

Anatomia foliar comparativa das cultivares de *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) sensível e tolerante ao ozônio

Andrea Nunes Vaz Pedroso¹ e Edenise Segala Alves^{1,2}

Recebido em 6/12/2006. Aceito em 16/04/2007

RESUMO – (Anatomia foliar comparativa das cultivares de *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) sensível e tolerante ao ozônio). O ozônio troposférico causa necroses foliares em *Nicotiana tabacum*. Cultivares de tabaco são muito utilizadas como bioindicadoras de ozônio, em programas de biomonitoramento da qualidade do ar. Dentre elas destacam-se as cultivares Bel-W3 (sensível) e Bel-B (tolerante). Este estudo teve como objetivo verificar se as duas cultivares apresentam variações na estrutura foliar que possam ajudar a explicar a diferença na sensibilidade ao ozônio que ambas apresentam. Em plantas que cresceram em ambiente isento de poluentes aéreos foram coletadas folhas do terceiro nó e que foram processadas segundo técnicas usuais empregadas em anatomia vegetal. Realizaram-se análises quantitativas e qualitativas dos tecidos foliares. A cultivar Bel-W3, quando comparada à Bel-B, apresentou menor densidade estomática na superfície abaxial e maior espessura do mesofilo. Qualitativamente as células de ambas cultivares mostraram aspecto sadio, com os vacúolos ocupando praticamente todo o volume celular. A cultivar sensível apresentou visivelmente mais espaços intercelulares, câmaras estomáticas maiores e estômatos ligeiramente salientes em ambas superfícies foliares. Tais características, que facilitam a entrada e a difusão dos poluentes na folha, podem explicar, do ponto de vista estrutural, a maior sensibilidade da cultivar Bel-W3.

Palavras-chave: anatomia foliar, ozônio, tabaco Bel-W3, tabaco Bel-B

ABSTRACT – (Comparative leaf anatomy of *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) cultivars sensitive and tolerant to ozone). Tropospheric ozone produces symptoms such as leaf injury in *Nicotiana tabacum*. Tobacco cultivars are often used as ozone indicators in air-quality biomonitoring programs. Bel-W3 (sensitive) and Bel-B (tolerant) cultivars are better known. The aim of this study was to verify if the two cultivars show variation in leaf structure that may help to explain differences in ozone sensitivity. Expanded leaves from plants growing in pollutant-free air were collected, processed according to the usual techniques of plant anatomy, and analyzed quantitatively and qualitatively. The sensitive cultivar showed lower stomatal density on the abaxial leaf surface and thicker mesophyll cells when compared to the tolerant cultivar. Qualitatively speaking, both cultivars had healthy cells with unaltered vacuoles. In the sensitive cultivar, we could see more intercellular spaces, larger substomatal chambers and slightly prominent stomata on both leaf surfaces. From a structural view point, these features explain why cultivar Bel-W3 is more sensitive.

Key words: leaf anatomy, ozone, tobacco Bel-W3, tobacco Bel-B

Introdução

Cultivares de *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) são empregadas em programas de biomonitoramento da qualidade do ar em regiões temperadas (Heggestad & Middleton 1959; Ashmore *et al.* 1978; Langerbatels *et al.* 1991; Krupa *et al.* 1993; Koppel & Sild 1995; Antonielli *et al.* 1997; Klumpp *et al.* 2001; Saitanis *et al.* 2001; Saitanis & Karandinos 2002; Vergé *et al.* 2002). Dentre elas, as mais utilizadas são as cultivares Bel-W3, muito sensível ao ozônio, e a Bel-B, tolerante a esse gás.

De acordo com Heggestad (1991), a origem dessas cultivares de tabaco remonta ao final da década de

1950, quando foram iniciadas pesquisas visando à redução de perdas na cultura do tabaco. As folhas de tabaco costumavam apresentar manchas, naquela época, denominadas de manchas do tempo (“weather fleck”), que foram posteriormente atribuídas ao efeito do ozônio. Desde 1962, a cultivar Bel-W3 vem sendo usada, em muitos países, como indicadora da presença de concentrações fitotóxicas de ozônio e, graças a ela, atualmente, muito se sabe sobre a fitotoxicidade desse gás.

Dentre os muitos estudos que relatam o biomonitoramento do ar com tabaco podem ser citados os trabalhos de Cuny *et al.* (2004), que empregaram as cultivares Bel-W3 e Bel-B no monitoramento de

¹ Instituto de Botânica, C. Postal 3005, 01061-970 São Paulo, SP, Brasil

² Autor para correspondência: ealves@ibot.sp.gov.br

ozônio em área industrial na França; Klumpp *et al.* (2004) que empregaram o tabaco e outras espécies bioindicadores num estudo amplo e abrangente que envolveu doze cidades européias. Muitos exemplos do emprego pontual das duas cultivares na avaliação da qualidade de ar urbano também são encontrados, podendo ser citados, dentre outros, os trabalhos de Stabentheiner *et al.* (2004), desenvolvido na Áustria e o de Zbierska & Karolewicz-Borowiak (2004), desenvolvido na Polônia.

