

**ASPECTOS DA ANATOMIA FOLIAR DE *Stevia rebaudiana* (BERT.) Bertoni
(COMPOSITAE)**

Thereza Grassioli, Maria Helena Cechella Achutti e Amélia Moema Veiga Lopes

Departamento de Biologia. Centro de Ciências Naturais e Exatas. UFSM. Santa Maria, RS.

RESUMO

Foram estudadas folhas de plantas cultivadas, vivas ou fixadas, em cortes transversais e paradérmicos. Fez-se a determinação da área ocupada pelas células epidérmicas, estômatos e tricomas, segundo método estereológico. Para essa determinação e o estudo da veenação, utilizaram-se folhas inteiras, clarificadas. A estrutura das folhas é dorsiventral. Os estômatos são anomocíticos. Os tricomas são dos tipos cônico, filiforme, glandular bisseriado. A veenação é acrodroma. Plexos de terminações de nervuras se dirigem para o ápice dos dentes da margem serrada, participando da formação de hidatódios. Os feixes vasculares são colaterais, ocorrendo diferenciação de fibras do floema. Os feixes vasculares das nervuras de ordem mais alta apresentam bainha parenquimática. Canais secretores esquizógenos, opostos ao protoxilema, acompanham as nervuras primárias.

SUMMARY

GRASSIOLLI, T.; ACHUTTI, M.H.C. and LOPES, A.M.V., 1985. Leaf structure of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni (Compositae). *Ciência e Natura*, 7: 129 - 144.

Leaves of cultivated plants, alive or fixed, in paradermal and cross sections were studied. The determination of occupied area by epidermal cells, stomata and trichomes according to the stereological method was done. For this determination and the study of venation, whole clarified leaves were used. The structure of leaves is dorsiventral. The stomata are anomocytic. The trichomes are of the conical, filiform and glandular biseriate types. The venation is acrodromous. The vascular bundles have a collateral arrangement. Floem fibers are present. The minor veins have paranchymatic bundle sheath. Hydathodes occur at the apices of serrations on the margins of leaves. Schizogenous secretory canals, opposed to protoxylem, accompany the primary veins.

INTRODUÇÃO

Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni é Compositae, nativa da região limítrofe entre o Brasil e o Paraguai. O interesse pelo cultivo dessa planta no Brasil vem aumentando cada vez mais nos últimos

anos (13). Sua importância decorre, principalmente, da presença de esteviosídeo que possui propriedades adoçantes.

FELIPPE (2) e SAKAGUCHI & KAN (13) apresentam revisão dos trabalhos publicados a respeito de *S. rebaudiana*. São estudos de fisiologia, química, farmacologia, cultivo, cultura de tecido e taxonomia.

Com o presente trabalho, visamos a estudar aspectos da estrutura foliar de *S. rebaudiana*, tendo como objetivo conhecer sua organização.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados exemplares cultivados no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul e em Capão Bonito, Vale da Ribeira, Estado de São Paulo. Foram usadas folhas jovens e adultas, vivas ou fixadas. Os fixadores usados foram FAA 50, FPA (8) e álcool etílico a 70% (7). Foram feitas lâminas temporárias, com cortes a mão livre, utilizando-se, como corante, vermelho neutro (8). Para a elaboração das lâminas permanentes, seguiu-se a técnica usual de inclusão em parafina, usando-se o processo de dupla coloração safranina - "fas-green" (8). Para identificação da natureza dos constituintes celulares, foram efetuados testes histoquímicos, utilizando-se Lugol, Sudan IV e floroglucina em meio ácido (14). Para o estudo da venação, as folhas foram diafanizadas, segundo técnica indicada por FOSTER (4). A determinação da área ocupada pelas células epidérmicas, estômatos e tricomas, foi obtida pelo método estereológico da fração de pontos (6), em folhas inteiras, clarificadas pela água sanitária comercial. Aspectos da morfologia, incluindo padrão de venação, foram descritos segundo o método proposto por HICKEY (5). Para a descrição da estrutura dos tricomas, tomou-se por base o estudo de tricomas de *Compositae* realizado por RAMAYYA (11). Os desenhos foram feitos ao microscópio ótico, com o auxílio da câmara clara. O aspecto geral da venação foi obtido através da projeção de lâmina em um anteparo.

RESULTADOS

As folhas de *Stevia rebaudiana* são simétricas, elípticas, com margens convexas inteiras, na base, e serreadas nas porções média e apical. O ângulo apical dos dentes é obtuso ou reto. O tipo de serreado é convexo, com espaciação comumente regular e seriação simples. O ápice da lâmina é agudo, a base é aguda, atenuada. A textura é membranácea. A posição das glândulas (tricomas glandulares) é laminar. O pecíolo está ausente ou é muito curto com a base alargada.

