VANESSA ROMERO GODOFREDO

ONTOGÊNESE, FUNÇÃO E EVOLUÇÃO
DAS TRAQUEÍDES VASCULARES EM CACTACEAE,
TENDO COMO MODELO O CACTO COLUNAR
PILOSOCEREUS AURISSETUS
(WERDERN.) BYLES & G.D. ROWLEY

SÃO PAULO 2009

VANESSA ROMERO GODOFREDO

ONTOGÊNESE, FUNÇÃO E EVOLUÇÃO DAS
TRAQUEÍDES VASCULARES EM CACTACEAE, TENDO
COMO MODELO O CACTO COLUNAR *PILOSOCEREUS*
AURISSETUS (WERDERN.) BYLES & G.D. ROWLEY

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Botânica, na Área de Anatomia Vegetal.

Orientador(a): Gladys Flávia de Albuquerque Melo-de-Pinna

SÃO PAULO

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Godofredo, Vanessa R.

ONTOGÊNESE, FUNÇÃO E EVOLUÇÃO DAS
TRAQUEÍDES VASCULARES EM CACTACEAE, TENDO
COMO MODELO O CACTO COLUNAR *PILOSOCEREUS*
AURISSETUS (WERDERN.) BYLES & G.D. ROWLEY
103 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo. Departamento de
Botânica.

1. Traqueídes vasculares; 2. Cactos colunares; 3.
Parede celular; 4. Ontogênese; 5. Evolução; 6.
Cactaceae.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

Aos meus pais

*“All our science, measured against reality, is primitive and childlike - and yet it is
the most precious thing we have.”*

Albert Einstein (1879-1955)

AGRADECIMENTOS

À **Universidade de São Paulo**, em especial ao **Instituto de Biociências**, pelo amparo, por ser minha formação, meu trabalho e meu segundo lar.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pela bolsa concedida e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPQ**), pelos dois primeiros meses de bolsa.

À minha querida orientadora, **Prof.^a Gladys Flavia Melo-de-Pinna**, pela orientação, apoio e amizade. Por todas as vezes que sentou comigo no laboratório, pelas eternas revisões de texto, pelas longas discussões sobre os mais variados assuntos, por incentivar as ideias boas e cortar as loucas, por suas palavras de apoio nas horas mais apropriadas.

Ao **Prof. Marcos Buckeridge**, pela valiosa colaboração, sem a qual seria impossível a interpretação dos resultados. Pelas discussões, ideias empolgantes, e mais revisões de texto.

À **Suzana Alcântara**, por suas aulas, pela orientação e participação essencial nas análises de reconstrução.

Aos professores que ministraram as disciplinas de pós-graduação nas quais me matriculei, **Prof. Antônio Salatino, Prof. Gabriel Marroig, Prof.^a Gladys Flavia Melo-de-Pinna, Prof. José Rubens Pirani, Prof.^a Lúcia Lohmann, Prof.^a Nanuza Luíza de Menezes e Prof.^a Verônica Angyalossy**, por aulas fundamentais na minha formação.

A todos os **professores da graduação**, dos quais guardo muitas lembranças, exemplos e ensinamentos.

Aos meus **professores biólogos dos tempos de colégio e cursinho**, pelo amor e respeito à biologia e pela participação na minha escolha de profissão, da qual não me arrependo nem por um minuto!

Aos professores do Laboratório de Anatomia Vegetal: **Prof.^a Berta Lange Morretes, Prof. Gregório Ceccantini, Prof.^a Maria Emilia Maranhão Estelita e Prof.^a Verônica Angyalossy**. Em especial à professora **Nanuza Luíza de Menezes**, que me encanta desde a primeira aula de Vasculares!

À bióloga e técnica **Gisele Costa**, por sua diligência, habilidade e conhecimentos.

A todos os **amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal**, alunos e ex-alunos, André Lima, Ari (Gustavo) Burin, Bianca Brasil, Cairo Faleiros, Carla Verna, Celina Nakamura, Cristiane Gonçalves, Cristina Zampieri, Deusa Deise de Abreu, Emília Arruda, Flávia Nascimento, Giuliano Locosselli, Guilherme Freire, José Hernandez, Luiz Horta, Marcelo Pace, Mariane de Souza-Baena, Marina Milanello, Marlene Luz, Marli Botânico, Natacha Lorigo, Natália Antonucci, Paula Elbl, Rafael Cruz, Renata Lemos, Ricardo Cardim, Roberta Magna, Tássia dos Santos, Thaís Muntoreano e Viviane Jono.

Ao adorável **Marcelo Pace**, que com sua vontade incondicional de ajudar e ensinar a todos, teve profunda influência em mim, na forma de enxergar meu próprio trabalho.

À querida **Emília Arruda**, com quem primeiro discuti sobre cactos, pelo seu companheirismo e solicitude, seja nas prévias de qualificação, seja na correção das várias versões dos relatórios.

Aos amigos **André Lima**, **Natália Antonucci** e **Renata Lemos**, pelas sugestões preciosas nos capítulos 1 e 2.

À **Michelle Bueno** pelo auxílio nos experimentos dos capítulos 1 e 2.

À **Patrícia Pinho**, por sua enorme ajuda e ensinamentos nos experimentos de imunocitotlocalização, bem como pela leitura do capítulo 3. Também à Adriana Grandis e Mari Ionashiro, pela ajuda com os demais experimentos de fisiologia do capítulo 3.

À **Emília Arruda**, **Paula Elbl**, **Renata Lemos** e outros pela ajuda nas coletas dos espinhosos!!

Ao especialista **Marlon Machado**, por transmitir seu grande conhecimento em Cactaceae, e por nos ter recebido generosamente em sua casa em Feira de Santana.

Às professoras **Maria Emília Estelita**, **Nanuza Luiza de Menezes** e **Verônica Angyalossy**, pelas sugestões na qualificação.

À **Prof.^a Eny Floh**, por permitir o uso de seu fotomicroscópio. Também à Júlia Bolanho, por me ajudar a usá-lo.

À minha querida e preciosa amiga **Natália Paganotti Antonucci**, pela cumplicidade, pelo companheirismo, e por me deixar invadir sua mesa tantas vezes!

Aos meus maravilhosos irmãos, **André Romero Godofredo**, **Daniela Romero Godofredo** e **Valéria Romero Godofredo**, pela companhia insubstituível e por estarem sempre ao meu lado, independentemente do contexto.

Aos meus pais, **Leila Romero Godofredo** e **Jerônimo Fernandes Godofredo**, pelo esforço em prover minha educação, por me apoiarem de todas as formas que lhes são possíveis, e pelo carinho e afeto incomensuráveis.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL	09
Referências bibliográficas	21
CAPÍTULO 1. ONTOGÊNESE DAS TRAQUEÍDES VASCULARES DE <i>PILOSOCEREUS AURISSETUS</i> BYLES & ROWLEY (CACTACEAE)	25
Resumo	26
Introdução	27
Material e métodos	28
Resultados	29
Discussão	32
Referências bibliográficas	38
CAPÍTULO 2. TRAQUEÍDES VASCULARES EM TRAÇOS DE ARÉOLAS DE <i>PILOSOCEREUS AURISSETUS</i> BYLES & ROWLEY (CACTACEAE)	46
Resumo	47
Introdução	48
Material e métodos	49
Resultados	50
Discussão	51
Referências bibliográficas	54
CAPÍTULO 3. CARBOIDRATOS DA PAREDE CELULAR DAS TRAQUEÍDES VASCULARES DE <i>PILOSOCEREUS AURISSETUS</i> BYLES & ROWLEY (CACTACEAE) E SUAS IMPLICAÇÕES FUNCIONAIS	59
Resumo	60
Introdução	61
Material e métodos	62
Resultados	64
Discussão	65
Referências bibliográficas	70
CAPÍTULO 4. EVOLUÇÃO DO POLIMORFISMO DO LENHO EM CACTOIDEAE	76
Resumo	77
Introdução	78
Material e métodos	79
Resultados e discussão	85
Referências bibliográficas	93
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	100
RESUMO	102
ABSTRACT	103

INTRODUÇÃO GERAL

A ordem Caryophyllales, segundo Judd *et al.* (2008), está constituída por cerca de 8600 espécies e 18 famílias, sendo as maiores Caryophyllaceae, Phytolaccaceae, Petiveriaceae, Nyctaginaceae, Amaranthaceae (incluindo Chenopodiaceae), Cactaceae e Portulacaceae. Dentre os últimos 40 milhões de anos, as famílias Cactaceae, Aizoaceae, Portulacaceae e Didiereaceae, pertencentes à ordem, desenvolveram diversas adaptações ao ambiente xérico (Landrum 2002). A família Cactaceae é tradicionalmente dividida em “Pereskioideae”, que compreendia os gêneros *Pereskia* e *Maihuenia*; Opuntioideae, os cactos com gloquídeos; e Cactoideae, cujos membros, com exceção de *Blossfeldia* (Butterworth 2006), têm como sinapomorfia a ausência do íntron rpoC1 (Wallace & Cota 1995). Cactoideae compreende cactos com diversas formas e tamanhos, cujos hábitos são descritos resumidamente como globosos, colunares e epífitas (Gibson & Nobel 1986).

Cactaceae

Plantas suculentas são características por absorverem grande quantidade de água, que fica armazenada para utilização em períodos de escassez hídrica (Fahn & Cutler 1992). Nessas plantas ocorre uma tendência a diminuição na razão superfície:volume, sendo o formato esférico o que mais se aproxima do ideal (Fahn & Cutler 1992). O órgão que armazena água em Cactaceae é o cladódio, ou seja, o caule, que também é responsável pela fotossíntese (Gibson & Nobel 1986). Geralmente o cladódio é formado por costelas, cujo número é importante para a identificação taxonômica, e podem estar relacionadas a diversas funções, como o aumento de volume durante a hidratação dos tecidos (Gibson & Nobel 1986). Na axila de cada folha, é desenvolvida a gema axilar, que, em Cactaceae, é modificada, pois origina espinhos no lugar de folhas, sendo conhecida como aréola (Gibson & Nobel

1986). Ao atingir certa idade, o meristema caulinar de algumas espécies passa irreversivelmente a formar uma estrutura especializada, denominada cefálio, onde as aréolas são tão próximas que a grande densidade de tricomas impede a realização de fotossíntese por essa região (Buxbaum 1950, Gibson & Nobel 1986, Mauseth 1989). Esta estrutura tem função reprodutiva e sua anatomia difere grandemente da região formada durante a fase juvenil, inclusive com relação ao lenho, onde não se encontram nem fibras, nem traqueídes vasculares (Mauseth 1989).

Fig 1. Eventos na evolução inicial da forma em Cactaceae. As caixas brancas representam eventos com maior certeza, enquanto que as caixas de cor cinza representam eventos mais incertos. O

traçado cinza mostra todos os possíveis locais em que os eventos da caixa cinza, abaixo, à direita, poderiam ter ocorrido. (Extraído de Edwards & Donougue 2006)

Conhecendo-se a morfologia peculiar encontrada na família, pode-se imaginar porque o ancestral de Cactaceae tem sido um tema tão debatido pelos pesquisadores recentemente (Hershkovitz & Zimmer 1997, Griffit 2004, Edwards *et al.* 2005, Edwards & Donougue 2006, Nyffeler *et al.* 2008, Butterworth & Edwards 2008). Surpreendentemente, em estudo sobre a evolução da forma em Cactaceae, Edwards & Donougue (2006) verificaram que o ancestral não suculento e com folhas da família já habitava o atual nicho ecológico, e que tanto a suculência do caule como a ausência de folhas teria evoluído independentemente em Cactoideae e Opuntioideae (Fig 1).

Vários estudos relacionam aspectos da estrutura interna, hábito e ambientes ocupados por cactos (Gibson 1973; Conde 1975; Gibson & Nobel 1986). Em um belo trabalho, Terrazas & Arias (2003) reuniram uma lista de caracteres morfo-anatômicos relevantes para reconstrução filogenética (63, ao todo), coletados da extensa literatura de Cactaceae, e que corroboraram as prévias hipóteses filogenéticas moleculares (Wallace & Cota 1995, Nyffeler 2002). Com relação às espécies brasileiras, destacam-se os trabalhos de Silva & Alves (1999) com espécies de *Pilosocereus* da caatinga, os quais descrevem, não apenas características xeromórficas, mas também diagnósticas como, a ocorrência de uma hipoderme colenquimática. Já Arruda *et al.* (2005) realizaram um estudo detalhado sobre a anatomia de diversos gêneros de Cactaceae encontrados na caatinga. Soffiatti & Angyalossy (2003, 2005) estudaram o desenvolvimento do cladódio de *Cipocereus* da Cadeia do Espinhaço - MG, e fazem algumas considerações a respeito do xilema secundário, com a definição de padrões para o gênero. As mesmas autoras em 2007 fizeram uma abordagem anatômica e filogenética de espécies da tribo Cereeae, considerando caracteres morfológicos, anatômicos e moleculares.

Alguns dos principais estudos anatômicos em Cactaceae foram desenvolvidos por Metcalfe & Chalk (1950), Gibson (1977), Gibson & Horak (1978), e o estudo de

Gibson & Nobel (1986) continua sendo uma das principais referências sobre a família. Dentre outros, alguns abordam questões adaptativas (Gibson 1973; Mauseth & Ross 1988; Sajeve & Mauseth 1991; Mauseth & Sajeve 1992; Mauseth 1993a; Mauseth & Plemons-Rodriguez 1998; Soffiatti & Angyalossy 2003; Arruda *et al.* 2005) bem como diagnósticas (Conde 1975; Mauseth 1989, 1999; Soffiatti & Angyalossy 2003; Silva & Alves 1999; Arruda *et al.* 2005). Mauseth (2006), de forma resumida, fez uma abordagem interessante ao tentar mostrar como a morfologia aparentemente bizarra dos cactos é derivada de uma organização anatômica básica, comum à maioria das eudicotiledôneas. Quanto aos trabalhos desenvolvidos com as raízes de Cactaceae podem ser mencionados os de Metcalfe & Chalk (1950) e Mauseth & Ross (1988), abordando aspectos anatômicos gerais observados no órgão, além dos trabalhos de Silva & Alves (1999) e Godofredo & Melo-de-Pinna (2008), em que são analisados caracteres em *Pilosocereus*.

No cladódio de um cacto, a epiderme pode ser uni ou multisseriada, sendo substituída pela periderme na região basal (Gibson & Nobel 1986). Embora sejam plantas xerófitas, muitos cactos não possuem estômato em cavidades, característica associada ao metabolismo CAM (Fahn & Cutler 1992). Como sistema fundamental, hipoderme geralmente está presente, e o parênquima cortical é diferenciado em clorofiliano, externamente, e aquífero, internamente (Gibson & Nobel 1986). Outros caracteres bastante frequentes em Cactaceae são as células mucilaginosas e os cristais, especialmente oxalato de cálcio, basicamente resíduos do metabolismo (Gibson & Nobel 1986). No largo córtex de Cactaceae, onde a simples difusão passa a ser um processo lento, o transporte é auxiliado pelos feixes corticais, característicos da família (Mauseth & Saveja 1992).

Gibson (1973) estudou em detalhe o crescimento secundário em Cactaceae, definindo alguns padrões comuns na família. Mauseth & Ross (1988), Mauseth (1993b) e Mauseth & Plemons-Rodriguez (1998) abordam aspectos evolutivos e adaptativos presentes neste tecido em várias espécies de Cactaceae. Trabalhos como

os de Metcalfe & Chalk (1950) e Soffiatti & Angyalossy (2003) também apresentam caracterização anatômica do xilema secundário em várias espécies de Cactaceae. Recentemente, Godofredo & Melo-de-Pinna (2008) descreveram em detalhe a anatomia dos órgãos vegetativos de *Pilosocereus aurisetus*, e buscaram entender o desenvolvimento do lenho.

Atualmente, uma característica que têm despertado interesse entre os pesquisadores se trata de um tipo particular de traqueíde vascular encontrado em Caryophyllales (Mauseth *et al.* 1995, Landrum 2001, 2002, 2008, Mauseth 2004, Arruda *et al.* 2004, Melo-de-Pinna *et al.* 2006, Godofredo & Melo-de-Pinna 2008). Estas traqueídes apresentam padrão de espessamento de parede secundária semelhante ao dos elementos de vaso do protoxilema (Carlquist 1975), entretanto com a diferença de terem bandas muito mais largas (superior a 2µm). Por isso, são denominadas traqueídes com amplo espessamento de parede – “wide-band tracheids ou WBT” (Mauseth *et al.* 1995).

As traqueídes vasculares de Cactaceae (WBTs)

Traqueídes são elementos traqueais, e, portanto possuem parede secundária espessada e protoplasto ausente na maturidade. Estas células diferem dos elementos de vaso por não serem perfuradas (Esau 1965). Segundo Fukuda (1996), a diferenciação dos elementos traqueais é feita a partir de células procambiais, e é dividida em quatro processos ontogenéticos: origem da célula; alongamento da célula; deposição e lignificação da parede secundária; e lise da parede e morte da célula. O autor divide a diferenciação em processo inicial, que inclui os dois primeiros estágios, e processo tardio, que compreende os eventos específicos para elementos traqueais.

Em Aizoaceae as WBTs foram encontradas em Ruschioideae, um grupo monofilético (Landrum 2001). O autor sugere que as WBTs sejam uma autapomorfia para este táxon, chamando a atenção ainda para o fato do grupo basal de Cactaceae (*Pereskia*) não apresentar WBTs e de apenas dois gêneros especializados de

“Portulacaceae” (*Anacampserus* e *Ceraria*) apresentarem WBTs, o que poderia sugerir uma origem independente em cada uma das três famílias. Entretanto, o fato de uma estrutura ter aparecido mais de uma vez dentro de grupos próximos filogeneticamente, pode indicar uma homologia latente. Isto significa que o mesmo mecanismo genético e de desenvolvimento está envolvido no aparecimento da estrutura, embora ela não esteja presente no ancestral (Rutishauser & Moline 2005). Recentemente, Mauseth (2004) encontrou WBTs em plântulas de cactos colunares, sendo que até então, em Cactaceae, essas células estavam restritas aos cactos globosos.

Fig 2. Tipos de lenho encontrados no caule de *Pilosocereus aurisetus*, em vista transversal. A – Lenho monomórfico WBT, encontrado no caule jovem (Barra = 80 μ m). B – Lenho fibroso, encontrado na região mediana do caule adulto. (Barra = 80 μ m). C – Lenho dimórfico WBT/fibroso, encontrado na base do caule adulto (Barra = 170 μ m). D – Detalhe da fase com WBTs (seta) (Barra = 40 μ m) (Extraído de Godofredo & Melo-de-Pinna 2008).

Em Portulacaceae, foram registradas traqueídes comuns em folhas das quatro espécies de *Portulaca*. Contudo, *P. hirsutissima* e *P. werdermannii* apresentam nas nervuras de menor porte traqueídes curtas, com características semelhantes às traqueídes terminais encontradas em várias angiospermas, mas que lembram as WBTs curtas das Cactaceae (Hernandes-Lopes & Melo-de-Pinna 2008).

