

DENISELE NEUZA ALINE FLORES BORGES

ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS DURANTE A FORMAÇÃO DO AERÊNQUIMA EM  
RAÍZES DE *PISTIA STRATIOTES* L. (ARACEAE)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, da Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Botânica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleusa Bona  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alexandra Antunes Mastroberti

Curitiba  
2014

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Borges, Denisele Neuza Aline Flores

Alterações citológicas durante a formação do aerênquima em raízes de  
*Pistia stratiotes* L. (Araceae). / Denisele Neuza Aline Flores Borges. –  
Curitiba, 2013.

57 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Cleusa Bona

Co-orientadora: Alexandra Antunes Mastroberti

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

1. Aracea 2. Raízes (Botânica) 3. Imunocitoquímica I. Título II. Bona,  
Cleusa III. Mastroberti, Alexandra Antunes IV. Universidade Federal do  
Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em  
Botânica.

CDD (20. ed.) 584.64



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Botânica



**"ALTERAÇÕES CITOLOGICAS DURANTE A  
FORMAÇÃO DO AERÊNQUIMA NAS RAÍZES DE *PISTIA  
STRATIOTES L. (ARACEAE)*"**

por

**DENISELE NEUZA ALINE FLORES BORGES**

Dissertação aprovada como requisito parcial  
para obtenção do grau de Mestre no Programa  
de Pós-Graduação em Botânica, pela Comissão  
formada pelos Professores

Profª Drª Cleusa Bona (UFPR)- PRESIDENTE

Dra. Edna Scremin Dias (UFMS)

Dr. Marcos Silveira Buckeridge (USP)

Curitiba, 28 de fevereiro de 2014.

Aos meus pais, *Joel e Neuza*, por sempre acreditarem nos meus sonhos, dedico.

## AGRADECIMENTOS

À *Cleusa Bona*, por ter me acolhido, acreditado que eu seria capaz e ter se disposto a trabalhar comigo sem ao menos me conhecer. Obrigada pela orientação, ensinamentos, ajudas nas coletas, críticas, acalentos, incentivos e amizade.

À *Alexandra Mastroberti*, pela co-orientação, confiança, ensinamentos, incentivos de vida profissional e por todas as sugestões.

Ao *Nilson*, técnico do Laboratório de Botânica Estrutural, pelas maiores e menores ajudas, por todas discussões botânicas ou sobrenaturais, pela torcida para que tudo sempre desse certo, pela amizade. Se fosse possível eu faria os agradecimentos com letras de ouro, como prometi.

À *Erika Amano*, pelas incontáveis conversas, auxílios e empréstimos que seriam impossíveis descrever aqui. Pelas sugestões feitas na banca de projeto e na correção do relatório de doze meses.

À *Barbara Moura*, pelo auxílio em algumas técnicas de MET.

À *Maria Cecília Moço*, por contribuições com técnicas e pelas sugestões no relatório de dezoito meses.

À *Lucimara Mach*, por se colocar sempre à disposição para me auxiliar e pela correção e sugestões feitas no relatório de dezoito meses.

Ao *Edvaldo Trindade*, pelo empréstimo de material para MET.

Ao *Ciro Ribeiro*, por permitir o uso do ultramicrotomo do departamento de Biologia Celular durante um feriado e pelas sugestões dadas para o manuseio do equipamento.

À *Tabata, Jule* e ao *Sr. Carlos Roberto*, por me ajudarem em algumas coletas e à *Amanda* pela ajuda na limpeza das plantas.

À *Poliana Cardoso*, pelos empréstimos, pela tradução do resumo, milhares de incentivos, conversas científicas e outras nem tanto, pela certeza de que tenho sempre alguém com quem contar, por ser uma grande amiga.

À *Dalvana Pedroso*, pelo desenho em grafite desse trabalho.

Às IC's *Jéssica, Tabata e Bruna* por toda e qualquer ajuda no laboratório.

Ao *Centro de Microscopia Eletrônica* da UFPR por ceder espaço e equipamentos para a preparação e análise de amostras.

Ao *Laboratório de Filogenia e Genética da Conservação de Plantas* da UFPR por ceder material e a *Mônica Bolson* pela ajuda no manuseio.

Ao *Laboratório E2* do Departamento de Bioquímica da UFPR por permitir o uso de materiais.

Ao *Laboratório de Anatomia Vegetal* da UFRGS por me receber, ceder espaço, equipamentos e materiais e, à todos os seus membros por me fazerem sentir em casa.

À *Casa dos Estudantes das Faculdades de Agronomia e Veterinária (CEFAV)* por me abrigar em Porto Alegre e aos amigos que conheci lá: *Mohamad, Fatiane, Vicky e Vicente*, por me apresentarem a cidade e fazerem meu tempo livre menos solitário.

À *CAPES*, pela bolsa de mestrado e ao *CNPQ*, pelo financiamento de projeto (Projeto 14/2012, processo 481713/2012-3).

Aos amigos *Sheila, Rodrigo e João Luís*, por todo companheirismo, auxílios, discussões científicas dos mais diversos assuntos, conversas sem sentido algum, companhias nos almoços e em muitos finais de semana.

À *Dalvana, José Alfredo, Isadora e Ana*, por dividirem comigo um lar, noites e finais de semana e por terem se tornado amigos queridos nessa convivência diária.

Por fim, mas não menos importante, aos meus pais, *Joel e Neuza*; meus irmãos, *Ederlan e Elvandro*; minhas cunhadas, *Rayane e Cinthia*; e aos pequenos mais amados desse mundo: *Thallyta, Vitor, Ingrid e Iago*, meus sobrinhos, agradeço por sempre respeitarem minhas escolhas, mesmo que elas impliquem que eu quase não conviva com vocês fisicamente e não esteja presente na maioria dos nossos momentos de família.

Muito obrigada!

## RESUMO

Os conceitos de esquizogenia e lisigenia, utilizados para descrever a origem do aerênquima em raízes de angiospermas, tem sido insuficientes para classificar os diversos padrões de aerênquima. A incongruência de informações na literatura evidencia a necessidade de estudos mais amplos que possam auxiliar na classificação dos padrões e no entendimento de sua funcionalidade. O objetivo deste trabalho foi analisar o aerênquima das raízes de *Pistia stratiotes* L., a fim de esclarecer sua origem e estrutura das células envolvidas na formação das cavidades. Para microscopia de luz, as raízes foram fixadas com solução Karnovsky, incluídas em resina hidroxietilmetacrilato e coradas com azul de toluidina. Para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e imunocitoquímica, as amostras foram fixadas com uma solução de glutaraldeído 1%, formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio, pós-fixadas com tetróxido de ósmio e incluídas em resina LRWhite®. Para MET, as grades com secções (60nm) foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. Para imunocitoquímica, as secções (500nm) foram submetidas as incubações com anticorpos monoclonais para detecção de diferentes glicanos de parede celular. O córtex externo é parenquimático e oriundo da camada subjacente à protoderme. O aerênquima na raiz de *P. stratiotes* é formado na região interna do córtex a partir de divisões periclinais da pró-endoderme. As lacunas de ar são formadas pela separação, divisão e distensão das células dispostas radialmente no córtex interno. As células formadoras do aerênquima apresentam parede, tonoplasto, núcleo e organelas com aparência normal. Os compostos pécticos e hemicelulósicos analisados provavelmente não tem uma ligação direta com a separação celular. O aerênquima das raízes de *P. stratiotes* é esquizógeno do tipo radial.

Palavras-chave: ontogênese, imunocitoquímica, alface d'água, aerênquima esquizógeno.

## ABSTRACT

The concepts of schizogeny and lysogeny used to describe the origin of aerenchyma in roots of angiosperms have been insufficient to categorize the several aerenchyma patterns. The inconsistency of data in the literature highlights the need for further studies that can assist in the classification of patterns and understanding of its functionality. The objective this study is to analyze the aerenchyma in roots of *Pistia stratiotes* L. (Araceae) to describe their origin and structure of the cells involved in the formation of cavities. For anatomical aspects, roots were fixed in Karnovsky solution, embedded in methacrylate resin and stained with toluidine blue. For ultrastructural and immunocytochemistry studies, samples were fixed in a 1 % glutaraldehyde and 4% formaldehyde in sodium phosphate buffer solution, post-fixed with osmium tetroxide and embedded in resin LRWhite. Grids were counterstained with uranyl acetate and lead citrate. Immunocytochemical sections (500nm) were subjected to incubation with monoclonal antibodies to the detection of cell wall glycans. The outer cortex of the root is parenchymatous and derived from the underlying layer protoderm. The periclinal divisions of the proendoderm originate the aerenchyma in the inner region of the cortex. These air spaces develop through the separation, division and distension of cortical cells arranged radially in the inner cortex. Cells of the aerenchyma show tonoplast, nucleus and organelles with normal appearance. The pectic and hemicellulosic compounds analyzed seem not to be directly involved with the cell separation. The aerenchyma of roots of *P. stratiotes* is schizogenous the radial type.

Keywords: ontogeny, immunocytochemistry, water lettuce, schizogenous aerenchyma.



## LISTA DE FIGURA

FIGURA 1: Classificação de aerênquima proposta por Seago *et al.* (2005) incluindo os tipos expansígenos onde: (A) Expansígeno favo de mel, (B) Expansígeno radial, (C) Esquizógeno, (D) Esquizo-lisígeno, (E) Lisígeno em pacotes, (F) Lisígeno radial, (G) Lisígeno tangencial. A cor azul representa os espaços intercelulares e lacunas. (Retirado de SEAGO *et al.*, 2005) 18

FIGURA 2: Comparação das classificações de Justin & Armstrong (1987), Jung *et al.* (2008) e Seago *et al.* (2005) para aerênquima em raízes. Justin & Armstrong (1987) propuseram três principais tipos, subdivididos em 14 categorias. Jung *et al.* (2008) propuseram 5 tipos de aerênquima para raízes e Seago *et al.* (2005) propuseram a inclusão do novo tipo expansígeno. (Retirado de Jung *et al.*, 2008)..... 19

FIGURA 3: Estrutura primária da parede celular onde as microfibrilas de celulose são representadas pelas hastes roxas. As hemiceluloses estão representadas do lado esquerdo da figura sem a presença de pectinas, para melhor compreensão, os xiloglucanos são representadas por hastes azuis. As pectinas estão representadas do lado direito da figura pelos dois principais polissacarídeos ramnogalacturonanos (haste laranja) e homogalacturonanos (haste vermelha). (Retirado de COSGROVE, 2005)..... 20

FIGURA 4: Estrutura geral de pectina. Os ácidos galacturônicos representam a cadeia principal em amarelo. É possível observar a estrutura das cadeias laterais formando ramnogalacturonanos I na direita da figura, xilogalacturonanos em azul marinho, homogalacturonanos metil-esterificados no centro e ramnogalacturonanos II na parte esquerda da figura. (Retirado de HARHOLT *et al.*, 2010)..... 21

FIGURA 5: Alterações celulares visualizadas em microscopia eletrônica de transmissão na raiz de milho. A e B. Membranas plasmáticas apresentam invaginações e presença de vesículas entre a parede celular e a membrana plasmática. C. Vacúolo com consistência granular e tonoplasto corado. Barra de escala A= 200nm; B e C= 1 µm. (Adaptado de GUNAWARDENA *et al.*, 2001a). ..... 22

Figura 6: Caracterização morfológica de *Pistia stratiotes*. A. Desenho esquemático evidenciando as raízes fasciculadas (Confeccionado por Dalvana Pedroso). B e C. Aspecto dos espécimes floridos. D Coleta dos espécimes de *P. stratiotes*. E. Local de coleta. (Barra de escala A, B, D e E = 1 cm e C= 0,5cm)..... 25

FIGURA 7: Especificidade dos anticorpos LM5 e LM6 na molécula de pectina. (Retirado de KNOX, 2003)..... 30

FIGURA 8: Representação da especificidade do anticorpo LM15, onde as estrelas representam cadeias laterais de xilose. (Adaptado de BURTON *et al.* 2010). ..... 30

FIGURA 9: Especificidade dos anticorpos LM19 e LM20 na molécula de pectina. (Adaptado de KNOX, 2003). ..... 30

FIGURA 10: Ápice da raiz de *Pistia stratiotes* L.. A. Corte longitudinal com columela (co) e coifa (cf). B, C. Meristema apical em corte longitudinal evidenciando o procâmbio (pc), as

iniciais da coifa e protoderme (\*), as iniciais columelares (seta preta) e o córtex (cx). D. Corte transversal com córtex evidenciando duas regiões distintas: córtex externo (cxe) e interno (cxi), proendoderme (\*) e iniciais da protoderme e coifa (seta preta). E. Células da coifa com compostos fenólicos (conteúdo preto) em microscopia eletrônica de transmissão. (Barra de escala: A= 200µm; B, C E D= 20µm; E= 5µm)..... 34

FIGURA 11: Desenvolvimento do córtex da raiz de *Pistia stratiotes* em secções transversais. A. Estádio inicial da organização das células formadoras do aerênquima (cxi), com início da distinção do córtex externo (cxe) e interno (cxi), protoderme (pd), proendoderme (\*) em divisão em procâmbio (pc). B. vista geral evidenciando o início da formação das lacunas. C, D, E. Evidências das divisões anticliniais (seta branca) dos septos (se) dando origem a novas lacunas (la), proendoderme (\*) em divisão. F. Aspecto final do aerênquima na raiz de *P. stratiotes*, com idioblastos com ráfides (setas). (Barra de escala: A= 20µm; B= 50µm; C, D e E= 100µm; F= 20 µm) ..... 36

Figura 12: Secções transversais da raiz de *Pistia stratiotes* L. em microscopia eletrônica de transmissão. A. Parede celular (pa) e membrana plasmática (mp) no estágio 1. B. Parede celular (pa), membrana plasmática (mp) e presença de organelas e vacúolo (V) no estágio 2. C. Parede celular (pa) e membrana plasmática (mp) no estágio 3, observar citoplasma com organelas junto às paredes. D. Vista geral do córtex interno com septos do aerênquima em separação (seta). Observar a presença de núcleo (N), vacúolos (V) e organelas com aparência normal. E. Detalhe da figura D mostrando a separação celular nas paredes anticliniais (seta). F. Citoplasma de uma célula do septo completamente desenvolvida com membrana plasmática (mp), mitocôndria (mi), plastídio (pl) e tonoplasto (to). (Barra de escala: A, B e C= 1µm; D= 5 µm; E= 2µm; F= 500nm)..... 38

FIGURA 13: Secções transversais da raiz de *Pistia stratiotes*. A, B, C. Estádios 1, 2 e 3 do desenvolvimento do aerênquima visualizado em microscopia de luz coradas com azul de toluidina. D, E, F. Secções incubadas com LM5,  $Na_2CO_3$  e pectato liase para detecção de galactanos. Secção D tratada com calco flúor para localização espacial das marcações no órgão. G, H, I. Secções incubadas com LM6,  $Na_2CO_3$  e pectato liase com ausência de arabinanos em todos os estádio de desenvolvimento..... 42