Nas regiões tropicais há muito são sentidos os problemas da poluição do ar, especialmente em cidades do Brasil, Chile, Argentina, Colômbia e Venezuela (Klumpp *et al.* 2000; Domingos *et al.* 2002). Programas de biomonitoramento devem ser incentivados nesses países, uma vez que representam uma alternativa barata, que fornece informações sobre a qualidade do ar em locais que não contam com custosas redes de monitoramento (De Temmerman *et al.* 2004). Nesse contexto, as duas variedades de tabaco são muito úteis, uma vez que há protocolos de exposição e análise de sintomas que permitem a padronização e a comparação dos resultados (VDI 2003).

Os sintomas observados nas cultivares de tabaco são caracterizados por manchas necróticas de coloração acobreada. A cultivar tolerante apresenta a injúria clássica, ou seja, esta aparece apenas na superfície adaxial, enquanto que a cultivar sensível desenvolve a injúria em ambas as superfícies foliares (Heggstad 1991).

Alguns estudos já foram desenvolvidos na tentativa de se explicar a diferença no grau de sensibilidade das cultivares sensível e tolerante do tabaco. Dentre alguns dos parâmetros comparados estão a quantidade de enzimas neutralizadoras de danos oxidativos, a atividade de enzimas relacionadas à defesa contra patógenos, a taxa fotossintética e as trocas gasosas (Langerbartels *et al.* 1991; Pasqualini *et al.* 2002; Schraudner *et al.* 1992; van Buuren *et al.* 2002).

Ainda visando explicar diferenças na sensibilidade ao ozônio das duas cultivares, Saitanis & Karandinos (2002) compararam alguns parâmetros morfométricos, além da densidade estomática, em seis cultivares de tabaco, dentre elas a Bel-W3 e não encontraram variações significativas entre elas.

Nesse contexto, o presente estudo objetiva, com base em parâmetros anatômicos da folha, buscar resultados que possam ajudar a explicar a diferença na sensibilidade ao ozônio das cultivares Bel-W3 e Bel-B do tabaco.

Material e métodos

A produção das cultivares de *Nicotiana tabacum* L. Bel-W3 e Bel-B seguiu o protocolo VDI (1999). As sementes foram depositadas em caixas plásticas contendo substrato Plantimax® e vermiculita fina na proporção de 3:1. Após a germinação, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos apoiados sobre telas de arame galvanizado, dispostas sobre caixas plásticas contendo água de torneira. A irrigação adequada das plantas foi garantida por cordões de náilon previamente inseridos nos vasos, cujas extremidades estavam em contato com as raízes da planta e com a água presente nas caixas. Semanalmente, cada vaso recebeu 100 ml de solução de Hoagland (Epstein 1975).

Dois vasos de cada cultivar, contendo uma planta cada, com cerca de 50 dias de idade e seis folhas, foram mantidos por 14 dias em casa de vegetação, com sistema de filtros que impedem a entrada dos poluentes, e também com temperatura e umidade controladas. Devido ao ar isento de poluentes da casa de vegetação, as folhas das duas cultivares não apresentaram injúrias. Ao término do período foram selecionadas para o estudo as folhas do terceiro nó, contando-se do ápice para a base, que já estavam totalmente expandidas. Estas foram fixadas sob vácuo, em FAA₇₀ (Berlyn & Miksche 1976) e posteriormente armazenadas em álcool 70%.

Foram selecionados fragmentos da região mediana do limbo foliar, que foram diafanizados de acordo com Strittmatter (1973, modificado), outros foram emblocados em polietilenoglicol (Richter 1981, modificado), seccionados em micrótomo rotativo, duplamente corados com azul de astra e safranina 1% aquosos (9:1) (Kraus & Arduin 1997) e montados em resina sintética.

Para classificação morfológica das folhas considerou-se Radford *et al.* (1974).

Para as análises qualitativas e quantitativas dos tecidos foliares foi utilizado microscópio equipado com câmara para captura de imagens e sistema semi-automático de medições, com *software* de análise de imagens Image-Pro Express versão 4.0.1, da Media Cybernetics.

Foram quantificadas as espessuras do parênquima paliádico, do parênquima lacunoso e da lâmina foliar (μm) e, com base nesses valores, estabeleceu-se a porcentagem relativa desses tecidos. Determinou-se, também, a densidade estomática (mm^2), em ambas as superfícies da folha. Análises comparativas entre as

folhas das duas cultivares foram realizadas para detectar variações no aspecto geral das células, como seu formato, presença de variações nas paredes celulares, entre outros parâmetros qualitativos.