As traqueídes podem estar presentes tanto no xilema primário quanto no secundário, sendo que neste último, a sua ocorrência é um dos fatores responsáveis pela diversidade de tipos de lenho em Cactaceae.

Polimorfismo do lenho

Basicamente, o lenho em Cactaceae pode ser fibroso ou não-fibroso, o que significa que, além dos elementos de vaso, o lenho pode ser uma matriz de fibras, ou uma matriz formada por traqueídes e parênquima em quantidades variáveis. Em alguns casos, ocorre apenas um desses tipos de lenho, mas muitas vezes observa-se mais de uma fase, o que é chamado em Cactaceae de polimorfismo do lenho. Mauseth & Plemons (1995), utilizando como critério a ocorrência de WBTs, classificaram os tipos de lenhos em: monomórfico WBT; dimórfico WBT/fibroso; dimórfico WBT/parenquimatoso; trimórfico WBT/fibroso/parenquimatoso. Os autores observaram que em *Vatricania guentheri*, o câmbio passa a se diferenciar em outro tipo de lenho de forma sincrônica, em toda a extensão do caule. Isso pode causar diferentes tipos de polimorfismo em diferentes regiões do caule.

Em estudos realizados por Godofredo & Melo-de-Pinna (2008) foi observado que *Pilosocereus aurisetus*, um cacto colunar, apresenta lenho monomórfico WBT no estágio jovem. Entretanto, na base do caule do adulto, vê-se um lenho dimórfico (WBT/fibroso), enquanto que nas regiões mediana e apical o que se observa é um lenho monomórfico fibroso (fig 2).

Fig 3. Formação do lenho dimórfico na base do caule dos cactos colunares adultos (Modificado de Godofredo & Melo-de-Pinna 2008).

Esses resultados sugerem que, a partir de um estágio, o cacto deixa de formar WBTs, para formar um lenho fibroso, e nas regiões mais novas, vê-se apenas o lenho fibroso (Fig 3), corroborando a hipótese que essas traqueídes estão mais relacionadas com o transporte e armazenamento de água do que com a sustentação, como sugerido por Mauseth *et al.* (1995).

Função das traqueídes vasculares

Os estudos das WBTs também têm despertado o interesse dos pesquisadores no sentido de entender a função destas células (Mauseth *et al.* 1995, Landrum, 2001, 2002, 2006), que parece estar relacionada tanto com o armazenamento quanto com o transporte axial de água (Mauseth *et al.* 1995). Segundo Carlquist (1975), elementos traqueais com espessamento anelar ou helicoidal, associados à ausência de fibras permitem a contração dos tecidos durante o estresse hídrico sem o colapso das células condutoras. Situação semelhante ocorre em *Sedum praealtum* (Crassulaceae), que

também possui traqueídes vasculares com esse padrão de espessamento no xilema secundário (Carlquist 1962).

Fig 4. Esquema, mostrando como o espessamento de parede secundária das WBTs pode evitar o colapso irreversível da célula. (Extraído de Landrum 2006).

No caso das WBTs, grande parte da parede primária fica exposta, aumentando a permeabilidade entre as células, e com a ausência das placas de perfuração, um conjunto de WBTs é mais resistente à perda de água do que um conjunto de elementos de vaso (Mauseth *et al.* 1995). Segundo os autores, as WBTs parecem representar uma importante adaptação ao ambiente xérico, pois, durante o estresse hídrico, asseguram o transporte de água, já que as bandas de espessamento são tão largas e próximas que podem manter o lúmen aberto, mesmo quando as células parenquimáticas estão murchas, evitando embolia. Além disso, Landrum (2002) chama a atenção para o fato de que os gêneros das três famílias em que ocorrem WBTs, são formados por espécies suculentas. Recentemente, o mesmo autor (2006), com base em dados quantitativos, discute a hipótese de evolução das WBTs como adaptação às condições de estresse hídrico, em Portulacaceae. Segundo o autor, a distância entre as bandas é muito menor do que o raio da célula (cerca de três a quatro vezes), o que

torna pouco provável o colapso irreversível da célula (fig 4). Recentemente, Landrum (2008) demonstrou que a diferenciação das WBTs está correlacionada com a intensidade luminosa à qual a plântula é submetida.

A parede celular

Segundo Buchanan *et al.* (2002), dos onze diferentes açúcares presentes em plantas, pode-se obter uma grande variabilidade, levando-se em conta as quatro possíveis ligações de cada carbono, bem como as duas configurações possíveis de cada ligação (L ou D). Apesar disso, poucos açúcares foram conservados durante a evolução e a diferença entre a quantidade relativa dessas estruturas parece ser o que define a função biológica da parede, e por sua vez, da célula (Buchanan *et al.* 2002).

É conhecida a importância para a sobrevivência em ambiente xérico dos polímeros de pectina, devido a sua natureza hidrofílica. (Esau 1965, Fahn 1979). Uma revisão detalhada de estudos sobre pectina, e seus marcadores moleculares, vista com um aspecto mais funcional, foi feita por Willats *et al.* (2001). Segundo os autores, o termo pectina se refere a um grupo de polissacarídeos de caráter ácido com diferentes domínios estruturais que estão sujeitos a modificações durante a biossíntese e que são ligados entre si formando uma rede na parede celular. Essa rede de pectinas confere à célula propriedades mecânicas e de porosidade, além de influenciar o pH, a adesão e a hidratação da matriz extracelular. Do ponto de vista bioquímico, os polissacarídeos pecticos são ricos em ácido galacturônico (GalA), sendo que os três domínios encontrados em todas as espécies são homogalacturonanos (HGA), rhamnogalacturonanos-I (RG-1) e rhamnogalacturonanos-II (RG-2) (Willats *et al.* 2001) (Fig 5).

Fig 5. Representação esquemática dos principais domínios pécticos (Extraído de Willats *et al.* 2001).

Um das técnicas que se têm utilizado para estudos de composição de parede celular, especialmente pectina, são os anticorpos, feitos em rato ou coelho, específicos para determinada região de uma molécula. Esta técnica, que além de evidenciar a presença de uma determinada substância, também mostra a sua localização, o que tem sido útil na compreensão das relações estrutura-função em tecidos vegetais (Jones *et al.* 2003), e também no desenvolvimento (Stacey *et al.* 1995, Bush *et al.* 2001).

Bush & McCann (1999) estudaram a distribuição de seis epitopos de pectina em batata (*Solanum tuberosum*), utilizando os anticorpos JIM5 e JIM7, para pectina, que se mostraram igualmente distribuídos em células de parênquima e vasculares; 2F4, para homogalacturonanos (HGAs), que estão envolvidos no metabolismo do cálcio e foram localizadas na lamela média; LM6, para arabinano, e LM5, para galactano, foram mais expressos no córtex; e, por fim, CCRC-M2, que não reagiu; mostrando que a composição de parede com relação à pectina é espacialmente regulada.

Assim, a proposta deste trabalho é descrever o processo ontogenético das traqueídes vasculares em um representante de cacto colunar (*Pilosocereus aurisetus*) e realizar um primeiro estudo sobre a composição química do tecido xilemático, composto principalmente por traqueídes, com atenção especial às pectinas, visando ampliar a compreensão das funções biológicas dessas estruturas. Por fim, uma revisão anatômica da situação é inserida em um contexto filogenético, a fim de clarear o papel das traqueídes na evolução de Cactaceae.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRUDA, E; ALVES, M. & MELO-DE-PINNA, G.F. 2004. Elementos traqueais de cinco táxons de Cactaceae da caatinga pernambucana, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** **18**: 731-736.
- ARRUDA, E., MELO-DE-PINNA, G.F. & ALVES, M. 2005. Anatomia dos órgãos vegetativos de Cactaceae da caatinga pernambucana. **Revista Brasileira de Botânica** **28**: 589-601.
- BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W. & JONES, R.L. 2002. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists. Rockville, MD, USA.
- BUSH, M.S. & MCCANN, M.C. 1999. Pectics epitopes are differentially distributed in the cell walls of potato (*Solanum tuberosum*) tubers. **Physiologia Plantarum** **107**: 201-213.
- BUSH, M.S., MARRY, M., HUXHAM, M.I., JARVIS, M.C. & MCCANN, M.C. 2001. Developmental regulation of pectic epitopes during potato tuberisation. **Planta** **213**: 869-880.
- BUTTERWORTH, C.A. 2006. Resolving “Nyffeler’s Puzzle”—the intriguing taxonomic position of *Blossfeldia*. **Haseltonia** **12**: 3–10.
- BUTTERWORTH, C. & EDWARDS, E.J. 2008. Investigating *Pereskia* and the earliest divergences in Cactaceae. **Haseltonia** **14**: 46–53.
- BUXBAUM, F. 1950. **Morphology of cacti: Section I. Roots and stems**. Abbey Garden Press, California.

- CARLQUIST, S. 1962. A theory of paedomorphosis in dicotyledonous woods. **Phytomorphology** 12:30-45.
- CARLQUIST, S. 1975. **Ecological strategies of xylem evolution**. University of California Press. Berkeley and Los Angeles, California.
- CONDE, L. 1975. Anatomical comparisons of five species of *Opuntia* (Cactaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden** 62: 425-473.
- EDWARDS E.J. & DONOGHUE M.J. 2006. *Pereskia* and the origin of the cactus life-form. **American Naturalist** 167: 777–793.
- EDWARDS, E.J., NYFFELER, R., DONOGHUE, M.J.. 2005. Basal cactus phylogeny: implications of *Pereskia* (Cactaceae) paraphyly for the transition to the cactus life form. **American Journal of Botany** 92: 1177–1188.
- ESAU, K. 1965. **Anatomy of seed plants**. Wiley Internacional Edition, New York.
- FAHN, A. 1979. **Plant anatomy**. 2 ed. Pergamon Press, Oxford.
- FAHN, A. & CUTLER, D.F. 1992. Xerophytes. Gebrüder Borntraeger. Berlin.
- FUKUDA, H. 1996. Xylogenesis: initiation, progression, and cell death. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 47:299–325.
- GIBSON, A. 1973. Comparative anatomy of secondary xylem in Cactoideae (Cactaceae). **Biotropica** 5: 29-65.
- GIBSON, A. 1977. Wood anatomy of *Opuntias* with cylindrical to globular stems. **Botanical Gazette** 138: 334-351.
- GIBSON, A. & HORAK, K. 1978. Systematic anatomy and phylogeny of mexican cacti. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 65: 999-1057.
- GIBSON, A. & NOBEL, P. 1986. **The cactus primer**. Haward University Press, Cambrigde.
- GODOFREDO, V. R. & MELO-DE-PINNA, G. F. 2008. Occurrence of wide-band tracheids in Cactaceae: wood variation during *Pilosocereus aurisetus* development. **The Journal of the Torrey Botanical Society** 135: 94 - 102.
- GRIFFITH, MP. 2004. What did the first cactus look like? An attempt to reconcile the morphological and molecular evidence. **Taxon** 53: 493–499.
- HERNANDES-LOPES, J. & MELO-DE-PINNA, G.F. 2008. Análise morfométrica dos elementos traqueais em quatro espécies de *Portulaca* (Portulacaceae). **Acta Botanica Brasilica** 22: 607-613.
- HERSHKOVITZ MA, ZIMMER EA. 1997. On the evolutionary origins of the cacti. **Taxon** 46: 217–232.
- JONES, L.; MILNE, J.L.; ASHFORD, D. & MCQUEEN-MASON, S.J. 2003. Cell wall arabinan is essential for guard cell function. **PNAS** 100: 11783-11788.
- JUDD, W.; CAMPBELL, C.; KELLOGG, E.; STEVENS, P. & DONOGUE, M. 2008. **Plant systematics - A phylogenetic approach**. 3ed. Sinauer Associates, Sunderland.
- LANDRUM, J.V. 2001. Wide-band tracheids in leaves of genera in Aizoaceae the systematic occurrence of a novel cell type and its implications for the monophyly of the subfamily Ruschioideae. **Plant Systematic Evolution** 227: 49-61

- LANDRUM, J.V. 2002. Four succulent families and 40 million years of evolution and adaptation xeric environments: What can stem and leaf anatomical characters tell us about their phylogeny? **Taxon** **51**: 463-473.
- LANDRUM, J.V. 2006. Wide-band tracheids in genera of Portulacaceae: novel, non xylary tracheids possibly evolved as an adaptation to water stress. **Journal Plant of Research** **119**: 497-504
- LANDRUM, J.V. 2008. Wide-band tracheids from a southern african succulent and their responses to varying light intensities: a pre-adaptation for future water stress? **International Journal of Botany** **4**: 99-103.
- MAUSETH, J. 1989. Comparative structure-function studies within a strongly dimorphic plant, *Melocactus inortus* (Cactaceae). **Bradleya** **7**: 1-12.
- MAUSETH, J. 1993a. Water-storing and cavitation-preventing adaptations in wood of Cacti. **Annals of Botany** **72**: 81-89.
- MAUSETH, J. 1993b. Medullary bundles and the evolution of cacti. **American Journal of Botany** **80**: 928-932.
- MAUSETH, J. 1999. Comparative anatomy of *Espostoa*, *Pseudoespostoa*, *Thrixanthocereus* and *Vatricania*. **Bradleya** **17**: 27-37.
- MAUSETH, J.D. 2004. Wide-band tracheids are present in almost all species of Cactaceae. **Journal of Plant Research** **117**: 69-76.
- MAUSETH, J.D. 2006. Structure-function relationships in highly modified shoots of Cactaceae. **Annals of Botany** **5**: 901-926.
- MAUSETH, J.D. & PLEMONS, B.J. 1995. Developmentally variable polymorphic woods in cacti. **American Journal of Botany** **82**: 1199-1205.
- MAUSETH, J.D. & PLEMONS-RODRIGUEZ, B.J. 1998. Evolution of Extreme Xeromorphic Characters in Wood: A Study of Nine Evolutionary Lines in Cactaceae. **American Journal of Botany** **85**: 209-218.
- MAUSETH, J. & ROSS, R. 1988. Systematic anatomy of the primitive cereoid cactus *Leptocereus quadricostatus*. **Bradleya** **6**: 49-64.
- MAUSETH, J.D. & SAVEJA, M. 1992. Cortical bundles in the persistent, photosynthetic stems of cacti. **Annals of Botany** **70**: 317-324.
- MAUSETH, J.D.; UOZUMI, Y.; PLEMONS, B.J. & LANDRUM, J.V. 1995. Structural and systematic study of an unusual tracheid type in cacti. **Journal of Plant Research** **108**: 517-526.
- MELO-DE-PINNA, G.F.A.; ARRUDA, E.C. & ABREU, D.D. 2006. Wide band tracheids in Brazilian cacti. **Bradleya** **24**: 53-60.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1950. **Anatomy of the dicotyledons**. Clarendon Press, Oxford.
- NYFFELER, R. 2002. Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from *trnK*, *matK* and *trnL-trnF* sequences. **American Journal of Botany** **89**: 312-326.

- NYFFELER, R., EGGLI, U., OGBURN, M. & EDWARDS, E. 2008. Variations on a theme: repeated evolution of succulent life forms in the Portulacineae (Caryophyllales). **Haseltonia** **14**: 26–36.
- RUTISHAUSER, R & MOLINE, P. 2005. Evo-devo and the search for homology (“sameness”) in biological systems. **Theory in Biosciences** **124**: 213–241.
- SAVEJA, M. & MAUSETH, J.D. 1991. Leaf-like structure in the photosynthetic, succulent stems of cacti. **Annals of Botany** **68**: 405-411
- SILVA, D. & ALVES, J.L. 1999. Anatomia dos órgãos vegetativos de seis espécies de *Pilosocereus* Byles & Rowley (Cactaceae). **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** **18**: 53-60.
- SOFFIATTI, P. & ANGYALOSSY V. 2003 Stem anatomy of *Cipocereus* (Cactaceae). **Bradleya** **21**: 39-48.
- SOFFIATTI, P. & ANGYALOSSY, V. 2005. Wood anatomy of *Cipocereus* (Cactaceae). **IAWA Journal** **26**: 299-308.
- SOFFIATTI, P. & ANGYALOSSY, V. 2007. Anatomy of Brazilian Cereeae (subfamily Cactoideae, Cactaceae): *Arrojadoa* Britton & Rose, *Stephanocereus* A. Berger and *Brasilicereus* Backeberg. **Acta Botanica Brasilica** **21**: 813-822.
- STACEY, N.J.; ROBERTS, K. ; CARPITA, N.C.; WELLS, B. & MCCANN, M.D. 1995. Dynamic changes in cell surface molecules are very early events in the differentiation of mesophyll cells from *Zinna elegans* into tracheary elements. **The Plant Journal** **8**: 891-906.
- TERRAZAS, T. & ARIAS, S. 2003. Comparative stem anatomy in the subfamily Cactoideae. **The Botanical Review** **68**: 444-473.
- WALLACE, R. S., & J. H. COTA. 1995. An intron loss in the chloroplast gene rpoC1 support a monophyletic origin for the subfamily Cactoideae of the Cactaceae. **Current Genetics** **29**: 275–281.
- WILLATS, W.G.T.; MCCARTNEY, L.; MACKIE, W. & KNOX, J.P. 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Molecular Biology** **47**: 9-27

CAPÍTULO I

ONTOGÊNESE DAS TRAQUEÍDES VASCULARES DE
PILOSOCEREUS AURISSETUS BYLES & ROWLEY (CACTACEAE)

ONTOGÊNESE DAS TRAQUEÍDES VASCULARES DE *PILOSOCEREUS AURISSETUS* BYLES & ROWLEY (CACTACEAE)

RESUMO

As traqueídes vasculares (WBTs) de Cactaceae têm sido objeto de estudos anatômicos e fisiológicos. Embora sejam descritas como traqueídes com espessamento da parede secundária superior a 2µm, o relato de WBTs em diferentes tecidos em outras famílias de Caryophyllales evidencia que a definição dessas células não está bem estabelecida devido à ausência de conhecimento sobre sua ontogênese. Esse trabalho mostra a sequência de estágios de diferenciação das traqueídes, tendo como modelo um cacto colunar, *Pilosocereus aurisetus*. Para isso, plântulas foram incluídas em parafina para obtenção de cortes seriados, que foram analisados em microscopia óptica e confocal, e submetidas a técnicas de dissociação para análise quantitativa das traqueídes ao longo da diferenciação do tecido xilemático. No presente estudo, a partir de células procambiais, foi observada a formação das traqueídes, as quais apresentam núcleo apenas em estágio inicial de diferenciação do metaxilema, corroborando a sua definição como elemento traqueal vascular. Entretanto não há formação da placa de perfuração e a deposição da parede secundária se dá em camadas, nem sempre lignificadas. Os padrões anelar-helicoidal e helicoidal são os únicos encontrados nas células do metaxilema, em contraste ao padrão anelar, que ocorre no metaxilema de *Melocactus*, um cacto globoso. Já no lenho, a sequência de diferenciação de espessamento de bandas de anelar a dupla hélice pode estar relacionada à função de sustentação na região da base, ainda que, somente a formação do lenho fibroso pareça fornecer a sustentação necessária para que o cacto colunar atinja a altura de um adulto.

