

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

Maria Elenice Alves Trevisan

Formação de aerênquima esquizo-lisígeno nas raízes de  
*Nymphoides humboldtiana* (Kunth) Kuntze  
(Menyanthaceae): ontogenia e caracterização química

Porto Alegre-RS  
2019

Maria Elenice Alves Trevisan

Formação de aerênquima esquizo-lisígeno nas raízes de *Nymphoides humboldtiana* (Kunth) Kuntze (Menyanthaceae): ontogenia e caracterização química

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Botânica.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Alexandra Antunes Mastroberti

Porto Alegre  
2019





“E amanhã, quando pela força do hábito, você pegar de volta a sua bagagem, largue-a de novo. Deponha-a outra vez e novamente, até aquele doce dia em que você descobrirá que não a está pegando de volta”.

(Max Lucado)

Dedico este trabalho a minha amiga Viviane Garci  
a minha amada sobrinha Dheniffer Alves Simões.

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Dr<sup>a</sup>. Alexandra Mastroberti, pela orientação, pela paciência e especialmente por tudo que me ensinou.

À técnica Juliana Troleis que me recebeu de braços abertos no LAVEG, obrigada por me ouvir, por sempre estar ao meu lado, pela imensa ajuda em tudo, por nos proporcionar um local agradável para trabalhar e pela grande amizade.

Ao José Richit por ter me ajudado e pelas muitas risadas que fizeram cada dia valer a pena.

À Valeria, Keyla, Vanessa, Fernanda e ao Vinícius pela amizade, pelo auxílio científico, pelo companheirismo e pelos inúmeros momentos agradáveis que passamos juntos. Por terem me compreendido mesmo quando a “Raquel” habitava em mim.

À Tamara Pastori pelo auxílio na edição das imagens.

À Aline Zevieski e a Julia Kilipper pela amizade.

Às minhas ex-orientadoras de iniciação científica Dra. Liliana Essi e Dra. Tânea Bisognin Garlet, agradeço por terem despertado em mim o gosto pela pesquisa e o encantamento pela Botânica.

Aos meus pais e minhas irmãs Alessandra, Denise e Deise Alves pela torcida.

À minha grande amiga do coração Viviane Garcia, por ter me ajudado a chegar até aqui, pela imensa ajuda em tudo, pela paciência, pelo companheirismo e por me fazer crescer.

À CAPES pela bolsa concedida.

À todos aqueles que direta ou indiretamente participaram de minha formação.

## **RESUMO**

O aerênquima é um tecido com grandes lacunas de ar que permite a circulação contínua de gases no interior da planta. Este tecido é muito comum em plantas aquáticas ou sujeitas ao alagamento, porém apresenta diferentes arquiteturas ou padrões morfológicos. Interessantemente, plantas com o mesmo tipo estrutural de aerênquima podem apresentar processos de formação distintos, ou seja, podem ser formados por esquizogenia (separação celular), lisigenia (morte celular) ou expansigenia (divisão seguida de expansão celular). *Nymphoides humboldtiana* é uma planta aquática comum nas lagoas brasileiras e, embora a arquitetura do aerênquima neste gênero tenha sido tema de alguns trabalhos, ainda há dados controversos sobre os processos de sua formação na raiz. A identificação do tipo de aerênquima dessa espécie é controversa na literatura, sendo identificado tanto como esquizógeno quanto lisígeno. Nesta dissertação, foi identificado o tipo de formação de aerênquima, incluiu-se também a identificação de compostos da parede celular através da imunocitoquímica, pois a parede celular tem papel fundamental na adesão celular e a identificação desses polímeros comparando as células formadoras do aerênquima com as células intactas da região do córtex durante formação do aerênquima podem ser fundamentais para o entendimento desses processos. *N. humboldtiana* foi coletada em lagoas do litoral norte do Rio Grande do Sul. As raízes foram processadas para análises em microscopia de luz em campo claro e testes imunocitoquímicos foram feitos sob microscopia de fluorescência. Na investigação da anatomia da raiz de *N. humboldtiana*, encontrou-se evidências de formação de aerênquima do tipo esquizo-lisígeno. Além disto, os resultados também demonstraram que durante processo de diferenciação celular ocorre perda de componentes estruturais da parede celular. Algumas pectinas, hemiceluloses e proteínas não foram observadas no estágio de maturação em células que sofrem alongamento celular e/ou colapso, diferentemente do que ocorrem nos demais estádios de desenvolvimento da raiz. Estes achados indicam que as células da raiz, durante o processo de amadurecimento, sofrem lisigenia.

**Palavras-chave:** imunocitoquímica da parede, aerênquima esquizo-lisígeno, ontogênese do aerênquima.

## ABSTRACT

The aerenchyma is a tissue with large air gaps that allows the continuous circulation of gases within the plant. This fabric is very common in aquatic plants or subject to flooding, but it has different architectures or morphological patterns. Interestingly, plants with the same structural type of aerenchyma can have different formation processes, that is, they can be formed by schizogeny (cell separation), lysigeny (cell death) or expansigeny (division followed by cell expansion). *Nymphoides humboldtiana* is a common aquatic plant in Brazilian lagoons and, although the architecture of the aerenchyma in this genus has been the subject of some studies, there are still controversial data on the processes of its formation at the root. The identification of the type of aerenchyma of this species is controversial in the literature, being identified as schizogenous and lysigenous. In this dissertation, the type of aerenchyma formation was identified, the identification of cell wall compounds by immunocytochemistry was also included, since the cell wall has a fundamental role in cell adhesion and the identification of these polymers by comparing aerenchyma-forming cells with intact cells in the cortex during aerenchyma formation may be instrumental in understanding these processes. *N. humboldtiana* was collected in ponds on the northern coast of Rio Grande do Sul. The roots were processed for analysis under light microscopy in a bright field and immunocytochemical tests were performed under fluorescence microscopy. In the investigation of the anatomy of the root of *N. humboldtiana*, evidence of formation of a schizo-lysigeny aerenchyma was found. In addition, the results also demonstrated that during the process of cell differentiation there is a loss of structural components of the cell wall. Some pectins, hemicelluloses and proteins were not observed in the maturation stage of cells that undergo cell elongation and/or collapse, unlike what occurs in the other stages of root development. These findings indicate that the root cells, during the ripening process, undergo lysigenous.

**Keywords:** immunocytochemistry of the wall, schizo-lysigeny aerenchyma and ontogenesis of the aerenchyma.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Diagramas dos tipos de aerênquima: representação do estágio meristemático ao aerênquima e estágio maduro; (A) expansígeno favo de mel; (B) expansígeno radial; (C) esquizógeno; (D) esquizo-lisígeno; (E) lisígeno em pacotes; (F) lisígeno radial; (G) lisígeno tangencial. Espaços intercelulares e lacunas são coloridos de azul claro (Imagem de Seago *et al.*, 2005).....18

**Figura 2:** Diagrama esquemático dos principais componentes estruturais da parede celular primária e sua disposição. Microfibrilas de celulose (bastões cinza), hemiceluloses (cordões azuis e purpúreos). As pectinas (cordões vermelhos, amarelos e verdes) formam uma matriz de entrelaçamento que controla o espaçamento das microfibrilas e a porosidade da parede (Imagem de Cosgrove, 2005 adaptado por Taiz *et al.*, 2017).....21

**Figura 3:** Aspecto geral de *N. humboldtiana* e local da coleta. **A.** hábito da planta. **B.** Hábito da planta em fenófase reprodutiva. **C.** Raiz da planta com os estádios de desenvolvimento: estágio I corresponde ao ápice da raiz, estágio II corresponde a região de alongamento, estágio III e IV corresponde a região de maturação. **D-E.** Local da coleta.....31

**Figura 4:** Seções longitudinais e transversais da raiz de *Nymphoides humboldtiana*. **A.** Corte longitudinal do ápice radicular. **B.** Meristema apical em corte longitudinal mostrando as iniciais corticais que estão delimitadas por um traço (zonas a-b-c), a coifa (cf), protoderme (seta), pró-exoderme (cabeça da seta), meristema provascular (chave) e espaço intercelular (seta transparente). **C.** Corte transversal do ápice radicular apresentando coifa (cf), protoderme (seta), pró-exoderme (cabeça da seta), pró-endoderme (seta transparente), derivadas da endoderme meristemática (dem), arranjo em Y do córtex (Y) e meristema provascular (mp). **D.** Região de alongamento da raiz apresenta epiderme (seta), exoderme (cabeça da seta), córtex (cx), afastamento entre as células (seta transparente) e cilindro vascular (cv). **E.** Região inicial da maturação da raiz apresentando as lacunas de ar (ar), células dos septos integras (ci), células alongadas (seta), cortex (cx) e cilindro vascular (cv). **F.** Região de maturação próxima ao colo, com abundantes lacunas de ar, célula colapsada (seta) **G.** Região de maturação de outro espécime de *N. humboldtiana*, que apresenta grandes lacunas de ar (ar), célula íntegra do

septo (ci) e cilindro vascular (cv). Os septos possuem poucas células integras (ci) e muitas células colapsadas (seta) **H.** Detalhe da Fig 4G. célula completamente colapsada (seta). (Barra de escala: A= 50µm; B,C= 20µm; D= 50µm; E- F= 100µm; G=10µm; H=50µm e I= 10µm). .....35

**Figura 5:** Seções transversais da raiz de *N. humboldtiana*. Estádio 1 (zona meristemática). **A.** Seção corada com azul de toluidina observada em microscopia de luz em campo claro. **B-I.** Seções equivalentes sob microscopia de epifluorescência. **B-C.** Tratamento de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e pectato liase, seguido pela incubação de LM18 e LM20, respectivamente. LM18 (anti-HGs de baixa metil-esterificação) e LM20 (anti-HGs de alta metil-esterificação) mostrando distribuição semelhante para estes epítomos. **D-I.** Seções tratadas previamente com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e pectato liase. **D-E.** LM5 (anti-galactanos) e LM6 (anti-arabinanos) mostraram tênue marcação para RGs pécticos. **F-G.** LM15 (anti-xiloglucanos) mostrou intensa marcação em todos os tecidos enquanto que LM21 (anti-mananos) não apresentou marcação para este epítomo. **H.** JIM13 (anti-AGPs) demonstrou a presença deste epítomo. **I.** LM1 (anti-extensina) não apresentou marcação. (Escala: 20µm).....42

**Figura 6:** Seções transversais da raiz de *N. humboldtiana*, estágio 2 (zona de alongamento). **A.** Seção corada com azul de toluidina observada em microscopia de luz em campo claro. **B-J.** Seções equivalentes sob microscopia de epifluorescência. **B-C.** Seção incubada com LM18, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e LM19 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para detecção de homogalacturanos de baixa metil-esterificação. **D.** Seção incubada com LM20 e pectato liase para detecção de homogalacturanos de alta metil-esterificação. **E-J.** Seções tratadas previamente com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e pectato liase. **E-F.** LM5 (anti-galactanos) e LM6 (anti-arabinanos) mostraram forte marcação para RGs pécticos. **G-H.** LM15 (anti-xiloglucanos) mostrou fraca marcação em algumas células, enquanto que LM21 (anti-mananos) apresentou a marcação deste epítomo. **I.** JIM13 (anti-AGPs) demonstrou a presença deste epítomo. **J.** LM1 (anti-extensina) não apresentou marcação deste epítomo nas células do córtex. (Escala: A=20 µm; B-J = 50µm).....43

**Figura 7:** Seções transversais da raiz de *N. humboldtiana*, estágio 3 (zona de maturação). **A.** Seção corada com azul de toluidina observada em microscopia de luz em campo claro.

B-J. Seções equivalentes sob microscopia de epifluorescência. B-C. Seção incubada com LM18, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e LM19 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> respectivamente, para detecção de homogalacturanos de baixa metil-esterificação. D. Seção incubada com LM20 e pectato liase para detecção de homogalacturanos de alta metil-esterificação. E-J. Seções tratadas previamente com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e pectato liase. E-F. LM5 (anti-galactanos) e LM6 (anti-arabinanos) mostraram marcação restrita para RGs pécticos. G-H. LM15 (anti-xiloglucanos) não apresentou marcação, mas o LM21 (anti-mananos) apresentou forte marcação deste epítipo. I. JIM13 (anti-AGPs) demonstrou a presença deste epítipo. J. LM1 (anti-extensina) não apresentou marcação deste epítipo. (Escala: A-H= 50µm; G e I=100µm).....44

**Figura 8:** Seções transversais da raiz de *N. humboldtiana*, estágio 4 (zona de maturação próxima ao colo). **A.** Seção corada com azul de toluidina observada em microscopia de luz em campo claro. **B-J.** Seções equivalentes sob microscopia de epifluorescência. **B-C.** Seção incubada com LM18, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e LM19 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> respectivamente, para detecção de homogalacturanos de baixa metil-esterificação. **D.** Seção incubada com LM20 e pectato liase para detecção de homogalacturanos de alta metil-esterificação. **E-J.** Seções tratadas previamente com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e pectato liase. **E-F.** LM5 (anti-galactanos) e LM6 (anti-arabinanos) mostraram marcação para RGs pécticos. **G-H.** LM15 (anti-xiloglucanos) não apresentou marcação, mas o LM21 (anti-mananos) apresentou forte marcação deste epítipo. **I.** JIM13 (anti-AGPs) apresentou tênue marcação deste epítipo. **J.** LM1 (anti-extensina) não apresentou marcação deste epítipo. (Escala: A-C= 50µm; D-I=100µm).....46

**Figura 9:** Seções transversais da raiz de *N. humboldtiana*, estágio 4 (zona de maturação de outra espécime). **A.** Seção corada com azul de toluidina observada em microscopia de luz em campo claro. **B-I.** Seções equivalentes sob microscopia de epifluorescência. **B.** Seção incubada com LM18 e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para detecção de homogalacturanos de baixa metil-esterificação. **C.** Seção incubada com LM20 e pectato liase para detecção de homogalacturanos de alta metil-esterificação. **D-I.** Seções tratadas previamente com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e pectato liase. **D-E.** LM5 (anti-galactanos) e LM6 (anti-arabinanos) mostraram marcação para RGs pécticos. **F-G.** LM15 (anti-xiloglucanos) não apresentou marcação, mas o LM21 (anti-mananos) apresentou forte marcação deste epítipo. **H.** JIM13 (anti-

AGPs) apresentou tênue marcação deste epítopo. **I.** LM1 (anti-extensina) não apresentou marcação deste epítopo. (Escala: A-C-D- F-G-H-I= 100µm; B e E=50µm)

.....47

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1:** Anticorpos monoclonais e suas especificidades.....30

**Tabela 2:** Comparação de polímeros péclicos e hemicelulósicos nas células do córtex e nas células formadoras de aerênquima da raiz de *N. humboldtiana* em seus diferentes estádios de desenvolvimento. Anticorpos monoclonais utilizados para a identificação de epítomos: LM18 e LM19 (homogalacturonanos de baixa metil-esterificação), LM20 (homogalacturonanos de alta metil esterificação), LM5 (galactanos), LM6 (arabinanos) LM21 (mananos), LM15 (xiloglucanos), JIM13 (proteínas arabinogalactanos) e LM1: (extensinas).....41

## SUMÁRIO

1.	15
1.1. Aerênquima	16
1.2. Parede celular	20
1.3. Material botânico	24
2.	26
3.	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2. Objetivos específicos:	27
4.	27
4.1. Área de coleta	28
4.2. Processamento do material para microscópio de luz em campo claro	28
4.3. Immunolocalização	29
5.	32
5.1. Desenvolvimento da raiz e formação do aerênquima em <i>Nymphoides humboldtiana</i> .	32
5.2. Distribuição dos epítomos pécticos, hemicelulósicos e proteicos da parede celular durante a formação do aerênquima.	37
6. DISCUSSÃO	48
6.1. Tipos de meristemas em plantas aquáticas: algumas considerações em <i>N. humboldtiana</i>	48
6.3. Processo de formação do aerênquima	50
6.4. Distribuição desigual dos epítomos pécticos	52
6.5. Distribuição heterogênea dos epítomos hemicelulósicos e proteicos da parede celular durante a formação de aerênquima	54
6. CONCLUSÃO	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

### 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1. Aerênquima

A história evolutiva dos organismos fotossintetizantes teve início há milhares de anos em ambientes aquáticos. As plantas colonizaram o ambiente terrestre e se adaptaram às diferentes condições de luz, temperatura, disponibilidade de água, oxigênio e gás carbônico. No entanto, diversos grupos de angiospermas, não relacionados

evolutivamente entre si, retornaram aos ambientes aquáticos, compartilhando inúmeras características por convergência adaptativa (Sculthorpe, 1967).

Vários os problemas são enfrentados pelas plantas aquáticas vasculares, como a baixa disponibilidade de oxigênio, gás carbônico, nutrientes; a dificuldade no transporte e distribuição de nutrientes minerais do sedimento para os órgãos da planta (Rascio, 2002). O ambiente selecionou plantas com características que permitiram seu restabelecimento no ambiente aquático. Uma das características adaptativas comum nestas espécies é a presença de aerênquima, que é um tecido com grandes lacunas de ar que permite a circulação contínua de gases por dentro da planta (Sculthorpe, 1967), otimizando o fluxo de nutrientes (Postma & Lynch, 2011). O aerênquima também torna a planta menos densa, o que favorece sustentação ou flutuação dentro da água (Rascio, 2002). A fim de aumentar a resistência do corpo do vegetal, o aerênquima pode apresentar septos transversais formadores de compartimentos, denominados de diafragma, o que confere estabilidade mecânica e também serve como barreira contra invasão de água causada por injúria (Williams & Barber, 1961; Scremin-Dias *et al.*, 1999 e Bona & Morretes, 2003).