Epiderme - A lâmina foliar adulta, de estrutura nitidamente

dorsiventral, é revestida de epiderme unisseriada, provida de tricomas tectores e glandulares. Os tricomas glandulares se alojam em concavidades da epiderme, o que confere a mesma aspecto ondulado.

Em vista frontal, a epiderme das superfícies adaxial e abaxial é formada por células com tamanho e forma variados. As paredes celulares são delgadas, sendo as anticlinais onduladas (Figuras 1 a,b). Em corte transversal, predomina o diâmetro periclinal das células sobre o diâmetro anticlinal. As células da face adaxial são maiores que as da abaxial. A epiderme é revestida da cutícula fina com estrias epicuticulares (Figuras 1 c,d).

Estômatos - Os estômatos estão distribuídos irregularmente em ambas as faces, podendo ocorrer estômatos geminados (Figura 1 b). São mais elevados do que as células epidérmicas. Na face abaxial, são mais elevados e numerosos do que na face adaxial (Figura 1 c,d). As determinações histométricas, apresentadas na Tabela I, mostram a relação da área ocupada pelas células epidérmicas, estômatos e tricomas, nas faces adaxial e abaxial da lâmina foliar adulta.

Na seqüência de Figuras 2a-f, correspondentes à epiderme de folhas jovens, estão representadas fases do desenvolvimento dos estômatos. As células da protoderme, em geral, estão pouco diferenciadas. Em vista frontal, sua forma é geralmente poligonal, tendendo para arredondada. O citoplasma é denso e o núcleo é grande em relação ao volume da célula. Na Figura 2a, vê-se célula em início de divisão que conduzirá à formação de duas células desiguais em forma e tamanho. A Figura 2b mostra uma célula pequena, triangular e uma maior. Ambas resultaram de uma divisão irregular semelhante à indicada na Figura 2a. A célula triangular pequena é a célula-mãe do estômato. Esta célula divide-se, formando as duas células oclusivas: na Figura 2c, vê-se o início da divisão e na Figura 2d, as duas células já estão individualizadas. Nas Figuras 2e,f, aparecem estômatos em fase final de diferenciação, com núcleo parietal e vacúolos grandes. As células epidérmicas que circundam as oclusivas não se distinguem das demais pelo aspecto. Os estômatos são do tipo anômico.

Tricomas - Os tricomas são dos seguintes tipos: simples cônico, simples filiforme e glandular bisseriado vesicular.

O simples cônico é um tricoma não ramificado, unisseriado, pluricelular. O pé é composto, o corpo é unisseriado inteiro, afilado no ápice e formado de sete a dez células. As células do ápice são longas, e as da base têm o diâmetro transversal maior do que o longitudinal. As paredes são espessadas e cutinizadas (Figura 1b).

O simples filiforme é um tricoma não ramificado, unisseriado, pluricelular. O pé é simples, o corpo unisseriado inteiro, arredondado no ápice e formado de quatro a cinco células com o diâmetro

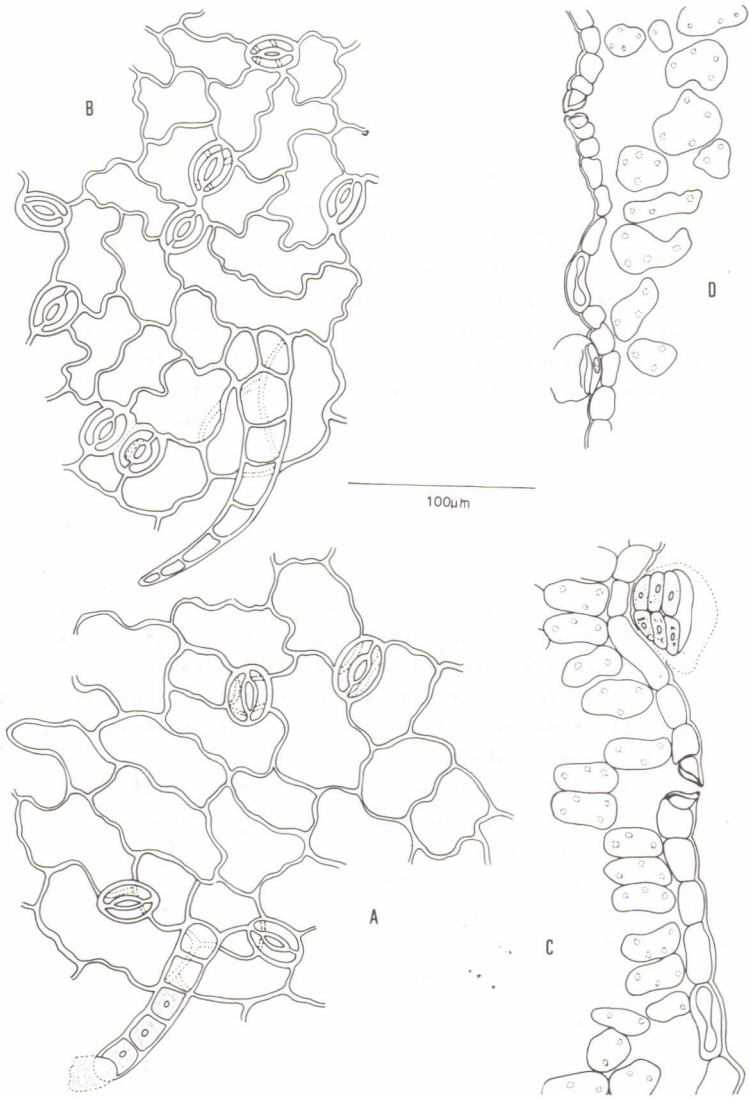
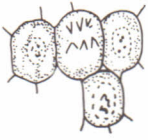