Palavras-chave: Cactoideae, cacto colunar, parede celular secundária.

INTRODUÇÃO

As traqueídes vasculares das Caryophyllales foram inicialmente observadas em Cactaceae por Schleiden (1845) e, a partir dos trabalhos de Mauseth *et al.* (1995), passaram a ser denominadas de “*wide-band tracheids*” (WBTs - traqueídes com espessamento largo), incluindo diferentes padrões de espessamento das bandas. Apesar da nova nomenclatura, o termo “traqueídes vasculares” continua sendo utilizado, por não ser incorreto, embora menos específico. Landrum (2001, 2002) observou traqueídes vasculares nas folhas suculentas de gêneros de Portulacaceae e Aizoaceae, mencionando o padrão de espessamento de bandas dupla-hélice, diferente dos padrões comumente observados em Cactaceae: anelar, anelar-helicoidal e helicoidal (Conde 1975; Gibson & Nobel 1986; Landrum 2001, Arruda & Melo-de-Pinna no prelo). As traqueídes das Caryophyllales são facilmente diferenciadas dos elementos de vaso por serem mais largas e pela ausência de placa de perfuração com borda (Gibson 1973, Mauseth 1993, Landrum 2001).

A definição das traqueídes vasculares requer algumas considerações. Mauseth *et al.* (1995) definiram-nas como uma variação da traqueíde comum, ainda que Van Tieghen (*apud* Boke 1944) tivesse detectado núcleo nessas células. No entanto, as traqueídes observadas por Van Tieghen provavelmente estavam em estágio inicial de diferenciação. Já Landrum (2006) expandiu a definição, tratando-as como células mortas lignificadas, não perfuradas e com bandas que se estendem para o lúmen da célula. O autor descreveu como “WBTs idioblásticas” aquelas que ocorrem na região medular do caule de três espécies de *Anacampseros*, mas não demonstrou a origem das traqueídes. Segundo o autor, essas células são originadas do meristema fundamental e, em alguns casos, do procâmbio.

Nos estudos realizados com Cactoideae (Mauseth *et al.* 1995, Mauseth 2004, Melo-de-Pinna *et al.* 2006), as traqueídes vasculares estão sempre associadas ao sistema vascular (xilema primário ou secundário) e, embora não existam trabalhos

sobre ontogênese dessa célula, sua origem parece ser exclusivamente do sistema vascular. Em Opuntioideae, entretanto, há uma grande diversidade de padrões de distribuição das WBTs no caule, tendo sido descritas na medula, nos raios e no sistema vascular axial (Mauseth 2006).

Como as WBTs são traqueídes, espera-se uma sequência de diferenciação semelhante à descrita para os demais elementos traqueais. Além disso, por serem as principais células do lenho inicial em Cactaceae, as WBTs devem exercer as funções do lenho, como transporte, armazenamento e sustentação, embora com alterações devido às particularidades da sua morfologia. Esse trabalho mostra a sequência de estágios de diferenciação das traqueídes, tendo como modelo um cacto colunar, *Pilosocereus aurisetus* (Werderh.) Byles & G.D.Rowley, já estudado pelas autoras (Godofredo & Melo-de-Pinna 2008) quanto à distribuição das WBTs em diferentes fases do desenvolvimento caulinar.

MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo foram utilizadas cinco plântulas (1-2 cm) de *Pilosocereus aurisetus* (Werderh.) Byles & G.D.Rowley obtidas de experimentos realizados previamente, mantidas em câmaras de germinação do tipo B.O.D., à temperatura de 28°, umidade 70% e fotoperíodo 12:12. Os dois indivíduos jovens (3-5 cm) foram obtidos de material fixado utilizado em trabalhos anteriores (Godofredo & Melo de Pinna 2008). A fim de se obter quatro estágios de diferenciação do xilema composto por traqueídes vasculares, foram observadas as traqueídes presentes nas plântulas, nas regiões do ápice (estágio 1), meio (estágio 2) e base (estágio 3), com lenho constituído por uma matriz de WBTs (lenho monomórfico WBT) e na base de indivíduos jovens (estágio 4) já com início de formação do lenho fibroso (lenho dimórfico WBT/fibroso). Visto que a formação do lenho fibroso encerra a formação de WBTs em *Pilosocereus aurisetus*, seria redundante a análise de estágios de

desenvolvimento posteriores, onde o lenho WBT é o mesmo e situa-se sempre na base.

As plântulas foram colocadas em água destilada em bomba a vácuo até a retirada do ar. Em seguida, foram fixadas em solução de Karnovsky (1965). O material foi então desidratado em série etanol-butanol, e posteriormente infiltrado e incluído em parafina (Johansen 1940). Cortes seriados transversais e longitudinais foram feitos com auxílio de micrótomo rotativo Leica RM 2145. Os cortes foram corados em safranina e azul de Astra, seguindo metodologia descrita por Bukatsch (1972). Os principais caracteres anatômicos foram registrados com o auxílio do Sistema de Digitalização de Imagem (IM50) acoplado ao microscópio Leica DMLB. A análise em microscopia confocal foi feita seguindo metodologia de Ruzin (1999) em microscópio eletrônico Zeiss LSM do Laboratório de Microscopia Eletrônica (IB-USP).

Amostras do caule foram submetidas à técnica de dissociação, seguindo metodologia descrita por Franklin (1945). A análise quantitativa das traqueídes vasculares, foi realizada a partir de medidas do comprimento, da largura e da distância entre as bandas em 30 células. A mensuração foi realizada em microscópio Zeiss Standard 25, com auxílio do software Zeiss KS100 3.0. Os parâmetros calculados foram: média, mediana e desvio padrão com auxílio do software Microsoft Excel 2007.

RESULTADOS

O sistema vascular em estágio primário é observado na região do ápice (estágio 1), onde é possível diferenciar feixes colaterais (fig.1). As WBTs estão ausentes no protoxilema, mas são observadas junto a elementos de vaso no metaxilema. No estágio 2 (região mediana) é possível observar a instalação do câmbio, que dá origem ao xilema e floema secundários (fig.2). O xilema de origem do câmbio fascicular é composto por parênquima, elementos de vaso e WBTs, enquanto que o xilema de

origem do câmbio interfascicular (origem pericíclica) é composto apenas por parênquima radial. Na transição caule/raiz, o estágio 3, a organização do sistema vascular é bastante semelhante à encontrada na raiz de origem da radícula, ou seja, sem a presença da medula (fig.3). Nesta região, estão presentes poucos elementos de vaso, imersos em uma matriz de traqueídes vasculares (fig. 3-6).

A parede primária não lignificada é mantida ao longo de toda a célula durante todo o desenvolvimento e as bandas de parede secundária são coradas com menor intensidade, pela safranina, do que a parede dos elementos de vaso. Por meio da metodologia utilizada, a parede celular secundária, na região da banda, apresentou um padrão com duas faixas estreitas com menor afinidade ao corante safranina em relação à faixa larga observada na região intermediária (fig. 4). Em corte longitudinal da região do ápice (estágio 1), foi possível registrar a ocorrência de traqueídes vasculares (WBT) com núcleo, em estágio de desenvolvimento onde já se observa a presença da parede secundária lignificada (figs.7-10). A partir de material dissociado foi possível perceber que a maioria das WBTs tem as extremidades pontiagudas, enquanto algumas têm extremidades planas, sendo que todas são fusiformes (figs.11-13). Através da análise em microscopia confocal, foi possível confirmar o arranjo das paredes primária e secundária (figs. 14-19) e, a partir do material analisado, não foram observadas pontoações localizadas nas bandas de espessamento de parede secundária.

Tabela 1. Tipos de espessamento secundário de parede secundária encontrados nas traqueídes vasculares.

Espessamento/ Região	Anelar	Anelar/helicoidal	Helicoidal	Helicoidal/dupla-hélice
Estágio 1	-	57%	43%	-
Estágio 2	17%	67%	16%	-
Estágio 3	17%	60%	23%	-
Estágio 4	43%	27%	27%	3%

Os tipos de espessamento encontrados estão resumidos na tabela 1. No estágio 2, foi possível observar com a análise de material dissociado, o aumento do tipo anelar-helicoidal e o início de formação do tipo anelar. No estágio 3 (região basal da plântula), ocorre o espessamento do tipo helicoidal, embora também esteja presente o espessamento anelar e anelar-helicoidal. Já no estágio 4 (base do caule jovem), pode-se observar, além dos tipos já citados, o espessamento helicoidal-dupla-hélice (fig. 13). Nesta fase, podemos observar a segunda fase de diferenciação do lenho, composto principalmente por fibras e elementos de vaso (lenho fibroso), compondo o lenho dimórfico WBT/fibroso. A partir desse estágio, WBTs não são mais produzidas.

Tabela 2. Medições do comprimento (L), diâmetro (D) e distância entre bandas (B) da parede secundária das traqueídes vasculares.

Valor/Parâmetro/Região (um)		Min	Máx	Mediana	Média	Desvio padrão
Estágio 1	L	50,18	185,67	104,52	110,89	33,94
	D	15,81	39,46	26,66	26,96	6,46
	B	5,14	23,67	12,96	13,17	4,63
Estágio2	L	57,28	238,92	138,41	142,45	40,08
	D	13,17	46,10	32,97	33,58	6,89
	B	7,89	29,77	19,98	19,90	5,42
Estágio 3	L	86,85	174,19	127,27	127,11	23,27
	D	21,79	51,46	37,55	37,71	6,33
	B	13,08	26,51	19,54	19,49	3,43
Estágio 4	L	79,90	287,95	169,05	175,60	52,15
	D	26,88	68,17	49,54	46,98	11,31
	B	14,55	79,32	37,97	39,28	13,74

Com relação aos dados quantitativos obtidos (Tabela 2), pode-se observar um aumento tanto no comprimento como no diâmetro em direção à base, sendo as médias maiores encontradas no estágio 4 (base do jovem). A média do comprimento no estágio 2 (região mediana) é maior do que no estágio 3 (base da plântula), entretanto o desvio padrão é extremamente alto, o que pode indicar um valor raro que alterou de forma significativa a média. A distância entre bandas é razoavelmente maior em regiões mais desenvolvidas da plântula, mas significativamente maior no estágio 4 (base do jovem). As figuras 20-23 mostram a variação de cada parâmetro analisado nas diferentes regiões.

DISCUSSÃO

Traqueídes vasculares são definidas como traqueídes originadas a partir de elementos de vaso, devido à perda da placa de perfuração, tendo sido descritas em grupos como Cactaceae e Compositae (Carlquist 1961). Podem ser diferenciadas de traqueídes normais porque usualmente nos tecidos, estão acompanhadas de estruturas intermediárias, como traqueídes com placas de perfuração pequenas e sem borda (Carlquist 1961).

Mauseth *et al.* (1995) descrevem a possibilidade de ocorrência de traqueídes vasculares em raízes e caules de Cactoideae, sendo possível encontrá-las tanto no sistema axial quanto em feixes corticais e medulares e traços de aréola. *Pilosocereus aurisetus* segue o padrão previsto para cactos colunares, com traqueídes sendo produzidas no estágio inicial do desenvolvimento (Mauseth 2004, Godofredo & Melo-de-Pinna 2008). Embora estejam presentes no xilema primário, essas traqueídes parecem estar restritas ao metaxilema, como seria esperado, já que, segundo Esau (1965), esta é uma região mais complexa do xilema primário, com diferenciação tardia em relação ao protoxilema, com células diferenciadas em fibras, em adição aos

elementos de vaso e parênquima. No caso de *P. aurisetus*, não são encontradas fibras, mas traqueídes e parênquima.

Segundo Fukuda (1996), a diferenciação dos elementos traqueais é dividida em quatro processos ontogenéticos: origem da célula; alongamento celular; deposição e lignificação da parede secundária; lise da parede na região da placa de perfuração (quando esta for formada) e morte da célula. O autor divide a diferenciação em processo inicial, que inclui os dois primeiros estágios, e processo tardio, que compreende os eventos específicos para elementos traqueais. No presente estudo, foi observada a formação das traqueídes a partir de cordões de procâmbio e a presença de núcleo foi registrada apenas nas traqueídes em estágio inicial de diferenciação do metaxilema.

Um dos fatos que merece atenção é a grande área com apenas parede primária na célula madura, em contraste com as regiões em que ocorrem as bandas de parede secundária. Turner *et al.* (2007), em uma grande revisão sobre diferenciação de elementos traqueais, lembram que após a deposição de parede secundária, a parede primária sofre drásticas alterações, tendo uma grande parte de seus componentes digeridos, o que parece não ocorrer com as traqueídes, mesmo em estágio tardio de desenvolvimento, em que as bandas estão completamente formadas. Por sua vez, as bandas apresentam morfologia bastante peculiar, tendo em vista que a deposição da parede se dá em até três camadas, sendo tanto a mais externa quanto a mais interna, aparentemente, não lignificadas (ver fig. 4). Até mesmo a ampla camada intermediária apresenta regiões em que a lignificação é pouco evidente. Tal padrão é bastante diferente do usualmente descrito para elementos traqueais, mostrando que mais estudos devem ser feitos com enfoque na ultra-estrutura dessas células.

Com relação à disposição das bandas, as traqueídes vasculares apresentam apenas os padrões de espessamento encontrados nos elementos de vaso do protoxilema, ou seja, anelar e helicoidal. Situação semelhante ocorre em *Sedum praealtum* (Crassulaceae), que também possui traqueídes vasculares com esse

padrão de espessamento no xilema secundário, ainda que sem o proeminente espessamento (Carlquist 1962). Tais padrões podem sugerir uma alteração no fator de transcrição comumente expresso em traqueídes. Recentemente, Kubo *et al.* (2005) e Yamagushi *et al.* (2008) identificaram uma família de sete fatores de transcrição *NAC*, sendo que dois deles são expressos durante a diferenciação de elementos traqueais: *VND6* e *VND7*. A super-expressão do *VND6* provoca a formação de espessamento ectópico do tipo reticulado ou pontuado, tipicamente encontrados em vasos do metaxilema. Já a super-expressão do *VND7* provoca a formação de espessamento ectópico do tipo anelar e helicoidal, típicos do protoxilema. Com base nessas descobertas, é possível que o padrão de espessamento encontrado nas traqueídes vasculares seja resultado da expressão do *VND7* em elementos traqueais de outras regiões além do protoxilema, inclusive no xilema secundário, o que poderia ter ocorrido com as traqueídes de *Cactaceae*.

Entretanto, apesar da semelhança já ressaltada com elementos de vaso do protoxilema, uma característica bastante peculiar e comum no espessamento dessas traqueídes é a formação de tipos mistos, como anelar-helicoidal e helicoidal-dupla-hélice. No estágio 1 (ápice), o sistema vascular encontra-se em estágio primário de diferenciação, onde há protoxilema, apenas com elementos de vaso, e metaxilema com as WBTs registradas para essa região. Com base nisso e nos dados mostrados nas tabelas 1 e 2, podemos observar que WBTs do metaxilema têm espessamento de parede secundária apenas dos tipos anelar-helicoidal e helicoidal. Portanto, nas demais regiões, WBTs com espessamento anelar provavelmente fazem parte do xilema secundário.

Abreu (2008) estudou duas espécies de *Melocactus*, gênero de arquitetura globosa, e observou que na base, ocorre a diferenciação de traqueídes com espessamento anelar e posteriormente de traqueídes com espessamento helicoidal, resultado semelhante ao encontrado em *Pilosocereus aurisetus*. Entretanto, segundo a autora no ápice foram encontradas apenas traqueídes com espessamento anelar, o

que não foi verificado em *Pilosocereus aurisetus*, cujas traqueídes do metaxilema tinham apenas espessamento anelar-helicoidal e helicoidal.

Nota-se que a proporção de WBTs com espessamento anelar-helicoidal aumenta no estágio 2 (região mediana) e diminui gradualmente nos estágios 3 e 4 (base da plântula e do jovem), o que nos leva a supor que além de ser um espessamento comum nas WBTs do metaxilema, também está presente nas WBTs originadas no estágio inicial do crescimento secundário. O espessamento anelar passa a ser encontrado no estágio 2, provavelmente por ser formado apenas no xilema secundário. Por outro lado, a proporção de WBTs com espessamento helicoidal, embora tenha diminuído com a formação do lenho inicial, rico em WBTs com espessamento anelar e anelar-helicoidal, aumenta progressivamente a partir do estágio 3, mostrando que células com este tipo de espessamento são diferenciadas em estágio tardio do crescimento secundário. O espessamento dupla-hélice, citado por Melo-de-Pinna *et al.* (2006) em *Discocactus placentiformis*, não foi observado, mas sim o espessamento misto entre helicoidal e dupla-hélice no estágio 4 (base do jovem), a região que apresenta o lenho WBT mais desenvolvido.

Além das diferenças com relação ao padrão de espessamento de parede secundária das WBTs, foram observadas, em *Pilosocereus aurisetus*, diferenças no comprimento e largura da célula, bem como na distância entre as bandas. Em Cactaceae, os elementos de vaso são geralmente curtos e estreitos (Arruda *et al.* 2004, Soffiatti & Angyalossy 2005), como sugerido primeiramente por Bailey (1966) ao observar que as iniciais fusiformes de Cactaceae são muito reduzidas em comprimento. É possível que em cactos, por estarem sujeitos a estresse hídrico, elementos de vaso estreitos tenham sido selecionados para evitar cavitação, uma adaptação proposta por Carlquist (1975). No entanto, apesar dos diferentes hábitos encontrados na família, Arruda *et al.* (2004) observaram que não há variação significativa entre eles. Abreu (2008) em estudos com *Melocactus*, cacto globoso, evidenciou um aumento no comprimento das traqueídes em direção ao ápice caulinar.

No presente estudo este resultado não ficou muito claro. Ao contrário, a média e a mediana dos valores encontrados mostram um aumento no comprimento em direção à base (estágios 3 e 4), sendo que no estágio 4 (base do jovem), embora tenha os valores mais altos, pode-se dizer que há uma grande variação, possivelmente devido à presença de traqueídes produzidas em diferentes estágios do desenvolvimento.

Entre o jovem e a plântula, nenhum outro valor mostrou maior discrepância do que a distância entre as bandas. Este parâmetro não apresenta grande diferença entre as diferentes regiões da plântula, mas sim em diferentes fases de desenvolvimento, já que no jovem podemos observar valores muito maiores do que os encontrados em plântulas, o que pode estar relacionado a um possível alongamento das células sem nova deposição de parede secundária durante o crescimento.