O aerênquima apresenta duas formas de origem fisiológica: constitutiva e induzida. A forma constitutiva ocorre quando o aerênquima é formado como parte do desenvolvimento da planta. A maioria das plantas aquáticas possuem aerênquima constitutivo, como por exemplo *Juncus effusus* (Visser & Bögemann, 2006), *Sagittaria lancifolia* (Schussler & Longstreth, 2000) e *Pistia stratiotes* (Flores-Borges *et al.*, 2016). O aerênquima induzido é formado em resposta a situações de estresse (Evans, 2003), como a hipóxia induzida (Dantas *et al.*, 2001; Holzschuh *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2010 e Pires *et al.*, 2015) alta temperatura, impedância mecânica (Evans, 2003) e carência de nutrientes como o nitrogênio (He *et al.*, 1992), fósforo (Coelho *et al.*, 2006), e sulfato (Bouranis *et al.*, 2006).

O aerênquima também se distingue pelos diversos padrões morfológicos. Várias classificações foram propostas, entre elas a de De Bary, (1877), Sculthorpe, (1967), Justin & Armstrong, (1987), Seago *et al.* (2005) e Jung *et al.* (2008).

A primeira classificação do aerênquima foi realizada por De Bary (1877), que se baseou no processo ontogênico e classificou o aerênquima como lisígeno e esquizógeno. No aerênquima lisígeno há o envolvimento de morte celular conforme uma serie ordenada de eventos que resultam na formação das lacunas de ar. No esquizógeno, os espaços

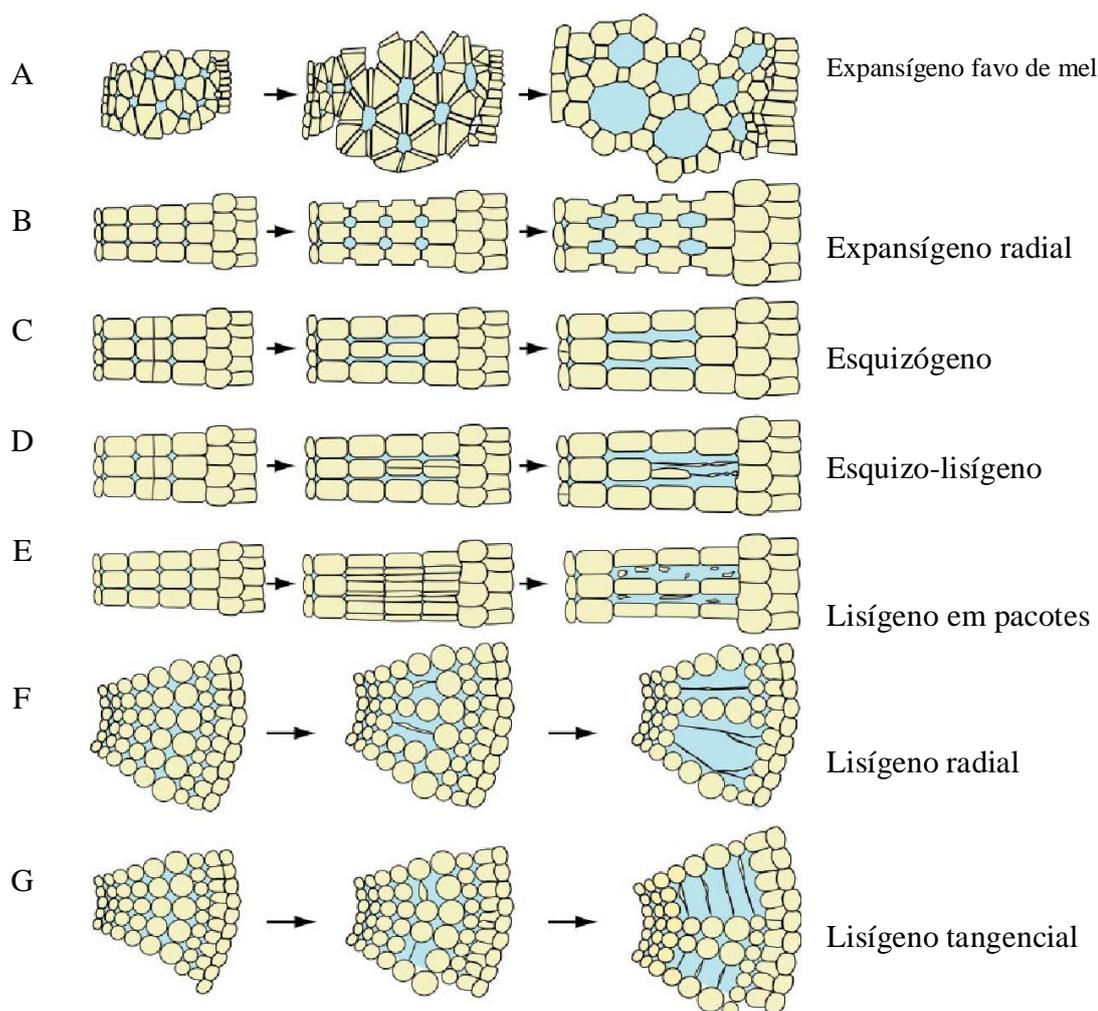
gasosos intercelulares formam-se por separação celular durante o desenvolvimento do tecido sem que ocorra a morte celular. Geralmente este tecido tem origem constitutiva, ocorrendo em muitas espécies de ambientes aquáticos (Evans, 2003).

Seago *et al.* (2005) descreveram um outro processo de formação de aerênquima, o expansígeno, o qual caracteriza-se pela formação de lacunas ou câmaras de ar pela divisão seguida de expansão celular durante o desenvolvimento do órgão ainda meristemático, sem que ocorra separação, colapso (célula que perde turgor) ou morte das células. Muitos autores ainda mantêm a classificação de tipo “esquizógeno” no lugar de “expansígeno” como no caso da revisão de Jung *et al.* (2008), classificando como esquizógeno “favo-de mel”. Seago *et al.* (2005) ainda revisitaram a classificação de aerênquima proposta por Justin e Armstrong (1987), propondo quatro tipos de aerênquima lisígeno: lisígeno “em pacotes”, esquizo-lisígeno, lisígeno radial e lisígeno tangencial. Nos três últimos, as paredes celulares das células colapsadas permanecem intactas, embora o protoplasto seja degenerado. Esse é um processo comum em plantas aquáticas, uma vez que a sobrevivência de algumas células corticais no aerênquima é fundamental para a integridade da estrutura da raiz e para o transporte de nutrientes pela via apoplástica ou simplástica (Fig 1).

Meristema

Intermediário

Maduro



**Figura 1:** Diagramas dos tipos de aerênquima: representação da ontogenia dos diferentes tipos de aerênquima: (A) expansígeno favo de mel; (B) expansígeno radial; (C) esquizógeno; (D) esquizo-lisígeno; (E) lisígeno em pacotes; (F) lisígeno radial; (G) lisígeno tangencial. Espaços intercelulares e lacunas são coloridos de azul claro (Imagem adaptado de: Seago *et al.*, 2005).

Jung *et al.* (2008) observaram que nas raízes o aerênquima esquizógeno ocorre com menor frequência do que o aerênquima lisígeno. Tanto o aerênquima esquizógeno, como o lisígeno apresentam o mesmo resultado final, ou seja, um tecido cheio de espaços gasosos, porém a esquizogenia ou expansigenia, se considerar o conceito de Seago *et al.* (2005), parece ser um processo mais ordenado, pois as lacunas são criadas por uma distribuição espacialmente regular de expansão celular e divisão (Evans, 2003).

Jung *et al.* (2008) se basearam na morfologia do aerênquima de acordo com o arranjo das células e propuseram classificar o aerênquima em cinco tipos: favo de mel, lisígeno tangencial e radial, aerênquima em forma de roda e oco. Segundo os autores,

essas diferentes morfologias podem indicar também processos fisiológicos relacionando, neste trabalho, o tipo de aerênquima ao hábito da planta e também com relação à filogenia.

Muitas espécies formam aerênquima em raízes, folhas e caules (Jackson & Armstrong, 1999). As raízes estão presentes em todas as plantas vasculares, possuem inúmeras funções, como ancorar a planta no solo, absorver água e minerais e armazenar fotoassimilados. Os processos de desenvolvimento da raiz são controlados por muitos fatores endógenos e altamente influenciados pelo ambiente. Os sistemas radiculares possuem grande plasticidade fenotípica, que é resultado da sua alta capacidade adaptativa, possibilitando explorar diversos ambientes (Jung & McCouch, 2013). As respostas adaptativas envolvem inúmeros processos fisiológicos e alterações morfoanatômicas nas raízes, como a formação de aerênquima (Grandis *et al.*, 2010 e Bellini *et al.*, 2014).

Podemos inferir que os eventos esquizógenos, expansígenos e lisígenos são respostas estruturais-fisiológicas e a arquitetura final deste tecido é muito variável, mostrando a plasticidade fenotípica como resposta adaptativa. De fato, ainda não estão claros os processos envolvidos que levam à formação dessa variabilidade. Além das incongruências para a classificação do aerênquima, faltam estudos do que ocorre em nível celular. Há vários estudos que focam as mudanças estruturais durante a formação do aerênquima (e.g. Jung *et al.*, 2008), entretanto, modificações citológicas em nível ultraestrutural ou do ponto de vista bioquímico também são relevantes para entender esses processos de desenvolvimento e adaptativos. Baseado nisso, um dos focos deste trabalho foi a detecção dos polímeros que constituem a parede celular de células formadoras do aerênquima.

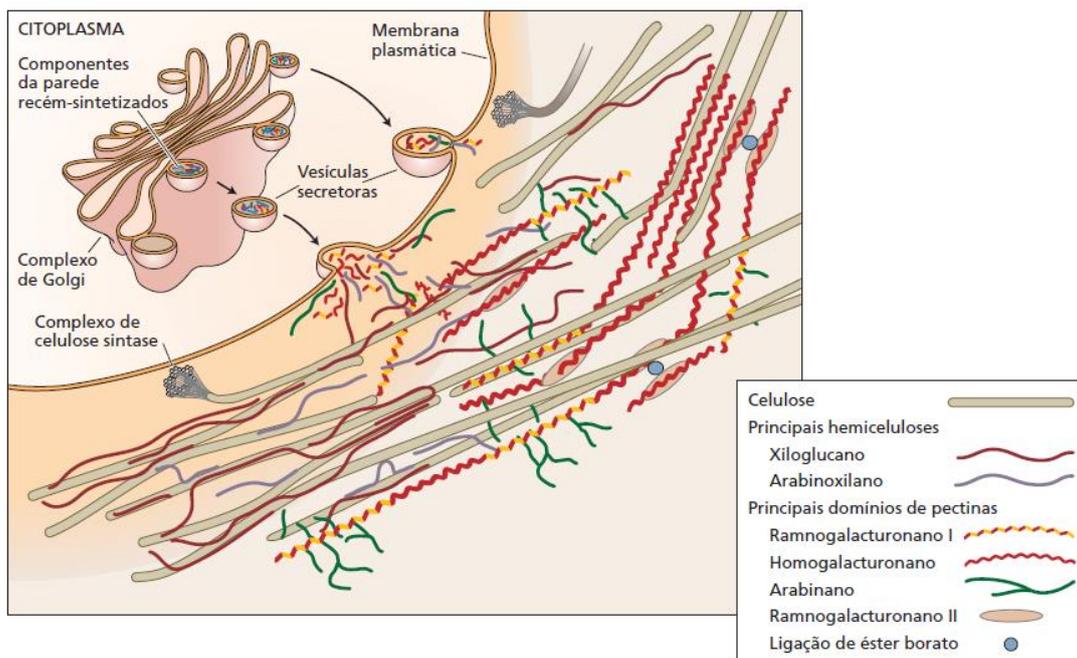
A parede celular tem um importante papel na força mecânica de tecidos e órgãos (Albersheim *et al.*, 2010). A heterogeneidade dos polímeros que se modificam espacial e temporalmente ao longo do desenvolvimento celular, tais como celulose, hemiceluloses, pectinas, proteínas, compostos fenólicos, etc, reflete o quanto a parede celular é uma estrutura multifuncional e dinâmica, o que implica em diferentes processos de sinalização e características estruturais e funcionais variáveis em determinadas células durante o desenvolvimento de tecidos (Lee *et al.*, 2011). Uma característica importante da parede celular é o seu papel na adesão/separação celular (Jarvis *et al.*, 2003). Logo, a identificação de elementos que envolvam possíveis alterações na parede celular e que possam auxiliar na compreensão dos processos de esquizogenia ou lisigenia é relevante para o estudo de aerênquima.

Alguns trabalhos nesta abordagem já identificaram que a parede celular fornece pistas de processos de desenvolvem como os realizados para raízes que formam aerênquima de forma indutiva como de milho (Gunawardena *et al.*, 2001) e cana-de-açúcar (Leite *et al.*, 2017) ou para raízes que desenvolvem aerênquima de forma constitutiva como o caso de *Pistia stratiotes* (Flores-Borges *et al.*, 2016) e *Potamogeton polygonus* (Bona *et al.*, 2017).

## 1.2. Parede celular

As células vegetais são delimitadas por uma parede celular mecanicamente forte que determina a resistência mecânica das estruturas vegetais. A parede atua como um “exoesqueleto” celular, que controla a sua forma e que possibilita o desenvolvimento de pressões de turgor altas. Além disso, atua em muitos processos essenciais de crescimento e desenvolvimento vegetal, participa na adesão e na sinalização celular, atua como uma barreira de difusão, limitando o tamanho e os tipos de moléculas que podem alcançar a membrana plasmática (Taiz *et al.*, 2017).

A composição da parede e as estruturas dos polissacarídeos não são estáticas, mas podem mudar durante o desenvolvimento e podem variar significativamente de uma célula para outra; No entanto, elas são essencialmente compostas por microfibrilas de celulose incluídas em uma matriz de polissacarídeos, proteínas e outros polímeros produzidos pela célula (Fig. 2). Também apresenta considerável teor de água, que esta localizada principalmente na matriz mantendo a capacidade da parede de se expandir durante o aumento celular (Fry, 2001; Burton *et al.*, 2010 e Taiz *et al.*, 2017).



**Figura 2:** Diagrama esquemático dos principais componentes estruturais da parede celular primária e sua disposição. Microfibrilas de celulose (bastões cinza), hemiceluloses (cordões azuis e purpúreos). As pectinas (cordões vermelhos, amarelos e verdes) formam uma matriz de entrelaçamento que controla o espaçamento das microfibrilas e a porosidade da parede (Imagem de Cosgrove, 2005 adaptado por Taiz *et al.*, 2017).

A celulose é o principal componente fibrilar da parede celular de todas as plantas, é composta de uma matriz de  $\beta(1\rightarrow4)$  glucanos. As cadeias de celulose (glucano) são conectadas por pontes de hidrogênio formando feixes fortes, conhecido como microfibrilas, que conferem à parede sustentação estrutural, devido ao sistema de fibras entrelaçadas (Srivastava *et al.*, 2017 e Taiz *et al.*, 2017).

O termo "hemicelulose" refere-se aos polissacarídeos não-celulósicos e não-pécticos encontrados nas paredes celulares primárias e secundárias (Srivastava *et al.*, 2017). Diferente da celulose, as hemiceluloses são compostas por diferentes tipos de monômeros além da glicose, as cadeias são ramificadas com cadeias laterais curtas, são classificadas conforme o tipo de açúcar que a compõe (Burton *et al.*, 2010). A hemicelulose desempenha funções estruturais de união de microfibrilas de celulose adjacentes (Srivastava *et al.*, 2017).

A hemicelulose dominante nas paredes celulares primárias da maioria das plantas terrestres é o xiloglucano, que interage fortemente com a celulose, formando ligações de hidrogênio entre suas respectivas cadeias de  $\beta$ -glucano (Lopez *et al.*, 2010). Já os mananos estão mais presentes na parede secundária (Srivastava *et al.*, 2017).

Pectina é o nome dado a um grupo complexo e diverso de polissacarídeos hidrofílicos e formadores de gel, ricos em resíduos de açúcares ácidos, sendo o seu principal o ácido galacturônico ligado em  $\alpha(1\rightarrow4)$  com grau variável de grupos carboxilas metil esterificados (O'Neill *et al.*, 1990). As pectinas e as hemiceluloses são denominadas polissacarídeos da matriz. Elas atuam como material de preenchimento hidrofílico que evita a agregação e o colapso da rede de celulose, e também determinam a porosidade da parede celular a macromoléculas. As pectinas estão concentradas, particularmente, na lamela média, em especial nas zonas de junção tricelulares, sendo importantes para a adesão celular, pois a capacidade das pectinas para formar ligações cruzadas entre si e, possivelmente, em outros polímeros da parede é importante para a adesão célula-célula (O'Neill *et al.*, 2001 e Taiz *et al.*, 2017). Foram definidas três classes de pectinas, que podem formar domínios separados de uma cadeia polimérica contínua: o homogalacturonano (HG), o ramnogalacturonan-I (RGI) e o ramnogalacturonan II (RGII) (Pabst *et al.*, 2013 e Srivastava *et al.*, 2017).

As paredes celulares primárias também podem conter de 2 a 10% de proteínas não enzimáticas, muitas das quais são glicoproteínas. Um dos grupos de proteínas são as extensinas, que são glicoproteínas que estão envolvidas na montagem da parede celular, no controle e manutenção do formato celular e no crescimento celular. Estas proteínas desempenham papéis importantes na integridade estrutural da parede celular, cicatrização de feridas e defesa de plantas (Srivastava *et al.*, 2017 e Taiz *et al.*, 2017). Outra classe de glicoproteínas são as proteínas arabinogalactanos (AGPs). Essas proteínas hidrossolúveis são fortemente glicosiladas. Mais de 90% da massa de AGPs podem ser resíduos de açúcar, sobretudo galactose e arabinose. As AGPs podem funcionar na adesão celular e na sinalização durante a diferenciação da célula (Taiz *et al.*, 2017).