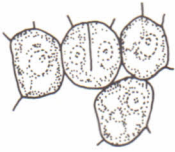
Figura 1. Epiderme Foliar. A - face adaxial em vista frontal, mostrando tricoma simples filiforme. B - face abaxial em vista frontal, mostrando tricoma simples cônico. C - face adaxial em corte transversal, mostrando tricoma glandular bisseriado. D - face abaxial em corte transversal.



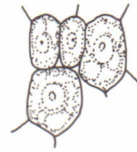
A



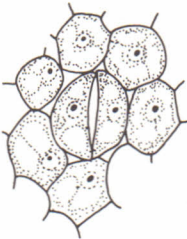
B



C



D



E



F

Figura 2 A-F - Fase do desenvolvimento de estômatos em epiderme de folhas jovens.

longitudinal maior do que o transversal. As paredes celulares são delicadas sendo as das células basais cutinizadas. As células terminais possuem um conteúdo mais denso e a longevidade parece ser menor em relação às basais. O tricoma filiforme se apresenta curvado em direção à epiderme, ficando o ápice pendente (Figura 1a).

TABELA I. VALORES DA DETERMINAÇÃO HISTOMÉTRICA DAS FRAÇÕES DE CÉLULAS EPIDÉRMICAS, ESTÔMATOS E TRICOMAS NA LÂMINA FOLIAR DE *Stevia rebaudiana*.

| Tipo celular | Valor mínimo | FACE ADAXIAL | | |
|------------------------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| | | Média | Valor máximo | Desvio padrão |
| Células epidérmicas | 78,0 | 84,3 | 88,0 | 2,79 |
| Estômatos | 5,0 | 5,9 | 8,0 | 1,37 |
| Tricoma simples cônico | 0,0 | 1,9 | 3,0 | 1,10 |
| Tricoma simples filiforme | 1,0 | 2,7 | 3,0 | 1,41 |
| Tricoma glandular bisseriado | 3,0 | 5,2 | 7,0 | 1,22 |

| Tipo celular | Valor mínimo | FACE ABAXIAL | | |
|------------------------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| | | Média | Valor máximo | Desvio padrão |
| Células epidérmicas | 68,0 | 74,0 | 77,0 | 2,70 |
| Estômatos | 12,0 | 14,9 | 18,0 | 1,72 |
| Tricoma simples cônico | 3,0 | 4,1 | 6,0 | 0,99 |
| Tricoma simples filiforme | 3,0 | 4,1 | 6,0 | 1,10 |
| Tricoma glandular bisseriado | 3,0 | 3,8 | 5,0 | 0,78 |

O tricoma glandular bisseriado vesicular tem o pé composto por duas células, o corpo é bisseriado, inteiro com quatro células em cada fileira. As células são aproximadamente do mesmo tamanho, com exceção das terminais que são mais longas. As paredes são delicadas, as externas levemente convexas e o citoplasma é denso. Todas as células do corpo são secretoras. A vesícula cuticular envolve uma ou mais camadas celulares terminais (Figura 1c).

Mesofilo - O mesofilo, na folha adulta, é formado por um parênquima assimilador diferenciado em paliçádico lacunoso (Figura 3). O paliçádico está junto à epiderme da face adaxial e o lacunoso, junto à face abaxial. O parênquima paliçádico é formado de duas a três camadas de células. Na primeira camada, as células são alongadas, compactadas e perpendiculares à epiderme. Os espaços observados correspondem às câmaras subestomáticas. A camada mais interna do paliçádico não é tão homogênea como a externa e tem alguma semelhança com o lacunoso.