Para determinação das diferenças para cada variável quantitativa, aplicou-se intervalo de confiança eliminando assim os *outliers*, logo após aplicou-se o teste-t, para identificação das diferenças entre os tratamentos. Nas análises estatísticas, utilizou-se o *software* Sigma Stat®.

Resultados

As folhas das cultivares Bel-W3 e Bel-B de *Nicotiana tabacum* são simples, alternas, pilosas com tricomas em ambas superfícies, ápice acuminado, base decorrente, margem crenada. As folhas adultas apresentam comprimento médio de 11,3 cm e largura, na região mediana, de 20 cm; seu padrão de nervação é broquidódromo.

As células epidérmicas das superfícies abaxial e adaxial, em vista frontal, apresentam paredes sinuosas, de formato irregular (Fig. 1-4). A folha é anfiestomática com estômatos do tipo anomocítico mais frequentes na superfície abaxial (Tab.1) e mais elevados em relação às demais células epidérmicas (Fig. 5-6). Os tricomas glandulares são multicelulares, unisseriados com porção apical globosa e unicelular (Fig. 1, 3). Em secção transversal, a epiderme é unisseriada, o mesofilo é dorsiventral, com uma camada única de parênquima paliçádico e com quatro a cinco camadas de parênquima lacunoso (Fig. 5-6). O

colênquima é do tipo angular e apresenta, na nervura principal, cerca de três camadas na região adaxial e cinco na região abaxial. O sistema vascular da nervura principal apresenta formato de meia lua, constituído por um feixe bicolateral (Fig. 7-8). Nas nervuras secundárias o feixe é colateral. Na nervura principal o câmbio está presente na face abaxial (Fig. 10-11) e o sistema vascular, delimitado pelo periciclo, é envolvido pela endoderme que apresenta amido (Fig. 9).

Os valores médios da densidade estomática na superfície abaxial foram maiores na cultivar tolerante quando comparada à cultivar sensível (Tab. 1). Entretanto na superfície adaxial, os valores não diferiram estatisticamente entre si (Tab. 1).

Constatou-se que a cultivar sensível apresentou maior espessura dos tecidos parenquimáticos (Tab. 1), porém o número de camadas de parênquima lacunoso não diferiu (Fig. 5-6). A porcentagem relativa do parênquima paliçádico e lacunoso nas duas cultivares encontra-se na Tab. 1.

Qualitativamente, as células que constituem o mesofilo de ambas as cultivares apresentaram aspecto sadio, com vacúolos íntegros, cloroplastos e núcleo visíveis ao microscópio fotônico (Fig. 5-6). Constatou-se uma nítida variação nos espaços intercelulares, sendo que a cultivar sensível apresentou maior quantidade, além de câmaras subestomáticas maiores (Fig. 5-6). Em secção transversal, não foi encontrada variação no aspecto dos elementos de vaso em ambas as cultivares (Fig. 10-11).

