

Josiane Wolff

**Ocorrência e evolução da fitomelanina em caules  
aéreos de Vernoniae e análise dos mecanismos  
celulares envolvidos em sua síntese.**

Dissertação/ submetida  
como requisito final para  
a obtenção do grau de  
mestre em Biologia de  
Fungos, Algas e Plantas  
(FAP) pela  
Universidade Federal de  
Santa Catarina.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.  
Makeli Garibotti Lusa  
(UFSC).

Coorientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>  
Ana Cláudia Rodrigues  
(UFSC)

Florianópolis  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca  
Universitária da UFSC.

Wolff, Josiane

Ocorrência e evolução da fitomelanina em caules aéreos de Vernoniaeae e análise dos mecanismos celulares envolvidos em sua síntese. / Josiane Wolff ; orientador, Makeli Garibotti Lusa, coorientador, Ana Cláudia Rodrigues, 2019.

81p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas, Florianópolis, 2019.

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2. Asteraceae. 3. Evolução. 4. Fitomelanina. 5. Mecanismos celulares. I. Garibotti Lusa, Makeli. II. Rodrigues, Ana Cláudia. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas. IV. Título.

Josiane Wolff

**Occurrence and evolution of phytomelanin in aerial  
stems of Vernoniae and analysis of cellular  
mechanisms involved in its synthesis.**

Dissertation submitted  
as final requirement to  
obtain a Master's Degree  
in Biology of Fungi  
Algae and Plants (FAP)  
by the Federal  
University of Santa  
Catarina.

Advisors: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.  
Makeli Garibotti Lusa  
(UFSC).

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.  
Ana Cláudia Rodrigues  
(UFSC)

Florianópolis  
2019



**“Ocorrência e evolução da fitomelanina em caules aéreos de Vernoniaceae e análise dos mecanismos celulares envolvidos em sua síntese”**

por

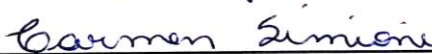
**Josiane Wolff**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 04/PPGFAP/2019) do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:



Prof.ª. Dr.ª. Makeli Garibotti Lusa



Prof.ª. Dr.ª. Carmen Simioni



Prof.ª. Dr.ª. Fernanda Maria Cordeiro de Oliveira



Prof.ª. Dr.ª. Mayara Krasinski Caddah



Prof. Dr. Pedro Fiaschi

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas

Florianópolis, 28 de março de 2019.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente sou grata a Deus pela vida e pela oportunidade que Ele me deu de conhecer pessoas maravilhosas durante o trajeto do mestrado.

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Cláudia Rodrigues pelo aceite em me orientar, pelo apoio, pela confiança e suporte técnico!

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Makeli Garibotti Lusa pela orientação, auxílio e suporte em todo o decorrer do mestrado! Pela paciência, pelos conselhos, por todas as discussões construtivas e por todos os ensinamentos em relação à pesquisa e ao ensino!!

Ao prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup>. Benoit Leulle pela colaboração, suporte técnico e por todo o apoio oferecido.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas, por me oferecer um ensino de qualidade e a realização deste mestrado. Aos professores do programa, por partilharem dos seus conhecimentos e disposição.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa (CAPES-DS de 01/03/2017 a 28/02/2019).

À Dr<sup>a</sup>. Carolina Siniscalchi, pelo apoio e por toda colaboração!

A todos os integrantes do Laboratório de Anatomia Vegetal que estiveram presentes durante esse período de estudos, Everton, Willian, Alexandre, Elisabech, Flávio, Felipe e Flávia, obrigada pela amizade, pelo carinho, pelas risadas (que não foram poucas), pelo apoio e por toda a colaboração que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), pela disponibilidade e apoio técnico.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), pelo apoio técnico no uso dos equipamentos, pelo auxílio na preparação das amostras e pela amizade. Em especial gostaria de agradecer à técnica Eliana de Medeiros Oliveira,

pelas discussões enriquecedoras e pela disposição sempre que necessário.

Aos meus colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas, obrigada pelo apoio e amizade constantes.

A toda minha família, mãe, Marquinhos, Pri, Vi, Deli, David, Fer, Lena, Mila, Giva, Pedrinho. Obrigada pelo amor sempiterno recebido de todos vocês! Só tenho a agradecer pelo apoio, pela amizade, companheirismo e paciência.

Ao meu esposo Flavio, companheiro e amigo! Obrigada pelo constante incentivo, por tantas horas de conversas, pelo carinho e atenção que você sempre me deu! Por todo apoio nas etapas de construção dessa dissertação (coletas, procedimentos, nas pranchas, na escrita). Só tenho a agradecer!!!

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a construção deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos!!!



*Dedico esse trabalho ao meu esposo  
Flávio, um presente de Deus em  
minha vida!*



## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESUMO</b> .....  | <b>15</b> |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>17</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....   | <b>19</b> |
| 1.1 Importância da fitomelanina .....  | 19        |
| 1.2 Hipóteses sobre a síntese da fitomelanina.....   | 21        |
| 1.3 Características gerais da família Asteraceae e da tribo Vernonieae .....   | 21        |
| 1.4 Objetivos .....  | 22        |
| <b>CAPÍTULO 1</b> .....  | <b>23</b> |
| <b>Ocorrência e evolução da fitomelanina em caules aéreos de Vernonieae (Asteraceae)</b> .....   | <b>23</b> |
| <b>RESUMO</b> .....  | <b>25</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>27</b> |
| <b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | <b>29</b> |
| 2.1 Material botânico .....  | 29        |
| 2.2 Procedimentos para análise micromorfológica do material herborizado.....   | 29        |
| 2.3 Reconstrução dos estados ancestrais dos caracteres na filogenia .....  | 29        |
| <b>3. RESULTADOS</b> .....   | <b>32</b> |
| 3.1. Ocorrência da fitomelanina nas diferentes regiões do caule .....  | 32        |
| 3.2. Evolução da fitomelanina: reconstruções dos estados ancestrais dos caracteres .....   | 34        |
| <b>4. DISCUSSÃO</b> .....  | <b>41</b> |
| 4.1. Ocorrência da fitomelanina nas espécies de Vernonieae e distribuição nos tecidos .....  | 41        |
| 4.2. Estados ancestrais da fitomelanina em caules aéreos de Vernonieae.....  | 42        |
| <b>5. CONCLUSÃO</b> .....  | <b>43</b> |
| <b>6. AGRADECIMENTOS</b> .....   | <b>43</b> |
| <b>ANEXO I</b> .....   | <b>44</b> |
| <b>Tab. A1</b> .....   | <b>44</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS</b> .....  | <b>47</b> |
| <b>CAPÍTULO 2</b> .....  | <b>51</b> |
| <b>Mecanismos celulares envolvidos com a presença de fitomelanina em caules aéreos de <i>Piptocarpha axillaris</i> (Less.) Baker. (Vernonieae, Asteraceae)</b> ..... | <b>51</b> |
| <b>RESUMO</b> .....  | <b>52</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>53</b> |
| <b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | <b>54</b> |
| 2.1 Material botânico .....  | 54        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.4 Observações estruturais – Microscopia de luz.....                     | 55        |
| 2.5 Observações subcelulares – Microscopia Eletrônica de Transmissão..... | 55        |
| <b>3. RESULTADOS.....</b>   | <b>56</b> |
| 3.2 Análises estruturais .....  | 57        |
| 3.2 Observações subcelulares – Formação da fitomelanina.....              | 60        |
| 3.3. Ontogênese de precursores da fitomelanina.....                       | 64        |
| <b>4. DISCUSSÃO .....</b>   | <b>68</b> |
| 4.1. Caracterização tecidual da distribuição da fitomelanina .....        | 68        |
| 4.2. Origem química da fitomelanina e caracterização subcelular.....      | 68        |
| <b>5. CONCLUSÃO .....</b>   | <b>71</b> |
| <b>6. AGRADECIMENTOS .....</b>  | <b>71</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>71</b> |
| <b>2. DISCUSSÃO GERAL .....</b>   | <b>76</b> |
| <b>3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                       | <b>77</b> |
| <b>4. REFERÊNCIAS GERAIS .....</b>  | <b>78</b> |

## RESUMO

A melanina é um pigmento escuro resistente e que pode ser encontrado em tecidos animais, vegetais e fúngicos. Quando encontrada em tecidos vegetais é chamada de fitomelanina. A fitomelanina é comumente descrita em sementes das Asparagales, em cipselas de algumas Asteraceae e recentemente foi relatada em caules aéreos de espécies de Lychnophorinae (Vernonieae – Asteraceae). O pigmento está relacionado à proteção contra invasões fúngicas e, ou, microbianas, contra herbivoria, alta radiação solar e dessecação. Os estudos relacionados à presença do pigmento em sementes e frutos vêm demonstrando a grande importância da fitomelanina nos estudos taxonômicos e evolutivos em Asparagales e Asteraceae. Em Asparagales, por exemplo, a ocorrência do pigmento no envoltório da semente é considerada uma sinapomorfia para a ordem. Nas Asteraceae, a ocorrência do pigmento no pericarpo da cipsela é considerada diagnóstica para certas tribos, que compõem a “aliança da fitomelanina”. A partir da premissa de que espécies da tribo Vernonieae apresentam fitomelanina em tecidos caulinares, este estudo pretendeu entender a evolução desse pigmento em caules aéreos de Vernonieae, investigando espécies pertencentes às principais linhagens da tribo. Além disso, pouco se sabe sobre a formação desse pigmento, já que há poucos estudos relacionados à temática, especialmente aos mecanismos celulares envolvidos com a síntese e liberação do pigmento nos tecidos. Assim, com o intuito de entender quais células e quais mecanismos celulares estariam envolvidos com a síntese da fitomelanina em caules aéreos de Vernonieae, foi realizado um estudo ontogenético, estrutural e subcelular de caules da espécie *Piptocarpha axillaris* (Less.) Baker. Para isso, utilizaram-se metodologias usuais em anatomia vegetal e em microscopia eletrônica de transmissão. Para o entendimento da evolução da ocorrência do pigmento na tribo Vernonieae, além de análises usuais em anatomia vegetal, foi realizada a reconstrução dos estados ancestrais dos caracteres de ocorrência de fitomelanina, por máxima verossimilhança, utilizando-se uma hipótese filogenética recente de Vernonieae, baseada em dados morfológicos e moleculares. Na caracterização da ocorrência de fitomelanina em caules aéreos de Vernonieae, a presença de fitomelanina foi observada nos espaços intercelulares de esclereídes com diferentes graus de espessamento, mas mais frequente em esclereídes espessadas. Pode-se observar uma maior frequência do pigmento na medula, no floema secundário e no córtex, respectivamente. As reconstruções dos estados ancestrais dos caracteres sugerem que provavelmente o ancestral comum mais recente da tribo Vernonieae apresentava fitomelanina na região do córtex, no floema secundário e na medula. Nas demais regiões e, ou tecidos do caule, o pigmento teria surgido ao longo da evolução da tribo. Já as análises dos caules da espécie *P. axillaris* possibilitam observar que a polimerização da fitomelanina pode ocorrer simultaneamente ou após a esclerificação e que essa deposição aumenta de acordo com o espessamento caulinar. A partir das análises subcelulares sugerimos a participação de compostos fenólicos formados em plastídeos como importantes precursores da fitomelanina, pois foi possível observar ampla frequência de compostos eletrondensos nessas organelas.

Também sugerimos a participação de material provindo do retículo endoplasmático rugoso e de ribossomos livres como precursores da fitomelanina. Foi descrito o processo de síntese, secreção e transporte de material eletrondenso até o espaço intercelular, onde o pigmento é polimerizado.

Palavras-chave: Caules aéreos, compostos fenólicos, estados ancestrais, melanina, secreção, análises subcelulares.

## ABSTRACT

Melanin is a dark, tough pigment that can be found in animal, vegetable and fungal tissues. When found in plant tissues is called phytomelanin. Phytomelanin is commonly described in Asparagales seeds, in cypselas of some Asteraceae, and has recently been reported in aerial stems of Lychnophorinae (Vernonieae - Asteraceae) species. The pigment is related to protection against fungal and microbial invasions, against herbivory, high solar radiation and desiccation. Studies related to the presence of pigment in seeds and fruits have demonstrated the great importance of phytomelanin in the taxonomic and evolutionary studies in Asparagales and Asteraceae. In Asparagales, for example, the occurrence of the pigment in the seed envelope is considered a synapomorphy for the order. In the Asteraceae, the occurrence of the pigment in the pericarp of the cypselas is considered diagnostic for certain tribes, which make up the "phytomelanin alliance". From the premise that species of the Vernonieae tribe present phytomelanin in cauline tissues, this study aimed to understand the evolution of this pigment in aerial stems of Vernonieae, investigating species belonging to the main lineages of the tribe. Moreover, little is known about the formation of this pigment, since there are few studies related to the subject, especially the cellular mechanisms involved with the synthesis and release of the pigment in the tissues. Thus, in order to understand which cells and which cellular mechanisms would be involved in the synthesis of phytomelanin in aerial stems of Vernonieae, an ontogenetic, structural and subcellular study of stems of the species *Piptocarpha axillaris* (Less.) Baker was carried out. For this, we used usual methodologies in plant anatomy and in transmission electron microscopy. In order to understand the evolution of the pigment occurrence in the Vernonieae tribe, in addition to the usual analyzes in plant anatomy, the ancestral states of the phytomelanin occurrence characters were reconstructed by maximum likelihood using a recent phylogenetic hypothesis of Vernonieae based in morphological and molecular data. In the characterization of the phytomelanin occurrence in aerial stems of Vernonieae, phytomelanin presence was observed in the intercellular spaces of sclereids with different degrees of thickening, but more frequent in thickened sclereids. It can be observed a higher frequency of pigment in the medulla, in the secondary phloem and cortex respectively. Reconstructions of the ancestral states of the characters suggest that probably the most recent common ancestor of the Vernonieae tribe presented phytomelanin in the cortex, the secondary phloem, and the marrow. In the other regions and, or tissues of the stem, the pigment would have appeared throughout the evolution of the tribe. On the other hand, the analysis of *P. axillaris* stems makes it possible to observe that the polymerization of phytomelanin can occur simultaneously or after sclerification and that this deposition increases according to the thickening of the stem. From the subcellular analyzes we suggest the participation of phenolic compounds formed in plastids as the main precursors of phytomelanin, since it was possible to observe a wide frequency of electron-dense compounds in these organelles. We also suggest the participation of material coming from the rough

endoplasmic reticulum and free ribosomes as precursors of phytomelanin. It was described the process of synthesis, secretion and transport of electrodependent material to the intercellular space, where the pigment is polymerized.

Key words: Aerial stems, cypselas, phenolic compounds, ancestral states, melanin, secretion, seeds, subcellular analysis.



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Importância da fitomelanina

A melanina é um pigmento que apresenta coloração escura, reportada em tecidos de animais, vegetais e de fungos. Não apresenta uma estrutura química única, sendo assim classificada em: eumelanina, feomelanina e alomelanina (Solano, 2014). O pigmento denominado de eumelanina é encontrado em tecidos animais, apresenta coloração marrom a preto, é formado a partir da oxidação da tirosina e estruturalmente apresenta os elementos 5,6-di-hidroxi-indol e ácido 5,6-di-hidroxi-indol-2-carboxílico (Aroca *et al.*, 1992; Solano, 2014). A feomelanina também é encontrada em tecidos animais, possui tons que variam do amarelo ao vermelho. Esse grupo se difere da eumelanina principalmente pela presença de enxofre em sua estrutura química. Sua formação também ocorre a partir da oxidação da tirosina, mas nesse caso, há participação do aminoácido cisteína (Pazella *et al.*, 2011; Napolitano *et al.*, 2013; Solano, 2014). O grupo das alomelaninas é encontrado em tecidos vegetais e de fungos, apresentando coloração escura (assim como as eumelaninas). É formado a partir da ação da enzima fenol oxidase, durante a polimerização de compostos fenólicos como:  $\gamma$ -glutaminil-4-hidroxibenzeno, ácido homogentísico, ácido 4-hidroxifenilacético, 1,8-di-hidroxinaftaleno e o-benzenodiol (catecol)) (Plonka & Grabacka, 2006; Solano, 2014). Quando extraída de tecidos animais os precursores mais comuns da melanina apresentam o composto aromático indol, sendo que a melanina formada é classificada como “indol melanina”. Já nos tecidos vegetais e de fungos, como o precursor mais comum é o catecol, a melanina formada é classificada como “catecol melanina” (Nikolaus, 1964; Solano, 2014; Cordero & Casadevall, 2017).

A presença do pigmento em tecidos animais inclui funções de proteção contra a exposição ao sol, camuflagem, termorregulação (no caso dos répteis), entre outros (De Leeuw *et al.*, 1994; Hill *et al.*, 1997; Riley, 1997). Estudos publicados indicam que a melanina animal possui uma atividade anti-HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) em culturas *in vitro* (Montefiori & Zhou, 1991). Nos fungos, ela também exerce papel de proteção contra alta radiação, alta pressão osmótica, baixa disponibilidade de nutrientes e de água, temperaturas extremas (Cordero & Casadevall, 2017), entre outros, sendo que as pesquisas relacionadas aos fungos melanizados se direcionam principalmente para o papel da melanina na virulência do fungo. Também há relatos de que o pigmento pode aumentar a resistência das hifas contra o sistema de defesa do hospedeiro e que a sua presença pode afetar significativamente a atividade de antifúngicos utilizados na medicina (Paim *et al.*, 1990; Gómez & Nosanchuk, 2003; Eisenman & Casadevall, 2012).

Nas plantas, esse pigmento é denominado como fitomelanina (Hartwich, 1885, *apud* Hanausek, 1907 e Griebel 1913; Nikolaus, 1964; Huber, 1969; Heubl *et al.*, 1988; Pandey & Dhakal, 2001). A

fitomelanina é comumente descrita em frutos de espécies da família Asteraceae (Huber, 1969; Pandey *et al.*, 1989; Pandey & Dhakal, 2001; Park *et al.*, 2007), em sementes de espécies da ordem Asparagales (Wittich & Graven, 1995, 1998) e também em sementes da família Convolvulaceae (Park, 2012; Freitas *et al.*, 2015). Nesses órgãos reprodutivos, o pigmento é considerado uma substância muito resistente, estando geralmente relacionada à proteção contra predadores, como por exemplo nos frutos do girassol, dificultando a oviposição de mariposas e aumentando a efetividade no cultivo da planta (Pandey *et al.*, 1989; Pandey & Dhakal, 2001). Estudos relatam que a presença da fitomelanina influencia positivamente o cultivo e o rendimento de sementes de girassóis, demonstrando que essa substância não só funciona como um bloqueador físico, mas também apresenta características tóxicas ou impalatáveis, que fazem as larvas de determinados insetos preferirem plantas sem a fitomelanina (Carlson *et al.*, 1972; Rogers & Kreitner, 1983). Além disso, o pigmento protege as sementes e frutos contra a invasão fúngica e microbiana, contra a desidratação e contra a radiação solar intensa (Pandey *et al.*, 1989; Pandey & Dhakal, 2001; Jeffrey, 2009). Sava *et al.* (2001) e Ozdenir & Keles (2018) afirmam que a fitomelanina, com suas propriedades antioxidantes, teria um grande potencial industrial, auxiliando no desenvolvimento de novos produtos cosméticos e nas indústrias alimentícias, já que a fonte desse pigmento seria abundante, a partir da extração de sementes de girassol.

Além disso, a detecção do pigmento tem apresentado grande relevância nos estudos relacionados à taxonomia e à evolução das espécies de Asparagales e das espécies de Asteraceae. Em Asparagales, por exemplo, a presença do pigmento nas sementes é uma característica diagnóstica para o grupo (Kubitzki, 1998). Em Asteraceae, o pigmento é comumente relatado para as cipselas e representa um caráter distintivo para as tribos: Bahieae, Chaenactideae, Coreopsidaeae, Eupatorieae, Feddeae, Helenieae, Heliantheae, Madieae, Millerieae, Neurolaeneteae, Perityleae, Polymnieae, Tageteae e Cardueae (Panero, 2007, Baldwin, 2009; Pandey *et al.* 2014). A presença do pigmento em todas essas tribos auxilia na delimitação taxonômica dos membros, de tal maneira que o grupo recebeu o nome de “Aliança da fitomelanina” (Funk *et al.*, 2009; Pandey *et al.* 2014).

Os registros encontrados na literatura para a família Asteraceae associam a ocorrência da fitomelanina principalmente ao pericarpo das cipselas, relacionando a presença do pigmento às fibras e às camadas mais internas da hipoderme (Rogers *et al.*, 1982; Hartwich, 1885, *apud* Hanausek, 1907 e Griebel, 1913; Pandey *et al.*, 1989; De-Paula *et al.*, 2013). Entretanto, também há trabalhos que indicam que essa substância está presente em raízes e rizomas das tribos Cardueae e Heliantheae (Asteraceae) (Hartwich, 1885, *apud* Hanausek, 1907 e Griebel, 1913; Heubl *et al.*, 1988; Mistríková & Vavřková, 2007; Fritz & Saukel, 2011). Recentemente, Lusa *et al.* (2018) relataram pela primeira vez a presença da fitomelanina em caules aéreos e folhas de indivíduos da subtribo Lychnophorinae (Vernonieae). Nesse estudo, os autores constataram que o pigmento ocorre entre as esclereídes espessadas e que a frequência dele é maior em caules lenhosos. Assim, Freitas *et al.* (2015) e Lusa *et al.* (2018) indicam que a ocorrência de

fitomelanina em Asteraceae pode estar subestimada. Contudo, estudos para uma melhor compreensão da ocorrência da fitomelanina na família ainda se fazem necessários.

### 1.2 Hipóteses sobre a síntese da fitomelanina

Além disso, o processo de formação celular e a identificação dos tecidos e, ou, tipos celulares envolvidos na síntese da fitomelanina, ainda não estão completamente desvendados. Em 1907, Hanausek sugeriu que a fitomelanina é formada por substâncias advindas da parede celular esclerenquimática transportadas até a lamela média. Contudo, Rogers *et al.* (1982) sugeriram que a formação do pigmento nas cipselas das Asteraceae ocorre através da desintegração de células hipodérmicas. Pandey *et al.* (1989) e De-Paula *et al.* (2013) propõem que a hipoderme e, ou, o esclerênquima (fibras) das cipselas, secretam os precursores que formarão a fitomelanina nos espaços intercelulares. Já para a presença de fitomelanina em caules aéreos e folhas de Lychnophorinae, Lusa *et al.* (2018) relataram que a presença do pigmento parece estar relacionada às esclereídes e às células parenquimáticas adjacentes. Apesar dessa sugestão, ainda não há registro de investigações dos processos celulares envolvidos na síntese da fitomelanina em sistemas caulinares.

### 1.3 Características gerais da família Asteraceae e da tribo Vernoniae

Asteraceae, também conhecida como Compositae (compostas), é uma família de plantas, dentre as angiospermas, pertencente à ordem Asterales, com cerca de 1.600-2.000 gêneros e 24.000-30.000 espécies, representando aproximadamente 10% da flora mundial (Bremer, 1994; Funk *et al.*, 2005; Jeffrey, 2007; Funk *et al.*, 2009). Asteraceae teve origem na América do Sul e é encontrada em grande parte dos continentes, exceto no continente Antártico (De Vore & Stuessy, 1995; Funk *et al.*, 2009).

Seus representantes são ervas, subarbustos, arbustos, arvoretas e árvores. A inflorescência é agregada em capítulos (característica marcante das compostas) com flores pequenas e envolvidas por brácteas involucrais, com anteras aderidas entre si e com apresentação secundária de pólen pelo estilete (Bremer, 1994; Funk *et al.*, 2009; Judd *et al.* 2007). Características moleculares e morfológicas sustentam sua condição monofilética (Jansen & Palmer, 1987; Kim *et al.*, 1992; Panero & Funk, 2002; Funk *et al.*, 2009). As características morfológicas observadas nos representantes desta família são: folhas geralmente alternas, capítulos discoides, estiletos longos, delgados, agudos e pilosos anteras sinânteras e o fruto do tipo cipsela, provindo de ovário bicarpelar (raramente tricarpelar) ínfero com óvulo basal ereto (Jansen & Palmer, 1987; Kim *et al.*, 1992; Bremer, 1995; Panero & Funk, 2002; Funk *et al.*, 2009; Keeley & Robinson, 2009). As espécies dessa família produzem compostos químicos secundários como poliacetilenos, compostos fenólicos e lactonas sesquiterpênicas (uma importante sinapomorfia da família) geralmente relacionados à defesa contra patógenos e herbivoria (Emerenciano, 1983; Judd *et al.*, 2007; Calabria *et al.*, 2009).

Asteraceae apresenta 12 subfamílias e 43 tribos (Funk *et al.*, 2009). A tribo Vernoniae é uma

das maiores, com 129 gêneros e 1.100 espécies representantes. Sua distribuição pode ocorrer em toda a América, África do Sul, Ásia (região Sudeste), e também na região do Pacífico (Bremer, 1995; Keeley & Robinson, 2009). As espécies de Vernoniae podem apresentar diversos hábitos, desde pequenas ervas a grandes árvores, a disposição das folhas geralmente é alterna, o capítulo é discoide e os estiletos são longos, delgados, agudos e pilosos (Bremer, 1995; Keeley & Robinson, 2009). Dados moleculares e morfológicos publicados por Keeley & Jansen, (1994), Panero & Funk, (2002), Goertzen *et al.*, (2003) e Funk *et al.*, (2005), sugerem que Vernoniae é monofilética. Loeuille *et al.*, (2015), publicaram um estudo sobre as Vernoniae americanas, demonstrando o monofiletismo da subtribo Lychnophorinae. Apesar disso, devido à grande dimensão da tribo e à sua ampla distribuição, muitas perguntas ainda não foram respondidas em relação a classificação das Vernoniae (Keeley *et al.*, 2007; Keeley & Robinson, 2009).