O lenho em Cactaceae é muito variado, e pode seguir diferentes padrões com base nos tipos celulares produzidos pelo câmbio fascicular e interfascicular, definidos por Gibson (1973). O padrão encontrado em *Pilosocereus aurisetus* é comum em cactos colunares, ou seja, as derivadas do câmbio interfascicular, composto por iniciais radiais, se diferenciam em células parenquimáticas que se lignificam apenas na base do caule, enquanto que próximo ao ápice o parênquima radial é não lignificado (Godofredo & Melo-de-Pinna 2008). O câmbio fascicular, por sua vez, origina elementos traqueais, fibras e parênquima (Godofredo & Melo-de-Pinna 2008). Niklas *et al.* (2000), em estudos com o lenho fibroso de *Pachycereus pringlei*, ressaltam a importância da manutenção do parênquima radial não lignificado na maior parte do caule de um cacto colunar, o que promove maior flexibilidade, em contraste com a base, que possui um cilindro contínuo de tipos celulares lignificados e, portanto, promove maior sustentação. Os autores, cuidadosamente, não atribuem tal formação exclusivamente ao efeito da seleção natural, lembrando que a estabilidade mecânica é consequência de diversas características anatômicas correlacionadas, que certamente possuem variadas funções. Em *Pilosocereus aurisetus*, esse padrão é observado na plântula, quando o lenho ainda é do tipo WBT, corroborando o efeito do programa de

diferenciação do câmbio, independente dos tipos celulares produzidos, mas também chamando a atenção para a importância das traqueídes na sustentação de cactos com altura reduzida.

Fibras não são encontradas no lenho WBT de plântulas e jovens de *Pilosocereus aurisetus*, como esperado, já que esta fase do xilema secundário é associada à ausência de fibras no xilema (Mauseth & Plemons 1995). Tais tipos celulares são encontrados no lenho fibroso, formado após determinado estágio de desenvolvimento (Mauseth 2004, Godofredo & Melo-de-Pinna 2008). Bernal-Salazar & Terrazas (2005), em estudo de correlação entre espessamentos de parede, medidas de diâmetro e comprimento de elementos traqueais perfurados e imperfurados no lenho fibroso de *Neobuxbaumia tetetzo*, um cacto colunar, mostraram que a variação que ocorre no sentido radial (do centro para a periferia) e longitudinal (da base para o ápice) é semelhante ao que ocorre em dicotiledôneas lenhosas, mais uma vez corroborando a importância do acúmulo do lenho na base para a sustentação de cactos colunares.

Curiosamente, Terrazas & Arias (2003) chama atenção para o fato de que a presença de WBTs está correlacionada à ausência de fibras não apenas no xilema, mas também no floema, fato este verificado no presente estudo em *Pilosocereus aurisetus*. Esta observação sugere que a formação de lenho fibroso e fibras no floema façam parte do mesmo módulo de desenvolvimento, especialmente por terem uma correlação temporal e funcional (sustentação). Entretanto, uma análise da ontogênese das fibras seria necessária para testar esta hipótese.

A princípio, a função das WBTs tem sido relacionada tanto com o transporte de água quanto com o armazenamento, já que o parênquima paratraqueal é muito escasso para cumprir esta função (Mauseth *et al.* 1995). Enquanto o tipo de espessamento, anelar ou helicoidal faz com que grande parte da célula seja constituída apenas por parede primária, aumentando a permeabilidade entre as células, como as células geralmente não são perfuradas, uma matriz de WBTs é mais

resistente à perda de água do que uma matriz de elementos de vaso (Mauseth *et al* 1995).

A célula com tipo de espessamento anelar é a que tem maior área com apenas parede primária, oferecendo menos resistência ao alongamento da célula. Já o tipo helicoidal, tem maior área com parede secundária, se comparado ao anelar, e assim, oferece mais resistência ao alongamento e maior sustentação. A função de sustentação é melhor quanto maior for a área da célula em que for depositada a parede secundária, mesmo porque, a dureza de um tecido é positivamente correlacionada não apenas à fração de volume apoplástico, mas também ao grau de lignificação das células (Carlquist 1975, Niklas 1992). Portanto, em elementos de vaso, a sustentação aumenta no sentido anelar-helicoidal-escalariforme-reticulado-pontuado (Esau 1965, Mauseth 1995). As WBTs seguem este padrão, mas não ultrapassam o padrão dupla-hélice, que tem um grau de exposição da parede primária entre o helicoidal e o escalariforme, mesmo estando presentes no xilema secundário. Esta tendência anelar-dupla hélice, incluindo os intermediários, pode estar relacionada à função de sustentação na região da base, ainda que, somente a formação do lenho fibroso, seguida à fase de formação de traqueídes com espessamento helicoidal e dupla-hélice, pareça fornecer a sustentação necessária para que o cacto colunar atinja a altura de um adulto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, D.D. 2008. **Germinação e morfo-anatomia do desenvolvimento em *Melocactus ernestii* Vaupel e *M. paucispinus* Heimen & R.J. Paul (Cactaceae)**. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Botânica. São Paulo.
- ARRUDA E., ALVES, M. & MELO-DE-PINNA, G.F. 2004. Elementos traqueais de cinco táxons de Cactaceae da caatinga pernambucana, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 18: 731-736.
- ARRUDA, E. & MELO-DE-PINNA, G.F.(no prelo). Wide-band tracheids in the photosynthetic and non-photosynthetic stem in species of Cactaceae. **Journal of the Torrey Botanical Society**.

- BAILEY, I.W. 1966. The significance of the reduction of vessels in the Cactaceae. **Journal of the Arnold Arboretum** **47**: 288-292.
- BERNAL-SALAZAR, S. & TERRAZAS, T. 2005. Wood anatomical variation of *Neobuxbaumia tetetzo*: a columnar Cactaceae. **Journal of Arid Environments** **63**: 671-685.
- BOKE, N. H. 1944. Histogenesis of the leaf and areole in *Opuntia cylindrica*. **American Journal of Botany** **31**: 299-316.
- BUKATSCH, F. 1972. Benerkrugen zur doppelfarbung astrablausafranina. **Microkosmos** **61**: 255.
- CARLQUIST, S. 1961. **Comparative plant anatomy**. Hold, Rinehart and Winston, New York.
- CARLQUIST, S. 1962. A theory of paedomorphosis in dicotyledonous woods. **Phytomorphology** **12**:30-45.
- CARLQUIST, S. 1975. **Ecological strategies of xylem evolution**. University of California Press. Berkeley and Los Angeles, California.
- CONDE, L. 1975. Anatomical comparisons of five species of *Opuntia* (Cactaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden** **62**: 425-473.
- ESAU, K. 1965. **Plant Anatomy**. 2ed. Wiley International Edition, New York.
- FRANKLIN, G. L. 1945. Preparations of thin sections of synthetic resin and wood rein composites, and a new macerating method for wood. **Nature** **155**:51
- FUKUDA, H. 1996. Xylogenesis: initiation, progression, and cell death. **Plant Molecular Biology** **47**:299–325.
- GIBSON, A. 1973. Comparative anatomy of secondary xylem in Cactoideae (Cactaceae). **Biotropica** **5**: 29-65.
- GIBSON, A. & NOBEL, P. 1986. **The cactus primer**. Haward University Press, Cambrigde.
- GODOFREDO, V. R. & MELO-DE-PINNA, G. F. 2008. Occurrence of wide-band tracheids in Cactaceae: wood variation during *Pilosocereus aurisetus* development. **Journal of the Torrey Botanical Society** **135**: 94 - 102.
- JOHANSEN, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. New York, McGraw-Hill Book Co. 523p.
- KARNOVISKY, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolatily for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** **27**:137-13.
- KUBO, M., UDAGAWA, M., NISHIKUBO, N., HORIGUCHI, G., YAMAGUCHI, M., ITO, J., MIMURA, T., FUKUDA, H. & DEMURA, T. 2005. Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. **Genes Development** **19**:1855–60.
- LANDRUM, J.V. 2001. Wide-band tracheids in leaves of genera in Aizoaceae the systematic occurrence of a novel cell type and its implications for the monophyly of the subfamily Ruschioideae. **Plant Systematic Evolution** **227**: 49-61
- LANDRUM, J.V. 2002. Four succulent families and 40 milion years of evolution and adaptation xeric environments: What can stem and leaf anatomical characters tell us about their phylogeny? **Taxon** **51**: 463-473.
- LANDRUM, J.V. 2006. Wide-band tracheids in genera of Portulacaceae: novel, non xylary tracheids possibly evolved as an adaptation to water stress. **Journal Plant of Research**

119: 497-504

- MAUSETH, J.D. 1993. Water-storing and cavitation-preventing adaptations in wood of Cacti. **Annals of Botany** 72: 81-89.
- MAUSETH, J.D. 1995. **Botany. An introduction to plant biology**. 2ed. Saunders College Publishing, Philadelphia.
- MAUSETH, J.D. 2004. Wide-band tracheids are present in almost all species of Cactaceae. **Journal of Plant Research** 117: 69-76.
- MAUSETH, J.D. & PLEMONS, B.J. 1995. Developmentally variable polymorphic woods in cacti. **American Journal of Botany** 82: 1199-1205.
- MAUSETH, J.D.; UOZUMI, Y.; PLEMONS, B.J. & LANDRUM, J.V. 1995. Structural and systematic study of an unusual tracheid type in cacti. **Journal of Plant Research** 108: 517-526.
- MELO-DE-PINNA, G.F.A.; ARRUDA, E.C. & ABREU, D.D. 2006. Wide band tracheids in Brazilian cacti. **Bradleya** 24: 53-60.
- NIKLAS, K. J. 1992. **Plant biomechanics: an engineering approach to plant form and function**. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.
- NIKLAS, K.J., MOLINA-FREANER, F., TINOCO-OJANGUREN, C., TINOCO-OJANGURE, D.J. 2000. Wood biomechanics and anatomy of *Pachycereus pringlei*. **American Journal of Botany** 87: 469-481.
- RUZIN, S.E. 1999. **Plant microtechnique and microscopy**. Oxford University Press, New York. 322p.
- SCHLEIDEN, M.J. 1845. Beiträge zur Anatomie der Cacteen. **Mém. Acad. Imp. Sci. St-Petérsbourg Divers Savans** 4: 335-380.
- SOFFIATTI, P. & ANGYALOSSY, V. 2005. Wood anatomy of *Cipocereus* (Cactaceae). **IAWA Journal** 26: 299-308.
- TERRAZAS, T. & ARIAS, S. 2003. Comparative stem anatomy in the subfamily Cactoideae. **The Botanical Review** 68: 444-473.
- TURNER, S. GALLOIS, P. & BROWN, D. 2007. Tracheary element differentiation. **Annual Review of Plant Biology** 58: 407-433.
- YAMAGUCHI, M., KUBO, M., FUKUDA, H. & DEMURA, T. 2008. VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 is involved in the differentiation of all types of xylem vessels in *Arabidopsis* roots and shoots. **The Plant Journal** 55: 652-664.

Fig. 1-5 – Secções transversais do caule da plântula de *Pilosocereus aurisetus*. 1 – Ápice caulinar, onde se podem ver os cordões de procâmbio (setas) (Barra = 80µm). 2 – Sistema vascular em estágio de crescimento secundário, onde estão presentes WBTs (Barra = 40µm). 3 – Região de transição caule-raiz, onde praticamente não há medula, e o sistema vascular, forma um cilindro contínuo (Barra = 320µm). 4 – Detalhe do espessamento de parede das WBTs (Barra = 8µm). 5 – Detalhe do floema (Barra = 8µm). Fig. 6 – Secção longitudinal da região da base do caule de *P.aurisetus*. Note a predominância do espessamento anelar (Barra = 20µm).

Fig. 7-10 - Secções longitudinais da região próxima ao ápice de *Ptilosocereus aurisetus*. Fig 7 - Traqueídes vasculares (WBTs) com núcleo (seta) (Barra = 40µm). 8 - Detalhe das WBTs (Barra = 20µm). 9 - WBT com núcleo evidente (seta) (Barra = 20µm). 10 - Detalhe do núcleo (seta) (Barra = 8µm).

Figs 11-13 - Traqueídes vasculares (WBTs) de *Pilosocereus aurisetus* a partir de material dissociado.

Fig 11 - WBTs com espessamento helicoidal e anelar, e extremidades achatadas ou agudas (Barra=40µm).

Fig 12 - WBTs unidas, com espessamento anelar-helicoidal e helicoidal (Barra=40µm). 13 - WBT com espessamento dupla-hélice-helicoidal, encontrado na base do jovem (Barra=40µm).

Figs 14-19 - Traqueídes vasculares (WBTs) em *Ptilocercus aurisetus* em microscopia eletrônica confocal. Figs 14-16. Secções longitudinais das traqueídes (Barras=100 μ m (14,15), 40 μ m (16)) Figs 17-18 - Secções transversais do lenho monomórfico WBT. Note a fina parede primária acima da banda de espessamento (seta) (Barra=50 μ m). Fig 19 - Detalhe das traqueídes em DIC (Barra=25 μ m).

Figs 20-22 - Gráficos ilustrativos onde pode-se observar a tendência das variáveis comprimento, diâmetro e distância entre bandas das traqueídes em diferentes regiões e estágios de desenvolvimento. Fig 23 - Gráfico que mostra a proporção de tipos de espessamento de parede secundária em diferentes regiões e estágios de desenvolvimento. DH=Dupla-hélice. H=Helicoidal. AH=Anelar-helicoidal. A=Anelar.

CAPÍTULO II

TRAQUEÍDES VASCULARES EM TRAÇOS DE ARÉOLAS DE
PILOSOCEREUS AURISSETUS BYLES & ROWLEY (CACTACEAE)

**TRAQUEÍDES VASCULARES EM TRAÇOS DE ARÉOLAS DE *PILOSOCEREUS*
AURISSETUS BYLES & ROWLEY (CACTACEAE)**

RESUMO

Dentre as estruturas mais características de Cactaceae, estão as aréolas, definidas como uma gema axilar, situada em uma persistente base foliar, produzindo espinhos no lugar de folhas. Traqueídes vasculares de Cactaceae, Portulacaceae e Aizoaceae, definidas como traqueídes com espessamento da parede secundária superior a $2\mu\text{m}$ (WBTs – “wide-band tracheids”), foram registradas nessa região, em cactos globosos. O objetivo deste estudo é entender a organização da aréola, e sua vascularização, quanto à ocorrência das WBTs, em *Pilosocereus aurisetus*, um cacto colunar. Para isto, a região apical de caules jovens foi submetida às técnicas usuais em anatomia vegetal. Os primórdios foliares são formados a partir de divisões periclinais, que provocam a protrusão lateral do primórdio, evidenciada em *Pilosocereus aurisetus*, na formação da base da folha. Os espinhos são formados a partir de divisões periclinais das células da camada mais externa, a qual continua se dividindo gerando células que irão se diferenciar, formando uma zona meristemática basal do espinho, região que conecta os espinhos ao eixo caulinar. A lignificação dos espinhos começa das células mais externas, sendo que este aspecto não foi registrado nas células basais, reforçando o fato de apenas um meristema formar o espinho, diferente do que ocorre em folhas. Não foram observadas células com características do felogênio, apenas uma faixa de células em divisão originando externamente um amplo tecido parenquimático, o qual sustenta os espinhos. O meristema areolar ainda pode formar tricomas multicelulares, unisseriados, com origem protodérmica. Com relação à vascularização, no ápice, pode se observar que durante a diferenciação do procâmbio, há formação de cordões em direção às aréolas, sendo possível observar traqueídes (WBTs) em feixes que vão em direção à aréola, corroborando a literatura.

Palavras-chave: espinhos, tricomas, cacto colunar, anatomia.

INTRODUÇÃO

Dentre as estruturas mais características de Cactaceae, estão as aréolas, definidas como uma gema axilar que está situada em uma larga e persistente base foliar, produzindo espinhos no lugar de folhas (Gibson & Nobel 1986). Estudos de histogênese da aréola em Cactaceae foram desenvolvidos principalmente por Boke (1944, 1951, 1952, 1954, 1955, 1958), incluindo todas as subfamílias, e dentro de Cactoideae, representantes dos hábitos globosos, colunares e epífitas. O conhecimento em anatomia de ápices e aréolas de Cactaceae foi utilizado inclusive para a discussão de grupos que eram considerados em posição filogenética duvidosa, como *Bartschella* (Boke 1956) e *Homalocephala* e *Echinocactus* (Boke 1957) e o dimorfismo areolar foi estudado em *Solisia*, que possui anatomia semelhante à *Mammillaria* (Boke 1960) e *Coryophanta* (1961). Na década de 70, Mauseth & Halperin (1975) continuaram os trabalhos com aréolas em *Opuntia* e *Trichocereus*.

Com todos os trabalhos já realizados sobre anatomia e o desenvolvimento da região areolar em Cactaceae, podemos caracterizar esta região como apresentando organização semelhante ao ápice caulinar, produzindo espinhos, ou invés de folhas, e tricomas que podem ser uni ou multisseriados. Mauseth *et al.* (1995), em uma ampla revisão sobre a ocorrência de traqueídes vasculares em Cactaceae, descrevem a ocorrência deste tipo de célula nos traços de aréolas.

Essas traqueídes foram inicialmente observadas, por Schleiden (1845), sendo denominadas, simplesmente de traqueídes vasculares. Já Carlquist (1975) classificou este tipo de traqueíde como “*wide-band helix*”, em virtude do tipo de espessamento por ele observado, o helicoidal. A partir dos trabalhos de Mauseth *et al.* (1995), estas células passaram a ser denominadas de “*wide-band tracheids*” (WBTs) incluindo os padrões de organização das bandas: anelar, helicoidal e dupla-hélice.

O objetivo deste trabalho é entender a organização da aréola, com relação à presença das traqueídes vasculares, a fim de contribuir para o entendimento das

WBTs e dessa estrutura tão característica em Cactaceae, tendo como modelo *Pilosocereus aurisetus* (Werderh.) Byles & G.D.Rowley (cacto colunar), previamente estudado por Godofredo & Melo-de-Pinna (2008).

MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo foram utilizadas plântulas de *Pilosocereus aurisetus* (Werderh.) Byles & G.D.Rowley (Cactaceae) obtidas de experimentos realizados previamente, mantidas em câmaras de germinação do tipo B.O.D., à temperatura de 28°, umidade 70% e fotoperíodo 12:12. Os indivíduos jovens e adultos foram obtidos de material fixado utilizado na pesquisa realizada por Vanessa Godofredo (IC-Fapesp 05/54784-6). Esse material foi coletado no Parque Nacional da Serra do Cipó (Licença para coleta e transporte -IBAMA nº 13848-1). Plântulas de *Pilosocereus aurisetus* foram colocadas em água destilada na bomba à vácuo até a retirada do ar, sendo em seguida, fixadas em solução de Karnovsky (1965). Regiões areolares do caule de indivíduos jovens e adultos foram fixadas em FAA 70 (formaldeído, ácido acético glacial e etanol 70%), posteriormente submetidas à desidratação em série etanol-butanol, sendo a infiltração e inclusão realizada em parafina (Johansen 1940). Cortes seriados transversais e longitudinais foram feitos com auxílio do micrótomo rotativo e as lâminas foram coradas em fucsina básica e azul de Astra, seguindo metodologia descrita por Bukatsch (1972).