FIGURA 14: Secções transversais da raiz de *Pistia stratiotes*. Excitação em azul com utilização do calco flúor para localização espacial dos tecidos. A, B, C. Secções incubadas com LM15,  $Na_2CO_3$  e pectato liase para detecção de xiloglucanos. D, E, F. Secções incubadas com LM19 para detecção de homogalacturanos de baixa metil-esterificação. G, H, I. Tratamento enzimático de carbonato de sódio e pectato liase antes da incubação com LM19. J, K, L. Secções tratadas com LM20 para detecção de homogalacturanos de alta metil-esterificação. M, N, O. Tratamento enzimático para LM20..... 44

## LISTA DE TABELA

TABELA 1: Anticorpos monoclonais e suas especificidades, seguido dos autores, utilizados neste trabalho.....29

TABELA 2: Abundância de polímeros pécicos e hemicelulósicos nas células formadoras de aerênquima da raiz de *Pistia stratiotes*. (LM5: galactanos; LM6: arabinanos; LM15: xiloglucanos; LM19: homogalacturonanos de baixa metil-esterificação; LM20: homogalacturonanos de alta metil esterificação) .....40

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>16</b>
2.1. CLASSIFICAÇÃO DO AERÊNQUIMA.....	16
2.2. ESTRUTURA CELULAR DO AERÊNQUIMA.....	19
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
4.1. ESPÉCIE SELECIONADA E ÁREA DE COLETA .....	24
4.2. MICROSCOPIA DE LUZ.....	26
<b>4.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO</b> .....	<b>27</b>
4.4. IMUNOCITOQUÍMICA.....	28
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
5.1. ONTOGÊNESE DO AERÊNQUIMA .....	31
5.1.1. ORGANIZAÇÃO DO MERISTEMA APICAL E DO ÁPICE DA RAIZ .....	31
5.1.2. DESENVOLVIMENTO DO CÓRTEX.....	31
5.2. IMUNOLOCALIZAÇÃO DE POLÍMEROS DA PAREDE CELULAR.....	40
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
6.1. ONTOGÊNESE DO AERÊNQUIMA .....	46
6.2. IMUNOLOCALIZAÇÃO DE POLÍMEROS DA PAREDE CELULAR.....	48
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>51</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>52</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O aerênquima proporciona à planta armazenamento de O<sub>2</sub>, formando um sistema de aeração interna que permite a sobrevivência em ambientes com pouca disponibilidade de oxigênio (DREW *et al.*, 2000). Sachs (1872 *apud* EVANS, 2003) foi o primeiro a reconhecer um tecido cheio de ar nas plantas. De Bary (1877) baseou-se no processo ontogênico e classificou esse tecido de duas maneiras: (i) lisígeno, aquele em que ocorre morte celular para a formação das lacunas de ar e, (ii) esquizógeno, onde as lacunas se formam pela separação de células.

Vários autores tem mostrado a existência de diferentes tipos morfológicos de aerênquima (SCULTHORPE, 1967; JUSTIN & ARMSTRONG, 1987; SCHUSSLER & LONGSTRETH, 1996; SEAGO *et al.*, 2005; JUNG *et al.*, 2008). Porém, os mecanismos que formam esses diferentes padrões são imprecisos e propor uma classificação que seja abrangente a todos os tipos tem sido uma tarefa árdua (SCHUSSLER & LONGSTRETH, 2000). Para tentar esclarecer esses padrões várias classificações foram propostas, entre as mais atuais estão as de Seago *et al.* (2005) e de Jung *et al.* (2008).

A classificação proposta por Seago *et al.* (2005) compreende sete tipos de aerênquima baseados na ontogênese, com um novo tipo, o expansígeno. Para esses autores, no aerênquima expansígeno as lacunas se originam apenas por divisão e expansão celular, não há separação de células como nos tipos esquizógenos. Jung *et al.* (2008) basearam-se na morfologia do aerênquima classificando primeiramente como lisígeno e esquizógeno, fazendo uma comparação com a classificação de Justin & Armstrong (1987) e Seago *et al.* (2005). No trabalho de Jung *et al.* (2008) a classificação do padrão expansígeno não foi considerada e é possível notar divergências quando comparadas às classificações de distintos

autores, sendo um mesmo padrão identificado como lisígeno em pacote por Seago *et al.* (2005) e como esquizógeno radial por Jung *et al.* (2008), por exemplo. Essas interpretações controversas reforçam a necessidade de estudos ontogênicos aliados à análise ultraestrutural para definição clara dos tipos de aerênquima e reavaliação dos conceitos.

Durante a formação dos espaços intercelulares podem acontecer alterações ultraestruturais na parede celular (KNOX, 1992). Drew *et al.* (2000) e Gunawardena *et al.* (2001), evidenciam que nas fases iniciais do desenvolvimento do aerênquima em raízes de milho ocorre degradação da parede celular, controlada por enzimas.

A parede celular pode ser um importante dado estrutural para compreender a planta pois ela atua como um exoesqueleto para célula e participa em processos celulares importantes como adesão, crescimento e diferenciação celular (COSGROVE, 1997). As hemiceluloses e pectinas são compostos responsáveis pela integridade estrutural das paredes celulares (KNOX, 1992), tais como a expansão e adesão celular (WILLATS *et al.*, 1999), fundamentais no desenvolvimento do aerênquima. O processo de separação celular é rigorosamente controlado pelas plantas e para entendê-lo é importante determinar a ocorrência de pectinas e hemiceluloses ao longo da parede celular (KNOX, 1992).

A distribuição de polissacarídeos na parede celular não é constante, e podem não ser uniformemente distribuídos nem mesmo em duas paredes adjacentes (CASSAB, 1998). Para entender o modo como os polímeros de parede celular atuam, estudos imunocitoquímicos com anticorpos monoclonais são utilizados para mostrar a localização espacial e temporal de sítios específicos dos diferentes constituintes da parede celular, denominados de epítomos (DOLAN *et al.*, 1995; KNOX, 1997; KNOX, 2006).

Dados sobre a dinâmica da parede celular das células formadoras de aerênquima podem fornecer respostas às lacunas existentes no âmbito da ontogênese desse tecido. Estudos realizados por Bona *et al.* (dados não publicados) e Mastroberti *et al.* (dados não publicados) evidenciaram, em microscopia eletrônica de transmissão, que o citoplasma das células formadoras do aerênquima lisígeno radial de *Potamogeton polygonus* Cham. e Schltdl., passam por progressiva degradação, indicando a existência de morte celular. No entanto, a lamela média e a parede primária permanecem íntegras, nas células formadoras desse tipo de aerênquima. Fica evidente a falta de estudos que abordem simultaneamente análises da ontogênese, alterações químicas na composição da parede celular e aspectos funcionais destas alterações facilitariam a compreensão das alterações das células formadoras do aerênquima.

Nossa equipe vem realizando estudos de ontogênese, ultraestrutura e imunocitoquímica de parede celular do aerênquima em raízes de várias espécies (Projeto CNPQ Universal 14/2012, processo 481713/2012-3) (BONA *et al.*, 2010; MASTROBERTI *et al.*, 2011) com o objetivo de fazer ampla avaliação desse tecido. Dentre as espécies em estudo, *Pistia stratiotes* L. (Araceae) tem potencial por não ter sido detalhadamente estudada, sendo citada por Seago *et al.* (2005) como tendo aerênquima lisígeno em pacotes, um tipo incomum de aerênquima em raízes. No entanto, não há registros que confirmem esse padrão para a espécie. Assim, pretende-se analisar a anatomia da raiz de *Pistia stratiotes*, a fim de esclarecer sua origem, padrão e alterações estruturais e ultraestruturais das paredes das células envolvidas na formação das lacunas de ar.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. CLASSIFICAÇÃO DO AERÊNQUIMA

Plantas aquáticas comumente apresentam variações fenotípicas evidentes (SCULTHORPE, 1967), relacionadas ao ambiente em que vivem (COAN *et al.*, 2002), sendo o aerênquima considerado uma das principais adaptações das plantas ao ambiente aquático.

A redução da disponibilidade de oxigênio é a maior limitação enfrentada pelas plantas no ambiente aquático (SCULTHORPE, 1967; CALBO *et al.*, 1998; COLMER, 2003). O oxigênio dissolvido em água é rapidamente esgotado pela respiração das raízes das plantas e microrganismos (ABIKO *et al.*, 2012). O transporte interno de gases é crucial para macrófitas e, a difusão de O<sub>2</sub> entre os tecidos submersos e o ambiente aquático é cerca de dez mil vezes mais lenta do que no ar (COLMER, 2003). Para a sobrevivência dessas plantas, é necessária a presença de um tecido que possa suprir essa falta de oxigenação no órgão, o aerênquima (DREW, 1987; ARMSTRONG *et al.*, 1991; KOLB *et al.*, 1998; SCHUSSLER & LONGSTRETH, 2000; COLMER, 2003). Aerênquima é o termo usado para denominar o tecido vegetal que contém espaços de ar maiores aos habitualmente encontrados como espaços intercelulares (EVANS, 2003).

Os diferentes tipos de aerênquima têm sido identificados tanto pela morte celular (SCHLEIDEN 1849; DE BARY, 1877), como pela separação das paredes (DE BARY, 1877) e também pelo simples crescimento e afastamento celular (CONARD, 1905; Seago, 2005). Schleiden (1849) descreveu a formação de cavidades de ar em *Canna* e *Nymphaea* a partir de destruição de células de parênquima. Para De Bary (1877), no aerênquima esquizógeno não há morte celular e as lacunas são limitadas



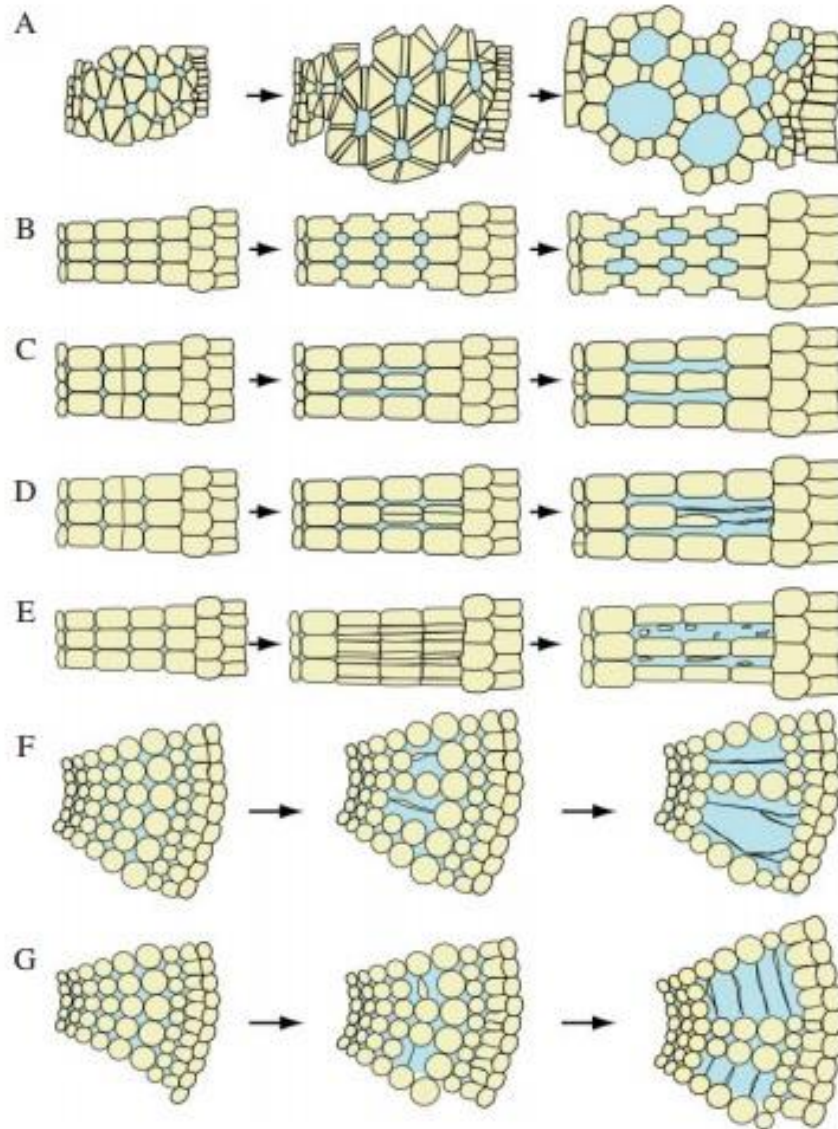
por paredes lisas podendo ser recobertas por uma delicada camada de cutícula em algumas espécies, já no lisígeno as paredes são recobertas por restos das células que morreram para originar o espaço.

Existem discordâncias entre autores quanto a classificação dos tipos de aerênquima. De Bary (1877) observou em *Sagittaria* um padrão de aerênquima formado por expansão do espaço intercelular, classificando-o como esquizógeno. Anos mais tarde, Severin (1932) caracterizou o aerênquima dessa mesma planta como lisígeno. Longstreth & Borkhsenius (2000), redescreveram o aerênquima de *Sagittaria* como lisígeno ocorrendo somente o colapso celular, colocando em dúvida se a morte celular ocorre sempre nas células formadoras desse tipo de aerênquima, já que muitas células colapsadas são comprimidas, porém sem sofrer lise completa.

Ao estudar o aerênquima em *Nymphaea*, Conard (1905) não usou os conceitos de esquizogenia e lisigenia propostos por De Bary (1877). Para Conard (1905) o aerênquima dessa planta era formado somente através de expansão e divisão celular. Seago *et al.* (1999, 2000) descreveram esse tipo de aerênquima usando o termo “expansão diferencial”. Um novo conceito foi criado por Seago *et al.* (2005) incluindo além de esquizógeno e lisígeno, o termo expansígeno.