Figura 3. Corte transversal de lâmina foliar, mostrando aspecto do mesófilo e nervuras de pequeno porte.

O tecido lacunoso é formado de três a quatro camadas de células heteromórficas, com espaços intercelulares acentuados e profundas câmaras subestomáticas.

Na porção inteira da margem da folha, ocorre parênquima paliçádico logo abaixo da epiderme. Esse parênquima é formado de uma ou duas camadas de células muito próximas umas das outras. Nessa região, não foram evidenciados estômatos (Figura 4a).

Na porção serreada, no ápice dos dentes, formam-se hidatódios. Após a epiderme, ocorre um parênquima semelhante ao lacunoso, tanto na forma das células como nos espaços intercelulares. Esses espaços, grandes e frequentes, correspondem às câmaras subestomáticas. Elementos condutores do xilema, pertencentes a plexos de terminações de nervuras, chegam muito próximo à epiderme. Muitas vezes, vê-se apenas uma camada de células entre o elemento condutor e a epiderme. Na extremidade livre desses elementos condutores, não ocorre bainha de feixe (Figura 4b).

Venação - A venação é acródroma, suprabasal com desenvolvimento perfeito (Figura 5a). Laços broquidódromos ocorrem no ápice da lâmina. As nervuras primárias (mediana e laterais) são de tamanho moderado, percurso reto ou curvado, ramificado. As nervuras secundárias têm ângulo de divergência agudo moderado. A espessura dessas nervuras é moderada, o percurso curvado de maneira abrupta, sinuoso, ramificado. As ramificações que formam arco unem-se às nervuras secundárias supra-adjacentes em ângulo reto ou agudo e estão encerradas por arcos secundários. O ângulo de origem das nervuras terciárias, no lado inferior das secundárias, é reto; no lado superior, é agudo ou reto. As nervuras terciárias mostram padrão reticulado: nervuras terciárias se anastomosam com outras terciárias ou com nervuras secundárias (Figura 5b).

A venação de ordem mais alta forma um retículo no qual não se distinguem ordens de nervuras. Sua trajetória é predominantemente ortogonal. As vênulas são simples, sem ramificações, curvadas, às vezes, lineares, ou ramificadas uma a três vezes por dicotomização. As aréolas são de forma quadrangular, pentagonal ou, ainda poligonal. Vênulas atravessam suas aréolas e também se anastomosam em arcos (Figura 5c). Traqueídeos espiralados isolados, aos pares, ou grupos de três ou mais, formam as extremidades livres das terminações de nervuras (Figura 5d).

Na margem inteira a venação última é incompleta, com vênulas terminais livres, ou arqueada. Na porção serreada da margem, as terminações de nervura livres convergem para o ápice dos dentes.

Nervuras primárias - Na base da lâmina foliar, observam-se em corte transversal, três feixes vasculares livres, sendo o central ligeiramente maior (Figura 6). Esses feixes são colaterais. Os elementos