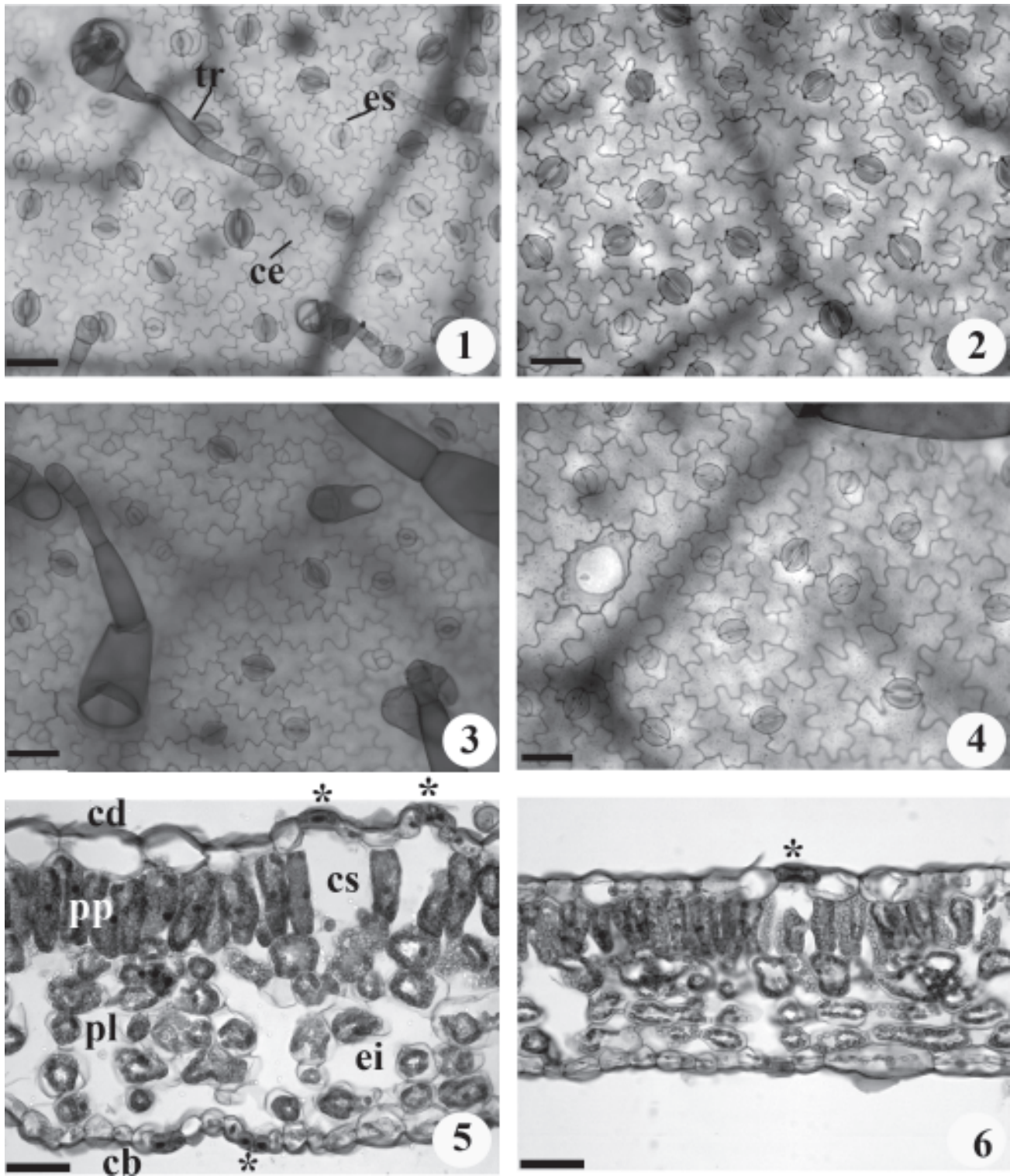
Discussão

O ozônio troposférico é absorvido pelas plantas através dos estômatos (Manning & Feder 1980). Comparando-se a densidade estomática das cultivares de *N. tabacum* sensível e tolerante ao ozônio, observou-se variação apenas na superfície abaxial e a cultivar tolerante mostrou a maior densidade, o que contraria alguns autores que correlacionam positivamente a densidade estomática com a maior sensibilidade de diferentes espécies vegetais ao ozônio (Pääkkönen *et al.* 1996; Evans *et al.* 1996; Pääkkönen *et al.* 1997; Ferdinand *et al.* 2000; Alves *et al.* 2001). Contudo não há consenso, uma vez que outros autores indicam relação inversa (Sharma & Butler 1975; Sharma 1989). Além disso, outros estudos realizados com diferentes cultivares de *N. tabacum* mostram que a densidade estomática não varia acentuadamente entre cultivares sensíveis e tolerantes (Heggstad 1991; Saitanis & Karandinos 2002), o que mostra que esta

Tabela 1. Valores médios de parâmetros anatômicos e porcentagem relativa dos tecidos parenquimáticos em folhas das cultivares de *Nicotiana tabacum* Bel-W3 e Bel-B.

| Parâmetros anatômicos | Bel-W3 (sensível) | Bel-B (tolerante) |
|---|----------------------|----------------------|
| Densidade estomática | | |
| Superfície abaxial (mm ²) | 36 ± 3,5b | 40 ± 3,3a* |
| Superfície adaxial (mm ²) | 23 ± 3,9a | 24 ± 4,0a |
| Espessura do parênquima paliçádico (µm) | 65,4 ± 7,7a | 41,3 ± 5,3b |
| Espessura do parênquima lacunoso (µm) | 98,6 ± 10,6a | 75,5 ± 11,8b |
| Espessura da lâmina foliar (µm) | 202,3 ± 14,1a | 153,3 ± 18,3b |
| % parênquima paliçádico | 39,9 | 35,3 |
| % parênquima lacunoso | 60,1 | 64,7 |

* Letras diferentes, na mesma linha, indicam diferenças estatisticamente significantes (P < 0,001), pelo teste-t.



Figuras 1-6. Fotomicrografias de folhas das cultivares de *Nicotiana tabacum* Bel-W3 (1, 3 e 5) e Bel-B (2, 4 e 6). 1-4. Seções paradermicas. 1-2. Superfície abaxial. 3-4. Superfície adaxial. 5-6. Seções transversais da região mediana (* = estômatos). Barras = 50 μ m. cb = células epidérmicas da face abaxial; cd = células epidérmicas da face adaxial; ce = célula epidérmica; cs = câmara subestomática; ei = espaços intercelulares; es = estômato; pl = parênquima lacunoso; pp = parênquima paliçádico; tr = tricoma.