Os principais caracteres anatômicos foram registrados com o auxílio do Sistema de Digitalização de Imagem (IM50) acoplado ao microscópio Leica DMLB do Laboratório de Anatomia Vegetal IB/USP.

RESULTADOS

O meristema apical do caule é formado por células pequenas de citoplasma denso, sendo a camada mais externa (túnica) claramente diferenciada das demais (corpo), a qual divide-se anticlinalmente, dando origem à protoderme, enquanto que as células do corpo dividem-se em vários planos (fig.1). Em uma região mais diferenciada do ápice caulinar, já com a organização dos três sistemas (revestimento, fundamental e vascular), as células da região cortical se diferenciam antes das células da medula, que começam a aumentar de tamanho ao mesmo tempo em que os cordões de procâmbio começam a se diferenciar (figs. 1-2).

Em todo material analisado a partir do meristema apical caulinar, não foi observada uma estrutura foliar típica, ou seja, constituída de uma lâmina foliar e base. No entanto, a partir da formação dos primórdios foliares foi possível registrar a ocorrência da base da folha bastante desenvolvida, delimitando a região axilar (fig.1-4). Esta apresenta uma organização semelhante ao ápice caulinar, com uma região meristemática (meristema da aréola) e suas estruturas derivadas (espinhos e tricomas). Primórdios de espinhos em diferentes fases de desenvolvimento foram observados desde a região próxima ao ápice, já caracterizando uma aréola (fig. 3-4). Junto aos primórdios foram observados tricomas multicelulares unisseriados originados a partir de divisões periclinais da protoderme. Na figura 5, em uma região próxima ao ápice caulinar, é possível observar os feixes vasculares que vascularizam a região da aréola (traço de aréola), diferenciados até a região da base da folha (figs. 3-4). Em secção longitudinal de um traço de aréola (fig. 6) foram observadas traqueídes vasculares ("*wide-band tracheids* – WBT").

Na região mediana do cladódio, as aréolas se encontram em estágio mais avançado de desenvolvimento, sendo possível observar espinhos já com certo grau de lignificação nas células mais externas (figs.7-8). No entanto, ainda são visíveis células

do meristema areolar, além das células meristemáticas situadas na base dos espinhos (figs.7-8).

Nas aréolas dos indivíduos adultos já completamente diferenciadas, os espinhos estão lignificados no ápice (figs.9-10), e as células já não apresentam mais características meristemáticas (fig.11). Em secção transversal da região areolar, foi possível observar a presença de um amplo tecido parenquimático (fig.10), em continuidade aos espinhos, além de uma faixa de células em intensa divisão celular (fig.10-11). Internamente a esta faixa podem ser observados os traços de aréola (figs. 12-13), os quais são formados por xilema e floema, organizados em um feixe fechado, sendo as células condutoras do xilema, possivelmente, originadas a partir de divisões assimétricas de uma célula inicial (fig. 14). Esta célula inicial sofre uma divisão anticlinal originando duas células de tamanhos diferentes, sendo a menor e mais interna diferenciada em célula condutora e a maior e mais externa se mantém parenquimática. Esta análise necessita de novas observações, pois ainda não foi possível acompanhar todas as fases de diferenciação.

DISCUSSÃO

A organização do ápice caulinar em representantes de Cactaceae foi descrita por Boke (1941) em estudos com *Trichocereus* e *Opuntia*, o qual definiu quatro zonas meristemáticas. A zona 1 correspondendo à túnica unisseriada, que dará origem somente à protoderme. As outras três zonas originadas do corpo diferem quanto ao padrão de divisão, tamanho das células e grau de vacuolização. A zona 2 está situada próximo à túnica e representa a origem de todas as células do corpo. Nas laterais do corpo se encontra a zona 3, que dará origem ao córtex, com os feixes corticais, e aos feixes vasculares centrais. As células são menores e menos vacuolizadas que na zona 2, sugerindo uma maior atividade mitótica. O plano de divisão é predominantemente anticlinal. A zona 4, ou “*rib meristem*”, corresponde à região central do corpo e é

responsável pela formação da medula e dos feixes medulares. As células são largas e vacuolizadas. No ápice da plântula de *Pilosocereus aurisetus* foram observadas as quatro regiões: uma camada de células externamente, dividindo-se anticlinalmente (zona 1); uma região mais interna que se divide em vários planos (zona 2); a zona 3 formada pelo córtex e cordões procambiais parcialmente diferenciado, e a zona 4, formada pela medula.

Assim como ocorre em outras eudicotiledôneas, os primórdios foliares são formados a partir de divisões periclinais na terceira camada de células, que acrescentam células em direção à periferia, o que provoca a protrusão lateral do primórdio (Esau 1965). Esta protrusão foi bem evidenciada em *Pilosocereus aurisetus*, na formação da base da folha. Em Cactaceae, o estágio cilíndrico do primórdio foliar pode alongar-se, gerando um estágio dorsiventral, que pode ou não desenvolver sistema vascular e até mesmo originar estômatos (Mauseth 2007), entretanto tal nível de detalhe ainda não pôde ser observado no material estudado.

Na axila de cada primórdio foliar, é desenvolvida a gema axilar, como descrito por diversos autores (Esau 1965, Fahn 1974). Em Cactaceae, a gema axilar é modificada, pois origina espinhos no lugar de folhas, e pode dar origem a uma estrutura reprodutiva, a um novo segmento ou a raízes (Gibson & Nobel 1986). Segundo os autores, o meristema areolar tem uma zonação semelhante à do ápice caulinar, e, seguindo a filotaxia pressuposta para sua espécie, dá origem aos espinhos. Em *Pilosocereus aurisetus* não foi possível observar a filotaxia na região areolar, apenas a formação de espinhos através de processos de diferenciação semelhantes aos descritos para os primórdios foliares em plantas com folhas.

Os espinhos são formados a partir de divisões periclinais das células da camada mais externa, a qual continua se dividindo gerando células que irão se diferenciar, formando uma zona meristemática basal do espinho, região que conecta os espinhos ao eixo caulinar (Gibson & Nobel 1986). Desde as primeiras fases de diferenciação dos

espinhos, é possível registrar a presença de uma faixa meristemática, correspondendo à zona meristemática basal do espinho. As características meristemáticas dessas células, como núcleo proeminente e citoplasma denso, já não estão visíveis em estágios posteriores do desenvolvimento, quando os espinhos encontram-se bastante lignificados, corroborando as observações feitas por Gibson & Nobel (1986) em outras espécies de Cactaceae.

A lignificação das células dos espinhos começa das células mais externas, e até a fase observada neste estudo, este aspecto não foi registrado nas células basais, o que reforça o fato de apenas um meristema formar o espinho, diferente do que ocorre em folhas, onde há o meristema apical com atividade de curta duração, e logo se formam os meristemas marginais que originam a lâmina foliar (Esau 1965). Mauseth (1977) observou que o balanço hormonal pode ser um dos fatores envolvidos nessa mudança durante o desenvolvimento, visto que a anatomia do espinho, formado por células lignificadas e possivelmente sem tecido vascular, é bem diferente da complexa anatomia foliar.

Segundo Gibson & Nobel (1986) a zona meristemática basal torna-se esclerificada, como as demais células do espinho, e com a instalação do felogênio na hipoderme do caule, há uma fusão das bases de cada espinho a partir do tecido originado externamente ao felogênio. Em *Pilosocereus aurisetus* não foram observadas células com características do felogênio, apenas uma faixa de células em divisão originando externamente um amplo tecido parenquimático, o qual sustenta os espinhos. Este tecido, em analogia a descrição de Gibson & Nobel (1986), possivelmente corresponde ao súber.

Além dos espinhos, o meristema areolar pode formar tricomas multicelulares, que foram observados em abundância em *Pilosocereus aurisetus*. Nesse caso, eles são unisseriados e têm origem a partir de células protodérmicas. Segundo Gibson & Nobel (1986), o crescimento dos tricomas é indeterminado, podendo ocorrer o colapso das

células apicais. Fato que ainda não pode ser observado no presente estudo, mas que será investigado posteriormente.

Com relação à vascularização, no ápice, pode se observar que durante a diferenciação do procâmbio, há formações de cordões em direção às aréolas. No indivíduo jovem foi possível observar traqueídes (WBTs) em feixes que vão em direção à aréola, corroborando as observações feitas por Mauseth *et al.* (1995).

Mauseth (2007) observou que, na maioria das espécies, o tecido vascular dos primórdios foliares, quando presente, é constituído exclusivamente por xilema. Na aréola adulta analisada no presente estudo, ainda não foi possível analisar todo o sistema vascular, mas resultados parciais indicam que os feixes estão presentes até a base dos espinhos, sendo constituídos por células xilemáticas e floemáticas. Segundo Gibson & Nobel (1986) a vascularização é freqüentemente ausente nos espinhos, o que faz sentido já que em folhas o traço foliar chega à base do primórdio, e a diferenciação do sistema vascular começa a partir do ápice foliar. Como nos espinhos ocorre rápida lignificação das células, não há um ápice foliar que sinalize a diferenciação dos tecidos vasculares, e a zona meristemática basal é outro fator que atrasa a diferenciação na base do espinho. Portanto, como esperado, os espinhos não apresentam vascularização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOKE, N. H. 1941. Zonation in the shoot apices of *Trichocereus spachianus* and *Opuntia cylindrica*. **American Journal of Botany** **28**: 656-664.
- BOKE, N. H. 1944. Histogenesis of the leaf and areole in *Opuntia cylindrica*. **American Journal of Botany** **31**: 299-316.
- BOKE, N. H. 1951. Histogenesis of the vegetative shoot in *Echinocereus*. **American Journal of Botany** **38**: 23-38.
- BOKE, N. H. 1952. Leaf and areole development in *Coryphantha*. **American Journal of Botany** **39**: 134-145.

- BOKE, N. H. 1954. Organogenesis of the vegetative shoot in *Pereskia*. **American Journal of Botany** **41**: 619-637.
- BOKE, N. H. 1955. Development of the vegetative shoot in *Rhipsalis cassytha*. **American Journal of Botany** **42**: 1-10.
- BOKE, N. H. 1956. Developmental anatomy and the validity of the genus *Bartschella*. **American Journal of Botany** **43**: 819-827.
- BOKE, N. H. 1957. Comparative histogenesis of the areoles in *Homalocephala* and *Echinocactus*. **American Journal of Botany** **44**: 368–380.
- BOKE, N. H. 1958. Areole histogenesis in *Mammillaria lasiacantha*. **American Journal of Botany** **45**: 473-479.
- BOKE, N. H. 1960. Anatomy and development in *Solisia*. **American Journal of Botany** **47**: 59-65.
- BOKE, N. H. 1961. Areole dimorphism in *Coryphantha*. **American Journal of Botany** **48**: 593–603.
- BUKATSCH, F. 1972. Benerkrugen zur doppelfarbung astrablausafranina. **Microkosmos** **61**: 255.
- CARLQUIST, S. 1975. **Ecological strategies of xylem evolution**. University of California Press. Berkeley and Los Angeles, California.
- ESAU, K. 1965. **Plant Anatomy**. 2 ed. Wiley International Edition, New York.
- FAHN, A. 1974. **Plant anatomy**. 2 ed. Pergamon Press, Oxford.
- GIBSON, A.C. & NOBEL, P.S. 1986. **The cactus primer**. Harvard University Press, London.
- GODOFREDO, V. R. & MELO-DE-PINNA, G. F. 2008. Occurrence of wide-band tracheids in Cactaceae: wood variation during *Pilosocereus aurisetus* development. **Journal of the Torrey Botanical Society** **135**: 94 - 102.
- JOHANSEN, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. New York, McGraw-Hill Book Co. 523p.
- KARNOVISKY, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** **27**: 137-143.
- MAUSETH, J.D. 1977. Cytokinin- and gibberellic acid-induced effects on the determination and morphogenesis of leaf primordia in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). **American Journal of Botany** **64**: 337-346.
- MAUSETH, J.D. 2007. Tiny but complex foliage leaves occur in many “leafless” cacti (Cactaceae). **International Journal of Plant Science** **168**: 845–853.
- MAUSETH, J.D. & HALPERIN, W. 1975. Hormonal control of organogenesis in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). **American Journal of Botany** **62**: 869-877.
- MAUSETH, J.D.; UOZUMI, Y.; PLEMONS, B.J. & LANDRUM, J.V. 1995. Structural and systematic study of an unusual tracheid type in cacti. **Journal of Plant Research** **108**: 517-526.
- SCHLEIDEN, M.J. 1845. Beiträge zur Anatomie der Cacteen. **Mém. Acad. Imp. Sci. St-Petersbourg Divers Savans** **4**: 335-380.

Figs 1-4 - Secções longitudinais do ápice de *Pilosocereus aurisetus*. Fig 1-2 - Aspecto geral do ápice. Notar a formação da base da folha (B) (Barra=80µm). Fig 3 - Detalhe da região axilar, com dois primórdios de espinhos.(setas) e vascularização da base da folha (Barra=40µm). Fig 4. Detalhe da região axilar, com tricomas (setas) (Barra=20µm). B=base da folha.

Fig 5-6. Secções transversais do ápice caulinar de *Pilosocereus aurisetus*. Fig 5 - Aspecto geral, mostrando a saída dos cordões de procâmbio (setas) (Barra=80µm). Fig 6 - Traço de aréola, com traqueídes vasculares (Barra=20µm). Fig 7-8. Secção longitudinal do cladódio da plântula de *Pilosocereus aurisetus*. Fig 7 - Aspecto geral da aréola, com espinhos em diferentes estágios de diferenciação (Barra=80µm). Fig 8 - Detalhe da zona meristemática basal dos espinhos (setas) em diferentes estágios de desenvolvimento (Barra=40µm).

Figs 9-14. Secções transversais da aréola de um caule adulto de *Pilosocereus aurisetus*. Fig 9 - Aspecto geral da aréola e da saída de espinhos (Barra=320 μ m). Fig 10 - Aspecto geral do tecido parenquimático formado na base dos espinhos. Notar faixa de células em divisão (seta) (Barra=320 μ m). Fig 11 - Detalhe do tecido parênquimático na base dos espinhos (Barra=80 μ m). Fig 12 - Aspecto geral dos traços de aréola (Barra=160 μ m). Fig 13 - Detalhe dos traços da aréola (Barra=40 μ m). Fig 14 - Traço de aréola, constituído por um feixe fechado. Notar células parenquimáticas em torno das células condutoras do xilema (Barra=20 μ m).

CAPÍTULO III

CARBOIDRATOS DA PAREDE CELULAR DAS TRAQUEÍDES
VASCULARES DE *PILOSOCEREUS AURISSETUS* BYLES & ROWLEY
(CACTACEAE) E SUAS IMPLICAÇÕES FUNCIONAIS

CARBOIDRATOS DA PAREDE CELULAR DAS TRAQUEÍDES VASCULARES DE
***PILOSOCEREUS AURISSETUS* BYLES & ROWLEY (CACTACEAE) E SUAS IMPLICAÇÕES**
FUNCIONAIS

RESUMO

As traqueídes vasculares de Cactaceae têm despertado interesse devido à sua peculiar estrutura. A fim de contribuir para um melhor entendimento da sua função, a composição química do tecido xilemático durante a diferenciação destas células foi investigada. Analisando-se os principais monossacarídeos presentes no tecido, com base nos resultados, foram feitos testes imunocitoquímicos, para se obter informação espacial específica. Pectinas estão presentes na parede primária das traqueídes, bem como nas células do parênquima. A concentração de galactano em estágio intermediário de diferenciação das traqueídes sugere grande capacidade de expansão celular após o alongamento celular, possivelmente relacionada à função de absorção de água destas células. A quantidade de manano aumenta na região da base das plântulas, e está possivelmente relacionado à maior rigidez da parede celular o que conferiria melhor capacidade de sustentação. Portanto, a composição de açúcares da parede celular das células xilemáticas está diretamente relacionada às diferentes funções do tecido, de acordo com a localização no corpo da plântula, junto à função principal de transporte. O aumento da concentração de galactano contribui para a função de armazenamento de água durante o estágio de desenvolvimento inicial, enquanto que o aumento da concentração de manano confere maior sustentação na base.

Palavras-chave: Cactoideae, pectina, polissacarídeos, WBTs, xilema.

INTRODUÇÃO

A parede celular é um compartimento dinâmico que muda ao longo de toda a vida da célula (Carpita & McCann 2002). As modificações na parede primária são principalmente relacionadas ao processo de expansão, desencadeado pela pressão de turgor da célula, enquanto que a parede secundária, depositada geralmente após o alongamento, pode assumir uma grande variedade de especializações (Carpita & McCann 2002). A parede primária é a primeira camada de parede celular depositada enquanto a célula está, ou pode estar, ainda expandindo, pois é ao mesmo tempo firme e flexível (Fry 2004). Por sua vez, a parede secundária é depositada internamente, sendo que em elementos traqueais, pode assumir diferentes padrões, regulados, dentre outros fatores, pela organização dos microtúbulos (Fukuda & Kobayashi 1989). Nessas células, ocorre deposição de lignina nos estágios finais de diferenciação, anteriores à morte celular programada (Fukuda 1996).

Em Caryophyllales, um tipo particular de traqueíde vascular (WBTs – “wide-band tracheids”) tem despertado o interesse dos pesquisadores com relação à sua função (Mauseth *et al.* 1995; Landrum 2006, 2008). Tais traqueídes possuem espessamento de parede secundária superior a 2µm (Mauseth *et al.* 1995), e apresentam padrões de espessamento (anelar, anelar-helicoidal, helicoidal, helicoidal-dupla-hélice e dupla-hélice) semelhantes ao dos elementos de vaso do protoxilema (Carlquist 1975), e já foram descritas em Portulacaceae (Landrum 2002, 2006, 2008), Aizoaceae (Landrum 2001, 2002) e dentro de Cactaceae, em representantes das três subfamílias, Maihuenioideae, Opuntioideae e Cactoideae (Mauseth *et al.* 1995, Mauseth & Plemons-Rodriguez 1997, Mauseth 2004, 2006). Dentro desta última, as células foram descritas tanto em cactos globosos (Mauseth *et al.* 1995, Mauseth 2004) como em colunares (Mauseth 2004, Godofredo & Melo-de-Pinna 2008). A ontogênese das traqueídes, bem como a diferenciação do tecido xilemático é bem conhecida em *Pilosocereus aurisetus*, um cacto colunar (Godofredo & Melo-de-Pinna 2008,

Godofredo, capítulo I). Tal conhecimento pôde ser utilizado para um maior entendimento da bioquímica que ocorre nas traqueídes, já que sua função é sempre associada à estrutura da parede celular. O presente estudo pretende investigar a estrutura da parede no nível de organização molecular, buscando explicações bioquímicas para as funções atribuídas a estas células.

Visto que a função de um tipo celular não é completa e independente dos demais tipos celulares do tecido em que se encontra, foi feita a análise da composição química do tecido xilemático de plântulas de *Pilosocereus aurisetus*. Com uso de anticorpos específicos, variações temporais e espaciais na disposição de alguns monossacarídeos de parede celular, discutindo as possíveis implicações no âmbito funcional.