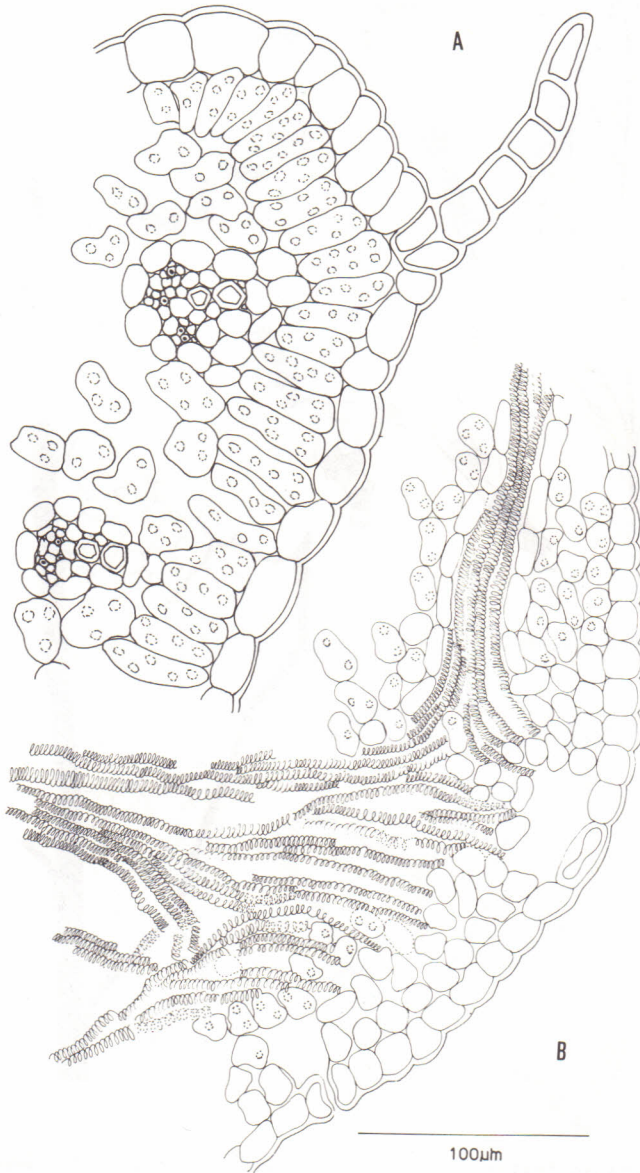


Figura 4. Margem da lâmina foliar. A - corte transversal na porção inteira. B - corte paradérmico na porção serrada.

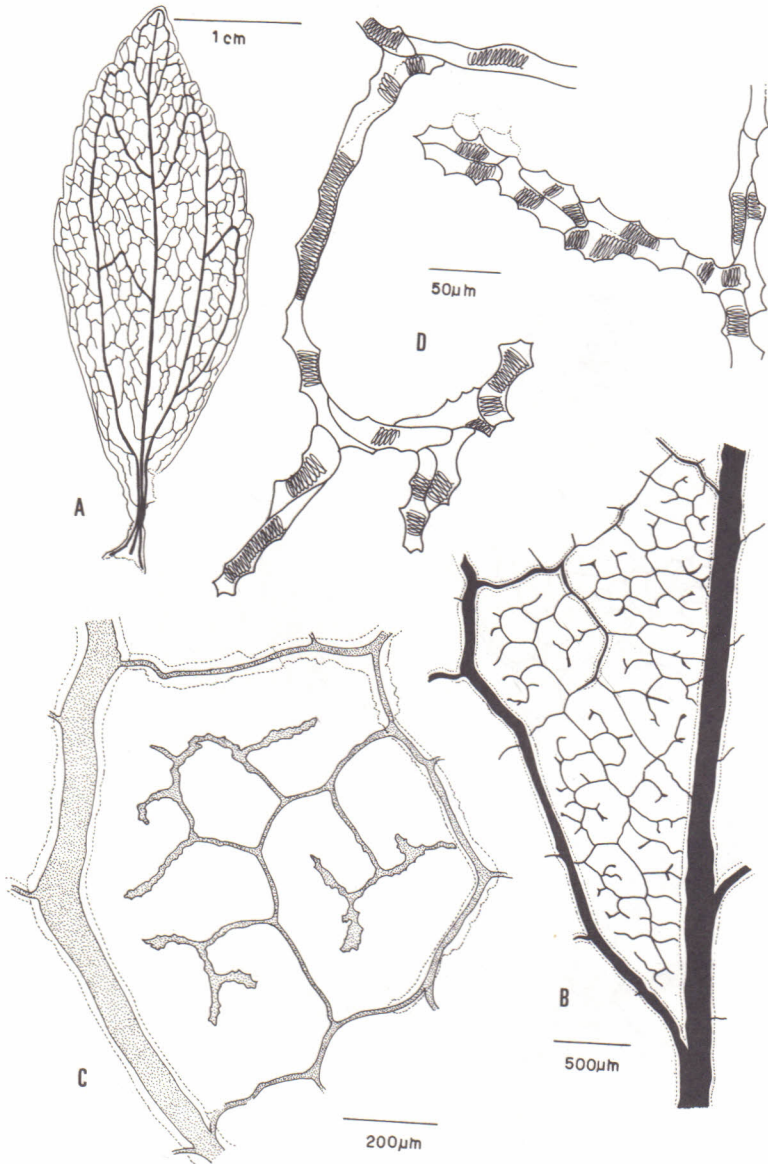


Figura 5. Venação foliar acrodroma. A - aspecto geral. B - área limitada por uma porção de nervura primária mediana e nervura secundária. C - pormenor, mostrando uma porção de nervura terciária e vénulas. D - terminações de nervuras. As linhas pontilhadas, em B e C, representam o esclerenquima que acompanha as nervuras primárias, secundárias e terciárias.