Para tentar esclarecer esses padrões e resolver as incongruências de nomenclatura várias classificações já foram propostas, além da classificação original de De Bary (1877) para lisígeno e esquizógeno. A classificação proposta por Seago *et al.* (2005) compreende sete tipos de aerênquima (FIGURA 1): lisígeno em pacote, lisígeno radial, lisígeno tangencial, esquizo-lisígeno, esquizógeno, expansígeno radial e expansígeno favo-de-mel. Nos tipos expansígenos, as lacunas se originam por divisão e expansão das células, sem ocorrência de separação celular. Nos esquizógenos, diferentemente do expansígeno, além de divisão e expansão

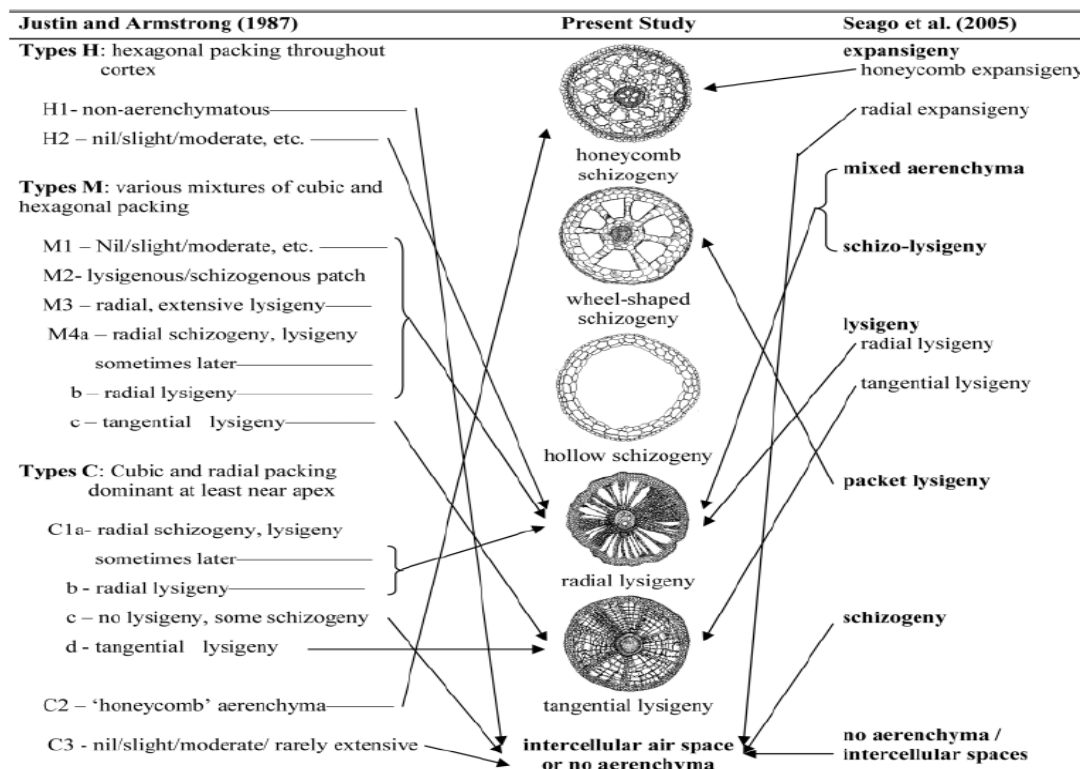
celulares, também ocorre a separação das paredes, na região da lamela média (SEAGO *et al.*, 2005).



**FIGURA 1:** Classificação de aerênquima proposta por Seago *et al.* (2005) incluindo os tipos expansígenos onde: (A) Expansígeno favo de mel, (B) Expansígeno radial, (C) Esquizógeno, (D) Esquizo-lisígeno, (E) Lisígeno em pacotes, (F) Lisígeno radial, (G) Lisígeno tangencial. A cor azul representa os espaços intercelulares e lacunas. (Retirado de SEAGO *et al.*, 2005)

Na classificação proposta por Jung *et al.* (2008), baseada na morfologia do aerênquima de acordo com o arranjo das células, são apresentadas variações dos padrões lisígeno e esquizógeno. Esses autores ainda apresentam uma comparação com os demais padrões, especialmente com a classificação de Seago *et al.* (2005).

Jung *et al.* (2008) identificam como esquizógeno radial o tipo de aerênquima identificado por Seago *et al.* (2005) como lisígeno em pacote e, para Jung *et al.* (2008) o tipo expansígeno proposto por Seago *et al.* (2005) é apenas uma variação do tipo esquizógeno, a qual os autores nomeiam esquizógeno favo-de-mel (FIGURA 2).

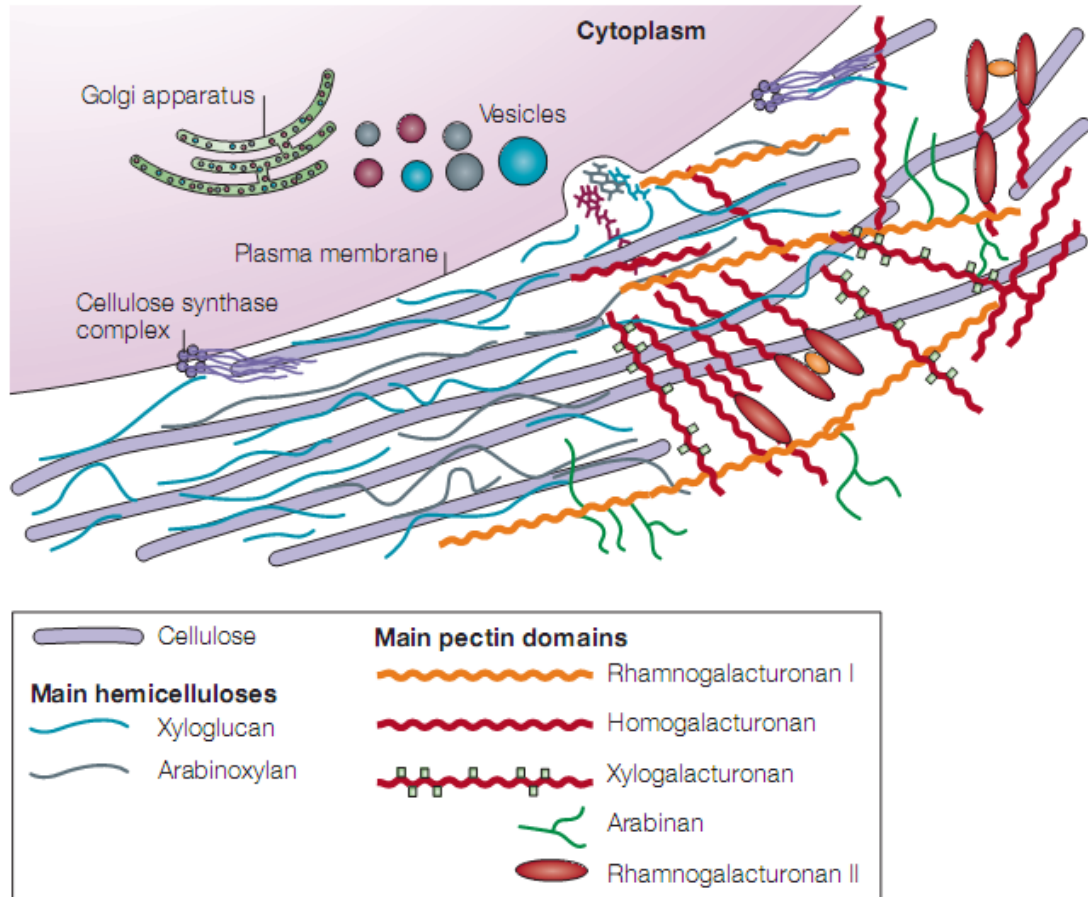


**FIGURA 2:** Comparação das classificações de Justin & Armstrong (1987), Jung *et al.* (2008) e Seago *et al.* (2005) para aerênquima em raízes. Justin & Armstrong (1987) propuseram três principais tipos, subdivididos em 14 categorias. Jung *et al.* (2008) propuseram 5 tipos de aerênquima para raízes e Seago *et al.* (2005) propuseram a inclusão do novo tipo expansígeno. (Retirado de Jung *et al.*, 2008)

## 2.2. ESTRUTURA CELULAR DO AERÊNQUIMA

A parede celular primária é formada basicamente por microfibrilas de celulose, hemicelulose e pectinas. As microfibrilas de celulose são sintetizadas na membrana plasmática e as hemiceluloses e pectinas pelos dictiossomos. Na maioria das espécies a principal hemicelulose são os xiloglucanos e as principais pectinas

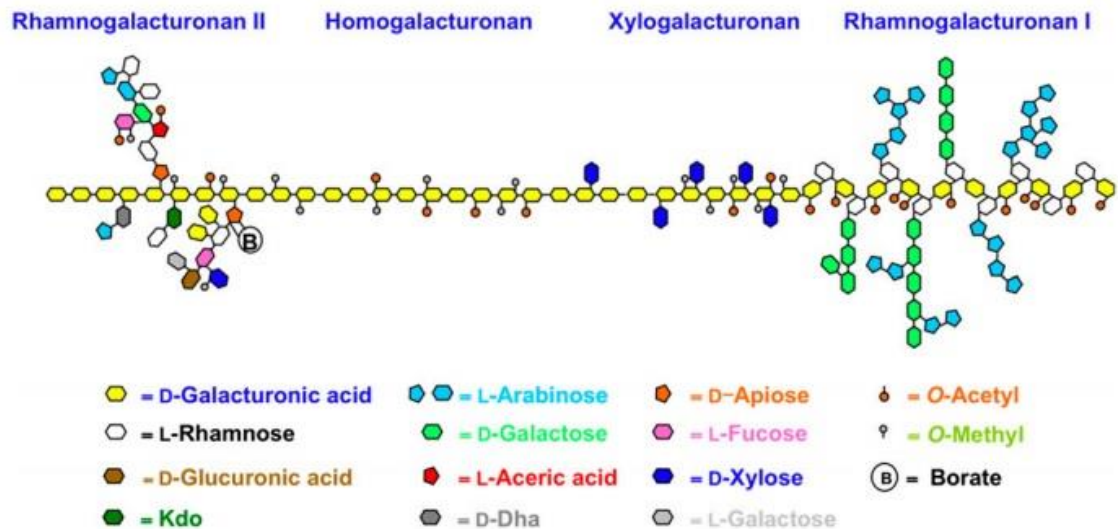
incluem os ramnogalacturonanos I e homogalacturonanos (FIGURA 3) (COSGROVE, 2005).



**FIGURA 3:** Estrutura primária da parede celular onde as microfibrilas de celulose são representadas pelas hastes roxas. As hemiceluloses estão representadas do lado esquerdo da figura sem a presença de pectinas, para melhor compreensão, os xiloglucanos são representadas por hastes azuis. As pectinas estão representadas do lado direito da figura pelos dois principais polissacarídeos ramnogalacturonanos (haste laranja) e homogalacturonanos (haste vermelha). (Retirado de COSGROVE, 2005)

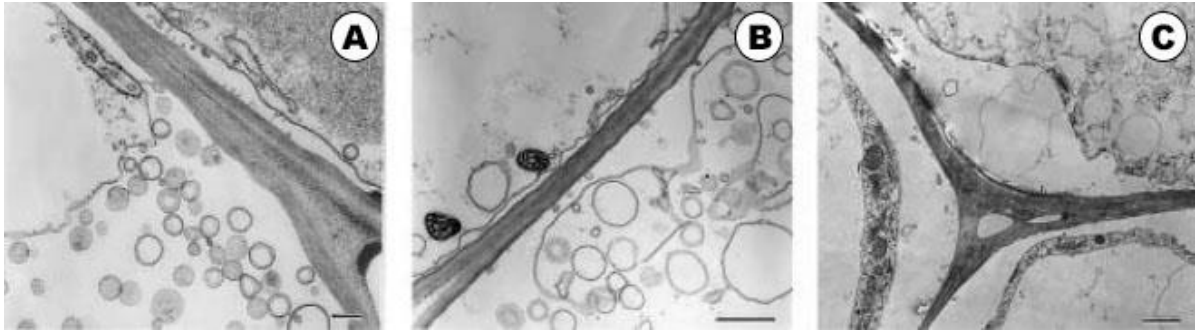
As hemiceluloses e pectinas são compostos com grande importância na integridade estrutural das paredes celulares (GUNAWARDENA *et al.*, 2001; GUNAWARDENA, 2008) tais como a expansão e adesão celular (WILLATS *et al.*, 1999). A pectina é um polissacarídeo formado por muitos ácidos galacturônicos,

unidos com ligações glicosídicas  $\alpha$  -1,4 em uma longa cadeia que pode ter como cadeias laterais açúcares como galactose, glicose, ramnose, arabinose e xilose (LINERS *et al.*, 1989; WILLATS *et al.* 2001) (FIGURA 4).



**FIGURA 4:** Estrutura geral de pectina. Os ácidos galacturônicos representam a cadeia principal em amarelo. É possível observar a estrutura das cadeias laterais formando rhamnogalacturonanos I na direita da figura, xilogalacturonanos em azul marinho, homogalacturonanos metil-esterificados no centro e rhamnogalacturonanos II na parte esquerda da figura. (Retirado de HARHOLT *et al.*, 2010)

Durante a formação do aerênquima, seja lisígeno ou esquizógeno, é provável a ocorrência de alterações celulares. Gunawardena *et al.* (2001a) observaram algumas dessas alterações *in situ* através dos anticorpos contra pectinas esterificadas e não esterificadas (JIM 5 e JIM 7) (FIGURA 5).



**FIGURA 5:** Alterações celulares visualizadas em microscopia eletrônica de transmissão na raiz de milho. **A e B.** Membranas plasmáticas apresentam invaginações e presença de vesículas entre a parede celular e a membrana plasmática. **C.** Vacúolo com consistência granular e tonoplasto corado. Barra de escala A= 200nm; B e C= 1  $\mu$ m. (Adaptado de GUNAWARDENA *et al.*, 2001a).

São escassos os trabalhos que envolvem marcação de polímeros da parede celular durante a formação do aerênquima, entre os poucos está o de Gunawardena (2008) que utilizaram marcação com os anticorpos JIM5 e JIM7 durante a formação do aerênquima em *Aponogeton madagascariensis* (Aponogetonaceae) e os testes indicaram que a distribuição de pectinas de-esterificadas e esterificadas foi alterada e houve alteração na parede celular dentro de 12 horas a partir da indução com etileno para formação do aerênquima.

O esclarecimento de diversos aspectos de crescimento e desenvolvimento da planta podem ser elucidados pelo estudo das paredes celulares, sabe-se que os polissacarídeos que compõem a parede celular não tem a mesma distribuição estrutural em todas as células (KNOX 2008).

### 3. OBJETIVOS

Analisar o aerênquima das raízes de *Pistia stratiotes* L., a fim de esclarecer sua ontogênese, classificação e alterações estruturais e ultraestruturais da parede das células envolvidas na formação das lacunas.

#### 3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a origem das lacunas de ar na raiz de *P. stratiotes*.
- Averiguar a existência ou não de morte celular, durante a formação do aerênquima.
- Caracterizar estruturalmente a parede das células que formam as lacunas do aerênquima durante a ontogênese.
- Verificar as possíveis alterações de glicanos constituintes da parede celular tais como pectinas e hemiceluloses em diferentes estádios de desenvolvimento do aerênquima.
- Confirmar o tipo de aerênquima presente nas raízes de *P. stratiotes*.