MATERIAL E MÉTODOS

Material. Para este estudo, foram utilizadas plântulas obtidas a partir de sementes retiradas do fruto coletado, e foram mantidas em câmaras de germinação do tipo B.O.D., à temperatura de 28°, umidade 70% e fotoperíodo 12:12. Foram selecionadas amostras de caule em diferentes estágios de desenvolvimento, seguindo descrição feita por Godofredo & Melo-de-Pinna (2008), quanto à ocorrência das traqueídes vasculares: 1) região basal; 2) região mediana e 3) região do ápice.

Anatomia. As plântulas foram colocadas em água destilada em bomba a vácuo até a retirada do ar. Em seguida, foram fixadas em solução de Karnovsky (1965). O material foi então desidratado em série etanol-butanol, e posteriormente infiltrado e incluído em parafina (Johansen 1940). Cortes transversais e longitudinais foram feitos à mão e com auxílio de micrótomo rotativo Leica RM 2145. Os cortes foram corados em safranina e azul de Astra, seguindo metodologia descrita por Bukatsch (1972). Os

caracteres anatômicos foram registrados com o auxílio do Sistema de Digitalização de Imagem (IM50) acoplado ao microscópio Leica DMLB.

Análise de monossacarídeos de parede celular. O sistema vascular do material vivo foi isolado dos demais tecidos com auxílio de estereomicroscópio Leica MZ8. O material foi dividido em amostras de 5mg para cada região (ápice, meio e base). Para a hidrólise ácida, o protocolo foi modificado de Saeman *et al.* (1945). Os polissacarídeos foram inicialmente hidrolisados com ácido sulfúrico 72%, por 45 min, em banho-maria, a 30°C, em ampola selada. Foram acrescentados 1,7 ml de água mili-Q, e posteriormente, o material foi colocado em autoclave por 1h, a 120°C. Após neutralização com NaOH e ácido acético, os extratos foram centrifugados e deionizados através de cromatografia de troca iônica em colunas de sílica aniônica e, em seguida, catiônica. Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado. Os monossacarídeos separados foram quantificados com utilização de calibração com uma mistura padrão de oito monossacarídeos sujeitos à hidrólise em paralelo (fig 1-4).

Imunocitocalização. O material foi fixado em solução de Karnovsky (paraformaldeído, glutaraldeído em solução tampão de cacodilato de sódio), segundo Karnovsky (1965). Secções feitas à mão livre foram submetidas à marcação com técnica de imunofluorescência descrita a seguir, adaptada de Beltz & Burd (1989), Buckeridge & Reid (1994), Orfila & Knox (2000), Willats *et al.* (2001) e Tonini *et al.* (2006). As secções hidratadas foram incubadas por 30 minutos em solução de bloqueio contendo 3% de leite em tampão fosfato de potássio salino (KPBS) 0,01 M pH 7,1. Posteriormente, foram incubadas durante 60 minutos em solução contendo anti-galactano LM5 ou anti-manano. Depois da incubação com o anticorpo, as secções foram lavadas com KPBS três vezes, por 5 minutos cada e, então, incubadas por 60 minutos em solução contendo anti-imunoglobulina de rato retirado de cabra ou coelho, conjugado com fluoresceína, diluído 1:50 em KPBS. Após a incubação, as secções

foram novamente lavadas com KPBS três vezes, durante 5 minutos cada, e em seguida lavadas brevemente com água deionizada. Como controle, algumas secções passaram pelo processo de bloqueio, porém foram incubadas somente em anti-imunoglobulina, para detecção de possíveis ligações não específicas do segundo anticorpo. Outras secções foram submetidas à mesma técnica, porém sem nenhum anticorpo, substituindo-se a incubação do mesmo por incubação em solução de bloqueio, visando detectar possível autofluorescência no material. A análise em microscopia foi feita em microscópio eletrônico confocal de fluorescência Leica Axio Imager M2 (IB-USP), com uso do filtro para fluoresceína.

RESULTADOS

O resultado da cromatografia pode ser analisado a partir das figuras 1-4 e estão resumidos na tabela 1, onde o fato que mais chama a atenção é o aumento do manano ao longo do caule, em direção à base.

Tabela 1. Porcentagem relativa de área ocupada pelo pico (nC*min), proporcional à quantidade de monossacarídeos obtidos após hidrólise ácida no tecido xilemático de diferentes regiões do caule

Região	Ramnose	Arabinose	Galactose	Glucose	Manose	Outros
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Ápice	1,09	3,49	29,51	39,67	6,75	19,48
Meio	3,07	4,99	13,64	20,75	33,52	24,03
Base	2,78	4,51	9,80	16,43	54,64	11,42

Foram observadas a presença e localização de três epitopos de polissacarídeo de parede: os radicais de pectina galactano (detectado pelo anticorpo LM5) e arabinano

(detectado pelo anticorpo LM6) e o monossacarídeo manano (detectado pelo anticorpo anti-manano) (Tabela 2), com base no resultado da cromatografia.

Tabela 2. Anticorpos utilizados e os respectivos epitopos.

Anticorpo	Epitopo	Referência
monoclonal		
Anti-manano	manano	Pettolino <i>et al.</i> (2001)
LM6	(1→5)-alfa-L-arabinano	Willats <i>et al.</i> (1998)
LM5	(1→4)-beta-D-galactano	Jones <i>et al.</i> (1997)

O material incubado com anticorpo anti-manano apresentou forte marcação na parede primária das traqueídes e das células parenquimáticas presentes no xilema na região da base, bem como em células parenquimáticas da região interna do córtex (figs. 5-10). O material incubado em LM5 teve forte marcação das células da medula e aparentemente da parede primária dos elementos condutores (figs. 11-16), onde a parede secundária das traqueídes, bem como a das células do córtex não foi marcada. A comparação entre o ápice e a base sugere um aumento na marcação de LM5 nas células da medula com o desenvolvimento das células, que compreende, entre outros aspectos, o aumento em tamanho da célula. O material incubado em LM6 não obteve marcação.

DISCUSSÃO

Bohicchio *et al.* (2006) estudaram a variação da composição da parede celular de *Araucaria angustifolia* durante o desenvolvimento, comparando-a com a variação decorrente dos eventos conhecidos em “dicotiledôneas”. Os autores estudaram mais especificamente a variação dos monossacarídeos constituintes dos polissacarídeos de

parede (celulose, hemiceluloses e pectina) em diferentes fases de diferenciação do caule, pois modificações no padrão inicial contribuem para a mecânica e controle do crescimento vegetal e da morfogênese (Fry 2004).

No presente estudo, foram encontrados baixos níveis de ramnose, arabinose e outros monossacarídeos, sendo que uma queda gradual é observada na concentração de galactose e glucose, do ápice para a base. Um aumento progressivo, por outro lado, foi observado na concentração de manose. Resultado semelhante foi encontrado em *Araucaria angustifolia* por Bochicchio *et al.* (2006), e tal aumento é considerado como consequência da formação da parede secundária em gimnospermas (Bochicchio *et al.* 2006).

O manano pode ser classificado em quatro subfamílias: manano linear, glucomanano, galactomanano e galactoglucomanano (Petkowicz *et al.* 2001). Os mananos são os maiores constituintes da porção de hemiceluloses no lenho de gimnospermas (Petkowicz *et al.* 2001), podendo ter, além da função estrutural bem conhecida das hemiceluloses, que é a ligação entre as microfibrilas de celulose, funções de reserva e de sinalização durante o desenvolvimento (Liepman *et al.* 2007, Moreira & Filho 2008). No lenho de angiospermas, entretanto, a porcentagem de manano é relativamente baixa, enquanto que a alta quantidade de xilano é característica do grupo (Meshitsuka & Isogai 1996). O presente estudo revela que, apesar de *Pilosocereus aurisetus* ser uma angiosperma, o manano tem significativa participação na composição da parede celular, talvez devido à sua função. Niklas *et al.* (2000), em estudos com o lenho fibroso de *Pachycereus pringlei*, ressaltam a importância da lignificação na base em cactos colunares, que garantem maior sustentação. Como a lignificação da parede primária nas traqueídes não ocorre, a deposição de manano deve desempenhar importante papel no seu enrijecimento na base do cacto com lenho sem fibras.

É conhecida a importância para a sobrevivência em ambiente xérico dos polímeros de pectina, devido à sua natureza hidrofílica (Esau 1965, Fahn 1974), mas

dependendo da estrutura péctica, a parede pode assumir diferentes funções. Do ponto de vista bioquímico, os polissacarídeos pécticos são ricos em ácido galacturônico (GalA), sendo que os três domínios encontrados em todas as espécies são homogalacturonanos (HGA), ramnogalacturonanos-I (RG-1) e ramnogalacturonanos-II (RG-2) (Willats *et al* 2001). Os rhamnogalacturonanos-I podem conter diferentes proporções de ramificações com galactano, detectado pelo LM5, e arabinano, detectado pelo LM6, que são fortemente reguladas de acordo com o estágio do desenvolvimento (Knox 1997). Bush & McCann (1999) estudaram a distribuição de seis epitopos de pectina em batata (*Solanum tuberosum*), sendo que os anticorpos utilizados foram JIM5 e JIM7, para pectina, que se mostraram igualmente distribuídos em células de parênquima e vasculares; 2F4, para homogalacturonanos (HGAs), que estão envolvidos no metabolismo do cálcio e foram localizadas na lamela média; LM6, para arabinano, e LM5, para galactano, foram mais expressos no córtex; e, por fim, CCRC-M2, que não reagiu, mostrando que a composição de parede com relação à pectina é espacialmente regulada.

O material incubado em LM5 teve forte marcação das células da medula, do córtex e do tecido xilemático. A comparação entre o ápice e a base sugere um aumento na marcação de LM5 nas células da medula e do córtex com o desenvolvimento das células, que compreende, entre outros aspectos, o aumento em tamanho da célula. O epitopo galactano, marcado pelo LM5, está relacionado à diminuição da rigidez da parede celular (Jones *et al.* 1997), e está geralmente ausente em células meristemáticas dos ápices caulinar e radicular (Willats 1999). Jones *et al.* (1997) demonstraram ainda, que, em frutos de tomate, as cadeias de galactano estão degradadas quando o fruto está maduro.

A grande concentração de galactanos também é característica da parede secundária de fibras gelatinosas (Meier 1962, Gorshkova & Morgan 2006). Gorshkova & Morgan (2006) estudaram em detalhe as características químicas dos diferentes tipos de galactano presentes em tais células, bem como sua variação temporal e

espacial, com auxílio de anticorpos. Estes autores levantaram a hipótese de que a presença de galactanos solúveis retarda a formação do estado cristalino da celulose. Isso ocorreria devido à interação entre as moléculas de celulose e galactano, o que deixa a parede hidratada, e possivelmente mais frouxa. Mastroberti & Mariah (2008), tendo estabelecido estágios de diferenciação para células mucilaginosas em *Araucaria angustifolia*, mostram que a parede celular é diferente, se comparada às células parenquimáticas. Segundo os autores, a marcação com o anticorpo LM5, que detecta galactano é mais forte na parede das células mucilaginosas, o que pode estar relacionado à expansão celular diferenciada. Em Cactaceae, a medula e o córtex se tratam do parênquima aquífero, característico por ter células de tamanho maior.

Com relação às traqueídes, um fator que chama a atenção é a grande área de parede primária não lignificada, em contraste com as regiões em que ocorrem as bandas de parede secundária (Godofredo, capítulo I). Os resultados sugerem que o epitopo galactano é depositado na parede primária das traqueídes vasculares e, a partir de determinado estágio de desenvolvimento, este radical é degradado. Analogamente, McCartney *et al.* (2003) observaram que o polímero (1->4)-beta-galactano delimita a região de alongamento da raiz, por não ser produzido na fase meristemática das células e ser posteriormente degradado.

Segundo Mauseth *et al.* (1995), a função das traqueídes vasculares parece estar relacionada tanto com o armazenamento quanto com o transporte axial de água. Para Landrum (2006), as largas bandas de espessamento das células impedem o colapso em períodos de estresse hídrico. Em 2008, o mesmo autor realizou experimentos fisiológicos, demonstrando que a quantidade de traqueídes em *Anacampseros* (Portulacaceae) está diretamente relacionada à intensidade luminosa. O autor concluiu que a diferenciação das traqueídes pode ser uma pré-adaptação para um ambiente muito luminoso, e, portanto, possivelmente seco. Tais inferências baseiam-se tanto no fato da célula ser uma traqueíde, e, portanto, ter variados graus de função no transporte, sustentação e armazenamento de fluidos, mas também nas

particularidades dessas células, comparadas às demais traqueídes, como o tipo de espessamento e a largura das bandas.

Fig 17. Variação da concentração de manano e galactano no tecido xilemático ao longo da plântula. A = Ápice; B = Base; M = Região mediana.

A marcação do LM5 na parede primária das WBTs em *Pilosocereus aurisetus* pode indicar uma potencial capacidade de extensão, o que é importante para sua aparente função de armazenamento, conforme proposto por Mauseth *et al.* (1995) e Landrum (2002, 2008), durante o estágio de desenvolvimento anterior a formação do lenho fibroso que ocorre em muitas espécies de Cactaceae (Mauseth & Plemons 1995, Godofredo & Melo-de-Pinna 2008). Um resumo da variação na deposição de manano e galactano ao longo da plântula pode ser visto na figura 17.

No capítulo I, foi observado que há um aumento na deposição de parede secundária nas WBTs do lenho, no sentido ápice-base, conferindo uma maior capacidade de sustentação na região basal. No presente trabalho ficou demonstrado que a parede primária também tem importante participação no desempenho dessa função na região basal, devido ao aumento da deposição de manano, possivelmente garantindo maior rigidez a essas células. A parede primária ainda parece ser essencial

para a potencial capacidade de extensão devido à alta concentração de galactano. Essa característica, associada aos tipos de espessamento de parede secundária comuns na região mediana contribui para a função de armazenamento nessa região. A mudança gradual de função que ocorre no lenho WBTs, culmina na drástica mudança de diferenciação do câmbio, que passa a formar o lenho fibroso, sem WBTs, de fundamental importância na aquisição de altura, especialmente em cactos colunares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELTZ, B.S. & BURD, G.D. 1989. **Immunocytochemical techniques - Principles and Practice**. Blackwell Sci. Pub.
- BOCHICCHIO, R., PETKOWICZ, C.L.O., ALQUINI, I., BUSATO, A.P. & REICHER, F. 2006. Changes in cell wall composition associated with maturation in the gymnosperm *Araucaria angustifolia*. **International Journal of Biological Macromolecules** **38**: 180–190.
- BUKATSCH, F. 1972. Benerkrugen zur doppelfarbung astrablausafranina. **Microkosmos** **61**: 255.
- BUCKERIDGE, M.S. & REID, J.S.G. 1994. Purification and properties of a novel β -galactosidase or exo-(1 $\rightarrow$ 4)- β -galactanase from the cotyledons of germinated *Lupinus angustifolius* L. seeds. **Planta** **192**:502-511.
- BUSH, M.S. & MCCANN, M.C. 1999. Pectics epitopes are differentially distributed in the cell walls of potato (*Solanum tuberosum*) tubers. **Physiologia Plantarum** **107**: 201-213.
- CARLQUIST, S. 1975. **Ecological strategies of xylem evolution**. University of California Press. Berkeley and Los Angeles, California.
- CARPITA, N. & MCCANN, M. 2002. The cell wall. *In*: Buchanan, B.B., Gruissem, W. & Jones, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists, Rockville.
- ESAU, K. 1965. **Plant Anatomy**. 2 ed. Wiley International Edition, New York.
- FAHN, A. 1974. **Plant anatomy**. 2 ed. Pergamon Press, Oxford.
- FUKUDA, H. 1996. Xylogenesis: initiation, progression, and cell death. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** **47**:299–325.
- FUKUDA, H. & KOBAYASHI, H. 1989. Dynamic organization of the cytoskeleton during tracheary element differentiation. **Development, Growth and Differentiation** **31**: 9-16.
- FRY, S.C. 2004. Primary Cell Wall Metabolism: Tracking the Careers of Wall Polymers in Living Plant Cells. **New Phytologist** **161**: 641-675.
- GODOFREDO, V.R. & MELO-DE-PINNA, G.F. 2008. Occurrence of wide-band tracheids in Cactaceae: wood variation during *Pilosocereus aurisetus* development. **Journal of the Torrey Botanical Society** **135**: 94 - 102.