#### *1.4 Objetivos*

O presente estudo teve por objetivo investigar a evolução da presença de fitomelanina em espécies da tribo Vernoniae, baseando-se em estudos filogenéticos realizados por Sinischalchi *et al.* (2019, no prelo) e também analisar as células e os mecanismos celulares envolvidos com a presença da fitomelanina em caules aéreos de uma espécie da tribo Vernoniae.

## **CAPÍTULO 1**

### **Ocorrência e evolução da fitomelanina em caules aéreos de Vernoniae (Asteraceae)**

*Manuscrito a ser submetido para a revista Botanical Journal of the Linnean Society*



## Ocorrência e evolução da fitomelanina em caules aéreos de Vernoniae (Asteraceae)

### RESUMO

A fitomelanina é um pigmento de coloração escura, sendo frequentemente relatada em frutos e em sementes. Entretanto, recentemente foi registrada em caules aéreos de espécies de Vernoniae, especificamente na subtribo Lychnophorinae. O presente estudo relata a presença desse pigmento em caules aéreos de outras espécies pertencentes a tribo Vernoniae e investiga a sua evolução da ocorrência do mesmo nessas linhagens. Amostras de 42 espécies pertencentes às principais linhagens de Vernoniae, além de duas espécies pertencentes ao grupo externo, foram analisadas através de técnicas usuais em anatomia vegetal. A partir dos dados coletados foi realizada a reconstrução dos estados ancestrais da ocorrência de fitomelanina, por máxima verossimilhança, utilizando uma reconstrução filogenética recente de Vernoniae baseada em dados morfológicos e moleculares. A presença de fitomelanina foi observada nos espaços intercelulares de esclereídes com diferentes graus de espessamento da parede celular, sendo mais frequente em esclereídes espessadas. Pôde-se observar maior frequência do pigmento na medula, floema secundário e no córtex. As reconstruções dos estados ancestrais dos caracteres sugerem que provavelmente o ancestral comum mais recente da tribo Vernoniae apresentava fitomelanina na região do córtex, no floema secundário e na medula. Os dados apresentados nesse trabalho indicam que novas investigações são necessárias em relação a ocorrência da fitomelanina em sistemas caulinares de espécies pertencentes a outras tribos de Asteraceae. Além disso, também se faz necessário entender se fatores ambientais podem influenciar no processo de formação do pigmento.

Palavras-chave: esclereídes, melanina, órgãos vegetativos, pigmento, reconstrução.





## 1. INTRODUÇÃO

A fitomelanina é um pigmento de coloração escura (marrom a preto) que recebe essa nomenclatura por ser um tipo de melanina encontrada em tecidos vegetais (Nicolaus, 1964; Pandey & Dhakal, 2001). Sua origem química é pouco conhecida, já que não é solúvel para grande parte dos solventes conhecidos, como: ácido crômico, hidróxido de potássio, ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido nítrico, água regia, água, álcool, éter de petróleo, glicerina, hidrato de cloro e amônia (Pandey & Dhakal, 2001). Assim como a melanina encontrada em tecido animal, a fitomelanina é um pigmento associado à proteção contra radiação solar intensa, mas também contra desidratação (Pandey *et al.*, 1989; Hill *et al.*, 1997; Pandey & Dhakal, 2001; Jeffrey, 2009). Além disso, há relatos indicando que esse pigmento está relacionado à proteção contra predadores, como por exemplo, em frutos de girassol, nos quais a presença do pigmento dificulta a alimentação das larvas de mariposas do girassol e aumenta a efetividade de cultivo da planta (Carlson *et al.*, 1972; Rogers & Kreitner, 1983; Aragón & Ravelo 2010; Prasifka *et al.*, 2014). Além disso, o pigmento é considerado importante na proteção contra infecções provocadas por fungos e outros microrganismos (Pandey & Dhakal, 2001).

A fitomelanina está presente em frutos ou cipselas de espécies da família Asteraceae, em sementes de espécies da ordem Asparagales e também há relatos para sementes de Convolvulaceae (Huber, 1969; Dahlgren *et al.*, 1985; Pandey *et al.*, 1989; Wittich & Graven, 1995; Pandey & Dhakal, 2001; Park *et al.*, 2007; Park, 2012; Freitas, *et al.*, 2015). Assim, as pesquisas envolvendo a presença do pigmento em frutos e em sementes têm apresentado grande importância no entendimento taxonômico e evolutivo dentro Asteraceae e de Asparagales.

Nas Asteraceae, a presença da fitomelanina é frequentemente associada ao pericarpo das cipselas (Rogers *et al.*, 1982; Pandey *et al.*, 1989; De-Paula *et al.*, 2013). No entanto, alguns trabalhos indicam que essa substância está presente também em raízes e rizomas de espécies das tribos Cardueae e Heliantheae (Hartwich, 1885, citado por Hanausek, 1907 e Griebel 1913; Huber, 1969; Heubl *et al.*, 1988; Mistríková & Vaverková, 2007; Fritz & Saukel, 2011). Além disso, Lusa *et al.* (2018) relataram a presença da fitomelanina em caules aéreos e folhas de Asteraceae, em indivíduos da subtribo Lychnophorinae (Vernonieae). Os autores também relatam que essa substância ocorre com maior frequência em caules lenhosos do que em caules jovens. Esses estudos sugerem que é possível que a ocorrência da fitomelanina em Asteraceae esteja subestimada, pela simples escassez de investigações, como já enfatizado por Freitas *et al.* (2015) e Lusa *et al.* (2018). Portanto, maior esforço investigativo é necessário para uma melhor compreensão da evolução da ocorrência da fitomelanina na família.

Vernonieae é uma das maiores tribos de Asteraceae, com cerca de 130 gêneros e 1.100 espécies distribuídas em todo o continente americano, no Sul da África, no Sudeste da Ásia e no Pacífico (Bremer, 1995; Keeley *et al.*, 2007; Keeley & Robinson, 2009). Os seus membros apresentam hábitos variados,

desde pequenas ervas a grandes árvores, com folhas geralmente alternas, capítulos discoides, estiletes longos, delgados, agudos e pilosos (Bremer, 1995; Keeley & Robinson, 2009). Devido ao grande tamanho da tribo e à ampla distribuição de Vernoniae, a classificação subtribal ainda não está adequadamente estabelecida, mas dados moleculares e morfológicos indicam que Vernoniae é monofilética (Keeley & Jansen, 1994; Panero & Funk, 2002; Goertzen *et al.*, 2003; Funk *et al.*, 2005). Em relação à classificação das subtribos, Loeuille *et al.* (2015) publicou estudo sobre as Vernoniae americanas, sustentando o monofiletismo da subtribo Lychnophorinae. Entretanto, para as demais subtribos ainda existem dúvidas sobre as relações de parentesco (Keeley *et al.*, 2007; Keeley & Robinson, 2009).

Através da investigação evolutiva da ocorrência de fitomelanina na subtribo Lychnophorinae, realizado por Lusa *et al.* (2018), observou-se que a fitomelanina está presente em outras espécies de Vernoniae pertencentes ao grupo externo no estudo. A partir disso, objetivou-se ampliar a investigação da ocorrência de fitomelanina para a tribo Vernoniae, baseando-se nos estudos filogenéticos mais recentes da tribo realizados por Siniscalchi *et al.* (2019, no prelo), com o intuito de procurar entender a evolução da ocorrência do pigmento dentro do referido grupo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material botânico

Para a determinação da ocorrência da fitomelanina bem como para o seu estudo evolutivo, foram analisadas amostras de 42 espécies pertencentes às principais linhagens de Vernoniae e de duas espécies que fazem parte do grupo externo (*Moquinia racemosa* (Spreng.) DC. e *Pseudostiffitia kingii* H.Rob.) (Tabela A1, Anexo I). As espécies foram selecionadas a partir da filogenia mais recente da tribo (Siniscalchi *et al.*, 2019, no prelo) (Figura 1) e de acordo com a disponibilidade de material nos herbários. Segundo estudos prévios de Lusa *et al.* (2018), os caules aéreos de Vernoniae são possivelmente os órgãos vegetativos que apresentam maior ocorrência da fitomelanina, especialmente nas regiões lenhosas dos ramos. Além disso, são as regiões com maior facilidade para serem amostradas em materiais herborizados. Assim, as amostras de material para o estudo evolutivo foram adquiridas por meio de coletas a partir de material herborizado, obtido em herbários nacionais e, ou internacionais, conforme a disponibilidade de material e autorização dos herbários (Tab. A1, Anexo I). Efetuaram-se as amostragens de forma a minimizar danos ao material herborizado, sendo obtidas exclusivamente das regiões mais basais dos ramos. Sempre que possível foram coletadas triplicatas para cada espécie, priorizando-se amostras provenientes de diferente localização geográfica.

### 2.2 Procedimentos para análise micromorfológica do material herborizado

As amostras de material herborizado foram reidratadas em solução de detergente, água e glicerina (na proporção: 1:89:10 - v/v), de acordo com Alcorn & Arsk (1953). Após a hidratação, as amostras foram seccionadas à mão livre com auxílio de lâmina de barbear. Não foi necessária a utilização de corantes, já que a coloração natural marrom escura da fitomelanina caracteriza bem a sua presença nos tecidos. Após os procedimentos citados, lâminas semipermanentes com o material histológico foram montadas com gelatina glicerinada (Kaiser, 1880). Para a observação dessas lâminas foi utilizado microscópio Olympus®, modelo CX21FS1. Os resultados foram documentados através de captura de imagens das lâminas, utilizando-se de microscópio de luz Olympus®, modelo BX41, com câmera (Q-imagin 3.3 mpixel) acoplada.

### 2.3 Reconstrução dos estados ancestrais dos caracteres na filogenia

A reconstrução evolutiva da ocorrência da fitomelanina nas espécies de Vernoniae foi realizada com base na análise filogenética mais recente da tribo (Siniscalchi *et al.*, 2019, no prelo) (Figura 1). Os terminais que não foram elencados para a análise foram retirados da árvore com auxílio do programa Mesquite 3.01 (Maddison e Maddison 2014). Os caracteres analisados foram: ocorrência da fitomelanina no parênquima cortical, no periciclo, no floema (primário e secundário), no xilema (primário e secundário) e no parênquima medular. Os estados dos caracteres foram codificados em uma matrix como presentes e

ausentes. A reconstrução dos estados ancestrais dos caracteres foi efetuada através do método de máxima verossimilhança contida na função Análise Filogenética e Evolução (APE) disponível em um ambiente computacional, denominado R, versão 5.1 (R Core Team, 2018).



### 3. RESULTADOS

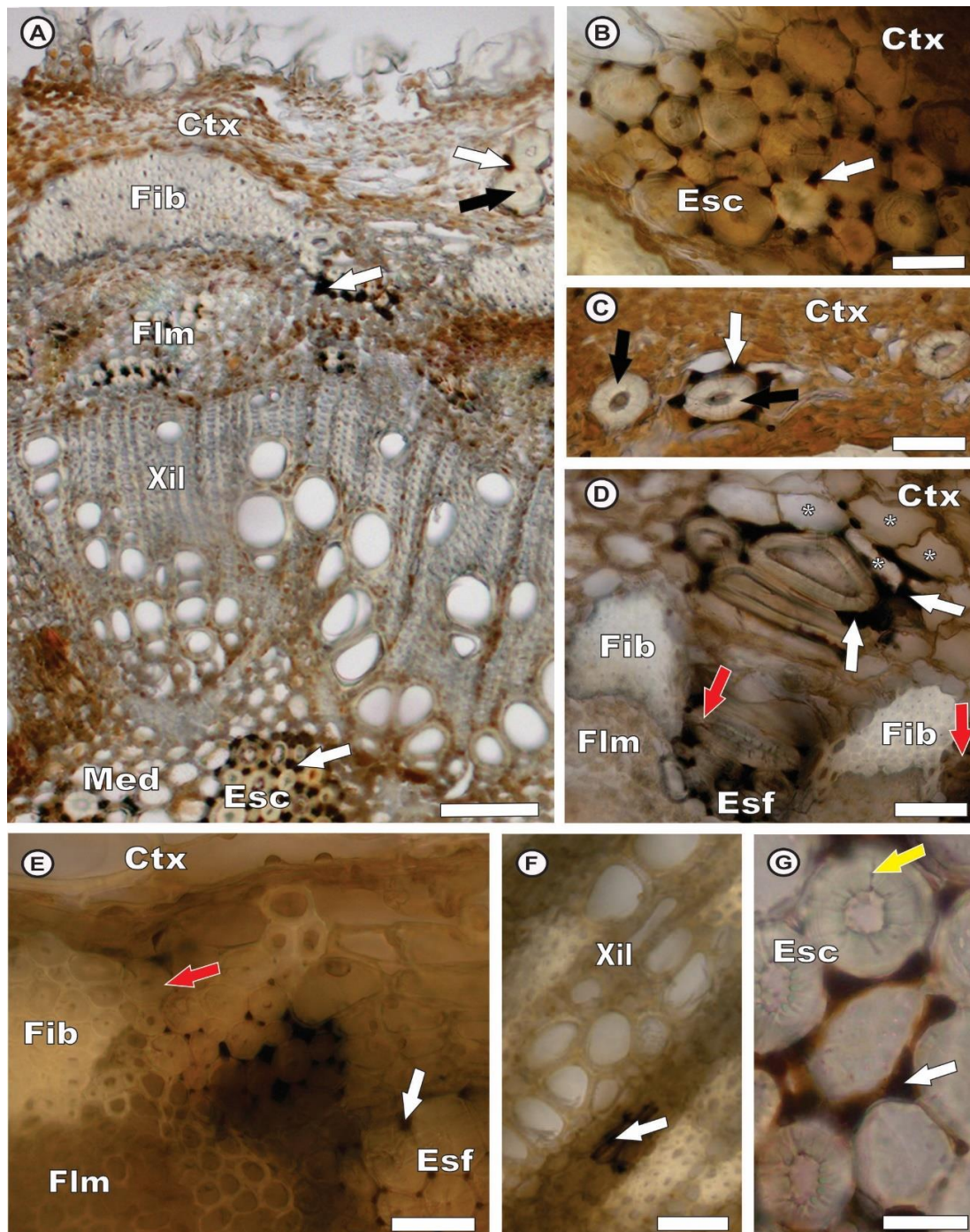
#### 3.1. Ocorrência da fitomelanina nas diferentes regiões do caule

Os caules analisados estavam em fase de crescimento secundário (Fig. 2A). A ocorrência de fitomelanina nas regiões e, ou tecidos do caule (córtex, periciclo, floema primário e secundário, xilema primário e secundário e medula), está apresentada na Tab. A2 (anexo I). A presença da fitomelanina está associada às esclereídes e é observada nos espaços intercelulares das mesmas (Fig. 2A-G).

Verificou-se que no córtex das espécies analisadas, as esclereídes podem estar dispostas de forma agrupada (Fig. 2B) ou isolada (Fig. 2C). A presença de fitomelanina foi observada nos espaços intercelulares entre esclereídes com diferentes graus de espessamento da parede celular, sendo mais frequente em esclereídes bastante espessadas (Fig. 2B-D e 2G). No entanto, há algumas esclereídes com paredes bastante espessadas que aparentemente não apresentam o pigmento nos espaços intercelulares adjacentes (Fig. 2C – seta preta). A fitomelanina foi observada também nos espaços intercelulares de células parenquimáticas vizinhas, que posteriormente se diferenciam em esclereídes (Fig. 2D – asterisco branco).

Na região periférica ao cilindro vascular foi observada a presença de calotas de fibras perivasculares (Fig. 2A). Em todos os exemplares analisados as fibras não apresentaram fitomelanina nos espaços intercelulares (Fig. 2A). No cilindro vascular, esclereídes formadas a partir do periciclo podem apresentar fitomelanina (Fig. 2D-E, setas vermelhas). As mesmas distribuem-se justapostas às calotas de fibras com abundante presença do pigmento (Fig. 2D-E). No floema primário observou-se presença de fitomelanina nos espaços intercelulares de esclereídes bastante espessadas. No floema secundário, o acúmulo do pigmento ocorre de forma semelhante (Fig. 2A). Na região do xilema primário não foi observada a presença do pigmento em nenhuma das espécies estudadas, já no xilema secundário a presença da fitomelanina foi identificada em duas das espécies investigadas (Tab. A2 do anexo I). Nesse tecido, o acúmulo do pigmento foi observado entre esclereídes na região do raio (Fig. 2F). A maioria das espécies analisadas apresentou o pigmento na região medular, sempre associado às esclereídes.

As esclereídes apresentam parede secundária bastante espessada, formato relativamente isodiamétrico no plano transversal, com pontoações simples ramificadas (Fig. 2G – seta amarela), sendo levemente alongadas no plano longitudinal. Levando em conta as espécies analisadas, a presença da fitomelanina é abundante no córtex, no floema secundário e na medula, enquanto que no floema primário e no xilema secundário, é rara (Fig. 2A).



**Fig. 2** – Secções transversais dos caules aéreos de espécies da tribo Vernoniae. (A-B,E) Caule de *Eremanthus incanus*. (C) Caule de *Gorceixia decurrens*. (D,G) Caule de *Lychnophora salicifolia*. (F) Caule de *Lychnophora haploppapa*. (A) Esclereídes na região cortical, floemática e medular com presença de fitomelanina (seta branca). (B) Detalhe das esclereídes corticais agrupadas, com fitomelanina nos espaços intercelulares (seta branca). (C) Esclereídes isoladas no córtex com e sem fitomelanina. (D) Esclereídes e células parenquimáticas circunvizinhas (asteriscos brancos) apresentando fitomelanina nos espaços intercelulares (seta branca); (E) Esclereídes pericíclicas (seta vermelha) e floemáticas com presença de fitomelanina (seta branca). (F) Tecido xilemático com fitomelanina entre esclereídes do raio (seta branca). (G) Detalhe das esclereídes medulares com presença de fitomelanina nos espaços intercelulares (seta branca). Ctx = Córtex; Esc = Esclereíde; Esf = Esclereíde floemática; Fib = Fibras; Flm = Floema; Med = Medula; Xil = Xilema; seta amarela = pontoações; seta preta = Esclereídes; seta vermelha = esclereídes pericíclicas. (A) 100µm; (B-D) 50µm; (E-F) 25µm; (G) 5µm.

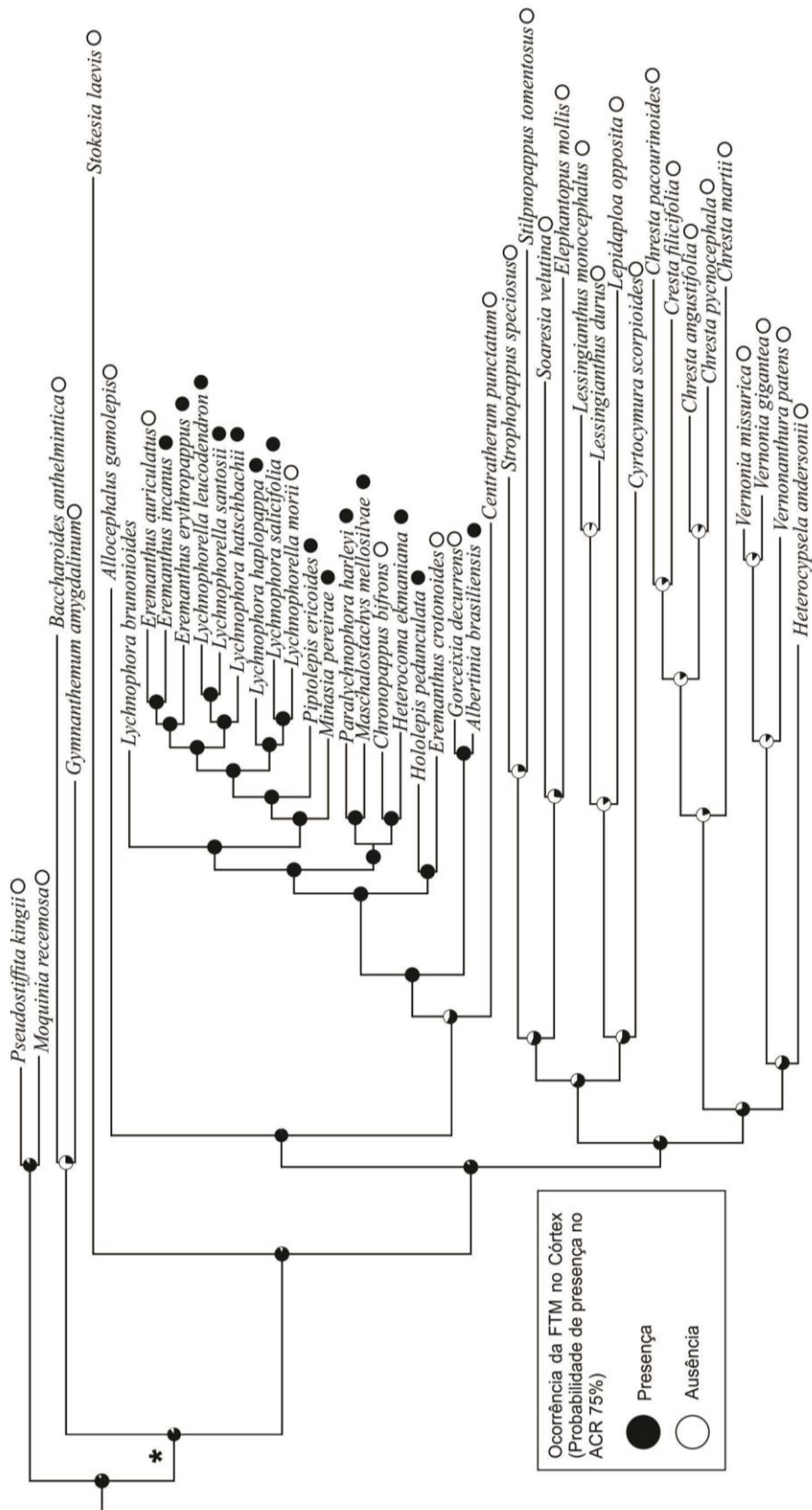
### 3.2. Evolução da fitomelanina: reconstruções dos estados ancestrais dos caracteres

As figuras 3, 4, 5, 6, 7 e 8 bem como a Tabela 1 representam as reconstruções dos estados ancestrais da ocorrência da fitomelanina para cada tecido e, ou região avaliados. A partir dessas reconstruções, verificou-se que a fitomelanina provavelmente já ocorria no ancestral comum mais recente da tribo (ACR) na região do córtex (75%, Fig. 3), no floema secundário (80%, Fig. 4) e na medula (100%, Fig. 5). Também foi possível observar que o pigmento está presente na região medular do caule de indivíduos pertencentes ao grupo externo (*Moquinia racemosa* (Spreng.) DC.) (Fig. 5).

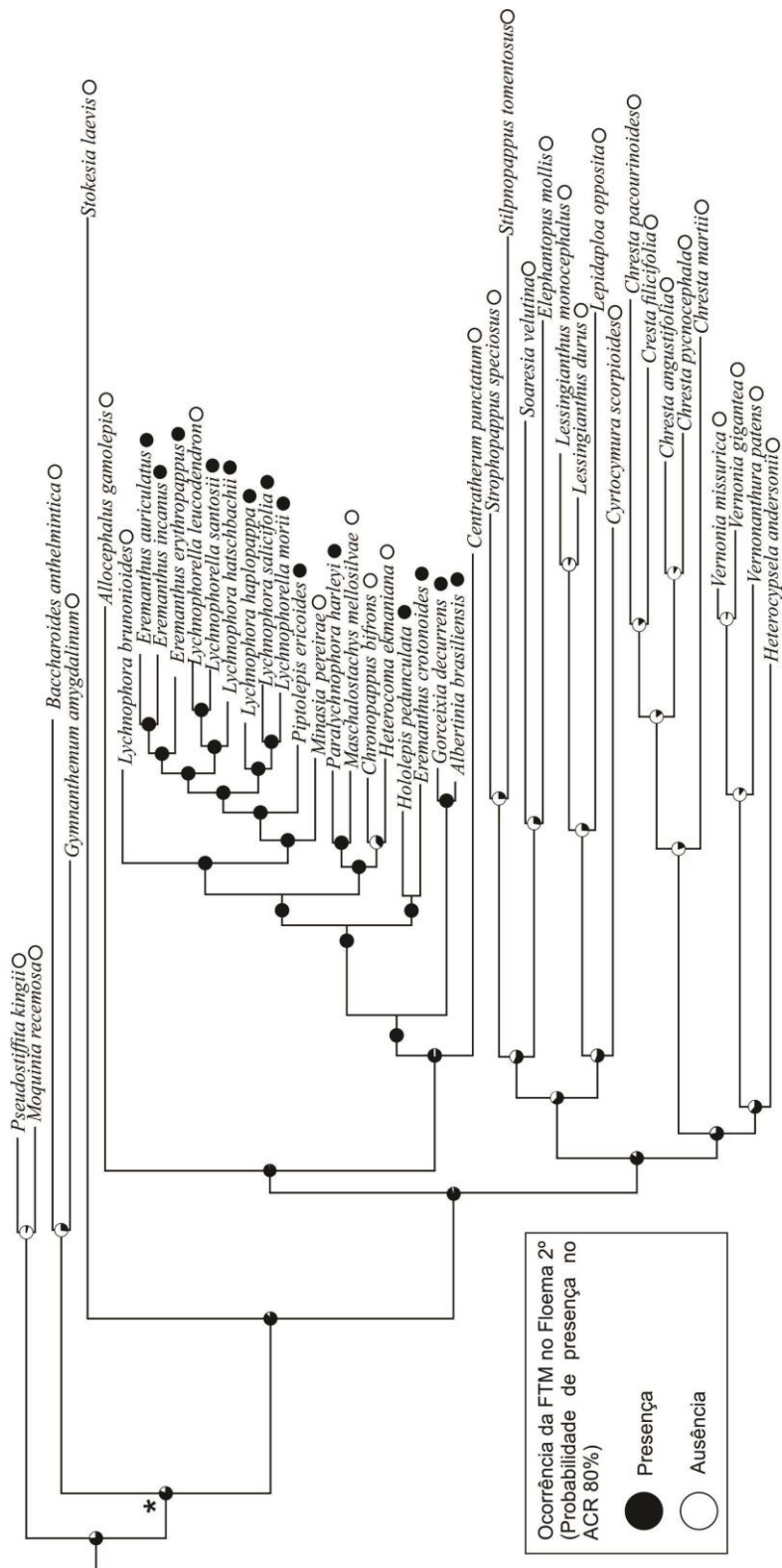
As análises de reconstrução do estado ancestral da ocorrência de fitomelanina no parênquima cortical demonstraram que dentro da tribo esse caractere teria se perdido várias vezes no grupo irmão de *Lychnophorinae* (Fig 3, Tab. A2, Anexo I), sendo a probabilidade de presença do pigmento no parênquima cortical do ACR de 0.75 e de ausência de 0.25 (Tab. 1). No periciclo, a probabilidade de ausência do pigmento no ACR é de 0.57 e de presença é de 0.43 (Tabela 1), estando presente em cinco gêneros (Fig. 6).