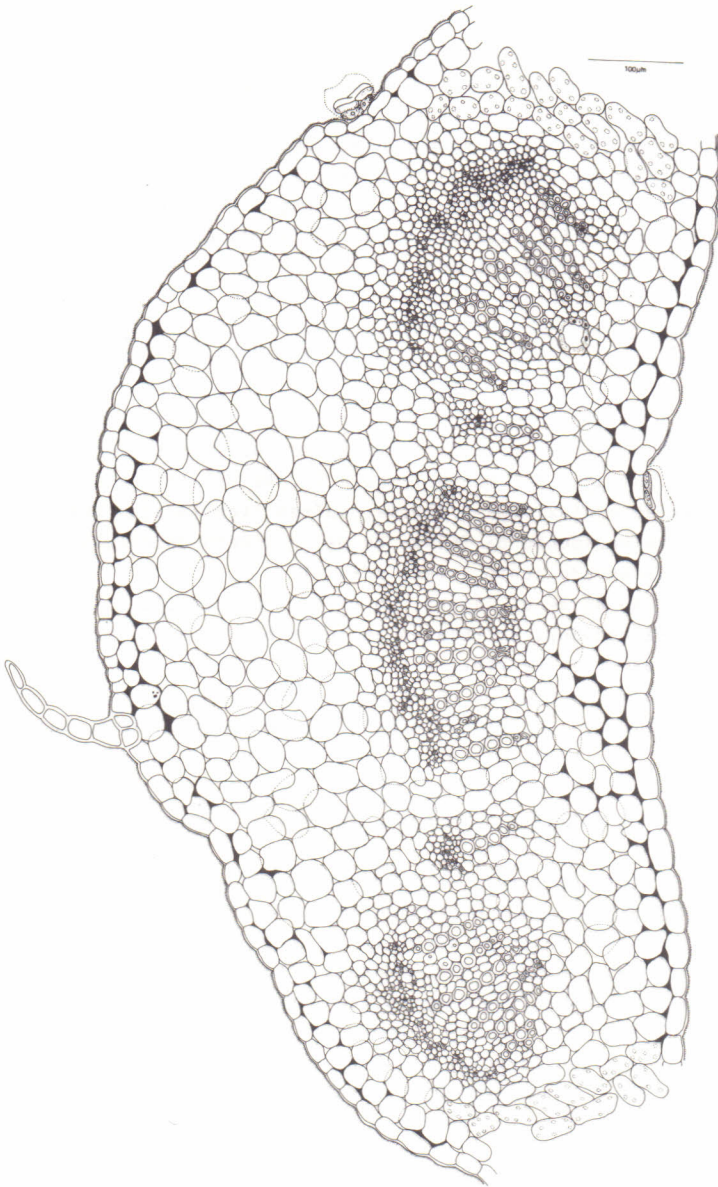


Figura 6. Corte transversal ao nível da base foliar, mostrando canais de secreção em posição oposta ao protoxilema.

condutores do xilema formam fileiras radiais unisseriadas ou bisseriadas, que se alternam com raios parenquimáticos. Os vasos são anelados, espiralados ou reticulados com paredes transversais inclinadas ou não e perfurações simples. No floema, os tubos crivados e células companheiras se dispõem em pequenos grupos separados por raios parenquimáticos. Ocorrem fibras do floema, que se lignificam.

Um parênquima fundamental com células clorofiladas envolve os feixes vasculares; as células que limitam com o protofloema contêm amido. Nesse parênquima, os espaços intercelulares são grandes, próximos à face adaxial. Logo abaixo da epiderme, em ambas as faces, ocorre colênquima angular.

A medida que se observa em direção ao ápice da folha, nota-se que os feixes vasculares laterais se afastam do feixe central, enquanto surge, entre eles, um mesófilo. Formam-se, assim, as três nervuras primárias que caracterizam a venação acródroma.

Ao nível do terço médio da lâmina foliar, em corte transversal, o feixe vascular da nervura mediana se assemelha aos da base em organização e tamanho (Figura 7). As células parenquimáticas, próximas ao protoxilema e floema, sofrem lignificação que aumenta com o envelhecimento da folha. Um maior número de células de colênquima é observado junto à face adaxial.

No ápice da lâmina, em corte transversal, o feixe vascular da nervura mediana, em relação ao terço médio, é bem menor. O parênquima fundamental se reduz a uma ou duas camadas de células, ficando o feixe muito próximo ao mesófilo. Fibras do floema estão presentes. As células, em posição oposta ao protoxilema, se apresentam lignificadas à semelhança do que ocorre com as fibras do floema. Não foi constatada ocorrência de colênquima.

As nervuras primárias laterais se assemelham à nervura mediana em sua organização.

É freqüente a ocorrência de canais de secreção esquizôgenos, em posição oposta ao protoxilema, nas nervuras primárias, desde a base até o ápice da folha (Figura 6). Esses canais se dispõem em séries longitudinais descontínuas, são em número de um ou dois por feixe vascular. Observou-se que pode ocorrer a fusão entre dois canais justapostos. Quando ocorre lignificação nas proximidades do protoxilema, inicialmente, ela não atinge o parênquima que circunda o canal. Com o envelhecimento da folha, apenas as paredes das células epiteliais não se apresentam espessadas, lignificadas.

