



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI - MPEG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
– BOTÂNICA TROPICAL



SUZANA MARQUES BARBOSA

RESPOSTAS ANATÔMICAS E HISTOQUÍMICAS DE *Aeollanthus suaveolens* MART.
EX SPRENG. (LAMIACEAE) À VARIAÇÃO NA INTENSIDADE LUMINOSA

BELÉM

2017

SUZANA MARQUES BARBOSA

**RESPOSTAS ANATÔMICAS E HISTOQUÍMICAS DE *Aeollanthus suaveolens* MART.
EX SPRENG. (LAMIACEAE) À VARIACÃO NA INTENSIDADE LUMINOSA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciências Biológicas: área de concentração Botânica tropical, para obtenção do título de Mestre.
Orientadora: Profa. Dra. Ely Simone Cajueiro Gurgel
Coorientador: Prof. Dr. Marco Antônio Menezes Neto

BELÉM

2017

SUZANA MARQUES BARBOSA

**RESPOSTAS ANATÔMICAS E HISTOQUÍMICAS DE *Aeollanthus suaveolens* MART.
EX SPRENG. (LAMIACEAE) À VARIACÃO NA INTENSIDADE LUMINOSA**

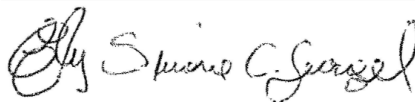
Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciências Biológicas: área de concentração em Botânica Tropical, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Ely Simone Cajueiro Gurgel

Coorientador: Prof. Dr. Marco Antônio Menezes Neto

Aprovada em 21 de fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Dra. ELY SIMONE CAJUEIRO GURGEL - Orientadora
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI – MPEG



Dra. FERNANDA ILKIU BORGES – 1º Examinadora
EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL



Dr. ROBERTO CÉZAR LOBO DA COSTA – 2º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA



Dr. RAFAEL GOMES VIANA - 3º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

AGRADECIMENTOS

A Deus, razão maior de minha vida e fonte de minha força diária.

À Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) pela pós-graduação.

Ao Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), pelo desenvolvimento do estudo e da pesquisa.

A Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus pais, João Barbosa e Zenaide Marques pelo apoio amor incondicional, paciência e compreensão nos momentos mais críticos da minha vida. Amo vocês!

Aos meus queridos orientadores, Dra. Ely Simone Gurgel e Dr. Marco Antônio Menezes Neto, professores e pesquisadores que acreditaram e confiaram na minha capacidade em desenvolver esse estudo, hoje, grandes amigos e meus exemplos de vida! Meus mais imensuráveis agradecimentos.

À Natália Couto, grande amiga e companheira de trabalho que nunca mediu esforços para me ajudar. Meus profundos agradecimentos!

Aos amigos do Laboratório de Anatomia do MPEG, Dra. Alba Lúcia, Breno Serrão, Wendell Vilhena, Thiara Mamoré, Olívia Ribeiro, Suzane Santa Brígida e Marina Santos, pelo acolhimento no LAVEG, ensinamentos e momentos de alegria.

Ao Laboratório de Biotecnologia da UFPA, ambiente que me acolheu durante toda a graduação e pós-graduação e me permitiu muitos bons momentos. Ao José Tavares e Álvaro Aleixo, pelos ensinamentos e auxílio nas atividades laboratoriais, grandes amigos que levarei para a vida toda.

Aos amigos do Laboratório de Sementes do MPEG, Mônica Falcão e Margoula Soares, pela amizade e convivência.

Aos meus amigos de graduação, Larissa Cardoso e Caio Crisley, pelo apoio e força incondicionais.

Aos meus companheiros de classe da pós-graduação, pela convivência diária, compartilhamento de informações e momentos descontração.

A todos que participaram de forma direta e indireta na realização desse estudo, deixo os meus inestimáveis agradecimentos.

*Aos meus queridos orientadores,
Simone Gurgel e Marco Antônio Neto,*

DEDICO

*A Deus,
Aos meus amados pais,
Zenaide e João,
pela sabedoria e amor,*
OFEREÇO

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. CONTEXTUALIZAÇÃO	10
REFERÊNCIAS	12
2. REPOSTAS ANATÔMICAS E HISTOQUÍMICAS DE <i>Aeollanthus suaveolens</i> MART. EX SPRENG. (LAMIACEAE) À VARIAÇÃO NA INTENSIDADE LUMINOSA.....	14
RESUMO	15
2.1. INTRODUÇÃO.....	16
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
2.2.1. Condições de cultivo	17
2.2.2. Microscopia de luz.....	17
2.2.3. Histoquímica.....	17
2.2.4. Frequência de estruturas secretoras	18
2.3. RESULTADOS	18
2.4. DISCUSSÃO	19
2.5. LITERATURA CITADA	23
3. ESTRUTURAS SECRETORAS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE <i>Aeollanthus</i> <i>suaveolens</i> MART. EX SPRENG. (LAMIACEAE) EM RESPOSTA A VARIAÇÃO NA INTENSIDADE LUMINOSA	31
3.1. INTRODUÇÃO	33
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.2.1. Microscopia de luz.....	34
3.2.2. Testes histoquímicos	34
3.3. RESULTADOS	35
3.4. DISCUSSÃO.....	36
3.5. LITERATURA CITADA.....	39
4. CONCLUSÕES GERAIS	47
ANEXO 1	48

RESUMO

Aeollanthus suaveolens Mart. ex Spreng. é uma aromática pertencente à Lamiaceae, que apresenta óleo essencial constituído por inúmeros monoterpenos e sesquiterpenos responsáveis pela aromaticidade de suas folhas. A espécie apresenta alguns estudos químicos e biológicos relacionados à composição química de seu óleo essencial rico em linalol e β -farneseno, e escassos estudos anatômicos e ecológicos, sobretudo em resposta a fatores ambientais, como a intensidade luminosa. Nesse contexto, objetivou-se verificar as respostas anatômicas de *A. suaveolens* em resposta a duas intensidades de luz: 50% luz (meia sombra - MS) e 100% luz (pleno sol - PS), bem como identificar estruturas secretoras e a influência da intensidade luminosa sobre seus secretados. A região mediana do limbo do 4º nó e segmento internodal entre 3º e 4º nós de 8 plantas de cada condição de luz, ambos no sentido ápice-base, foram utilizados para estudos anatômicos; testes histoquímicos para identificação de lipídios, óleo essencial, alcaloides, compostos fenólicos, lactonas sesquiterpênicas, mucilagem e taninos; e para contagem de estruturas secretoras, utilizou-se microscopia eletrônica de varredura. *Aeollanthus suaveolens* adaptou-se anatomicamente, quimicamente e estruturalmente em função da intensidade luminosa: plantas PS apresentaram acúmulo de compostos fenólicos na cutícula e na epiderme; formação de parênquima paliçádico; orientação paralela dos cloroplastos em relação à incidência luminosa; aumento na densidade de tricomas e delimitação cilíndrica do caule, enquanto que as plantas MS não acumularam compostos fenólicos na epiderme e na cutícula; o mesofilo não apresentou diferenciação; orientação perpendicular dos cloroplastos em relação à incidência de luz, menor densidade de tricomas e delimitação quadrangular do caule. O limbo e o caule de *A. suaveolens*, em secção transversal, apresentaram tricomas glandulares em ambas às faces foliares e na superfície do caule: a) peltado (TGP) com várias células epidérmicas basais, pedicelo unicelular curto e uma cabeça com 6-8 células secretoras; b) captado-curto (TGCC I) com uma célula basal, uma célula pedicelar curta e uma cabeça bicelular esférica; c) captado-curto II (TGCC II) com uma célula basal, uma célula pedicelar e cabeça unicelular ovoide; e d) captado-longo (TGCL) com uma célula basal, uma célula pedicelar e cabeça unicelular esféricas, sendo os dois últimos pouco frequentes. Óleo essencial foi identificado em todos os tipos morfológicos de tricomas glandulares, além de acúmulo em oleossomos no parênquima clorofiliano. As intensidades de luz estabelecidas no estudo não influenciaram a síntese de terpenos e lactonas sesquiterpênicas, entretanto houve síntese de compostos fenólicos e alcaloides em plantas PS. As respostas anatômicas e químicas obtidas em *A. suaveolens* sugerem modificações com o intuito de proteger o aparato fotossintético de danos provenientes do excesso radiação luminosa e otimizar a captura de luz fotossinteticamente ativa.

Palavras-chave: antocianina, β -farneseno, compostos fenólicos, linalol, oleossomos, óleo essencial, tricomas glandulares.

ABSTRACT

Aeollanthus suaveolens Mart. ex Spreng. is an aromatic belonging to Lamiaceae, which presents essential oil constituted by numerous monoterpenes and sesquiterpenes responsible for the aromaticity of its leaves. The species presents some chemical and biological studies related to the chemical composition of its essential oil rich in linalool and β -farnesene, and scarce anatomical and ecological studies, mainly in response to environmental factors such as light intensity. In this context, the aim was to verify the anatomical responses of *A. suaveolens* in response to two light intensities: 50% light (half shadow-HS) and 100% light (full sun-FS), as well as to identify secretory structures and influence of the luminous intensity on its secreted ones. The median limbus region of the 4th node and internodal segment between 3rd and 4th nodes of 8 plants of each light condition, both apex-base, were used for anatomical studies; histochemical tests for identification of lipids, essential oil, alkaloids, phenolic compounds, sesquiterpene lactones, mucilage and tannins; and for scanning of secretory structures, scanning electron microscopy was used. *Aeollanthus suaveolens* adapted anatomically, chemically and structurally as a function of light intensity: PS plants presented accumulation of phenolic compounds in the cuticle and epidermis; formation of palisade parenchyma; parallel orientation of the chloroplasts in relation to the light incidence; increase in trichome density and cylindrical stem delimitation, while MS plants did not accumulate phenolic compounds in the epidermis and in the cuticle; the mesophyll showed no differentiation; perpendicular orientation of chloroplasts in relation to light incidence, lower density of trichomes and quadrangular delimitation of the stem. The limb and stem of *A. suaveolens* showed a glandular trichome on both leaf faces and on the surface of the stem: a) pellet (TGP) with several basal epidermal cells, a short unicellular pedicel and a head with 6-8 secretory cells; B) short-capped (TGCC I) with a basal cell, a short pedicellar cell and a two-celled spherical head; C) short-capped II (TGCC II) with a basal cell, a pedicellar cell and a single-celled ovoid head; And d) long-capped (TGCL) with a basal cell, a pedicellar cell and a spherical unicellular head, the latter two being infrequent. Essential oil was identified in all morphological types of glandular trichomes, as well as accumulation in oleosomes in the chlorophyllous parenchyma. The light intensities established in the study did not influence the synthesis of sesquiterpene terpenes and lactones, however there was synthesis of phenolic compounds and alkaloids in PS plants. The anatomical and chemical responses obtained in *A. suaveolens* suggest modifications in order to protect the photosynthetic apparatus from damage from excessive light radiation and to optimize the capture of photosynthetically active light.

Key words: anthocyanin, β -farnesene, essential oil, glandular trichomes, linalool, phenolic compounds, oleosomes.

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Lamiaceae Martinov. (Labiatae Adanson) pertence a Lamiales Bromhead e apresenta cerca de 7.200 espécies em 240 gêneros, sendo várias espécies aromáticas e medicinais (HARLEY et al., 2010). Apresentam-se morfologicamente diversificadas e cosmopolitas, sendo particularmente abundante na região do Mediterrâneo (HARLEY et al., 2004). A família é conhecida pela síntese de óleos essenciais contendo inúmeros terpenos voláteis, acumulados em estruturas secretoras distribuídas em órgãos vegetativos e reprodutivos e, que, geralmente, apresentam bioatividade antibacteriana, antifúngica, inseticida e antioxidante (HARLEY et al., 2004).

Weiss (1997) relata que as estruturas secretoras são consideradas sítios de biossíntese metabólica primária e/ou secundária de secreção e/ou armazenamento. A síntese e/ou acúmulo de óleos essenciais variam em sua localização e podem ocorrer em estruturas especializadas: tricomas glandulares (Lamiaceae e Verbenaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Poaceae, Lauraceae e Piperaceae), bolsas lisígenas e esquizolisígenas (Pinaceae e Rutaceae) e canais oleíferos (Apiaceae) (SIMÕES et al., 2004). Os tricomas secretores são considerados os principais sítios secretores de óleo essencial em Lamiaceae, apresentando diversidade de tipos morfológicos e classe de metabólitos secundários. Geralmente, os tricomas são compostos por agrupamento de células ou células individualizadas, no entanto, podem diferir na forma e material secretado (VON POSER; MENTZ, 2001).

O metabolismo vegetal produz dois tipos distintos de produtos: metabólitos primários e metabólitos secundários. Enquanto os metabólitos primários são essenciais às plantas durante o seu desenvolvimento, os metabólitos secundários apresentam ação biológica que garante vantagens adaptativas a condições ambientais e estão divididos em três grupos químicos distintos: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides, e são originados por diferentes rotas dos metabólitos primários (TAIZ; ZEIGER, 2004).

De acordo com Cardoso (2010), os testes histoquímicos fornecem informações sobre as principais classes de metabólitos e sua distribuição nos órgãos, subsidiando relações entre o exsudato da estrutura secretora e a influência de fatores ambientais. Maraschin e Verporte (1999) relatam que os compostos resultantes do metabolismo secundário exercem ação protetora em resposta a fatores abióticos e sua síntese está associada à deficiência de nutrientes, regime hídrico, alterações de temperatura, níveis de luminosidade e exposição à luz ultravioleta, além de atuarem, principalmente, na proteção contra a herbivoria. Podem ainda, influenciar diretamente na produção e composição do óleo essencial (TAIZ; ZEIGER

2004; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Estudos sobre os efeitos de condições ambientais na estrutura interna das plantas são de fundamental importância, pois podem existir relações entre a organização dos tecidos vegetais e a produção dos diferentes metabólitos. A estrutura foliar pode ser um forte indicador da disponibilidade de luz durante o desenvolvimento das plantas, além da capacidade de adaptação de suas estruturas internas, conferindo amplo potencial de aclimação (BJÖRKMAN, 1981).

Aeollanthus apresenta 45 espécies e são ervas aromáticas ou subarbustos perenes ou anuais (JAARSVELD, 2002). Dentro deste gênero se encontra *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng., conhecida popularmente como catinga-de-mulata, chegadinha, bergamotinha e macassá (BERG, 1982). A espécie tem origem africana, sendo encontrada em Sudão do Sul, Quênia, África do Sul e na Nigéria, onde é cultivada para fins alimentícios (HANELT et al., 2001). No Brasil, é cultivada com finalidade ritualística afro-brasileira (HANELT et al., 2001) e medicinal (ALMEIDA; ALBUQUERQUE, 2002).

Aeollanthus suaveolens apresenta alguns estudos químicos e biológicos relacionados à composição química de seu secretado rico em compostos voláteis, contudo, carece de estudos morfológicos, anatômicos e ecológicos, principalmente no que se refere à influência de fatores externos sobre a composição química do óleo essencial.