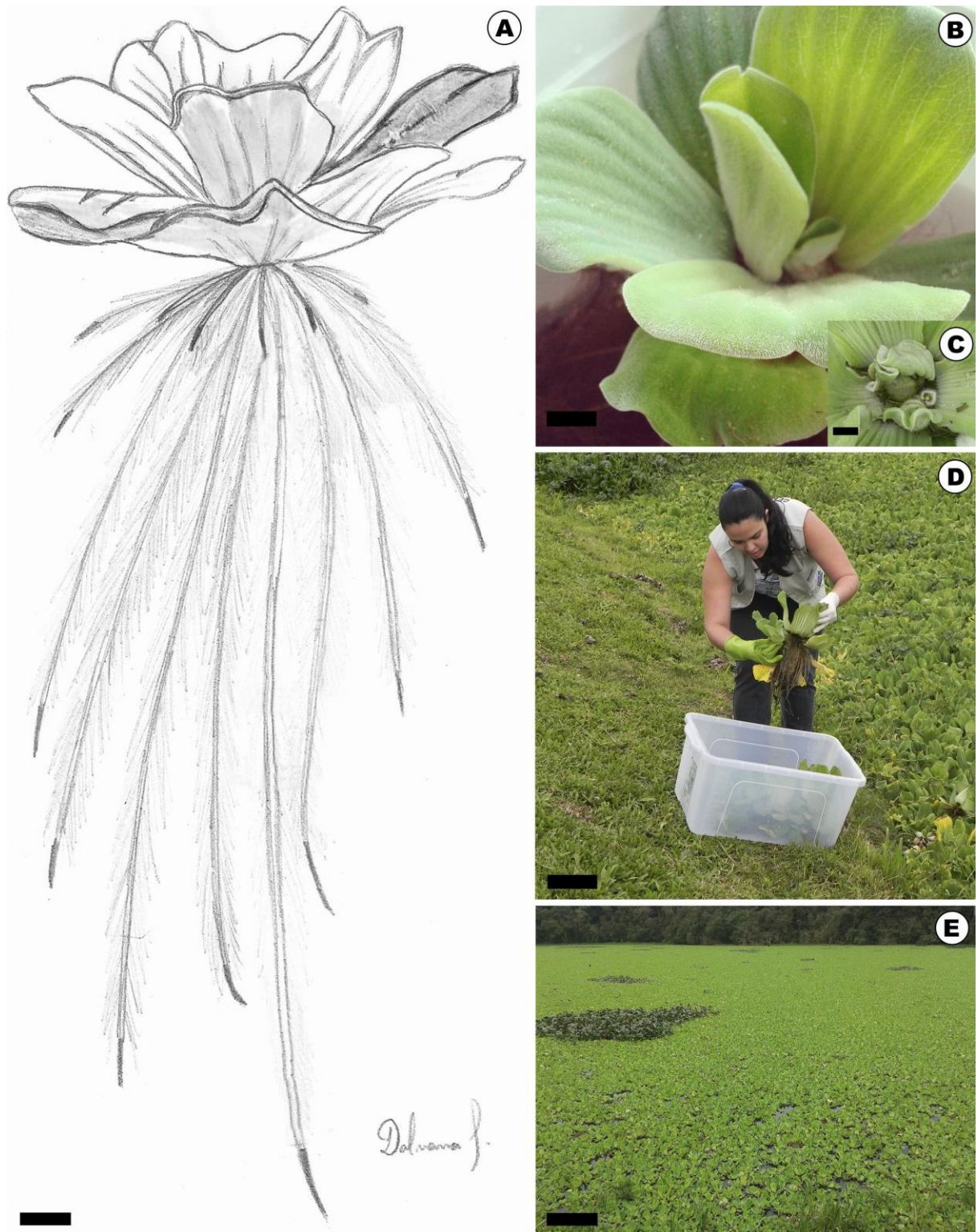
## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. ESPÉCIE SELECIONADA E ÁREA DE COLETA

*Pistia stratiotes* L. (Araceae) é uma macrófita aquática, monocotiledônea, de hábito flutuante livre, com folhas dispostas em rosetas, verdes, espessas e recobertas por tricomas; raízes adventícias fasciculadas, claras, com coifa escura; flores brancas, diminutas e unissexuadas; reprodução sexuada ou vegetativa por haste estolonífera (ODJEGBA & FASIDI, 2004). É amplamente distribuída nos países tropicais e subtropicais vivendo em lagos, rios, lagoas e valas (SCHMITZ *et al.*, 1993); possui tamanho variado, de 3 a 30 cm, conforme o ambiente, floresce durante o ano todo. *P. stratiotes* é conhecida popularmente como alface d'água, erva-de-santa-luzia, camalotinho, orelha-de-onça; em espanhol como: repollo de agua e, em inglês como: water lettuce (POTT & POTT, 2000).

A coleta do material botânico foi realizada em cavas do Parque da Imigração Japonesa e do Zoológico do Parque Iguaçu, localizados na Bacia Hidrográfica do Rio Iguaçu, em Curitiba (FIGURA 6 D e E). A região possui temperatura média anual inferior a 20°C e clima subtropical com chuvas bem distribuídas durante todo o ano (SEMA, 2010).





**Figura 6:** Caracterização morfológica de *Pistia stratiotes*. **A.** Desenho esquemático evidenciando as raízes fasciculadas (Confeccionado por Dalvana Pedroso). **B e C.** Aspecto dos espécimes floridos. **D** Coleta dos espécimes de *P. stratiotes*. **E.** Local de coleta. (Barra de escala A, B, D e E = 1 cm e C= 0,5cm).

#### 4.2. MICROSCOPIA DE LUZ

Foram separadas, aleatoriamente, e lavadas em água corrente, raízes inteiras com comprimento entre 10 e 15 cm, de no mínimo 10 indivíduos. De cada raiz seccionou-se seis amostras com 5 mm cada uma: duas na região de coifa (consecutivas), duas na região mediana (com intervalo de 5 mm entre as mesmas) e duas na região mais próxima a base (também com intervalo de 5 mm entre as amostras).

O material foi fixado em solução Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) à temperatura ambiente. As amostras passaram por desidratação em série etílica ascendente de 10 em 10 até 95% por 30 minutos cada etapa, e posteriormente foram incluídas em hidroxietilmetacrilato (historesina Leica®).

Os cortes transversais e longitudinais foram realizados de forma seriada com espessura de 5  $\mu\text{m}$  usando navalha de aço em micrótomo de rotação Leica® RM 2145. Posteriormente, os cortes foram corados com azul de toluidina em tampão acetato pH 4,7 (PEARSE, 1961), montados em lâminas permanentes com PermOUNT® e as analisadas no Laboratório de Botânica Estrutural, no Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba.

### 4.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para microscopia eletrônica de transmissão o material foi seccionado em pequenas porções de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> e fixado em solução de glutaraldeído 1%, formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio por 12 horas (MCDOWELL & TRUMP, 1976). Após a retirada do fixador, a lavagem foi realizada em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 (GABRIEL, 1982) e pós-fixação em uma solução de tetróxido de ósmio 1% (OsO<sub>2</sub>) aquoso mantendo o material no escuro por 12 horas aproximadamente.

Depois de pós-fixadas, as amostras foram lavadas três vezes em tampão fosfato de sódio pH 7,2 0,1 M e, em seguida, em água destilada. A desidratação foi obtida através de série alcoólica etílica ascendente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 2 trocas 90%, 2 trocas 95% e 2 trocas 100%, por 30 minutos cada etapa. Depois de desidratado, o material foi incluído em resina acrílica hidrofílica LR White® “Hard Grade” (Fluka). Para inclusão foram utilizadas cápsulas de gelatina levadas para polimerização em estufa a 60°C, por um período de 8 a 12 horas.

As seções ultrafinas foram feitas em Ultramicrotomo Leica Ultracut UCT, em navalha de diamante Drukker 45°, com fio de 3 mm, com espessura de 60 nm, colocadas em suportes (“grids”) de cobre de 100 mesh. Os suportes contendo os cortes passaram por uma contrastação em solução de acetato de uranila 2% aquoso por 20 min (BOZZOLA & RUSSEL, 1998) e solução de chumbo por 5 min (HANAICHI *et al.*, 1986). As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL – 1200 EX II) no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba.

#### 4.4. IMUNOCITOQUÍMICA

Amostras de aproximadamente 2 mm da região apical, da área subsequente a coifa e da zona de alongamento foram fixadas em solução de Trump (MCDOWELL & TRUMP, 1976) por 24 horas à vácuo, lavados por três vezes em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,2 e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% (OsO<sub>2</sub>) aquoso *overnight*. Em seguida, as amostras foram novamente lavadas no mesmo tampão e desidratadas em série etílica ascendente (de 10% até 100%), por 30 minutos cada etapa, sendo a etapa 100% repetida por 3 vezes. O material desidratado foi pré-infiltrado com uma solução de etanol absoluto e LR White “Hard Grade” (Fluka) (1:1) por 8 horas e, posteriormente, a infiltração foi feita através de três trocas de LR White pura, com intervalo de 8 horas entre elas. As amostras foram polimerizadas em cápsulas de gelatina fechadas, em estufa a 60°C durante 12 horas. Seções semifinas (500 nm) foram feitas em Ultramicrotomo Leica Ultracut UCT, utilizando navalha de vidro. O material testemunho foi corado com Azul de Toluidina 1% pH 8-9 (SOUZA, 1998) e observadas em microscópio de luz.

As seções, aderidas a lâminas recobertas com uma solução de gelatina, foram incubadas com anticorpos monoclonais LM5, LM6, LM15, LM19, LM20 (FIGURA 7, 8 e 9) que reconhecem epítomos anti-pectinas e anti-hemicelulose, apresentados e referenciados na tabela 1.

Para a incubação dos anticorpos as seções foram hidratadas com tampão fosfato salino PBS pH 7,1 (HARRIS, 1994), bloqueadas contra ligações inespecíficas com uma solução de proteína de leite 3% em PBS e incubadas com os anticorpos monoclonais primários diluídos em tampão PBS (1:10) por 1 hora. Depois de lavadas em tampão PBS por três vezes, as seções foram incubadas com anticorpo secundário anti-rat-IgG (molécula inteira) ligada a FITC (Sigma) diluídos em PBS

(1:100) por 1 hora, em câmara escura. Em seguida, as secções foram lavadas por três vezes em PBS (5 minutos cada), incubadas com calcoflúor por 5 minutos e novamente lavadas em PBS por três vezes. A montagem com lamínula foi obtida usando uma solução de p-fenilenodiamina (PPD) e de glicerol em solução de PBS (solução anti-fade).

As secções passaram por um pré-tratamento enzimático usando uma solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (pH 11,4) e pectato liase (pH 8,0)/ Tris-HCl (de *Aspergillus niger*, Megazyme) por 2 horas cada, para remoção dos homogalacturonanos pécticas. Foram realizados controles negativos onde uma etapa da incubação com anticorpo monoclonal primário foi omitida.

As seções foram analisadas em epifluorescência no microscópio Leica DM R (filtro de excitação 450-490 nm), no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre.

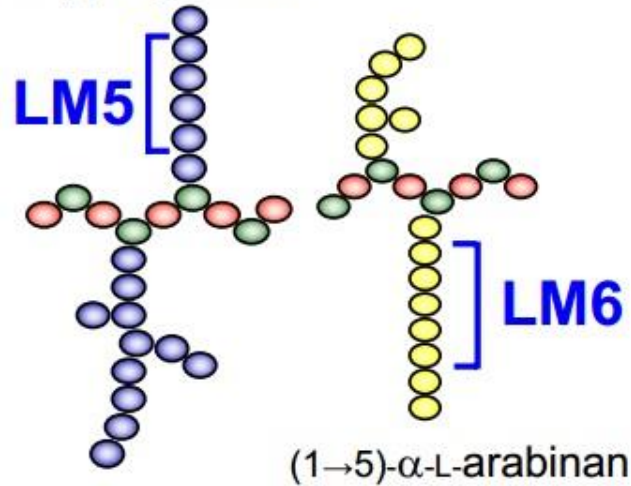
**TABELA 1:** Anticorpos monoclonais e suas especificidades, seguido dos autores, utilizados neste trabalho.

<b>Anticorpo</b>	<b>Epítopo</b>	<b>Referência</b>
<b>LM 5</b>	(1→4)-β-D-galactano	Jones <i>et al.</i> (1997)
<b>LM 6</b>	(1→5) -α-L- arabinano	Willats <i>et al.</i> (1998)
<b>LM 15</b>	XXXG de xiloglucano	Marcus <i>et al.</i> (2008)
<b>LM 19</b>	Homogalacturonano com baixa metil-esterificação	Verhertbruggen <i>et al.</i> (2009)
<b>LM 20</b>	Homogalacturonano com alta metil-esterificação	Verhertbruggen <i>et al.</i> (2009)

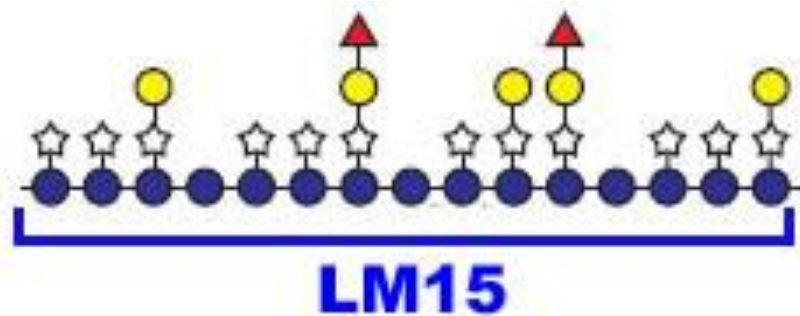
### RHAMNOGALACTURONAN-I (RG-I)

Antibodies to epitopes occurring in side chains of RG-I have been prepared using **neoglycoproteins**

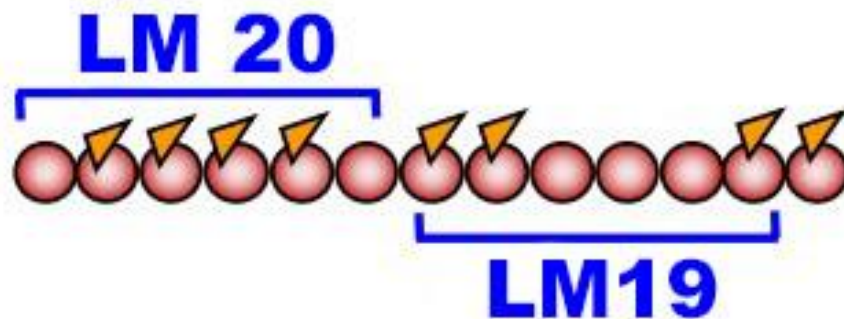
(1→4)-β-D-galactan



**FIGURA 7:** Especificidade dos anticorpos LM5 e LM6 na molécula de pectina. (Retirado de KNOX, 2003).



**FIGURA 8:** Representação da especificidade do anticorpo LM15, onde as estrelas representam cadeias laterais de xilose. (Adaptado de BURTON *et al.* 2010).