As reconstruções correspondentes à presença de fitomelanina no floema primário indicaram que o ACR da tribo provavelmente não apresentava fitomelanina nessa região (probabilidade de ausência de 0.88 e de presença de 0.12) (Fig7). No floema secundário as reconstruções designaram que a fitomelanina estaria presente no ACR da tribo (probabilidade de presença de 0.80 e de ausência de 0.20) (Fig. 4 e Tab. 1 e Tab. A2 do anexo I). Para o xilema secundário, as reconstruções apontaram que provavelmente não havia fitomelanina presente no tecido do ACR da tribo, com probabilidade de ausência 0.95 e presença 0.05 (Fig 8 e Tab. 1, anexo 1). O pigmento apareceu nesse tecido duas vezes, independentemente, nos gêneros *Lychnopora* (em *L. salicifolia*) e *Paralychnophora* (em *P. harleyi*). Para a ocorrência do pigmento na medula, as reconstruções apontam que a fitomelanina provavelmente estava presente no ACR da tribo, com probabilidade de presença de 1.00 e de ausência de 0.00 (Tab. 1, Fig. 5 e Tab. A2 do Anexo I).

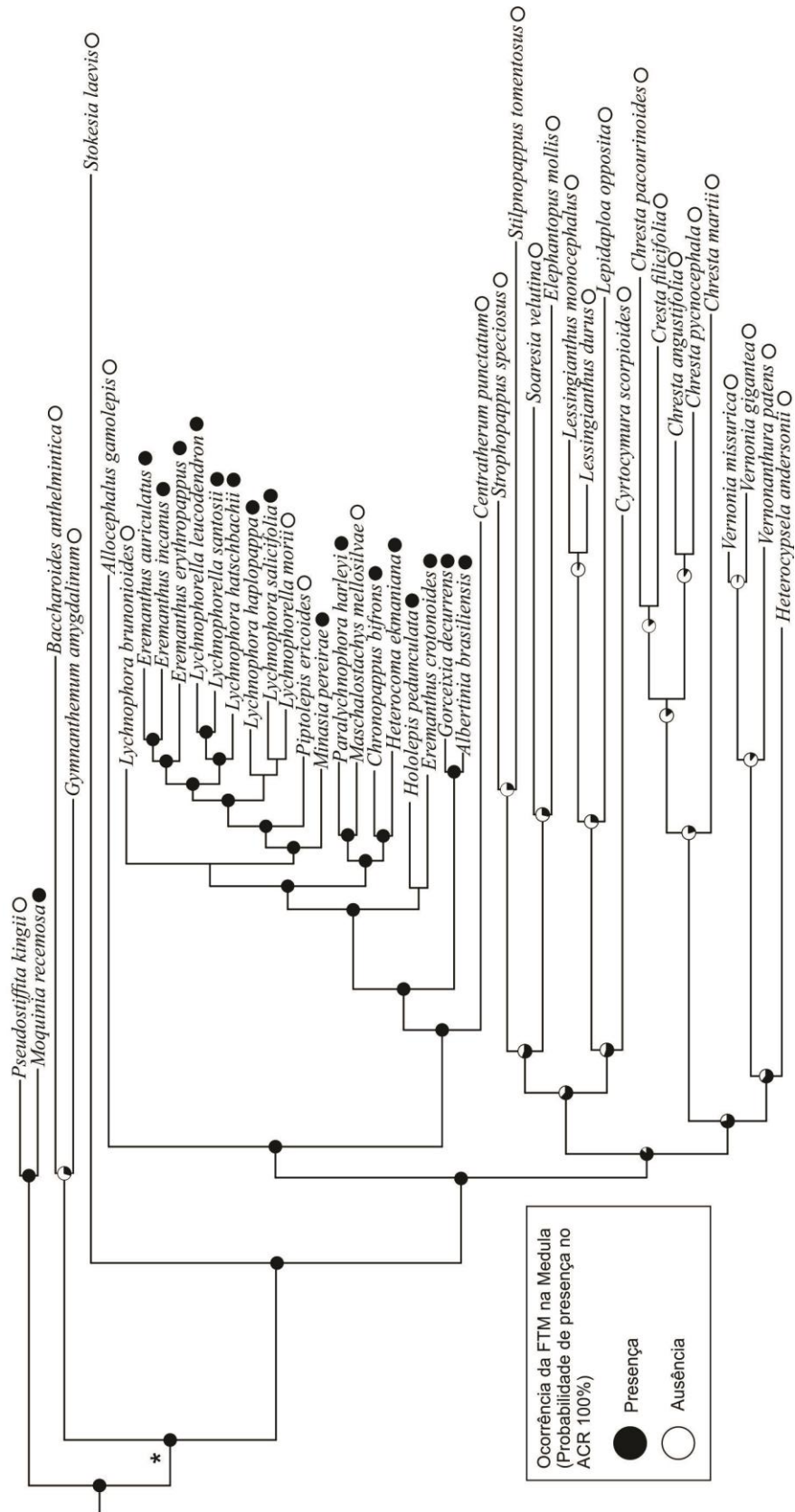




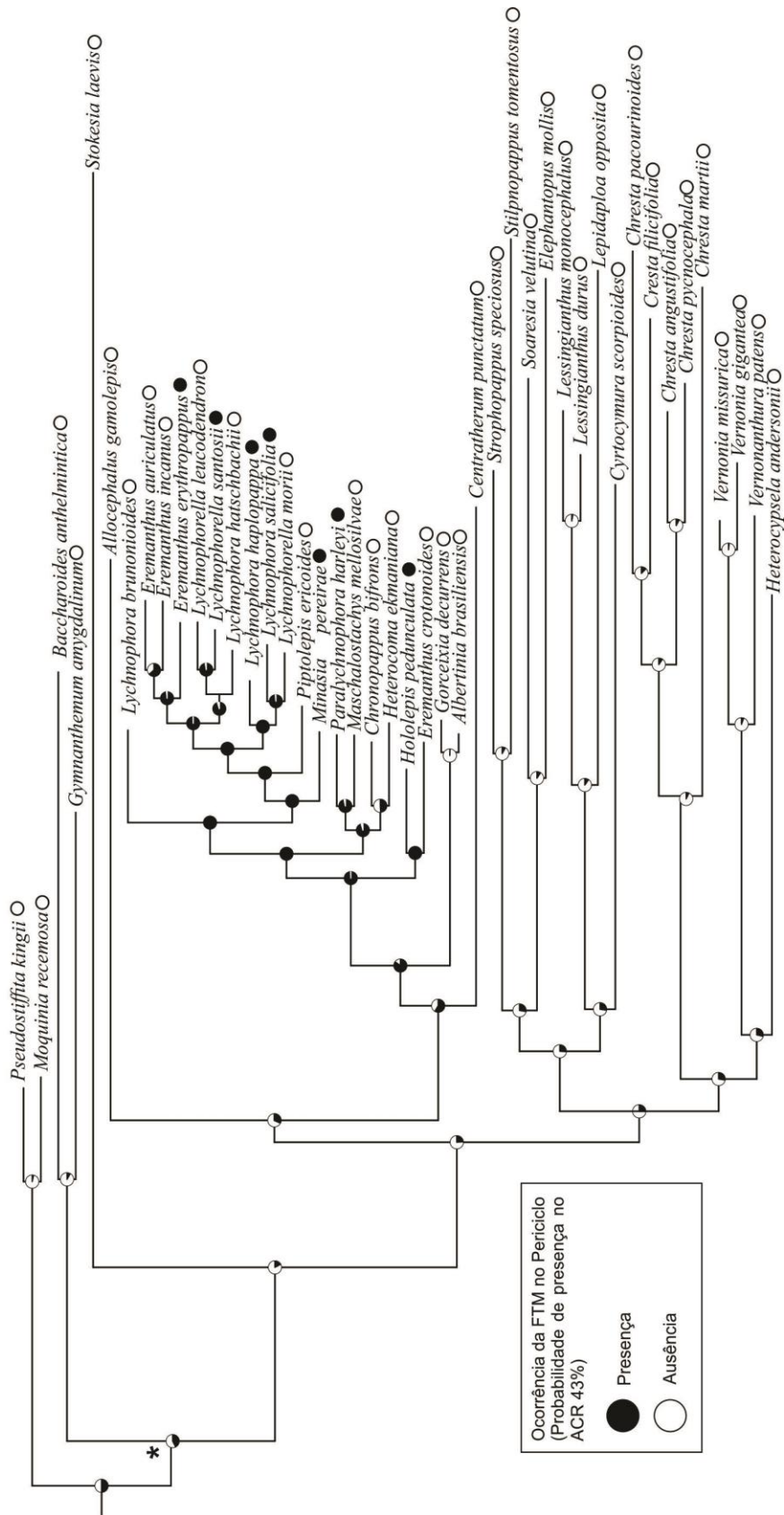
**Fig. 3** Reconstrução dos estados ancestrais da ocorrência da fitomelanina no córtex de caules espessados de Vernoniae. Análise de máxima verossimilhança. Os gráficos em pizza representam a propabilidade do caractere estar presente no ACR. Asterisco: ancestral comum mais recente; círculos pretos: presença de FTM; círculos brancos: ausência de FTM; FTM: fitomelanina.



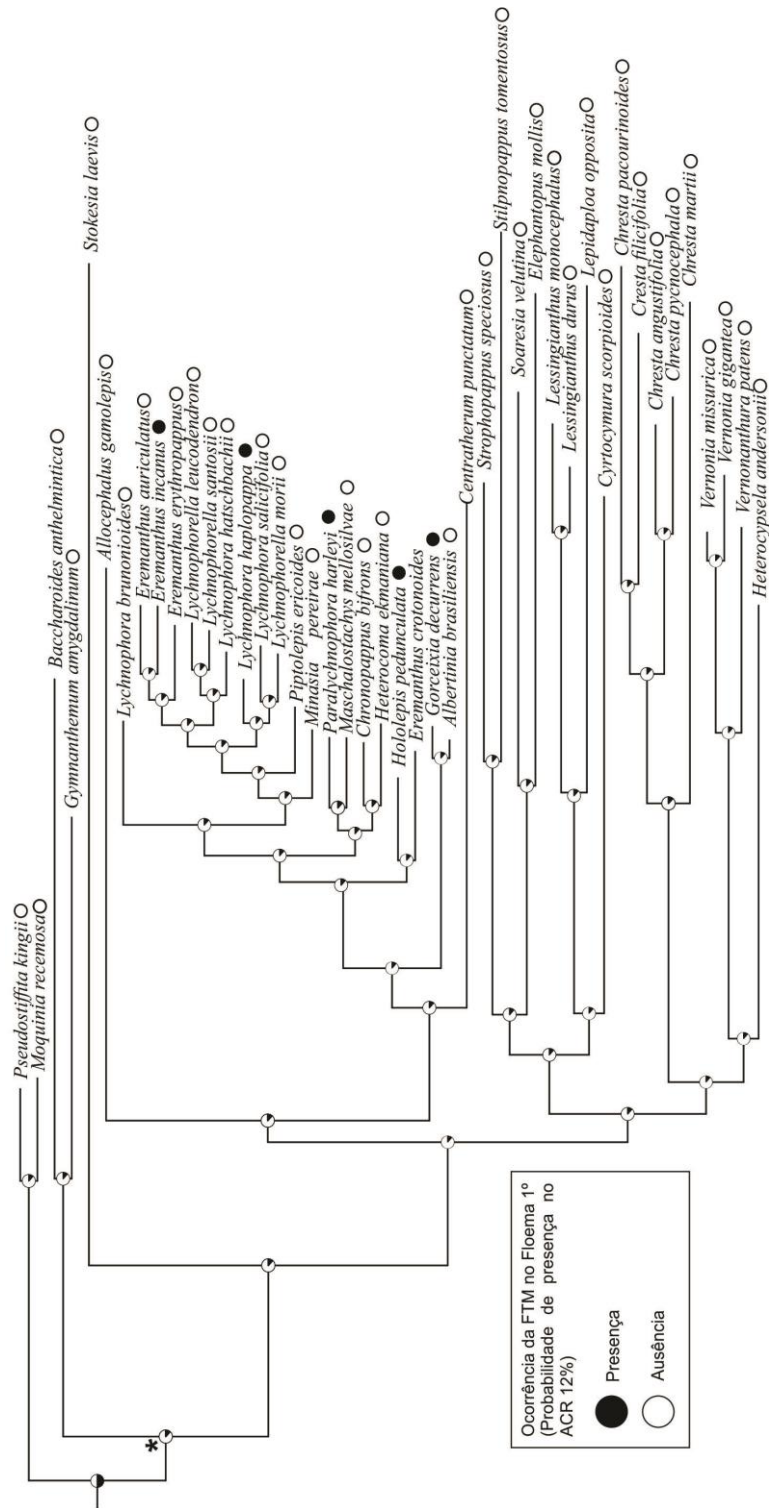
**Fig. 4** Reconstrução dos estados ancestrais da ocorrência da fitomelanina no floema secundário de caules espessados de Vernoniae. Análise de máxima verossimilhança. Os gráficos em pizza representam a propabilidade do caractere estar presente no ACR. Asterisco: ancestral comum mais recente; círculos pretos: presença de FTM; círculos brancos: ausência de FTM; FTM: fitomelanina.



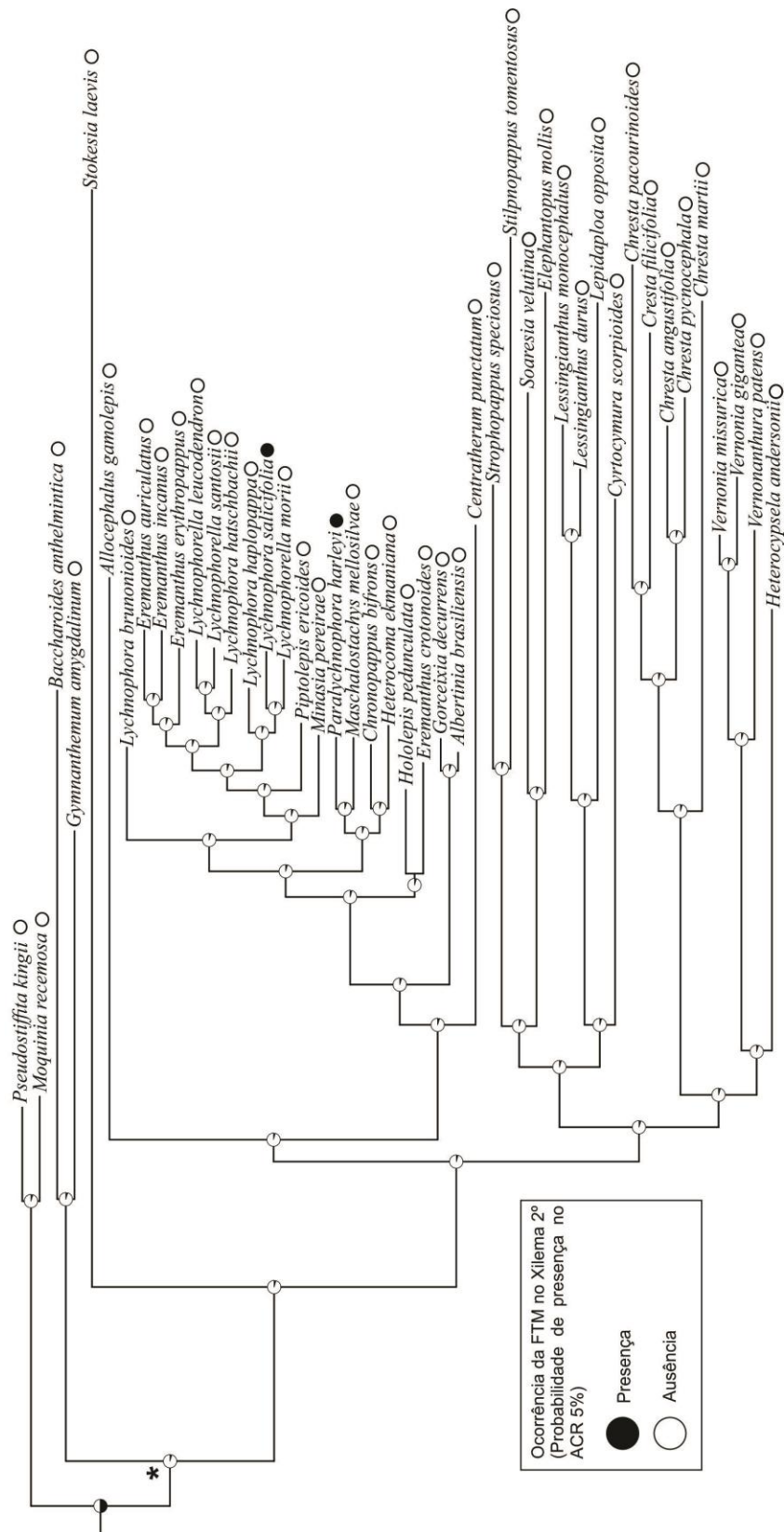
**Fig. 5** Reconstrução dos estados ancestrais da ocorrência da fitomelanina na medula de caules espessados de Vernoniae. Análise de máxima verossimilhança. Os gráficos em pizza representam a propabilidade do caractere estar presente no ACR. Asterisco: ancestral comum mais recente; círculos pretos: presença de FTM; círculos brancos: ausência de FTM; FTM: fitomelanina.



**Fig. 6-** Reconstrução dos estados ancestrais da ocorrência da fitomelanina no periciclo de caules espessados de Vernoniae. Análise de máxima verossimilhança. Os gráficos em pizza representam a propabilidade do caractere estar presente no ACR. Asterisco: ancestral comum mais recente; círculos pretos: presença de FTM; círculos brancos: ausência de FTM; FTM: fitomelanina.



**Fig. 7-** Reconstrução dos estados ancestrais da ocorrência da fitomelanina no floema primário de caules espessados de Vernoniae. de máxima verossimilhança. Os gráficos em pizza representam a propabilidade do caractere estar presente no ACR. Asterisco: a comum mais recente; círculos pretos: presença de FTM; círculos brancos: ausência de FTM; FTM: fitomelanina.



**Fig. 8-** Reconstrução dos estados ancestrais da ocorrência da fitomelanina no xilema secundário de caules espessados de Vernoneae. Análise de máxima verossimilhança. Os gráficos em pizza representam a propabilidade do caractere estar presente no ACR. Asterisco: ancestral comum mais recente; círculos pretos: presença de FTM; círculos brancos: ausência de FTM; FTM: fitomelanina.

**Tab. 1.** Reconstruções dos estados ancestrais da ocorrência da fitomelanina na tribo Vernonieae (Asteraceae) por máxima verossimilhança

| Caracteres                    | Modelo de duas taxas    | Modelo de uma taxa      | Estados dos caracteres ancestrais estimados para a tribo Vernonieae (probabilidade proporcional de presença de FTM nas regiões do caule no ACR da tribo). |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|---|
| Regiões da planta/<br>tecidos | Verossimilhança<br>-Log | Verossimilhança<br>-Log |   |
| Córtex                        | <b>17.74377</b>         | 28.89608                | Ausência (0.25)<br><b>Presença (0.75)</b>   |
| Periciclo                     | <b>16.88091</b>         | 29.87272                | <b>Ausência (0.57)</b><br>Presença (0.43)   |
| Floema primário               | <b>14.8851</b>          | 23.87447                | <b>Ausência (0.88)</b><br>Presença (0.12)   |
| Floema secundário             | <b>14.77448</b>         | 21.64607                | Ausência (0.20)<br><b>Presença (0.80)</b>   |
| Xilema secundário             | <b>7.442778</b>         | 11.29634                | <b>Ausência (0.95)</b><br>Presença (0.05)   |
| Medula                        | <b>17.50855</b>         | 25.47666                | Ausência (0.00)<br><b>Presença (1.00)</b>   |

\*Em negrito somente o modelo que foi considerado através do teste Akaike Information Criterion. ACR = Ancestral comum mais recente; FTM = Fitomelanina

#### 4. DISCUSSÃO

##### 4.1. Ocorrência da fitomelanina nas espécies de Vernonieae e distribuição nos tecidos

Em relação ao aspecto da fitomelanina nas espécies analisadas nesse estudo, pode-se observar que ela apresenta coloração escura (de marrom a preto) e que está presente nos espaços intercelulares, corroborando os trabalhos que a descreveram previamente (Nicolaus, 1964; Pandey & Dhakal, 2001; De-Paula *et al.*, 2013; Freitas *et al.*, 2015; Lusa *et al.*, 2018). Em frutos de Asteraceae, o pigmento é associado ao pericarpo e sua presença associada às fibras e, ou às camadas mais internas de células hipodérmicas (Rogers *et al.*, 1982; Stussy & Liu, 1983; Pandey *et al.*, 1989; De-Paula *et al.*, 2013; Pandey *et al.*, 2014). Já em raízes, rizomas, caules aéreos e folhas o pigmento é associado às esclereídes e/ou às células parenquimáticas vizinhas (Mistríková & Vaverková, 2007; Fritz & Saukel, 2011; Lusa *et al.*, 2018). Na presente investigação pode-se observar que nos ramos caulinares lenhosos as espécies de Vernonieae apresentam depósitos de fitomelanina nos espaços intercelulares de tecidos corticais, vasculares e medulares, como já descrito por Lusa *et al.*, 2018, sempre associados às esclereídes, já que as células parenquimáticas com depósitos de fitomelanina em espaços intercelulares adjacentes se diferenciam invariavelmente em esclereídes (vide Capítulo 2).

No que se refere à função, a fitomelanina é descrita como um pigmento associado à proteção contra a desidratação e radiação solar intensa (Pandey *et al.*, 1989; Hill *et al.*, 1997; Pandey & Dhakal, 2001; Jeffrey, 2009). Estudos com frutos de girassol realizados por Carlson *et al.* (1972), Rogers &

Kreitner (1983), Aragón & Ravelo (2010) e Prasifka *et al.* (2014) relacionam a fitomelanina à proteção contra predadores, pois indicam que a presença do pigmento aumenta a produtividade da planta, dificultando a alimentação das larvas das mariposas do girassol. Os autores ainda afirmam que o pigmento além de servir como bloqueador mecânico, também apresenta características tóxicas ou impalatáveis, fazendo com que os insetos tenham preferência por plantas que não apresentem o pigmento. Além disso, a fitomelanina é considerada importante na proteção contra invasões fúngicas e microbianas (Pandey & Dhakal, 2001). No presente estudo, as espécies que apresentaram o pigmento no córtex, no floema secundário e na medula são ervas, arbustos e arvoretas. Essas espécies foram coletadas em regiões com altitudes elevadas (entre 600 a 2000 metros) com clima que varia de tropical litorâneo úmido a tropical sazonal, de inverno seco (Mendonça & Oliveira, 2007; Cavalcanti *et al.*, 2009). Levando em consideração que as plantas presentes nessas determinadas localidades estão expostas a intensa radiação solar e elevadas temperaturas, é possível que a fitomelanina presente nas porções externas dos caules, ou seja no córtex e no floema, possa estar exercendo a função de proteção contra efeitos danosos, como os da radiação solar intensa, da dessecação, ou atuando como um bloqueador mecânico contra ação de predadores, como sugerido por Carlson *et al.* (1972), Rogers & Kreitner (1983), Aragón & Ravelo (2010) e Prasifka *et al.* (2014). Lusa *et al.* (2018) sugeriram que a presença do pigmento pode atuar na proteção de efeitos danosos provocados pela exposição das Lychnophorinae ao fogo frequente no domínio Cerrado. As espécies analisadas no presente estudo, que preponderantemente apresentaram fitomelanina pertencem à mesma subtribo citada anteriormente, corroborando com a descrição feita pelos autores. Além disso, *Moquinia racemosa* que não pertencente à subtribo Lychnophorinae também tem ocorrência na região do Cerrado, o que poderia estar relacionado à proteção contra queimadas, como sugerido por Lusa *et al.* (2018). Os dados apresentados nesse estudo sugerem novas investigações, especialmente relacionadas ao sinal filogenético da ocorrência da fitomelanina em sistemas caulinares aéreos de Vernonieae, ou seja, a investigação do padrão de semelhança funcional entre as espécies filogeneticamente relacionadas (Blomberg *et al.*, 2003).