No primeiro artigo, serão abordados aspectos anatômicos de *Aeollanthus suaveolens* cultivados sob duas intensidades luminosas, com o intuito de identificar suas adaptações anatômicas, estruturais e químicas adquiridas em resposta à alteração na intensidade luminosa.

No segundo artigo, serão identificadas as estruturas secretoras de *Aeollanthus suaveolens* e a influência da intensidade luminosa sobre a síntese das principais classes de metabólitos secundários (alcaloides, terpenos e compostos fenólicos).

Os artigos foram formatados de acordo com as normas da revista internacional *Annals of Botany*.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. F. C. B. R.; ALBUQUERQUE, U. P. Check-list of the family Lamiaceae in Pernambuco, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 3, p. 343-353. 2002.
- BERG, M. E. V. **Plantas Medicinais na Amazônia – Contribuição ao seu Conhecimento Sistemático**. CNPQ/PTU. Belém, p.223, 1982.
- BJORKMAN O. Responses to different quantum flux densities. In: LANGE O; NOBEL PS; OSMONA CB; ZIEGLER H. (eds.). **Physiological plant ecology**. Responses to the physical environment. New York: Springer-Verlang, p. 57-60, 1981.
- CARDOSO, P. R. **Estruturas secretoras em órgãos vegetativos aéreos de *Passiflora alata* Curtis e *P. edulis* Sims (Passifloraceae) com ênfase na localização *in situ* de compostos bioativos**. 2010. Dissertação (Mestrado em biologia vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2010.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.
- HANELT, P.; BUTTNER, R.; DIEDERICHSEN, A.; DORFELT, H.; FRITSCH, R.; HAMMER, C.; HAWKES, J.G.; HELLER, J.; JEFFREY, C.; KELLER, J.; KREBS, G.; KRUSE, J.; LESTER, R.N.; MULLER, G.K.; NATHO, G.; OCHSMANN, J.; PISTRICH, K.; REIBER, W.; SPECHT, C.E. E WEBER, H.E. **Mansfeld's encyclopedia of agricultural and horticultural crops**. Springer, Institute of plant genetics and crop plant research (Eds.), p. 1947, 2001.
- HARLEY, R.M.; ATKINS, S.; BUDANTSEV, A.; CANTINO, P.H.; CONN, B.; GRAYER, R.; HARLEY, R.M.; K.O.K., R.; KRESTOVSKAJA, T.; MORALES, A.; PATON, A.J.; RYDING, O. & UPSON, T. Labiatae. In: Kadereit, J.W. (ed.). **The families and genera of vascular plants**. Kubitzki, K.: ed. 7, p. 167-275, 2004.
- HARLEY, R.M.; FRANÇA, F.; SANTOS, E.P. E SANTOS J.S. Lamiaceae. In: **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Vol. 2. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. p. 1130-1146, 2010.
- JAARSVELD, E.V. Illustrated handbook of succulent plants: Dicotyledons. Springer, Urs Egli, p. 289-290, 2002.
- MARASCHIN, M. E.; VERPORTE, R. Engenharia do metabolismo secundário. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 10, p. 24-28, 1999.
- SIMÕES, C. M. O. E SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES C. M. O et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 468-495, 2004.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ed. Porto Alegre. Artmed. p. 719, 2004.

VON POSER, G. L.; MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 63-76, 2001.

WEISS, E. A. **Essential oil crops**. New York, NY: CAB International, 1997.

**2. REPOSTAS ANATÔMICAS E HISTOQUÍMICAS DE *Aeollanthus suaveolens*
MART. EX SPRENG. (LAMIACEAE) À VARIAÇÃO NA INTENSIDADE
LUMINOSA**

Suzana Marques Barbosa^{*1}, Marco Antônio Menezes Neto², Natália do Couto Abreu³ e

Ely Simone Cajueiro Gurgel^{*4}

^{1,4} Museu Paraense Emílio Goeldi, Coordenação de Botânica, Avenida Perimetral, 1901, Belém, PA, 66077-530.

E-mail: suzanamarques2006@yahoo.com.br e esgurgel@emilio-goeldi.br

1 RESUMO

2 *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. é uma espécie aromática pertencente à Lamiaceae,
3 que apresenta óleo essencial contendo grande diversidade de monoterpenos e sesquiterpenos.
4 Apresenta vários estudos relacionados à composição química de seu óleo essencial, entretanto
5 escassas informações sobre seus aspectos anatômicos, sobretudo seu comportamento em
6 resposta a fatores ambientais, como a intensidade luminosa. Dessa forma, objetivou-se
7 verificar adaptações anatômicas e histoquímicas de *A. suaveolens* em resposta a duas
8 intensidades luminosas: 50% de luz (Meia Sombra-MS) e 100% de luz (Pleno Sol-PS). A
9 região mediana do limbo do 4º nó e região internodal entre 3º e 4º nós de 8 plantas, foram
10 submetidas a secções histológicas, testes histoquímicos e frequência de estruturas secretoras
11 através de microscopia de luz, microscopia de fluorescência e microscopia de varredura. A
12 espécie apresentou diferenças em função da intensidade luminosa: plantas PS acumularam
13 compostos fenólicos na cutícula e na epiderme; formação de parênquima paliçádico;
14 orientação dos cloroplastos paralela à incidência luminosa; maior densidade de tricomas e
15 caule em formato cilíndrico; enquanto que plantas MS não acumularam compostos fenólicos
16 na epiderme e cutícula; o mesofilo não apresentou diferenciação; houve orientação
17 perpendicular dos cloroplastos a incidência luminosa, menor densidade de tricomas e caule
18 em formato quadrangular. *Aeollanthus suaveolens* apresentou adaptações anatômicas,
19 histoquímicas e estruturais em resposta a variações na intensidade luminosa com a possível
20 finalidade de proteger o tecido fotossintético de danos provocados pelo excesso de radiação
21 luminosa.

22

23 **Palavras-chave:** radiação, antocianina, compostos fenólicos, tricomas, parênquima
24 paliçádico, oleossomos.

25

2. 1. INTRODUÇÃO

A energia luminosa, de acordo com Wang e Guo (2007), é um dos fatores ambientais que mais apresenta influência na síntese e/ou acúmulo de metabólitos primários e secundários, além de alterar aspectos morfológicos, anatômicos e fisiológicos dos vegetais. A plasticidade anatômica dos vegetais, em função da radiação solar, depende de ajustes na organização do tecido fotossintético no intuito de tornar eficaz a conversão de energia em carboidratos e, consequentemente, promover o crescimento do vegetal (Alvarenga et al., 2003).

A anatomia foliar pode ser fortemente influenciada pela radiação recebida durante o crescimento, uma vez que a sua estrutura interna se adapta a condições externas do ambiente em que se encontra, como por exemplo, o aumento da espessura foliar e da epiderme (Castro et al., 1998; Lee et al., 2000; Hanba et al., 2002; Schluter et al., 2003). Além das adaptações que ocorrem nos tecidos fotossintetizantes do mesofilo, modificações nos níveis de intensidade luminosa também podem provocar mudanças significativas na densidade de tricomas (Castro et al. 2007).

As folhas que se desenvolvem sob altos níveis de radiação luminosa, geralmente, apresentam maior espessamento da lâmina foliar em decorrência do aumento na espessura do parênquima clorofiliano (Lambers et al., 2008), conforme observado em *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae) cultivada a pleno sol por Boeger et al. (2009) e em *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) sobre diferentes níveis de luz por Castro et al. (2007).

Aeollanthus suaveolens Mart. ex Spreng. é uma aromática suculenta de Lamiaceae e conhecida popularmente como catinga-de-mulata, chegadinha, macassá, bergamotinha e taia (Albuquerque, 1989). Na literatura, não há registros sobre aspectos anatômicos, histoquímicos e agrônômicos da espécie, principalmente relacionados à influência de fatores externos. Nesse contexto, objetivou-se com esse estudo, verificar as respostas anatômicas e estruturais de *Aeollanthus suaveolens* em resposta a variação na intensidade luminosa.

2. 2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Condições de cultivo

Plantas jovens de *Aeollanthus suaveolens* foram cultivadas em casas de vegetação sob duas condições de luz, a pleno sol (PS: 100% de luz) e a meia sombra (MS: 50%) com auxílio de sombrite, sob mesmas condições de substrato, adubação e água, por 60 dias no período de Junho a Julho de 2016. Para estudo anatômico, espessura do limbo, testes histoquímicos e densidade de tricomas, foram utilizadas a região mediana do limbo do 4º segmento nodal (sentido ápice-base) e segmentos internodais entre o 3º e 4º nós de 8 plantas.

2.2.2. Microscopia de luz

Secções transversais e paradérmicas obtidas de material fresco do caule e da folha, feitas a mão com auxílio de lâmina de aço inoxidável, foram analisadas sem coloração (corte em branco) para observação de pigmentos acumulados em plantas cultivadas a pleno sol e a movimentação de cloroplastos.

As demais secções obtidas, da folha e do caule, foram submetidas à clarificação com hipoclorito de sódio (2%), lavados em água destilada e submetidos à dupla coloração com safranina e azul de astra em solução aquosa (Bukatsch, 1972). As fotomicrografias foram utilizadas para descrições anatômicas e espessura do limbo. As médias obtidas do espessamento do limbo de ambas as condições de luz serão submetidas ao test *t* em programa computacional STATISTICA 6.0 e o nível de confiabilidade foi de 95%.

2.2.3. Histoquímica

Secções transversais da folha e do caule, feitas a mão, foram tratadas com vermelho neutro e observadas sob microscopia de fluorescência com filtro verde em UV para detecção de compostos fenólicos (Kirk, 1970).

2.2.4. Frequência de estruturas secretoras

Secções do caule e da região mediana do limbo foram fixadas em solução de FAA70% (Formaldeído, ácido acético e álcool) por 24 horas e desidratadas em série etílica (Johansen, 1940). Para obtenção das eletromicrografias, o material previamente desidratado foi processado em secador de ponto crítico usando o CO₂ como líquido de transição (Bozzola e Russel, 1991), montados em *stubs* com fita adesiva *dupla face* de carbono e metalizadas com ouro (Robards, 1978). As regiões medianas do limbo (face abaxial e adaxial) e do caule foram delimitadas em quadrantes de 1 mm² e a frequência das secretoras submetidas a média aritmética. A comparação das médias foi realizada utilizando o teste t para abundância de estruturas secretoras entre as faces foliares e entre os tratamentos Pleno Sol (PS) e Meia Sombra (MS). A análise foi feita através do programa computacional STATISTICA 6.0 e o nível de confiabilidade foi de 95%.

2.3. RESULTADOS

As células epidérmicas da lâmina foliar, em secção paradérmica, apresentaram paredes anticlinais delgadas e sinuosas, revestidas por cutícula lisa, além de acúmulo de antocianina em plantas PS (Fig. 1A). Estômatos predominantemente diacíticos e, raramente anisocíticos, sendo a folha anfiestomática em ambas as condições de luz (Fig. 1A).

Houve acúmulo de compostos fenólicos na cutícula (Fig. 1B), inclusive revestindo os tricomas de plantas PS (Fig. 1C). Observou-se outra classe de composto fenólico: antocianina na epiderme do limbo (Fig. 1A) e do caule (Fig. 1I) de plantas PS, enquanto que plantas MS não acumularam o referido composto. Em secção transversal, o limbo de *Aeollanthus suaveolens* apresentou reação positiva para compostos fenólicos na cutícula e epiderme de ambas as superfícies foliares (Fig. 1D). A epiderme, em secção transversal, de ambas as condições de luz, apresentou camada unisseriada de células heterodiamétricas e cutícula delgada (Fig. 1E-F). As intensidades luminosas influenciaram a organização do mesofilo:

1 formação 1-2 camadas de parênquima paliçádico e 3-4 camadas de parênquima indiferenciado
2 no tratamento PS (Fig. 1E), enquanto que em plantas MS apresentaram mesofilo
3 indiferenciado com 5-6 camadas (Fig. 1F). Inúmeros oleossomos e feixes vasculares
4 colaterais na extensão do parênquima foram comuns a ambos os tratamentos. A variação na
5 intensidade luminosa provocou o aumento na espessura do limbo (p : 0,002). Além da
6 formação do parênquima paliçádico, observou-se a orientação paralela dos cloroplastos em
7 relação à incidência luminosa de plantas PS (Fig. 1G), enquanto que plantas MS tiveram
8 orientação perpendicular à incidência luminosa (Fig. 1H).

9 A epiderme do caule, em secção paradérmica e em ambas as condições de luz,
10 apresentou células unisseriadas e retangulares; exceto na base dos tricomas secretores, onde se
11 mostraram levemente globosas (Fig. 1I). Em plantas MS, a delimitação do caule apresentou-
12 se quadrangular e o córtex preenchido por 1-2 camadas de colênquima angular seguido de 8-
13 10 camadas de células parenquimáticas isodiamétricas. Também foi observada a formação do
14 câmbio interfascicular e agrupamento de células esclerenquimáticas sobrepondo os feixes
15 floemáticos, bem como feixes colaterais em regiões fasciculares (Fig. 1J). Em plantas PS, o
16 caule apresentou a mesma organização descrita anteriormente, entretanto houve delimitação
17 cilíndrica em decorrência da atividade cambial avançada e formação de xilema e floema em
18 várias regiões do câmbio (Fig. 1K).

19 No limbo, a densidade de tricomas foi semelhante entre as faces foliares (p : 0,085),
20 entretanto houve diferença significativa entre as intensidades de luz (p : 0,003). A densidade
21 de tricomas do caule não foi influenciada pelas intensidades luminosas (p : 0,070) (Fig. 2A-D).

23 2.4. DISCUSSÃO

24 Fahn e Cutler (1992) relatam que a folha anfiestomática é comum a espécies ocorrentes
25 em ambientes áridos com alta incidência luminosa. Em decorrência desse tipo de habitat,
26 podem apresentar folhas espessas e dificuldade na difusão interna de CO₂ (Boeger &

1 Gluzezak, 2006). A característica é comumente observada em muitas espécies descritas em
2 Lamiaceae.

3 O aumento na intensidade luminosa induziu a síntese/acúmulo de antocianina nas
4 células epidérmicas do limbo do caule de *Aeollanthus suaveolens*, o que sugere uma medida
5 de fotoproteção causada pelo estresse luminoso. Alguns autores estabelecem relações entre
6 intensidade de radiação solar e a produção de compostos fenólicos (Markham et al., 1998;
7 Tattini et al., 2004), como as antocianinas (Grace et al., 2000; Jeong et al., 2004).