**FIGURA 9:** Especificidade dos anticorpos LM19 e LM20 na molécula de pectina. (Adaptado de KNOX, 2003).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. ONTOGÊNESE DO AERÊNQUIMA

#### 5.1.1. ORGANIZAÇÃO DO MERISTEMA APICAL E DO ÁPICE DA RAIZ

O ápice de raiz de *P. stratiotes* possui coifa alongada com columela evidente (FIGURA 10 A). O promeristema é composto de um conjunto de células centrais não alinhadas, delimitadas abaixo pelas células iniciais da coifa e protoderme, com origem conjunta e pouco distinta em secção longitudinal (FIGURA 10 B), e lateralmente pelo córtex, com origem tanto da proendoderme quanto da camada subprotodérmica, e acima pelo procâmbio (FIGURA 10 B e C). As mesmas iniciais epidérmicas do meristema contribuem para a formação da coifa e columela (FIGURA 10 B e D). Em secção transversal, na região do promeristema, a raiz exibe coifa com cinco ou mais camadas de células que possuem grandes vacúolos preenchidos por compostos fenólicos (FIGURA 10 D e E).

#### 5.1.2. DESENVOLVIMENTO DO CÓRTEX

As células corticais tem claramente duas origens, permitindo delimitar uma região externa e outra interna com organização celular distinta (FIGURA 10 D e 11 A). O tecido do córtex externo é formado por meio de divisões periclinais e anticlinais da primeira camada subjacente a protoderme (FIGURA 11 A). Ao final do desenvolvimento o córtex externo possui cinco ou mais camadas de células parenquimáticas sem lacunas de ar e sem organização regular (FIGURA 10 B, C, D, E, F).



O córtex interno é oriundo da proendoderme, que através de divisões periclinais origina fileiras radiais de células. Essas fileiras, com cerca de quatro células, se conectam ao córtex externo (FIGURA 11 B, C, D, E, F). Os espaços podem ser percebidos na região onde a protoderme, meristema fundamental e procâmbio ainda não estão bem delimitados. As células dos raios são inicialmente justapostas e vão gradativamente se separando na lamela média da parede anticlinal, iniciando a formação das lacunas de ar. Essas ficam delimitadas pelos septos que são fileiras unisseriadas de células (FIGURA 11 B, C e D). O aumento em diâmetro da raiz ocorre por meio de divisões anticlinais dos septos, conseqüentemente, aumentando o número de raios e de lacunas (FIGURA 11 C, D e E). O volume da lacuna de ar aumenta em resultado da expansão das células do septo. Ao final da diferenciação, essas células se apresentam estiradas (FIGURA 11 F). O aerênquima de *P. stratiotes* é originado por separação de paredes, divisões e expansão das células. Idioblastos com ráfides são frequentes nos septos ou margeando as lacunas (FIGURA 11 F).

### **5.1.3. ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS ASSOCIADAS À FORMAÇÃO DO AERÊNQUIMA ESQUIZÓGENO**

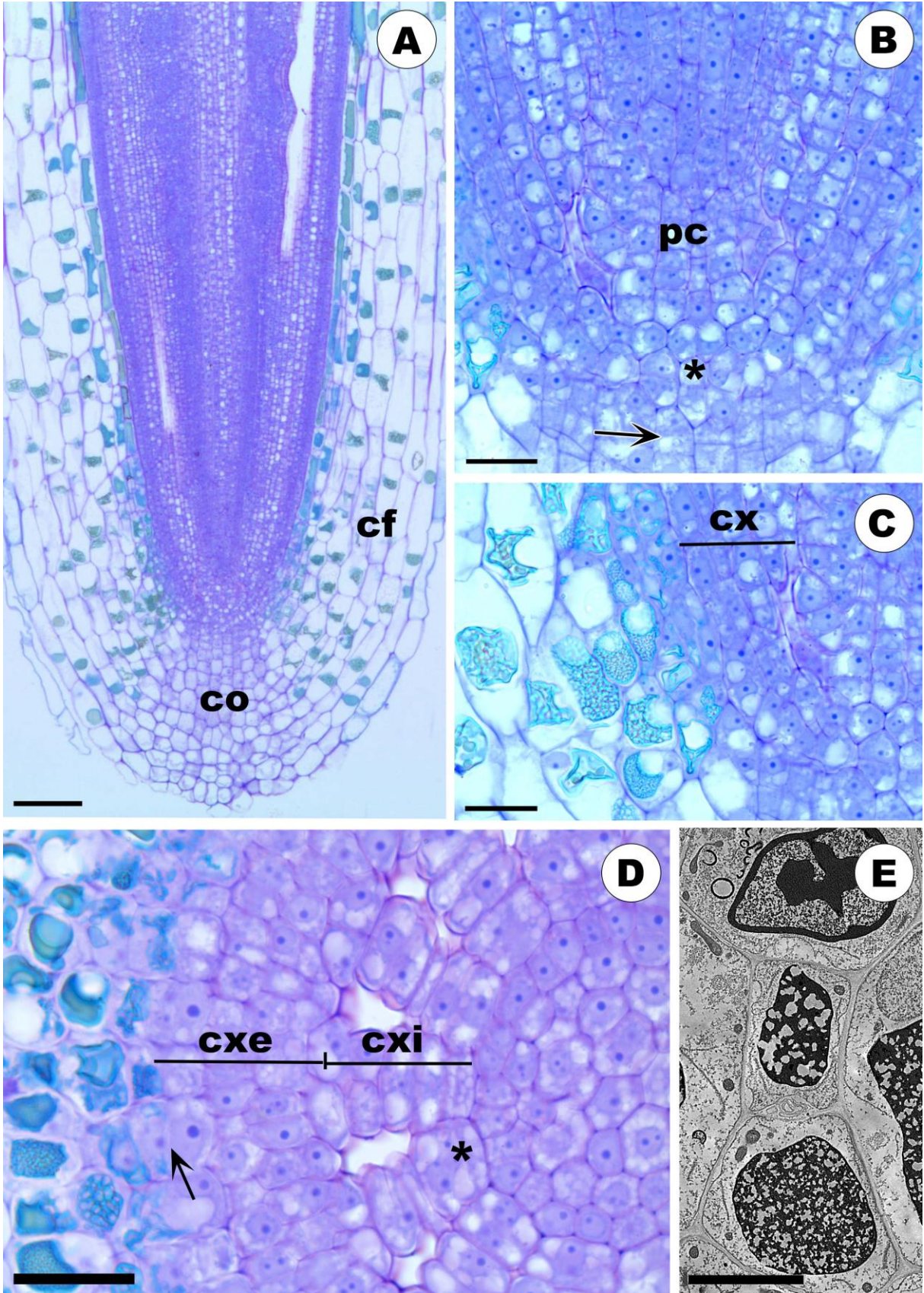
As paredes celulares não apresentam vestígio de degradação ou estresse nas fases de desenvolvimento do aerênquima (FIGURA 12 A, B e C). Não foram encontradas vesículas que pudessem contribuir para lise e rompimento celular (FIGURA 12 D). Células do córtex ficaram altamente vacuolizadas quando o aerênquima estava completamente formado, com o citoplasma formando uma



camada fina entre a parede da célula e vacúolo. A presença de cloroplastos foi evidente durante todo o desenvolvimento do aerênquima. Ainda que a mudança no formato das células formadoras de aerênquima tenha sido significativa com a separação celular (FIGURA 12 E) e o estiramento dos septos, a ultraestrutura indica que essas células se mantêm vivas na maturidade.

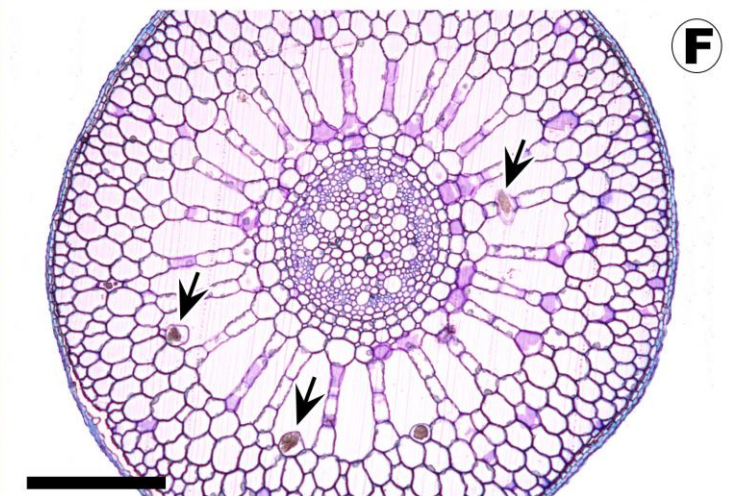
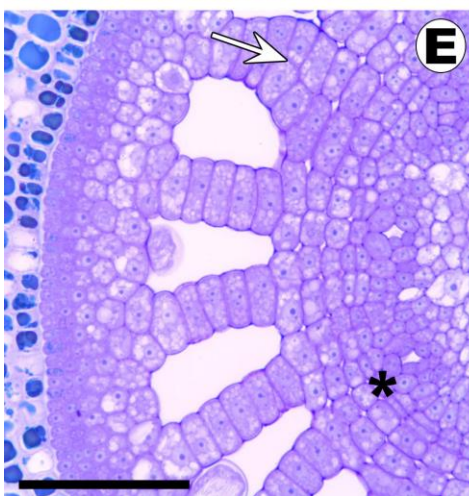
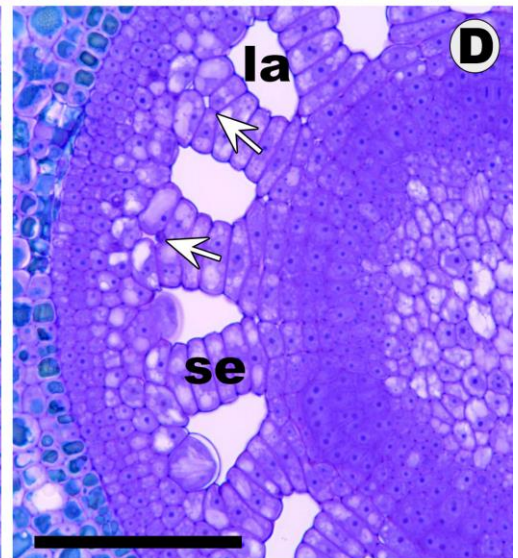
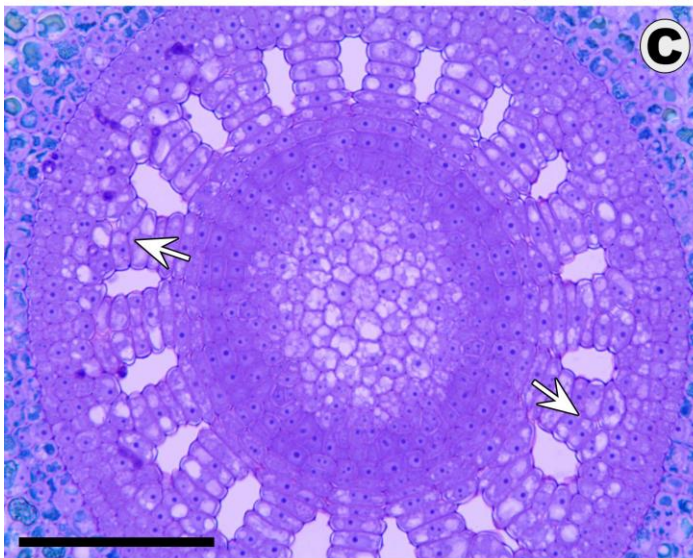
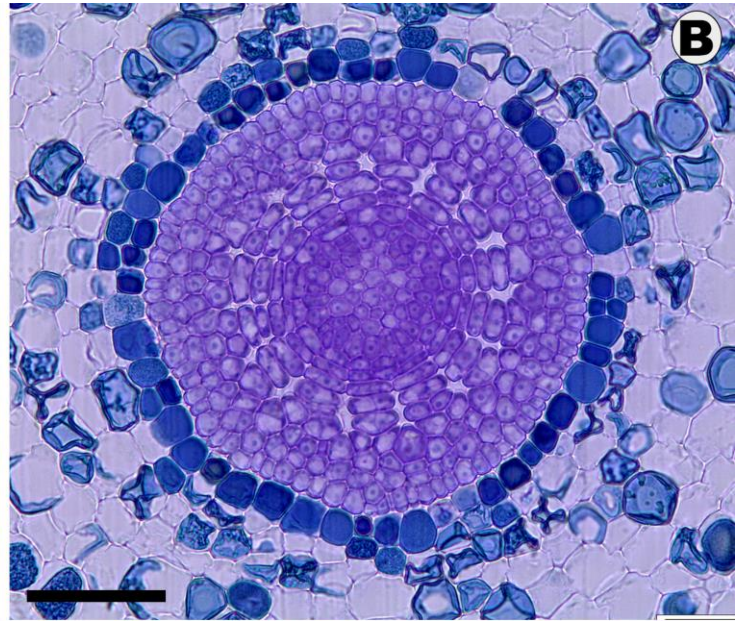
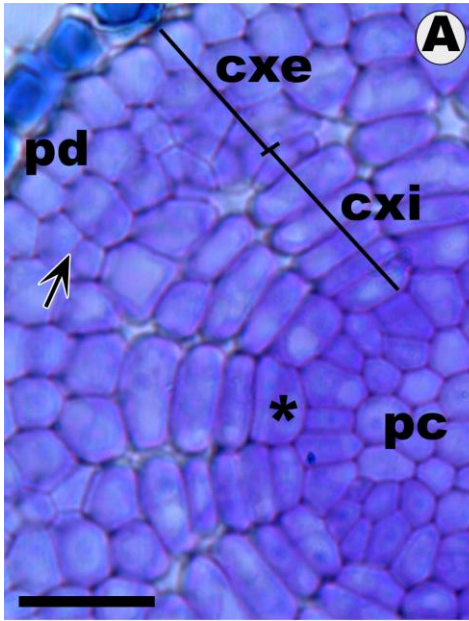
Em todos os estádios investigados foi possível observar células turgidas com tonoplasto intacto. Não houve invaginação da membrana plasmática e, os núcleos, as mitocôndrias e os dictiossomos apresentaram aparência normal, inclusive na fase mais tardia (FIGURA 12 F).