Por sua vez, a presença da fitomelanina internamente, como na medula dos caules aéreos, ainda se apresenta como uma questão mal compreendida em termos funcionais. No entanto, quando observamos que os tipos celulares presentes no córtex são os mesmos da medula, ou seja, parênquima de preenchimento, onde algumas células se diferenciam em esclereídes pelo processo de espessamento da parede celular, podemos sugerir que a diferenciação de esclereídes com presença de fitomelanina ocorra internamente na medula como parte de resposta metabólica mais generalista ao estresse, assim como foi relatado por Mangena (2018) para as alterações anatômicas corticais e medulares em plantas de *Glycine max* L. sujeitas ao estresse hídrico.

#### 4.2. Estados ancestrais da fitomelanina em caules aéreos de Vernonieae

Os resultados obtidos das reconstruções indicam que provavelmente a fitomelanina ocorria no ACR da tribo. Contudo, a capacidade de produzir o pigmento em caules aéreos parece ter surgido



também em outras tribos de Asteraceae, pois *Moquinia racemosa*, pertencente à Moquineae (representante do grupo externo à Vernonieae) apresentou fitomelanina na medula caulinar. Conforme já considerado por Freitas *et al.* (2015) e Lusa *et al.* (2018) possivelmente a fitomelanina esteja mais distribuída em Asteraceae do que se tem registros. A descrição da presença de fitomelanina em sistemas subterrâneos de Cardueae (Fritz & Saukel, 2011; Upton, 2011), Heliantheae (Heubl *et al.*, 1988; Mistríková & Vaverková, 2007) e Nassauvieae (Hartwich, 1885, *apud* Hanausek, 1907 e Griebel, 1913) também pode ser evidência dessa maior distribuição do pigmento na família.

As análises demonstraram que a ocorrência da fitomelanina no córtex, no floema secundário e na medula de caules espessados (lenhosos) teria surgido mais de uma vez, ou seja, independentemente nas linhagens da tribo, apesar de ser preponderante na subtribo Lychnophorinae. Levando em consideração essas observações e os relatos na literatura sobre a ocorrência de fitomelanina em outras tribos, ainda se fazem necessários novos estudos a fim de esclarecer tanto a distribuição do pigmento em órgãos vegetativos nas demais tribos da família, bem como os fatores que poderiam estar relacionados à produção da fitomelanina nesses órgãos.

## 5. CONCLUSÃO

No presente estudo, foi possível verificar que as espécies de Vernonieae apresentaram maior frequência de fitomelanina na medula, no floema secundário e no córtex, respectivamente. A presença do pigmento geralmente foi observada entre as esclereídes já espessadas. A espécie pertencente ao grupo externo (*Moquinia racemosa*) também apresenta fitomelanina. Assim, os dados apresentados nesse estudo indicam que novas investigações são necessárias em relação a ocorrência da fitomelanina em caules aéreos de Asteraceae. Além disso, também é importante investigar mais profundamente se fatores ambientais podem ter influência no processo de formação do pigmento ao longo da diversificação do grupo. Deste modo, novos estudos que tragam mais compreensão sobre a distribuição do pigmento nos tecidos vegetais, sua síntese e evolução são de extrema importância e podem trazer luz para um melhor entendimento das adaptações ocorridas nessa grande família de plantas, durante a sua diversificação.

## 6. AGRADECIMENTOS

Somos gratos ao corpo técnico do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), pela disponibilidade e apoio técnico. Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa (CAPES-DS de 01/03/2017 a 28/02/2019).

**ANEXO I**

Tab. A1

Lista de espécies utilizadas para o presente estudo e seus respectivos vouchers. Divisão das subtribos de acordo com estudos feitos por Keeley & Robinson (2009), de Azevedo Bringel *et al.* (2011) e Loeuille *et al.* (2015).

| Subtribos         | Espécies   | Amostra<br>1_Voucher                   | Amostra<br>2_Voucher            | Amostra<br>3_Voucher                  |
|-------------------|--|--|---------------------------------|---------------------------------------|
| Dipterocypselinae | <i>Heterocypcela andersonii</i> H. Rob.                              | Siniscalchi 601                        | ~~~~~                           | ~~~~~                                 |
| Vernoniinae       | <i>Vernonanthura patens</i> (Kunth) H. Rob.                          | Peres 28                               | Nunes 3834                      | Roth. P. 1452                         |
|                   | <i>Vernonia gigantea</i> (Nutt.) Trell., Branner & Coville           | Mauzy, B. 0043591                      | Stuts 715                       | Hoywood, M.J. 113                     |
|                   | <i>Vernonia missurica</i> Raf.                                       | Mac Donald 9862                        | Friemann 6370                   |                                       |
|                   | <i>Chresta martii</i> (DC.) H.Rob.                                   | Siniscalchi 482                        | Siniscalchi 637                 | Siniscalchi 642                       |
| Chrestinae        | <i>Chresta pycnocephala</i> DC.                                      | Siniscalchi 522                        | Hatshbach et al. 68115          | Siniscalchi 535                       |
|                   | <i>Chresta angustifolia</i> Gardner                                  | Pirani, J.R. <i>et al.</i> 6472        | Hass, H. 228                    | Silva, J.M, <i>et al.</i> 8034        |
|                   | <i>Chresta filicifolia</i> Siniscalchi & Loeuille                    | Siniscalchi 512                        | USP_Siniscalchi                 |                                       |
|                   | <i>Chresta pacourinoides</i> (Mart. ex DC.) Siniscalchi & Loeuille.  | Siniscalchi 613                        | ~~~~~                           | ~~~~~                                 |
| Vernoniinae       | <i>Cyrtocymura scorpioides</i> (Lam.) H.Rob.                         | Caxambu, M.G. <i>et al.</i> 4817       | Ogasawara H.A. 03               | Silva, J.M. <i>et al.</i> 2474        |
|                   | <i>Lepidaploa opposita</i> A.Teles, Sobral & J.N.Nakaj.              | Siniscalchi 508                        | ~~~~~                           | ~~~~~                                 |
| Lepidaploinae     | <i>Lessingianthus durus</i> (Mart. ex DC.) H.Rob.                    | Monge 2246_                            | Rizzo 5221                      | Kalago, R. 153                        |
|                   | <i>Lessingianthus monocephalus</i> (Gardner) H.Rob.                  | Hatschbach, G. 71370                   | Hatschbach, G. 64852            | ~~~~~                                 |
| Elephantopinae    | <i>Elephantopus mollis</i> Kunth                                     | Queiroz, de L.M. 422                   | Pastório, F.F. 37               | Nuemberg, A. & Mello 62               |
| Chrestinae        | <i>Soaresia velutina</i> Sch.Bip.                                    | Hatschbach, G. 64550                   | Siniscalchi 577                 | ~~~~~                                 |
| Lepidaploinae     | <i>Stilpnopappus tomentosus</i> Mart. ex DC.                         | Guedes, M.L. 11884                     | Atkins, S. <i>et al.</i> 5759   | Hatschbach, G. & Hatschbach, M. 56730 |
|                   | <i>Strophopappus speciosus</i> (Less.) R. Esteves                    | Loeuille 459                           | Cordeiro, J. <i>et al.</i> 2848 | Hatschbach, H. 64790                  |
| Centratherinae    | <i>Centratherum punctatum</i> Cass.                                  | Bresolim, A. 253                       | Nuernberg, A. & Mello, A.S. 456 | Wolff & Lusa, 2017                    |
| Lychnophorinae    | <i>Albertinia brasiliensis</i> Spreng.                               | L.Kolenann 4955                        | M.A. de A. 124                  | Hotmanan 132                          |
|                   | <i>Gorceixia decurrens</i> Baker                                     | Souza, J. P. 5238_                     | Harley, R.M. 54071              | Hatschbach, G. 46336                  |
|                   | <i>Eremanthus crotonoides</i> (DC.) Sch.Bip.                         | J.R.Stehmann <i>et.al</i> (11-09-1990) | Stehmann <i>et.al</i> 06400     | Pirani, J.R. 5336                     |
|                   | <i>Hololepis pedunculata</i> (DC. ex Pers.) DC.                      | Roth, L.1651                           | V.C Souza 21141                 | Nakajima, J.N. <i>et.al</i> 1174      |
|                   | <i>Heterocoma ekmaniana</i> (Philipson) Loeuille, J.N.Nakaj. & Semir | USP 198893                             | ~~~~~                           | ~~~~~                                 |
|                   | <i>Chronopappus bifrons</i> (DC. ex Pers.) DC.                       | USP 189313                             | ~~~~~                           | ~~~~~                                 |
|                   | <i>Maschalostachys mellosilvae</i> Loeuille & Roque                  | Siniscalchi 461                        | ~~~~~                           | ~~~~~                                 |
|                   | <i>Paralychnophora harleyi</i> (H.Rob.) D.J.N.Hind.                  | Gason, P. 5905                         | Hatschbach, G. 47486            | Giulietti CFCR 1497                   |

(continua na próxima página)

Tab. A1 (continuação)

| Subtribos      | Espécies   | Amostra<br>1_Voucher   | Amostra<br>2_Voucher                                     | Amostra<br>3_Voucher  |
|----------------|--|--|--|---|
| Lychnophorinae | <i>Minasia pereirae</i> H.Rob.   | Siniscalchi 554  | Loeulle 494  | Hatschbach, G.<br>51160   |
|                | <i>Piptolepis ericoides</i><br>Sch.Bip.  | USP 1377   | Hatschbach, G.<br>2884                                   | Loeulle 500   |
|                | <i>Lychnophorella morii</i><br>(H.Rob.) Loeuille, Semir<br>& Pirani                  | Conceição 1072   | ~~~~~  | ~~~~~   |
|                | <i>Lychnophora salicifolia</i><br>Mart.  | Pirani, J.R. 5286  | Pirani, J.R. 2163  | Barboza, E. 3856  |
|                | <i>Lychnophora haplopappa</i><br>Loeuille, Semir & Pirani                            | Loeuille 905   | ~~~~~  | ~~~~~   |
|                | <i>Lychnophora hatschbachii</i> (H. Rob.)<br>Loeuille, Semir & Pirani                | USP CFR9552  | Monge 1402   | ~~~~~   |
|                | <i>Lychnophorella santosii</i><br>(H. Rob.) Loeuille, Semir<br>& Pirani              | Harley, R.N. 26329   | Lusa, M. <i>et al.</i><br>Pico das almas,<br>BA-26/05/12 | Lusa, M. <i>et al.</i><br><i>Pico das almas</i> ,<br>BA-26/05/12        |
|                | <i>Lychnophorella leucodendron</i> (Mattf.)<br>Loeuille, Semir & Pirani              | Harley 26351   | ~~~~~  | ~~~~~   |
|                | <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.)<br>MacLeish                                    | Caxambu, M.G. <i>et al.</i> 4735   | Ditrich 1831   | Silva, da B.P.<br>3382  |
|                | <i>Eremanthus incanus</i><br>(Less.) Less.   | Arndt, M.H.L. &<br>Aristóbolo, M.S.<br>(09-09-1990)                            | Hatschbach, G. <i>et al.</i> 49603                       | Hatschbach, G.<br>27012   |
|                | <i>Eremanthus auriculatus</i><br>MacLeish & H.Schumach.                              | Loeuille 836   | ~~~~~  | ~~~~~   |
|                | <i>Lychnophora brunonioides</i> Mart.  | Loeuille 598   | ~~~~~  | ~~~~~   |
|                | Dipterocypselinae  | <i>Allocephalus gamolepis</i><br>de Azevedo Bringel,<br>J.N.Nakajima & H. Rob. | Sevilha, A.C. <i>et al.</i><br>5244                      | de Azevedo<br>Bringel Jr, J.B.A.;<br>Sevilha, A.C.; et<br>al. 423       |
| Stokesiinae    | <i>Stokesia laevis</i> (Hill)<br>Greene  | USP Siniscalchi  | Kral, R. 46971   | ~~~~~   |
| Vernoniinae    | <i>Baccharoides anthelmintica</i> (L.)<br>Moench.                                    | Chapman 498  | ~~~~~  | ~~~~~   |
| Gymnantheminae | <i>Gymnanthemum amygdalinum</i> (Del.) Sch.<br>Bip. ex Walp.                         | Venturi, S. 75   | Carpanezzi, A.A.<br>51                                   | Coutinho, P.P.<br>201310 (25-02-<br>1972)                               |
| Grupo externo  | <i>Moquinia racemosa</i><br>(Spreng.) DC.<br><i>Pseudostiffütia kingii</i><br>H.Rob. | Hatschbach, G.<br>44265<br>Furlan, A. et al.<br>18746                          | Hind 3985<br>Hind 3553                                   | Cordeiro, I. &<br>Mellosilva, R.<br>CFR10042<br>Hatschbach, H.<br>47924 |

**Tab. A2**

Espécies pertencentes às principais linhagens da tribo Vernoniae (Asteraceae) e presença (1)\ausência (0) de fitomelanina nas diferentes regiões/tecidos do caule espessado. Em negrito somente as espécies que apresentaram fitomelanina em pelo menos uma região/tecido do caule. Divisão das subtribos de acordo com estudos feitos por Keeley & Robinson (2009), de Azevedo Bringel *et al.* (2011) e Loeuille *et al.* (2015).

| Subtribos         | Espécies                                  | Caule espessado |          |          |          |          |          |          |
|-------------------|---|-----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|                   |   | Periciclo       | Cor      | Fl 1ª    | Fl 2ª    | Xil 2ª   | Xil 1ª   | Med      |
| Dipterocypselinae | <i>Heterocypselia andersonii</i>          | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |
|                   | <i>Vernonanthura patens</i>               | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |
| Vernoniinae       | <i>Vernonia gigantea</i>                  | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |
|                   | <i>Vernonia missurica</i>                 | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |
|                   | <i>Chresta martii</i>                     | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |
|                   | <i>Chresta pycnocephala</i>               | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |
| Chrestinae        | <i>Chresta angustifolia</i>               | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |
|                   | <i>Cresta filicifolia</i>                 | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |
|                   | <i>Chresta pacourinoides</i>              | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |
| Vernoniinae       | <i>Cyrtocymura scorpioides</i>            | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |
|                   | <i>Lepidaploa opposita</i>                | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |
| Lepidaploinae     | <i>Lessingianthus durus</i>               | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |
|                   | <i>Lessingianthus monocephalus</i>        | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |
| Elephantopinae    | <i>Elephantopus mollis</i>                | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |
| Chrestinae        | <i>Soaresia velutina</i>                  | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |
|                   | <i>Stilpnopappus tomentosus</i>           | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |
| Lepidaploinae     | <i>Strophopappus speciosus</i>            | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |
| Centratherinae    | <i>Centratherum punctatum</i>             | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |
|                   | <b><i>Albertinia brasiliensis</i></b>     | <b>0</b>        | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>1</b> |
|                   | <b><i>Gorceixia decurrens</i></b>         | <b>0</b>        | <b>0</b> | <b>1</b> | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>1</b> |
|                   | <b><i>Eremanthus crotonoides</i></b>      | <b>0</b>        | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>1</b> |
|                   | <b><i>Hololepis pedunculata</i></b>       | <b>1</b>        | <b>1</b> | <b>1</b> | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>1</b> |
|                   | <b><i>Heterocoma ekmaniana</i></b>        | <b>0</b>        | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>1</b> |
|                   | <b><i>Chronopappus bifrons</i></b>        | <b>0</b>        | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>1</b> |
|                   | <b><i>Maschalostachys mellosilvae</i></b> | <b>0</b>        | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>0</b> |
|                   | <b><i>Paralychnophora harleyi</i></b>     | <b>1</b>        | <b>1</b> | <b>1</b> | <b>1</b> | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>1</b> |
|                   | <b><i>Minasia pereirae</i></b>            | <b>1</b>        | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>1</b> |
|                   | <b><i>Piptolepis ericoides</i></b>        | <b>0</b>        | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>0</b> |
| Lychnophorinae    | <b><i>Lychnophorella morii</i></b>        | <b>0</b>        | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>0</b> |
|                   | <b><i>Lychnophora salicifolia</i></b>     | <b>1</b>        | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>1</b> | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>1</b> |
|                   | <b><i>Lychnophora haplopappa</i></b>      | <b>1</b>        | <b>1</b> | <b>1</b> | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>1</b> |
|                   | <b><i>Lychnophora hatschbachii</i></b>    | <b>0</b>        | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>1</b> |
|                   | <b><i>Lychnophorella santosii</i></b>     | <b>1</b>        | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>1</b> |
|                   | <b><i>Lychnophorella leucodendron</i></b> | <b>0</b>        | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>1</b> |
|                   | <b><i>Eremanthus erythropappus</i></b>    | <b>1</b>        | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>1</b> |
|                   | <b><i>Eremanthus incanus</i></b>          | <b>0</b>        | <b>1</b> | <b>1</b> | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>1</b> |
|                   | <b><i>Eremanthus auriculatus</i></b>      | <b>0</b>        | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>1</b> |
|                   | <i>Lychnophora brunonioides</i>           | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |
| Dipterocypselinae | <i>Allocephalus gamolepis</i>             | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |
| Stokesiinae       | <i>Stokesia laevis</i>                    | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |
| Vernoniinae       | <i>Baccharoides anthelmintica</i>         | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |
| Gymnantheminae    | <i>Gymnanthemum amygdalinum</i>           | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |
|                   | <b><i>Moquinia recemosa</i></b>           | <b>0</b>        | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>1</b> |
| Grupo externo     | <i>Pseudostiffita kingii</i>              | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |

## 7. REFERÊNCIAS

- Alcorn SM, Arsk PA. 1953.** Softening paraffin-embedded plant tissues. *Stain Technology* **28**: 55-56.
- Aragón AR, Ravelo HG. 2010.** Evaluación de los daños producidos por *Homoeosoma electellum* (Hulst) a girasol en Cuba. *Centro Agrícola* **37**: 9-14.
- Baldwin BG. 2009.** Heliantheae alliance. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy T, Bayer R, eds. *Systematics, Evolution and Biogeography of the Compositae*. IAPT, 689–711.
- Blomberg SP, Garland JrT, Ives AR. 2003.** Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution* **57**: 717-745.
- Bremer K. 1995.** Asteraceae: cladistics and classification. *Timber Press* **97**: 176-178.
- de Azevedo Bringel JB, Nakajima JN, Robinson, H. 2011.** *Allocephalus gamolepis*, a New Genus and Species of Dipterocypselinae (Vernonieae, Asteraceae) from Central Brazil. *Systematic botany* **36**: 785-789.
- Carlson EC, Knowles PF, Dillb JE. 1972.** Sunflower varietal resistance to sunflower moth larvae. *California agriculture* **26**: 11-13.
- Cavalcanti IFA, Kousky VE. 2009.** Climas do Brasil. In: Cavalcanti IFA, Ferreira NJ, Justi da Silva MGA, Silva Dias MAF eds. *Tempo e clima no Brasil*. Oficina de Textos, 135-148.
- Dahlgren RMT, Clifford HT, Yeo PF. 1985.** *The Families of the Monocotyledons. Structure, Evolution and Taxonomy*. Springer Verlag.
- De-paula OC, Marzinek J, Oliveira DMT, Machado SR. 2013.** The role of fibres and the hypodermis in Compositae melanin secretion. *Micron* **44**: 312-316.
- Freitas FS, Orlando C, De-paula OC, Nakajima JN, Marzinek J. 2015.** Fruits of *Heterocoma* (Vernonieae-Lychnophorinae): taxonomic significance and a new pattern of phytomelanin deposition in Asteraceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **269**: 255-265.
- Fritz E, Saukel J. 2011.** Secretory structures of subterranean organs of some species of the Cardueae and their diagnostic value. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica* **53**: 62–72.
- Funk VA, Bayer RJ, Keeley S, Chan R, Watson L, Gemeinholzer B, Schilling E, Panero JL, Baldwin BG, Garcia-Jacas NT, Susanna A, Jansen RK. 2005.** Everywhere but Antarctica: using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. In: Friis I, Balslev H. eds. *Plant diversity and complexity patterns – local, regional and global dimensions. Proceedings of an International Symposium*. Biologiske Skrifter **55**: 343-373.
- Funk VA, Susanna A, Stuessy TF, Robinson H. 2009.** Classification of Compositae. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy TF e Bayer RJ, eds. *Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae*. *International Association for Plant Taxonomy*. IAPT, 171-189.
- Goertzen LR, Cannone JJ, Gutell RR, Jansen RK. 2003.** ITS secondary structure derived from comparative analysis: implications for sequence alignment and phylogeny of the Asteraceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**: 216-234.
- Griebel C. 1913.** Über das Vorkommen von Phytomelan im Wurzelstock von *Inula Helenium* L. Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs und Genußmittel. sowie der Gebrauchsgegenstände. **25**: 555–559.

- Hanausek TF. 1907.** Neue Mitteilungen über die sogenannte Kohleschicht der Kompositen. *Wiesner-Festschrift*, 139–150.
- Heubl GR, Bauer R, Wagner H. 1988.** Morphologische und anatomische Studien an *Echinacea purpurea*, *E. angustifolia*, *E. pallida* und *Parthenium integrifolium*. *Scientia Pharmaceutica* **56**: 145-160.
- Hill HZ, Weixiong LI, Xin P, Mitchell DL. 1997.** Melanin: A Two Edged Sword? *Pigment Cell Res* **10**: 158-161.
- Huber H. 1969.** Die Samenmerkmale und Verwandtschaftsverhältnisse der Liliiflorae. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* **8**: 219–538.
- Jeffrey C. 2009.** Evolution of Compositae flowers. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy TF e Bayer RJ, eds. *Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae*. Sheridan Books, 131-138.
- Kaiser E. 1880.** Verfahren zur Herstellung einer tadellosen Glycerin-Gelatine. *Bot. Zentralb*, 25-26.
- Keeley SC, Jansen RK. 1994.** Chloroplast DNA restriction site variation in the Vernonieae (Asteraceae), an initial appraisal of the relationship of New and Old World taxa and the monophyly of Vernonia. *Plant Systematics and Evolution* **193**: 249–265.
- Keeley SC, Forsman ZH, Chan R. 2007.** A phylogeny of “evil tribe” (Vernonieae: Compositae) reveals Old/New World long distance dispersal: support from separate and combined congruent datasets (trn L-F, ndh F, ITS). *Molecular phylogenetics and Evolution* **44**: 89-103.
- Keeley SC, Robinson H. 2009.** Vernonieae. In: Funk, V.A., Susana, A., Stuessy, T.F. e Bayer, R.J. (Ed.). *Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae*. *International Association for Plant Taxonomy IAPT*, 439-470.
- Kubitzki K. 1998.** Flowering Plants. Monocotyledons: Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae). In: Kubitzki K. *The families and Genera of Vascular Plant*. Springer **4**.
- Loeuille B, Semir J, Lohmann LG, Pirani JR. 2015.** A phylogenetic analysis of Lychnophorinae (Asteraceae: Vernonieae) based on molecular and morphological data. *Syst. Bot.* **40**: 299–315.
- Lusa MG, Loeuille BFP, Appezzato-da-Glória B. 2018.** First record of phytomelanin in aerial vegetative organs and its evolutionary implications in Lychnophorinae (Vernonieae: Asteraceae). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **33**: 18–33.
- Maddison W, Maddison D. 2014.** Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Disponível em: <http://mesquiteproject.org>
- Mangena P. 2018.** Water stress: Morphological and anatomical changes in soybean (*Glycine max* L.) plants. In: *Plant, Abiotic Stress and Responses to Climate Change*. IntechOpen.
- Mendonça F, Danni-Oliveira IM. 2007.** Climatologia noções básicas e climas do Brasil. *Oficina de Textos* 150-157.
- Mistríková I, Vaverková S. 2007.** Morphology and anatomy of *Echinacea purpurea*, *E. angustifolia*, *E. pallida* and *Parthenium integrifolium*. *Biologia, Section Botany* **62**: 2-5.
- Nicolaus RA, Piatelli M, Fattorusso E. 1964.** The structure of melanins and melanogenesis: IV. On some natural melanins. *Tetrahedron* **20**: 1163–1172.
- Pandey AK, Lee WW, Sack FD, Stuessy TF. 1989.** Development of the phytomelanin layer in fruits of *Ageratum conyzoides* (Compositae). *American Journal of Botany* **75**: 739–746.

- Pandey AK, Dhakal MR. 2001.** Phytomelanin in Compositae. *Current Science* **80**: 933 -940.
- Pandey AK., Stuessy TF, Mathur RR. 2014.** Phytomelanin and Systematics of the Heliantheae Alliance (Compositae). *Plant Diversity and Evolution* **131**: 1-21.
- Panero JL, Funk VA. 2002.** Toward a phylogenetic subfamilial classification for the Compositae (Asteraceae). *Proceedings of the biological society of Washington* **115**: 909-922.
- Panero JL. 2007.** Key to the tribes of the Heliantheae alliance. In: Kadereit, J.W. & Jeffrey, C. (eds.), *The Families and Genera of Vascular Plants. Flowering Plants. Eudicots. Asterales*. Springer **8**: 391–395.
- Park KIL, Ishikawa N, Morita Y, Choi JD, Hoshino A, Iida S. 2007.** A bHLH regulatory gene in the common morning glory, *Ipomoea purpurea*, controls anthocyanin biosynthesis in flowers, proanthocyanidin and phytomelanin pigmentation in seeds, and seed trichome formation. *The Plant Journal* **49**: 641–654.
- Park KIL. 2012.** A bHLH Protein Partially Controls Proanthocyanidin and Phytomelanin Pigmentation in the Seed Coats of Morning Glory *Ipomoea tricolor*. *Hort. Environ. Biotechnol.* **53**: 304-309.
- Prasifka JR, Hulke BS, Seiler GJ. 2014.** Pericarp strength of sunflower and its value for plant defense against the sunflower moth, *Homoeosoma electellum*. *Arthropod-Plant Interactions* **8**: 101–107.
- R Core Team. 2018.** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Rogers CE, Stafford RE, Kreitner GL. 1982.** Phytomelanin development and role in hybrid resistance to *Homoeosoma electellum* (Hulst.) larvae. In: *Proceedings of the 10th International Sunflower Conference*, Surfers Paradise 138–141.
- Rogers CE, Kreitner GL. 1983.** Phytomelanin of Sunflower Achenes: a Mechanism for Pericarp Resistance to Abrasion by Larvae of the Sunflower Moth (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental entomology* **2**: 1-9.
- Siniscalchi C, Loeuille B. 2019.** Phylogenomics of chresta and relationships within Vernoniaeae. Artigo no prelo. 2018.
- Stuessy TF, Liu HY. 1983.** Anatomy of the pericarp of clibadium, desmanthodium and ichthyothere (Compositae, Heliantheae) and systematic implications. *New England Botanical Club* **85**: 213-227.
- Upton R., Graff A, Jolliffe G, Laenger R., Williamson E. 2011.** American Herbal Pharmacopoeia. Botanical Pharmacognosy. *Microscopic Characterization of Botanical Medicines*, 363–373 510–512.
- Wittich PE, Graven P. 1995.** Histochemical study of the development of the phytomelan layer in the seed coat of *Gasteria verrucosa* (Mill.) H. Duval. *Protoplasma* **187**: 72–78.