8 As antocianinas apresentam coloração que variam do vermelho ao azul (Degáspari e
9 Waszczynskyj, 2004) e são acumuladas, principalmente, em tecidos superficiais, absorvendo
10 comprimentos de onda de luz na faixa de 400 a 600 nm (Close e Beadle, 2003) e funcionando
11 como filtro no excesso de radiação fotossinteticamente ativa (Caldwell et al., 1983; Bieza e
12 Lois, 2001). A síntese desses compostos é controlada por enzimas da rota biossintética dos
13 fenilpropanoides e pode ter sua expressão gênica induzida pela luz (Chappell e Hahlbrock,
14 1984; Bharti e Khurana, 1997).

15 Cruz et al. (2012) cultivaram duas espécies suculentas de *Kalanchoe* Adans.
16 (Crassulaceae) sob quatro intensidades luminosas e observaram que as plantas cultivadas a
17 pleno sol adquiriram pigmentação avermelhada na epiderme do caule, pecíolo e limbo.
18 Resposta semelhante foi observada em *A. suaveolens* cultivada a pleno sol, sugerindo que as
19 antocianinas atuem como dissipador de energia solar UV-B e, conseqüentemente, protegendo
20 o tecido fotossintético de processos oxidativos.

21 A cutícula de plantas PS apresentou acumulou compostos fenólicos, indicando uma
22 barreira inicial em resposta a alta incidência luminosa. Somerville et al. (2000) relatam que a
23 composição química da cutícula, além de poliésteres, pode apresentar compostos lipofílicos
24 em sua composição, como alguns hidrocarbonetos, terpenos e fenois. Este último foi
25 evidenciado por microscopia de fluorescência em plantas PS, inclusive revestindo os tricomas

glandulares e não glandulares, enquanto que plantas MS não apresentaram acúmulo de compostos fenólicos, indicando uma primeira adaptação de fotoproteção, antes mesmo de atingir a epiderme contendo antocianina em plantas PS. Resposta semelhante foi visualizada em *Phillyrea latifolia* L. (Oleaceae) (Tattini et al., 2000), que acumulou compostos fenólicos (flavonoides) na epiderme e tricomas quando foi exposta à alta radiação solar natural.

Fernandes et al. (2014) cultivaram *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) sob três intensidades luminosas (25%, 50% e 75%) e observaram que o espessamento do mesofilo, em função dos tratamentos, foi resultado do alongamento celular e formação do parênquima paliçádico, pois o número de camadas constituintes do mesofilo manteve-se inalterado. De acordo com Boeger et al. (2009) e Lambers et al. (2008), o aumento da espessura do parênquima paliçádico, observado em condições de exposição a maiores níveis de radiação, pode ocorrer devido à adição de novas camadas de parênquima paliçádico, pelo alongamento de células ou pela combinação desses dois fatores. *Aeollanthus suaveolens* apresentou maior espessamento no mesofilo em plantas PS, em decorrência da formação de 1-2 camadas de parênquima paliçádico, considerando-se que não houve alteração no número de camadas do parênquima fotossintetizante.

Taiz e Zeiger (2004) comentam que o parênquima paliçádico funciona como um filtro de luz, uma vez que é a primeira camada fotossintética ativa a receber a energia solar, funcionando como canalizador de luz visível através da propagação pelos vacúolos até a chegada de luz nas camadas mais internas da folha.

A movimentação dos cloroplastos também foi evidente em *A. suaveolens*, que se apresentaram paralelos em relação à incidência luminosa nas plantas PS, enquanto que em plantas MS, os cloroplastos se orientaram perpendicularmente. A movimentação dos cloroplastos também foi observada em algas, musgos e plantas superiores (Haupt e Scheuerlein 1990). Taiz e Zeiger (2004) relatam que a referida movimentação ocorre em

1 resposta à luz azul, no intuito de controlar a quantidade de luz incidente a ser absorvida, o que
2 provavelmente ocorreu em *Aeollanthus suaveolens* em resposta a variação na intensidade
3 luminosa. Os mesmos autores relata que a movimentação também pode evitar a
4 fotodegradação de pigmentos fotossintetizantes pelo excesso de raios UV. Os mesmos autores
5 relatam que, em baixa incidência luminosa, os cloroplastos dispõem-se paralelamente ao
6 plano da folha e alinhados perpendicularmente à luz incidente, posição essa que maximiza a
7 absorção de luz.

8 Agrupamentos de células esclerenquimáticas no caule são frequentemente descritos em
9 Lamiaceae (Metcalf e Chalk, 1950), bem como regiões cambiais interfasciculares e feixes
10 colaterais em dicotiledôneas herbáceas (Esaú, 1977). Tais características são condizentes com
11 o corpo primário de *A. suaveolens* cultivada a meia sombra. Essas características também
12 foram observadas nas suculentas *Plectranthus neochilus* Schltr. (Duarte e Lopes, 2007) e
13 *Plectranthus barbatus* Andrews (Scavone, 1965), cujos feixes vasculares formam regiões
14 fasciculares (Esaú, 1977). Esse padrão anatômico mostrou-se em avançado estágio de
15 desenvolvimento em *A. suaveolens* cultivada a pleno sol, evidenciando o crescimento
16 secundário e seu formato cilíndrico.

17 Tattini et al. (2000), verificando as adaptações de *Phillyrea latifolia* (Oleaceae),
18 cultivada em dois tipos de ambientes (sombreado e a pleno sol), observaram que, a pleno sol,
19 o número de tricomas na folha duplicou em relação a plantas cultivadas em ambiente
20 sombreado, e que houve síntese de compostos fenólicos (flavonoides) na cutícula, revestindo
21 os tricomas. Espíndola Júnior et al. (2009) submetendo *Mikania glomerata* Spreng. à três
22 intensidades luminosas (100%, 26,4% e 13,8%), observaram que a densidade de tricomas em
23 plantas cultivadas a pleno sol (100%) aumentou aproximadamente duas vezes a densidade de
24 tricomas em plantas cultivadas a sombra (13,8%).

25 Em ambas as condições citadas, os altos níveis de radiação promoveram aumento

significativo no número de tricomas, semelhante ao observado em *A. suaveolens*, que apresentou aproximadamente o dobro do número de tricomas glandulares em plantas a pleno sol, evidenciando a influência da intensidade luminosa sobre a densidade de estruturas secretoras.

FONTE FINANCIADORA

PNADB (Programa Nacional de Apoio ao Desenvolvimento da Botânica)

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos, ao laboratório de biotecnologia do NUMA da UFPA pelo cultivo das plantas, ao museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) pela execução do estudo e à Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) pela pós-graduação.

2.5. LITERATURA CITADA

Albuquerque UP. 1989. Manejo tradicional de plantas em regiões neotropicais. *Acta Botânica Brasílica* **13**: 307-315.

Alvarenga AA, Castro EM, Lima Junior EC, Magalhães M. 2003. *Croton urucurana* Baill in southeastern Brazil. *Revista Árvore* **27**: 1-7.

Bharti AK, Khurana JP. 1997. Mutants of *Arabidopsis* as tools to understand the regulation of phenylpropanoid pathway and UVB protection mechanisms. *Photochemistry and photobiology* **65**: 765–776.

Bieza K, Lois R. 2001. An *Arabidopsis* mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. *Plant Physiology* **126**: 1105-1115.

Boeger MRT, Gluzezak RM. 2006. Adaptações estruturais de sete espécies de plantas para as condições ambientais da área de dunas de Santa Catarina, Brasil. *Iheringia, Série Botânica* **61**: 73-82.

Boeger MRT, Espíndola Júnior A, Maccari Júnior A, Reissmann CB, Atala Alves ACA, Rickli FL. 2009. Variação estrutural foliar de espécies medicinais em consórcio com erva-mate sob diferentes intensidades luminosas. *Floresta*, **39 (1)**: 215-225.

Bozzola JJ, Russell LD. 1991. Electron Microscopy. In: Bozzola JJ, Russel LD, eds. *Principles and Techniques for Biologists*. Boston: Jones and Bartlett Publishers, p. 542.

Bukatsch, F. 1972. Bemerkungen zur doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* **6**: 255.

Caldwell MMR, Robberecht R, Flint SD. 1983. Internal filters: prospects for UV acclimation in higher plants. *Plant Physiology* **58**: 445–450.

Castro EM, Gavilanes ML, Alvarenga AA, Castro DM, Gavilanes TOT. 1998. Aspectos da anatomia foliar de mudas de *Guarea guidonea* (L.) Sleumer sob diferentes níveis de sombreamento. *Daphne* **8**: 31-35.

Castro EM, Pinto JEBP, Soares AM, Melo, HC, Bertalucci SKV, Vieira CV; Júnior ECL. 2007. Adaptações anatômicas de folhas de *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae) em três regiões distintas da planta, em diferentes níveis de sombreamento. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **9**: 8-16.

Chappell J, Hahlbrock K. 1984. Transcription of plant defense genes in response to UV light or fungal elicitor. *Nature* **311**:76–78.

Close DC, Beadle CL. 2003. The Ecophysiology of Foliar Anthocyanin. *The Botanical Review* **69**: 149–161.

Cruz BP, Chedier LM, Peixoto PHP, Fabri RL, Pimenta DS. 2012. Effects of light intensity on the distribution of anthocyanins in *Kalanchoe brasiliensis* Camb. and *Kalanchoe pinnata* (Lamk.) Pers. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **84**: 211-217.

Degáspari CH, Waszcynskyj N. 2004. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica* **5**: 33-40.

Duarte MR, Lopes JF. 2007. Stem and leaf anatomy of *Plectranthus neochilus* Schltr., Lamiaceae. *Revista brasileira de Farmacognosia* **17**: 4.

Esau K. 1977. *Anatomy of seed plants*. 2th edn. New York: John Wiley.

Espindola Junior A, Boeger MRT, Júnior AM, Reissmann CB, Rickli FL. 2009. Variação na estrutura foliar de *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) sob diferentes condições de luminosidade. *Revista brasileira de Botânica* **32**: 4.

Fahn A, Cutler, D. 1992. Xerophytes. In: Spez, eds. *Encyclopedia of Plant Anatomy*. Berlin: Gebrüder Borntraeger, p. 87-98.

Fernandes VF, Bezerra LA, Mielke MS, Silva DC, Costa LCB. 2014. Anatomia e ultraestrutura foliar de *Ocimum gratissimum* sob diferentes níveis de radiação luminosa. *Ciência Rural* **44**: 1037-1042.

Grace SC, Logan BA. 2000. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences* **355**: 1499-1510.

Hanba YT et al. 2002. The effects of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in *Acer* species differing in light demand. *Plant Cell and Environment* **25**: 1021-1030.

Haupt, W, Scheuerlein, R. 1990. Chloroplast movement. *Plant, Cell and Environment*, **13**: 595-614.

Jeong ST et al. 2004. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science* **167**: 247-252.

Johansen, DA. 1940. Plant microtechnique. New York: Mcgraw-Hill Book, 523 p.

Kirk, PW. 1970. Neutral red as a lipid fluorochrome. *Stain Technology* **45**: 1-4.

Lambers, H, Chapim IFS, Pons, TL. 2008. Plant physiological ecology. 2 ed. Berlin: Springer.

Lee DW, Oberbauer SF, Johnson P, Khirnapilay B, Mansor M, Mohamad H, Yap SK. 2000. Effects of irradiance and espectrus quality on leaf structure and function in seedlings of two southeast aian *Hopea* (Diptenocarpeceae) species. *American Journal of Botany* **87**: 447-455.

Markham KR, Tanner GJ, Caasi-Lit M, Whitecross MI, Nayudu M, Mitchell KA. 1998. *Phytochemistry* **49**: 1913–1919.

Metcalf CR, Chalk L. 1950. *Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*, 4Th edn. Oxford: Clarendon Press.

Robards, AW. 1978. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cels. In: Hall JL, eds. *Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells*. New York: Elsevier, 343-403.

Scavone O. 1965. Contribuição ao estudo morfológico e anatômico de *Coleus barbatus* Benth., Labiatae. *Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica de São Paulo* **3**: 249-270.

Schluter, U. et al. 2003. Photosyntetic performance of an *Arabidopsis* mutant with elevated stomatal density (sdd1-1) under different light regimes. *Journal of Experimental Botany* **54**: 867-874.

1 **Somerville C, Browse J, Jaworski, Ohlrogge JB. 2000.** Lipids. In: Buchanan BB,
2 Gruissem W, Jones RL, eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. MD: American
3 Society of Plant Physiologists, Rockville p.509.

4 **Taiz L, Zeiger E. 2004.** *Fisiologia Vegetal*, 4th edn. Porto Alegre: Artmed.

5 **Tattini M, Gravano E, Pinelli P, Mulinacci N, Romani A. 2000.** Flavonoids
6 accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar
7 radiation. *Tree Physiology* **19**: 905-908.

8 **Wang R, Guo ZH. 2007.** Photosynthetic Responses of *Schima superba* Grown in
9 Different Light Regimes of Subtropical Evergreen Broadleaf Forest. *Forest Research* **20**:
10 688-693.