**FIGURA 10:** Ápice da raiz de *Pistia stratiotes* L.. **A.** Corte longitudinal com columela (co) e coifa (cf). **B, C.** Meristema apical em corte longitudinal evidenciando o procâmbio (pc), as iniciais da coifa e protoderme (\*), as iniciais columelares (seta preta) e o córtex (cx). **D.** Corte transversal com córtex evidenciando duas regiões distintas: córtex externo (cxe) e interno (cxi), proendoderme (\*) e iniciais da protoderme e coifa (seta preta). **E.** Células da coifa com compostos fenólicos (conteúdo preto) em microscopia eletrônica de transmissão. (Barra de escala: A= 200µm; B, C E D= 20µm; E= 5µm)



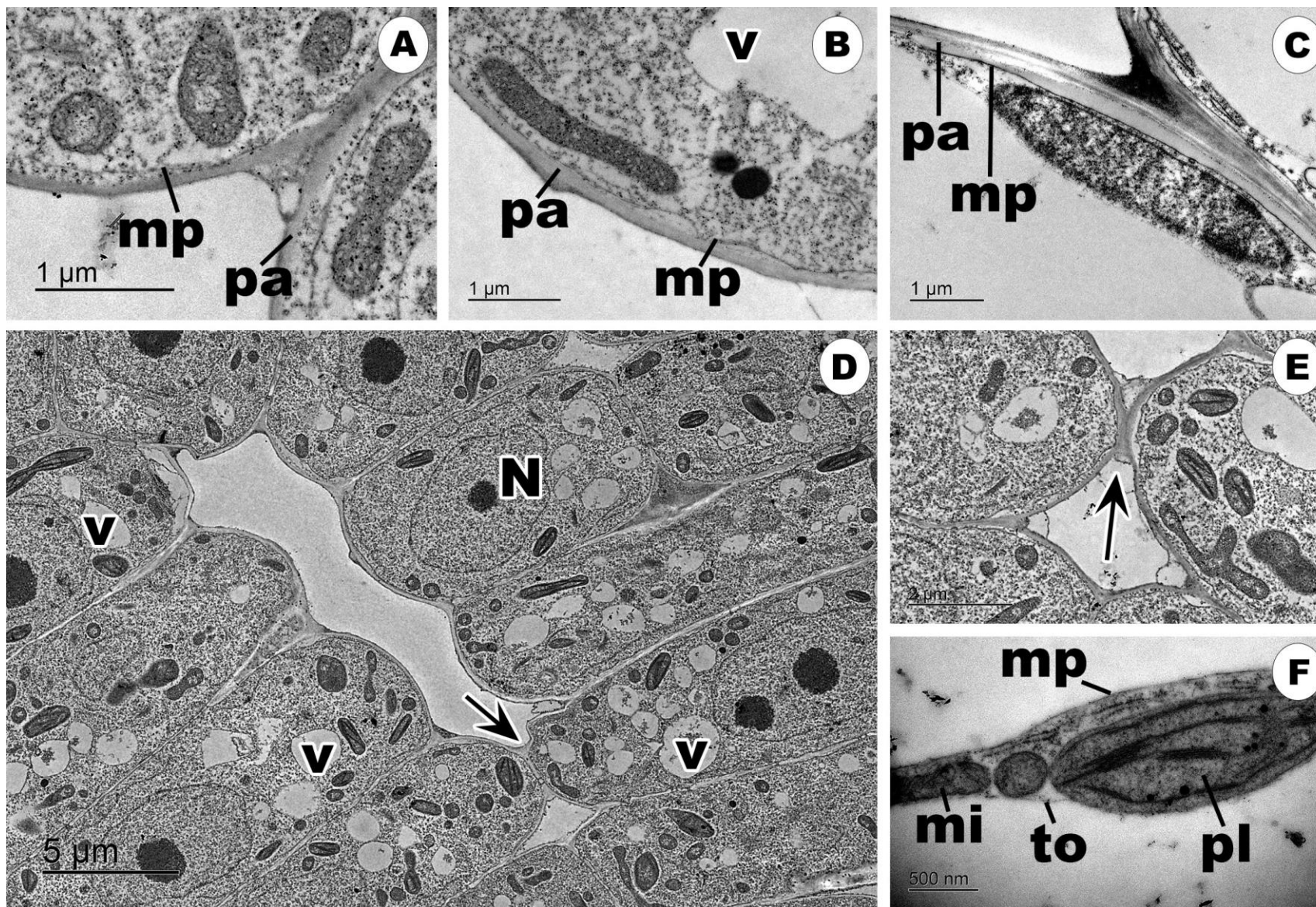
**FIGURA 11:** Desenvolvimento do córtex da raiz de *Pistia stratiotes* em secções transversais. **A.** Estádio inicial da organização das células formadoras do aerênquima (cxi), com início da distinção do córtex externo (cxe) e interno (cxi), protoderme (pd), proendoderme (\*) em divisão em procâmbio (pc). **B.** vista geral evidenciando o início da formação das lacunas. **C, D, E.** Evidências das divisões anticlinais (seta branca) dos septos (se) dando origem a novas lacunas (la), proendoderme (\*) em divisão. **F.** Aspecto final do aerênquima na raiz de *P. stratiotes*, com idioblastos com ráfides (setas). (Barra de escala: A= 20µm; B= 50µm; C, D e E= 100µm; F= 20 µm)





**Figura 12:** Secções transversais da raiz de *Pistia stratiotes* L. em microscopia eletrônica de transmissão. **A.** Parede celular (pa) e membrana plasmática (mp) no estágio 1. **B.** Parede celular (pa), membrana plasmática (mp) e presença de organelas e vacúolo (V) no estágio 2. **C.** Parede celular (pa) e membrana plasmática (mp) no estágio 3, observar citoplasma com organelas junto às paredes. **D.** Vista geral do córtex interno com septos do aerênquima em separação (seta). Observar a presença de núcleo (N), vacúolos (V) e organelas com aparência normal. **E.** Detalhe da figura D mostrando a separação celular nas paredes anticlinais (seta). **F.** Citoplasma de uma célula do septo completamente desenvolvida com membrana plasmática (mp), mitocôndria (mi), plastídio (pl) e tonoplasto (to). (Barra de escala: A, B e C= 1µm; D= 5 µm; E= 2µm; F= 500nm)





## 5.2. IMUNOLocalização de Polímeros da Parede Celular

As secções coradas com azul de toluidina nortearam a localização dos tecidos (FIGURA 13 A, B e C). No estágio 1, onde as células formadoras de aerênquima haviam acabado de se separar para formar as lacunas de ar, a detecção de galactanos (LM5) ocorreu pontualmente nas células do aerênquima (FIGURA 13 D). A presença desses galactanos apareceu como moderada marcação nas paredes das células do aerênquima no estágio 2 e também no córtex externo (FIGURA 13 E), momento em que essas células iniciaram o estiramento para aumento da lacuna de ar e, houve moderada marcação até o aerênquima estar completamente formado no estágio 3 (FIGURA 13 F).

**TABELA 2: Abundância de polímeros pécnicos e hemicelulósicos nas células formadoras de aerênquima da raiz de *Pistia stratiotes*. (LM5: galactanos; LM6: arabinanos; LM15: xiloglucanos; LM19: homogalacturonanos de baixa metil-esterificação; LM20: homogalacturonanos de alta metil esterificação)**

Anticorpo	Estádio 1		Estádio 2		Estádio 3	
	Aerênquima	Córtex externo	Aerênquima	Córtex externo	Aerênquima	Córtex externo
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /PL/ LM5	+	+	++	++	++	++
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /PL/ LM6	–	–	–	–	–	–
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /PL/ LM15	+	+	+	+	+	++
LM19	–	–	++	+	++	+
LM20	++	++	++	++	++ zona de adesão	+
						vértices

Não houve marcação para arabinanos (LM6) em nenhum tecido da raiz durante todos os estádios investigados (FIGURA 13 G, H, I). Os xiloglucanos (LM15) foram encontrados moderadamente nas células do córtex externo e no aerênquima do estágio 1 (FIGURA 14 A). No estágio 2 a marcação para xiloglucanos



permaneceu moderada no aerênquima e nos vértices das células do córtex externo (FIGURA 14 B), essa marcação dos vértices das células corticais externas foi acentuada no estágio 3 e permaneceu moderada no aerênquima (FIGURA 14 C). O anticorpo LM19 não detectou a presença de homogalacturonanos de baixa esterificação no estágio 1 (FIGURA 14 D e G). No segundo estágio os homogalacturonanos de baixa esterificação apareceram de forma pouco uniforme e bastante reduzida nas células do aerênquima (FIGURA 14 E e H). No estágio final, os homogalacturonanos de baixa esterificação aparecem pontuais nas junções de células que formam o aerênquima e, estão ausentes nas outras células do córtex que não estão envolvidas na formação desse tecido (FIGURA 14 F e I).

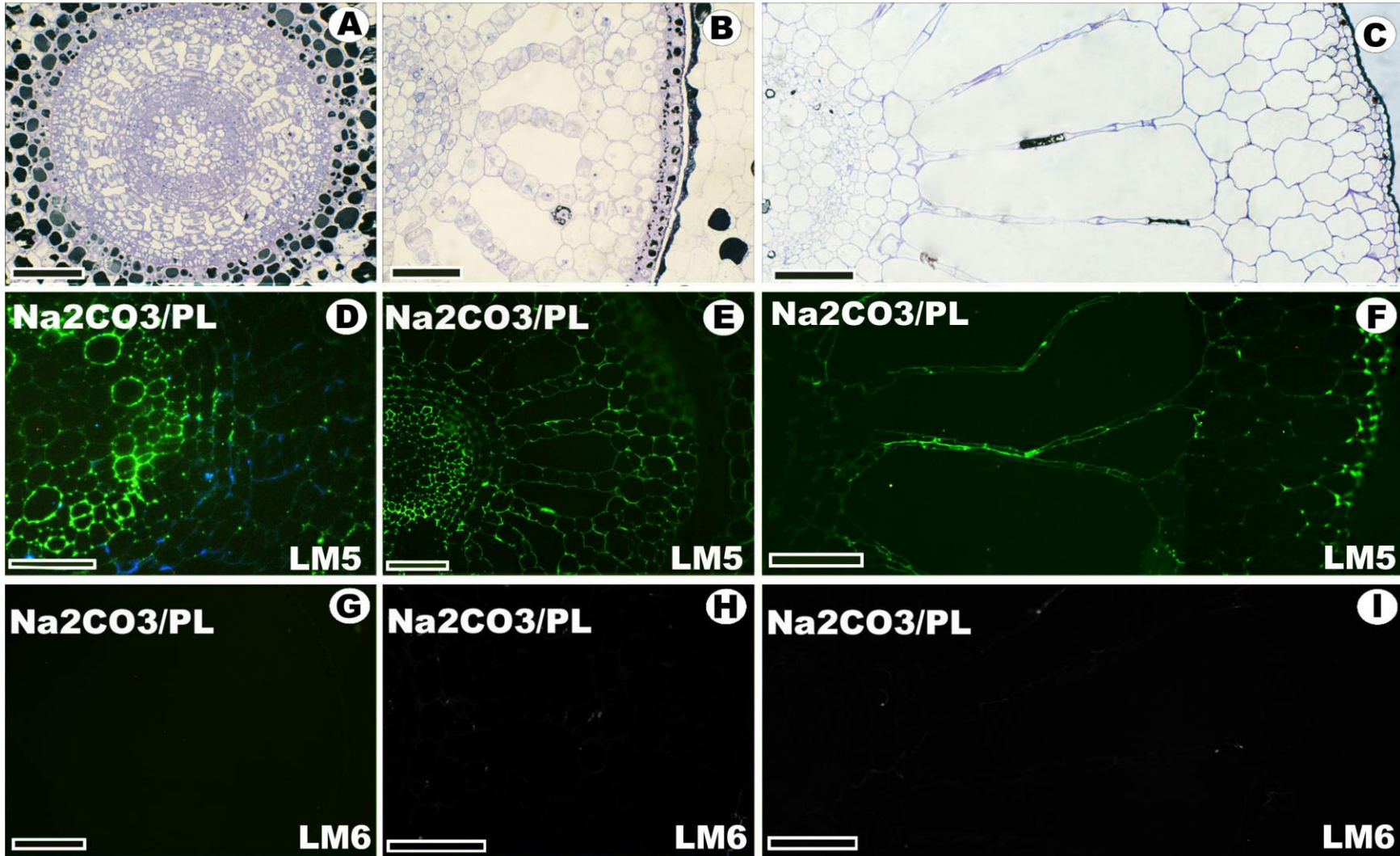
Os homogalacturonanos de alta metil-esterificação foram fortemente detectadas com LM20 no primeiro estágio em todo o órgão (FIGURA 14 J e M). No estágio 2, a marcação de homogalacturonanos de alta metil-esterificação ainda foi evidente em todo órgão (FIGURA 14 K e N). A detecção também foi encontrada no estágio 3 ao longo das paredes e, pontualmente evidenciando os vértices celulares do córtex externo (FIGURA 14 L e O).

**FIGURA 13:** Secções transversais da raiz de *Pistia stratiotes*. **A, B, C.** Estádios 1, 2 e 3 do desenvolvimento do aerênquima visualizado em microscopia de luz coradas com azul de toluidina. **D, E, F.** Secções incubadas com LM5,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e pectato liase para detecção de galactanos. Secção D tratada com calco flúor para localização espacial das marcações no órgão. **G, H, I.** Secções incubadas com LM6,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e pectato liase com ausência de arabinanos em todos os estádio de desenvolvimento.