## CAPÍTULO 2

**Mecanismos celulares envolvidos com a presença de fitomelanina em caules aéreos de *Piptocarpha axillaris* (Less.) Baker. (Vernonieae, Asteraceae)**

*Manuscrito a ser submetido para a revista Annals of Botany*

**Mecanismos celulares envolvidos com a presença de fitomelanina em caules aéreos de *Piptocarpha***

## RESUMO

- **Introdução e objetivos** A fitomelanina é um pigmento de coloração marrom a preto encontrado em tecidos vegetais. Frequentemente é registrado em sementes e cipselas, mas recentemente foi observado em caules aéreos de espécies de Lychnophorinae. Estudos subcelulares envolvendo a formação do pigmento foram feitos somente em sementes e cipselas. O presente estudo apresenta a primeira investigação subcelular dos mecanismos envolvidos com a presença da fitomelanina em caules aéreos de Vernonieae (Asteraceae).
- **Material e métodos** Foram analisados caules da espécie *Piptocarpha axillaris*, os quais passaram por processos usuais em estudos de anatomia vegetal e microscopia eletrônica de transmissão.
- **Principais resultados** A polimerização da fitomelanina em *P. axillaris* inicia-se a partir do segundo nó caulinar (na região medular), pode ocorrer simultaneamente à esclerificação e aumentar de acordo com o espessamento do caule (a partir da diferenciação de outras esclereídes). As análises subcelulares permitiram observar a participação de plastídeos na formação de material fenólico, principal precursor da fitomelanina. Foi possível descrever a síntese, secreção e transporte desse material fenólico até o espaço intercelular, onde ocorre a polimerização do pigmento.
- **Conclusões** Sugerimos que os compostos fenólicos produzidos pelos plastídeos estariam envolvidos na síntese e polimerização da fitomelanina. Além disso, propomos a provável participação do retículo endoplasmático rugoso e de ribossomos livres na síntese de enzimas que participam do processo de polimerização dos compostos fenólicos ou na síntese de proteínas que compõem a fitomelanina.

Palavras-chave: cipselas, compostos fenólicos, melanina, pigmento, plastídeos, tanino, subcelular.

## 1. INTRODUÇÃO

A melanina é um pigmento de coloração escura (marrom a preta), encontrado em tecidos animais, vegetais e fúngicos (Nikolaus, 1964). Quando encontrado em tecidos vegetais esse pigmento é denominado de fitomelanina (Hartwich, 1885, *apud* Hanausek, 1907 e Griebel, 1913; Nicolaus, 1964; Huber, 1969; Heubl *et al.*, 1988; Pandey & Dhakal, 2001). A ocorrência de melanina vegetal é usualmente relatada em frutos ou cipselas de Asteraceae e em sementes de Asparagales (Wittich & Graven, 1995, 1998). Estudos recentes realizados por Park *et al.* (2007) e Park (2012) também relataram a presença do pigmento em sementes de Convolvulaceae. O pigmento está geralmente relacionado à proteção contra predadores (Beard *et al.*, 1977; Johnson & Beard, 1977; Pandey *et al.*, 1989; Pandey & Dhakal, 2001), apresentando características tóxicas ou impalatáveis e também agindo como bloqueador mecânico (Kiewnick, 1964; Carlson *et al.*, 1972; Kreitner & Rogers, 1981; Rogers & Kreitner, 1983). Além disso, o pigmento é relatado como sendo protetor contra a desidratação e contra a radiação solar intensa (Pandey *et al.*, 1989; Pandey & Dhakal, 2001; Jeffrey, 2009).

A literatura registrada para Asteraceae geralmente associa a presença da fitomelanina ao pericarpo das cipselas, sendo considerada uma camada mecânica resistente (Rogers *et al.*, 1982; Pfister, 1894; Pandey *et al.*, 1989; Pandey & Dhakal, 2001; De-Paula *et al.*, 2013). No entanto, menos frequentemente relatado, esse pigmento pode estar presente em raízes e rizomas das tribos Cardueae e Helianthae, de Asteraceae (Hartwich, 1885, citado por Hanausek, 1907 e Griebel 1913; Huber, 1969; Heubl *et al.*, 1988; Mistríková & Vaverková, 2007; Fritz & Saukel, 2011). Lusa *et al.* (2018) descreveram pela primeira vez a presença da fitomelanina em folhas e caules aéreos de Asteraceae, em espécies de Lychnophorinae (Vernonieae) relando a ocorrência em maior frequência em caules lenhosos do que em caules jovens.

A natureza química da fitomelanina ainda não é totalmente conhecida devido à sua complexidade estrutural, pois não é solúvel em grande parte dos solventes conhecidos, como: ácido crômico, hidróxido de potássio, ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido nítrico, água regia, água, álcool, éter de petróleo, glicerina, hidrato de cloro e amônia (Pandey & Dhakal, 2001). Nikolaus (1964) afirma que a substância apresenta compostos fenólicos do tipo catecol conjugado. Além disso, estudos de Wittich & Graven (1995, 1998) apontam a provável participação de compostos fenólicos e da calose na constituição da fitomelanina em Asparagales. Estudos mais recentes realizados por Plonka & Grabacka (2006) e com Solano (2014), indicam que em tecidos vegetais a melanina é formada a partir da ação da enzima fenol oxidase, durante a polimerização de compostos fenólicos como:  $\gamma$ -glutaminil-4-hidroxibenzeno, ácido homogentísico, ácido 4-hidroxifenilacético, 1,8-di-hidroxi-naftaleno e o-benzenodiol (catecol)). Portanto, nesse estudo assumimos a hipótese de que os principais precursores da fitomelanina sejam compostos fenólicos.

Em relação à origem celular da fitomelanina é causa de debates no meio científico. Estudos realizados por Knowles (1978), em cipselas de girassóis, indicaram que a obtenção da substância precursora da fitomelanina possa vir da parede celular do esclerênquima. Além disso, outros pesquisadores defendem que o desenvolvimento da fitomelanina em cipselas pode ocorrer: pela degradação das células hipodérmicas parenquimáticas (Rogers *et al.*, 1982), ou por secreção da hipoderme parenquimática e, ou das fibras (Pandey *et al.*, 1989; De-Paula *et al.*, 2013). Para Pandey *et al.*, (1989) e De-Paula *et al.*, (2013) o conteúdo secretado entre a hipoderme e o esclerênquima nas cipselas, juntamente com as enzimas liberadas por esses tipos celulares seriam os precursores da fitomelanina. De acordo com Pandey *et al.* (1989), a secreção das substâncias precursoras da fitomelanina em *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) está relacionada à maior atividade do retículo endoplasmático liso nas células da hipoderme, não apresentando alterações no protoplasto das fibras. Já as investigações realizadas por De Paula *et al.* (2013) em *Praxelis difusa* (Rich.) Pruski indicaram a atividade potencialmente secretora no protoplasto das fibras, tanto no retículo endoplasmático liso quanto nas vesículas de Golgi. Pandey *et al.* (1989) e De-Paula *et al.* (2013) apontam ainda que a fitomelanina é formada no espaço esquizógeno entre as fibras e a camada mais interna da hipoderme nas cipselas. Investigações realizadas por Lusa *et al.* (2018) sugerem que em caules aéreos de Lychnophorinae (Vernonieae, Asteraceae) os precursores da fitomelanina possivelmente são formados nas esclereídes e/ou nas células parenquimáticas vizinhas. No entanto, em órgãos vegetativos o conhecimento a respeito do processo de síntese celular dessa substância é completamente desconhecido. Logo, o presente estudo apresenta a primeira investigação subcelular envolvendo o processo de síntese da fitomelanina em órgãos vegetativos de Vernonieae (Asteraceae).

A espécie investigada no presente estudo foi *Piptocarpha axillaris* (Less.) Baker. A mesma foi selecionada após análise prévia, por apresentar abundante fitomelanina nos tecidos caulinares. A espécie pertence à subtribo Piptocarphinae e à tribo Vernonieae (Asteraceae) (Bremer, 1995; Keeley & Robinson, 2009). *P. axillaris* é encontrada em matas do sul e sudeste do Brasil, com hábito arbóreo, medindo de 3 a 16 metros de altura (Volet, 2017). Geralmente cresce nas bordas e no interior da Floresta Ombrófila Mista e também na Floresta Ombrófila Densa, sendo conhecida popularmente por: cambará, cambará-do-campo, canela-podre, maria-mole, pau-de-cinza, pau-toucinho-de-folhas-largas, saboeiro e vassoura-preta (Volet, 2017).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material botânico

Para as análises estruturais e subcelulares foram coletadas em campo amostras de caule de três indivíduos da espécie *Piptocarpha axillaris* (Less.) Baker (Vernonieae, Asteraceae). Foram selecionadas amostras de diferentes estágios do desenvolvimento do eixo caulinar aéreo da espécie *P. axillaris*, ou seja, da gema apical até as regiões lenhosas, em torno do 30º nó caulinar. A coleta foi realizada entre outubro de 2017 a outubro de 2018 no Morro da Lagoa da Conceição (Wolff & Lusa 002 e 004), Florianópolis,

Santa Catarina, na trilha da “pista de asa delta” (27°35’39” S; 48°28’39,4” O, a 265 metros de altura ).

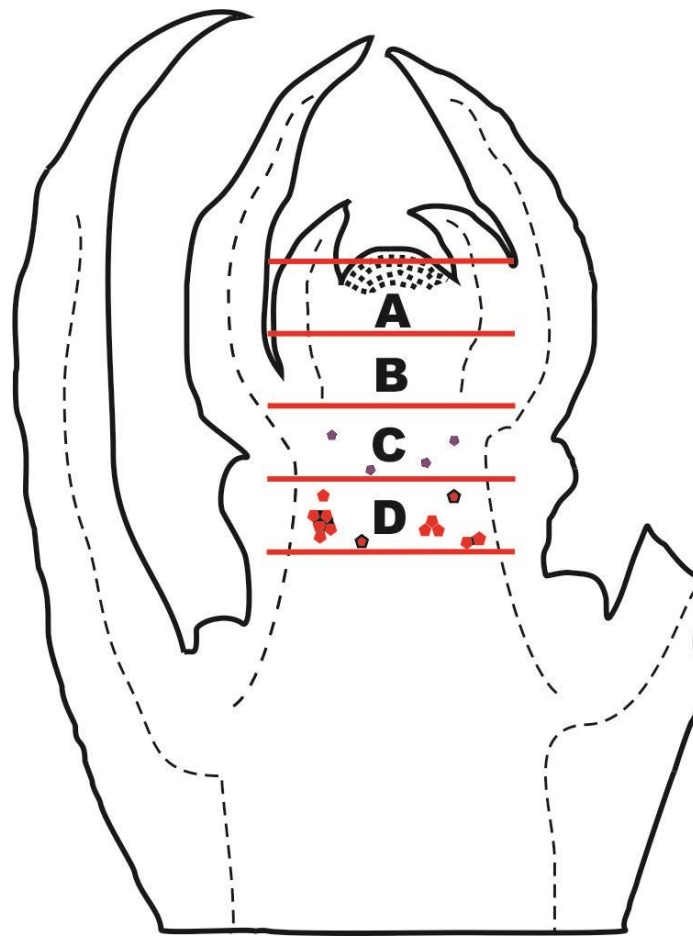
#### 2.4 Observações estruturais – Microscopia de luz

Amostras de caule de *Piptocarpha axillaris*, de regiões meristemáticas e adultas, foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,2 (Feder & O’Brien, 1968) e em FAA 70% (Johansen, 1940) respectivamente, por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série butanólica terciária crescente, pré-infiltradas em óleo de parafina e butanol terciário (1:1 v/v), infiltradas em parafina e incluídas em parafina pura (Johansen, 1940). Os blocos foram seccionados (de 7 a 15 µm de espessura) em micrótomo rotativo (RM 2125 RT Leica Microsystem, Nussloch, Alemanha). As secções foram coradas com safranina 1% e azul de astra 1% (Bukatsch, 1972), montadas entre lâmina e lamínula com Entelann (Merk KGaA, Darmstadt, Alemanha) e observadas em microscópios de luz. As imagens foram registradas em microscópio Olympus, modelo BX41, com câmera Q-imagin acoplada.

#### 2.5 Observações subcelulares – Microscopia Eletrônica de Transmissão

Após a análise da distribuição da fitomelanina no caule em diferentes fases de desenvolvimento caulinar, através das observações estruturais, foi determinada a região para a realização das investigações subcelulares. A região elencada foi a partir do promeristema, na região do meristema central (Figura 1), onde a diferenciação das esclereídes e a formação da fitomelanina comumente se inicia. Foram amostradas quatro regiões consecutivas, a partir do domo meristemático.

As amostras foram dissecadas sob microscópio estereoscópico (Leica EZ4), fixadas em glutaraldeído 3% em tampão cacodilato de sódio 0,2M, pH 7,25 em bomba de vácuo por 12 horas (O’Brien, 1966, modificado). Posteriormente as amostras foram pós-fixadas com OsO<sub>4</sub> 1,0% por duas horas, desidratadas em série acetônica e embebidas em resina Spurr®. As secções semifinas foram realizadas em ultramicrótomo Leica® (modelo RM2125RT) com auxílio de navalhas de vidro, coradas com azul de toluidina 1% em tampão fosfato-citrato (Sakai, 1973), por 1 a 2 minutos em placa aquecedora e examinadas em microscópio de luz para seleção da região de interesse. As secções ultrafinas foram executadas em ultramicrótomo Leica® (modelo RM2125RT) com auxílio de navalha de diamante para ultramicrotomia (DIATOME), coletadas em telas de cobre de 150-Mesh e contrastadas com acetato de uranila 5% (Watson, 1958) e citrato de chumbo 5% (Reynolds, 1963). As secções foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 TEM, operado a 200 Kv. Para o embasamento de hipóteses foram levadas em consideração investigações subcelulares prévias realizadas em cipelas que apresentam fitomelanina (Pandey *et al.*, 1989 e De-Paula *et al.*, 2013).



**Fig. 1-** Ápice caulinar: regiões selecionadas para as análises em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Linha pontilhada ( . . . ): promeristema; linha tracejada ( \_ \_ \_ ): procâmbio; pentágonos roxos: esclereídes em início de diferenciação; pentágonos vermelhos: esclereídes diferenciadas (contornos representam a fitomelanina nos espaços intercelulares entre as esclereídes).

### 3. RESULTADOS

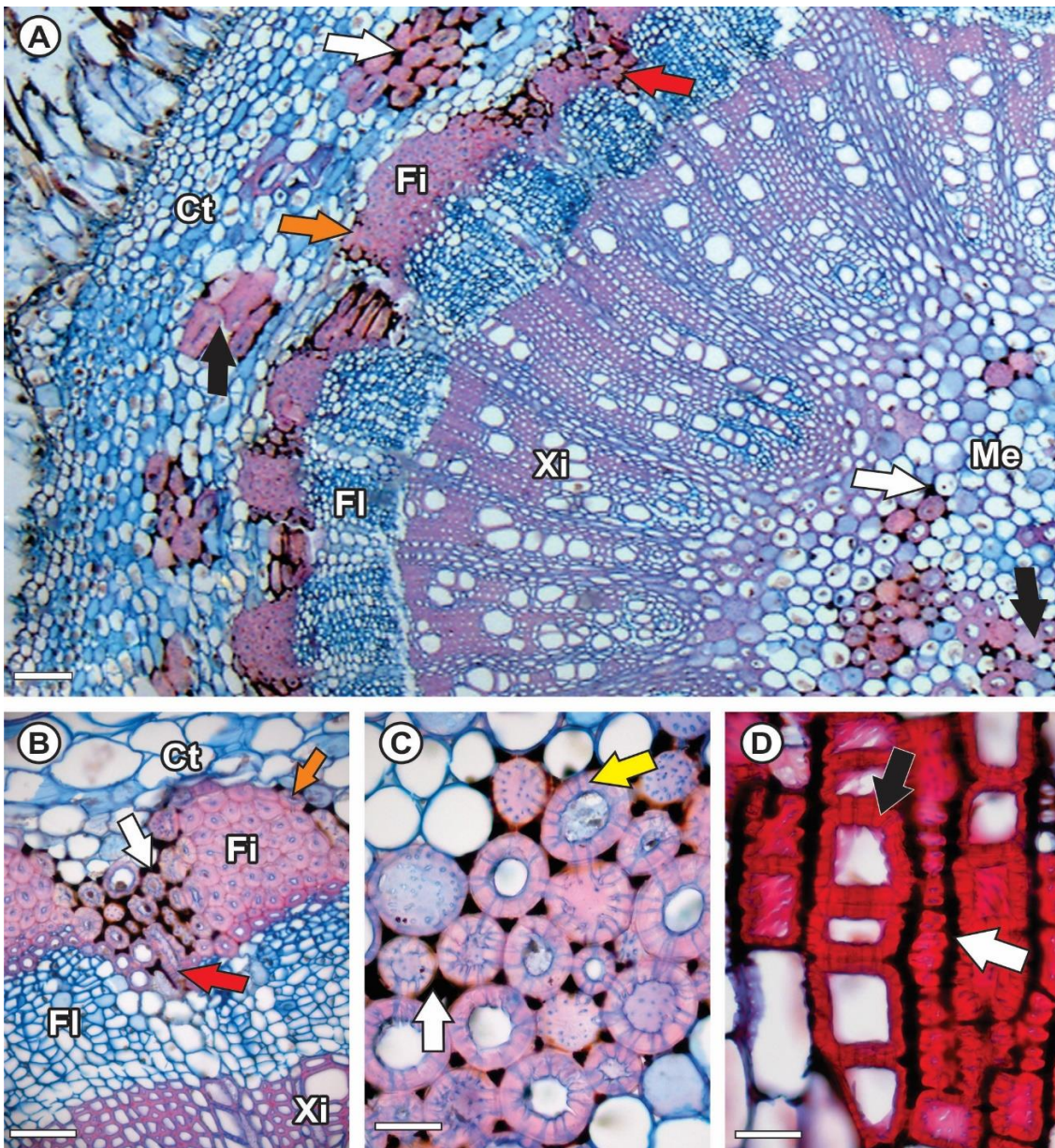
### 3.2 Análises estruturais

A partir de secções transversais observamos a ocorrência da fitomelanina em espaços intercelulares no córtex, periciclo, floema primário ou secundário e na medula, geralmente associada às esclereídes, as quais se distribuem de forma agrupada ou isolada (Fig. 2A-D). As esclereídes apresentam parede secundária espessa, formatos e tamanhos ligeiramente variados no plano transversal (Fig. 2B-C), pontoações simples ramificadas abundantes (Fig. 2C-D) sendo levemente alongadas no plano longitudinal (Fig. 2D).

Na porção mais apical da gema caulinar há pouca diferenciação celular (Fig. 3A). Logo abaixo do promeristema, os tecidos meristemáticos se diferenciam, contudo, sem formação de fitomelanina ou de esclereídes (Fig. 3A-B), embora algumas células apresentem conteúdo mais densamente corado. No segundo nó foi possível observar, em secção transversal, a formação de esclereídes em tecidos pouco diferenciados (Fig. 3C). Nessa mesma fase, no córtex e na medula das porções caulinares apicais, as esclereídes em diferenciação podem se apresentar isoladas ou agrupadas (Fig. 3C-D), sendo que na medula há presença de fitomelanina nos espaços intercelulares (Fig. 3D).

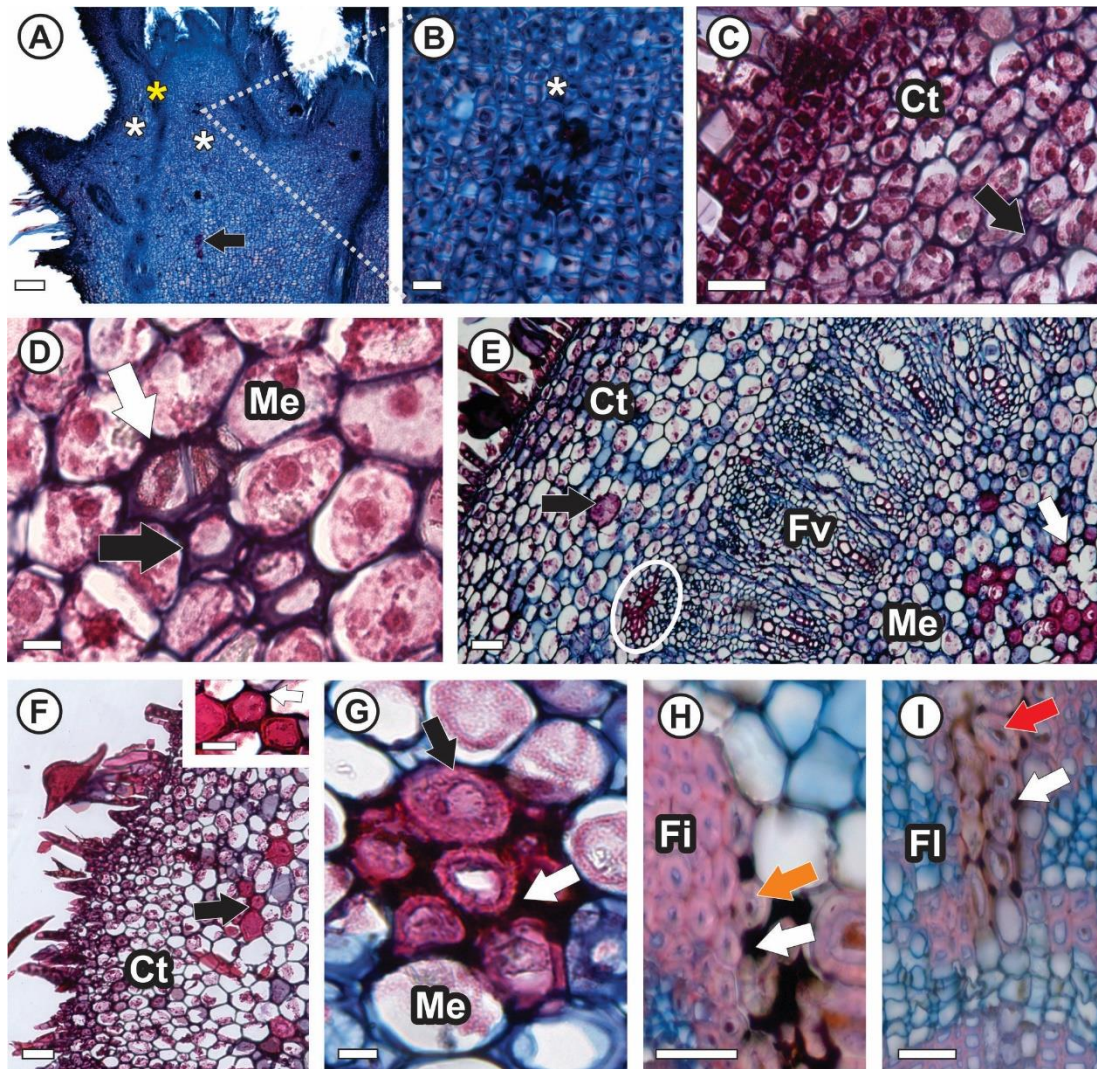
A partir do sexto nó é possível observar algumas esclereídes completamente diferenciadas com presença de fitomelanina no córtex (Fig. 3E-F-detalle). Na região periférica ao cilindro vascular, calotas de fibras perivasculares se diferenciam a partir do periciclo e do floema primário. Essas calotas de fibras não apresentam fitomelanina (Fig. 3E, círculo branco). A região medular apresenta esclereídes espessadas com presença de fitomelanina entre elas (Fig. 3E, G).

A partir do sétimo nó do eixo caulinar foram observadas esclereídes espessadas e isoladas na região cortical, geralmente sem presença de fitomelanina nos espaços intercelulares. Contudo, nos nós subsequentes em que as esclereídes corticais formam agrupamentos mais conspícuos é possível observar a fitomelanina depositada nos espaços intercelulares dessas células (Fig. 2A). Na periferia do sistema vascular notam-se as calotas de fibras perivasculares completamente diferenciadas e sem fitomelanina (Fig. 2A-B, 3H). Entretanto, observa-se também a formação de esclereídes de origem pericíclica, justapostas às calotas de fibras perivasculares, com abundante presença de fitomelanina (Fig. 2A-B, 3H). As esclereídes presentes no floema secundário também apresentam o pigmento nos espaços intercelulares, especialmente na região dos raios (Fig. 2A, B, 3I). A região medular apresentou esclereídes espessadas abundantes com fitomelanina entre elas (Fig. 2A, C).