Nervuras de ordem mais alta - Os feixes vasculares, que se encontram no mesófilo propriamente dito, estão circundados por uma bainha de feixe, constituída de células parenquimáticas (Figura 3). Essas células são comumente alongadas e seu maior diâmetro é paralelo ao eixo longitudinal do feixe. Têm paredes alongadas, cloroplastos

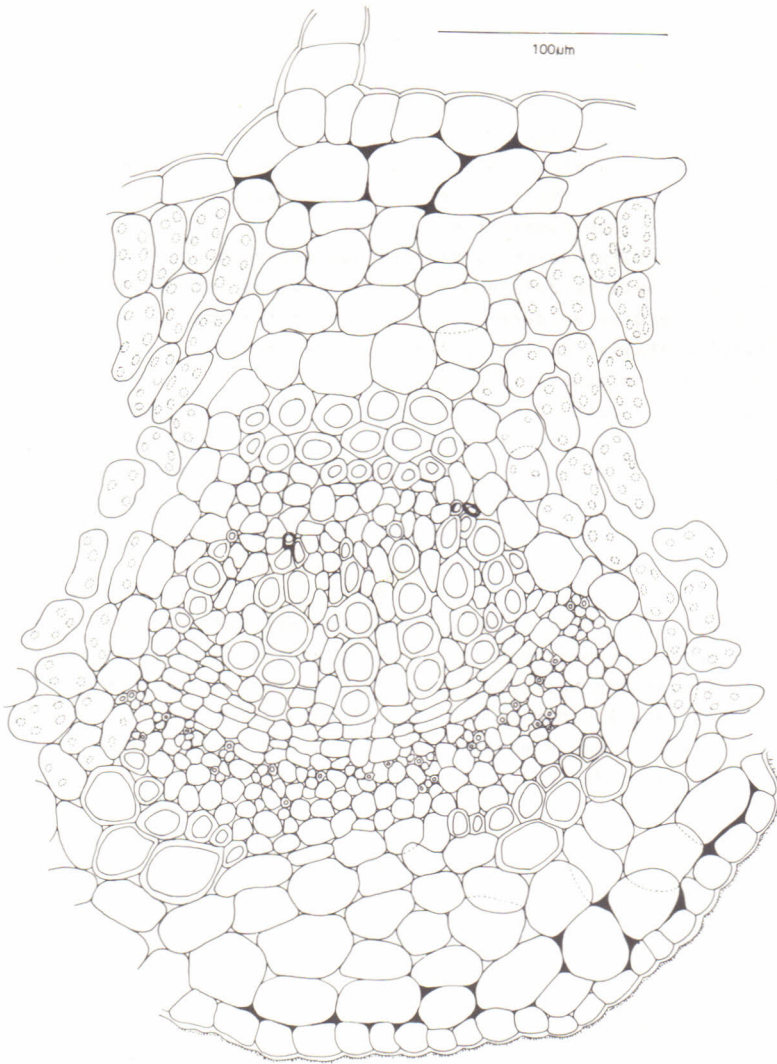


Figura 7. Corte transversal ao nível do terço médio da nervura mediana.

pequenos, pouco numerosos e amido. A bainha de feixe pode ou não estender-se em direção à epiderme. Quando presente, a extensão da bainha de feixe pode estar em ambos os lados do feixe ou apenas no lado adaxial.

DISCUSSÃO

As folhas de *S. rebaudiana* apresentam estrutura dorsiventral, estômatos anomocíticos, hidatódios nas terminações de nervuras, feixe vasculares com distinta bainha de parênquima. Segundo METCALFE & CHALK (1950), esses aspectos anatômicos são de ocorrência comum em folha de Compositae.

Analisando-se os valores das determinações histométricas (Tabela I) nota-se diferença significativa na relação da área ocupada pelas células epidérmicas, estômatos e tricomas, entre as faces adaxial e abaxial da lâmina foliar. O valor médio das células epidérmicas e dos tricomas glandulares, na face adaxial, é maior do que o da abaxial. O contrário observa-se em relação aos estômatos e tricomas cônico e filiforme. O caráter anfiestomático, observado nas folhas de *S. rebaudiana*, é comum na maioria das Compositae (10).

No ápice dos dentes das folhas da espécie em estudo, ocorrem hidatódios com mais de um estômato (poro). Essa característica é mencionada para Compositae por ESAU (1).

Os tricomas das folhas de *S. rebaudiana* exemplificam padrões estruturais de tricomas propostos por RAMAYYA (12): filiforme (simples filiforme), macroforme (simples cônico) e bisseriado (glandular bisseriado vesicular). Os tricomas filiforme e cônico são uniseriadados como é comum ocorrer com tricomas tectores de Compositae (15). O filiforme apresenta as células da porção terminal com paredes mais delicadas e conteúdo mais denso do que as basais. UPHOF & HUMMEL (16), RAMAYYA (11), fazem referência a tricomas que apresentam diferença no comportamento das células basais em relação às apicais. SOLEREDER (15) cita tal ocorrência para *Vernonia* e *Catananche*.