### Estádio 1

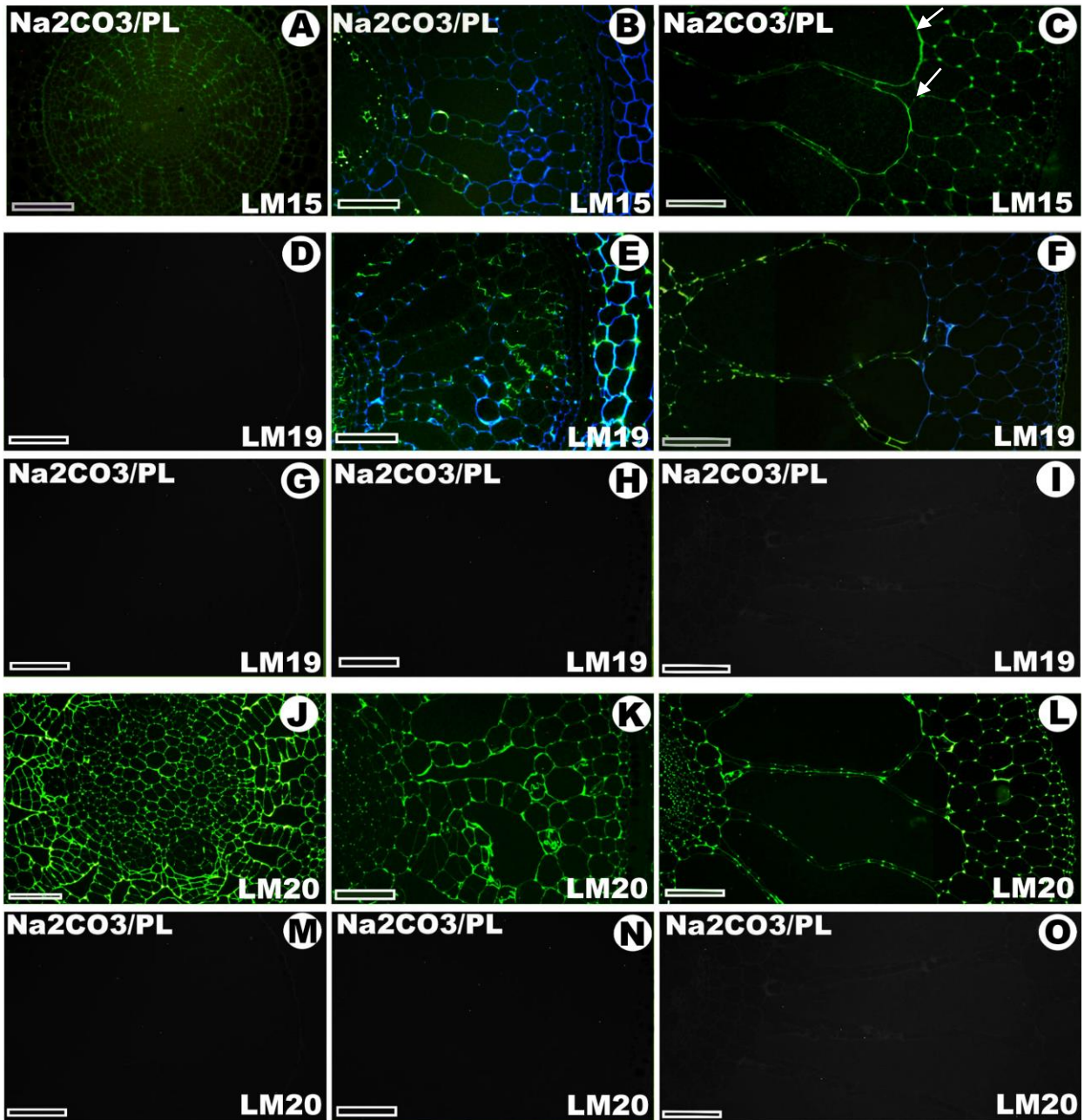
### Estádio 2

### Estádio 3



**FIGURA 14:** Secções transversais da raiz de *Pistia stratiotes*. Excitação em azul com utilização do calco flúor para localização espacial dos tecidos. **A, B, C.** Secções incubadas com LM15,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e pectato liase para detecção de xiloglucanos. **D, E, F.** Secções incubadas com LM19 para detecção de homogalacturanos de baixa metil-esterificação. **G, H, I.** Tratamento enzimático de carbonato de sódio e pectato liase antes da incubação com LM19. **J, K, L.** Secções tratadas com LM20 para detecção de homogalacturanos de alta metil-esterificação. **M, N, O.** Tratamento enzimático para LM20.

# Estádio 1      Estádio 2      Estádio 3



## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. ONTOGÊNESE DO AERÊNQUIMA

A organização do meristema apical da raiz (RAM) encontrado em *P. stratiotes* é do tipo Open Epidermal Monocot (OEM) (HEIMSCH & SEAGO, 2008). Este tipo de meristema não pode ser considerado aberto ou fechado em sua totalidade, apesar de ter as iniciais do procâmbio mais organizadas que as demais, não é possível notar separação clara das camadas iniciais. O RAM OEM pode ser considerado o precursor dos meristemas fechados e é comumente encontrado em monocotiledôneas (PILLAI & PILLAI, 1962) como *P. stratiotes* e *Acorus calamus* (SOUKUP *et al.*, 2005), apesar disso já foram encontradas em raízes de eudicotiledôneas como *Caltha palustres* e *Nymphaea odorata* (SEAGO *et al.*, 2000).

O padrão de células do córtex das raízes de plantas aquáticas podem ser influenciados pelo tipo de meristema apical (SEAGO *et al.*, 2000). A estrutura do córtex do tipo favo-de-mel, registrado em *Nymphaea odorata*, está relacionada ao meristema aberto que torna irregulares as divisões celulares que formam o córtex (SEAGO *et al.*, 2000). SEAGO *et al.* (2005) acreditam que o aerênquima misto de esquizógeno e expansígeno, presente em algumas espécies de Fabaceae, esteja relacionado ao meristema aberto que as espécies desta família apresentam. O meristema apical do tipo aberto é comumente encontrado em monocotiledôneas e tende a originar aerênquima com esquizogenia e posteriormente lise de algumas células (SEAGO *et al.*, 2005). O padrão de meristema apical da raiz, intermediário entre aberto e fechado, que *P. stratiotes* apresenta pode estar relacionado ao córtex com duas origens distintas dessa espécie.

Meristemas do tipo fechado parecem dar origem a córtex com células em organização radial, formadas através de divisões periclinais da proendoderme. Além de *P. stratiotes*, esse padrão de córtex com organização radial e células provenientes da proendoderme já foi encontrado em raízes de várias espécies (MENEZES *ET AL.*, 2005; BONA & MORRETES, 2003; MELO-DE-PINNA & MENEZES, 2003).

O córtex *P. stratiotes*, dividido em interno e externo, com o externo formado por parênquima fundamental e o interno originado da proendoderme, e sua formação envolvendo a separação de paredes de resultados obtidos reforçam a característica típica de aerênquima esquizógeno caracterizado por vários autores (DE BARY, 1877; JACKSON & ARMSTRONG, 1999; EVANS, 2003; SEAGO *et al.*, 2005; JUNG *et al.*, 2008, entre outros) e, devido a organização das lacunas de *P. stratiotes*, seu aerênquima pode ser classificado como esquizógeno radiado.

O início da separação das células para a formação do aerênquima no córtex da raiz de *P. stratiotes* observado logo no primeiro milímetro acima do ápice, e o aerênquima completamente desenvolvido a aproximadamente 20mm, evidenciam o início precoce das lacunas de ar, que pode ser relacionado ao habitat desta planta. A espécie em questão habita águas ricas em matéria orgânica e, conseqüentemente, com limitada disponibilidade de oxigênio. A ocorrência de aerênquima adjunto ao meristema apical nas raízes pode refletir adaptação ao ambiente aquático (BONA & MORRETES, 2003). No entanto, ainda não são claros os limites adaptativos com relação à formação do aerênquima (JUNG *et al.*, 2008).

A formação do córtex radial, possivelmente, reflete na formação de aerênquima do tipo lisígeno (JUSTIN & ARMSTRONG, 1987). Para Justin & Armstrong (1987) no córtex radial existem células predispostas a formar as

cavidades do aerênquima. Há possibilidade de que o córtex radial contenha células especializadas em divisão e ampliação, causando a separação celular dos raios (EVANS, 2003), assim como ocorre em *P. stratiotes*, e em *B. salzmanii* e *B. monnierioides* (BONA & MORRETES, 2003).

O aerênquima esquizógeno é mais comum em órgãos aéreos que recebem luz frequentemente (JUNG *et al.*, 2008). Raízes, que normalmente crescem em ambientes com pouca ou nenhuma luz, geralmente possuem lacunas de origem lisígena, sendo a origem esquizógena encontrada nesse órgão com menor frequência (SCULTHORPE, 1967). A presença de cloroplastos é incomum em raízes e em *P. stratiotes* essas organelas podem estar relacionadas ao processo de formação do aerênquima como fontes diretas de energia (RAVEN *et al.*, 2007).

A ontogênese da raiz de *P. stratiotes* evidenciou claramente que as lacunas de ar são formadas exclusivamente por separação, divisão e expansão das células, sem indícios de morte celular. Com esses resultados, podemos discordar da classificação de Seago *et al.* (2005), de lisígeno em pacotes, e identificar o padrão de aerênquima da raiz de *P. stratiotes* como esquizógeno radiado.

## **6.2. IMUNOLOCALIZAÇÃO DE POLÍMEROS DA PAREDE CELULAR**

As paredes celulares são compostas principalmente por celulose, hemiceluloses e pectinas, substâncias complexas e importantes na organização estrutural e funcionalidade da parede (YAPO, 2011). Existe uma abundância de pectinas em paredes de células em crescimento, divisão, na lamela média e nos ângulos celulares (MOHNEN, 2008).



A marcação evidente de LM5 somente nos estádios mais desenvolvidos do aerênquima confirma a ligação dos galactanos com a força mecânica da parede celular, uma vez que as células já haviam passado por todo processo de crescimento e estiramento e as grandes lacunas de ar poderiam comprometer a integridade do órgão. Willats *et al.* (1999) também não encontraram galactanos em paredes celulares do ápice de raízes e a presença das cadeias de galactanos e arabinanos podem estar relacionadas com o alongamento celular (MCCARTNEY *et al.*, 2000; MCCARTNEY & KNOX, 2002). E, além do alongamento, esses compostos também colaboram para a elasticidade da parede da célula (MCCARTNEY *et al.*, 2003). No caso das raízes de *P. stratiotes* a elasticidade das paredes das células corticais é fundamental, uma vez que as raízes são submersas e estão sujeitas ao movimento da água.

As hemiceluloses do tipo xiloglucanos são conhecidos por anexar microfibrilas de celulose através de ligações de pontes de hidrogênio podendo em conjunto com a celulose ter participação na expansão celular (MARCUS *et al.*, 2008). Para Pauly *et al.* (1999) os xiloglucanos são os maiores componentes hemicelulósicos de dicotiledôneas e monocotiledôneas (exceto gramíneas).

A detecção de epítomos de xiloglucano evidente nos vértices das células do córtex externo e nas células do aerênquima de todos os estádios é um padrão de ocorrência. Esse padrão pode indicar um papel para o xiloglucano na formação de espaços de ar do aerênquima ou até mesmo evidenciar uma estabilização celular através de uma associação com pectinas (MARCUS *et al.*, 2008).

A marcação decrescente, em relação ao desenvolvimento do órgão, de homogalacturonanos de alta metil-esterificação (LM20) e a crescente de

homogalacturonanos de baixa metil-esterificação (LM19) ocorreu pois os polímeros pécticos são sintetizados de forma altamente metil-esterificada no complexo de Golgi (JARVIS, 1984; MICHELI, 2001) e são desterificados durante o processo de crescimento celular (FEMENIA *et al.*, 1999), justificando a marcação mais evidente de LM20 nos dois primeiros estádios, já que as células ainda não haviam passado pelo processo de crescimento, separação e estiramento.

A demetil-esterificação dos homogalacturonanos nas paredes celulares é catalisada pela enzima pectina metil-esterase (PME), que reduz o pH enquanto libera metanol e prótons formando grupos carboxila, a estrutura resultante é conhecida como “egg-box” (WEN *et al.* 1999; MOHNEN, 2008; PELLOUX *et al.*, 2007), e pode formar géis e/ou se tornar alvo para enzimas que degradam pectinas (por exemplo, as poligalacturonases) que podem afetar diretamente a estrutura e rigidez da parede da célula (KNOX, 1997; ALEXANDRE *et al.*, 1997; PELLOUX *et al.*, 2007), favorecendo a separação (KOUTOJANSKY, 1987) e/ou expansão e crescimento celular (NARI *et al.*, 1986).

Essa demetil-esterificação é associada com o fim do crescimento celular, e o homogalacturonano de baixa esterificação resultante cria pontes salinas que contribuem para a adesão das células (MORRIS *et al.*, 2000; MOHNEN, 2008). No final de desenvolvimento do aerênquima, as células apresentam-se de forma bastante alongadas e bem aderidas formando os septos, corroborando assim a detecção elevada da homogalacturonano de baixa esterificação através do anticorpo LM19 nesse estádio.

## 7. CONCLUSÕES

O córtex da raiz é de origem mista, a região externa oriunda da camada externa ou basal do promeristema, e o córtex interno derivado da camada mais interna do meristema fundamental (proendoderme).

O aerênquima da raiz de *P. stratiotes* é do tipo esquizógeno radiado, sem morte celular, originado da endoderme meristemática, e com lacunas formadas a partir de divisões, separações e expansões celulares.

As células do córtex de *P. stratiotes* possuem elasticidade e são flexíveis, tanto pelo fato dessas plantas viverem submersas em ambiente aquático sujeitas a movimento da água como também pela necessidade de expansão, divisão e separação celular para a formação do aerênquima.

Se comparadas as células do córtex externo, é possível perceber que as células formadoras de aerênquima possuem algumas diferenças em galactanos e na desterificação péctica da parede celular. Porém essas modificações só são perceptíveis no estágio em que aerênquima já estava completamente desenvolvido, ou seja, a parede celular não possui variação desses polímeros pécticos e hemicelulósicos durante o desenvolvimento do tecido, mas atende às modificações morfológicas que estas células passam.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIKO, T.; KOTULA, L.; SHIONO; K. MALIK, A. I.; COLMER, T. D.; NAKAZONO, M. Enhanced formation of aerenchyma and induction of barrier to radial oxygen loss in adventitious roots of *Zea nicaraguensis* contribute to its waterlogging tolerance as compared with maize (*Zea mays* ssp. *Mays*). **Plant, Cell and Environment**, v.35, p. 1618-1630, 2012.

ALEXANDRE, F.; MORVAN, O.; GAFFÉ, J.; MAREK, A.; JAUNEAU, A.; DAUCHEL, H.; BALANGÉ, A.; MORVAN, C. Pectin methylesterase pattern in flax seedlings during their development. **Plant Physiol Biochem**, v.35, p.427–436, 1997.

ARMSTRONG, W.; JUSTIN, S. H. F. W.; BECKETT, P. M.; LYTHER, S. Root adaptation to soil waterlogging. **Aquatic Botany, Amsterdam**, v. 39, p. 57-73, 1991.

BONA, C.; MORRETES, B. L. Anatomia das raízes de *Bacopa salzmanii* (Benth.) Wettst. Ex Edwall e *Bacopa monnierioides* (Cham.) Robinson (scrophulariaceae) em ambientes aquático e terrestre. **Acta Botanica Brasilica**, v.17, n.1, p. 155-170, 2003.

BONA, C; MASTROBERTI, A; MOÇO, MCC; MARIATH, JEA. (2010) Alterações citológicas durante a formação do aerênquima na raiz de *Potamogeton polygonus* Cham. et Schldt. **Resumos do 61º Congresso Nacional de Botânica**, Manaus, AM, 2010.

BOZZOLA, J.J.; RUSSEL, L.D. ElectronMicroscopy. **Principles and Techniques for Biologists**. Jones e Bartlett Publishers, Boston, 1998.

BURTON, R.A.; GIDLEY, M.J.; FINCHER, G.B. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. **Nature Chemical Biology**, v.6, p. 724-732, 2010.