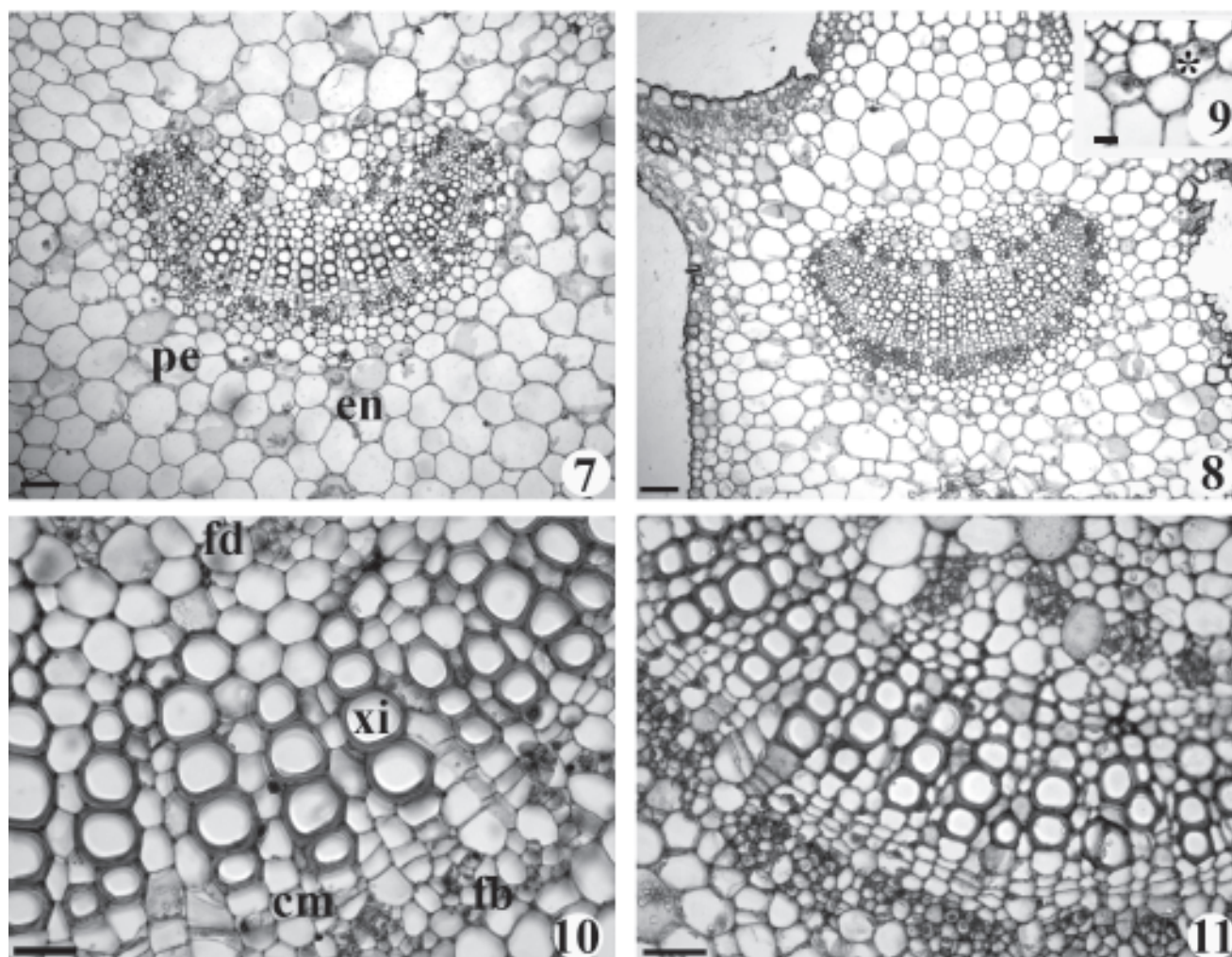
característica não exerce papel fundamental na determinação do grau de sensibilidade das cultivares ao ozônio.

Muitos estudos mostram que a posição dos estômatos tem influência nas trocas gasosas. Estômatos elevados em relação às demais células epidérmicas facilitam a entrada de gases (Willmer & Fricker 1996; Fahn & Cutler 1992). As duas cultivares de *N. tabacum* apresentaram, nas duas superfícies, estômatos elevados em relação às demais células epidérmicas, contudo na cultivar sensível, a elevação foi mais acentuada, o que poderia levar, em parte, a diferença na sensibilidade das duas cultivares, uma vez que estômatos mais elevados facilitariam a entrada do poluente, contudo não se pode atribuir a diferença na

sensibilidade diretamente à tal característica, uma vez que Pasqualini *et al.* (2002) não encontraram diferenças na condutância estomática das duas cultivares, quando expostas ao ozônio.