**Fig. 2-** Seções transversais (A-C) e longitudinal (D) do 13º nó de *Piptocarpha axillaris*. A) Aspecto geral do caule: distribuição das esclereídes corticais (seta preta), pericíclicas (seta laranja), floemáticas (seta vermelha) e medulares (seta preta). B) Região perivascular: detalhe das calotas de fibras, esclereídes pericíclicas e floemáticas com fitomelanina. C-D) Detalhe das esclereídes com pontoações simples ramificadas (seta amarela) e fitomelanina presente nos espaços intercelulares (seta branca). Ct = córtex; Fi = fibras; FI = floema; Me = medula; Xi = xilema. Barras de escala: 100µm (A); 50µm (B-D).





**Fig. 3** - Caule de *Piptocarpha axillaris*. A-B) Secções longitudinais do Meristema Apical Caulinar (MAC). A) Vista geral do MAC. B) Detalhe das células indiferenciadas com conteúdo mais densamente corado. C-I) Secções transversais. C-D) Segundo nó: detalhe das esclereídes (seta preta) em diferenciação no córtex e na medula respectivamente. E-G) Região do 6º nó: E) Esclereídes corticais e medulares (seta preta) com formação de fitomelanina (seta branca). Calotas de fibras perivasculares se diferenciando a partir do periciclo e do floema primário (círculo branco); F) Esclereídes agrupadas na região cortical (seta preta), com fitomelanina. F- (Detalhe) Esclereídes com presença de fitomelanina (seta branca); G) Região medular com esclereídes (seta preta) e fitomelanina nos espaços intercelulares (seta branca). H-I) Região do 13º nó: H) Detalhe das esclereídes pericíclicas (seta laranja) com fitomelanina (seta branca). I) Detalhe das esclereídes floemáticas (seta vermelha) com presença de fitomelanina no raio floemático (seta branca). Ct = córtex; Fv = feixe vascular; Fi = floema; Me = medula; asterisco branco = meristema fundamental; asterisco amarelo = procâmbio. Barras de escala: 250µm (B); 100µm (E); 50µm (F-detalhe), H-I); 25µm (A, C, G); 20µm (F); 10µm (D).

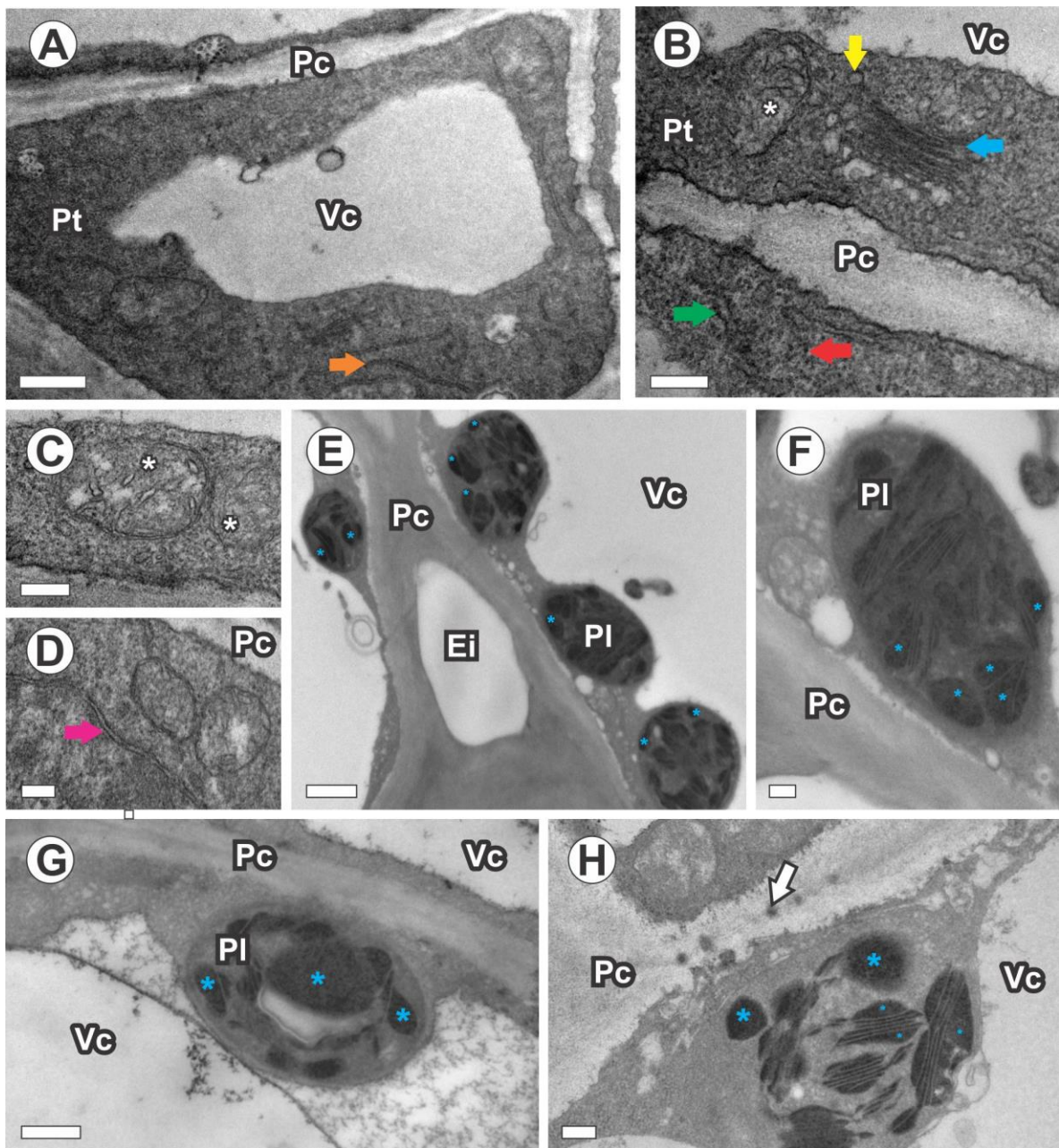
### 3.2 Observações subcelulares – Formação da fitomelanina

Logo abaixo do domo apical do Meristema Apical Caulinar (Fig. 1), na região do meristema medular, as células em processo de diferenciação (Fig. 4A-D) apresentam protoplasto denso, um ou mais vacúolos conspícuos, pró-plastídeos (Fig. 4B-C), mitocôndrias (Fig. 4C), membrana nuclear (Fig. 4D), corpos de Golgi (Fig. 4B), inúmeras vesículas e ribossomos dispersos no protoplasto (Fig. 4B). Tais organelas se localizam na porção periférica da célula em função do volume do(s) vacúolo(s).

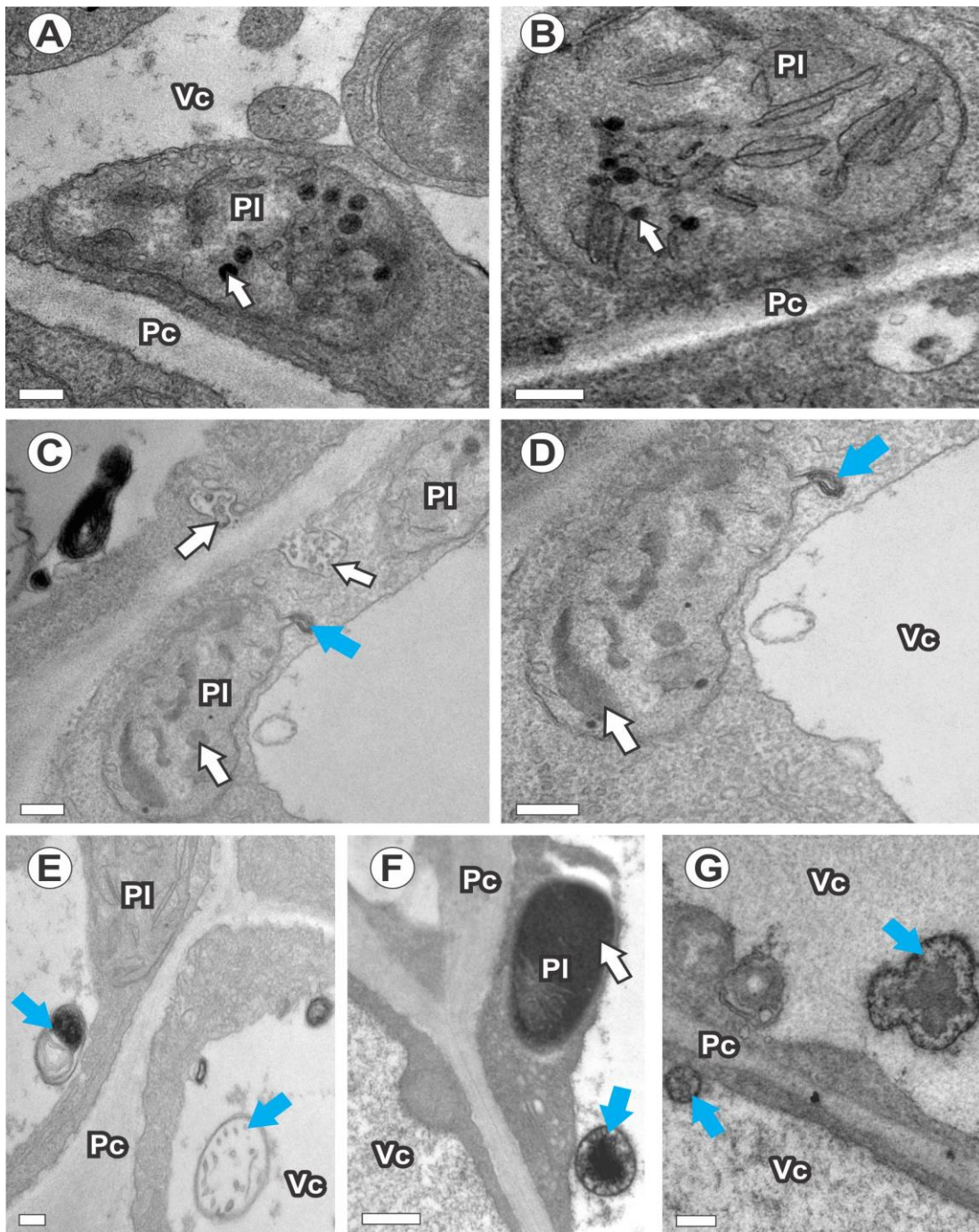
No decorrer da diferenciação das células que formarão as esclereídes, os plastídeos passam à apresentar tilacóides empilhados com deposição intensa de material osmiofílico ou eletrondenso, possivelmente compostos fenólicos (Fig. 4E-F). Observou-se aumento no volume dos tilacóides (Fig. 4F), com a formação de lóculos de diferentes tamanhos entre as pilhas de tilacóides, onde há acumulação de material eletrondenso (Fig. 4G-H). A configuração dos tilacóides no plastídeo se altera (Fig. 5A-C), e o material eletrondenso pode ser secretado através da emissão de vesículas transportadoras (Fig. 5C-D). As vesículas transportadoras, que podem apresentar diferentes formas (Fig. 5E-G), se fundem à membrana plasmática (Fig. 5G).

No processo de esclerificação, ou seja, na formação da parede secundária das esclereídes medulares (que se dá a partir do segundo nó, Fig. 1, região D) a deposição de material eletrondenso amorfo é bastante conspícua (Fig. 6A-C). Do mesmo modo, também é possível observar vesículas próximas à membrana plasmática (Fig. 6A, C). O material depositado atravessa a parede celular, se direciona até o espaço intercelular, onde é acumulado (Fig. 6A, D), em seguida polimerizado, formando assim a fitomelanina (Fig. 6E). Após secretarem o material eletrondenso, os plastídeos se tornam inviáveis, se fundido ao vacúolo, onde serão degradados (Fig. 7A-F).

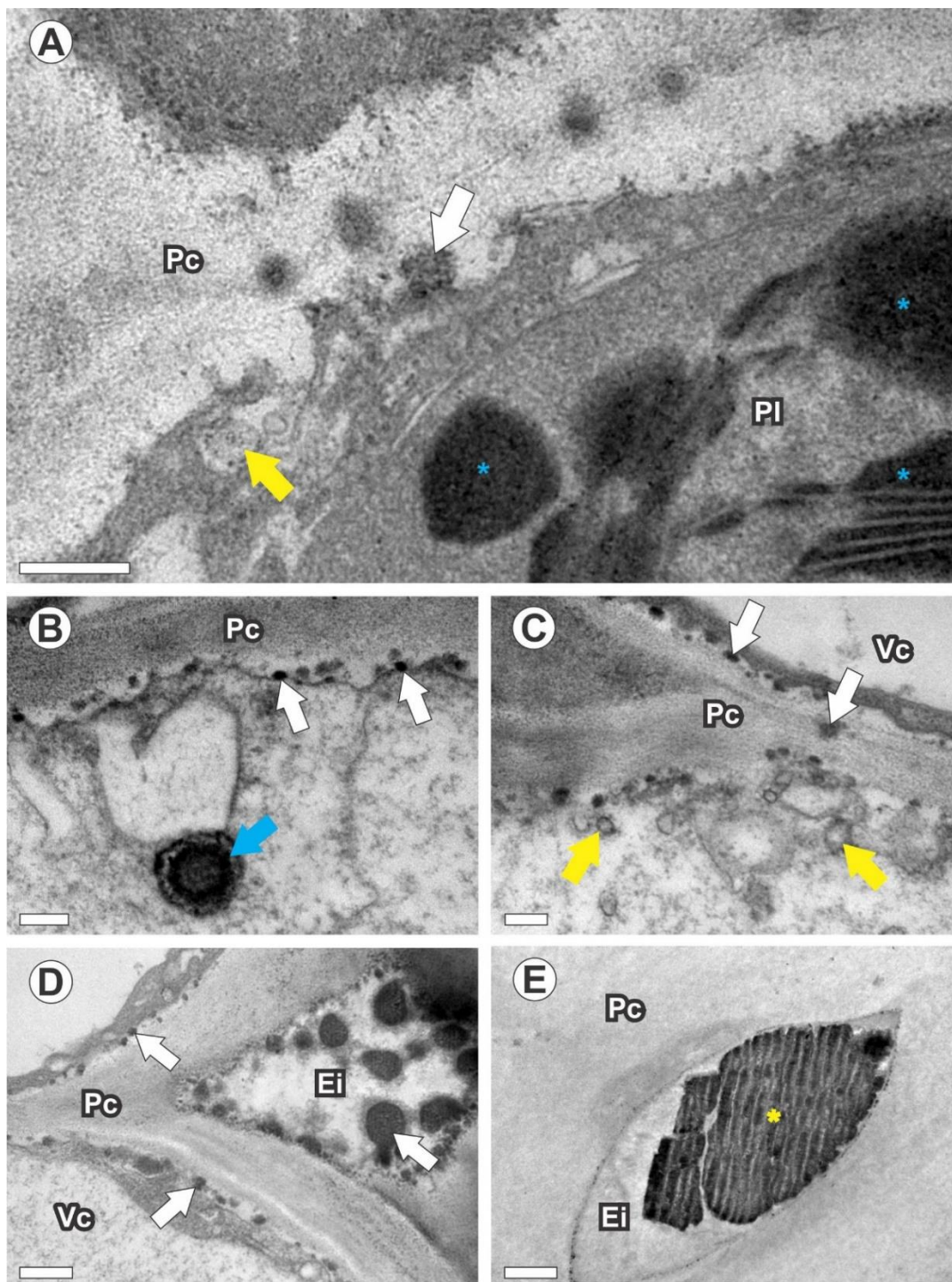
O processo de formação de compostos eletrondensos não é sincrônico, ou seja, plastídeos em diferentes estágios de síntese e secreção podem ser observados na mesma célula (Fig. 7D-E). Nessa fase inúmeros ribossomos livres e retículo endoplasmático rugoso também são visualizados na periferia celular (Fig. 7D-detalle).



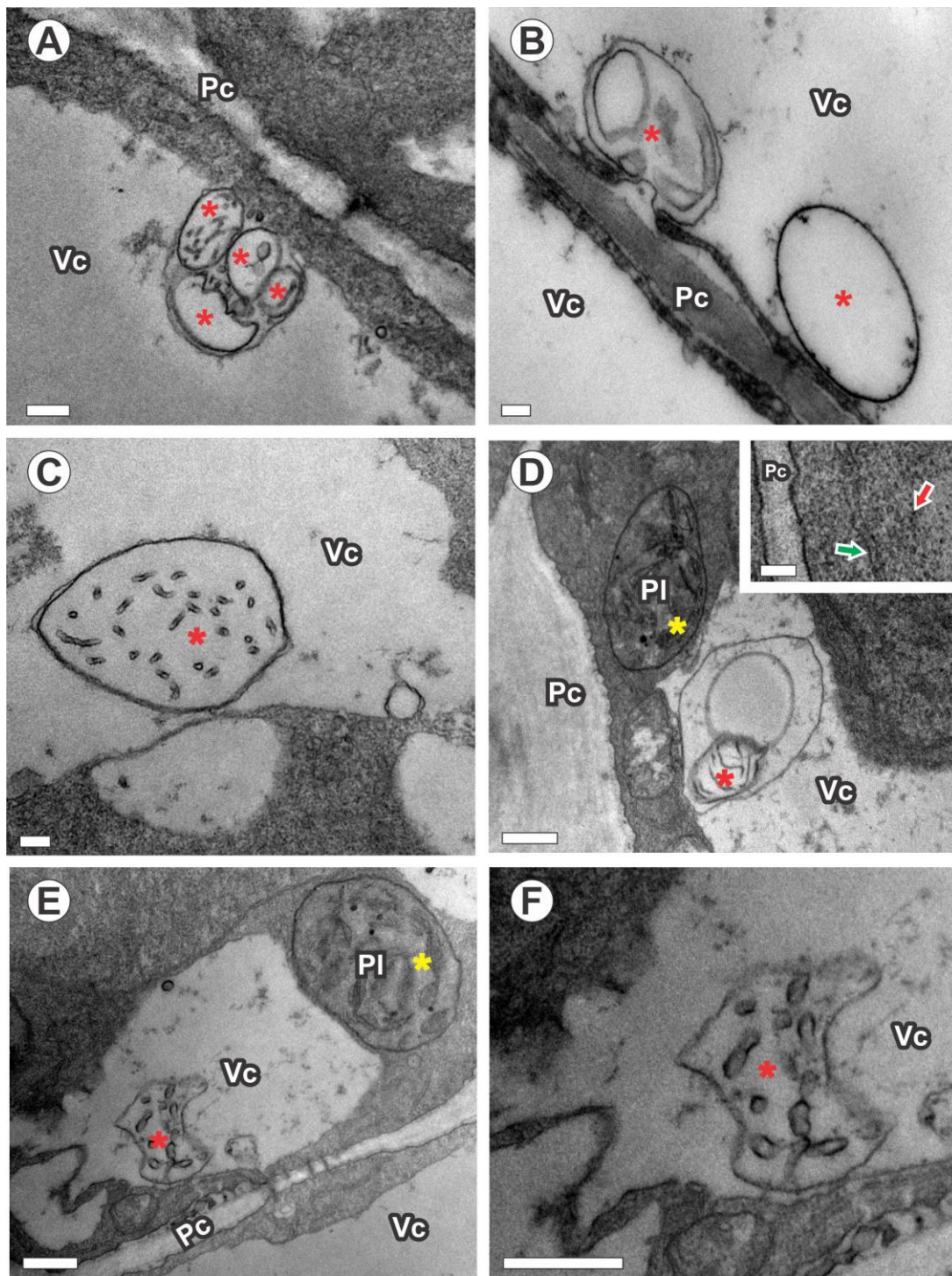
**Fig. 4** – Eletromicrografias de transmissão de células em diferenciação do ápice caulinar de *Piptocarpha axillaris*. A) Vacúolo conspícuo e protoplasto denso. B) Protoplasto denso, mitocôndria (asterisco branco), corpos de Golgi (seta azul), retículo endoplasmático rugoso (seta verde), ribossomos livres (seta vermelha) e vesículas (seta amarela). C) Detalhe das mitocôndrias (asterisco branco); D) Membrana nuclear (seta rosa); E-H) Plastídeos com intensa deposição de material eletrondenso, com lóculos de diferentes tamanhos acumulando material osmiofílico entre os tilacóides (asterisco azul). H) Detalhe da parede celular com deposição de material osmiofílico (seta branca). Ei = espaço intercelular; Pc = parede celular; Pl = plastídeo. Barras de escala = 1 $\mu$ m (E); 0,5 $\mu$ m (A, H); 0,2 $\mu$ m (B-D, F-G).



**Fig. 5** – Eletromicrografias de transmissão de células em diferenciação do ápice caulinar de *Piptocarpha axillaris*. A-C) Diferentes conformações dos tilacóides nos plastídeos. Em A, C-D notar material osmiofílico livre no estroma (seta branca); C-D) Secreção do material eletrondenso através da emissão de vesículas transportadoras (seta azul); E-G) Diferentes formatos de vesículas transportadoras (seta azul); G) Detalhe do transportador (seta azul) se fundindo à membrana plasmática. Pc = parede celular; Pl = plastídeo; Vc = vacúolo; asterisco amarelo = diferentes conformações dos tilacóides nos plastídeos. Barras de escala = 0,5 $\mu$ m (F-G); 0,2 $\mu$ m (A-E).



**Fig. 6** – Eletromicrografias de transmissão de esclereídes em diferenciação na medula caular de *Piptocarpha axillaris*. A-C) Material osmiofílico (seta branca) sendo liberado e transportado através da parede celular; D) Deposição de material osmiofílico na região do espaço intercelular; E) Fitomelanina polimerizada no espaço intercelular. Ei = espaço intercelular; Pc = parede celular; Pl = plastídeo; Vc = vacúolo; asterisco amarelo = fitomelanina polimerizada; asterisco azul = lóculos com deposição de material eletrondenso; seta amarela = vesículas; seta azul = transportador; seta branca = material osmiofílico. Barras de escala = 0,5μm (D-E); 0,2 μm (A-C).



**Fig. 7** – Eletromicrografias de transmissão de células em diferenciação do ápice caulinar de *Piptocarpha axillaris*. A-E) Diferentes estágios de degradação dos plastídeos (asterisco vermelho); em D-E notar a formação de material osmiofílico nos plastídeos (asterisco amarelo); D (detalhe) retículo endoplasmático rugoso (seta verde) e dos ribossomos livres (seta vermelha) na periferia celular; F) detalhe da degradação do plastídeo no vacúolo. Pc = parede celular; PI = plastídeo; Vc = vacúolo. Barras de escala = 0,5mm (E, F); 0,2 mm (A-C); 0,1mm (D-detalle).

### 3.3. Ontogênese de precursores da fitomelanina

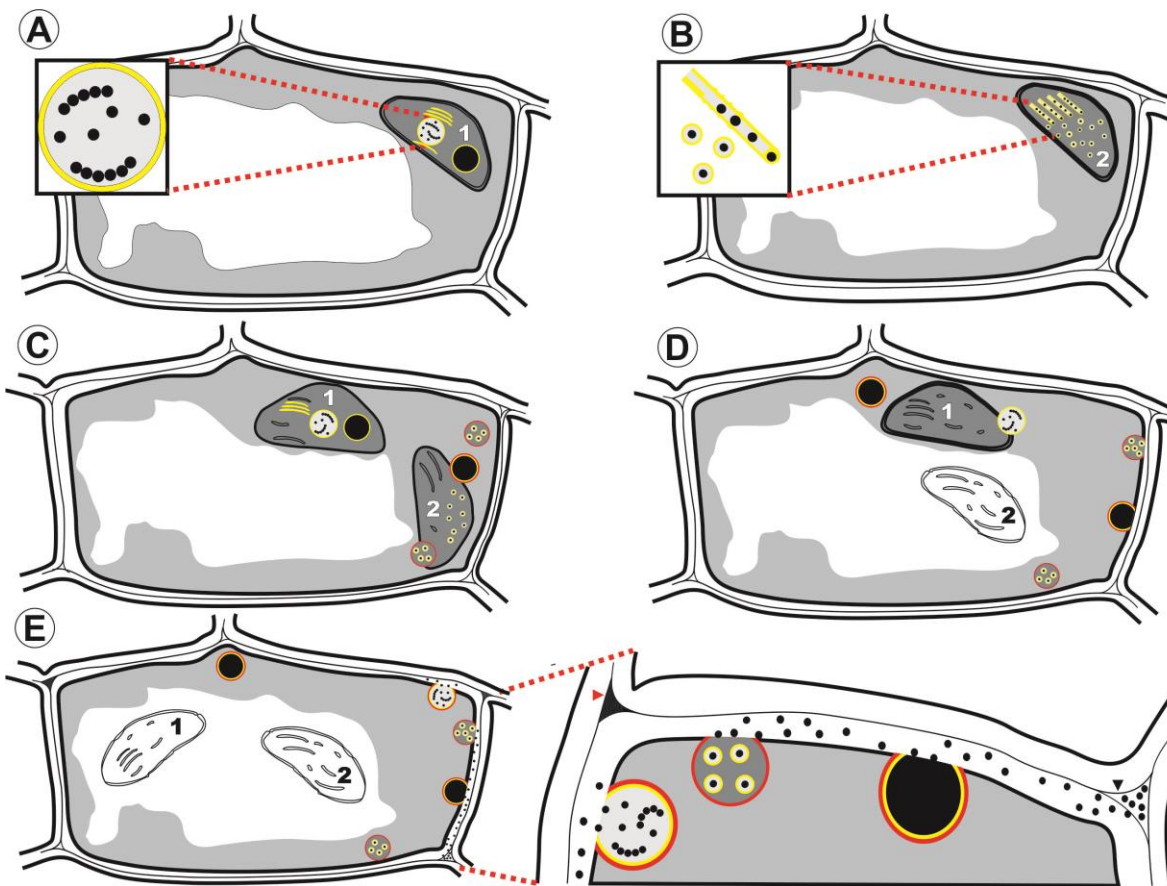
O processo de formação das vesículas contendo material eletrondenso, o modo como são transportados, bem como, que forma assumem esses depósitos na célula, obedecem a dois distintos padrões em *Piptocarpha* (Fig. 8A-E, 9A-F). Tais padrões serão denominados a seguir, tendo como base referencial os estudos realizados por Brillouet *et al.*, (2013), Brillouet (2014, 2015) que descrevem a formação de tanossomos em plastídeos. Nós denominaremos essas organelas como corpos fenólicos, já que seu processo ontogenético se assemelha ao observado para a formação dos tanossomos, descritos pelos autores (Brillouet *et al.*, 2013, Brillouet 2014, 2015) para a formação de taninos, contudo nesse trabalho estão relacionados com a formação e liberação de compostos fenólicos precursores da fitomelanina:

1) Modelo “colar-de-pérolas”:

Inicialmente os tilacóides aumentam de volume e ocorre a formação de um ou mais espaços entre os tilacóides empilhados (Fig. 4G), também chamados de lóculos. Nesses lóculos (Fig. 9A-B) há acúmulo de corpos esféricos osmiofílicos (corpos fenólicos), que são secretados a partir da membrana interna do tilacóide e se mantêm unidos através de um fino cordão osmiofílico, como um colar-de-pérolas (Fig. 8A, 9B). Ao finalizar esse acúmulo, os lóculos estão cheios de corpos fenólicos e envolvidos pela membrana do tilacóide, são segregados do plastídeo por vesículas transportadoras (Fig. 5D-G, 8D, 9C-D). Nessas vesículas, os corpos fenólicos podem se apresentar conectados pelo cordão osmiofílico ou mais densamente acumulados (Fig. 8D, 9C-D). Essas vesículas transportadoras posteriormente se fundem à membrana plasmática e são segregados à célula, como descrito anteriormente (Fig. 6A-D, 8C-E, 8E-detalle).