Segundo Lipchinsky (2013) é necessária uma grande diversidade de proteínas estruturais e enzimas para remodelar estruturas da parede celular, levando à extensibilidade e afrouxamento da parede. Enzimas de afrouxamento e/ou de degradação atuam na parede durante a formação do aerênquima, causando modificações nos componentes da parede celular das células formadoras de aerênquima (He *et al.*, 1996 e Saab & Sachs, 1996).

Considerando a complexidade e importância dos componentes da parede celular para a compreensão dos processos de formação do aerênquima, temos a hipótese de que

diferentes polímeros que formam as paredes celulares podem esclarecer como ocorre este processo de formação.

São poucos os trabalhos que incluem as observações da parede celular durante a formação do aerênquima em raízes, entre eles os trabalhos de Gunawardena *et al.* (2001), Flores-Borges *et al.* (2016), Bona *et al.* (2017) e Leite *et al.* (2017).

Gunawardena *et al.* (2001) utilizaram a imunocitoquímica através de anticorpos monoclonais específicos para avaliar o grau de metil-esterificação de pectinas no aerênquima em formação raízes de *Zea mays* (Poaceae). Esses autores evidenciaram que, nas paredes celulares de raízes imaturas, as pectinas desterificadas estavam presentes nas células intactas do córtex celular, porém nas células formadoras de aerênquima, elas foram localizadas apenas nas junções triangulares. Em raízes maduras, onde o aerênquima é mais desenvolvido, ocorreu perda de marcação nas junções triangulares. Já nas paredes celulares de raízes maduras, a marcação de pectinas esterificadas ocorreu em todas as células, inclusive nas células que formam o aerênquima.

Flores-Borges *et al.* (2016) também utilizaram anticorpos monoclonais para demonstrar alterações morfológicas e bioquímicas na parede celular durante a formação do aerênquima esquizógeno em raízes de *Pistia stratiotes* (Araceae) das células que formam o aerênquima. As pectinas metil-esterificadas foram identificadas apenas nas zonas de adesão.

Bona *et al.* (2017) investigaram *Potamogeton polygonus* e a formação de um aerênquima constitutivo com base na distribuição de glicanos da parede celular. Foram observadas ao longo do desenvolvimento da raiz, mudanças na proporção de pectinas e hemiceluloses.

Leite *et al.* (2017) analisaram a formação de aerênquima lisígeno em raízes de *Saccharum officinarum* e constataram que esta não está relacionada diretamente à completa degradação das paredes das células corticais. Ocorreu degradação de  $\beta$ -glucano e de pectinas, principalmente daquelas associadas às lamelas médias, resultando na separação das células. A degradação destes polissacarídeos e as alterações ocorridas em xiloglucanos podem estar relacionadas com as alterações das características físicas das paredes, tornando-as mais suscetíveis a dobras e colapsos, gerando as lacunas de ar.

É interessante ressaltar de que todos estes trabalhos demonstraram que a marcação de alguns glicanos ocorre restritamente nos vértices das células que formam o aerênquima

após a maturação, enquanto que as células intactas do córtex apresentam estas marcações amplamente distribuídas em suas paredes celulares.

O desenvolvimento do aerênquima muitas vezes é induzido por fatores abióticos, sugerindo que o aerênquima seja um excelente modelo para compreender processos biológicos, como por exemplo, respostas adaptativas relacionadas a adesão e/ou morte celular. Ao mesmo tempo, as características da parede celular podem fornecer novas informações sobre as células formadoras de aerênquima, principalmente para aqueles tipos em que as células sofrem estiramento.

### 1.3. Material botânico

Menyanthaceae da ordem Asterales é uma família morfológicamente diversa de plantas aquáticas e de zonas úmidas, sendo eudicotiledônea. É constituída por 60 a 70 espécies distribuídas em todo o mundo (Tippery *et al.*, 2008; APG IV, 2016), sendo *Nymphoides* o gênero com maior riqueza de espécies.

*Nymphoides* é o único gênero de Menyanthaceae com ocorrência no Brasil, com duas espécies registradas: *Nymphoides grayana* (Grizeb.) Kuntze e *Nymphoides humboldtiana* (Kunth) Kuntze, que anteriormente era identificada como *N. indica* (Francener *et al.*, 2014 e Giulietti *et al.*, 2015). Segundo a Flora do Brasil 2020, até o momento, existem registros para *N. grayana* em algumas cidades da região norte, nordeste, centro oeste e sudeste do país. Para *N. humboldtiana* há registros para todas as regiões brasileiras.

No estado do Rio Grande do Sul (RS) *N. humboldtiana* é popularmente conhecida como coração flutuante, ninfeia e estrela branca (Figs. 3A e 3B). Esta espécie é flutuante, submersa ou anfíbia, habita áreas alagadas de águas paradas ou com pouca movimentação. É perene, algumas vezes anual, com rizoma curto e raízes adventícias abundantes, que são firmemente enraizadas ao substrato. Possui caules ascendentes, com folhas flutuantes suborbiculares ou reniformes e suas folhas alcançam a superfície através de pecíolos longos e flexíveis. Inúmeras flores podem surgir de uma única planta, as quais têm duração de cerca de um dia. Apresenta pequenas cápsulas elípticas com poucas sementes (Pott & Pott, 2000 e Giulietti *et al.*, 2015).

Seago & Seago (2004) observaram que o aerênquima nas raízes do gênero *Nymphoides* é predominantemente formado no parênquima cortical, o qual dá origem a

grandes espaços intercelulares ou lacunas de origem esquizógena, embora também esteja presente o processo lisígeno. No trabalho de Seago *et al.* (2005) o aerênquima das raízes de *Nymphoides humboldtiana* (sinonímia de *N. indica*) foi classificado como esquizógeno ou esquizo-lisígeno, onde as células colapsam e em seguida morrem, formando lacunas de ar. Porém, Jung *et al.* (2008) classificaram o aerênquima dessa espécie como sendo lisígeno radial, com degradação celular. Como não há um consenso sobre a formação do aerênquima neste gênero, estudos mais detalhados são necessários para esclarecer essas dúvidas.

Além disso, as paredes celulares estão frequentemente envolvidas na formação de aerênquima, seja por separação celular, por degeneração da lamela média (Webb e Jackson, 1986), alongamento celular (Flores-Borges *et al.*, 2016) e/ou morte celular, como resultado de processos lisígenos (Gunawardena *et al.*, 2001, Leite *et al.*, 2017 e Bona *et al.*, 2017). Uma característica fundamental da parede celular é o seu papel na adesão e separação célula-célula (Jarvis *et al.*, 2003), um papel que envolve predominantemente pectinas, e onde o grau de esterificação da pectina pode alterar substancialmente a adesão de célula para célula (Willats *et al.*, 2000). Assim, a determinação de como esses polímeros estão distribuídos na parede celular poderia fornecer uma melhor compreensão da formação de aerênquima durante o desenvolvimento da raiz.

## 2. HIPÓTESES

1. O aerênquima de *Nymphoides humboldtiana* é do tipo esquizo-lisígeno.
2. A parede celular das células formadoras do aerênquima sofrem modificações na sua composição ao longo do desenvolvimento da raiz.
3. As modificações na composição das paredes celular participam da formação das lacunas de ar.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Analisar a ontogenia da raiz de *Nymphoides humboldtiana* (Menyanthaceae), a fim de esclarecer o processo de formação do aerênquima, bem como as alterações e variações estruturais sofridas pelas células corticais formadoras de aerênquima, com ênfase na dinâmica dos componentes da parede celular.

#### 3.2. Objetivos específicos:

- a. Estabelecer um número de estádios de desenvolvimento da raiz de *Nymphoides humboldtiana*;
- b. Identificar o tipo de formação de aerênquima;
- c. Identificar, em cada estádio de desenvolvimento, a distribuição dos principais constituintes da parede celular.
- d. Identificar as diferenças nos constituintes da parede das células formadoras de aerênquima em relação as não formadoras.

### 4. MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1. Área de coleta

Exemplares de *Nymphoides humboldtiana* (estrela branca), (Figs. 3A e 3B) foram coletadas em lagoas do município de Imbé, estado do Rio Grande do Sul, Brasil (29°56.366'S, 50°07,114'W), (Figs. 3D e 3E). A cidade possui clima subtropical com chuvas bem distribuídas durante todo o ano, com média anual de 1491 mm, e temperatura média anual de 18,8°C (Climate-data, 2018).

O material testemunho foi coletado em fenofase reprodutiva, para preparo de exsicata. A preparação de exsicatas seguiu as recomendações de Fidalgo & Bononi (1984). O exemplar foi incluído no herbário ICN do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, número do voucher 194860.

#### 4.2. Processamento do material para microscópio de luz em campo claro

Foram selecionadas raízes subterrâneas inteiras com comprimento entre 15 a 20 cm, as quais foram subdivididas em 4 regiões, com base no estágio de desenvolvimento: estágio 1 (região meristemática), estágio 2 (zona de alongamento), estágio 3 (zona de maturação) e estágio 4 (zona de maturação próximo ao colo). Foram selecionadas raízes de maior espessura que as raízes mencionadas anteriormente (com maior grau de desenvolvimento), na qual também coletou-se fragmentos cortados transversalmente na região madura próxima ao colo (estádio 4'). Foram analisadas 8 raízes de espécimes diferentes (Fig. 3C).

As amostras foram fixadas em formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,2 (mod. de Jones *et al.*, 1997) por 48 h sob vácuo; lavadas três vezes em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH7,2) e incluídas em gel de agarose 3%. Pequenos blocos do material incluído em agarose foram recortados, sendo os mesmos desidratados em série etílica ascendente (30, 50, 70, 90 e duas vezes 100%). O material foi pré-infiltrado com uma solução de etanol absoluto e resina acrílica LR White hard grade (Electron Microscopy Sciences) por 8 a 12 h. A infiltração foi realizada através de três trocas de LR White, com intervalo de 8 a 12 h. Posteriormente, o material foi emblocado na mesma resina em cápsulas de gelatina e polimerizado a 50°C durante 48 h (Freshour *et al.*, 1996).

Realizaram-se cortes longitudinais e transversais semifinos de 500 nm em ultramicrótomo (Leica Ultracut UCT) utilizando navalha de vidro. Em seguida, os cortes

foram corados com azul de toluidina 0,05% aquoso (pH 4,4) e observadas em microscópio de luz em campo claro.

### 4.3. Immunolocalização

Dentro dos estádios estabelecidos, as amostras foram fixadas e processadas conforme descrito para as análises em microscopia de luz em campo claro.

As seções semifinas foram aderidas em lâminas de vidro cobertas com solução de gelatina (0.5% [w/v] gelatina, 0.05% [w/v] sulfato de potássio crômico em água destilada). Após a incubação com tampão fosfato salino (PBS; 0.15 % [w/v]  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,04 % [w/v]  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,7 % [w/v]  $\text{NaCl}$ , 1,0 % [w/v]  $\text{NaN}_3$  em água destilada, pH 7,1) (Harris 1994), o bloqueamento contra ligações inespecíficas foi realizado com uma solução de proteína de leite a 3% w/v em PBS (MP/PBS). Foram utilizados anticorpos monoclonais LM18, LM19 e LM20 em lâminas distintas, específicos contra homogalacturonanos (HGs) com baixo e alto grau de metil-esterificação, respectivamente (Verherbruggen *et al.*, 2009); LM5 e LM6 para ramnogalacturonanos (RGs I) como galactanos e arabinanos, respectivamente (Jones *et al.*, 1997, Willats *et al.*, 1998); LM15 para cadeias repetidas de XXXG em xiloglucanos (Marcus *et al.*, 2008); LM21 para (galacto)(gluco) mananos (Marcus *et al.*, 2010); JIM13, o qual reconhece proteínas arabinogalactanos e LM1 para extensinas (Knox *et al.*, 1991, Smallwood *et al.*, 1995), (Tabela 1). Os anticorpos monoclonais foram cedidos pelo Prof. Dr. Paul Knox (Centre for Plant Sciences, University of Leeds, UK).

As amostras foram incubadas nos anticorpos monoclonais citados acima (anticorpo primário) em diluições de 1:10 em MP/PBS por 2 h. Após lavar com tampão PBS, as amostras foram incubadas com uma solução 1:100 de anti-rat-IgG (toda a molécula) ligada a fluoresceína isotiocianato (FITC, Sigma-Aldrich) em MP/PBS por 2 h. Posteriormente, as amostras foram lavadas em tampão PBS e incubadas com calcoflúor White (Pacini *et al.*, 1999) por 5 min e novamente lavadas tampão PBS.

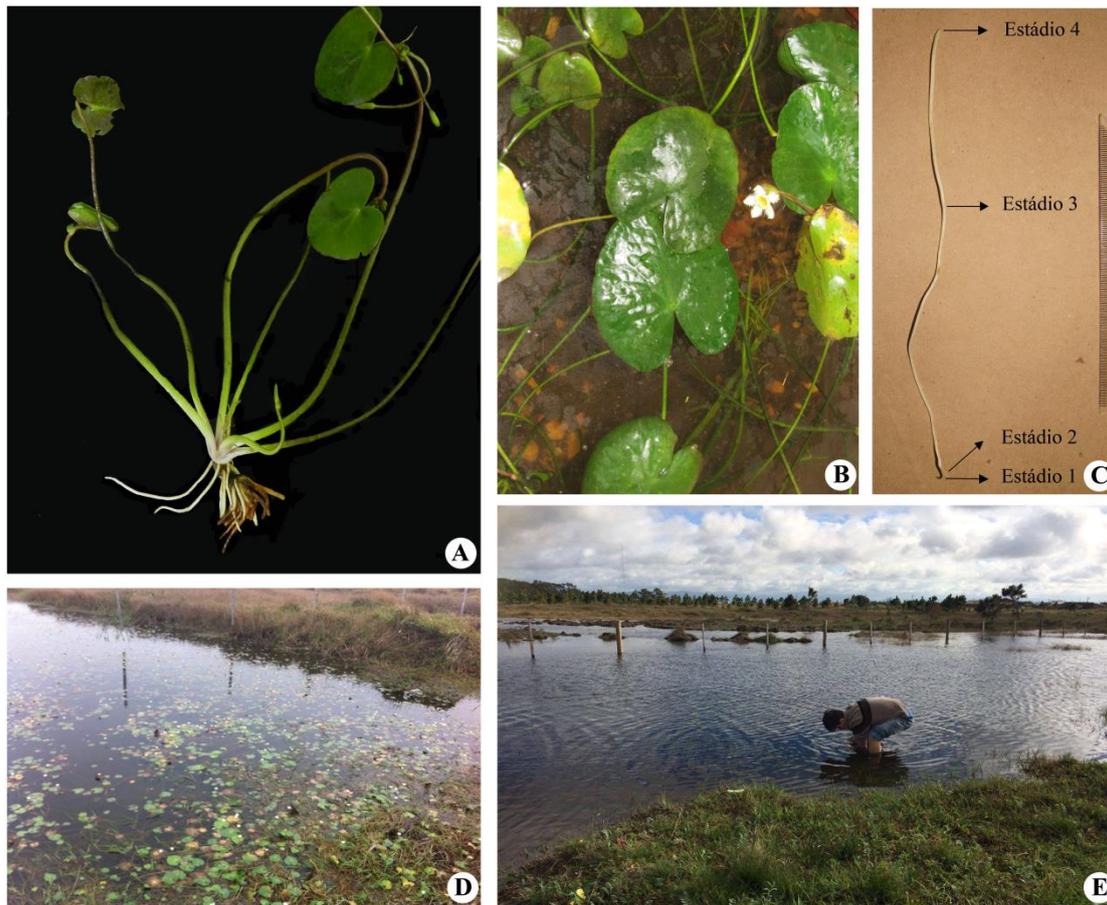
As seções foram montadas com uma solução anti-fade consistindo de 0,1 % de parafenilenodiamina (PPD) (Sigma-Aldrich) em uma proporção de 1:9 de tampão fosfato de sódio 10 mM 0.15 M  $\text{NaCl}$  e 90 % de glicerol. As amostras foram analisadas em epifluorescência no microscópio Leica DMR (filtro de excitação 450-490 nm).

Os controles foram feitos através da omissão da etapa de incubação do anticorpo primário. O material também foi verificado para autofluorescência. Além disso, foi aplicado um pré-tratamento para remoção de HGs pécticos com solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1M, pH 11,4 por 2 h e pectato liase (de *Aspergillus* sp., Megazyme) em Tris-HCl tampão, pH 8,0 por 2 h. Este pré-tratamento foi aplicado como um controle antes da incubação com LM19 e LM20. Entretanto, como HGs pécticos podem mascarar a detecção de hemiceluloses e cadeias laterais de pectinas como os RGs (Marcus *et al.* 2008), o mesmo pré-tratamento foi realizado para todas as análises antes da incubação dos anticorpos monoclonais específicos para estes epitopos.

Algumas seções foram coradas com Azul de Toluidina O 0,05 % [w/v] (O'Brien & McCully, 1964) e montadas em água para observação em microscopia de luz em campo claro.