- GORSHKOVA, T. & MORGAN, C. 2006. Secondary cell-wall assembly in flax phloem fibres: role of galactans. **Planta** **223**: 149–158.
- JOHANSEN, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. New York, McGraw-Hill Book Co. 523p.
- JONES, L., SEYMOUR, G. B. & KNOX, J. P. 1997. Localization of Pectic Galactan in Tomato Cell Walls Using a Monoclonal Antibody Specific to (1[->]4)-[beta]-D-Galactan. **Plant Physiology** **113**: 1405-1412.
- KARNOVISKY, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** **27**:137-13.
- KNOX, P.J. 1997. The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. **International Review of Cytology** **171**: 79–120.
- LANDRUM, J.V. 2002. Four succulent families and 40 million years of evolution and adaptation xeric environments: What can stem and leaf anatomical characters tell us about their phylogeny? **Taxon** **51**: 463-473.
- LANDRUM, J.V. 2006. Wide-band tracheids in genera of Portulacaceae: novel, non xylary tracheids possibly evolved as an adaptation to water stress. **Journal of Plant Research** **119**: 497-504.
- LANDRUM, J.V. 2008. Wide-band tracheids from a southern african succulent and their responses to varying light intensities: a pre-adaptation for future water stress? **International Journal of Botany** **4**: 99-103.
- LIEPMAN, A.H., NAIRN, C.J., WILLATS, W.G.T., ROBERTS, I.S.A.W. & KEEGSTRA, K. 2007. Functional genomic analysis supports conservation of function among cellulose synthase-like a gene family members and suggests diverse roles of mannans in plants. **Plant Physiology** **143**: 1881–1893.
- MASTROBERTI, A.A. & MARIATH, J.E.A. 2008. Immunocytochemistry of the mucilage cells of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae). **Revista brasileira de Botânica** **31**: 1-13.
- MAUSETH, J.D. 2004. Wide-band tracheids are present in almost all species of Cactaceae. **Journal of Plant Research** **117**: 69-76.
- MAUSETH, J.D. 2006. Wood in the cactus subfamily Opuntioideae has extremely diverse structure. **Bradleya** **24**: 93-106.
- MAUSETH, J.D. & PLEMONS, B.J. 1995. Developmentally variable polymorphic woods in cacti. **American Journal of Botany** **82**: 1199-1205.
- MAUSETH, J.D. & PLEMONS-RODRIGUEZ, B.J. 1997. Presence of paratracheal water storage tissue does not alter vessel characters in cactus wood. **American Journal of Botany** **84**: 815–822.
- MAUSETH, J.D.; UOZUMI, Y.; PLEMONS, B.J. & LANDRUM, J.V. 1995. Structural and systematic study of an unusual tracheid type in cacti. **Journal of Plant Research** **108**: 517-526.
- MCCARTNEY, L. STEELE-KINGY, C.G., JORDAN, E. & KNOX, J.P. 2003. Cell wall pectic (1,4)-b-D-galactan marks the acceleration of cell elongation in the Arabidopsis seedling root

- meristem. **The Plant Journal** **33**: 447–454.
- MEIER, H. 1962. Studies on a galactan from tension wood of beech (*Fagus silvatica* L.). **Acta Chemica Scandinavica** **16**: 2275-2283.
- MESHITSUKA, G. & ISOGAI, A. 1996. Chemical structures of cellulose, hemicelluloses, and lignin. In: Hon, D.N.S. **Chemical modification of lignocellulosic materials**. Marcel Dekker, New York.
- MOREIRA, L.R.S. & FILHO, E.X.F. 2008. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. **Applied Microbiology and Biotechnology** **79**: 165–178.
- NIKLAS, K.J., MOLINA-FREANER, F., TINOCO-OJANGUREN, C., TINOCO-OJANGURE, D.J. 2000. Wood biomechanics and anatomy of *Pachycereus pringlei*. **American Journal of Botany** **87**: 469-481.
- ORFILA, C. & KNOX, J.P. 2000. Spatial regulation of pectic polysaccharides in relation to pit fields in cell walls of tomato fruit pericarp. **Plant Physiology** **122**: 775-782.
- PETKOWICZ, C.L. DE O., REICHER, F., CHANZY, H., TARAVEL, F.R. & VUONG, R. 2001. Linear mannan in the endosperm of *Schizolobium amazonicum*. **Carbohydrate Polymers** **44**: 107–112.
- PETTOLINO, F.A., HOOGENRAAD, N.J., FERGUSON, C., BACIC, A., JOHNSON, E. & STONE, B.A. 2001. A (1 fi 4)-b-mannan-specific monoclonal antibody and its use in the immunocytochemical location of galactomannans. **Planta** **214**: 235–242.
- SAEMAN, J. F., BUHL, J. L., & HARRIS, E. E. 1945. Quantitative saccharification of wood and cellulose. **Industrial Engineer and Chemical Analyses Edition** **17**: 35–37.
- TONINI, P.P. LISBOA, C. G. S., FRESCHI, L., MERCIER, H., MAZZONI-VIVEIROS, S. C. & BUCKERIDGE, M. S. 2006. Effect of abscisic acid on galactomannan degradation and endo-beta-mannanase activity in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae). **Trees (Berlin)** **20**: 669-678.
- WILLATS, W.G.T., MARCUS, S.E. & KNOX, J.P. 1998. Generation of a monoclonal antibody specific to (1-5)-alfa-L-arabinan. **Carbohydrate Research** **308**: 149-152.
- WILLATS, W.G.T., STEELE-KING, C.G., MARCUS, S.E. & KNOX, J.P. 1999. Side chains of pectic polysaccharides are regulated in relation to cell proliferation and cell differentiation. **The Plant Journal** **20** (6): 619-628.
- WILLATS, W.G.T.; MCCARTNEY, L.; MACKIE, W. & KNOX, J.P. 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Molecular Biology** **47**: 9-27.

Figs 1-4. Resultado da cromatografia do material submetido à hidrólise ácida. 1- Padrão. 2-4. Caule de plântulas de *Pilosocereus aurisetus*. 2- Ápice. 3- Região mediana. 4- Base do caule.

Figs 5-10. Secções longitudinais da base do caule da plântula de *Pilosocereus aurisetus*. 5 - Detalhe do cilindro vascular (Barras = 40µm). 6 - Detalhe do córtex (Barras = 80µm). 7 - Controle (Barras = 40µm). 8-10 - Material tratado com anti-manano. (Barras = 40µm). 8 - Parede primária das traqueídes com manano, bem como células de parênquima. 9 - Leve gradiente de concentração de manano, com aumento da marcação do ápice pra a base. 10 - Córtex próximo à medula com forte marcação, córtex próximo à epiderme com fraca marcação. Tempo de exposição da luz = 660ms.

Fig 11-16. Secções transversais do caule da plântula de *Pilosocereus aurisetus*. 11- Ápice caulinar (Barras=80µm). 12- Região mediana do caule (Barras=40µm). 13-16 - Secções vistas sob microscopia de fluorescência (Barras=80µm). 13- Controle (ápice). 14 - Marcação do anticorpo LM5 no ápice. Notar marcação suave da parede das células da medula. 15 - Controle (região mediana). 16 - Marcação do anticorpo LM5 na região mediana. M = medula.

CAPÍTULO IV

EVOLUÇÃO DO POLIMORFISMO DO LENHO EM CACTOIDEAE

EVOLUÇÃO DO POLIMORFISMO DO LENHO EM CACTOIDEAE

RESUMO

Cactoideae compreende cactos com diversas formas e tamanhos, cujos hábitos são descritos resumidamente como globosos, colunares e epífitas. Anatomicamente, o lenho em Cactaceae é dito polimórfico, ou seja, possui diferentes fases, que variam de acordo com a sequência de eventos ontogenéticos. Ao reconstruir a evolução dos estados de caráter, utilizando uma filogenia bem sustentada de Cactaceae, nosso objetivo foi estudar a origem do polimorfismo do lenho na família, tentando apontar as alterações no desenvolvimento ocorridas no curso da evolução, e suas implicações para a evolução do hábito em Cactoideae. De acordo com os resultados, o ancestral globoso de Cactoideae deu origem a cactos colunares mais de uma vez na história da evolução, possivelmente devido à aquisição de um segundo estágio ontogenético, que forma o lenho dimórfico, uma predisposição anatômica presente no ancestral, que garante a sustentação necessária a um cacto colunar. Além disso, perdas ontogenéticas de diferentes fases do lenho parecem ter ocorrido em cactos epífitas e globosos, como resultado do rearranjo do padrão dimórfico ancestral.

Palavras-chave: Cactaceae, desenvolvimento do lenho, traqueídes vasculares.

INTRODUÇÃO

Cactaceae é tradicionalmente dividida entre as subfamílias Pereskioideae, Opuntioideae e Cactoideae (Gibson & Nobel 1986). Ainda que *Pereskia* seja atualmente considerada parafilética (Edwards *et al.* 2005, Butterworth & Edwards 2008), a monofilia das subfamílias Opuntioideae e Cactoideae tem sido corroborada em reconstruções feitas a partir de dados morfológicos (Terrazas & Arias 2003) e moleculares (Wallace & Cota 1996, Nyffeler 2002, Griffith & Porter 2009). Entretanto, algumas relações entre tribos e gêneros da família são mal resolvidas (Terrazas & Arias 2003). Nyffeler (2007) continuou com os estudos filogenéticos na família, investigando o grupo mais próximo dos cactos, “Portulacaceae”. Os autores sugerem que *Anacampseros*, *Portulaca* e *Talinum*, tradicionalmente parte de “Portulacaceae”, sejam parte de um clado que inclua Cactaceae (ACPT).

Um dos caracteres interessantes estudados na família se trata de uma traqueíde peculiar, descrita pela primeira vez por Schleiden (1845), e que a partir do trabalho de Mauseth *et al.* (1995) tem sido denominada “wide-band tracheid” (WBT), ou simplesmente traqueíde vascular das Caryophyllales. O espessamento de parede secundária, superior a 2µm, pode ter padrão anelar, helicoidal e intermediários, similares aos encontrados em elementos de vaso do protoxilema (Carlquist 1975), e sua função parece estar relacionada principalmente ao transporte e armazenamento de água (Mauseth *et al.* 1995).

Para um melhor entendimento da origem das traqueídes vasculares na evolução, Terrazas & Arias (2003) mapearam o caráter em uma filogenia baseada em dados morfológicos. Entretanto, por ter sido feito antes do trabalho de Mauseth (2004), que observou a presença das células em plântulas de cactos colunares, o estudo de Terrazas & Arias (2003) leva em consideração apenas as traqueídes dos cactos globosos. No mesmo trabalho, os autores mapearam o tipo de lenho, que em

Cactaceae pode ser fibroso, não-fibroso (WBT), ou ambos, caracterizando o polimorfismo do lenho (Mauseth & Plemons 1995). Entretanto, como a base do caule não foi utilizada, alguns estágios de desenvolvimento podem não ter sido considerados. Godofredo & Melo-de-Pinna (2008) observaram que *Pilosocereus aurisetus*, um cacto colunar, tem lenho WBT monomórfico em estágio juvenil, mas, em estágio adulto, o cladódio tem lenho fibroso monomórfico na região fotossintetizante, enquanto a base tem lenho dimórfico WBT/fibroso. Tal fato reforça a importância, no estudo anatômico, do uso da base do caule, ao invés do caule fotossintetizante, já que aquela região tem maior informação ontogenética.

Os diferentes padrões ontogenéticos de formação do lenho em Cactaceae sugerem que processos heterocrônicos possam estar envolvidos na formação da diversidade atual. Além disso, a informação do tipo de lenho tem sido geralmente associada ao hábito na família, o que nos levar a supor que exista uma correlação entre esses dois caracteres. Ao reconstruir os estados ancestrais, utilizando uma filogenia bem sustentada de Cactaceae, nosso objetivo é compreender o papel do polimorfismo do lenho na família, tentando apontar as alterações no desenvolvimento ocorridas no curso da evolução, e suas implicações para a diversidade de hábitos na família.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracteres. Os caracteres e seus estados (entre parênteses) foram obtidos da literatura: “hábito”, simplificado de Gibson & Nobel (1986) (arbóreo, rasteiro, arbustivo, colunar, globoso e epífita), “WBTs” (ausência e presença) e “sequência ontogenética do lenho” (ONT 1, ONT 2, ONT 3, ONT 4 e ONT 5). A ilustração das sequências pode ser vista na figura 1, sendo que a tabela 1 representa a distância entre as sequências ontogenéticas, ou seja, a quantidade de passos necessários para mudar de uma sequência à outra. Estão representadas as sequências inferidas para a formação dos

três tipos de lenhos polimórficos descritos por Mauseth & Plemons (1995), além dos dois tipos de lenho monomórfico. Entretanto, devido à controvérsia a respeito da definição de lenho parenquimatoso (Melo-de-Pinna 2009), que mais provavelmente se trata de uma faixa de parênquima não lignificado, o que, portanto, dificultaria a interpretação ontogenética, optamos por considerar apenas os tipos de lenho tradicionalmente descritos por Gibson (1973), fibroso e não fibroso. Portanto as sequências utilizadas como estados no presente estudo são: ONT1, ONT2 e ONT3 (Figura 1). Os dados morfológicos foram obtidos de Mauseth *et al.* (1995), Mauseth & Plemons (1995), Mauseth & Plemons-Rodriguez (1997) e Mauseth (2004) (Tabela 2).

Fig 1. Sequência de eventos ontogenéticos na formação dos diferentes tipos de lenho em Cactaceae.

Hipótese filogenética. A topologia utilizada foi a árvore de consenso estrito publicada por Nyffeler (2002), que representa a hipótese mais aceita de relacionamento

filogenético entre os clados de Cactaceae. Essa árvore foi obtida através de análises de parcimônia, utilizando sequências de DNA plastidial, *trnK* e *matK*. Os 32 táxons incluem pelo menos um representante por subfamília (Pereskioideae, Opuntioideae, Mahiuenioideae e Cactoideae), e incluem os diversos tipos de hábitos em Cactoideae. Nesse mesmo estudo, análises de máxima-verossimilhança (ML) produziram medidas do comprimentos dos ramos em número de sequência divergentes, porém a árvore de ML resultante apresenta algumas politomias (correspondentes a nós resolvidos na árvore de consenso estrito) que poderiam ser cruciais para as análises de reconstrução de caracteres. A partir da árvore de ML apresentada em Nyfeller (2002), nós utilizamos uma análise gráfica para calcular os comprimentos de ramos aproximados com base na escala apresentada na figura 2. Embora se trate de uma aproximação, essa medida de comprimento de ramo pode adicionar informações importante quanto à escala temporal de divergência entre os clados, sob a premissa de relógio molecular e/ou de correlação entre a taxa evolutiva dos genes utilizados para a construção da filogenia e os eventos de cladogênese.

Tabela 1. Distância entre as sequências ontogenéticas.

Distâncias	ONT1	ONT2	ONT3	ONT4	ONT5
ONT1	0				
ONT2	2	0			
ONT3	1	1	0		
ONT4	1	3	2	0	
ONT5	2	2	1	1	0

Devido à existência de duas árvores, uma melhor resolvida baseada em parcimônia e outra apresentando politomias, mas com informação sobre os comprimentos dos ramos, nós optamos por utilizar duas abordagens para estudar o padrão de evolução dos caracteres de lenho em Cactaceae. A primeira abordagem foi

a realização de análises de reconstrução dos estados ancestrais dos caracteres com algoritmo de parcimônia, utilizando como base a topologia de consenso estrito (Nyfeller 2002). A segunda foi a realização das análises de reconstrução utilizando o princípio de ML, utilizando uma hipótese filogenética de Cactaceae produzida da seguinte maneira: a topologia resultante da árvore de consenso estrito foi inserida no programa Mesquite (Maddison & Maddison 2008) e os comprimentos de ramos alterados manualmente com a ferramenta “*Adjust branch lengths*”. Os comprimentos dos ramos foram obtidos como descritos acima e, para os ramos presentes na árvore de consenso estrito que não estão presentes na árvore de ML (nós politômicos), foram atribuídos comprimentos de ramos curtos (pelo menos 3 casas decimais a menos que o menor comprimento de ramo obtido a partir da árvore de ML). Isso só foi possível porque, apesar das politomias presentes na árvore de ML, essa árvore não apresenta discrepâncias topológicas quando comparada com a árvore de consenso estrito. Essa é uma estratégia conservadora para lidar com a ausência de informação sobre os comprimentos de alguns ramos aceitos em Cactaceae, já que algoritmos de verossimilhança utilizam o comprimento dos ramos como parâmetros para cálculo das probabilidades de transição em cada ramo e a atribuição de comprimentos de ramos reduzidos interfere muito pouco na análise (Case *et al.* 2008).

Tabela 2. Lista de gêneros utilizados.

Gênero	Referência
<i>Pereskia</i>	<i>Mauseth (2004)</i>
<i>Opuntia</i>	<i>Mauseth (2004)</i>
<i>Echinocactus</i>	<i>Mauseth (2004)</i>
<i>Astrophytum</i>	<i>Mauseth (2004)</i>
<i>Corryocactus</i>	<i>Mauseth (2004)</i>
<i>Armatocereus</i>	<i>Mauseth (2004)</i>

<i>Pachycereus</i>	<i>Mauseth (2004)</i>
<i>Escontria</i>	<i>Mauseth (2004)</i>
<i>Disocactus</i>	<i>Mauseth (2004)</i>
<i>Hylocereus</i>	<i>Mauseth & Plemons (1995), Mauseth (2004)</i>
<i>Rhipsalis</i>	<i>Mauseth (2004)</i>
<i>Hatiora</i>	<i>Mauseth (2004)</i>
<i>Browningia</i>	<i>Mauseth (2004)</i>
<i>Cereus</i>	<i>Mauseth (2004)</i>
<i>Micranthocereus</i>	<i>Mauseth (2004)</i>
<i>Harrisia</i>	<i>Mauseth (2004)</i>
<i>Oreocereus</i>	<i>Mauseth (2004)</i>
<i>Maihuenia</i>	<i>Mauseth (2004)</i>
<i>Leptocereus</i>	<i>Mauseth (2004)</i>
<i>Neoraimondia</i>	<i>Mauseth (2004)</i>
<i>Pereskopsis*</i>	<i>Mauseth et al. (1995)</i>
<i>Blossfeldia*</i>	<i>Mauseth et al. (1995)</i>
<i>Mammillaria*</i>	<i>Mauseth et al. (1995)</i>
<i>Aztekium*</i>	<i>Mauseth et al. (1995)</i>
<i>Frailea*</i>	<i>Mauseth et al. (1995)</i>
<i>Copiapoa*</i>	<i>Mauseth et al. (1995)</i>
<i>Echinocereus*</i>	<i>Mauseth et al. (1995)</i>
<i>Neowerdermannia*</i>	<i>Mauseth & Plemons-Rodriguez (1997)</i>
<i>Matucana*</i>	<i>Mauseth et al. (1995)</i>
<i>Echinopsis</i>	<i>Mauseth & Plemons (1995)</i>
<i>Parodia</i>	<i>Mauseth & Plemons (1995)</i>
<i>Gymnocalycium</i>	<i>Mauseth & Plemons (1995)</i>

*Falta informação sobre o tipo de lenho

Fig 2. Árvore obtida por Nyffeler (2002) por análise de máxima verossimilhança das sequências *trnK/matK*, com escala para medidas de comprimento de ramo (Extraído de Nyffeler 2002).

Reconstrução do caráter ancestral. O padrão de evolução dos caracteres estudados foi determinado a partir de análises de reconstrução dos estados ancestrais dos caracteres utilizando os princípios de parcimônia e ML baseados nas filogenias descritas anteriormente. Os estados de caracteres foram considerados não-ordenados em todas as análises. Para as análises de parcimônia, foi utilizado o programa McClade (Maddison & Maddison 1992). As análises de ML foram realizadas no programa Mesquite (Maddison & Maddison 2008), utilizando o modelo de cadeia de

Markov com $k = 1$ (sendo k = número de taxas de transição utilizadas no modelo). No caso dos caracteres binários estudados, WBT e tipo de lenho, também foi testado o modelo de cadeia de Markov com $k = 2$ e utilizado o LRT para escolha do modelo que melhor se ajusta aos dados (Posada & Buckley 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A reconstrução da evolução do hábito, das traqueídes vasculares e do polimorfismo do lenho pode ser observada nas figuras 3-8. Os resultados obtidos com máxima-verossimilhança tiveram certa diferença ao se inserir a informação relativa aos comprimentos de ramo, obtendo de forma geral maior certeza na proposição do ancestral. É interessante que a análise de parcimônia gerou reconstruções mais parecidas com a análise de máxima-verossimilhança com comprimentos de ramo, embora esta tenha resolvido os ancestrais ambíguos da primeira. Com isso, a discussão será baseada na reconstrução obtida por máxima-verossimilhança, com a informação dos comprimentos de ramo, por sua resolução, e por sua concordância com a análise de parcimônia.