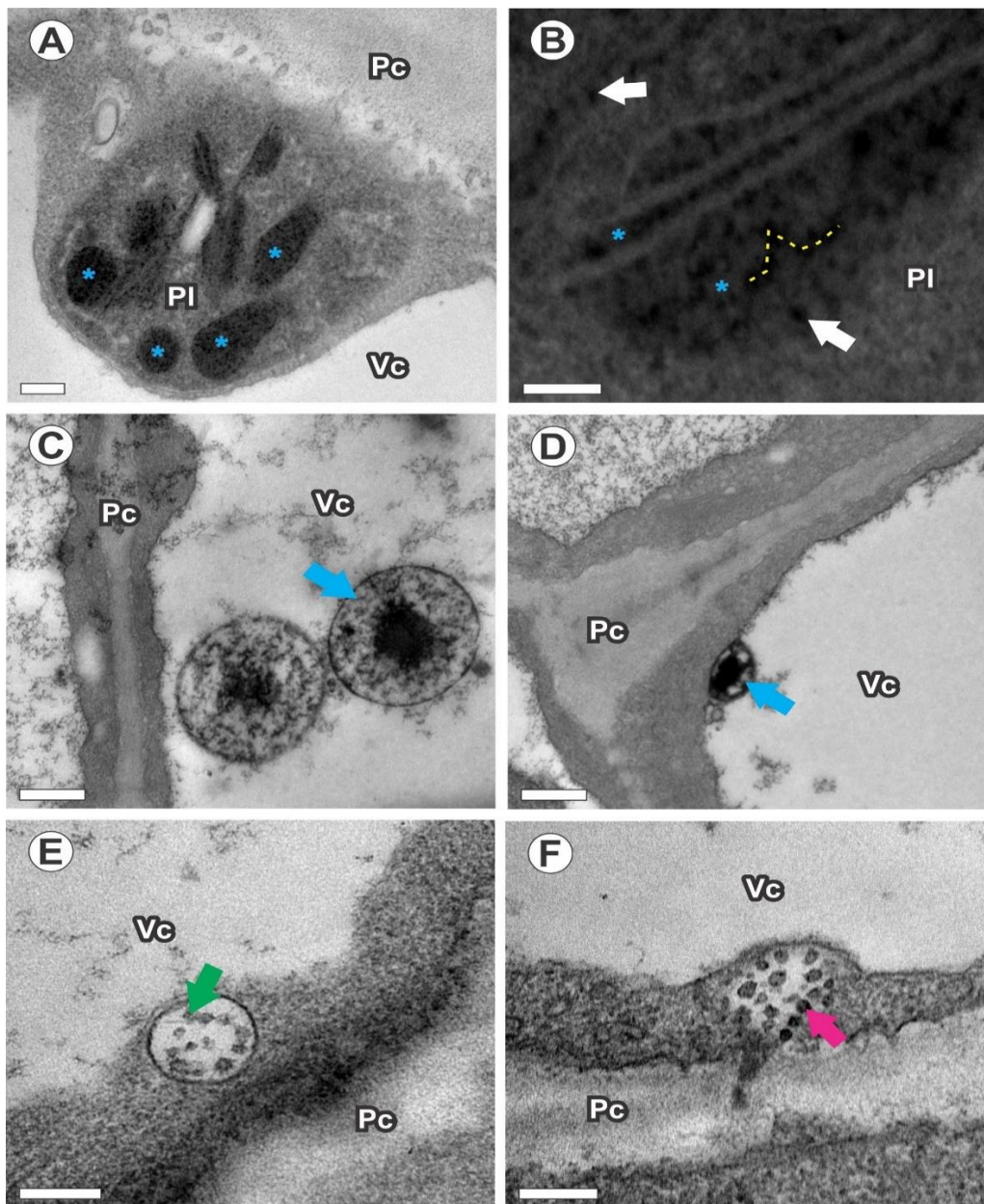
2) Modelo “tanossomo”:

A formação dos corpos fenólicos se dá também através de tilacóides não empilhados que aumentam de volume e produzem corpos esféricos osmiofílicos (corpos fenólicos, (Fig. 5A) semelhantes a “tanossomos”, a partir da membrana interna do tilacóide. No entanto, neste modelo esses corpos fenólicos se mantêm individualizados (Fig. 9A), tanto no plastídeo, quanto no transportador e ainda individualizados, são liberados do transportador na parede celular (Fig. 8D-E, 8E-detalle, 9F).



**Fig. 8-** Formação celular e a liberação de corpos fenólicos precursores da fitomelanina: modelo de formação “colar-de-pérolas” (plastídeo 1) e modelo de formação “tanossomo” (plastídeo 2). A) Acúmulo de corpos esféricos osmiofílicos (círculos pretos) secretados através da membrana interna do tilacóide (em amarelo); em detalhe: esferas osmiofílicas (corpos fenólicos), que se mantêm unidas através de um fino cordão, como um colar-de-pérolas; B) Formação de corpos fenólicos através do aumento de volume dos tilacóides não empilhados; em detalhe: esferas osmiofílicas se mantêm individualizadas, envolvidas por membrana; C) Célula em processo de formação de corpos fenólicos (1) e de liberação dos mesmos a partir do plastídeo através de vesículas transportadoras (2); D) Plastídeo 1 liberando vesículas, plastídeo 2 incluído no vacúolo e vesículas transportadoras se fundindo à membrana plasmática; E) Plastídeos 1 e 2 incluídos no vacúolo e vesículas transportadoras se fundindo à membrana plasmática, liberando os corpos fenólicos; em detalhe: material fenólico atravessando a parede celular e se acumulando no espaço intercellular (cabeça de seta preta), onde ocorre a formação da fitomelanina (cabeça de seta vermelha).





**Fig. 9** – Eletromicrografias de transmissão de células em diferenciação do ápice caulinar de *Piptocarpha axillaris*. A-B) Lóculos de diferentes conformações com acúmulo de material (eletrodens) fenólico (asterisco azul); B) Detalhe da organização dos corpos fenólicos: Notar linha pontilhada que indica a organização como um “colar-de-pérolas”. Seta branca indica os corpos fenólicos individualizados; C-D) Vesículas transportadoras (seta azul); D) Transportador se fundindo à membrana plasmática; E) Vesícula transportadora com material fenólico organizado como no modelo “colar-de-pérolas” (seta verde); F) Vesícula transportadora com material fenólico organizado como no modelo “tanossomo” (seta rosa). Pc = parede celular; PI = plastídeo; Vc = vacúolo; asterisco azul = lóculos com deposição de material eletrodens; seta azul = transportador; seta branca = corpos fenólicos; seta rosa = modelo “tanossomo”; seta verde = modelo “colar-de-pérolas”. Barras de escala = 0,5mm (C, D); 0,2 mm (A, B, E, F).

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização tecidual da distribuição da fitomelanina

No presente estudo, a fitomelanina foi observada nos seguintes tecidos caulinares: parênquima cortical, periciclo, floema primário, floema secundário e medula, diferindo do padrão de deposição descrito por Wittich & Graven (1995, 1998), que relataram a presença de fitomelanina nas células epidérmicas de sementes de *Gasteria verrucosa* (Mill.) Duval (Asparagales). A presença do pigmento foi observada com maior frequência em caules espessados de *P. axillaris*, corroborando os estudos realizados por Lusa *et al.* (2018).

Quando presente, o pigmento está sempre associado às esclereídes e depositado nos espaços intercelulares. Tais resultados corroboram com os dados publicados para ocorrência de fitomelanina em órgãos vegetativos de espécies de Asteraceae, como as investigações realizadas por Mistríková & Vaverková (2007) em raízes de *Echinacea*, Fritz & Saukel (2011) em raízes e rizomas de Cardueae, Upton *et al.* (2011) em raízes e rizomas de Heliantheae e por Lusa *et al.* (2018) em caules e folhas de Lychnophorinae (Asteraceae). No presente estudo verificou-se que a polimerização da fitomelanina nos espaços intercelulares pode ocorrer logo no início ou durante o processo de esclerificação. Com isso, para caules aéreos de Vernoniae pode ser considerado que a presença da fitomelanina está relacionada às esclereídes ou às células parenquimáticas que em seguida se diferenciam em esclereídes, concordando com estudos publicados por Lusa *et al.* (2018).

### 4.2. Origem química da fitomelanina e caracterização subcelular

A natureza química da fitomelanina não é totalmente esclarecida, no entanto já em 1964 Nikolaus afirmava que o pigmento apresenta compostos fenólicos do tipo catecol conjugados, o que foi também relatado por Sava *et al.* (2001) e Asad *et al.* (2017). De acordo com Klabunde *et al.* (1998) as melaninas em plantas são unidades polifenólicas de catecol resultantes de autopolimerização de quinonas altamente reativas, formadas pela oxidação enzimática de o-difenóis (como o ácido cafeico) à o-quinonas, cujo processo visa proteger a planta danificada por patógenos ou insetos, já que, de acordo com Özdemir e Keleş (2018), as fitomelaninas tem alto poder antioxidante. Os compostos fenólicos são substâncias que apresentam um anel aromático, os quais, quando encontrados em tecidos vivos, estão geralmente acumulados nos vacúolos (Roshchina, 1993).

Os compostos fenólicos são de grande importância na constituição da célula, pois fazem parte da estruturação da parede celular, especialmente da parede celular secundária, pois atuam na formação da lignina e da suberina (Roshchina, 1993; Gunning & Steer, 1996; Hutzler, 1998; Beckmann, 2000). Tais compostos são sintetizados nos plastídeos, os quais são os primeiros compartimentos a armazenarem fenóis (Roshchina, 1993), o que é também descrito no presente trabalho. Assim, Pinard & Mizrachi (2018) relatam, por exemplo, a participação dos plastídeos no crescimento secundário de plantas vasculares, onde os plastídeos atuam como precursores de compostos aromáticos presentes na formação da lignina. A

fitomelanina presente em órgãos vegetativos de Asteraceae tem sido observada em espaços intercelulares circunvizinhos a células que passam por processo de esclerificação. Assim, nós sugerimos que os compostos fenólicos envolvidos na formação da parede celular secundária possam também estar relacionados à síntese da fitomelanina no material investigado.

As análises em microscopia eletrônica de transmissão realizadas na presente investigação possibilitaram a observação de grande quantidade relativa de material osmiofílico durante os estágios de diferenciação celular das esclereídes. Levando-se em consideração os estudos que atestam a origem fenólica da fitomelanina, as imagens obtidas foram comparadas com aquelas de trabalhos que relatam a síntese de compostos fenólicos (Brillouet *et al.*, 2013; Brillouet, 2014, 2015) e, a partir disso, consideramos que o material osmiofílico observado se trata de compostos fenólicos agrupados em unidades que denominamos de corpos fenólicos, os quais são liberados pela células esclerificadas ou em esclerificação para o espaço intercelular, onde são polimerizados, formando a fitomelanina. Além disso, Whitich & Graven (1995, 1998) também apontam provável participação de compostos fenólicos na constituição da fitomelanina em seus estudos, relatando a presença de material osmiofílico no retículo endoplasmático rugoso.

Brillouet *et al.* (2013) e Brillouet (2014, 2015) descreveram três modelos de formação de compostos fenólicos do tipo taninos no plastídeo: modelo “colar-de-pérolas”, modelo “caracol” e modelo “tanossomo”. No presente estudo foi possível observar dois dos três modelos sugeridos pelos autores, envolvidos na formação dos corpos fenólicos precursores da fitomelanina: o modelo “tanossomo” e o modelo “colar de pérolas”. No modelo “tanossomo” o volume intratilacoidal do *granum* é limitado e as lamelas não empilhadas incham, gerando sequências de estruturas esféricas livres no estroma (*vide* Figura 5A, 9A-D), que neste trabalho denominamos de corpos fenólicos. Os corpos fenólicos se mantêm individualizados mesmo dentro das vesículas transportadoras (*vide* Figura 9A-D, 10E) e produzem pontos osmiofílicos que podem preencher o seu volume parcial ou totalmente. No modelo “colar de pérolas” formam-se lóculos entre os tilacóides, onde esferas eletrondensas são conectadas através de uma junção osmiofílica tênue (*vide* Figura 8A-D, 10B) e se projetam no *lumen* do lóculo como um “colar-de-pérolas”. Nesse modelo, a polimerização dos corpos fenólicos, assim como dos tanossomos (Brillouet, 2014) é concomitante à formação dos lóculos (*vide* Figura 10A), podendo ocorrer de forma individual, ou seja, em corpos fenólicos separados entre si, ou na estrutura de “colar-de-pérolas” (*vide* Figura 8A-D, 10B). O modelo “caracol” descrito por Brillouet (2014) difere do modelo “tanossomo” apenas porque os tanossomos não estão livres no estroma, mas agregados em forma esférica como em um espiral. Esse modelo não foi observado no presente estudo.

Assim, a formação dos corpos fenólicos descrita anteriormente se assemelha muito ao processo de síntese de taninos relatado por Brillouet *et al.*, (2013) e Brillouet (2014, 2015), especialmente nas fases anteriores à liberação dos corpos fenólicos. No entanto, na formação da fitomelanina o processo de

acúmulo desses corpos fenólicos, ou o seu destino final é distinto ao apresentado para os taninos. Em qualquer um dos três modelos propostos para a ontogênese dos tanossomos, os mesmos são expelidos para fora dos plastídeos em vesículas transportadoras, denominadas pelos autores simplesmente por transportadores (Brillouet, 2014) e se acumulam no vacúolo (Wiermann, 1981; Zhao & Dixon, 2010; Brillouet *et al.*, 2013; Qu *et al.*, 2017). Já na síntese dos corpos fenólicos precursores da fitomelanina, após a liberação dos mesmos no plastídeo, os corpos fenólicos são levados pelas vesículas transportadoras até a membrana plasmática, onde se fundem a ela e liberam o material fenólico que atravessa a parede celular e se acumula no espaço intercelular, onde é polimerizado, formando a fitomelanina. O mecanismo pelo qual ocorre a transposição do material fenólico através da parede celular ainda necessita de maiores investigações.

Além dos inúmeros plastídeos observados nesse estudo, que relacionamos com a síntese de fenóis precursores da fitomelanina, as análises subcelulares realizadas nesse trabalho apontaram a presença de corpos de Golgi, retículo endoplasmático liso (REL), retículo endoplasmático rugoso (RER) e ribossomos livres, os quais possivelmente estão associados à formação de parede celular, assim como à manutenção e, ou ampliação da membrana plasmática e à polimerização da fitomelanina. Na formação da parede celular, os corpos de Golgi têm papel fundamental, pois juntamente com o RER, participam da conformação de glicoproteínas de parede (Driouich *et al.*, 1993; Roshchina, 1993; Beckmann, 2000). Nesse processo, o RER e os ribossomos livres são responsáveis pela síntese de proteínas (inclusive aquelas do complexo celulose-sintase, responsáveis pela síntese de microfibrilas de celulose que participam da formação da parede), enquanto que os corpos de Golgi originam os carboidratos que glicosilam algumas destas proteínas constituintes da parede celular, além de sintetizarem carboidratos de parede não celulósicos, como pectinas e hemiceluloses (Driouich *et al.*, 1993; Roshchina, 1993; Beckmann, 2000). O retículo endoplasmático liso, por sua vez, faz parte da síntese de lipídios (Hepler, 1982; Hepler *et al.*, 1990), possivelmente relacionados à constituição ou manutenção da membrana plasmática. Além da óbvia relação dos compartimentos subcelulares citados com a formação de parede e de membrana, os ribossomos livres e o RER provavelmente estão participando da síntese de enzimas que atuam na polimerização dos compostos fenólicos no espaço intercelular, como as fenol-oxidases relatadas por Plonka & Grabacka (2006) e Solano (2014) resultando na formação da fitomelanina.

Além disso, trabalhos anteriores de investigação subcelular da síntese de fitomelanina em cipselas de Asteraceae (Pandey *et al.*, 1989 e De-Paula *et al.*, 2013) sugerem a participação de carboidratos como precursores do pigmento. Nesse trabalho não observamos evidências dessa participação, contudo encorajamos investigações químicas que desvendem a estrutura complexa da fitomelanina.

Os dados obtidos na presente investigação são inéditos e apresentam um modelo de síntese de fitomelanina distinto daquele até então conhecido e discutido na literatura para a formação de fitomelanina em cipselas de Asteraceae (Pandey *et al.*, 1989 e De-Paula *et al.*, 2013).

## 5. CONCLUSÃO

O desenvolvimento caulinar da espécie *Piptocarpha axillaris* demonstrou que a presença da fitomelanina está associada às esclereídes, sempre ocorrendo nos espaços intercelulares. Também foi possível observar que a polimerização da fitomelanina pode ocorrer no início ou concomitante ao processo de esclerificação e que essa deposição aumenta em caules mais espessados (a partir da diferenciação de outras esclereídes). Em geral, ocorreu uma maior frequência do pigmento no córtex, periciclo, floema primário, floema secundário e medula. Sugere-se que o pigmento está presente mais abundantemente nas regiões mais periféricas do caule e também em seus tecidos condutores provavelmente por questões protetoras (contra predadores, contra os efeitos danosos da dessecação e da alta radiação solar) como citado na literatura para frutos de Asteraceae.

A partir das análises subcelulares pode-se considerar que para caules da espécie *Piptocarpha axillaris* há participação de plastídeos na síntese de material fenólico, principal precursor da fitomelanina. Além disso, há uma provável participação do retículo endoplasmático rugoso e de ribossomos livres na síntese de enzimas que participam do processo de polimerização dos compostos fenólicos.

O presente estudo representa a primeira investigação subcelular relacionada a síntese da fitomelanina em órgãos vegetativos de Asteraceae, agregando informações inéditas a respeito do processo de síntese, liberação de precursores e formação da fitomelanina em órgãos vegetativos. Contudo, apesar dos resultados obtidos, ainda são necessários maiores esclarecimentos sobre a caracterização química desses compostos fenólicos envolvidos com a síntese da fitomelanina. Além disso, o processo de translocação dos precursores de fitomelanina através da parede celular ainda não está totalmente esclarecido, sendo necessárias maiores investigações a esse respeito.

## 6. AGRADECIMENTOS

Somos gratos ao corpo técnico do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) – UFSC, pelo apoio técnico no uso dos equipamentos e pelo auxílio na preparação das amostras. Agradecemos também o corpo técnico Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) - UFSC, pela disponibilidade e apoio técnico. Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através da concessão da bolsa (CAPES-DS de 01/03/2017 a 28/02/2019).

## 7. REFERÊNCIAS

- Asad M, Brahim M, Ziegler-Devin I, Boussetta N, Brosse N. 2017.** Chemical Characterization of Non-saccharidic and Saccharidic Components of Rapessed Hulls and sunflower shells. *Bio Resources* **12**: 3143-3153.
- Baldwin BG. 2009.** Heliantheae alliance. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy T, Bayer R eds. *Systematics, Evolution and Biogeography of the Compositae*. IAPT, 689–711.
- Beard B, Carlson E, Waiss A, Elliger C, Klislewfcz J, Johnson A, Chan B. 1977.** Sunflower resistance to the sunflower moth. *California Agriculture* **31**: 17-19.
- Beckman CH. 2000.** Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology* **57**: 101-110.
- Bremer K. 1995.** Asteraceae: cladistics and classification. *Timber Press* **97**: 176-178.
- Brillouet JM, Romieu C, Schoefs B, Solymosi K, Cheynier V, Fulcrand H, Verdeil JL, Conéjéro G. 2013.** The tannosome is an organelle forming condensed tannins in the chlorophyllous organs of Tracheophyta. *Annals of Botany* **112**: 1003-1014.
- Brillouet JM. 2014.** Plasticity of the tannosome ontogenesis in the Tracheophyta. *Journal of Plant Sciences* **2**: 317-323.
- Brillouet JM. 2015.** On the role of chloroplasts in the polymerization of tannins in tracheophyta: a monograph. *American Journal of Plant Sciences* **6**: 1401.
- Bukatsch F. 1972.** Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* **6**: 255.
- Carlson EC, Knowles PF, Dillb JE. 1972.** Sunflower varietal resistance to sunflower moth larvae. *California agriculture* **26**: 11-13.
- De-paula OC, Marzinek J, Oliveira DMT, Machado SR. 2013.** The role of fibres and the hypodermis in Compositae melanin secretion. *Micron* **44**: 312-316.
- Driouich A, Faye L, Staehelin A. 1993.** The plant Golgi apparatus: a factory for complex polysaccharides and glycoproteins. *Trends in biochemical sciences* **18**: 210-214.
- Feder N, O'Brien TP. 1968.** Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany* **55**: 123-142.
- Freitas FS, Orlando C, De-paula OC, Nakajima JN, Marzinek J. 2015.** Fruits of *Heterocoma* (Vernonieae-Lychnophorinae): taxonomic significance and a new pattern of phytomelanin deposition in Asteraceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **269**: 255-265.
- Fritz E, Saukel J. 2011.** Secretory structures of subterranean organs of some species of the Cardueae and their diagnostic value. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica* **53**: 62–72.
- Funk VA, Susanna A, Stuessy TF, Robinson H. 2009.** Classification of Compositae. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy TF e Bayer RJ eds. *Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae*. International Association for Plant Taxonomy. IAPT, 171-189.
- Griebel C. 1913.** Über das Vorkommen von Phytomelan im Wurzelstock von Inula

Helenium L. Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs und Genußmittel. sowie der Gebrauchsgegenstände. **25**: 555–559.

- Gunning BES, Steer MW. 1996.** *Plant Cell Biology: Structure and Function*. Jones and Bartlett Publishers.
- Hanausek TF. 1907.** Neue Mitteilungen über die sogenannte Kohleschicht der Kompositen. *Wiesner-Festschrift*, 139–150.
- Hepler PK. 1982.** Endoplasmic reticulum in the formation of the cell plate and plasmodesmata. *Protoplasma* **111**: 121-133.
- Hepler PK, Palevitz BA, Lancelle SA, McCauley MM, Lichtschidl L. 1990.** Cortical endoplasmic reticulum in plants. *Journal of Cell Science* **96**: 355-373.
- Heubl GR, Bauer R, Wagner H. 1988.** Morphologische und anatomische Studien an *Echinacea purpurea*, *E. angustifolia*, *E. pallida* und *Parthenium integrifolium*. *Scientia Pharmaceutica* **56**: 145-160.
- Huber H. 1969.** Die Samenmerkmale und Verwandtschaftsverhältnisse der Liliiflorae. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* **8**: 219–538.
- Hutzler P, Fischbach R, Heller W, Jungblut TP, Reuber S, Schmitz R, Veit M, Weissenbo G, Schnitzler JP. 1998.** Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Experimental Botany* **49**: 953-965.
- Jeffrey C. 2009.** Evolution of Compositae flowers. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy TF e Bayer RJ, eds. *Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae*. Sheridan Books, 131-138.
- Johansen D. 1940.** *Plant microtechnique*. New York, McGraw-Hill Book Co. Inc.
- Johnson AL, Beard BH. 1977.** Sunflower Moth Damage and Inheritance of the Phytomelanin Layer in Sunflower Achenes 1. *Crop Science* **17**: 369-372.
- Klabunde T, Eicken C, Sacchetti JC, Krebs B. 1998.** Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural & Molecular Biology* **5**: 1084.
- Keeley SC, Forsman ZH, Chan R. 2007.** A phylogeny of “evil tribe” (Vernonieae: Compositae) reveals Old/New World long distance dispersal: support from separate and combined congruent datasets (trn L-F, ndh F, ITS). *Molecular phylogenetics and Evolution* **44**: 89-103.
- Keeley SC, Robinson H. 2009.** Vernonieae. In: Funk, V.A., Susanna, A., Stuessy, T.F. e Bayer RJ ed. *Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae*. International Association for Plant Taxonomy IAPT, 439-470.
- Kiewnick L. 1964.** Die Phytomelanschicht im Perikarp von *Helianthus annuus* L. als Resistenzschicht gegen *Homoeosoma nebulosella* Hb. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten (Pflanzenpathologie) und Pflanzenschutz*, 294-301.
- Knowles PE. 1978.** Morphology and anatomy. In: Carter JF eds. *Sunflower Science and Technology*, 55–88.