11
12
13

14

15

16

17

18

19

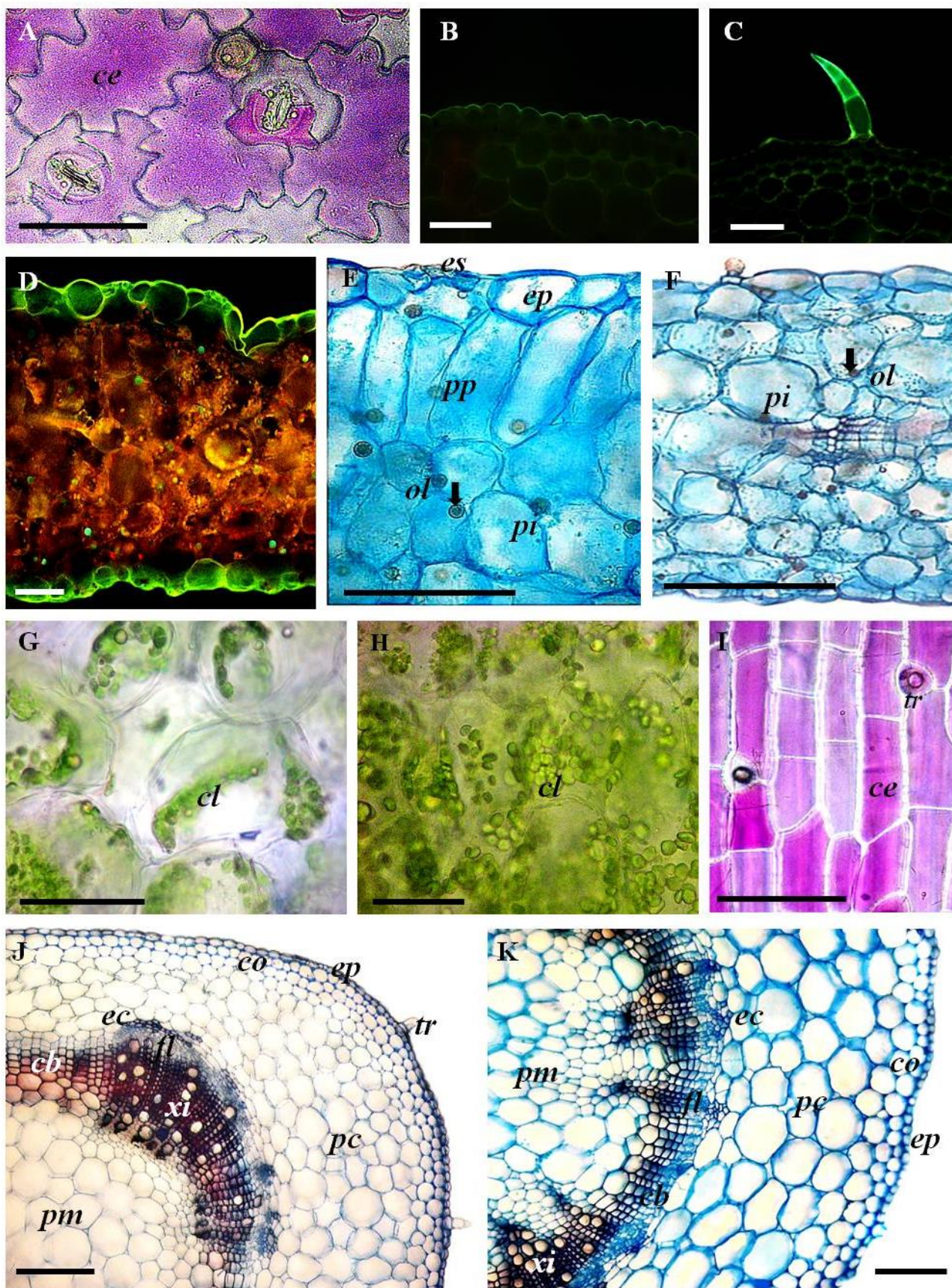
20

21

22

23

24

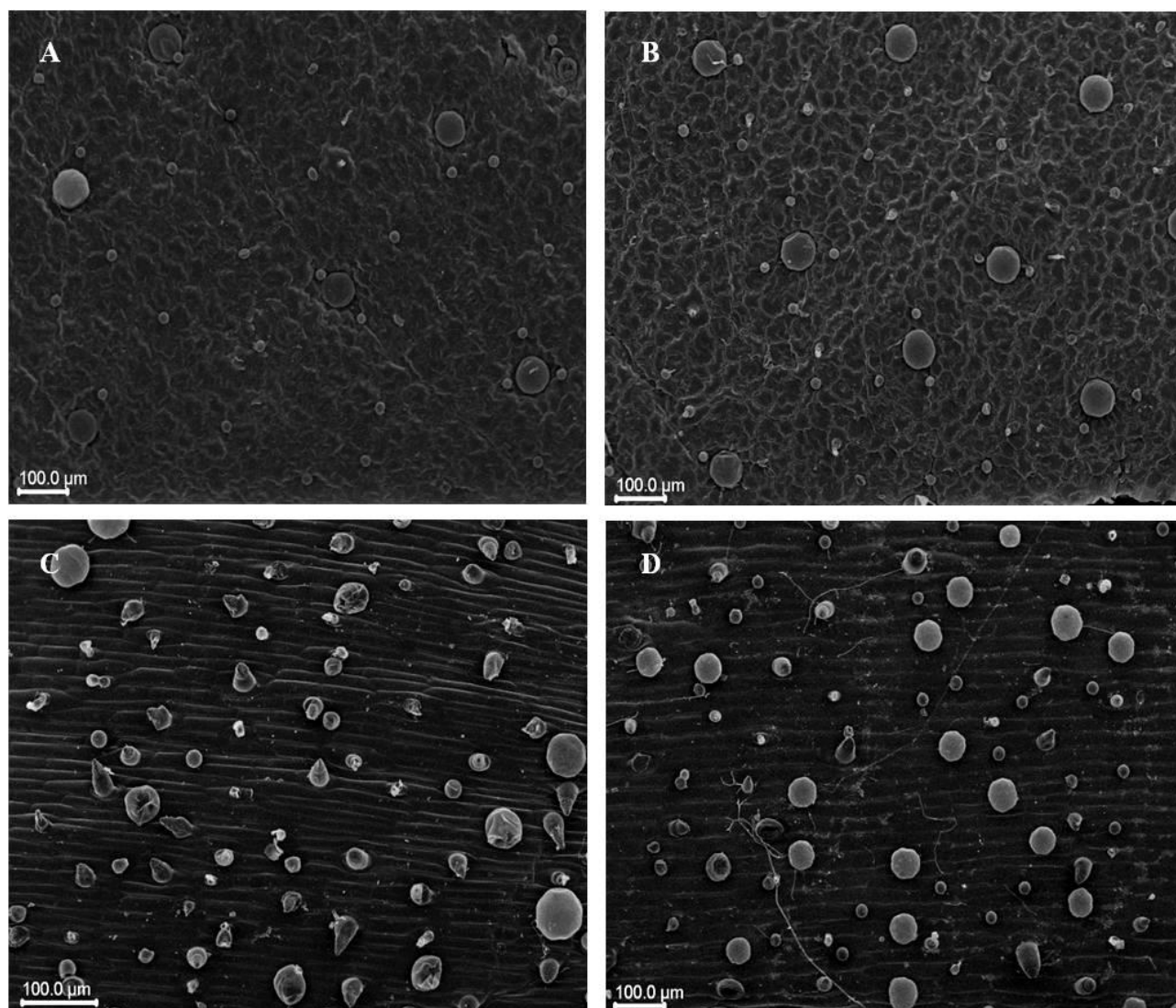


2 **Figura 1.** Secções transversais e paradérmicas do limbo e caule de *Aeollanthus suaveolens*

1 cultivadas a pleno sol e meia sombra. (A) *ce* em secção paradérmica de *A. suaveolens*
 2 mostrando estômatos diacíticos e acúmulo de antocianina em plantas PS sem prévia coloração
 3 (corte em branco). (B-D) acúmulo de compostos fenólicos em plantas PS evidenciados pelo
 4 teste histoquímico com corante vermelho neutro sob microscopia de fluorescência: (B) secção
 5 transversal do caule destacando a cutícula, (C) secção transversal de caule evidenciando
 6 cutícula de tricoma tector e (D) secção transversal do limbo evidenciando cutícula e epiderme
 7 de ambas as faces foliares. (E-F) secção transversal do limbo sob dupla coloração: (E) camada
 8 unisseriada de *pp*, *pi* e inúmeros *ol* em plantas PS e (F) *pi* e inúmeros *ol* em plantas MS. (G-
 9 H) orientação do *cl* em secção transversal do limbo sem prévia coloração (corte em branco):
 10 (G) paralela em relação à epiderme de planta MS e (H) perpendicular em relação à epiderme
 11 de planta PS. (I) secção paradérmica do caule evidenciando *ce* retangulares e acúmulo de
 12 antocianina em plantas PS sem prévia coloração (corte em branco). (J-K) secção transversal
 13 do caule sob dupla coloração: (J) planta MS mostrando a formação de *cb* interfascicular,
 14 feixes vasculares em regiões fasciculares e delimitação quadrangular e (K) planta PS
 15 evidenciando a formação de xilema secundário em várias regiões do *cb*. Abreviações: *ce*,
 16 célula epidérmica; *ep*, epiderme; *pp*, parênquima paliçádico; *pi*, parênquima indiferenciado;
 17 *ol*, oleossomo; *es*, estômato; *cl*, cloroplasto; *tr*, tricoma; *ec*, esclerênquima; *co*, colênquima;
 18 *pm*, parênquima medular; *pc*, parênquima cortical; *xi*, xilema; *fl*, floema; *cb*, câmbio, MS,
 19 meio sombra e PS, pleno sol. Escalas: (A) = 50 µm (B) = 100 µm, (C-F) = 200 µm, (G-I) =
 20 50 µm e (J-K) = 200 µm.

21

22



1
2 **Figura 2.** Densidade de tricomas nas faces adaxial e abaxial e caule de *Aeollanthus*
3 *suaveolens* cultivada a meia sombra (MS) e pleno sol (PS). (A-B) epiderme adaxial de *A.*
4 *suaveolens*: (A) cultivada a MS e (B) cultivada a PS. (C-D) epiderme do caule de *A.*
5 *suaveolens*: (C) PS e (D) MS. Abreviações: MS, meia sombra; PS, pleno sol. Escala: (A-D) =
6 100 µm.

3. ESTRUTURAS SECRETORAS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Aeollanthus suaveolens* MART. EX SPRENG. (LAMIACEAE) EM RESPOSTA A VARIAÇÃO NA INTENSIDADE LUMINOSA

Suzana Marques Barbosa^{1*}, Marco Antônio Menezes Neto², Natália do Couto Abreu³
e Ely Simone Cajueiro Gurgel^{*4}

^{1,4} Museu Paraense Emílio Goeldi, Coordenação de Botânica, Avenida Perimetral, 1901, Belém, PA, 66077-530.

E-mail: suzanamarques2006@yahoo.com.br e esgurgel@emilio-goeldi.br

RESUMO

A produção de óleo essencial em Lamiaceae está associada à tricomas glandulares que apresentam morfologia variada e podem acumular vários metabólitos secundários. Estudos fitoquímicos com *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. identificaram, na composição química de seu óleo essencial, vários monoterpenos e sesquiterpenos, dentre eles, como majoritários, o linalol e o β -farneseno. Nesse contexto, objetivou-se identificar estruturas secretoras e a influência de duas intensidades luminosas (50% e 100% de luz) sobre seus secretados. Para o estudo, o limbo do 4º nó e segmentos internodais entre o 3º e o 4º nós de 8 plantas foram submetidas a secções histológicas e testes histoquímicos para a detecção de lipídeos, alcaloides, terpenos, taninos, mucilagem e lactonas sesquiterpênicas. Foram identificados quatro tipos morfológicos de tricomas glandulares: um tipo peltado e três tipos de capitados. A síntese de terpenos e lactonas não foram influenciadas pelas intensidades luminosas, entretanto plantas cultivadas a pleno sol acumularam compostos fenólicos e alcaloides, evidenciando uma possível adaptação a altos níveis de radiação.

Palavras-chave: alcaloides, β -farneseno, compostos fenólicos, lactonas sesquiterpênicas, linalol, secreção, tricomas glandulares.

3.1. INTRODUÇÃO

Aeollanthus suaveolens Mart. ex Spreng. é uma aromática que vem despertando interesse devido a composição química de seu óleo rico em terpenos voláteis, e apresenta como componentes majoritários, o β -farneseno e o linalol (Tucker et al., 2001, Maia et al. 2003).

Em Lamiaceae, a síntese de óleo essencial está associada à tricomas glandulares, que são descritos como apêndices epidérmicos secretores com morfologia bastante variada em decorrência do número de células secretoras, tamanho da célula peduncular, volume de óleo secretado e arranjo na epiderme (Metcalf e Chalk, 1983).

A secreção pode ser descrita como complexo processo de separação ou isolamento de metabólitos do protoplasma celular, nos quais se inserem a síntese de substâncias, o acúmulo e o armazenamento em compartimentos internos da célula, em espaços intercelulares (subcuticulares e entre células adjacentes) e/ou na superfície externa da planta (Fahn, 1979, 1988; Schnepf, 1972). Embora estruturas secretoras tenham controle genético controlado, sua frequência pode ser influenciada por fatores ambientais como radiação, temperatura, fotoperíodo, regime hídrico e disponibilidade de nutrientes, além de agentes biológicos, como predadores e patógenos (Weker, 2000).

Os metabólitos secundários são derivados de precursores dos metabólitos primários e produzidos por meio de rotas biossintéticas diferentes, sendo armazenados e liberados através de estruturas do mesofilo ou da epiderme (Sangwan et al., 2001). A biossíntese de óleos essenciais em plantas aromáticas está condicionada a fatores ambientais e fisiológicos, que interagem entre si e podem levar à produção de diferentes metabólitos secundários (Castro et al., 2004). Alguns estudos mostram que fatores abióticos, como a radiação, podem afetar direta ou indiretamente a produção as vias biossintéticas dos metabólitos secundários e a produção do óleo essencial (Farooqi et al., 1999; Sangwan et al., 2001). Dessa forma,

objetivou-se verificar a influência de duas intensidades luminosas sobre a síntese de metabólitos secundários no exsudato de estruturas secretoras de *Aeollanthus suaveolens*.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

Plantas jovens de *Aeollanthus suaveolens* foram cultivadas por 60 dias sob duas intensidades luminosas, a primeira com sombrite e retenção de 50% luz (Meia sombra/MS), e a segunda com 100% luz (Pleno sol/PS), sob as mesmas condições de regime hídrico e nutricional no período de Junho a Julho de 2016. Para o estudo de estruturas secretoras e identificação de metabólitos secundários, foram utilizadas secções transversais e paradérmicas da região mediana do limbo do 4º segmento nodal (sentido ápice-base) e segmentos internodais entre 3º e 4º segmento nodal de 8 plantas.

3.2.1. Microscopia de luz

Secções transversais e paradérmicas do caule e do limbo, a mão livre com auxílio de lâmina de aço inoxidável, foram clarificadas com hipoclorito de sódio (2%) e, em seguida, submetidas à dupla coloração safranina/azul de astra em solução aquosa (Bukatsch, 1972) e montadas em glicerina 50%, segundo técnica modificada de Kraus e Arduin (1997).

3.2.2. Testes histoquímicos

As demais secções, obtidas do corte a mão livre, foram tratadas com solução: sudan IV (Jensen, 1962) para identificação de lipídios totais; vermelho neutro sobre UV (Kirk, 1970) para compostos fenólicos totais; reagente de Wagner (Furr e Mahlberg, 1981) para alcaloides; vanilina clorídrica (Mace e Howell, 1974) para taninos; azul de alcião (Pearse, 1985) para mucilagem, ácido sulfúrico (Geissmann e Griffin, 1971) para lactonas sesquiterpênicas e reagente de NADI (David e Carde, 1964) para identificação de terpenos em óleos essenciais e

1 óleo resina. Filtro verde em UV em microscopia de fluorescência para detecção de compostos
2 fenólicos utilizando-se o vermelho neutro como o reagente.

3.3. RESULTADOS

3 O limbo e o caule de *A. suaveolens*, em secção transversal, apresentaram os seguintes
4 tipos morfológicos de tricomas glandulares em ambas as faces foliares e superfície do caule:
5 a) tricoma glandular peltado (TGP) com várias células epidérmicas basais, pedicelo unicelular
6 curto e uma cabeça com 6-8 células secretoras (Fig. 1A-B); b) tricoma glandular captado-
7 curto (TGCC I) com uma célula basal, uma célula peduncular curta e uma cabeça bicelular
8 esférica (Fig. 1C-D); c) tricoma glandular captado-curto II (TGCC II) com uma célula basal,
9 uma célula pedicelar e cabeça unicelular elíptica (Fig. 1E); e d) tricoma glandular captado-
10 longo (TGCL) com uma célula basal, uma célula pedicelar e cabeça unicelular esférica (Fig.
11 1F). Os dois últimos tricomas glandulares foram pouco frequentes. Além de estruturas
12 secretoras exógenas (tricomas), foram encontradas estruturas secretoras endógenas
13 (oleossomos) no parênquima clorofiliano foliar de ambas as condições de luz. Os tricomas
14 foram identificados de acordo com a morfologia e nomenclatura utilizadas por Serrato-Valenti
15 et al. (1997), Ascensão et al. (1999) e Martins e Pastori (2004), para espécies de Lamiaceae.