O tricoma glandular bisseriado vesicular é amplamente distribuído na família Compositae (15, 9 e 16). Em *S. rebaudiana*, esse tricoma encontra-se caracteristicamente alojado em concavidades, o que confere à epiderme um aspecto ondulado.

WYLIE (17) se refere às paredes finas e permeáveis das cêlulas da extensão de bainha de feixe, como uma característica de importância na translocação extravascular da lâmina foliar. Em *S. rebaudiana*, a bainha dos feixes menores e suas extensões permanecem parenquimáticas, enquanto que as células que circundam os feixes das nervuras maiores sofrem esclerificação. FERREIRA (3) cita a ocorrência de bainhas esclerificadas em diversas espécies de Eupatoriae.

Canais secretores esquizôgenos, que se originam por divisão

de células da endoderme, são características das Compositae, podem ocorrer em raiz, caule e folhas. Além de canais secretores endodermis, têm sido observados canais secretores em outras posições nos diversos órgãos de determinados representantes da família (15).

Nas folhas de *S. rebaudiana*, canais de secreção esquizógenos estão opostos ao protoxilema, delimitados por células epiteliais. Foram observados canais secretores desprovidos de epitélio em caules e rizomas de espécies de determinados gêneros de Compositae, dentre eles o gênero *Stevia* (15). De acordo com SOLEREDER (15), a posição dos canais secretores é uma característica útil em taxonomia de Compositae, especialmente como um caráter genérico.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Adelino Alvarez Filho, pela coleta de parte do material. À Senhora Antonieta Isaia da Rosa, pela confecção das lâminas permanentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ESAU, K. *Plant anatomy*. 2 ed. New York, John Wiley & Sons, 1965, 767p.
2. FELIPPE, G.M. *Stevia rebaudiana* Bert.; uma revisão. *Ciência e Cultura*, 29(11): 1240-8, 1977.
3. FERREIRA, A.G. Contribuição ao estudo da nervação foliar das Compositae dos cerrados. IV: Tribo Eupatoriae. *Archos Bot. Estado de São Paulo* 4(3): 153-70, 1968.
4. FOSTER, A.S. Techniques for study of venation patterns in the leaves of Angiosperms. In: INTERNATIONAL CONGRESS, 7, Stockholm, 1950. *Proceedings ... Stockholm*, 1953. 586-7.
5. HICKEY, L.J. Classification of the architecture of dicotyledonous leaves. *American Journal Botanic.*, 60(1): 17-33, 1973.
6. IFJU, G. *Quantitative wood anatomy; a stereological approach*. Blacksburg, VPI, IPT, 1977. 26 p.
7. JENSEN, W.A. *Botanical histochemistry; principles and practice*. San Francisco, W.H. Freeman, 1962. 408 p.
8. JOHANSEN, D.A. *Plant microtechnique*. New York, McGraw-Hill Book, 1940. 523 p.
9. METCALFE, C.R. & CHALK, L. *Anatomy of dicotyledons*. Oxford, Clarendon, 1950. v.2.
10. NAPP-ZINN, K. Anatomie des Blattes. II Blattanatomie der Angiosperm. In *Handbuch Pflanzenanatomie*. Berlin, Gebr. Borntraeger, 1973/1974. V. 8, parte 1 e 2.
11. RAMAYYA, N. Studies on the trichomes of some Compositae. I - General structure. *Bulletin Bot. Surv. India*, 4(1-4): 177-88, 1962.
12. _____. Modes of development in the trichomes of Compositae.

Current Science. India, 32(1): 27-8, 1963.

13. SAKAGUCHI, M. & KAN, T. As pesquisas japonesas com *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni e o esteviosídeo. *Ciência e Cultura*, 34: 235-48, 1982.
14. SASS, J.E. *Botanical microtechnique*. 2 ed. Iowa, The Iowa State College, 1951, 228 p.
15. SOLEREDER, H. *Systematic anatomy of the dicotyledons*. Oxford, Clarendon, 1980. 2v.
16. UPHOF, J.C. & HUMMEL, K. Plants hairs. In *Handbuch Pflanzenanatomie*, Berlin, Gebr. Borntraeger, 1962. 4 t.5.
17. WYLIE, R.B. The bundle sheath extension in leaves of dicotyledons. *American Journal of Botany*, 39(9): 645-51, 1952.

Recebido em novembro, 1985; aceito em novembro, 1985.