- Kreitner G, Rogers CE. 1981.** Sunflower Seed Midge1: Effects of Larval Infestation on Pericarp Development in Sunflower2. *Annals of the Entomological Society of America*, **74**: 431–435.
- Kubitzki K. 1998.** Flowering Plants. Monocotyledons: Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae). In: Kubitzki K. *The families and Genera of Vascular Plant*. Springer **4**.
- Loeuille, BFP, Nakajima JN, Oliveira DMT, Semir J, Pirani JR. 2013.** Two New Species of *Heterocoma* (Asteraceae: Vernoniae) and a Broadened Concept of the Genus. *Systematic Botany* **38**: 242–252.
- Lusa MG, Loeuille BFP, Appezzato-da-Glória B. 2018.** First record of phytomelanin in aerial vegetative organs and its evolutionary implications in Lychnophorinae (Vernoniae: Asteraceae). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **33**: 18–33.
- Mistriřková I, Vaverková S. 2007.** Morphology and anatomy of *Echinacea purpurea*, *E. angustifolia*, *E. pallida* and *Parthenium integrifolium*. *Biologia, Section Botany* **62**: 2-5.
- Nikolaus RA, Piatelli M, Fattorusso E. 1964.** The structure of melanins and melanogenesis: IV. On some natural melanins. *Tetrahedron* **20**: 1163–1172.
- O` Brien TP. 1966.** Observations on the Fine Structure of the Oat Coleoptile I. The epidermal Cells of the Extreme Apex. *The Biological Laboratories*.
- Özdemir Ö, Keleş Y. 2018.** Extraction, purification, antioxidant properties and stability conditions of phytomelanin pigment on the sunflower seeds. *International Journal of Secondary Metabolite* **5**: 140-148.
- Pandey AK, Lee WW, Sack FD, Stuessy TF. 1989.** Development of the phytomelanin layer in fruits of *Ageratum conyzoides* (Compositae). *American Journal of Botany* **75**: 739–746.
- Pandey AK. 1998.** Development of phytomelanin in fruits of *Tagetes patula* (Asteraceae). *Journal of Indian Botanical Society* **77**: 35 – 38.
- Pandey AK, Dhakal MR. 2001.** Phytomelanin in Compositae. *Current Science* **80**: 933 -940.
- Pandey AK, Stuessy TF, Mathur RR. 2014.** Phytomelanin and Systematics of the Heliantheae Alliance (Compositae). *Plant Diversity and Evolution* **131**: 1-21.
- Panero JL. 2007.** Key to the tribes of the Heliantheae alliance. In: Kadereit, J.W. & Jeffrey, C, eds. *The Families and Genera of Vascular Plants. Flowering Plants. Eudicots. Asterales*. Springer **8**: 391–395.
- Park KIL, Ishikawa N, Morita Y, Choi JD, Hoshino A, Iida S. 2007.** A bHLH regulatory gene in the common morning glory, *Ipomoea purpurea*, controls anthocyanin biosynthesis in flowers, proanthocyanidin and phytomelanin pigmentation in seeds, and seed trichome formation. *The Plant Journal* **49**: 641–654.
- Park KIL. 2012.** A bHLH Protein Partially Controls Proanthocyanidin and Phytomelanin Pigmentation in the Seed Coats of Morning Glory *Ipomoea tricolor*. *Hort. Environ. Biotechnol.* **53**: 304-309.
- Pinard D, Mizrachi E. 2018.** Unsong and understudied: plastids involved in secondary growth. *Current opinion in plant biology* **42**: 30-36.



- Qu, S, Chapman N, Xia Z, Feng M, Feng, S, Wang Z, Liu L. 2017.** Ultramicroscopy reveals a layer of multiply folded membranes around the tannin-accumulating vacuole in honeysuckle petal trichomes. *Micron* **99**: 1-8
- Robinson H. 2009.** An introduction to micro-characters of Compositae. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy TF, Bayer RJ eds. *Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae*. Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy (IAPT), 89-100.
- Reynolds ES. 1963.** The use of lead citrate and high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **17**: 208-212.
- Rocha WS, Lopes RM, Silva DB, Vieira RF, Silva JP, Agostini-Costa TS. 2011.** Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do Cerrado. *Rev. Bras. Frutic* **33**: 1215-1221.
- Rogers CE, Stafford RE, Kreitner GL. 1982.** Phytomelanin development and role in hybrid resistance to *Homoeosoma electellum* (Hulst.) larvae. In: *Proceedings of the 10th International Sunflower Conference*, Surfers Paradise 138–141.
- Rogers CE, Kreitner GL. 1983.** Phytomelanin of Sunflower Achenes: a Mechanism for Pericarp Resistance to Abrasion by Larvae of the Sunflower Moth (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental entomology* **2**: 1-9.
- Roshchina, VV, Roshchina VD. 1993.** The elimination of substances in response to extreme factors. In: Roshchina, VV, Roshchina VD. *The excretory Function of Higher Plants*. Springer-Verlag, 195-198.
- Sakai WS. 1973.** Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. *Stain Technology* **48**: 247-249.
- Sava VM, Yang SM., Hong MY, Yang PC, Huang GS. 2001.** Isolation and characterization of melanic pigments derived from tea and tea polyphenols. *Food Chemistry* **73**: 177-184.
- Upton R, Graff A, Jolliffe G, Laenger R., Williamson E. 2011.** American Herbal Pharmacopoeia. Botanical Pharmacognosy. *Microscopic Characterization of Botanical Medicines*, 363–373 510–512.
- Volet DP. 2017.** *Estudo florístico e taxonômico do gênero Piptocarpha R. Br (Asteraceae: Vernonieae) no estado de São Paulo, Brasil*. Dissertação em taxonomia vegetal, Universidade Estadual de Campinas.
- Watson ML. 1958.** Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *The Journal of Cell Biology* **4**: 475-478.
- Wiermann R, Vieth K. 1983.** Outer pollen wall, an important accumulation site for flavonoids. *Protoplasma* **118**: 230-233.
- Wittich PE, Graven P. 1995.** Histochemical study of the development of the phytomelan layer in the seed coat of *Gasteria verrucosa* (Mill.) H. Duval. *Protoplasma* **187**: 72–78.
- Wittich PE, Graven P. 1998.** Callose deposition and breakdown, followed by phytomelan, synthesis in the seed coat of *Gasteria verrucosa* (Mill.) H. Duval. *Protoplasma* **201**: 221-230.

**Zhao J, Pang Y, Dixon RA. 2010.** The mysteries of proanthocyanidin transport and polymerization. *Plant Physiology* **153**: 437-443.

## **2. DISCUSSÃO GERAL**

No presente estudo, em ambos os capítulos se observou que a presença de fitomelanina se dá nos espaços intercelulares de células esclerificadas (esclereídes) de caules mais desenvolvidos,

concordando com as observações feitas por Lusa *et al.* (2018). No estudo de desenvolvimento caulinar da espécie *Piptocarpha axillaris* (que está apresentado no capítulo dois) observamos que a polimerização da fitomelanina pode ocorrer juntamente ou após a esclerificação das esclereídes e que a presença do pigmento diminui em caules jovens, concordando com os dados publicados por Lusa *et al.* (2018). Nos dois capítulos, a deposição foi observada nos seguintes tecidos caulinares: parênquima cortical, periciclo, floema primário, floema secundário e parênquima medular. Assim como nas demais espécies de Asteraceae que apresentam fitomelanina, as células epidérmicas não apresentaram o pigmento, o que difere da descrição feita por Wittich & Graven (1995, 1998), que relataram a presença do pigmento nas células epidérmicas de sementes de *Gasteria verrucosa* (Mill.) Duval (Asparagales).

No capítulo um as reconstruções dos estados ancestrais da ocorrência de fitomelanina indicaram que o pigmento provavelmente já ocorria no ancestral comum mais recente de Vernonieae. É possível que o pigmento tenha surgido em outras tribos pertencentes à Asteraceae, pois o mesmo foi detectado na região medular da espécie *Moquinia racemosa*, pertencente ao grupo externo à Vernonieae. Esses dados confirmam as considerações feitas por Freitas *et al.* (2015) e por Lusa *et al.* (2018), os quais sugerem que a fitomelanina esteja mais distribuída em Asteraceae do que se tem registros. Com isso, um maior esforço investigativo se faz necessário a fim de esclarecer a distribuição desse pigmento dentro de Asteraceae e também a fim de compreender sua evolução dentro da família.

No capítulo dois, os estudos subcelulares nos levaram a sugerir a participação dos compostos fenólicos como precursores da fitomelanina. Nessa etapa, foi possível identificar uma grande quantidade de material osmiofílico (que chamamos de corpos fenólicos) presente nos plastídeos e sendo secretada até o espaço intercelular. As imagens obtidas foram comparadas às imagens publicadas nos estudos de Brillouet *et al.* (2013) e de Brillouet (2014 e 2015), que relataram a síntese de compostos fenólicos em Tracheophyta. Os autores descreveram três organizações de formação de fenólicos (taninos) nos plastídeos (modelo “colar-de-pérolas”, modelo “caracol” e modelo “tanossomo”). Na síntese dos corpos fenólicos envolvidos na formação da fitomelanina relatados no presente estudo, foram observados dois dos três modelos sugeridos pelos autores: o modelo “tanossomo” e o modelo “colar de pérolas” (descritos no capítulo dois). Além disso, para síntese da fitomelanina sugerimos também a participação de precursores provindos do retículo endoplasmático rugoso e dos ribossomos livres, processo detalhado no capítulo dois. Tais dados são inéditos e trazem uma descrição bastante distinta daquelas já publicadas para a síntese de fitomelanina em cipelas de Asteraceae (Pandey *et al.*, 1989 e De-Paula *et al.*, 2013).

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na presente dissertação, foram investigadas as características morfoanatômicas, subcelulares e evolutivas de indivíduos de espécies pertencentes a tribo Vernonieae (Asteraceae), com o principal

objetivo de compreender quais células e mecanismos celulares estariam envolvidos com a síntese da fitomelanina e como ocorreu a evolução desse pigmento dentro da tribo.

Em Asteraceae, as investigações da fitomelanina comumente estão relacionadas às cipselas, no entanto, estudos recentes apontaram a presença do pigmento em caules aéreos de espécies da subtribo Lychnophorinae e também em seu grupo externo. Com isso, estudos que abrangessem os caules das espécies pertencentes à tribo Vernonieae e analisassem a evolução desse pigmento dentro da tribo se fizeram necessários para preencher essa lacuna de conhecimento. Os estudos do capítulo um apontaram quais espécies representantes das principais linhagens de Vernonieae apresentaram fitomelanina nas diferentes regiões do caule: córtex, periciclo, floema primário/secundário, xilema primário/secundário e medula. Além da distribuição do pigmento nas diferentes regiões do caule, foram feitas reconstruções dos estados ancestrais da ocorrência da fitomelanina na tribo. As reconstruções indicaram que o pigmento possivelmente já ocorria no ancestral comum recente da tribo nas regiões do córtex, floema secundário e medula. A espécie *Moquinia racemosa*, pertencente ao grupo externo, também apresentou fitomelanina na região medular, indicando que o pigmento provavelmente está muito mais distribuído do que se conhece.

Para um melhor entendimento da distribuição da fitomelanina nos diferentes tecidos/regiões do caule e também compreender os mecanismos celulares envolvidos na formação do pigmento, o capítulo dois abrangeu o desenvolvimento caulinar da espécie *Piptocarpha axillaris*. Nessa etapa, foi possível observar que a fitomelanina está presente no córtex, floema primário (raramente) e floema secundário e medula. Pôde-se observar que o pigmento está sempre relacionado às esclereídes e é polimerizado nos espaços intercelulares. A presença do pigmento pode aparecer relacionada às esclereídes de diferentes graus de espessamento, mas ocorre principalmente em esclereídes espessadas. Além disso, no capítulo dois há a descrição da primeira investigação subcelular feita em caules de Asteraceae. Através dessa investigação, pode-se sugerir o envolvimento de compostos fenólicos advindos de plastídeos como principais precursores da fitomelanina nos caules, assim como, a participação do retículo endoplasmático rugoso e de ribossomos livres através da formação de precursores responsáveis pela polimerização do pigmento nos espaços intercelulares de células esclerificadas ou em esclerificação.

#### 4. REFERÊNCIAS GERAIS

**Aroca P, Solano F, Salinas C, Garcia-Borrón JC, Lozano JA. 1992.** “Regulation of the final phase of mammalian melanogenesis. The role of dopachrome tautomerase and the ratio between 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid and 5,6-dihydroxyindole.” *European Journal of Biochemistry* **208**: 155–163.

- Baldwin BG. 2009.** Heliantheae alliance. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy T, Bayer R, eds. *Systematics, Evolution and Biogeography of the Compositae*. IAPT, 689–711.
- Bremer K. 1995.** Asteraceae: cladistics and classification. *Timber Press* **97**: 176-178.
- Brillouet JM, Romieu C, Schoefs B, Solymosi K, Cheynier V, Fulcrand H, Verdeil JL, Conéjéro G. 2013.** The tannosome is an organelle forming condensed tannins in the chlorophyllous organs of Tracheophyta. *Annals of Botany* **112**: 1003-1014.
- Brillouet JM. 2014.** Plasticity of the tannosome ontogenesis in the Tracheophyta. *Journal of Plant Sciences* **2**: 317-323.
- Brillouet JM. 2015.** On the role of chloroplasts in the polymerization of tannins in tracheophyta: a monograph. *American Journal of Plant Sciences* **6**: 1401.
- Calabria LM, Emerenciano VP, Scotti MT, Mabry TJ. 2009.** Secondary chemistry of Compositae. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy TF e Bayer RJ eds. *Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae*. International Association for Plant Taxonomy. IAPT, 171-189.
- Carlson EC, Knowles PF, Dillb JE. 1972.** Sunflower varietal resistance to sunflower moth larvae. *California agriculture* **26**: 11-13.
- Cordero RJ, Casadevall A. 2017.** Functions of fungal melanin beyond virulence. *Fungal Biology Reviews*, **31**: 99-112.
- De Leeuw SM, Janssen S, Simons JW, Lohman PH, Vermeer BJ, Schothorst AA. 1994.** The UV action spectra for the clone-forming ability of cultured human melanocytes and keratinocytes. *Photochemistry and photobiology* **59**: 430-436.
- De-paula OC, Marzinek J, Oliveira DMT, Machado SR. 2013.** The role of fibres and the hypodermis in Compositae melanin secretion. *Micron* **44**: 312-316.
- De Vore ML, Stuessy TF. 1995.** The place and time of origin of the Asteraceae, with additional comments on the Calyceraceae and Goodeniaceae. In: Hind DJN, Jeffrey CE, Pope GV eds. *Advances in Compositae systematics* Kew: Royal Botanic Gardens 23-40.
- Emerenciano VP. 1983** *A evolução de lactonas sesquiterpênicas em Angiospermas*. Dissertação em química orgânica. Universidade de São Paulo.
- Eisenman HC, Casadevall A. 2012.** Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied microbiology and biotechnology* **93**: 931-940.
- Freitas FS, Orlando C, De-paula OC, Nakajima JN, Marzinek J. 2015.** Fruits of *Heterocoma* (Vernonieae-Lychnophorinae): taxonomic significance and a new pattern of phytomelanin deposition in Asteraceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **269**: 255-265.
- Fritz E, Saukel J. 2011.** Secretory structures of subterranean organs of some species of the Cardueae and their diagnostic value. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica* **53**: 62–72.

- Funk VA, Bayer RJ, Keeley S, Chan R, Watson L, Gemeinholzer B, Schilling E, Panero JL, Baldwin BG, Garcia-Jacas NT, Susanna A, Jansen RK. 2005.** Everywhere but Antarctica: using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. In: Friis I, Balslev H. eds. *Plant diversity and complexity patterns – local, regional and global dimensions. Proceedings of an International Symposium*. Biologiske Skrifter **55**: 343-373.
- Funk VA, Susanna A, Stuessy TF, Robinson H. 2009.** Classification of Compositae. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy TF e Bayer RJ, eds. *Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae. International Association for Plant Taxonomy. IAPT*, 171-189.
- Gómez BL, Nosanchuk JD. 2003.** Melanin and fungi. *Current opinion in infectious diseases* **16**: 91-96.
- Goertzen LR, Cannone JJ, Gutell RR, Jansen RK. 2003.** ITS secondary structure derived from comparative analysis: implications for sequence alignment and phylogeny of the Asteraceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**: 216-234.
- Griebel C. 1913.** Über das Vorkommen von Phytomelan im Wurzelstock von Inula Helenium L. *Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs und Genußmittel. sowie der Gebrauchsgegenstände*. **25**: 555–559.
- Hanausek TF. 1907.** Neue Mitteilungen über die sogenannte Kohleschicht der Kompositen. *Wiesner-Festschrift*, 139–150.
- Heubl GR, Bauer R, Wagner H. 1988.** Morphologische und anatomische studien on *Echinacea purpurea*, *E. angustifolia*, *E. pallida* und *Parthenium integrifolium*. *Scientia Pharmaceutica* **56**: 145-160.
- Hill HZ, Weixjiong LI, Xin P, Mitchell DL. 1997.** Melanin: A Two Edged Sword? *Pigment Cell Res* **10**: 158-161.
- Huber H. 1969.** Die Samenmerkmale und Verwandtschaftsverhältnisse der Liliiflorae. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* **8**: 219–538.
- Jansen RK, Palmer JD. 1987.** A chloroplast DNA inversion marks an ancient evolutionary split in the sunflower family (Asteraceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American* **84**: 5818-5822.
- Jeffrey C. 2007.** Introduction with key to tribes. In: Kadereit JW, Jeffrey C eds. *The families and genera of vascular plants*. Springer **8**: 61–87.
- Jeffrey C. 2009.** Evolution of Compositae flowers. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy TF e Bayer RJ, eds. *Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae*. Sheridan Books, 131-138.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2007.** *Plant systematics: a phylogenetic approach* **3**: 508-515.
- Keeley SC, Jansen RK. 1994.** Chloroplast DNA restriction site variation in the Vernonieae (Asteraceae), an initial appraisal of the relationship of New and Old World taxa and the monophyly of Vernonia. *Plant Systematics and Evolution* **193**: 249–265.
- Keeley SC, Forsman ZH, Chan R. 2007.** A phylogeny of “evil tribe” (Vernonieae: Compositae) reveals Old/New World long distance dispersal: support from separate and combined congruent datasets (trn L-F, ndh F, ITS). *Molecular phylogenetics and Evolution* **44**: 89-103.

- Keeley SC, Robinson H. 2009.** Vernoniae. In: Funk, V.A., Susana, A., Stuessy, T.F. e Bayer, R.J. (Ed.). Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae. *International Association for Plant Taxonomy IAPT*, 439-470.
- Kim KJ, Jansen RK, Wallace RS, Michaels HJ, Palmer JD. 1992.** Phylogenetic implications of rbcL sequence variation in the Asteraceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **79**: 428-445.
- Kubitzki K. 1998.** Flowering Plants. Monocotyledons: Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae). In: Kubitzki K. *The families and Genera of Vascular Plant*. Springer **4**.
- Loeuille B. 2014.** *Eremanthus* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro **66**: 4.
- Loeuille B, Semir J, Lohmann LG, Pirani JR. 2015.** A phylogenetic analysis of Lychnophorinae (Asteraceae: Vernoniae) based on molecular and morphological data. *Syst. Bot.* **40**: 299–315.
- Lusa MG, Loeuille BFP, Appezzato-da-Glória B. 2018.** First record of phytomelanin in aerial vegetative organs and its evolutionary implications in Lychnophorinae (Vernoniae: Asteraceae). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **33**: 18–33.
- Mistríková I, Vaverková S. 2007.** Morphology and anatomy of *Echinacea purpurea*, *E. angustifolia*, *E. pallida* and *Parthenium integrifolium*. *Biologia, Section Botany* **62**: 2-5.
- Montefiori DC, Zhou J. 1991.** Selective antiviral activity of synthetic soluble L-tyrosine and L-dopa melanins against human immunodeficiency virus *in vitro*. *Antiviral research* **15**: 11-25.
- Napolitano A, Panzella L, d’Ischia VM. 2013.** “Red hair benzothiazines and benzothiazoles: mutation inspired chemistry in the quest for functionality,” *Accounts of Chemical Research* **46**: 519–528.
- Nicolaus RA, Piatelli M, Fattorusso E. 1964.** The structure of melanins and melanogenesis: IV. On some natural melanins. *Tetrahedron* **20**: 1163–1172.
- Keeley SC, Forsman ZH, Chan R. 2007.** A phylogeny of “evil tribe” (Vernoniae: Compositae) reveals Old/New World long distance dispersal: support from separate and combined congruent datasets (trn L-F, ndh F, ITS). *Molecular phylogenetics and Evolution* **44**: 89-103.
- Keeley SC, Robinson H. 2009.** Vernoniae. In: Funk, V.A., Susana, A., Stuessy, T.F. e Bayer, R.J. (Ed.). Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae. *International Association for Plant Taxonomy IAPT*, 439-470.
- Keles Y, Özdemir Ö. 2018.** Extraction, purification, antioxidant properties and stability conditions of phytomelanin pigment on the sunflower seeds. *International Journal of Secondary Metabolite* **5**: 140-148.
- Kubitzki K. 1998.** Flowering Plants. Monocotyledons: Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae). In: Kubitzki K. *The families and Genera of Vascular Plant*. Springer **4**.
- Keles Y, Özdemir Ö. 2018.** Extraction, purification, antioxidant properties and stability conditions of phytomelanin pigment on the sunflower seeds. *International Journal of Secondary Metabolite* **5**: 140-148.

- Paim S, Linhares LF, Mangrich AS, Martin JP. 1990.** Characterization of fungal melanins and soil humic acids by chemical analysis and infrared spectroscopy. *Biology and Fertility of Soils* **10**: 72-76.
- Pandey AK, Lee WW, Sack FD, Stuessy TF. 1989.** Development of the phytomelanin layer in fruits of *Ageratum conyzoides* (Compositae). *American Journal of Botany* **75**: 739-746.
- Pandey AK, Dhakal MR. 2001.** Phytomelanin in Compositae. *Current Science* **80**: 933-940.
- Pandey AK., Stuessy TF, Mathur RR. 2014.** Phytomelanin and Systematics of the Heliantheae Alliance (Compositae). *Plant Diversity and Evolution* **131**: 1-21.
- Panero JL, Funk VA. 2002.** Toward a phylogenetic subfamilial classification for the Compositae (Asteraceae). *Proceedings of the biological society of Washington* **115**: 909-922.
- Panero JL. 2007.** Key to the tribes of the Heliantheae alliance. In: Kadereit, J.W. & Jeffrey, C. (eds.), *The Families and Genera of Vascular Plants. Flowering Plants. Eudicots. Asterales*. Springer **8**: 391-395.
- Panzella GGL, d' Ischia VM, Napolitano A. 2011.** "Uncovering the structure of human red hair pheomelanin: benzothiazolylthiazinodihydroisoquinolines as key building blocks," *Journal of Natural Products* **74**: 675-682.
- Park KIL, Ishikawa N, Morita Y, Choi JD, Hoshino A, Iida S. 2007.** A bHLH regulatory gene in the common morning glory, *Ipomoea purpurea*, controls anthocyanin biosynthesis in flowers, proanthocyanidin and phytomelanin pigmentation in seeds, and seed trichome formation. *The Plant Journal* **49**: 641-654.
- Park KIL. 2012.** A bHLH Protein Partially Controls Proanthocyanidin and Phytomelanin Pigmentation in the Seed Coats of Morning Glory *Ipomoea tricolor*. *Hort. Environ. Biotechnol.* **53**: 304-309.
- Plonka PM, Grabacka M. 2006.** Melanin synthesis in microorganisms - biotechnological and medical. *Acta Biochimica Polonica* **53**: 429-443.
- Riley PA. 1997.** Melanin. *The international journal of biochemistry & cell biology* **29**: 1235-1239.
- Rogers CE, Stafford RE, Kreitner GL. 1982.** Phytomelanin development and role in hybrid resistance to *Homoeosoma electellum* (Hulst.) larvae. In: *Proceedings of the 10th International Sunflower Conference*, Surfers Paradise 138-141.
- Rogers CE, Kreitner GL. 1983.** Phytomelanin of Sunflower Achenes: a Mechanism for Pericarp Resistance to Abrasion by Larvae of the Sunflower Moth (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental entomology* **2**: 1-9.
- Sava VM, Yang SM, Hong MY, Yang PC, Huang GS. 2001.** Isolation and characterization of melanic pigments derived from tea and tea polyphenols. *Food Chemistry* **73**: 177-184.
- Siniscalchi C, Loeuille B. 2019.** Phylogenomics of chresta and relationships within Vernoniaeae. Artigo no prelo. 2018.
- Solano F. 2014.** Melanins: Skin Pigments and Much More - Types, Structural Models, Biological Functions, and Formation Routes. *New Journal of Science* **2014**: 1-28.



**Wittich PE, Graven P. 1995.** Histochemical study of the development of the phytomelan layer in the seed coat of *Gasteria verrucosa* (Mill.) H. Duval. *Protoplasma* **187**: 72–78.

**Wittich PE, Graven P. 1998.** Callose deposition and breakdown, followed by phytomelan, synthesis in the seed coat of *Gasteria verrucosa* (Mill.) H. Duval. *Protoplasma* **201**: 221-230.