16 As classes de metabólitos secundários secretados nos tricomas glandulares em *A.*
17 *suaveolens* apresentaram pequena variação entre os tipos morfológicos e as intensidades
18 luminosas e encontram-se descritos na tabela 1.

19 Os secretados dos tricomas de *Aeollanthus suaveolens* reagiram positivamente para
20 compostos fenólicos (Fig. 2A-C) e alcaloides (Fig. 2D-E) apenas em plantas PS, enquanto que
21 os lipídios (Fig. 2F-H), terpenos (Fig. 2I-M) e lactonas sesquiterpênicas (Fig. 2N-O) reagiram
22 positivamente para os secretados de ambos os tratamentos e em todos os tipos morfológicos
23 de tricomas glandulares descritos. Os secretados dos tricomas não reagiram positivamente

para mucilagens e taninos. Os oleossomos presentes no mesofilo reagiram positivamente apenas para terpenos (Fig. 2P) e lipídios (Fig. 2Q).

3.4. DISCUSSÃO

O acúmulo de compostos fenólicos nos secretados e cutícula de tricomas em *A. suaveolens* submetidas a pleno sol, indica uma foto indução em decorrência do aumento na intensidade luminosa e, possivelmente, atuam como proteção contra o excesso de radiação, pois plantas MS não reagiram positivamente ao teste histoquímico correspondente. Compostos fenólicos foram identificados em tricomas de *Phillyrea latifolia* L.(Oleaceae) cultivada a pleno sol por Tattini et al. (2000), semelhante ao ocorrido em *A. suaveolens*, o que confirma a dependência de luz na síntese dessa classe de metabólitos.

Alguns autores afirmam que os compostos fenólicos são responsáveis pela absorção da radiação UV-B e estão localizados em tecidos superficiais, como vacúolos de células epidérmicas (Caldweel et al., 1983; Day et al., 1993) e tricomas (Karabourniotis et al., 1992), absorvendo e/ou dissipando a energia dos raios UV-B sem alterar a radiação fotossinteticamente ativa (Tevini et al., 1991; Middleton e Teramura, 1993). Podem ainda, apresentar estruturas e derivações variadas, e atuar como agentes redutores, sequestrantes de radicais livres ou desativadores do oxigênio singleto (Larcher, 2004; Taiz e Zeiger, 2013) o que possivelmente pode ter sido desenvolvido por *A. suaveolens* em resposta ao alto nível de luminosidade.

As intensidades de luz estabelecidas no estudo de *A. suaveolens* não demonstraram influência sobre a síntese de terpenos e lactonas sesquiterpênicas no secretado dos tricomas dentre os quatro tipos morfológicos descritos, mostrando reduzida especificidade. Entretanto, houve influência da intensidade luminosa na síntese de alcaloides em plantas a pleno sol, o que pode indicar uma possível estratégia de proteção contra raios UV-B. A caracterização

1 histoquímica de *Isodon rubescens* Hemsl. (H.) Hara (Lamiaceae) por Liu e Liu (2012), *Salvia*
2 *officinalis* L. (Lamiaceae) por Corsi e Bottega (1999) e *Ocimum obovatum* Benth.
3 (Lamiaceae) por Naidoo et al. (2013) confirmou a presença de compostos fenólicos e
4 alcaloides nos secretados dos tricomas peltado e capitado, semelhante à composição
5 observada no secretado de *A. suaveolens* cultivada a pleno sol. A escassez de registros sobre
6 a influência de fatores ambientais em relação à secreção em Lamiaceae, e a grande variação
7 de metabólitos encontrada entre os tipos morfológicos, dificultam sua compreensão.

8 A diversidade de metabólitos secundários presentes na composição química do
9 secretado de *A. suaveolens* sugere que haja conjugação e rearranjo entre os grupos funcionais
10 existentes na secreção dos tricomas, e possivelmente esteja atuando como proteção contra o
11 excesso de radiação.

12 Na literatura, há relatos mostrando que alcaloides conjugados apresentam atividade
13 biológica relacionada à defesa contra herbivoria, incluindo proteção contra UV-B (Ahsan et
14 al., 2007). Matsuuro (2012) submeteu duas espécies de *Psychotria* L. (apenas uma acumula
15 um alcaloide monoterpene indólico nas folhas) à exposição em UV-B por 96 horas e verificou
16 que a espécie desprovida desse acúmulo apresentou degradação de fotopigmentos, enquanto a
17 espécie com o referido alcaloide não apresentou fotodegradação, tampouco houve formação
18 de peróxido de hidrogênio após o período de exposição, indicando que este pode ter função
19 antioxidante. *A. suaveolens* pode ter desenvolvido resposta semelhante, pois sintetizou
20 alcaloides e compostos fenólicos apenas quando cultivada a pleno sol, possivelmente
21 protegendo as células secretoras de danos causados pela exposição à luz UV-B.

22 Brun et al (1991), caracterizando as folhas de *Mentha x piperita* L. var. *piperita*
23 (Lamiaceae), verificaram a presença de dois tipos morfológicos de tricomas secretores:
24 peltados e capitados, onde apenas os tricomas peltados apresentaram secretado contendo óleo
25 essencial. Em contrapartida, *A. suaveolens* apresentou óleo essencial em todos os tipos de

1 tricomas secretores, além de acúmulo em oleossomos no parênquima clorofiliano. A literatura
2 pertinente a Lamiaceae não apresentou registros semelhantes sobre acúmulo de óleo essencial
3 no parênquima fotossintetizante. A função dos terpenos nos exudatos de tricomas ainda não é
4 bem definida na literatura, entretanto associa-se a repulsão de herbívoros, devido a sua
5 característica volátil.

6 Lactonas sesquiterpênicas são comuns a Asteraceae (Rodriguez et al., 1976) e ainda
7 pouco relatadas em Lamiaceae. Estudos biológicos com lactonas extraídas de *Artemisia*
8 L.(Asteraceae) relatam que seu contato ou ingestão provoca ulcerações na boca, dores
9 abdominais e dermatite de contato (Berry, 1984; Veiga Júnior et al., 2005), sendo uma classe
10 de metabólitos com potencial citotóxico, e ocasionalmente evitada por herbívoros. Lactonas
11 sesquiterpênicas também foram encontradas em tricomas peltados de *Salvia officinalis* L. por
12 Corsi e Bottega (1999), assim como em *A. suaveolens* no presente estudo, entretanto não há
13 relatos na literatura sobre sua ação em relação à atividade antioxidante.

14 Lactonas sesquiterpênicas, possivelmente, funcionam como defesa química para *A.*
15 *suaveolens* em decorrência do seu caráter citotóxico, e podem atuar na repulsão de insetos e
16 herbívoros devido ao seu caráter volátil. O caráter constitutivo das lactonas sugere que as
17 plantas desenvolvam mecanismos químicos contra um possível ataque herbívoro, pois, sendo
18 de caráter induzido, levaria um tempo considerável entre o ataque e a resposta da planta, o
19 que poderia comprometer seu estabelecimento e reprodução. Esse fato evidencia uma possível
20 ação das lactonas como proteção química.

21 Diferentemente das lactonas, os compostos fenólicos e alcaloides, que foram induzidos
22 em plantas PS, devem atuar como um mecanismo de proteção contra o estresse fotooxidativo,
23 pois a resposta a esse tipo de estresse pode ser mais lenta e/ou tardia.

24

25

1 **FONTE FINANCIADORA**

2 PNADB (Programa Nacional de Apoio ao Desenvolvimento da Botânica).

4 **AGRADECIMENTOS**

5 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pela concessão da
6 bolsa de estudos, ao laboratório de biotecnologia do NUMA da UFPA pelo cultivo das
7 plantas, ao museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) pela execução do estudo e à Universidade
8 Federal Rural da Amazônia (UFRA) pela pós-graduação.

10 **3.5. LITERATURA CITADA**

11 **Ahsan H, Reagan-Shaw S, Eggert DM, Tan TC, Afaq F, Mukhtar H., Ahmad, N.**
12 **2007.** Protective effect of sanguinarine on ultraviolet B-mediated damages in SKH-1 hairless
13 mouse skin: implications for prevention of skin cancer. *Photochem Photobiol*, **83**: 986–993.

14 **Ascensão L. et al. 1999.** Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus*
15 *ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. *Annals of Botany* **84**: 437-447.

16 **Berry, MI. 1984.** Feverfew faces the future. *The Pharmaceutical Journal* **232**: 611-614.

17 **Brun, N, Voirin, B. 1991.** Chemical and morphological studies of the effects of ageing
18 on monoterpenes composition in *Mentha X piperita* leaves. *Canadian Journal of Botany*, **69**:
19 2271-2278.

20 **Bukatsch F. 1972.** Bemerkungen zur doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos*
21 **61**: 255.

22 **Caldwell MM, Robberecht R, Flint SD. 1983.** Internal filters: prospects for UV-
23 acclimation in higher plants. *Physiology Plant* **58**: 445-450.

24 **Castro HG, Ferreira AF, Silva DJH, Mosquim PR. 2004.** *Contribuição ao estudo*
25 *das plantas medicinais: metabólitos secundários*, 2th edn. Viçosa: Gráfica Suprema e Editora.

26 **Corsi, G, Bottega S. 1999.** Glandular Hairs of *Salvia officinalis*: New Data on

Morphology, Localization and Histochemistry in Relation to Function. *Annals of Botany* **84**: 657–664.

David R, Carde JP. 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l' Academie des Sciences Paris* **258**: 1338-1340.

Day TA, Martin G, Vogelmann TC. 1993. Penetration of UV-B radiation in foliage: evidence that the epidermis behaves as a non-uniform filter. *Plant Cell Environment* **16**: 735-741.

Fahn A. 1979. *Secretory tissues in plants*, London: Academic Press.

Fahn A. 1988. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist* **108**: 229–257.

Farooqi AHA, Sangwan NS, Sangwan RS. 1999. Effect of different photoperiodic regimes on growth, flowering and essential oil in *Mentha* species. *Plant Growth Regulation* **29**: 181-187.

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

Geissmann TA, Grin TS. 1971. Sesquiterpene lactones: acid-catalysed colour reactions as an aid in structure determination. *Phytochemistry* **10**: 2475-2485.

Jensen WA. 1962. Botanical histochemistry, principles and practice. W. H. Freeman, San Francisco.

Karabourniotis G, Papadopoulos K, Papamarkou M, Manetas Y. 1992. Ultraviolet-B absorbing capacity of leaf hairs. *Physiologia Plantarum* **86**: 414-418.

Kirk PW. 1970. Neutral red as a lipid fluorochrome. *Stain Technology* **45**: 1-4.

Kraus JE, Arduin M 1997. *Manual básico de métodos de morfologia vegetal*. Rio de Janeiro: EDUR.

Larcher W. 2004. *Ecofisiologia vegetal*, 1th edn. São Carlos: Rima.

1 **Liu, MQ, Liu, JF. 2012.** Structure and histochemistry of the glandular trichomes on the
2 leaves of *Isodon rubescens* (Lamiaceae). *African Journal of Biotechnology* **11(17)**: 4069-
3 4078.

4 **Mace ME, Howell CR. 1974.** Histochemistry and identification of condensed tannin
5 precursor in roots of cotton seedlings. *Phytopathology* **64**: 1297-1302.

6 **Maia JG, Zoghbi MGB, Andrade EH. 2003.** Essential oil of *Aeollanthus suaveolens*
7 Mart. ex Spreng. *Journal of Essential Oil Research* **15**: 86-87.

8 **Martins MBG, Pastori AP. 2004.** Anatomia foliar com ênfase nos tricomas secretores
9 e análise cromatográfica de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae). *Revista*
10 *Brasileira de Plantas Medicinais* **6**:77-82.

11 **Matsuuro, HN. 2012.** *Papel do alcalóide N,β-D-glicopiranosil vincosamida na*
12 *resposta a dano mecânico e herbivoria em Psychotria leiocarpa Cham & Schltld.* Dissertação
13 de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

14 **Metcalf CR, Chalk L. 1983.** *Anatomy of the Dicotyledons*, 2th edn. Clarendon Press:
15 Oxford.

16 **Middleton EM, Teramura AH. 1993.** The role of flavonol glycosides and carotenoids
17 in protecting soybean from ultraviolet B damage. *Plant Physiology* **103**: 741—752.

18 **Naidoo, Y, Kasim, N, Heneidak, S, Nicholas, A, Naidoo, G. 2013.** Foliar secretory
19 trichomes of *Ocimum obovatum* (Lamiaceae): micromorphological structure and
20 histochemistry. *Plant Systematics and Evolution* **299**: 873–885.

21 **Pearse AGE. 1985.** *Histochemistry: theoretical and applied*. Little, Brown &
22 Company, Boston.

23 **Rodriguez, E, Towers, GHN, Mitchell, JC. 1976.** Biological activities of
24 sesquiterpene lactones. *Phytochemistry* **15**: 1573-1580.

25 **Sangwan NS, Farooqi AHA, Sfiabih F, Sangwan RS. 2001.** Regulation of essential

oil production in plants. *Plant Growth regulation* **34**: 3-21.

Schnepf E. 1972. Tubulares endoplasmatisches Reticulum in Drusen mit lipophilen Ausscheidung von *Ficus*, *Ledum* und *Salvia*. *Biochemie Physiologie Pflanzen* **163**: 113-125.

Serrato-Valenti G, Bisio A, Cornara L, Ciarallo G. 1997. Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salvia aurea* L. leaves, and chemical analysis of the essential oil. *Annals of Botany* **79**: 329–336.

Taiz L, Zeiger E. 2013. *Fisiologia Vegetal*, 4th edn. Porto Alegre: Artmed.

Tattini M, Gravano E, Pinelli P, Mulinacci N, Romani A. 2000. Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation. *Tree Physiology* **19**: 905-908.

Tevini M, Braun J, Fieser G. 1991. The protective function of the epidermal layer of rye seedlings against ultraviolet-B radiation. *Photochemistry and Photobiology* **53**: 329-333.

Tucker AO, Maciarello MJ, Alkire BH. 2001. Essential oil of *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research* **13(3)**: 198-1993.

Veiga Júnior VF, Pinto AC, Maciel MAM. 2005. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova* **28**: 519-28.

Werker E. 2000. Trichome diversity and development. *Advances in Botanical Research* **31**: 1-35.