**Tabela1:** Anticorpos monoclonais e suas especificidades.

<b>Grupo de polissacarídeo</b>	<b>Anticorpo</b>
Homogalacturonanos pécticos	LM18, LM19, LM20
Ramnogalacturonanos I pécticos	LM5 (galactanos), LM6 (arabinanos)
Xiloglucanos-hemicelulose	LM15
Mananos- hemicelulose	LM21
proteínas arabinogalactanos	JIM13
Extensinas	LM1



**Figura 3:** Aspecto geral de *N. humboldtiana* e local da coleta. **A.** Morfologia da planta. **B.** Planta em fenofase reprodutiva. **C.** Caracterização dos estádios de desenvolvimento da raiz: estágio I corresponde ao ápice da raiz, estágio II corresponde a região de alongamento, estágio III corresponde a região de maturação e estágio IV corresponde a região de maturação próxima ao colo **D-E.** Local da coleta.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Desenvolvimento da raiz e formação do aerênquima em *Nymphoides humboldtiana*.

#### **Estádio 1: Zona meristemática**

Na região situada entre 0,5 e 3 mm do ápice radicular observa-se o promeristema e suas células derivadas, demonstrando uma organização do tipo fechada, pois apresenta três camadas de células iniciais (Figs. 4A - 4B).

A camada celular L1 é o dermatocaliptrogênio (Fig. 4B), é uma região discreta do meristema apical que forma a protoderme e a coifa, ou seja, esses tecidos possuem iniciais comuns. A protoderme é formada por uma única camada de células com formato achatado, que irá se diferenciar em epiderme ao longo do desenvolvimento da raiz. A coifa é composta por inúmeras camadas de células relativamente grandes, muito vacuoladas (Fig. 4B). Uma segunda camada de células L2, situada externamente às iniciais do meristema provascular (Fig. 4B), é composta pela inicial do córtex na qual se distingue a inicial da endoderme e as iniciais do córtex parenquimático (Fig. 4C), sendo este o meristema fundamental. A camada de células L3 dá origem ao meristema provascular, o qual é composto por células alongadas que se estendem em um único sentido, na base desse meristema têm 4 células com formato achatado (Fig. 4B). Esse meristema posteriormente se diferencia no cilindro vascular (Fig. 4D), (Diagr. 1).

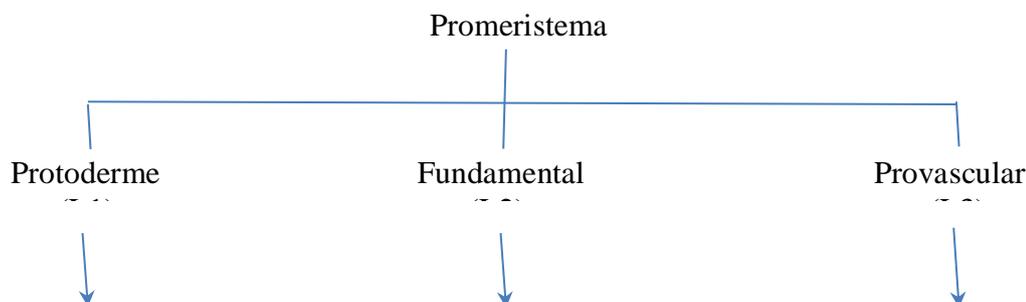
Em seção transversal do ápice radicular (Fig. 4C), entre 0,5 a 3 mm do início do ápice radicular, observa-se externamente a região da coifa, que apresenta duas a três camadas de células muito vacuoladas. Adjacente à coifa encontram-se as células da protoderme, que apresentam divisão anticlinal e é uniestratificada, formada por células de menor tamanho que as células da pró-exoderme quando observadas em seção transversal. A pró-exoderme, assim como a protoderme, são uniestratificadas não apresentam espaços intercelulares irregulares e as células e as células são de formato irregular. Ainda nesta região, a 0,3 mm do ápice radicular, é possível visualizar, no parênquima cortical em diferenciação, pequenos espaços intercelulares alongados em vista longitudinal (Figs. 4A e 4B) e de formatos “angulares” em vista transversal (Fig. 4C).

A região cortical é originada a partir de uma inicial (Fig. 4B, zona a) que dá origem às iniciais do córtex externo (Fig. 4B, zona b) e interno (Figura 4B, zona c), ambas

pertencentes ao meristema fundamental (Fig 4B). O córtex interno forma-se a partir de divisões periclinais da pró-endoderme. Estas divisões resultam de duas células de tamanho igual, sendo que a interna se mantém como uma célula pró-endodérmica e a externa se diferencia em células do parênquima cortical interno (Figura 4B, zona c). A partir da quarta camada de células do parênquima cortical ocorrem divisões anticlinais, formando um arranjo em “Y” no córtex (Fig. 4C). Ao final, há um maior número de camadas oriundas do córtex interno e poucas camadas celulares (aproximadamente 2 a 3) de um parênquima cortical externo.

No cilindro vascular, o periciclo (Fig. 4C) já pode ser identificado, porém os tecidos vasculares apresentam-se indiferenciados.

### Meristema apical radicular



**Diagrama 1:** Origem das camadas dos tecidos meristemáticos.

### Estádio 2: Zona de alongamento

Cerca de 4,5 mm a partir do ápice radicular (Fig. 4D), observa-se que a coifa não está mais presente. A epiderme e a exoderme são uniestratificadas e formadas por células irregulares e comprimidas. Nesse estágio ocorre o aumento gradativo do tamanho das células do córtex, bem como o alargamento irregular dos espaços intercelulares de algumas células do córtex interno, parecendo haver um afastamento entre as células, devido à expansão celular. Estas são as células formadoras do aerênquima. No cilindro vascular, células de condução do xilema possuem espessamentos de parede secundária e, de forma alternada, pequenos grupos de células do floema são observadas.

### Estádio 3: Zona de maturação de crescimento primário

Aproximadamente a 15 cm do ápice da raiz todos os tecidos encontram-se diferenciados (Fig. 4E), em muitos locais a epiderme persiste, porém em outros locais a epiderme acaba sendo eliminada, ficando somente a exoderme. Onde a epiderme esta presente apresenta parede periclinal externa um pouco mais espessada em relação à epiderme na zona de alongamento. As camadas de células corticais mais próximas à endoderme são constituídas por células justapostas e pequenos espaços intercelulares. A partir da décima quarta camada de células do córtex interno as células formadoras do aerênquima apresentam um estiramento radial tornando-se alongadas, o que possibilita a ampliação dos espaços intercelulares para a formação de lacunas de ar (Fig. 4E). Ocorre também à separação das células na região da lamela média, isso é característica de esquizógenia.

O cilindro vascular da região de maturação apresenta-se com tecido vascular bem desenvolvido, sendo composto pelo periciclo unisseriado, oito polos de protoxilema e oito grupos de floema, evidenciando uma raiz poliarca (Fig. 4E).

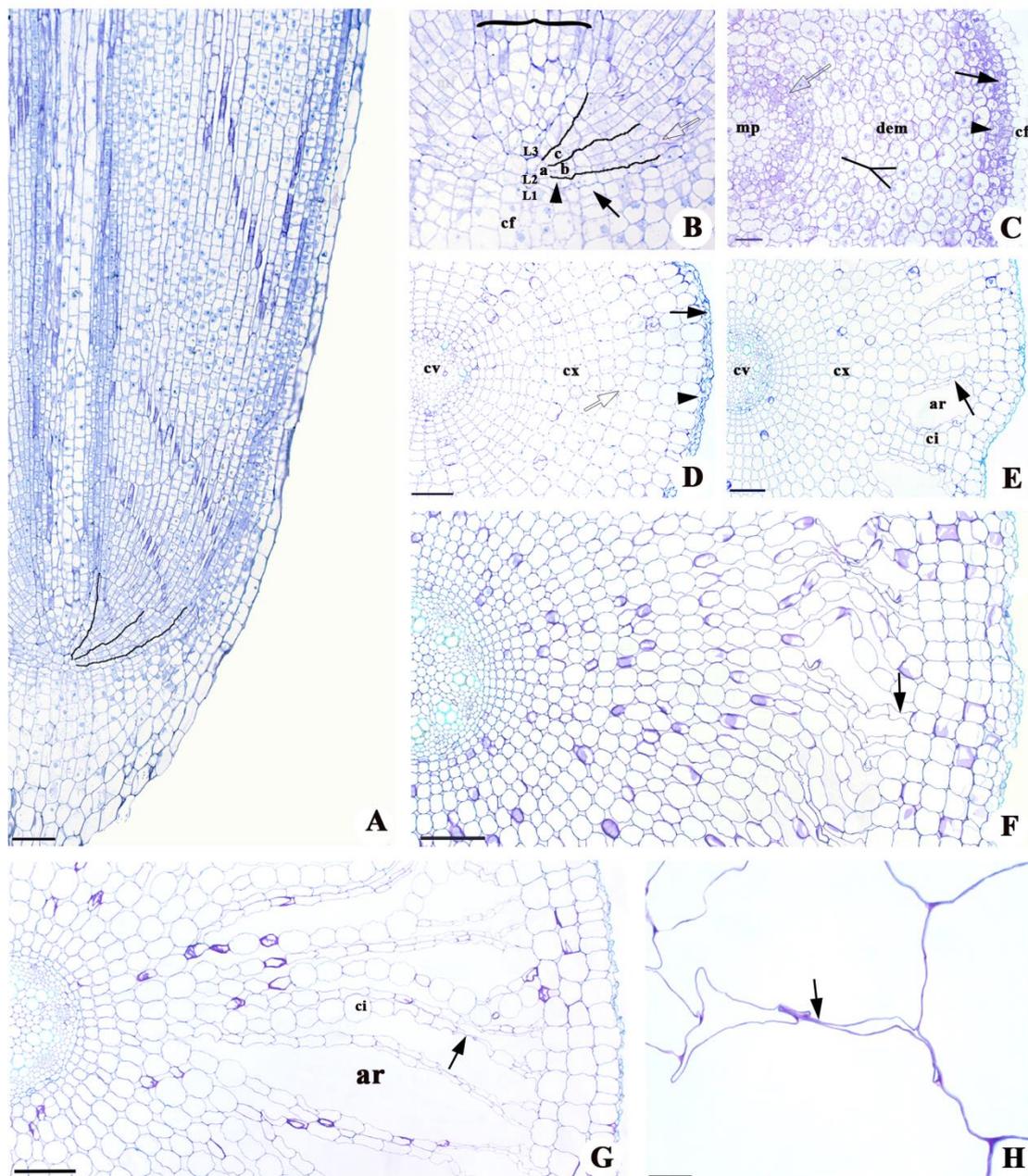
#### **Estádio 4: Zona de maturação de crescimento secundário**

Este estágio refere-se a zona de maturação próxima ao colo, aproximadamente a 20 cm do ápice radicular, caracterizado pelo início do crescimento secundário com a instalação de felogênio e câmbio, embora em estágio inicial (Fig. 4F).

A partir da décima quinta camada de células do córtex interno as células formadoras de aerênquima possuem formatos e dimensões irregulares, com células mais longas que as células do parênquima cortical intacto.

#### **Estádio 4': Zona de maturação de crescimento secundário**

Em raízes de maior porte, é perceptível que o aerênquima mostra-se mais desenvolvido, cujas células formadoras deste tecido ocorrem a partir da sexta camada do córtex interno. Algumas destas células sofrem um intenso estiramento e apresentam separação celular, resultando em paredes celulares completamente colabadas e em um aumento no tamanho das lacunas de ar quando observadas em seção transversal (Figs. 4G-4H).



**Figura 4:** Seções longitudinais e transversais da raiz de *Nymphoides humboldtiana*. **A.** Corte longitudinal do ápice radicular. **B.** Meristema apical em corte longitudinal mostrando as iniciais corticais que estão delimitadas por um traço (zonas a-b-c), a coifa (cf), protoderme (seta), pró-exoderme (cabeça da seta), meristema provascular (chave) e espaço intercelular (seta transparente). **C.** Corte transversal do ápice radicular apresentando coifa (cf), protoderme (seta), pró-exoderme (cabeça da seta), pró-endoderme (seta transparente), derivadas da endoderme meristemática (dem), arranjo em Y do córtex (Y) e meristema provascular (mp). **D.** Região de alongamento da raiz apresenta epiderme (seta), exoderme (cabeça da seta), córtex (cx), afastamento entre as células (seta transparente) e cilindro vascular (cv). **E.** Região inicial da maturação da raiz apresentando as lacunas de ar (ar), células dos septos integras (ci), células alongadas (seta), cortex (cx) e cilindro vascular (cv). **F.** Região de maturação próxima ao colo, com abundantes lacunas de ar, célula colapsada (seta) **G.** Região de maturação de outra

especime de *N. humboldtiana*, que apresenta grandes lacunas de ar (ar), célula íntegra do septo (ci) e cilindro vascular (cv). Os septos possuem poucas células integras (ci) e muitas células colapsadas (seta) **H**. Detalhe da Fig 4G. célula completamente colapsada (seta). (Barra de escala: A= 50 $\mu$ m; B,C= 20 $\mu$ m; D= 50 $\mu$ m; E- F= 100 $\mu$ m; G=10 $\mu$ m; H=50 $\mu$ m e I= 10 $\mu$ m).

## 5.2. Distribuição dos epítomos pécnicos, hemicelulósicos e proteicos da parede celular durante a formação do aerênquima.

Foram estabelecidos 4 estádios de desenvolvimento da raiz seguindo os mesmos critérios estruturais para a análise ontogenética em microscopia de luz de campo claro e focando, principalmente, na formação do aerênquima.

As seções coradas com azul de toluidina, utilizadas como material testemunho de cada estágio, são equivalentes às utilizadas para imunolocalização (Figs. 5A, 6A, 7A, 8A e 9A).

No estágio 1 (zona meristemática), no qual os tecidos estão ainda indiferenciados, não se observou um gradiente espacial de distribuição dentre os epítomos analisados nas paredes celulares correspondentes às células do córtex, tanto interno, como externo. HGs com baixo e alto grau de metil-esterificação, reconhecidos pelos anticorpos monoclonais LM18 e LM20, respectivamente, foram fortemente marcados nos vértices celulares em suas zonas de junção na região dos espaços intercelulares (Figs. 5B-5C). Galactanos e arabinanos pécnicos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais LM5 e LM6, respectivamente, tiveram marcação homogênea nas paredes celulares do parênquima cortical (Figs. 5D-5E). Entretanto, no cilindro vascular, arabinanos reconhecidos pelo LM6 foram apenas detectados no floema (Fig. 5E). A detecção de hemiceluloses mostrou-se diferenciada. Enquanto xiloglucanos reconhecidos pelo anticorpo LM15 (Fig. 5F) foram intensamente marcados em todas as paredes celulares das células corticais, mananos não foram detectados com o LM21 em nenhum tecido desta zona meristemática (Fig. 5G). Dentro dos epítomos de proteínas estruturais analisados, as AGPs foram bem marcadas com JIM13 (Fig. 5H), as extensinas, reconhecidas pelo LM1, não foram detectadas (Fig. 5I).

O estágio 2 (zona de alongamento) é caracterizado por apresentar um aumento nos espaços intercelulares do parênquima cortical (Fig. 6A). Houve forte marcação de HGs com baixo grau e alto grau de metil-esterificação reconhecidos pelos anticorpos monoclonais LM18/LM19 e LM20, respectivamente, principalmente nas zonas de junção, as quais se encontram nos vértices celulares do parênquima cortical (Figs. 6B, 6C e 6D). Galactanos e arabinanos pécnicos, quando marcados com LM5 e LM6 respectivamente, demonstraram estar presentes nas paredes celulares do parênquima cortical. Entretanto, enquanto observa-se forte marcação para galactanos pécnicos, o

mesmo não ocorre para os arabinanos, cuja marcação é muito fraca, sendo mais evidente no floema (Figs. 6E-6F). Com relação às hemiceluloses, xiloglucanos detectados pelo anticorpo LM15 foram fracamente marcados e, praticamente, na região dos vértices celulares mesmo após o pré-tratamento com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ /pectato liase (Fig. 6G). Ao contrário, mananos, reconhecidos pelo LM21, mostraram a presença deste epitopo em todas as regiões da parede celular das células do parênquima cortical (Fig. 6H). Um gradiente espacial é observado quando foram detectados galactanos pécticos e AGPs, reconhecidos pelos anticorpos monoclonais LM5 e JIM13, respectivamente. Em algumas camadas da região mais interna do córtex, esses epitopos foram detectados mais intensamente, diminuindo a marcação ainda nesta região indo em direção à região do córtex externo (Figs. 6E-6I). Não foram observadas marcações com LM1 para detecção de extensinas no parênquima cortical, mesmo após o pré-tratamento enzimático, apenas na exoderme, endoderme e periciclo (Fig. 6J).

O estágio 3 é caracterizado pelas células formadoras de aerênquima que começam a sofrer o estiramento celular, conduzindo à formação das lacunas de ar (Fig. 7A). A presença de HGs com baixo grau de metil-esterificação, detectados pelo anticorpo monoclonal LM18, mostrou fraca marcação apenas nas zonas de junção (Fig. 7B). Entretanto, LM19 (que tem a propriedade de identificar o mesmo epitopo mostrou ampla marcação nas paredes celulares de todos os tecidos, inclusive nas células formadoras de aerênquima (Fig. 7C). O anticorpo LM20 (HGs com alto grau de metil-esterificação) apresentou intensa marcação nas células intactas do parênquima cortical para o referido epitopo, porém, destacando-se praticamente a ausência ou diminuição desses HGs nas paredes celulares das células formadoras de aerênquima (Fig. 7D). LM5 e LM6, utilizados para reconhecer galactanos e arabinanos dos RGs pécticos, mostraram diferenças na distribuição desses epítomos nas células formadoras de aerênquima. Enquanto LM5 mostrou a presença desse epítopo nas células intactas do parênquima cortical e ausentes nas células formadoras do aerênquima, as quais sofrem o estiramento, LM6 marcou os arabinanos pécticos apenas em algumas células formadoras de aerênquima, porém de detecção muito fraca (Fig. 7F). Xiloglucanos, reconhecidos pelo LM15, não foram detectados neste tecido, apenas no cilindro vascular (Figs. 7G). Mananos, por outro lado, reconhecidos pelo LM21, foram detectados em todas as paredes celulares das células do parênquima cortical, inclusive das células formadoras do aerênquima (Fig. 7H). A marcação com JIM13, que reconhece epítomos de AGPs, apresentou o mesmo tipo de

marcação pelo LM5, ou seja, está presente nas paredes celulares de células intactas e ausente nas células que sofrem o estiramento (Figs. 7I). Não foi possível observar marcação para extensinas pelo anticorpo monoclonal LM1 (Fig. 7J).