Vários autores sustentam a hipótese de que outras características estruturais da folha, além dos estômatos, são importantes na determinação da sensibilidade da planta aos poluentes, dentre elas destacam-se as variações na espessura dos tecidos que constituem o mesofilo (Bussotti *et al.* 1995; Evans *et al.* 1996; Gerosa *et al.* 2003).

No presente estudo, a cultivar sensível apresentou maior espessura foliar quando comparada à cultivar tolerante. Na literatura existem informações contraditórias com relação a espessura dos tecidos



Figuras 7-11. Fotomicrografias da nervura principal de folhas das cultivares de *Nicotiana tabacum* Bel-W3 (7 e 10) e Bel-B (8, 9 e 11). 7-8. Visão geral. 9. Amiloplastos na endoderme (*). 10-11. Detalhe dos feixes vasculares. Barras = 100 μ m (7,8); 25 μ m (9); 50 μ m (10,11). cm = câmbio; en = endoderme; fb = floema abaxial; fd = floema adaxial; pe = periciclo; xi = xilema.

foliares e a contaminação do ambiente por poluentes aéreos. Bussotti *et al.* (1995), Gerosa *et al.* (2003) correlacionaram positivamente a espessura foliar com a maior concentração dos poluentes. Entretanto, outros autores encontraram relação inversa, isto é, o aumento na concentração de poluentes provocou a diminuição na espessura foliar (Eleftheriou 1987; Evans *et al.* 1996; Alves *et al.* 2001; Reig-Armiñana *et al.* 2004).

Outros autores já buscaram, com base em avaliações metabólicas, justificar a variação na sensibilidade entre as cultivares Bel-W3 e Bel-B. Pasqualini *et al.* (2002) verificaram que, quando as duas cultivares foram expostas ao ozônio, a cultivar tolerante mostrou maior capacidade de recuperação da fotossíntese e maior eficiência no ciclo do ascorbato, sendo o ácido ascórbico um dos compostos antioxidantes produzidos pelas plantas, que lhes confere proteção contra o ozônio. Ainda com o enfoque metabólico, Langebartels *et al.* (1991) verificaram que a cultivar tolerante apresentou, em relação à cultivar sensível, maior quantidade de poliaminas. De acordo com van Buuren *et al.* (2002), as poliaminas, substâncias neutralizadoras de danos oxidativos, têm várias funções e, dentre elas, a proteção da planta contra agentes abióticos ou bióticos e a proteção da clorofila, preservando a eficiência do processo fotossintético. van Buuren *et al.* (2002) observaram que a cultivar Bel-B, quando submetida ao ozônio, apresentou um rápido aumento em um tipo de poliamina, enquanto que na cultivar Bel-W3 esse aumento somente ocorreu quando as injúrias já estavam sendo formadas.

Com base nos diferentes autores aqui discutidos conclui-se que as defesas bioquímicas e fisiológicas são importantes e podem explicar, pelo menos em parte, a diferença na sensibilidade das duas cultivares ao ozônio. Contudo, os parâmetros estruturais da folha também devem ser considerados, uma vez que a maior quantidade de espaços intercelulares na cultivar sensível implica numa maior facilidade de difusão do ozônio no interior da folha. Esses resultados estão de acordo com Ferdinand *et al.* (2000) que avaliaram a diferença na sensibilidade ao ozônio em dois genótipos de *Prunus serotina* Ehrh. e constataram que o genótipo tolerante apresentou maior compactação do mesófilo. O mesófilo menos compacto observado na cultivar sensível facilitaria a difusão do ozônio no interior da folha, o que implicaria em maior possibilidade de danos às membranas celulares. A densidade estomática nas duas cultivares não mostrou relação direta com o grau de sensibilidade das mesmas.

Agradecimentos

À Dra Marisa Domingos e sua doutoranda Silvia Maria Romano Sant'Anna, pela ajuda e sugestões; ao CNPq, pela concessão de Bolsa de Mestrado à primeira autora e Bolsa de Produtividade à segunda; à FAPESP, pelo apoio logístico.