1 **Tabela 1.** Classe de metabólitos secundários presentes no secretado de tricomas glandulares e
 2 oleossomos de *Aeollanthus suaveolens* cultivadas a pleno sol (PS: 100% luz) e meia sombra
 3 (MS: 50% luz).

Histoquímica /Coloração	Classe de metabólitos	Oleossomos		TGP		TGC I		TGC II		TGCL	
		PS	MS	PS	MS	PS	MS	PS	MS	PS	MS
Sudan IV (Alaranjado)	Lipídeos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Wagner (Vermelho)	Alcaloides	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Vanilina clorídrica (marrom)	Taninos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vermelho neutro (verde)	Compostos fenólicos	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Nadi (roxo)	Óleo essencial e óleo resina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácido sulfúrico (amarelo)	Lactona sesquiterpênica	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Azul de Alcão (Azul)	Mucilagem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4

5

6

7

8

9

10

11

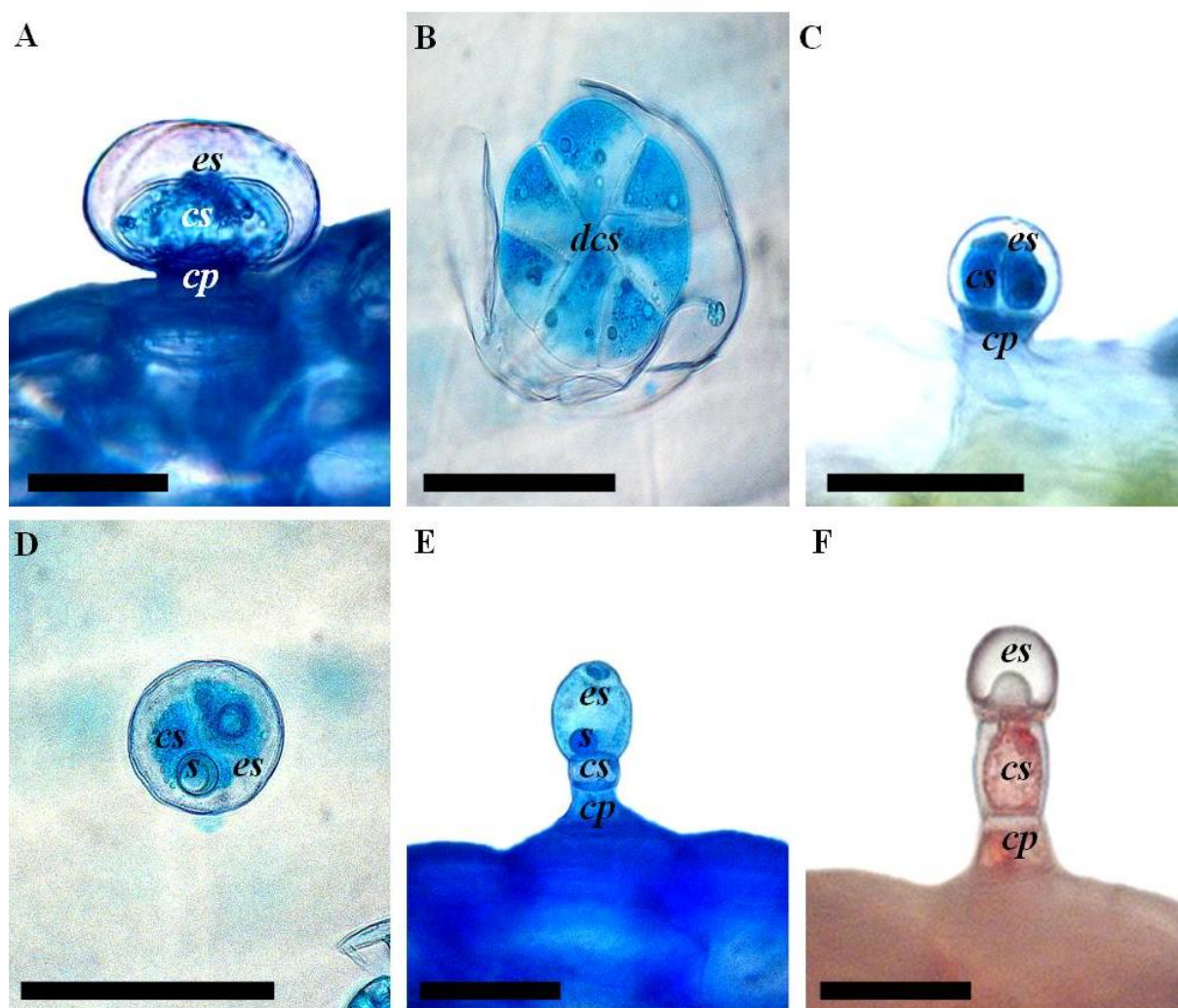
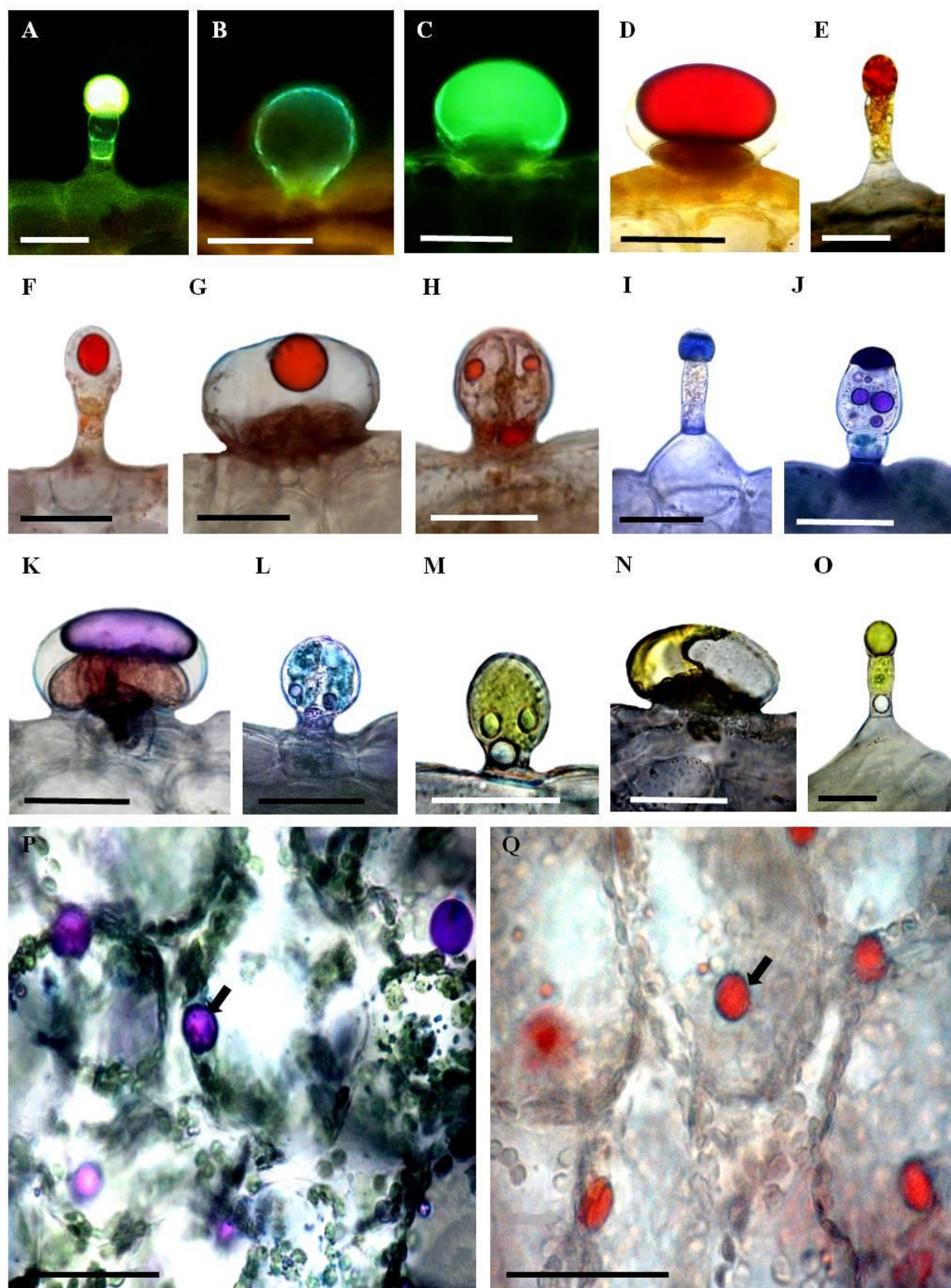


Figura 1: Morfologia dos tricomas glandulares do caule e da folha de *Aeollanthus suaveolens* em secção transversal e longitudinal. (A) vista transversal do TGP mostrando uma *cp* reduzida, uma *cs* e abundante *es* discoide; (B) vista frontal do TGP evidenciando *dcs* com sete células e cutícula rompida; (C) vista transversal do TGC I evidenciando reduzida *cp*, duas *cs* secretoras apicais e pequeno *es* esférico; (D) vista frontal do TGCC I com duas células *cs* apicais e formação de *s*; (E) vista transversal do TGC II evidenciando uma *cp* reduzida, uma *cs* com abundante *es* ovoide e (F) vista transversal do TGCL mostrando uma *cp* alongada, uma *cs* apical e *es* abundante e esférico. Abreviações: *dcs*, disco de células secretoras *es*, espaço subcuticular; *cs*, célula secretora; *cp*, célula pedicelar, *s*, secreção; TGCC I, tricoma glandular capitado curto I; TGCC II, tricoma glandular capitado curto II; TGCL, tricoma glandular capitado longo e TGP, tricoma glandular peltado. Escala (A-F) = 50 μm.

1

2
3

1 **Figura 2:** Caracterização histoquímica da secreção de tricomas glandulares e oleossomos de
2 *Aeollanthus suaveolens*. (A-C) TGCL, TGCC I e TGP apresentando compostos fenólicos na
3 cutícula e secreção de plantas PS. (D-E) TGP e TGCL reagiram positivamente para
4 alcaloides. (F-H) reagiram positivamente para lipídeos. (I-L) TGP, TGCC I, TGCC II, TGCL
5 reagiram positivamente para óleo essencial e óleo resina. (M-O) TGP, TGCC I e TGCL
6 reagiram positivamente para lactonas sesquiterpênicas. (P-Q) oleossomos em secção
7 transversal do mesofilo: (P) evidenciando reação positiva para lipídeos e (Q) reação positiva
8 para óleo resina e óleo essencial. Abreviações: TGP, tricoma glandular peltado; TGCC I,
9 tricoma glandular capitado curto I; TGCC II, tricoma glandular capitado curto II; TGCL,
10 tricoma glandular capitado longo. Escala (A-F) = 50 µm.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Aeollanthus suaveolens apresentou adaptações anatômica, química e estrutural em resposta ao aumento na intensidade luminosa. A síntese de terpenos e lactonas sesquiterpênicas não foram influenciadas pelas intensidades de luz estabelecidas no estudo. A variação na intensidade luminosa foi essencial na síntese de alcaloides e compostos fenólicos. O acúmulo de óleo essencial em *Aeollanthus suaveolens* não é restrito aos tricomas glandulares, sendo o parênquima fotossintetizante um importante acumulador de óleo essencial, o que não é comumente encontrado em Lamiaceae.

ANEXO 1

NORMAS DA REVISTA ANNALS OF BOTANY

INTRODUCTION

Scope of the journal

Annals of Botany is published for the Annals of Botany Company by Oxford University Press. Experimental, theoretical and applied papers on all aspects of plant science are welcome. The submitted manuscript or its essential content must not have been published previously or be under consideration for publication elsewhere. To merit publication in *Annals of Botany*, contributions should be substantial, written in clear English and combine originality of content with potential general interest. Submission of manuscripts that report small incremental advances or are of geographically local interest only is discouraged unless the implications of the findings are wide-reaching. Agronomic papers are expected to contain a substantial amount of basic plant biology. In general, a paper is unlikely to be accepted unless the referees and editors involved in its evaluation are enthusiastic about the science. The Covering Letter is an essential part of all submissions. It should include an ~60 word summary of the scientific strengths of the paper that the author(s) believe qualify it for consideration by *Annals of Botany*.

Language editing

If English is not your first language, you may wish to have your manuscript edited for language before submitting it. This is not a mandatory step, but may help to ensure that the academic content of your paper is fully understood by journal editors and reviewers. Language editing does not guarantee that your manuscript will be accepted for publication. There are many specialist language editing services available and you can find these easily by searching online. Authors are liable for all costs associated with such services.

Charges

Authors pay no fees or page charges unless electing for our Open Access scheme (see below for details). The corresponding author receives a free copy of the issue of the Journal in which their paper appears and a unique URL that gives access to a PDF

(Portable Document Format) file of their article. The corresponding author is entitled to receive 25 printed offprints free of charge. These can be claimed using the Oxford Journals Authors Services site. Additional offprints can also be ordered using the Oxford Journals Authors Services site. Orders from the UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from elsewhere in the EU you or your institution should account for VAT by way of a reverse charge. Please provide us with your or your institution's VAT number. Colour photographs and graphics are also printed without charge where their use enhances scientific content or clarity.

Open Access

Annals of Botany authors have the option to publish their paper under the Oxford Open initiative; whereby, for a charge, their paper will be made freely available online immediately upon publication. *Annals of Botany* offers extremely competitive rates for Open Access publication, supported by its not-for-profit status aiming to promote botanical science. Corresponding authors/institutions can choose to pay a subsidized rate of £1050/ \$1700 / €1400, and open access is further discounted or free for developing countries (click [here](#) for a list of qualifying countries). After your manuscript is accepted the corresponding author will be required to accept a mandatory licence to publish agreement. As part of the licensing process you will be asked to indicate whether or not you wish to pay for open access. If you do not select the open access option, your paper will be published with standard subscription-based access and you will not be charged.

Oxford Open articles are published under Creative Commons licences. Authors publishing in *Annals of Botany* can use the following Creative Commons licences for their articles:

Creative Commons Attribution licence (CC BY)

Please click [here](#) for more information about the Creative Commons licences.

If you choose the Open Access option you can pay the Open Access charges using our Author Services site. This will enable you to pay online with a credit/debit card, or request an invoice by email or post. Open access charges can be viewed [here](#) in detail.

Orders from the UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from the rest of the European Union, OUP will assume that the service is provided for business purposes. Please provide a VAT number for yourself or your institution and ensure you account for your own local VAT correctly.

Types of article

Standard research papers ('ORIGINAL ARTICLES') and 'TECHNICAL ARTICLES' should not normally exceed ten printed pages. A 'REVIEW' submitted speculatively should generally have fewer than 25 printed pages. Opinion papers ('VIEWPOINT') and 'RESEARCH IN CONTEXT' articles are also welcome: the latter category is for papers that combine a review/overview of a subject area with original research that moves the topic forward. 'INVITED REVIEWS' (generally up to 25 pages) and 'BOTANICAL BRIEFINGS' (up to 6 pages) are published by invitation only. Note that with the exception of Botanical Briefings, which are intended as short reviews, the number of pages suggested here is a guideline: in all cases the length of an article should be appropriate to its scientific content. The journal also publishes book reviews, but these are by invitation only (see [Publishers' Books for Review](#)).