O estágio 4 (zona de maturação) é aqui caracterizado pelo maior desenvolvimento do aerênquima na zona de maturação próximo ao colo (Fig. 8A). A detecção de HGs com baixo e alto grau de metil-esterificação reconhecidos pelos anticorpos monoclonais LM18/LM19 e LM20, respectivamente, demonstrou que LM18 reconhece o referido epítipo nos vértices celulares de todas as células do parênquima cortical, sem haver marcação nas células formadoras de aerênquima (Fig. 8B). LM19, que também tem especificidade para este epítipo, marcou de forma homogênea e intensa todas as células do córtex (Fig. 8C). LM20, o qual reconhece epítipos de HGs de alta metil-esterificação, marcou as paredes celulares das células intactas e apenas zonas de junção das células formadoras de aerênquima (Fig. 8D). Galactanos pécticos reconhecidos pelo LM5 estão presentes no parênquima cortical, sendo mais abundantes na região interna do córtex. Arabinanos de RGs pécticos detectados pelo LM6, por sua vez, estão menos evidentes nas células formadoras de aerênquima comparado às células intactas do parênquima cortical (Fig. 8F). Os epítipos para hemiceluloses, como xiloglucanos e mananos, reconhecidos por LM15 e LM21, respectivamente, mantiveram o mesmo tipo de marcação do estágio anterior, com fraca detecção por LM15 (anti-xiloglucanos) (Fig. 8G), e intensa marcação por LM21 (anti-mananos) em todas as células do córtex (Fig. 8H). À semelhança das marcações com LM5 (anti-galactanos) e LM6 (anti-arabinanos), JIM13 demonstrou que a região correspondente das células formadoras de aerênquima sofrem diminuição na marcação para AGPs comparado às células intactas (Fig. 8I). Como no estágio anterior, extensinas reconhecidas pelo anticorpo monoclonal LM1 não foram detectadas ou mostraram fraca marcação no parênquima cortical, porém evidente nas células da endoderme, periciclo e exoderme (Fig. 8J).

O estágio 4' também corresponde à zona de maturação, porém, de raízes de calibre maior e crescimento secundário, detectado através do início de formação do câmbio vascular. As células formadoras do aerênquima já sofreram total estiramento e em mais camadas celulares e as lacunas de ar estão bem desenvolvidas, apresentando maior área de abertura (Fig. 9A). O anticorpo monoclonal LM18, o qual reconhece HGs de baixo grau de metil-esterificação, apresentou marcações nas zonas de junção das células que sofreram estiramento (Fig. 9B). Porém, HGs metil-esterificados detectados pelo LM20

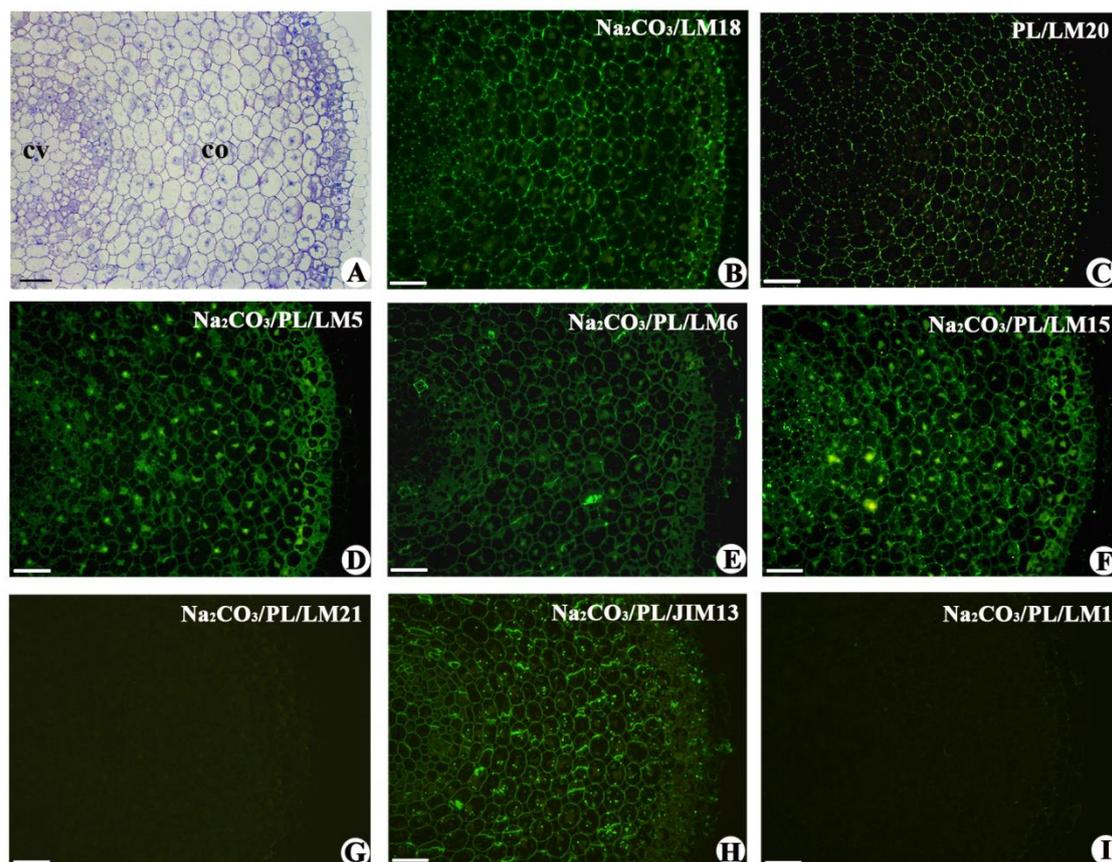
estão presentes apenas nas células intactas e nas zonas de junção de algumas das células formadoras de aerênquima, sendo praticamente ausentes nas células que sofreram estiramento (Figs. 9C). Semelhantemente ao estágio anterior, galactanos e AGPs não foram detectados pelo LM5 e JIM13, respectivamente, nas células formadoras de aerênquima, ou foram detectados fracamente, mas estavam notavelmente presentes nas células intactas do córtex (Figs. 9D-9H). Arabinanos, reconhecidos pelo LM6, foram fracamente marcados em todo parênquima cortical não apresentando diferenças entre as células intactas e àquelas que sofreram o estiramento (Fig. 9E). Com relação às hemiceluloses, à semelhança de estádio anteriores, xiloglucanos não foram detectados pelo LM15 no córtex (Fig. 9F) e mananos, ao contrário, foram detectados pelo LM21 nas células intactas do parênquima cortical, entretanto, fracamente detectadas nas células que sofreram o estiramento para formação do aerênquima (Figs. 9G). Nesse estágio de maior desenvolvimento do aerênquima esta marcação com LM21 assemelhou-se ao observado com LM5 e JIM13. Extensinas detectadas pelo LM1 (Fig. 9I), como em estádios anteriores, apresentaram uma marcação mais evidente nas células da endoderme e periciclo (Tabela 2).

**Tabela 2:** Comparação de polímeros pécicos e hemicelulósicos nas células do córtex e nas células formadoras de aerênquima da raiz de *N. humboldtiana* em seus diferentes

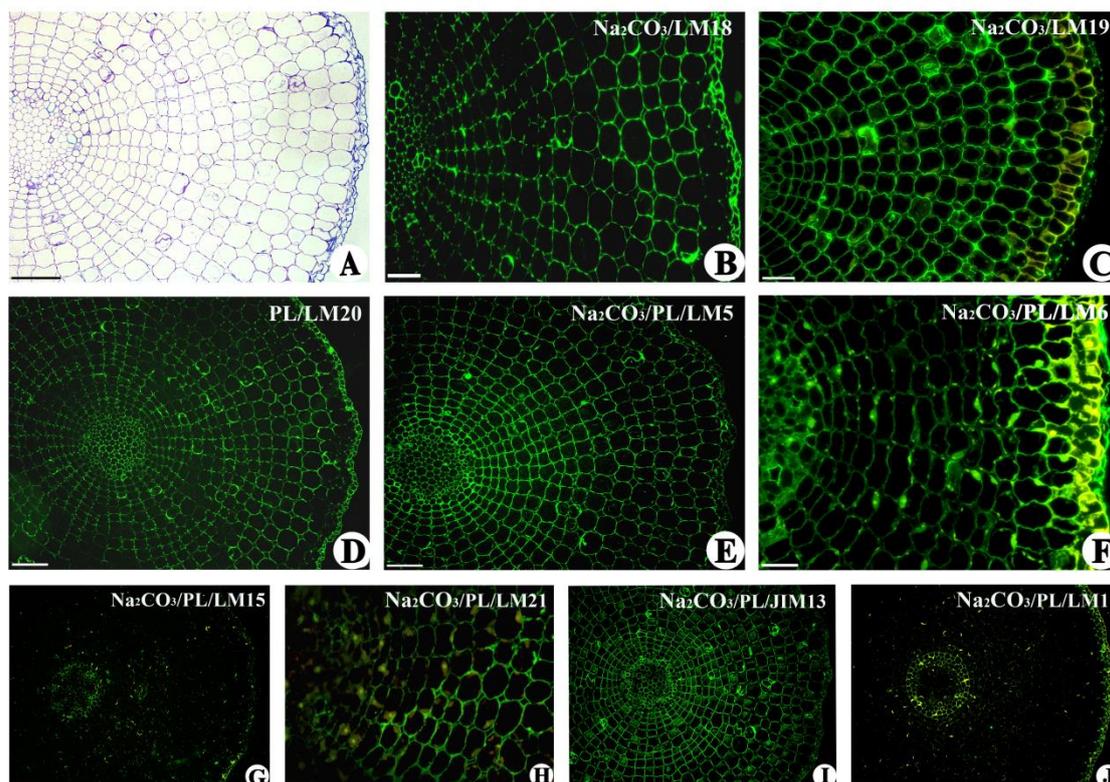
estádios de desenvolvimento. Anticorpos monoclonais utilizados para a identificação de epítomos: LM18 e LM19 (homogalacturonanos de baixa metil-esterificação), LM20 (homogalacturonanos de alta metil esterificação), LM5 (galactanos), LM6 (arabinanos) LM21 (mananos), LM15 (xiloglucanos), JIM13 (proteínas arabinogalactanos) e LM1: (extensinas).

Estádios de desenvolvimento	Estádio 1	Estádio 2	Estádio 3		Estádio 4		Estádio 4'	
			Córtex	Células dos septos colapsadas	Córtex	Células dos septos colapsadas	Córtex	Células dos septos colapsadas
LM18 ( $\text{NA}_2\text{CO}_3$ ) HG's	++	++	+	-	++zonas de junção	++zonas de junção	++	+ zonas de junção
LM19 ( $\text{NA}_2\text{CO}_3$ ) HG's	0	++	++	++	++	++	0	0
LM20 (PL) HG's	++	++	++	+	++	+	++	+zonas de junção
LM5 ( $\text{NA}_2\text{CO}_3/\text{PL}$ ) RG's	++	++	++	+	++	+	++	+ _
LM6 ( $\text{NA}_2\text{CO}_3/\text{PL}$ ) RG's	+	++	+	-	++	+	+	+
LM21 ( $\text{NA}_2\text{CO}_3/\text{PL}$ ) Mananos	-	++	++	+	++	+	++	+
LM15 ( $\text{NA}_2\text{CO}_3/\text{PL}$ ) Xiloglucanos	++	+	-	-	-	-	-	-
JIM13 ( $\text{NA}_2\text{CO}_3/\text{PL}$ ) arabinogalactanos	++	++	++	-	++	-	++	-
LM1 ( $\text{NA}_2\text{CO}_3/\text{PL}$ ) Extensinas	-	-	-	-	-	-	-	-

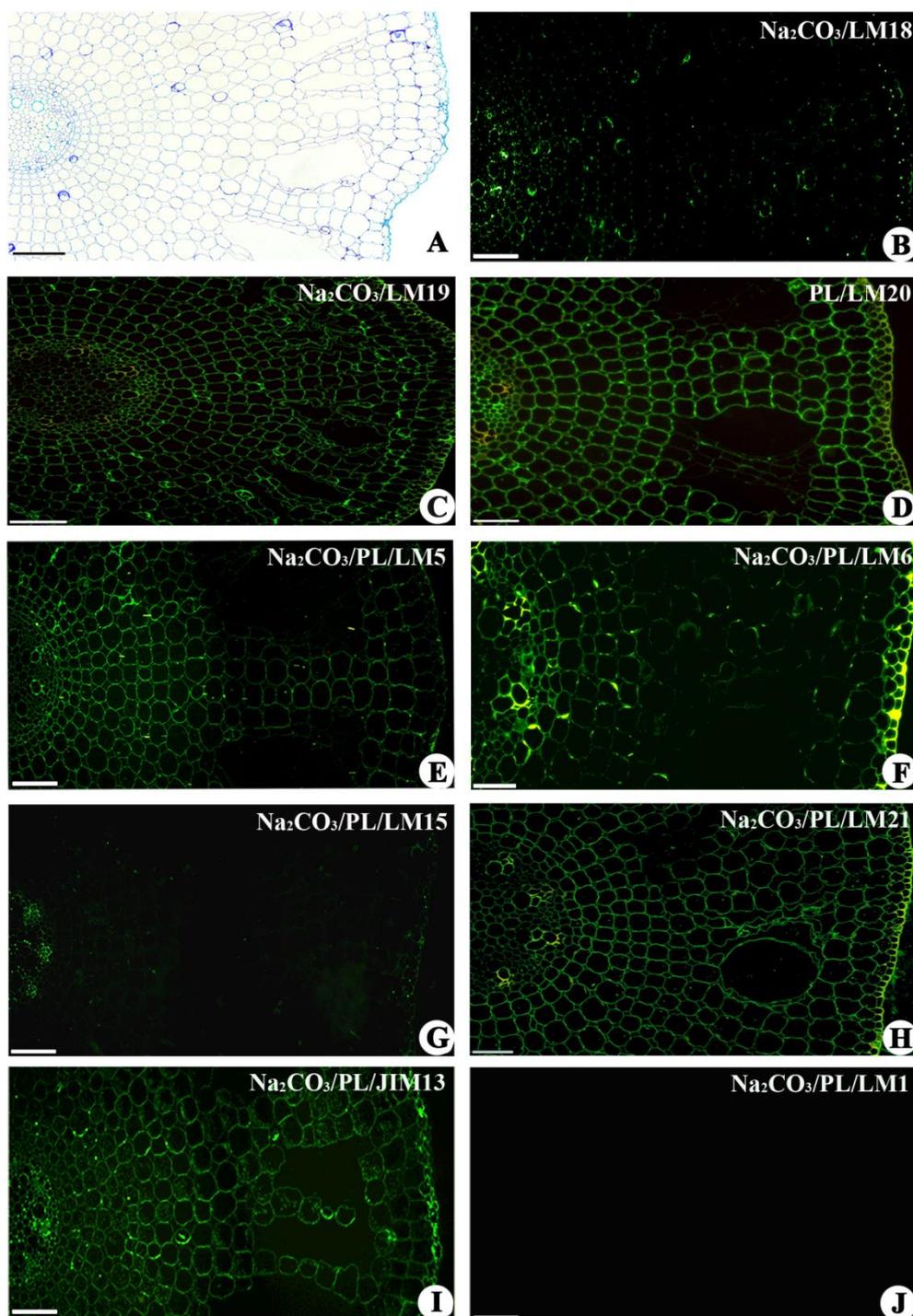
Legenda: - ausente; + fraca marcação; ++ intensa marcação; 0 não avaliado



**Figura 5:** Seções transversais da raiz de *N. humboldtiana*. Estádio 1 (zona meristemática). **A.** Seção corada com azul de toluidina observada em microscopia de luz em campo claro. **B-I.** Seções equivalentes sob microscopia de epifluorescência. **B-C.** Tratamento de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e pectato liase, seguido pela incubação de LM18 e LM20, respectivamente. LM18 (anti-HGs de baixa metil-esterificação) e LM20 (anti-HGs de alta metil-esterificação) mostrando distribuição semelhante para estes epítomos. **D-I.** Seções tratadas previamente com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e pectato liase. **D-E.** LM5 (anti-galactanos) e LM6 (anti-arabinanos) mostraram tênue marcação para RGs pécticos. **F-G.** LM15 (anti-xiloglucanos) mostrou intensa marcação em todos os tecidos enquanto que LM21 (anti-mananos) não apresentou marcação para este epítomo. **H.** JIM13 (anti-AGPs) demonstrou a presença deste epítomo. **I.** LM1 (anti-extensina) não apresentou marcação. (Escala:  $20\mu\text{m}$ ).