Referências bibliográficas

- Alves, E.S.; Giusti, P.M.; Domingos, M.; Saldiva, P.H.N.; Guimarães, E.T. & Lobo, D.J.A. 2001. Estudo anatômico foliar do clone híbrido 4430 de *Tradescantia*: alterações decorrentes da poluição aérea urbana. **Revista Brasileira de Botânica** **24**: 567-76.
- Antonielli, M.; Pasqualini, S.; Ederli, L.; Batini, P.; Moscatello, S. & Loreto, F. 1997. Physiological characteristics of tobacco cultivars with contrasting sensitivity to ozone. **Environmental and Experimental Botany** **38**: 271-77.
- Ashmore, M.R.; Bell, J.N.B. & Reily, C.L. 1978. A survey of ozone levels in the British Isles using indicator plants. **Nature** **276**: 813-915.
- Berlyn, G.P. & Miksche, J.P. 1976. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames, The Iowa State College Press.
- Bussotti, F.; Bottacci, A.; Bartolesi, A.; Grossoni, P. & Tani, C. 1995. Morpho-anatomical alterations in leaves collected from beech trees (*Fagus sylvatica* L.) in conditions of natural water stress. **Environmental and Experimental Botany** **35**: 201-13.
- Cuny, D.; Davranche, L.; Van Haluwyn, C.; Plaisance, H.; Caron, B. & Malrieu, V. 2004. Monitoring ozone by using tobacco, automated network and passive samplers in an industrial area in France. Pp: 97-107. In: A. Klumpp; W. Ansel. & G. Klumpp (eds.). **Urban air pollution, bioindication and environmental awareness**. Göttingen, Cuvillier Verlag.
- De Temmerman, L.; Bell, J.N.B.; Garrec, J. P.; Klumpp, A.; Krause, G.H.M. & Tonneijck, A.E.G. 2004. Biomonitoring of air pollutants with plants – considerations for the future. Pp. 337-73. In: A. Klumpp; W. Ansel. & G. Klumpp (eds.). **Urban air pollution, bioindication and environmental awareness**. Göttingen, Cuvillier Verlag.
- Domingos, M.; Bourette, C.; Klumpp, A.; Klumpp, G. & Forti, M.C. 2002. Impactos de poluição atmosférica sobre remanescentes florestais. Pp. 221-49. In: D.C. Bicudo; M.C. Forti & C.E.M. Bicudo (eds.). **Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo**. São Paulo, Editora Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.
- Eleftheriou, E.P. 1987. A comparative study of the leaf anatomy of olive trees growing in the city and the county. **Environmental and Experimental Botany** **27**: 105-111.
- Epstein, E. 1975. **Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas**. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo.