Information about reviews

As with all papers for *Annals of Botany*, reviews should carry an important message. Articles for reviews might fit any of the following appropriate article types: Reviews, Viewpoints, Botanical Briefings and Research-in-Context (see below for a brief outline of each type). We ask you to write an article that is focussed and accessible for research, teaching and information across our readership of professional botanists, and normally include intellectual and practical implications, maybe suggesting novel research directions. We are not prescriptive and there will be a different balance and length in each review – with Viewpoints more opinionated but nevertheless rigorous, and reviews approaching meta-analysis, reanalysis of data or integration of previous work are encouraged. Applied, analytical, policy-driven and overview papers are also welcome. Reviews should be novel, rigorous and "make a difference" to plant science. We want you to use your expertise and judgement to discuss new work and ideas, develop new hypotheses, expand and support models, or explain what is important and the implications and future for a field. Each paper cited should carry an important message. We are not looking for blow-by-blow and exhaustive coverage of a large field (as would be the case for e.g. *Annual Reviews* or *Current Plant Biology*). The articles must have informative titles and abstracts, will invariably be illustrated, normally including one or more conceptual/summary figures. Colour will be free, all articles will be reviewed as appropriate for their content, and will be freely downloadable without subscription.

Reviews should place the subject in context, include the most up-to-date references available and add significantly to previous reviews in the topic with a critical overview of the topic. A review will move forward research in the topic. They are generally up to around 12,000 words in length, or typically 40 to 60 manuscript pages, and must include appropriate figures to help illustrate the topic.

Research in Context should combine a review/overview of a subject area with original research that moves the topic forward; i.e. it is a hybrid of review/research papers. Typically it contains an extended Introduction that provides a general overview of the subject area before incorporating new research results (potentially even meta-analyses) that move the subject forward, with a Discussion that may propose general models, discuss impact of the research and future opportunities. Research in Context papers are typically the length of a long “normal” research paper, up to about 10,000 words and should be illustrated.

Viewpoints should present clear, concise and logical arguments supporting the authors’ opinions, and in doing so help stimulate discussions within the topic. A typically Viewpoint would be about 4,000 words in length and should include at least one figure (e.g. a schematic to illustrate the point being made).

Botanical Briefings are concise, perhaps more specialized reviews and usually cover topical issues, maybe involving some controversy. They are much shorter in length (4000–6000 words) and normally have a limit of 40 references.

Summary of submission processes

Submission management and evaluation of submitted manuscripts will involve the Journal's online manuscript submission system. The manuscript text should be prepared in English (see PREPARING THE ARTICLE FILE below for details) and submitted online starting from our login page. Figures, tables and other types of content should be organized into separate files for submission (see PREPARING TABLE and FIGURE FILES , SUPPLEMENTARY INFORMATION FILES and VIDEO FILES below for details). If you are using the online submission system for the first time please go to the login page and generate a login name and password after clicking on the “ First time authors only should register here ” link. If you are already registered but need to be reminded of your login name or password please go to the login page and click on “ Unknown/Forgotten password?”. There is extensive guidance available throughout the submission process. To make use of this guidance please click on the “Author

Instructions” link or the “Tips” link situated at the top of every screen. In addition, there are frequent context-sensitive help points throughout the site that can be opened by clicking on the following symbol ?.

If you are unable to access our web-based submission system, please contact the Editorial Office (e-mail: office@annbot.com) for alternative methods of submitting your paper. The postal address is Annals of Botany Editorial Office, Department of Plant Sciences, University of Oxford, South Parks Road, Oxford, OX1 3RB, UK.

Preparing a covering letter

Each submission should be accompanied by a Covering Letter formatted in MS Word (file type DOC) or in Rich Text Format (file type RTF). The letter should include contact details of the corresponding author, the title and authorship of the paper, and should state if the paper is a first submission, revision or a resubmission. It must also include an ~60 word summary of the scientific strengths of the paper that the author(s) believe qualify it for consideration by *Annals of Botany*. The manuscript reference number must be given if the paper is a revision or resubmission. If the paper is a revised or resubmitted manuscript, the letter should explain what changes have been made to the manuscript and where changes requested by the Handling Editor and referees have not been carried out. Any other information to which authors wish to draw the Chief Editor’s attention should also be included in this letter.

PUBLICATION ETHICS

Authors should observe high standards with respect to publication ethics. The Journal is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE). Any cases of ethical misconduct are treated very seriously and will be dealt with in accordance with the COPE guidelines. Further information about OUP’s ethical policies followed by *Annals of Botany* is available [here](#). All work submitted to *Annals of Botany* should be novel, rigorous and substantial, and the Editors may make plagiarism checks at any time after submission.

The corresponding author agrees by submission of a manuscript that 1) the work is free of plagiarism and is not under consideration for publication elsewhere; 2) all authors have agreed to publication in *Annals of Botany*; 3) all those contributing substantial ideas and work have been appropriately acknowledged or given co-authorship; 4) all addresses and institutional affiliations are complete and correct; 5) all national laws

relating to the research have been complied with; 6) funding sources and conflicts of interest have been appropriately acknowledged; and 7) authorization to publish all parts of the submission from employers, intellectual property or copyright holders, funders, and others is given. A published paper subsequently found not to have fulfilled all of these criteria may be retracted or, at the journal's sole discretion, a correction may be published. We reserve the right to charge authors the full original cost of publishing any subsequently retracted paper, or the cost of publishing any correction.

PREPARING THE ARTICLE FILE

(Always consult a recent issue of *Annals of Botany* for layout and style)

Text should be typed using size 12 Times New Roman or Courier, double-spaced throughout and with an approx. 25 mm margin. All pages should be numbered sequentially. Each line of the text should also be numbered, with the top line of each page being line 1. The article file should be in PC-compatible Microsoft Word - file type DOC [please make sure the "Language" is "English (U.K)" via Tools → Language → Set Language]. RTF files are also acceptable. Please do not use the Windows Vista DOCX format: if you have created the text in this format, please save the files as RTF before submitting them. Please do *not* submit PDFs, desktop publishing files or LaTeX files. The article file should *include* a list of any figure legends but *exclude* any figures themselves – these should be submitted separately, with each figure in a separate file. Tables should be included at the end of the article file, in a Word format and *not* embedded as an image/picture. For more details see below under PREPARING TABLE and FIGURE FILES, SUPPLEMENTARY INFORMATION FILES AND VIDEO FILES .

It is NOT journal style to have footnotes within articles. Any such notes must be incorporated into the main text, for example within brackets or as a separate paragraph. The first page should state the type of article (e.g. Original Article, Technical Article) and provide a concise and informative full title followed by the names of all authors. Where necessary, each name should be followed by an identifying superscript number (^{1, 2, 3} etc.) associated with the appropriate institutional address to be entered further down the page. For papers with more than one author, the corresponding author's name should be followed by a superscript asterisk*. The institutional address(es) of each author should be listed next, each address being preceded by the relevant superscript number where appropriate. A running title of not more than 75 characters, including spaces,

should also be provided, followed by the e-mail address of the corresponding author. Please follow the layout used for the first page of papers published in *Annals of Botany*. The second page should contain a structured Abstract not exceeding 300 words made up of bulleted headings. For 'ORIGINAL ARTICLES' these heading will normally be as follows:

Background and Aims

Methods

Key Results

Conclusions

Alternative bulleted headings, such as ' *Background* ', ' *Scope* ' and ' *Conclusions* ', are also acceptable for 'REVIEWS', 'INVITED REVIEWS', 'BOTANICAL BRIEFINGS', 'TECHNICAL ARTICLES' papers and 'VIEWPOINT' papers.

The Abstract should be followed by between three and 12 Key words that include the complete botanical name(s) of any relevant plant material. If many species are involved, species groups should be listed instead. Note that essential words in the title should be repeated in the key words since these, rather than the title, are used in some electronic searches. Title, Abstract and Key words should be self-explanatory without reference to the remainder of the paper.

The third and subsequent pages should comprise the remaining contents of the article text. 'ORIGINAL ARTICLES' will usually have the structure INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, ACKNOWLEDGEMENTS and LITERATURE CITED followed by a list of captions to any figures.

The RESULTS section should not include extensive discussion and data should not be repeated in both graphical and tabular form. The DISCUSSION section should avoid extensive repetition of the RESULTS and *must* finish with some conclusions.

Abbreviations are discouraged *except* for units of measurement, standard chemical symbols (e.g. S, Na), names of chemicals (e.g. ATP, Mes, Hepes, NaCl, O₂), procedures (e.g. PCR, PAGE, RFLP), molecular terminology (e.g. bp, SDS) or statistical terms (e.g. ANOVA, s.d., s.e., *n*, *F*, *t*-test and *r*²) where *these are in general use*. Other abbreviations should be spelled out at first mention and all terms must be written out in full when used to start a sentence. Abbreviations of scientific terms should not be followed by a full stop. Use the minus index to indicate 'per' (e.g. m⁻³, L⁻¹, h⁻¹) except in such cases as 'per plant' or 'per pot'. If you decide that a list of

abbreviations would help the reader, this should be included as an Appendix.

Units of Measurement. Use the *Système international d'unités* (SI) wherever possible. If non-SI units have to be used, the SI equivalent should be added in parentheses at first mention. For units of volume, expressions based on the cubic metre (e.g. $5 \times 10^{-9} \text{ m}^3$, $5 \times 10^{-6} \text{ m}^3$ or $5 \times 10^{-3} \text{ m}^3$) or the litre (e.g. 5 μL , 5 mL, 5 L) are acceptable, but one or other system should be used consistently throughout the manuscript. Typical expressions of concentrations might be 5 mmol m^{-3} , 5 μM (for 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$), or 25 mg L^{-1} . The Dalton (Da), or more conveniently the kDa, is a permitted non-SI unit of protein mass.

Names of plants must be written out in full (Genus, species) in the abstract and again in the main text for every organism at first mention (but the genus is only needed for the first species in a list within the same genus, e.g. *Lolium annuum*, *L. arenarium*). The authority (e.g. L., Mill., Benth.) is *not* required unless it is controversial. Guidance for naming plants correctly is given in The International Plant Names Index and in *The Plant Book: a Portable Dictionary of the Vascular Plants* (1997) by D.J. Mabberley (Cambridge: Cambridge University Press. ISBN 0521-414210-0). After first mention, the generic name may be abbreviated to its initial (e.g. *A. thaliana*) except where its use causes confusion.

Any cultivar or variety should be added to the full scientific name e.g. *Solanum lycopersicum* 'Moneymaker' following the appropriate international code of practice. For guidance, refer to the ISHS International Code of Nomenclature for Cultivated Plants (2004) edited by C.D. Brickell, B. R. Baum, W. L. A. Hetterscheid, A. C. Leslie, J. McNeill, P. Trehane, F. Vrugtman, J. H. Wiersema (ISBN 3-906166-16-3).

Once defined in full, plants may also be referred to using vernacular or quasi-scientific names without italics or uppercase letters (e.g. arabidopsis, dahlia, chrysanthemum, rumex, soybean, tomato). This is often more convenient.

Items of Specialized Equipment mentioned in MATERIALS AND METHODS should be accompanied by details of the model, manufacturer, and city and country of origin.

Numbers up to and including ten should be written out unless they are measurements. All numbers above ten should be in numerals except at the start of sentences. Dates should be in the form of 10 Jan. 1999, and Clock Time in the form of 1600 h.

Mathematical equations must be in proper symbolic form; word equations are not acceptable. Each quantity should be defined with a unique *single character* or symbol together with a descriptive subscript if necessary. Each subscript should also be a *single*

character if possible, but a short word is permissible. For example, a relationship between plant dry mass and fresh mass should appear as $M_d = 0.006 M_f^{1.461}$, where M_d is plant dry mass and M_f is plant fresh mass; and not as $DM = 0.006 FM^{1.461}$.

The meaning of terms used in equations should be explained when they first appear. Standard conventions for use of *italics* only for variables should be followed: normal (Roman) font should be used for letters that are identifiers. Thus in the above example, M is the *variable quantity* of mass, the subscripts d and f are identifiers for dry and fresh respectively.

Special note regarding 'Equation Editor' and other software for presentation of mathematics. Symbols and equations that are imported into Word documents as embedded objects from other software packages are generally incompatible with typesetting software and have to be re-keyed as part of the proof-making process. It is therefore strongly advisable to type symbols and equations directly into MS Word wherever possible. Importing from other software should ideally be confined to situations where it is essential, such as two-line equations (i.e. where numerators and denominators cannot be set clearly on a single line using '/') and to symbols that are not available in Word fonts. This will minimize the risk of errors associated with rekeying by copyeditors.

Summary statistics should be accompanied by the number of replicates and a measure of variation such as standard error or least significance difference. Analysis of variance is often appropriate where several treatments are involved. Presentation of an abridged ANOVA table is permissible when its use illustrates critical features of the experiment. Chemical, biochemical and molecular biological nomenclature should be based on rules of the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) and the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). Chapter 16 of *Scientific Style and Format. The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers 6th edn.*, by Edward J. Huth (Cambridge: Cambridge University Press. ISBN 0-521-47154-0) gives guidelines.

Sequence information. Before novel sequences for proteins or nucleotides can be published, authors are required to deposit their data with one of the principal databases comprising the International Nucleotide Sequence Database Collaboration: EMBL Nucleotide Sequence Database, GenBank, or the DNA Data Bank of Japan and to include an accession number in the paper. Sequence matrices should only be included if alignment information is critical to the message of the paper. Such matrices can be in

colour but should not occupy more than one printed page. Larger matrices will only be printed by special agreement but may more readily be published electronically as Supplementary Information (see below).

Gene nomenclature. Species-specific rules on plant gene nomenclature are available for:

maize ;

rice ;

wheat and

arabidopsis .

Otherwise, *Annals of Botany* adopts the following conventions for abbreviations: each gene abbreviation is preceded by letters identifying the species of origin. Lower-case italics should be used for mutant genes (e.g. *Rp-etr1*); upper-case italics (e.g. *Le-ACO1*) for wild-type genes; upright lower-case for proteins of mutated genes (e.g. Le-adh1); and upright upper-case for proteins of wild-type genes (e.g. At-MYB2). It may often be helpful to readers if the names of genes or gene families are spelled out in full at first mention.

Citations in the text. These should take the form of Felle (2005) or Jacobsen and Forbes (1999) or (Williamson and Watanabe, 1987; Rodrigues, 2002 *a* , *b*) and be ordered chronologically. Papers by three or more authors, even on first mention, should be abbreviated to the name of the first author followed by et al. (e.g. Zhang *et al.* , 2005). If two different authors have the same last name, give their initials (e.g. NH Kawano, 2003) to avoid confusion. Only refer to papers as 'in press' if they have been accepted for publication in a named journal, otherwise use the terms 'unpubl. res.', giving the initials and location of the person concerned. (e.g. H Gautier, INRA, Lusignan, France, unpubl. res.) or 'pers. comm.' (e.g. WT Jones, University of Oxford, UK, 'pers. comm.')