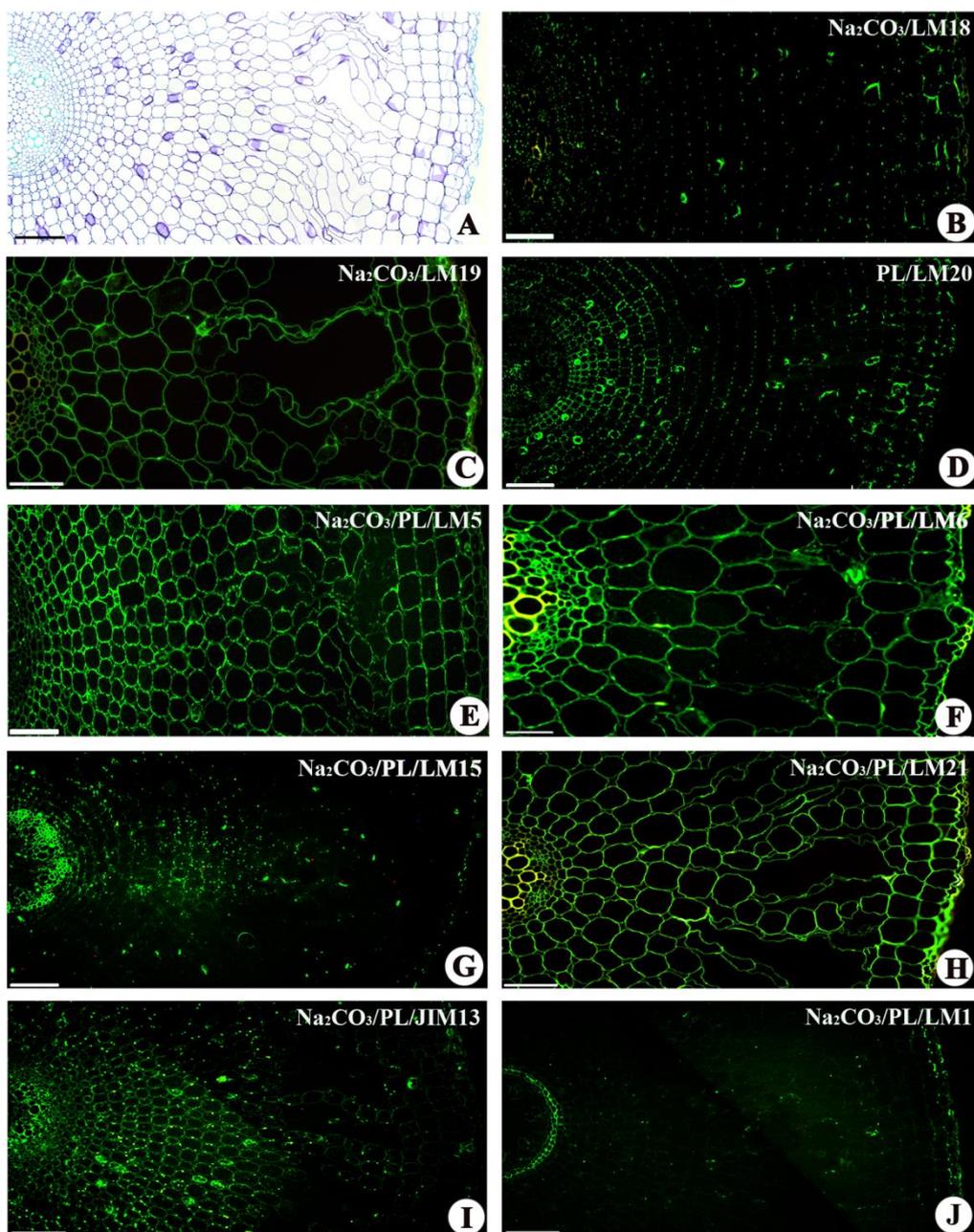


**Figura 6:** Seções transversais da raiz de *N. humboldtiana*, estágio 2 (zona de alongamento). **A.** Seção corada com azul de toluidina observada em microscopia de luz em campo claro. **B-J.** Seções equivalentes sob microscopia de epifluorescência. **B-C.** Seção incubada com LM18,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e LM19  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para detecção de homogalacturanos de baixa metil-esterificação. **D.** Seção incubada com LM20 e pectato liase para detecção de homogalacturanos de alta metil-esterificação. **E-J.** Seções tratadas previamente com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e pectato liase. **E-F.** LM5 (anti-galactanos) e LM6 (anti-arabinanos) mostraram forte marcação para RGs pécicos. **G-H.** LM15 (anti-xiloglucanos) mostrou fraca marcação em algumas células, enquanto que LM21 (anti-mananos) apresentou a marcação deste epítipo. **I.** JIM13 (anti-AGPs) demonstrou a presença deste epítipo. **J.** LM1 (anti-extensina) não apresentou marcação deste epítipo nas células do córtex. (Escala: A=20  $\mu\text{m}$ ; B-J = 50 $\mu\text{m}$ ).

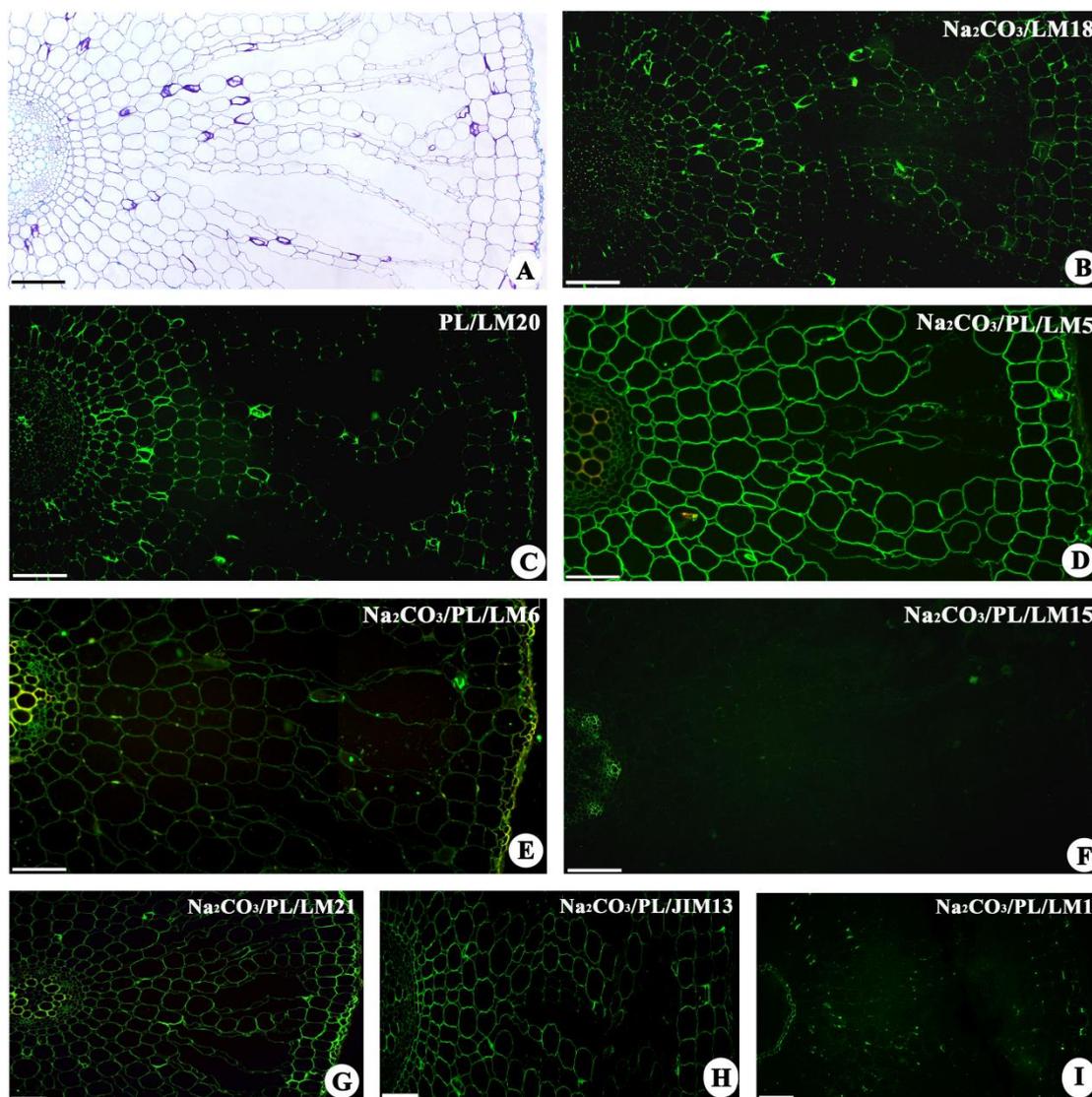


**Figura 7:** Seções transversais da raiz de *N. humboldtiana*, estágio 3 (zona de maturação). A. Seção corada com azul de toluidina observada em microscopia de luz em campo claro. B-J. Seções equivalentes sob microscopia de epifluorescência. B-C. Seção incubada com LM18,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e LM19  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  respectivamente, para detecção de homogalacturanos de baixa metil-esterificação. D. Seção incubada com LM20 e pectato liase para detecção de homogalacturanos de alta metil-esterificação. E-J. Seções tratadas previamente com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e pectato liase. E-F. LM5 (anti-galactanos) e LM6 (anti-arabinanos) mostraram marcação restrita para RGs pécticos. G-H. LM15 (anti-xiloglucanos) não apresentou marcação, mas o LM21 (anti-mananos) apresentou forte marcação deste epítipo. I. JIM13

(anti-AGPs) demonstrou a presença deste epítipo. J. LM1 (anti-extensina) não apresentou marcação deste epítipo. (Escala: A-H= 50 $\mu$ m; G e I=100 $\mu$ m).



**Figura 8:** Seções transversais da raiz de *N. humboldtiana*, estágio 4 (zona de maturação próxima ao colo). **A.** Seção corada com azul de toluidina observada em microscopia de luz em campo claro. **B-J.** Seções equivalentes sob microscopia de epifluorescência. **B-C.** Seção incubada com LM18,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e LM19  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  respectivamente, para detecção de homogalacturanos de baixa metil-esterificação. **D.** Seção incubada com LM20 e pectato liase para detecção de homogalacturanos de alta metil-esterificação. **E-J.** Seções tratadas previamente com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e pectato liase. **E-F.** LM5 (anti-galactanos) e LM6 (anti-arabinanos) mostraram marcação para RGs pécticos. **G-H.** LM15 (anti-xiloglucanos) não apresentou marcação, mas o LM21 (anti-mananos) apresentou forte marcação deste epítipo. **I.** JIM13 (anti-AGPs) apresentou tênue marcação deste epítipo. **J.** LM1 (anti-estensina) não apresentou marcação deste epítipo. (Escala: A-C= 50 $\mu\text{m}$ ; D-I=100 $\mu\text{m}$ ).



**Figura 9:** Seções transversais da raiz de *N. humboldtiana*, estágio 4 (zona de maturação de outra espécie). **A.** Seção corada com azul de toluidina observada em microscopia de luz em campo claro. **B-I.** Seções equivalentes sob microscopia de epifluorescência. **B.** Seção incubada com LM18 e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para detecção de homogalacturanos de baixa metil-esterificação. **C.** Seção incubada com LM20 e pectato liase para detecção de homogalacturanos de alta metil-esterificação. **D-I.** Seções tratadas previamente com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e pectato liase. **D-E.** LM5 (anti-galactanos) e LM6 (anti-arabinanos) mostraram marcação para RGs pécticos. **F-G.** LM15 (anti-xiloglucanos) não apresentou marcação, mas o LM21 (anti-mananos) apresentou forte marcação deste epítipo. **H.** JIM13 (anti-AGPs) apresentou tênue marcação deste epítipo. **I.** LM1 (anti-extensina) não apresentou marcação deste epítipo. (Escala: A-C-D- F-G-H-I= 100µm; B e E=50µm)

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Tipos de meristemas em plantas aquáticas: algumas considerações em *N. humboldtiana*

A organização do meristema apical da raiz (MAR) de *N. humboldtiana* é do tipo fechado, típico de eudicotiledônea, com três camadas de células iniciais. Raízes com iniciais em camadas, em geral, são consideradas com padrão de estrutura fechado (Guttenberg 1960). Seago e Heimsch (1969) definem células iniciais como células na posição mais apical de um tecido, que mantêm o meristema como uma região de contínua formação celular. Quando as iniciais se dividem, uma derivada permanece meristemática e a outra se torna parte do corpo radicular. Esta organização do MAR fechada também foi observada em outras plantas aquáticas, como *Bacopa salzmanii* e *B. monnieroides* (Bona & Morretes, 2003), em *Clarkia unguiculata* (Chapman *et al.*, 2003) e em *Senecio juergensii* (Bagatini, 2008).

A origem comum de protoderme e coifa observada para a espécie em estudo não tem relação com o tipo de sistema (aberto ou fechado) do MAR, pois *Pontederia cordata* apresenta MAR fechado e *Nymphaea capensis* apresenta MAR aberto, porém ambas possuem protoderme e parênquima cortical com origem comum das iniciais do meristema (Clowes, 2000 e Seago *et al.*, 2000). Também pode-se dizer, que, neste caso, não haveria uma relação filogenética. *Pistia stratiotes*, uma monocotiledônea da família Araceae, apresenta MAR fechado, com coifa e protoderme de origem comum (Flores-Borges., *et al* 2016) assim como observamos em *N. humboldtiana* (sinônimo de *N. indica*).

Pode-se dizer que o tipo de MAR em *N. humboldtiana* determina a formação do córtex radiado. Segundo Seago *et al.* (2000) o tipo de MAR de plantas aquáticas influencia no padrão das células do córtex e na sua capacidade de formação de aerênquima. Para Justin & Armstrong (1987) o MAR aberto não apresenta um padrão regular de divisões periclinais nas células da pró-endoderme, tornando o arranjo celular irregular na maior parte do córtex. O meristema apical fechado, ao contrário, produz um córtex mais organizado, que é resultado de múltiplas divisões periclinais regulares da pró-endoderme tornando o córtex radial, favorável à formação de aerênquima tanto lisígeno quanto esquizógeno. Heimsch & Seago (2008) relatam que, às vezes, a organização do MAR depende da idade da raiz, pois o MAR é uma estrutura dinâmica, visto que alguns

fatores causam mudanças na atividade do meristema, como a idade e as condições ambientais.

Seago & Seago (2004), analisando *N. humboldtiana*, confirmam que o córtex apresenta duas ou três células corticais iniciais, sendo a célula distal a que origina a pró-exoderme. Entretanto, estes autores descrevem que a pró-endoderme produz todo o córtex, exceto a exoderme. Em *N. humboldtiana* foi confirmado que a região cortical é originada a partir de uma inicial, que dá origem às iniciais do córtex externo, e uma inicial que dá origem às iniciais do córtex interno, ambas pertencentes ao meristema fundamental.

## 6.2. Ontogenia da raiz: aspectos estruturais

Em *N. humboldtiana* a protoderme e a pró-exoderme são uniestratificadas e as células da pró-exoderme são menores que as células da protoderme, apoiando, assim, a ocorrência da protoderme como camada protetora neste estágio inicial de desenvolvimento (Reddy & Chary, 2003). Evidências apontam que as divisões celulares na coifa/protoderme e suas células derivadas, se desenvolvem em padrões definidos (Wenzel e Rost, 2001).

Em *Eleocharis kleinii* a pró-endoderme forma todo o córtex da raiz (Marcondes, 2017), mas em *P. stratiotes* o córtex interno é oriundo da pró-endoderme e o córtex externo é formado por meio de divisões periclinais e anticlinais da primeira camada subjacente a protoderme (Flores-Borges *et al.*, 2017). Resultado similar a este foi encontrado em *Canna edulis* (Alonso *et al.*, 2004). Segundo Seago (2000) as variações na organização das células meristemáticas corticais, muitas vezes estão relacionadas com o tipo de meristema apical. Pois, *P. stratiotes* o MAR é Open Epidermal Monocot (OEM) (Heimsch & Seago, 2008), este tipo de meristema não pode ser considerado aberto ou fechado em sua totalidade, entretanto *Eleocharis kleinii* apresenta meristema fechado igual de *N. humboldtiana*, apesar disso apresentam formação do córtex diferente.

Em *B. salzmanii* e *B. monnieroides* a epiderme apresenta células estreitas e longas, com paredes delgadas, e a exoderme possui células curtas e longas (Bona & Morretes, 2003). Enquanto, que em *N. humboldtiana* a epiderme e exoderme são formadas por células estreitas. Epidermes discretas são comuns em plantas aquáticas

(Guttenberg, 1968), mas nem todas as raízes de plantas aquáticas têm uma epiderme discreta como, por exemplo, *P. polygonus* (Bona *et al.*, 2017).

A ocorrência da exoderme como camada de suporte mecânico no lugar de uma epiderme que é perdida e/ou epiderme que persiste, mas fica em muitos locais apenas colabada, durante o desenvolvimento da raiz de algumas plantas (Bona, 1993 e Seago *et al.*, 1999), como espécies do gênero *Potamogeton* (Rodrigues, 2006), é uma hipótese, uma vez que o crescimento secundário é anômalo. Raízes com pouco crescimento secundário geralmente retêm sua epiderme. Em plantas que apresentam crescimento secundário, como *N. humboldtiana*, as células do córtex externo começam a se diferenciar em um felogênio e no cilindro vascular observou-se o início de formação do câmbio vascular na borda interna do floema. A epiderme ainda está presente, porém, apresenta células colabadas e curtas, quando comparada com a camada subsequente (exoderme). Resultados similares a este também foram observados em *B. salzmanii* e *B. monnieroides* (Bona & Morretes, 2003) e *Senecio juergensii* (Bagatini, 2008).

### 6.3. Processo de formação do aerênquima

A formação de pequenos espaços intercelulares começou a ocorrer ainda na zona meristemática, no meristema fundamental acima do MAR. Resultados semelhantes a este também foram encontrados em *Triticum* (Thomson *et al.*, 1990), *Pontederia cordata* (Seago *et al.*, 2000), *Pistia stratiotes* (Flores-Borges *et al.*, 2016) e em *Potamogeton polygonus* (Bona *et al.*, 2017). Porém, no trabalho de Grandis (2015) *Saccharum officinarum* os espaços intercelular ocorreram na zona de alongamento.