CALBO, M. E. R.; MORAES, J. A. P. V. de; CALBO, A. G. Crescimento, condutância estomática, fotossíntese e porosidade do Buriti sob inundaç o. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, n. 1, p. 51-58, 1998.

CASSAB, G. I. Plant cell wall proteins. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.49, p.281-309, 1998.

CLOWES, F.A.L. The promeristem and the minimal constructional centre in grass root  pices. **The New Phytologist**, v.53, p.108-116,1954.

CLOWES, F.A.L. **Apical meristems**. Blackwell, Oxford, UK. 1961.

COAN, A.I.; SCATENA, V.L.; GIULIETTI, A.M. Anatomia de algumas espécies aquáticas de Euriocaulaceae brasileiras. **Acta Botanica Brasilica**, v.16, n.4, p.371-384, 2002.

COLMER, T. D. Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, p. 17-36, 2003.

CONARD, H.S. **The Waterlilies: a monograph of the genus Nymphaea**. Washington, 1905.

COSGROVE, D.J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews: molecular cell biology**, v. 6, p. 850-861, 2005.

DE BARY, A. **Comparative anatomy of the vegetative organs of the phaeogams and ferns**. (Translation by Bower FO, Scott DH, 1884). Oxford: Clarendon Press. 1877.

DOLAN, L.; LINSTED, P.; ROBERTS, K. An AGP epitope distinguishes a central metaxylem initial from other vascular initials in the *Arabidopsis* root. **Protoplasma**, v.189, p.149-155, 1995.

DREW, M. C. Plant responses to anaerobic conditions in soil and solution culture. **Curr. Adv. Plant. Sci.**, v. 36, p.1-4, 1987.

DREW, M.C.; HE, C.; MORGAN, P.W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. **Trends in Plants Science**, v. 5, p. 123-127, 2000.

EVANS, D.E. Aerenchyma formation. **New Phytologist**, v.161, 35-49, 2003.

FEMENIA, A., WALDRON, K.W., ROBERTSON, J.A., SELVENDRAN, R.R. Compositional and structural modification of the cell wall of cauliflower (*Brassica oleracea* L. Varbotrytis) during tissue development and plant maturation. **Carbohydr. Polymer**, v.39, p. 101-108, 1999.

GABRIEL, B.L. **Biological electron microscopy**. Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1982.

GUNAWARDENA, A.H.L.A.N.; PEARCE, D.M.E.; JACKSON, M.B.; HAWES, C.R.; EVANS, D.E. Rapid changes in cell wall pectic polysaccharides are closely associated with early stages of aerenchyma formation, a spatially localized form of programmed cell death in roots of maize (*Zea mays* L.) promoted by ethylene. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, p. 1369-1375, 2001.

GUNAWARDENA, A.H.L.A.N.; PEARSE, D.M.E.; JACKSON, M.B.; HAWES, C.R.; EVANS, D.E. Characterisation of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.). **Planta**, v. 212, p. 205-214. 2001a.

GUNAWARDENA, A.H.L.A.N. Programmed cell death and tissue remodelling in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n.3, p.445-451, 2008.

HANAICH, T.; SATO, T.; IWAMOTO, T.; MALAVASIYAMASHIRO, J.; HOSHIRO, M.; MIZUNO, N. A stable lead by modification of Sato method. **Journal of Electron Microscopy**, v.35, p. 304-306, 1986.

HARHOLT, J.; SUTTANGKAKUL, A.; SCHELLER, H.V. Biosynthesis of pectin. **Plant Physiology**, v.153, p. 384-395, 2010.

HARRIS, N. Immunocytochemistry for light and electron microscopy. *In*: HARRIS N, OPARKA KJ (Eds.). **Plant Cell Biology**. A practical approach. Oxford University Press, London, p. 157-176, 1994.

HEIMSCH, C.; SEAGO, J.L. Organization of the root apical meristem in angiosperm. **American Journal of Botany**, v. 95, n. 1, p. 1-21, 2008.

JACKSON, M.B.; ARMSTRONG, W. Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. **Plant biology**, v.1, p. 274-287, 1999.

JARVIS, M.C. Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. **Plant, Cell and Environment**, v. 7, p.153–164,1984.

JONES, L.; SEYMOUR, G.B.; KNOX, J.P. Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1→4)-β-D-galactan. **Plant Physiol.**, v. 113, p.1405-1412, 1997.

JUNG, J.; LEE, S.C.; CHOI, H.K. Anatomical patterns of aerenchyma in aquatic and wetlands plants. **Journal of Plant Biology**, v. 51, p. 428-439, 2008.

JUSTIN, S.H.F.W.; ARMSTRONG, W. The anatomical characteristics of roots and plant response to soil flooding. **New Phytologist**, v.105, p. 465-495,1987.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of cell Biology**, v. 27, p. 137, 1965.

KNOX, J.P. Cell adhesion, cell separation and plant morphogenesis. **The Plant Journal**, v.2, n.2, p.137-141, 1992.

KNOX, J.P. The use of antibodies to study the architecture and the developmental regulation of plant cell walls. **International Review of Cytology**, v. 171, p.79-120, 1997.

KNOX, J.P. **Pectic polysaccharides**. 2003. <http://www.personal.leeds.ac.uk/~bmbjpk/pdf/pectab03.pdf> Acesso em 14/07/2013.

KNOX, J.P. Up against the wall: arabinogalactan protein dynamics at cell surfaces. **New Phytologist**, v.169, p.443-445, 2006.

KNOX, J.P. Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. **Curr. Opin. Plant Biol**, v.11, p.308–313, 2008.

KOLB, R. M.; MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; GILONI, P. C.; CORREA, G. T. Anatomia ecológica de *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs (Euphorbiaceae) submetida ao alagamento. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 21, n. 3, 1998.

KOUTOJANSKY, A. Molecular genetics of pathogenesis by soft-rot *Erwinias*. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.25, p.405–430, 1987.

LINERS, F.; LETESSON, J.J.; DIDEMBOURG, C.; CUTSEM, P.V. Monoclonal antibodies against pectin: recognition of a conformation induced by calcium. **Plant Physiology**, v.91, p.1419-1424, 1989.

LONGSTRETH, D. J.; BORKHSENIUS, O. N. Root cell ultrastructure in developing aerenchyma tissue of three wetland species. **Annals of Botany**, v. 86, p. 641-646, 2000.

MARCUS, S.E.; VERHERTBRUGGEN, Y.; HERVÉ, C.; ORDAZ-ORTIZ, J.J.; FARKAS, V.; PEDERSEN, H.L.; WILLATS, W.G.T.; KNOX, J.P. Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. **BMC Plant Biol.**, v.8, p. 60. 2008.

MASTROBERTI, A.A.; MARIATH, J.E.A. Immunocytochemistry of the mucilage cells of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae). **Revista Brasil. Bot.**, v.31, n.1, p.1-13, 2008.

MASTROBERTI, A.A.; MOÇO, M.C.C.; BONA, C.; MARIATH, J.E.A. (2011) Development of the root aerenchyma in *Potamogeton polygonus* Cham. et Schltdl: cell wall and cytological alterations. Abstracts, **XVIII International Botanical Congress**, Melbourne, Australia, July 2011.

MCCARTNEY, L.; KNOX, J.P. Regulation of pectic polysaccharide domains in relation to cell development and cell properties in the pea testa. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.707-713, 2002.

MCCARTNEY, L.; ORMEROD, A.P.; GIDLEY, M.J.; KNOX, J.P. Temporal and spatial regulation of pectic (1→4)-b-D galactan in cell walls of developing pea cotyledons: implication for mechanical properties. **Plant J.**, v. 22, p. 105–113, 2000.

MCCARTNEY, L.; STEELE-KING, C.G.; JORDAN, E.; KNOX, J.P. Cell wall pectic (1→4)-b-D-galactan marks the acceleration of cell elongation in the *Arabidopsis seedling* root meristem. **Plant J.**, v.33, p.447–454, 2003.

MCDOWELL, E. M.; TRUMP, B. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 100, p. 405-414, 1976.

MELO-DE-PINNA, G.F.A.; MENEZES, N.L. Meristematic endodermis and secretory structures in adventitious roots of *Richtera* Kuntze (Mutisieae-Asteraceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, n.1, p. 1-10, 2003.

MENEZES, N.L.; SILVA, D.C.; ARRUDA, R.C.O.; MELO-DE-PINNA, G.F.; CARDOSO, V.A.; CASTRO, N.M.; SCATENA, V.L.; SCREMIN-DIAS, E. Meristematic activity of the endodermis and the pericycle in the primary thickening in monocotyledons. Considerations on the "PTM". **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, n.2, p.259-274, 2005.

MICHELI, F. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. **Trends in Plant Science**, v.6, p.414-419, 2001.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.11, p. 266–270, 2008.

MORRIS, G.A.; FOSTER, T.J.; HARDING, S.E. The effect of the degree of esterification on the hydrodynamic properties of citrus pectin. **Food Hydrocolloid.**, v.14, p.227-235, 2000.

NARI, J.; NOAT, G.; DIAMANTIDIS, G.; WOULDSTRA, M.; RICARD, J. Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. III. Interplay between limited cell-wall autolysis, pectin methyl esterase activity and electrostatic effects in soybean cell wall. **Eur. J. Biochem**, v.155, p.199–210, 1986.

ODJEGBA, V.; FASIDI, I. Accumulation of Trace Elements by *Pistia stratiotes*: Implications for phytoremediation. **Ecotoxicology**, v. 13, n.7, p. 637 – 646, 2004.

PAULY, M.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. YORK, W.S. Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. **The Plant Journal**, v.20, n.6, p.629-639, 1999.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: theoretical and applied**. 2nd Ed. London, 1961.

PELLOUX, J.; RUSTÉRUCI, C.; ANDMELLEROWICZ, E.J. New insights into pectin methylesterase structure and function. **Trends Plant Sci.**, v.12, p.267–277, 2007.

PILLAI, A.; PILLAI, S.K. Air-spaces in the roots of some monocotyledons. **Indian Academy of Science Proceedings B**, v. 55, p. 296–301, 1962.

POTT, V.J.; POTT, A. **Plantas aquáticas do Pantanal**. Corumbá, EMBRAPA. 353p, 2000.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**, 7a. ed. Coord. Trad. J.E.Kraus. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2007.

SCHLEIDEN, J.M. **Scientific botany; botany as an inductive science**. London, 1849.



SCHMITZ, D.C.; SCHARDT, J.D.; LESLIE, A.G.; DRAY, F.A.; OSBORNE, J.A.; NELSON, B.V. The ecological impact and management history of three invasive alien aquatic plants in Florida. In B.N. McKnight (ed.). **Biological Pollution– the Control and Impact of Invasive Exotic Species**. Indianapolis: Indiana Acad. Sci. 261 p., 1993.

SCHUSSLER, E. E; LONGSTRETH, D. J. Aerenchyma develops by cell lysis in roots and cell separation in leaf petioles in *Sagittaria lancifolia* (Alismataceae). **American Journal of Botany**, v. 83, p. 1266–1273. 1996.

SCHUSSLER, E.E.; LONGSTRETH, D.J. Changes in cell structure during the formation of root aerenchyma in *Sagittarialancifolia* (Alismataceae). **American Journal of Botany**, v. 87, p. 12-19, 2000.

SCULTHORPE, C. D. **The biology of aquatic vascular plants**. Edward Arnold, London, England.610 p. 1967.

SEAGO JR, J.L.; PETERSON, C.A.; ENSTONE, D.E. Cortical ontogeny in roots of the aquatic plant, *Hydrocharis morsus-ranae* L. **Canadian Journal of Botany**, v.77, p.113-121, 1999.

SEAGO JR, J.L.; PETERSON, C.A.; KINSLEY, L.J.; BRODERICK, J. Development and structure of the root cortex in *Caltha palustris* L. and *Nymphaea odorata* Ait. **Annals of Botany**, v.86, p.631-640, 2000.

SEAGO JR., J.L.; PETERSON, C.A.; ENSTONE, D.E. Cortical development in roots of the aquatic plant *Pontederia cordata* (Pontederiaceae). **American Journal of Botany**, v.87, n.8, p.1116-1127, 2000a.

SEAGO JR., J.L.; MARSH, L.C.; STEVENS, K.J.; SOUKUP, A.; VOTRUBOVA, O.; ENSTONE, D.E. A re-examination of the root cortex in wetland flowering plants with respect to aerenchyma. **Annals of Botany**, v. 96, p.565-579, 2005.

SEMA – Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos. **Bacia Hidrográfica do Iguaçu. Revista Bacias Hidrográficas do Paraná– Série Histórica**. Curitiba, 2010. Disponível em:<[http://www.meioambiente.pr.gov.br/arquivos/File/corh/Revista\\_Bacias\\_Hidrograficas\\_do\\_Parana.pdf](http://www.meioambiente.pr.gov.br/arquivos/File/corh/Revista_Bacias_Hidrograficas_do_Parana.pdf)>. Acesso em: 24/05/2012.

SEVERIN, C.F. Origin and structure of the secondary root of *Sagittaria*. **Botanical Gazette**, v. 93, p. 93–99, 1932.

SOUKUP, A.; SEAGO, J.L.; VOTRUBOVA, O. Developmental anatomy of the root cortex of the basal monocotyledon, *Acorus calamus* (Acorales, Acoraceae). **Annals of Botany**, v.96, p.379-385, 2005.

SOUZA, W. Introdução à imunocitoquímica. In: SOUZA W (ed.). **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**, UENF: Rio de Janeiro, 1998.

VERHERTBRUGGEN, Y.; MARCUS, S.E.; HAEGER, A.; ORDAZ-ORTIZ, J.J.; KNOX, J.P. An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. **Carbohydr. Res.**, v. 344, p. 1858–1862, 2009.

WEN, F.S.; ZHU, Y.M.; HAWES, M.C. Effect of pectin methylesterase gene expression on pea root development. **Plant Cell**, v.11, n.6, p.1129-1140, 1999.

WILLATS, W.G.T.; MARCUS, S.E.; KNOX, J.P. Generation of a monoclonal antibody specific to (1→5)- $\alpha$ -L-arabinan. **Carbohydr. Res.**, v. 308, p.149-152, 1998.

WILLATS, W.G.T.; GILMARTIN P.M.; MIKKELSEN, J.D.; KNOX, J.P. Cell wall antibodies without immunization: Generation and use of de-esterified homogalacturonan block-specific antibodies from a naive phage display library. **Plant J.**, v. 18, p. 57–65, 1999.

WILLATS, W.G.T.; MCCARTNEY, L.; MACKIE, W.; KNOX, J.P. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Molecular Biology**, v.47, p 9-2, 2001.

YAPO, B.M. Pectic substances: from simple pectic polysaccharides to complex pectins: a new hypothetical model. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 373-385, 2011.