- Evans, L.S.; Adamski II, J.H. & Renfro, J.R. 1996. Relationships between cellular injury, visible injury of leaves, and ozone exposure levels for several dicotyledonous plant species at Great Smoky Mountains National Park. **Environmental and Experimental Botany** **36**: 229-227.
- Fahn, A. & Cutler, D.F. 1992. **Xerophytes**. Berlin, Stuttgart, Gebrüder Borntraeger.
- Ferdinand, J.A.; Fredericksen, T.S.; Kouterick, K.B. & Skelly, J.M. 2000. Leaf morphology and ozone sensitivity of two open pollinated genotypes of black cherry (*Prunus serotina*) seedlings. **Environmental Pollution** **108**: 297-302.
- Gerosa, G.; Marzuoli, R.; Bussotti, F.; Pancrazi, M. & Ballarindenti, A. 2003. Ozone sensitivity of *Fagus sylvatica* and *Fraxinus excelsior* young trees in relation to leaf structure and foliar ozone uptake. **Environmental Pollution** **125**: 91-98.
- Heggestad, H.E. & Middleton, J.T. 1959. Ozone in high concentrations as cause of tobacco leaf injury. **Science** **129**: 208-9.
- Heggestad, H.E. 1991. Origin of Bel-W3, Bel-C and Bel-B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. **Environmental Pollution** **74**: 264-291.
- Klumpp, A.; Domingos, M. & Pignata, M.L. 2000. Air pollution and vegetation damage in South America – State of knowledge and perspectives. Pp: 111-136. In: S.B. Agrawal & M. Agrawal (eds.). **Environmental pollution and plant responses**. Boca Raton, London, New York, Washington DC, Lewis Publishers.
- Klumpp, A.; Ansel, W.; Klumpp, G. & Fomin, A. 2001. Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: a rede européia para avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras (EuroBionet). **Revista Brasileira de Botânica** **24**: 511-18.
- Klumpp, A.; Klumpp, G. & Ansel, W. 2004. Urban air quality in Europe – results of three years of standardized biomonitoring studies. Pp: 25-50. In: A. Klumpp; W. Ansel. & G. Klumpp (eds.). **Urban air pollution, bioindication and environmental awareness**. Göttingen, Cuvillier Verlag.
- Koppel, A. & Sild, E. 1995. Bioindication of ozone in Estonia by using the tobacco variety Bel W3. **Water, Air and Soil Pollution** **85**: 1515-1519.
- Kraus, J.E. & Arduin, M. 1997. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro, Editora Universidade Rural.
- Krupa, S.V.; Manning, W.J. & Nosal, M. 1993. Use of tobacco cultivars as biological indicators of ambient ozone pollution: an analyses of exposure-response relationships. **Environmental Pollution** **81**: 137-146.
- Langerbatels, C.; Kerner, K.; Leonardi, S.; Schraudner, M.; Trost, M.; Heller, W. & Sandermann Jr, H. 1991. Biochemical plant responses to ozone I. Differential induction of polyamine and ethylene biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology** **95**: 882-889.
- Manning, W.J. & Feder, W.A. 1980. **Biomonitoring air pollutants with plants**. London, Applied Science Publishers Ltd.
- Pääkkönen, E.; Metsärinne, S.; Holopainen, T. & Kärenlampi, L. 1996. The ozone sensitivity of birch (*Betula pendula*) in relation to the developmental stage of leaves. **New Phytologist** **132**: 145-54.
- Pääkkönen, E.; Holopainen, T. & Kärenlampi, L. 1997. Differences in growth, leaf senescence and injury, and stomatal density in birch (*Betula pendula* Roth) in relation to ambient levels of ozone in Finland. **Environmental Pollution** **96**: 117-127.
- Pasqualini, S.; Antonielli, M.; Ederli, L.; Piccioni, C. & Loreto, F. 2002. Ozone uptake and its effect on photosynthetic parameters of two tobacco cultivars with contrasting ozone sensitivity. **Plant Physiology Biochemistry** **40**: 599-603.
- Radford, A.E.; Dickinson, W.C.; Massey, J.R. & Bell, C.R. 1974. **Vascular plant systematics**. New York, Harper & Row Publishers.
- Reig-Armiñana, J.; Calatayud, V.; Cerveró, J.; Garcia-Breijo, F.J.; Ibars, A. & Sanz, M.J. 2004. Effects of ozone on the foliar histology of the mastic plant (*Pistacia lentiscus* L.). **Environmental Pollution** **132**: 321-31.
- Richter, H.G. 1981. **Anatomia des sekundären xylems und der Rinde der Lauraceae**. Hamburg, Sonderbande des Natur, Vereins Hamburg 5. Paul Parey.
- Saitanis, C.J.; Riga-Karandinos, A.N. & Karandinos, M.G. 2001. Effects of ozone on chlorophyll and quantum yield of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) varieties. **Chemosphere** **42**: 945-953.
- Saitanis, C.J. & Karandinos, M.G. 2002. Effects of ozone on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) varieties. **Journal of Agronomy & Crop Science** **188**: 51-58.
- Schraudner, M.; Ernst, D.; Langebartels, C. & Sandermann Jr, H. 1992. Biochemical plant responses to ozone. III. Activation of the defense-related proteins β -1,3-glucanase and chitinase in tobacco leaves. **Plant Physiology** **99**: 1321-1328.
- Sharma, G.K. & Butler, J. 1975. Environmental pollution: leaf cuticular patterns in *Trifolium pratense* L. **Annals of Botany** **39**: 1087-1090.
- Sharma, G.K. 1989. **Cuticular and morphological dynamics in *Salix nigra* L. and *Quercus alba* L. in relation to air pollution**. Pp: 527-529. In: Proceedings 14th International Meeting for Specialists in Air Pollution Effects on Forest Ecosystems. Interlaken 1988. Birmensdorf.
- Stabentheiner, E.; Gross, A.; Soja, G. & Grill, D. 2004. Air quality assessment in Graz/Austria using monitoring plants. Pp: 51-57. In: A. Klumpp; W. Ansel & G. Klumpp (eds.). **Urban air pollution, bioindication and environmental awareness**. Göttingen, Cuvillier Verlag.
- Strittmatter, C.G.D. 1973. Nueva tecnica de diafanizacion. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica** **15**: 126-129.
- van Buuren, M.L.; Guidi, L.; Fornalé, S.; Ghetti, F.; Franceschetti, M.; Soldatini, G.F. & Bagni, N. 2002. Ozone-response mechanisms in tobacco: implications of polyamine metabolism. **New Phytologist** **156**: 389-398.

- VDI-Verein Deutscher Ingenieure. 1999. **Biological measuring techniques for the determination and avaluation of effects of air pollutants on plants. Fundamentals and aims. VDI 3957/1. VDI/DIN.** Berlin, Handbtch Reinhaltung der Luft Beuth.
- VDI - Verein Deutscher Ingenieure. 2003. **Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants (bioindication). Determination and evaluation of the phytotoxic effects of photooxidants. Method of the standardized tobacco exposure. VDI 3957/6. VDI/DIN.** Berlin, Handbuch Reinhaltung der Luft Beuth.
- Vergé, X.; Chapuis, A. & Delpoux, M. 2002. Bioindicator reliability: the example of Bel W3 tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Environmental Pollution 118:** 337-49.
- Willmer, C. & Fricker, M. 1996. **Stomata.** London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, Chapman & Hall.
- Zbierska, J. & Karolewicz-Borowiak, K. 2004. Initial recognition of the reaction of tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.) to tropospheric ozone in an urban area (Poznań, Poland). Pp: 329-336. In: A. Klumpp; W. Ansel & G. Klumpp (eds.). **Urban air pollution, bioindication and environmental awareness.** Göttingen, Cuvillier Verlag.