A formação de espaços intercelulares mais amplos ainda no meristema ou próximo a ele mostra a capacidade de adaptação dessas plantas em viverem em ambiente com baixa concentração de oxigênio (hipoxia) e/ou em condições críticas de ausência de oxigênio (anoxia) (Bona & Morretes, 2003). *S. officinarum* tem formação de aerênquima induzido, mencionando o alto grau de tolerância à ambientes úmidos e ao déficit nutricional, ambos fatores que levam à formação desse tecido nas raízes do milho (Dantas *et al.*, 2001; Gunawardena *et al.*, 2001; Bouranis *et al.*, 2006; Coelho *et al.*, 2006 e Abiko *et al.*, 2012). Isso pressupõe, que o início de formação dos espaços esquizógenos em uma zona mais tardia que a meristemática, contrastando com o aerênquima de formação constitutiva. Assim, no caso de *N. humboldtiana*, cujo aerênquima é constitutivo, é de se

esperar uma resposta rápida à hipóxia ainda na fase meristemática da raiz como forma adaptativa, até mesmo em função do ambiente aquático que ocupam.

Bona & Morretes (2003) observaram que, na região de alongamento da raiz de alguns membros do gênero *Bacopa*, ocorreu um aumento do comprimento transversal das células do córtex, quando comparada com a região meristemática. Mas, em *N. humboldtiana* ocorreu separação das células e estiramento das células do córtex, que resultou em aumento no diâmetro da raiz e, conseqüentemente, aumento das lacunas de ar entre as células. A separação das células adjacentes do córtex, inicialmente resulta em lacunas esquizógenas, orientadas radialmente, confirmando o observado por Seago & Seago, (2004) nas espécies do gênero *Nymphoides* estudadas por estes autores.

Os septos, formados por células corticais dispostas radialmente, representam um reforço para a integridade do sistema de lacunas de ar (Scremin-Dias *et al.*, 1999). Em *N. humboldtiana* as lacunas de ar são separadas entre si por septos unisseriados formados por células íntegras e/ou colapsadas, sendo que as células formadoras de aerênquima sofrem um estiramento no sentido radial. Esta característica também foi registrada em raízes de *Zea mays* (Drew *et al.*, 1980; Drew *et al.*, 1981; Gunawardena *et al.*, 2001 e Evans, 2003), em *P. cordata*, *S. lancifolia* e *Thalia geniculata* (Longstreth & Borkhsenius, 2000); *B. salzmanii* e *monnierioides* (Bona & Morretes, 2003); *Nymphoides* (Seago & Seago, 2004); *Hydrocharis morsus-ranae*. L., *Glyceria máxima* (Hartn.) Holmb, *Phragmites australis* (Cav.) Trine x Steud (Seago *et al.*, 2005); *Juncus effusus* (Visser & Bögemann, 2006) *Trapella sinensis*, *Juncos krameri* e *Oryza sativa* (Jung *et al.*, 2008), *Pistia stratiotes* (Flores- Borges *et al.*, 2016); *P. polygonus* (Bona *et al.*, 2017) e *S. officinarum* (Leite *et al.*, 2017). Baseado nesses trabalhos, pode-se pensar que o formato das células dos septos é variável, e que plantas com aerênquima constitutivo apresentam septos com mais células íntegras do que colapsadas, enquanto que o aerênquima induzido apresenta mais células colapsadas do que íntegras, por ser uma situação de maior estresse às plantas que não vivem em ambientes alagados.

Seago & Seago (2004) descreveram que o aerênquima de *Nymphoides* é principalmente esquizógeno, embora exista alguma lisigenia aparente, visto restos celulares observados. Seago *et al.*, (2005), descreveram o aerênquima de *Nymphoides* como sendo esquizógeno ou esquizo-lisígeno dependendo da espécie. Enquanto que Jung *et al.*, (2008) constataram que *N. humboldtiana* desenvolveu aerênquima lisígeno radial. Em trabalho anteriormente realizado no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFRGS

(Richit & Mastroberti, em preparação), bem como neste estudo, confirmam o observado por Seago *et al.* (2005) em outras espécies do gênero, quando o aerênquima de *N. humboldtiana* inicialmente se desenvolve como esquizógeno e em seguida ocorre lisigenia, sendo um processo de esquizo-lisígeno.

Em geral, quando as células corticais estão dispostas radialmente, ocorre formação de aerênquima lisígeno (Justin & Armstrong, 1987). É sabido que, mesmo ocorrendo em alta frequência, isto não ocorre todas as vezes, como no caso de raízes de *Pistia stratiotes*, cujas células que sofrem estiramento permanecem vivas e, por isso, foi descrito como aerênquima esquizógeno (Flores-Borges *et al.* 2016). Identificar o tipo de formação do aerênquima foi uma das perguntas deste trabalho e, com base em nossos resultados, concluímos que os dois processos estão envolvidos na formação de aerênquima em *N. humboldtiana*.

#### 6.4. Distribuição desigual dos epítomos pécticos

Quimicamente, as paredes celulares das plantas são compostas principalmente por três classes de polissacarídeos - celulose, hemiceluloses e pectinas, mas também incluem proteínas e outros compostos químicos (Lampugnani *et al.*, 2018). Esses componentes da parede celular são regularmente remodelados durante desenvolvimento da planta (Carpita & Gibeaut, 1993).

Nos estádios iniciais de desenvolvimento da raiz *P. stratiotes* (Flores-Borges *et al.*, 2016) e de *P. polygonus* (Bona *et al.*, 2017) a detecção de homogalacturonanos com baixa metil-esterificação (identificada com o anticorpo LM19), é moderado, resultado diferente a esse foi encontrado em *N. humboldtiana* que apresentou abundância desse composto em todas as células. Nos estádios finais de desenvolvimento de *P. polygonus* (Bona *et al.*, 2017) e de *N. humboldtiana* foi detectado forte marcação de homogalacturonano com baixa metil-esterificação (LM19) em todas as células do córtex, inclusive nas células formadoras de aerênquima. Isso ocorre, pois no geral o HG esterificado está tipicamente presente em toda a parede celular (Ridley *et al.*, 2001 & Mohnen, 2008). De acordo com Sakai *et al.* (1993), o grau de metil-esterificação tem influência sobre as propriedades gelificantes das pectinas e também limita ou impede a ação de pectinases sobre esses polissacarídeos, ou seja, quanto menor o grau de metil-esterificação mais suscetível esta. Com isso, geralmente pode ocorrer um aumento do

grau de resistência física das paredes celulares, por causa da maior interação iônica com cálcio (Willats *et al.*, 2001). Dessa forma, pode-se supor que a presença de homogalacturonanos com baixa metil-esterificação em células colapsadas que formam o aerênquima se deve a maior interação com o cálcio, que formar um gel péctico mais estável e aumentam a rigidez da parede celular.

Nos estádios iniciais de desenvolvimento de *P. stratiotes* (Flores-Borges *et al.*, 2016), *P. polygonus* (Bona *et al.*, 2017) e de *N. humboldtiana*, homogalacturonano com alta metil-esterificação (LM20), foram fortemente detectados em toda a parede celular. Em *N. humboldtiana*, nos estádios mais desenvolvidos da raiz, os epítomos marcados com LM20, apresentaram forte marcação nas células integras do córtex, porém ocorreu marcação restrita apenas nas zonas de junções das células que formam o aerênquima. Resultado similar foi observado em *P. stratiotes* (Flores-Borges *et al.*, 2016) e *P. polygonus* (Bona *et al.*, 2017). A presença de HG apenas nas células íntegra do córtex e nas zonas de junções das células colapsadas, não é usual para células do parênquima, pois a lamela media é rica em HG (Willats *et al.*, 2001). Acredita-se que as alterações químicas observadas nessas raízes podem afetar a adesão e a morfologia das células do aerênquima, levando ao alongamento durante o colapso (Bona *et al.*, 2017).

Em *N. humboldtiana* o epítomo de galactanos (LM5) apresentou marcação leve e uniforme, nos estádios iniciais do desenvolvimento da raiz. Esses achados também foram encontrados em plântulas de *Arabidopsis* (McCartney *et al.*, 2003). Nos estádios mais desenvolvidos da raiz de *N. humboldtiana*, nas células íntegras do córtex, a marcação de galactanos é intensa. Segundo McCartney *et al.*, (2000) a deposição de galactanos nas paredes celulares está relacionada com o aumento da firmeza do tecido. Isso explica a baixa quantidade de galactanos nas células colapsadas. Acreditamos que a diminuição desse composto, as células ficam mais suscetíveis ao alongamento e ao colapso celular.

A deposição de arabinanos (identificado com o anticorpo LM6) está relacionada com a divisão celular e maior flexibilidade à parede celular (Carpita, 1984). Em vários tecidos e órgãos arabinanos está relacionado com a adesão celular (Iwai *et al.*, 2001 e Zykwincka *et al.*, 2007). Isso justifica a presença desse epítomo, em todo o desenvolvimento da raiz de *N. humboldtiana*, pois ocorreu marcação moderada em todas as células do córtex, inclusive nas células formadoras de aerênquima. No entanto, em *P. stratiotes* (Flores-Borges *et al.*, 2016) arabinanos está presente apenas no estádio mais desenvolvidos da raiz e somente nas células que formam o aerênquima. Para Moore *et*

*al.*, (2008) as cadeias laterais de arabinanos do RGI desempenham um papel crítico na capacidade das paredes celulares permanecerem flexíveis durante o crescimento da planta. Sendo assim, a flexibilidade da parede celular é fundamental, uma vez que as células que formam o aerênquima sofrem alongamento e/ou colapso.

#### 6.5. Distribuição heterogênea dos epítomos hemicelulósicos e proteicos da parede celular durante a formação de aerênquima

Em todos os estádios de desenvolvimento das raízes de *P. stratiotes* (Flores-Borges *et al.*, 2016) e de *P. polygonus* (Bona *et al.*, 2017) mananos (LM21) está presente, de maneira uniforme. Além de serem polissacarídeos de armazenamento, mananos também são polissacarídeos estruturais, responsáveis pela manutenção da integridade mecânica da parede celular (Buckeridge *et al.*, 2000c e Schroder *et al.*, 2009). Resultado semelhante ao esses, foi observado em *N. humboldtiana*, exceto na região meristemática, que não apresentou marcação. Segundo Thimm *et al.* (2002) em alguns casos, essa hemicelulose não é detectado. Para Bona *et al.* (2017) a grande presença de mananos constituindo hemicelulose estrutural em vez de xiloglucanos poderia ser um auxiliar significativo na manutenção da resistência mecânica e integridade celular das células colapsadas.

Os xiloglucanos (LM15) estão presentes em toda a parede celular das células do córtex, na região meristemática em *N. humboldtiana*. No entanto, na zona de alongamento a presença desse epítopo diminui, se comparada com a região anterior. Na região madura da raiz não se encontra esse epítopo. Resultado semelhante a esse foi encontrado em *P. stratiotes* (Flores-Borges *et al.*, 2016) e em *P. polygonus* (Bona *et al.*, 2017). Nas raízes maduras de milho xiloglucanos também não estão presentes (Brennan & Harris, 2011). Segundo Cavalier *et al.*, (2008) o xiloglucano é abundante na parede celular de células próximas do ápice meristemático. Entretanto, na região madura da raiz esta hemicelulose está ausente. Uma das justificativas para esses fatos pode ser que a união de microfibrilas de celulose com xiloglucanos pode limitar a flexibilidade celular, já que a essa hemicelulose tem função estrutural, por isso, que ao longo do desenvolvimento da raiz ela não esta presente. Outra justificativa, é que o acesso ao xiloglucano poderia ser limitado pela presença de manano na parede celular, pois mananos e xiloglucanos parecem se alternar conforme o estádio de desenvolvimento.

O anticorpo JIM13, que é marcador da proteína arabinogalactanos (AGPs), está presente em todas as paredes celulares de todas as células, dos estádios iniciais de desenvolvimento da raiz de *N. humboldtiana*. Resultado semelhante a esse foi relatado por Leite *et al.*, (2017) em raízes de cana-de-açúcar. Nos quais os AGPs estão localizados na parede celular e/ou na membrana plasmática, e estão envolvidos em vários aspectos do crescimento e desenvolvimento vegetal, como a diferenciação de tecidos reprodutivos e vegetativos, na adesão célula-célula e na expansão celular (Carpita, 1996; Majewska-Sawka & Nothnagel, 2000 e Rumyantseva, 2005). Na região madura da raiz de cana-de-açúcar (Leite *et al.*, 2017) e de *N. humboldtiana* foi detectado a presença de AGPs (JIM13) em todas as células do córtex, exceto nas células alongadas que formam o aerênquima. Para He *et al.*, (1996) os AGPs estão implicados em diversos papéis de desenvolvimento, como, afrouxamento e/ou degradação na parede celular, durante a formação de aerênquima. Isso justifica a ausência de AGPs nas células colapsadas e alongadas que compõem os septos. Outra classe de proteína é as extensinas, que em *N. humboldtiana* esta ausente, em todos os estádios de desenvolvimento da raiz, inúmeras pistas apontam para papéis relacionados ao estresse, cicatrização de feridas e defesa de plantas (Srivastava *et al.*, 2017). Dever por isso que não ocorreu marcação para esse epítipo.

Nossos resultados mostram que a ausência de alguns componentes da parede celular nas células formadoras de aerênquima (a partir do estágio 3), como HGs (LM18 e LM20), galactanos (LM5), xiloglucanos (LM15) e as proteínas arabinogalactanos (JIM13) podem levar ao alongamento celular durante o colapso celular. Estes compostos estão presentes nas demais células íntegras do córtex e ausentes apenas nas células colapsadas que formam o aerênquima.

Talvez, as alterações químicas observadas nas raízes de *N. humboldtiana* possam causar diversas modificações na parede celular, como a perda da adesão célula a célula, que é proporcionado pela presença de HGs; a estabilidade mecânica da parede celular, que é obtida através dos galactanos; as funções estruturais da parede que são mantidas através dos xiloglucanos e a expansão e proliferação das células, que é afetada pela ausência de proteínas arabinogalactanas. Esse comportamento no metabolismo dos polissacarídeos durante a formação do aerênquima esquizo-lisígeno indica que ocorre degradação parcial da parede celular e que este processo pode estar relacionado com a degradação da lamela média. Evans (2003) descreve que a degradação da parede celular

começa com a separação da lamela média, seguida pelo colapso das células. De forma geral, apenas os arabinanos e os mananos estão presentes nas células colapsadas que formam o aerênquima. Nossa hipótese é que os arabinanos desempenham um papel fundamental na determinação da flexibilidade na parede celular e que os mananos mantêm a integridade desses restos de parede celular.

## **7. CONCLUSÃO**

As raízes de *N. humboldtiana* formam aerênquima esquizo-lisígeno e que durante este processo as paredes celulares das células formadoras de aerênquima sofrem alterações químicas, ocasionando modificações das características morfológicas das paredes, deixando estas mais suscetíveis ao alongamento, colapso e à conseqüentemente formação de lacunas de ar.

Os polissacarídeos detectados por testes imunocitoquímicos mostram que não ocorreu degradação em parte da parede celular nas células do córtex que formam aerênquima. Nos estádios mais desenvolvidos da raiz houve a presença de alguns compostos químicos, como arabinanos e os mananos. Entretanto, os demais compostos químicos analisados (HGs, galactanos, xiloglucanos e as proteínas arabinogalactanos) não estão presentes/ou estão em pequena quantidade, nestes restos de parede celular que compõe as células formadoras de aerênquima. Porém estes compostos estão presentes nas células integras do córtex. Esses dados suportam a hipótese de que nem todo processo lisígeno leva a degradação total da parede celular.

## **1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**Abiko T, Kotula L, Shiono K, Malik Ai, Colmer TD & Nakazono M. 2012.** Enhanced formation of aerenchyma and induction of a 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* **35**: 1618-1630.

**Albersheim P, Darvill A.G, Roberts K, Sederoff R.R, Staehelin A. 2010.** Plant Cell Walls: from Chemistry to Biology. *Garland Science* **1**: 430.

**Alonso AA, Moraes-Dallaqua MA, Menezes NL. 2004.** Endoderme com atividade meristemática em raiz de *Canna edulis* Kerr-Gawler (Cannaceae). *Acta Botanica Brasilica* **18**: 693-699.

**Bagatini KP. 2008.** Ontogênese e anatomia da raiz, anatomia do rizoma e folhas de *Senecio juergensii* mattf. (Asteraceae) (margaridinha do banhado) dos ambientes lêntico gramíneo e lótico, e variações morfoanatômicas dos estádios vegetativo e reprodutivo destes órgãos nos dois ambientes. Dissertação (Mestrado em Botânica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

**Barlow PW. 1975.** The root cap. In: Torrey JG, Clarkson DT, editors. The development and function of roots. London: *Academic Press* 21-54.

**Barlow PW. 2003.** The Root Cap: Cell Dynamics, Cell Differentiation and Cap Function. *Journal of Plant Growth Regulation* **21**: 261-286.

**Bellini C, Pacurar, DI, Perrone I. 2014.** Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annual Review of Plant Biology* **65**: 639–666.

**Bona C, Moço MCC, Mastroberti AA. 2017.** Cytological aspects during the stretching of collapsed cells in the root aerenchyma of *Potamogeton polygonus* Cham. & Schldl. (Potamogetonaceae). *Flora* **239**: 151-158.

**Bona C, Morretes, BL. 2003.** Anatomia das raízes de *Bacopa salzmanii* (Benth.) Wettst. EX Edwall e *Bacopa Monnieroides* (Cham.) Robinson (Scrophulariaceae) em ambientes aquático e terrestre. *Acta Botanica Brasilica* **17**: 155-170.