The LITERATURE CITED should be arranged alphabetically based on the surname of the first or sole author. Where the same sole author or same first author has two or more papers listed, these papers should be grouped in year order. Where such an author has more than one paper *in the same year* , these should be ordered with single authored papers first followed by two-author papers (ordered first alphabetically based on the second author's surname, then by year) , and then any three-or-more-author papers (in year order only). Italicized letters '*a* ', '*b* ', '*c* ', etc., should be added to the date of papers with the same first authorship and year.

For papers with *six* authors or fewer, please give the names of *all* the authors. For papers with *seven* authors or more, please give the names of the *first three* authors only,

followed by *et al.*

Each entry must conform to one of the following styles according to the type of publication.

Books

Öpik H, Rolfe S. 2005. *The physiology of flowering plants. Physicochemical and environmental plant physiology*, 4th edn. Cambridge: Cambridge University Press.

Chapters in books

Scandalios JG. 2001. Molecular responses to oxidative stress. In: Hawkesford MJ, Buchner P, eds. *Molecular analysis of plant adaptation to the environment*. Dordrecht: Kluwer, 181-208.

Research papers

Popper ZA, Fry SC. 2003. Primary cell wall composition of bryophytes and charophytes. *Annals of Botany* 91: 1–12.

Papers published online ahead of print

Forster MA, Ladd B, Bonser SP. 2011. Optimal allocation of resources in response to shading and neighbours in the heteroblastic species, *Acacia implexa*. *Annals of Botany*, in press. doi:10.1093/aob/mcq228.

NB include the doi number: a search for the doi will always be directed to the most recent version, so the reader will be able to find the final published paper as soon as it appears.

Online-only journals

Aizen MA, Morales C, Morales JM. 2008. Invasive mutualists erode native pollination webs. *PloS Biology* 6: e31. doi:10.1371/journal.pbio.0060031.

NB include the doi number after the volume and article number.

Theses

Tholen D. 2005. *Growth and photosynthesis in ethylene-insensitive plants*. PhD Thesis, University of Utrecht, The Netherlands.

Anonymous sources

Anonymous. Year. *Title of booklet, leaflet, report, etc.* City: Publisher or other source, Country.

References to websites should be structured as: Author(s) name, author(s) initial(s). year. *Full title of article*. Full URL. Date of last successful access (e.g. 12 Jan. 2003)

Acknowledgements. In the ACKNOWLEDGEMENTS, please be brief. 'We thank . . .' (not 'The present authors would like to express their thanks to . . .').

Funding information. Details of all funding sources for the work in question should be given in a separate section entitled 'Funding'. This should appear before the 'Acknowledgements' section.

The following rules should be followed:

The sentence should begin: 'This work was supported by ...'

The full official funding agency name should be given, i.e. 'the National Cancer Institute at the National Institutes of Health' or simply 'National Institutes of Health' not 'NCI' (one of the 27 subinstitutions) or 'NCI at NIH' (full RIN-approved list of UK funding agencies)

Grant numbers should be complete and accurate and provided in brackets as follows: '[grant number ABX CDXXXXXX]'

Multiple grant numbers should be separated by a comma as follows: '[grant numbers ABX CDXXXXXX, EFX GHXXXXXX]'

Agencies should be separated by a semi-colon (plus 'and' before the last funding agency)

Where individuals need to be specified for certain sources of funding the following text should be added after the relevant agency or grant number 'to [author initials]'.

An example is given here: 'This work was supported by the National Institutes of Health [P50 CA098252 and CA118790 to R.B.S.R.] and the Alcohol & Education Research Council [HFY GR667789].

Oxford Journals will deposit all NIH-funded articles in PubMed Central. See http://www.oxfordjournals.org/for_authors/repositories.html for details. Authors must ensure that manuscripts are clearly indicated as NIH-funded using the guidelines above.

Crossref Funding Data Registry.

In order to meet your funding requirements authors are required to name their funding sources, or state if there are none, during the submission process. For further information on this process or to find out more about the CHORUS initiative please click [here](#).

Appendix.

If elaborate use is made of units, symbols and abbreviations, or a detailed explanation of one facet of the paper seems in order, further details may be included in a separate APPENDIX placed after the LITERATURE CITED.

For more detail and information on types of files required for text, graphics and tables etc., please see the next section.

PREPARING TABLES, FIGURE FILES, SUPPLEMENTARY INFORMATION FILES AND VIDEOS

Each figure, video and set of supplementary information should be prepared as a separate file on your computer in preparation for online submission. Tables should be included at the end of the Word file containing the main text (see below). Towards the bottom of the first submission screen of the online submission system, you should enter the appropriate number of files you have in each category. This creates the spaces (boxes) that will accommodate the files when they are uploaded later. The files are categorized as 'Colour Figures', 'Black and White Figures', 'Supplemental Material' and 'Video'.

Tables. The best guide for laying out tables and diagrams are papers in a recent issue of *Annals of Botany*. Tables should be placed at the end of the main text file after the Literature Cited, and include a complete caption above the table and be numbered Table 1, Table 2 etc. according to the order in which they are first mentioned in the text. When preparing tables, adopt the 'Tables' set-up in MS Word, using one cell for each datum cluster (e.g. 12.2 ± 1.65) and avoid the use of the 'return' key. If the tables have been prepared in MS Excel, please paste them into the Word document as text, not as an object: i.e. it should be possible in Word to select and edit the text within the table.

Figures. All images (line diagrams, drawings, graphs, photographs, plates) are considered 'Figures'. Each figure should be in a separate file and be numbered (Fig. 1, Fig. 2 etc.) in the order they are first mentioned in the text. Group related graphics into a single figure and label A, B, C, etc. following the style in recent issues of the Journal. Images (micrographs, maps, plants) should have internal scale bars. Colour images are encouraged and printed without charge where they enhance the clarity of the scientific information. Line diagrams are normally black on white but may be in colour where this enhances clarity. Consider that some readers will use black-and-white printouts or have reduced colour vision. Height and width of figures should be chosen to not exceed 23cm in height and for either single (8.4 cm wide) or double (up to 17.3 cm wide) column reproduction. Graphs and diagrams are often redrawn and should be inspected carefully in proofs.

We suggest supplying figures for first submissions as PowerPoint PPT (drawings) or JPG (images) files at 300 dpi (= 120 pixels/cm) and 8.4 or 17.3cm wide. Ensure the PDF created for review is less than 5MB in size, the points you make are clearly visible

in the figures, and that all pages in the PDF are approximately the same width; if not, please revise figures and recreate the PDF. Reviewers may not be able to download very large PDFs nor wish to resize pages. After review of your manuscript, and provisional acceptance, please submit original figures in non-compressed formats: EPS, AI, or PPT files are suitable for diagrams, and TIF, PSD or a low-compression JPG at 600dpi or 300 dpi at print size for photographic or other images. Please do not supply photographic images as PowerPoint files nor save PowerPoint files in TIF or JPG format as these are generally of poor resolution. If figures are drawn in PowerPoint and contain imported images, then please supply the image files separately as clearly labelled supplementary files. PDF files are not acceptable for reproduction. JPG files should not be repeatedly saved as this reduces quality.

Large amounts of additional information can be submitted for publication electronically as Supplementary Information provided that it is not essential for a basic understanding of the main paper. Supplementary material will be refereed along with the core paper. At appropriate positions in the main text authors should indicate what details are being made available, followed by the words [Supplementary Information] in bold and between square brackets. The online submission system provides space for supplementary information to be uploaded in “Supplemental Material” files. The appropriate number of these types of file can be selected towards the bottom of the first submission screen. Similarly, if you are including a video you should enter [Supplementary Information - Video] in bold and between square brackets at the appropriate place(s) in the text. A video can be uploaded after selecting a “Video” file on the first submission screen. The movie should be created in a widely available program such as Windows MediaPlayer. A short paragraph describing the contents of any Supplementary Information or Video should also be inserted in the main text immediately before ACKNOWLEDGEMENTS.

Reproducing material from other published work. If material from work already published elsewhere is included in the article (for example, a figure used to illustrate a review) then permission must be obtained in advance from the copyright holder. Even before you submit your article to the journal, please ensure you that you explore the copyright situation for the material you wish to use, identify any relevant copyright holders, and establish whether you are likely to be able to obtain permissions from them. When seeking permission to reproduce any kind of third party material, please request the following: (1) non-exclusive rights to reproduce the material in the specified

article and journal published by Oxford Journals, a division of Oxford University Press; (2) print and electronic rights, ideally for use in any form or medium. If not possible to secure such broad-ranging rights, we do need the right to make the content available online; (3) the right to use the material for the life of the work (no time-restrictions such as one year etc on the licence granted); (4) world-wide English-language rights; if rights for all languages can be secured, this is preferable; and (5) the right to use images with a resolution of 300 dpi in the PDF version of the journal, or 72 dpi in the HTML version. Please contact the Annals of Botany Editorial Office if you have any queries regarding obtaining permission to reproduce material that may be under copyright.

Third-Party Content in Open Access papers. If you will be publishing your paper under an Open Access licence but it contains material for which you do not have Open Access re-use permissions, please state this clearly by supplying the following credit line alongside the material:

*Title of content
Author, Original publication, year of original publication, by permission of [rights holder]*

This image/content is not covered by the terms of the Creative Commons licence of this publication. For permission to reuse, please contact the rights holder.

THE REVIEW PROCESS

The corresponding author and all co-authors receive an acknowledgment of receipt of the manuscript and a manuscript reference number by e-mail. The corresponding author is informed when a Handling Editor has been assigned to the paper. Manuscripts considered suitable for peer review are sent to at least two outside referees. We give referees a target of two weeks for the return of their reports. Currently less than 25 % of submitted papers are accepted. Authors are asked to revise provisionally accepted articles within four weeks. To view the make-up of the Editorial Board click on [View full editorial board](#).

FORMATTING AND SUBMITTING A REVISED PAPER

The technical requirements for the Article, Table and Figure Files etc. are as described above for the first submission. If the technical requirements are not met, the paper will be sent back to the author until satisfactory files are provided. Revised papers are checked by a member of the Editorial Board and may be subject to a further round of

refereeing.

ACCEPTANCE, PROOFS, PRODUCTION AND PUBLICATION

When a paper is finally accepted you will be asked to supply some additional material for our Content *Snapshot* feature. Each Content *Snapshot* comprises a thumbnail image relevant to the paper and a short summary of its principal findings. For this, you will be asked to prepare a suitable Snapshot Image file (in colour) for the thumbnail illustration and also a short summary title and text (up to 60 words) to associate with the image. Examples of Content *Snapshots* can be found at <http://aob.oxfordjournals.org/content/106/4/i.full.pdf+html>.

You will also be invited to submit an eye-catching front cover picture and about 60 words of text for possible printing on the inside cover of the issue in which your article would appear. The technical requirements are similar to those for manuscript photographs. The picture should be sharp, of good contrast and be related to the content of the submitted paper; however, it need not be duplicated in the paper itself. The image should be sent as a TIFF, JPG or GIF file at 300 dpi, size approx. 10 × 10 cm. Authors of selected material will receive a copy of the cover illustration and a complimentary copy of the relevant issue of the Journal.

After acceptance you will also be asked to complete the online Licence to Publish form. This form also offers the opportunity to choose to have the full text and PDF versions of the paper made available to non-subscribers online from the time of first publication (Open Access). There is a charge for this, which varies depending on circumstances (see <http://www.oxfordjournals.org/oxfordopen/charges.html>) but it is considerably cheaper for authors whose university or institution subscribes to the Journal, and for authors in developing countries. If you do not select the Open Access option, your paper will be published with standard subscription-based access and no charge will be made.

Once a satisfactorily revised version has been received and accepted, the title of the paper, authorship and hyperlinked e-mail address of the corresponding author will be posted on the *Annals of Botany* website under AOB *FirstAlert*. This feature is accessible by subscribers and non-subscribers from the [Journal's home page](#). Corresponding authors will receive PDF proofs by e-mail attachment approximately 4–6 weeks after acceptance. Corrected proofs should be returned within 24 h. Adobe Acrobat Reader will be needed to read the PDF proof and is downloadable without charge from: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Authors should

pay special attention to diagrams, figures and to equations since these items are usually re-keyed or redrawn by the publisher. At this stage, authors will also be invited to order offprints and extra single copies of the issue in which the article will appear.

Publication and printing process

Once corrected proofs have been received and checked, the paper is posted on the website approximately six weeks ahead of print under *AOB Preview*. Each article is identified by a unique DOI (Digital Object Identifier), a code that can be used in bibliographic referencing and searching. The DOI and date of electronic publication in *AOB Preview* are also printed in the normal fully paginated monthly issue that is published about six weeks later. The paper will appear online and in print during the week preceding the start of the month of issue. The dates of submission, first return for revision, final acceptance and date of electronic publication of each article are printed on each paper.

The corresponding author will receive a free copy of the printed issue in which their paper appears and a free URL that gives access to the article online and to a downloadable PDF. In addition, 25 free printed copies of the article will be supplied. These items are normally dispatched within seven days of publication of the printed journal. The corresponding author is responsible for distributing this URL to any co-authors.

Post-publication services

Monthly alerts that supply the Journal's current Table of Contents can be requested by clicking on [Email table of contents](#) or by using an RSS feed. For more details on the latter click on [XML RSS feed](#). Readers can also be alerted to related papers in *Annals of Botany* and a wide range of other journals using the High Wire 'CiteTrack' alerting system. To access this click on [CiteTrack](#).

FORMAL STATEMENT

Upon receipt of accepted manuscripts at Oxford Journals authors will be invited to complete an online copyright licence to publish form. Please note that by submitting an article for publication you confirm that you are the corresponding/submitting author and that Oxford University Press ("OUP") may retain your email address for the purpose of communicating with you about the article. You agree to notify OUP immediately if your

details change. If your article is accepted for publication OUP will contact you using the email address you have used in the registration process.

Authors or their employers retain copyright on articles published in *Annals of Botany* . However, it is a condition of publication in the Journal that authors or their employers grant an exclusive licence to the Annals of Botany Company by completing and signing the Licence to Publish. This ensures that requests from third parties to reproduce articles are handled efficiently and consistently and allows the article to be disseminated as widely as possible. The Licence permits authors to use their own material in other publications provided that the Journal is acknowledged as the original place of publication and that the Annals of Botany Company is notified in writing. For more about rights and permissions click on this link [Rights](#) .

The official publication date is the date on which the paper is first posted electronically on the website. This date will normally be when the paper appears in *AOBPreview* . If a paper is not posted in *AOBPreview* , the date of publication is the date of first appearance in a fully paginated print or electronic monthly issue.

Author Self-Archiving/Public Access policy.