**Bona C. 1993.** Estudo morfo-anatômico comparativo dos órgãos vegetativos de *Alternanthera philoxeroides* (Mart) Griseb e *Alternanthera aquatica* (Parodi) Chodat (Amaranthaceae). Dissertação (Mestrado em Botânica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

**Bouranis DL, Chorianopoulou SN, Kollias C, Maniou P, Protonotarios VE, Siyiannis, VF, Hawkesford MJ. 2006.** Dynamics of aerenchyma distribution in the cortex of sulfate-deprived adventitious roots of maize. *Annals of Botany* **97**: 695-704.

**Brennan M, Harris PJ. 2011.** Distribution of fucosylated xyloglucans among the walls of different cell types in monocotyledons determined by immunofluorescence microscopy. *Molecular Plant* **4**: 144-156.

**Burton RA, Gidley MJ, Fincher GB. 2010.** Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nature chemical biology* **6**: 724-732.

**Carpita NC. 1984.** Fractionation of hemicelluloses from maize cell walls with increasing concentrations of alkali. *Phytochemistry* **23**:1089-1093.

**Carpita NC, Gibeaut DM. 1993.** Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* **3**: 1-30.

**Carpita NC. 1996.** Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*. **47**:445–476.

**Cavalier DM, Lerouxel O, Neumetzler L, Yamauchi K, Reinecke A, Freshour G, Zabolina OA, Hahn MG, Burgert I, Pauly M. 2008.** Disrupting two *Arabidopsis*

*thaliana* xylosyltransferase genes results in plants deficient in xyloglucan, a major primary cell wall component. *Plant Cell* **20**: 1519-1537.

**Chapman K, Groot EP, Nichol SA, Rost TL. 2003.** Primary root growth and the pattern of root apical meristem organization are coupled. *Journal of Plant Growth Regulation* **21**: 287-295.

**Clowes FAL. 2000.** Pattern in root meristem development in angiosperms. *New Phytologist* **146**: 83-94.

**Coelho GTCP, Souza IRP, Carneiro NP, Schaffert RE, Brandão RL, Alves VMC, Paiva LV, Carneiro AA. 2006.** Formação de aerênquima em raízes de milho sob estresse de fósforo. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo* **5**: 443-449.

**Cosgrove DJ. 2005.** Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews: molecular cell biology* **6**: 850-861.

Dados climáticos para cidades mundiais. Imbé. Disponível em:

< [https://pt.climate data.org/location/43871/](https://pt.climate.data.org/location/43871/)>. Acesso em 30/06/2018.

**Dantas BF, Aragão CA, Alves JD. 2001.** Cálcio e o desenvolvimento de aerênquimas e atividade de celulase em plântulas de milho submetidas a hipoxia. *Scientia Agrícola, Piracicaba* **58**: 251-257.

**De Bary A. 1877.** Comparative anatomy of the vegetative organs of the phanerogams and ferns. Translation by Bower FO, Scott DH, 1884). *Oxford*: Clarendon Press.

**Drew MC, Chamel A, Garrec GP, Fourcy A. 1980.** Cortical air spaces (Aerenchyma) in roots of corn subjected to oxygen stress. *Plant Physiology* **65**: 506-511.

**Drew MC, Jackson MB, Giffard SC & Campbell R. 1981.** Inhibition by silver ions of gas space (aerenchyma) formation in adventitious roots of *Zea mays* L. subjected to exogenous ethylene or to oxygen deficiency. *Planta* **153**: 217-224.

**Evans DE. 2003.** Aerenchyma formation. *New Phytologist* **161**: 35-49.

**Fidalgo O, Bononi VLR. 1984.** Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico. São Paulo. *Instituto de Botânica* 1-62.

**Flores-Borges DNA, Mastroberti AA, Bona C. 2016.** Ontogeny and distribution of cell-wall glycans during aerenchyma formation in roots of *Pistia stratiotes* (Araceae) *Botanical Journal of the Linnean Society (Print)* **180**: 401-412.

**Francener A, Fernandes-Júnior AJ, Dantas-Queiroz, MV, Hall CF. 2014.** *Nymphoides grayana* (Griseb.) Kuntze: First record of Menyanthaceae for the state of Tocantins. *Check List* **10**: 1538-1540.

**Fry SC. 2001.** Plant Cell Walls. *Nature Publishing Group* 1-11.

**Freshour G, Clay RP, Fuller MS, Albersheim P, Darvill AG, Hahn MG. 1996.** Developmental and tissue-specific structural alterations of the cell wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Physiology* **110**: 1413-1429.

**Gaspar Y, Johnson KL, McKenna JA, Bacic A, Schultz CJ. 2001.** The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Molecular Biology* **47**: 161-176.

**Grandis A, Godoi S, Buckeridge MS. 2010.** Respostas fisiológicas de plantas amazônicas de regiões alagadas às mudanças climáticas globais. *Revista Brasileira de Botânica* **33**: 1-12.

**Giulietti1 AM, Izabel1 TSS, Oliveira1 RP. 2015.** Flora da Bahia: Menyanthaceae. *Sitentibus série Ciências Biológicas* **15**: 1-5.

**Gunawardena A, Pearce DM, Jackson MB, Hawes CR Evans DE. 2001.** Characterisation of programmed cells death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.). *Planta* **212**: 205-214.

**Guttenberg von H. 1968.** Der primäre Bau der Angiospermenwurzel. In: K. Linsbauer. *Handbuch der pflanzenanatomie*. Berlin, Gebruder Borntraeger **8**.

**He CJ, Finlayson SA, Drew MC, Jordan WR & Morgan PW. 1996.** Ethylene Biosynthesis during Aerenchyma Formation in Roots of Maize Subjected to Mechanical Impedance and Hypoxia. *Plant Physiology* **112**: 1679-1685.

**He CJ, Morgan PW, Drew MC. 1992.** Enhanced sensitivity to ethylene in nitrogen-or phosphate-starved roots of *Zea mays* L. during aerenchyma formation. *Plant Physiology* **98**: 137-142.

**Heimsch C, Seago JL. 2008.** Organization of the root apical meristem in angiosperm. *American Journal of Botany* **95**: 1-21.

**Holzschuh MJ, Bohnen H, Anghinoni I. 2010.** Avaliação da porosidade e placa férrica de raízes de arroz cultivado em hipóxia. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* **34**: 1763-1769.

**Iwai H, Ishii T, Satoh S. 2001.** Absence of arabinan in the side chains of the pectic polysaccharides strongly associated with cell walls of *Nicotiana plumbaginifolia* non-organogenic callus with loosely attached constituent cells. *Planta* **213**: 907-915.

**Jackson MB, Armstrong W. 1999.** Formation of Aerenchyma and the Processes of Plant Ventilation in Relation to Soil Flooding and Submergence. *Plant biology* **1**: 274-287.

**Jarvis MC, Briggs SPH, Knox JP. 2003.** Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant, Cell & Environment* **26**: 977-989.

**Jones L, Seymour GB, Knox JP. 1997.** Localization of pectic galactan in tomatocell walls using a monoclonal antibody specific to (1→4)-β-D-galactan. *Plant Physiology* **113**: 1405-1412.

**Jung J, Lee SC, Choi, HK. 2008.** Anatomical patterns of aerenchyma in aquatic and wetland plants. *Journal of Plant Biology* **51**: 428-439.

**Jung JKH, McCouch S. 2013.** Getting to the roots of it: genetic and hormonal control of root architecture. *Frontiers in Plant Science* **4**: 1-32.

**Justin SHFW, Armstrong W. 1987.** The anatomical characteristics of roots and plant response to soil flooding. *New Phytologist* **106**: 465-495.

**Lampugnani ER, Khan GA, Somssich M, Persson S. 2018.** Building a plant cell wall at a glance. *Journal of Cell Science* **131**: 1-6.

**Lee KJ, Marcus SE, Knox JP. 2011.** Cell wall biology: perspectives from cell wall imaging. *Molecular Plant* **4**: 212-219.

**Leite DCC, Grandis A, Tavares EQP, Piovezani S, Pattathil U, Avci A, Rossini A, Cambler A, Souza AP, Hahn MG, Buckeridge MS. 2017.** Cell wall changes during the formation of aerenchyma in sugarcane roots. *Annals of Botany* **120**: 693-708.

**Lipchinsky A. 2013.** How do expansins control plant growth? A model for cell wall loosening via defect migration in cellulose microfibrils. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**: 3277-3284.

**Longstreth DJ, Borkhsenius ON. 2000.** Root Cell Ultrastructure in Developing Aerenchyma Tissue of Three Wetland Species. *Annals of Botany* **86**: 641-646.

**Marcondes JPBAC. 2017.** Caracterização e evolução do aerênquima em *Eleocharis* R.BR (Cyperaceae). Dissertação (Mestrado em Botânica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

**Marcus SE, Verhertbruggen Y, Hervé C, Ordaz-Ortiz JJ, Farkas V, Pedersen HL, Willats WGT, Knox JP. 2008.** Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biology* **8**:1-12.

**Marcus SE, Blake AW, Benians TAS, Lee KJD, Poyser C, Donaldson L, Leroux O, Rogowski A, Petersen HL, Boraston A. 2010.** Restricted access of proteins to mannan polysaccharides in intact plant cell walls. *Plant J* **64**: 191-203.

**McCartney L, Ormerod A, Gidley M, Knox JP. 2000.** Temporal and spatial regulation of pectic (1→4)-β-D galactan in cell walls of developing pea cotyledons: implication for mechanical properties. *The Plant Journal* **22**: 105-113.

**McCartney L, Steele-Kingy CG, Jordan E, Knox JP. 2003.** Cell wall pectic (1-4)-β-D-galactan marks the acceleration of cell elongation in the *Arabidopsis* seedling root meristem. *The Plant Journal* **33**: 447–454.

**Melton LD, Smith BG, Ibrahim R, Schröder R. 2009.** Mannans in primary and secondary plant cell walls. *New Zealand Journal of Forestry Science* **39**: 153-160.

**Mohnen D. 2008.** Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 266-277.

**O'Brien TP, Feder N, ME M. 1964.** Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**: 368-373.

**O'Neill AM, Darvill AG, Albersheim P. 2001.** Pectic Substances. *Nature Publishing Group*. 1-11.

**O'Neill M, Albersheim P, Darvill A. 1990.** The pectic polysaccharides of primary cell walls. *Methods in Plant Biochemistry* **2**: 415-441.

**Pabst S, Brand M, Wolf OT. 2013.** Stress effects on framed decisions: there are differences for gains and losses. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **7**:1-10.

**Pacini E, Franchi GG & Ripaccioli M. 1999.** Ripe structure and histochemistry of some gymnosperms. *Plant Systematic and Evolution*. **217**: 81-99.

**Pereira FJ, Magalhães PC, Souza TC, Castro EM, Alves JD. 2010.** Atividade do sistema antioxidante e desenvolvimento de aerênquima em raízes de milho 'Saracura'. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **45**: 450-456.

**Pires MF, Castro EM, Magalhães PC, Neta ICS, Monteiro AGDP. 2015.** Etileno e peróxido de hidrogênio na formação de aerênquima em milho tolerante a alagamento intermitente. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **50**: 779-787.

**Postma JA, Lynch JP. 2011.** Root Cortical Aerenchyma Enhances the Growth of Maize on Soils with Suboptimal Availability of Nitrogen, Phosphorus, and Potassium. *Plant Physiology* **156**: 1190-1201.

**Pott VJ, Pott A. 2000.** Plantas aquáticas do Pantanal. Brasília. *Embrapa*. 1-404.

**Rascio N. 2002.** The underwater life of secondarily aquatic plants: some problems and solutions. *Critical Reviews in Plant Sciences* **21**: 401-427.

**Reddy SM, Chary SJ. 2003.** University Botany-2: Gymnosperms, Plant Anatomy, Genetics, Ecology. *New Age International* **2**: 92.

**Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D. 2001.** Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**: 929-967.

**Rodrigues S. 2006.** O gênero *Potamogeton* L. em rios de Bonito, Mato Grosso do Sul: Anatomia comparada de *Potamogeton gayi* A. Benn. e *Potamogeton illinoensis* Morong, efeitos da velocidade do fluxo da água na morfologia, e o potencial de reprodução

vegetativa de *Potamogeton illinoensis*. Dissertação (Mestrado em Botânica). Setor de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

**Saab IN, Sachs MM. 1996.** A flooding-induced xyloglucan endo-transglycosylase homolog in maize is responsive to ethylene and associated with aerenchyma. *Plant Physiology* **112**: 385-391.

**Sculthorpe CD. 1967.** The biology of aquatic vascular plants. New York. *London: Edward Arnold* **53**.

**Schussler EE, Longstreth DJ. 2000.** Changes in cell structure during the formation of root aerenchyma in *Sagittaria lancifolia* (Alismataceae). *American Journal of Botany* **87**: 12-19.

**Scremin-Dias E, Pott VJ, Hora RC, Souza PR. 1999.** Nos jardins submersos da Bodoquena - Guia para identificação de plantas aquáticas de Bonito e região. Campo Grande. *UFMS*. 1-160.

**Seago JL Jr, Marsh LC, Stevens KJ, Soukup A, Votrubova O, Enstone DE. 2005.** A re-examination of the root cortex in wetland flowering plants with respect to aerenchyma. *Annals of Botany* **96**: 565-579.

**Seago JL Jr, Peterson CA, Kinsley LJ, Broderick J. 2000.** Development and structure of the root cortex in *Caltha palustris* L. and *Nymphaea odorata* Ait. *Annals of Botany* **86**: 631-640.

**Seago JL Jr, Seago M. 2004.** A. Development and structure of the root cortex in adventitious roots of *Nymphoides* (Menyanthaceae). *Biologia* **59**: 49-56.

**Seago JR, J.L, Peterson CA, Enstone DE. 1999.** Cortical ontogeny in roots of the aquatic plant, *Hydrocharis morsus-ranae* L. *Canadian Journal of Botany* **77**: 113-121.

**Smallwood M, Martin H, Knox JP. 1995.** An epitope of rice threonine and hydroxyproline-rich glycoprotein is common to cell wall and hydrophobic plasma membrane glycoproteins. *Planta* **196**: 510-522.

**Srivastava V, McKee LS, Bulone V. 2017.** Plant Cell Walls. *John Wiley & Sons Ltd: Chichester*. **2017**: 1-17.

**Taiz L, Zeiger E, Moller IM, Murphy A. 2017.** Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal. *Artmed*. **6**: 888.

**Tavares EQP. 2015.** Regulação da degradação da parede celular durante a formação do aerênquima em raízes de cana-de-açúcar. Tese (doutor em Ciências). Setor de Biologia de Sistemas da Universidade de São Paulo.

**Tippery NP, Les DH, Padgett DJ, Jacobs WL. 2008.** Generic circumscription in Menyanthaceae: a phylogenetic evaluation. *Systematic Botany* **33**: 598-612.

**Thimm JC, Burritt DJ, Sims IM, Newman RH, Melton LD. 2002.** Celery (*Apium graveolens* L.) parenchyma cell walls: cell walls with minimal xyloglucan. *Physiologia Plantarum* **224**: 1091-1102.

**Thomson CJ, Armstrong W, Waters I, Greenway H. 1990.** Aerenchyma formation and associated oxygen movement in seminal and nodal roots of wheat. *Plant, Cell and Environment* **13**: 395-403.

**Verhertbruggen Y, Marcus SE, Haeger A, Ordaz-Ortiz JJ, Knox JP. 2009.** An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. *Carbohydrate Research* **344**: 1858-1862.

**Visser EJW, Bögemann GM. 2006.** Aerenchyma formation in the wetland plant *Juncus effusus* is independent of ethylene. *New Phytologist* **171**: 305-314.

**Voiniciuc C, Pauly M, Usadel B. 2018.** Monitoring Polysaccharide Dynamics in the Plant Cell Wall. *Plant Physiology* **176**: 2590-2600.

**Webb J, Jackson MB. 1986.** Transmission and cryo-scanning electron microscopy study of the formation of aerenchyma (cortical gas-filled space) in adventitious roots of rice (*Oryza sativa*). *Journal of Experimental Botany* **37**: 832-841.

**Willats WGT, Marcus SE, Knox JP. 1998.** Generation of a monoclonal antibody specific to (1→5)- $\alpha$ -L-arabinan. *Carbohydrate Research* **308**: 149-152.

**Willats WGT, Orfila C, Limberg G, Buchholtz HC, Alebeek GWM, Voragen AGJ, Marcus SE, Christensen TMIE, Mikkelsen JD, Murray BS, Knox JP. 2001.** Modulation of the Degree and Pattern of Methyl-esterification of Pectic Homogalacturonan in Plant Cell Walls. *The journal of biological chemistry* **276**: 19404-19413.

**Willats WGT, Limberg G, Buchholtz H, van Alebeek GJ, Benen J, Christensen T, Visser J, Voragen A, Mikkelsen J, Knox JP. 2000.** Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides and enzymatic degradation. *Carbohydrate Research* **327**: 309-320.

**Willats WGT, Gilmartin PM, Mikkelsen JD, Knox JP. 1999.** Cell wall antibodies without immunization: generation and use of de-esterified homogalacturonan block-specific antibodies from a naive phage display library. *The Plant Journal* **18**: 57-65.

**Williams WT, Barber DA. 1961.** The functional significance of aerenchyma in plants. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **15**: 132-144.

**Zykwinska A, Thibault JF, Ralet MC. 2007.** Organization of pectic arabinan and galactan side chains in association with cellulose microfibrils in primary cell walls and related models envisaged. *Journal of Experimental Botany*, **58**: 1795-1802.