Edwards & Donoghue (2006), com base em dados anatômicos fisiológicos e ambientais, inferiram que o ancestral de Cactaceae já tinha fatores essenciais para a aquisição das atuais formas de vida, como ocupação de hábitat quente, raízes superficiais com alta capacidade de absorção e suculência. Edwards & Donoghue (2006) investigaram a evolução de diversos caracteres anatômicos no grupo, chegando à conclusão de que muitos são homoplásticos, e discutem a questão de como a plasticidade pode ser vista como inovação, partindo do fato de que o organismo, de forma integrada, evolui. Griffith (2008) observou que os gêneros mais próximos de Cactaceae (*Anacampseros*, *Grahamia*, *Portulaca* e *Talinum*), apesar de certa heterogeneidade em forma e hábito, possuem características em comum, como hábito diminuto, tecidos de armazenamento e suculência. Quanto ao ancestral de

Cactaceae, Griffith (2004) o caracterizou como diminuto e suculento e Nyffeler (2007) o descreveu como arbustivo, com folhas suculentas. Griffith (2008), portanto sugere que caracteres como hábito arbóreo, caule não-fotossintético e folhas amplas de *Pereskia* sejam reversões. Nossos resultados sugerem que o ancestral tenha sido arbóreo (figs 3-4), como os representantes de *Pereskia*, entretanto este pode ser um artefato, já que representantes de “Portulacaceae” não foram incluídos na análise.

Cactoideae compreende cactos com diversas formas e tamanhos, cujos hábitos são descritos resumidamente como globosos, colunares e epífitas (Gibson & Nobel 1986). Buxbaum (1950) sugeriu que o crescimento vertical mais rápido do que o longitudinal origina a forma dos cactos colunares, enquanto que o contrário origina a forma dos cactos globosos. Em alguns casos, o crescimento em largura é tão mais rápido, que a forma do adulto globoso assemelha-se mais a um disco, como ocorre em *Discocactus* sp. (Buxbaum 1950). Os resultados do presente estudo indicam que, provavelmente, o ancestral de Cactoideae tenha tido o hábito globoso, possivelmente pequeno, semelhante ao gênero basal *Blossfeldia*. O hábito colunar parece ter surgido a partir do hábito ancestral globoso pelo menos duas vezes, independentemente, a partir de ancestrais globosos (fig 1). Da mesma forma, o hábito epífita apareceu independentemente, a partir de ancestrais colunares (figs. 2-3). A evolução do hábito epífita a partir de ancestrais colunares já tinha sido proposta por Buxbaum (1950). É curioso que hábitos semelhantes tenham aparecido independentemente em linhagens que divergiram a partir de um mesmo estado ancestral, um tipo de homoplasia denominado paralelismo (Olson 2005). Seria de se esperar que algo na estrutura deste ancestral globoso dos cactos colunares permitisse tal evolução independente, o que de fato parece ter ocorrido.

Em Cactaceae, o lenho pode ser WBT ou fibroso, mas ambos os tipos de lenho podem ocorrer no mesmo indivíduo, caracterizando o polimorfismo (Mauseth & Plemons 1995). O lenho WBT é constituído por traqueídes vasculares, mas também por elementos de vaso e parênquima axial e radial. A questão da origem única das

traqueídes foi debatida por Mauseth (2004), o qual propôs quatro hipóteses, sendo que três sugerem que as WBTs tenham aparecido uma única vez em Cactaceae. Na primeira hipótese, as WBTs estão presentes em todas as espécies e não foram encontradas em certas espécies porque não foram analisados indivíduos em diferentes estágios de desenvolvimento e diferentes regiões, situação comum, com base na qual, apenas espécies analisadas com o objetivo de registrar WBTs foram inseridas no presente estudo. A segunda hipótese postula que o caráter presença de WBTs tenha sido perdido nos táxons em que as elas não ocorrem, o que parece ser a única explicação no caso de epífitas (fig 3).

A terceira hipótese sugere uma mudança na filogenia com base na presença de WBTs, e embora a princípio parecesse drástica, com base nos resultados mostra-se aparentemente pouco efetiva. A última hipótese, e única que propõe uma origem múltipla das WBTs, parece pouco provável ao considerarmos apenas a família Cactaceae, e claramente nada parcimoniosa, devido à quantidade de origens independentes que seriam necessárias. Segundo de Pinna (1991), para que diferentes estruturas sejam consideradas sinapomorfias de um clado, e, portanto, homologias secundárias, ou táxicas, elas devem seguir determinados critérios: similaridade, que, ao menos no caso de traqueídes do xilema vêm a ser confirmada; conjunção, que descarta a possibilidade de duas estruturas, quando presentes no mesmo organismo, serem uma homologia; e congruência, o único teste no sentido estrito, pois separa homologias primárias de secundárias, e postula que uma sinapomorfia deve ser coerente com as demais. Este último critério é testado em reconstruções filogenéticas, bem como em reconstruções do estado ancestral do caráter em estudo, com a diferença que neste último, o caráter não participa da elaboração da hipótese de parentesco. Com base nisso, o mapeamento do caráter WBT deixa clara a homologia da estrutura na família, já que como podemos observar na figura 6, as WBTs estão provavelmente presentes no ancestral da família. As duas primeiras hipóteses de

Mauseth (2004) parecem ser, portanto, as únicas com poder de explicação para os registros da célula em Cactaceae.

Em contraste ao lenho WBT, o lenho fibroso, é constituído por elementos de vaso, pouco parênquima, e grande quantidade de fibras. Enquanto o primeiro tipo de lenho tem sido usualmente associado à questão do estresse hídrico, devido à presença das traqueídes vasculares (Mauseth *et al.* 1995), o último tem sido associado à sustentação (Terrazas & Arias 2003, Godofredo & Melo-de-Pinna 2008). Godofredo & Melo-de-Pinna (2008) mostraram em *Pilosocereus aurisetus*, um cacto colunar, que na fase juvenil, o câmbio diferencia-se em lenho monomórfico WBT. Todavia, a partir de certo estágio, o cacto deixa de formar WBTs, para formar um lenho fibroso, sendo que nas regiões mais novas, apenas esse lenho é observado. Na base, entretanto, por ser a região mais antiga do caule, estão registrados os dois tipos de lenho produzidos em fases diferentes do desenvolvimento, constituindo um lenho dimórfico (WBT/fibroso).

A evolução do lenho é resultado da seleção natural, favorecendo diferentes estratégias para sustentação, condução e armazenamento em diferentes espécies (Olson 2007). Em Cactaceae, para cada tipo de lenho, determinados tipos celulares são formados em determinada quantidade, de forma a constituir um tecido único, especializado em certa função, armazenamento e transporte seguro no caso do lenho WBT, e sustentação no caso do lenho fibroso. A congruência do desenvolvimento e função caracteriza um módulo, onde os caracteres que o compõem evoluem de forma integrada (Berg 1960, Wagner 1996).

Modularidade é uma característica da vida multicelular, e, ao mesmo tempo em que restringe a evolução pelo desenvolvimento (*constraints*), permite que interações inter-modulares possam ser dissociadas, por exemplo, no tempo (heterocronia) (Raff 1996, Wagner 1996, Raff 2000). Heterocronia, mesmo sem envolver a formação de novas estruturas, provoca drásticas mudanças evolutivas (Gould 1977). Através da observação de ancestrais e descendentes, o modelo Gould-Alberch (Alberch *et al.*

1979, Guerrant 1988) quantifica as mudanças no início ou fim do desenvolvimento, bem como a taxa das mudanças ontogenéticas, sendo uma importante ferramenta nos estudos de heterocronia. Entretanto, a utilização exclusiva deste modelo, como bem observado por Olson (2007), encontra algumas dificuldades como a comparação exclusivamente alométrica, a difícil separação entre tamanho e forma e a utilização do tempo absoluto, empecilhos que falham ao explicar muitas das mudanças evolutivas morfológicas mais interessantes (Raff & Wray 1989, Olson 2007). A comparação de eventos qualitativos do desenvolvimento, por outro lado, enfoca menos no tempo absoluto e mais na sequência de eventos, tendendo a evitar os termos do modelo Gould-Alberch (Mabbee 1993, Prochel 2004), uma estratégia particularmente interessante para o estudo da heterocronia em plantas.

Mark Olson vem estudando diferentes aspectos da evolução de *Moringa*, com base nos conceitos de modularidade e heterocronia (Olson & Rosell 2006, Olson 2007). Segundo o autor (2007), a propriedade do lenho de conter na sua anatomia a sua história faz dele um modelo para os estudos que integram ontogenia e evolução adaptativa, pois é possível inferir a ordem dos eventos ontogenéticos. Inclusive, nos casos em que ocorrem anéis de crescimento, o próprio tempo absoluto pode ser inferido (Olson 2007). Dentre os desafios que devem ser levados em consideração no estudo do lenho estão os fatos de que o tempo pode variar muito de acordo com o ambiente, a maturidade sexual não cessa a ontogênese e o desenvolvimento é incompleto em plantas perenes (Olson 2007). O mesmo autor ainda reforça que a interpretação do tipo de heterocronia, como pedomorfose ou peramorfose, só pode ser feita dentro de um contexto filogenético.

No presente estudo da evolução do lenho em *Cactaceae*, o método de sequências foi o mais apropriado, pois se tratam de dados qualitativos. O número de sequências é o mesmo número de tipos de polimorfismo finais visto que são apenas dois tipos de lenho (possivelmente dois módulos parcialmente independentes): fibroso e WBT. Alguns trabalhos relatam a ocorrência de um lenho trimórfico, entretanto para

tal classificação utiliza-se o lenho parenquimatoso (Mauseth & Plemons 1995). O lenho parenquimatoso foi descrito por Mauseth & Plemons (1995) como sendo uma fase em que não ocorre a formação de traqueídes, e tampouco a formação de fibras, sendo rico em células parenquimáticas não-lignificadas. Melo-de-Pinna (2009) contesta a definição, sugerindo que se trata de uma faixa de parênquima não lignificado, similar ao que ocorre em outras eudicotiledôneas. Devido à atual divergência de opiniões com relação a esse tipo de lenho, optamos por utilizar uma definição baseada nos tipos monomórficos tradicionalmente definidos por Gibson (1973), ou seja, fibroso e não-fibroso (tratado por lenho WBT, no presente estudo) associando ao conceito de polimorfismo de Mauseth & Plemons (1995). Como só há dois tipos de lenhos monomórficos, só é possível a formação de um lenho polimórfico: o dimórfico wbt/fibroso, encontrado sempre nessa sequência nos registros de anatomia caulinar (Mauseth & Plemons 1995, Godofredo & Melo-de-Pinna 2008)

Segundo os resultados apresentados, o ancestral de Cactoideae, provavelmente, tinha lenho monomórfico WBT, e é possível que o ancestral dos cactos, excluindo “Pereskioideae”, já tivesse esse tipo de lenho. O lenho dimórfico, formado pela sequência ontogenática “ONT3”, apareceu uma vez em Cactoideae, e possivelmente apareceu em Opuntioideae, independentemente. Caso isso fosse confirmado, acrescentar-se-ia mais um exemplo aos paralelismos que parecem ter ocorrido entre as duas subfamílias, como a redução de folhas, descrita por Edwards & Donougue (2006). O presente estudo, por falta de dados representativos da diversidade de Opuntioideae, não lhe dedicou a atenção que merece. A impressionante diversidade anatômica (Mauseth 2006) e uma filogenia recente bem sustentada (Griffith & Porter 2009) fazem de Opuntioideae um grupo muito interessante para o estudo da evolução do lenho. Embora as consequências do lenho dimórfico em Opuntioideae sejam incertas, em Cactoideae podem ser melhor analisadas.

Podemos perceber que o primeiro cacto com lenho dimórfico deve ter tido o hábito globoso, e deu origem há algumas linhagens de cactos colunares (fig 8). Trata-se de uma adição terminal, em que o resultado é a recapitulação da filogenia pela ontogenia, ainda que não tenha ocorrido um processo heterocrônico real. Resultado semelhante foi descrito e discutido claramente por Pace *et al.* (2009) com relação a formação de cunhas no xilema de espécies de Bignoniaceae. Os autores não consideram a adição terminal um caso de peramorfose, pois sugeriria um rearranjo heterocrônico do padrão ancestral, que não ocorreu de fato. Da mesma forma, as sequências ontogenéticas ONT4 e ONT5, excluídas da presente análise, seriam provavelmente casos isolados de adição terminal, autapomorfias de *Parodia* (ONT4), *Gymnocalycium* (ONT4) e *Hylocereus* (ONT5).

É possível que a evolução de um cacto com maior altura tenha sido bastante favorável, o que é demonstrado pela alta diversificação de cactos colunares, que surgiu mais de uma vez. Entretanto para que tal hábito seja possível, é necessário o desenvolvimento de um tecido de sustentação mais adequado, e a diferenciação do câmbio em lenho fibroso depois de atingida uma altura mínima fornece esta função (Godofredo & Melo-de-Pinna 2008). Paralelismos e convergências são dois casos de homoplasia em que determinado caráter evoluiu independentemente em duas ou mais linhagens, como resultado de mesma pressão seletiva ambiental. O primeiro caso é o mais difícil de diferenciar de uma sinapomorfia, pois, ao contrário da convergência, está presente em linhagens próximas filogeneticamente, que têm o estado derivado do mesmo estado presente no ancestral (Olson 2005).

Recentemente, paralelismos têm sido indicativos de predisposições do desenvolvimento (Gould 2002, Olson 2005). Portanto, podemos supor que o lenho dimórfico seja a predisposição anatômica que possibilitou a evolução de cactos colunares (fig 9). Sem o desenvolvimento de um lenho fibroso no estágio adulto, não seria possível atingir a altura de um cacto colunar. A formação do lenho dimórfico permanece em cactos com hábito globoso que evoluíram a partir de um ancestral

colunar (ex: *Matucana*). O retorno ao hábito globoso em determinados táxons sugere uma pressão seletiva maior no sentido da aquisição de suculência, já que o formato esférico é o que possui menor razão superfície:área, caracterizando o maior grau de suculência possível (Fahn & Cutler 2002). Entretanto, a formação do lenho fibroso, após a formação do lenho WBT, confere a esses cactos maior sustentação e, conseqüentemente, permite uma altura maior.

A reversão para lenho monomórfico WBT deve ter ocorrido em *Parodia* e *Gymnocalycium*, cactos globosos. A perda do segundo estágio de desenvolvimento do lenho, o fibroso, parece sugerir um caso de pedomorfose. Entretanto, algum cuidado deve ser tomado com esta explicação, visto que é conhecida a importância do peso na morfogênese vegetal, especialmente na formação de xilema secundário (Ko *et al.* 2004). Portanto, uma hipótese alternativa para pedomorfose em *Parodia* e *Gymnocalycium* é a de que esses cactos não formam lenho fibroso, pois não atingem altura suficiente. Experimentos fisiológicos que simulem o peso dos tecidos sobre os cactos poderiam testar esta hipótese

Curiosamente, a perda da fase inicial do lenho dimórfico também ocorreu na evolução da família, uma homoplasia entre os grupos onde o hábito epífita surgiu. Nyffeler *et al.* (2008) chamaram atenção para a evolução paralela da suculência em Portulacinae, clado que inclui Cactaceae, "Portulacaceae" e Didieraceae, levantando questões quanto as diferentes formas de adquirir a capacidade de suculência, habilitadas pelo padrão já existente no ancestral do grupo, e a possível reversão dessa característica em epífitas.

As perdas tanto da fase inicial quanto da fase tardia poderiam ser explicadas por desligamento de genes responsáveis pela formação de um dos módulos (lenho fibroso ou lenho WBT). Ambos os casos são mudanças heterocrônicas, pois os módulos são fases de diferenciação do lenho, e não ocorrem simultaneamente. Wiltshire *et al.* (1994) mostraram, em *Pisum*, que mudanças pontuais em determinados genes podem provocar drásticas mudanças heterocrônicas, como já

tinha sido proposto por Goldschmidt (1940) e Gould (1977). Já o surgimento do lenho dimórfico, ou melhor, a aquisição da fase de lenho fibroso deveria ser tratada mais como novidade evolutiva pelo conceito de Müller & Wagner (1991), do que como peramorfose, já que não se trata de um rearranjo do estado ancestral, monomórfico WBT, mas sim da aquisição de uma estrutura nova, não homóloga às presentes no ancestral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERCH, P., GOULD, S. J., OSTER, G. F. & WAKE, D. B. 1979. Size and shape in ontogeny and phylogeny. **Paleobiology** 5: 296-317.
- BERG, R.L. 1960. The ecological significance of correlation pleiades. **Evolution** 14: 171-180.
- BUTTERWORTH, C. & EDWARDS, E.J. 2008. Investigating *Pereskia* and the earliest divergences in Cactaceae. **Haseltonia** 14: 46-53.
- BUXBAUM, F. 1950. **Morphology of cacti: Section I. Roots and stems**. Abbey Garden Press, California.
- CARLQUIST, S. 1975. **Ecological strategies of xylem evolution**. University of California Press. Berkeley and Los Angeles, California.
- CASE, A.L., GRAHAM, S.W., MACFARLANE, T.D. & BARRETT, S.C.H. 2008. A phylogenetic study of evolutionary transitions in sexual systems in Australasian *Wurmbea* (Colchicaceae). **International Journal of Plant Sciences** 169: 141-156.
- DE PINNA, M. C. C. 1991. Concepts and tests of homology in the cladistic paradigm. **Cladistics** 7: 367-394.
- EDWARDS, E.J. & DONOGHUE, M.J. 2006. *Pereskia* and the origin of the cactus life-form. **The American Naturalist** 167: 777-793.
- EDWARDS, E.J., NYFFELER, R., DONOGHUE, M.J. 2005. Basal cactus phylogeny: implications of *Pereskia* (Cactaceae) paraphyly for the transition to the cactus life form. **American Journal of Botany** 92: 1177-1188.
- FAHN, A. & CUTLER, D.F. 1992. Xerophytes. Gerbrüder Borntraeger. Berlin.
- GIBSON, A. 1973. Comparative anatomy of secondary xylem in Cactoideae (Cactaceae). **Biotropica** 5: 29-65.
- GIBSON, A. & NOBEL, P. 1986. **The cactus primer**. Haward University Press, Cambridge.
- GODOFREDO, V. R. & MELO-DE-PINNA, G. F. 2008. Occurrence of wide-band tracheids in Cactaceae: wood variation during *Pilosocereus aurisetus* development. **Journal of the Torrey Botanical Society** 135: 94 - 102.
- GOULD, S. J. 1977. **Ontogeny and phylogeny**. Harvard Univ. Press, Cambridge.
- GOULD, S.J. 2002. **The structure of evolutionary theory**. Belknap Press, Cambridge.

- GOLDSCHMIDT, R. 1940. **The material basis of evolution**. Yale University Press, New Haven.
- GRIFFITH, M.P. 2008. *Pereskia*, Portulacaceae, photosynthesis, and phylogenies: Implications for early Cactaceae. **Haseltonia** **14**: 37–45.
- GRIFFITH, M.P. & PORTER, J.M. 2009. Phylogeny of Opuntioideae (Cactaceae). **International Journal of Plant Sciences** **170**:107–116.
- GUERRANT, E.O. 1988. Heterochrony in plants: the intersection of evolution, ontogeny and ecology. In: MCKINNEY, M.L., Ed., **Heterochrony in Evolution: a Multidisciplinary Approach**. Kluwer/Plenum, New York.
- KO, J., HAN, K., PARK, S. & YANG, J. 2004. Plant body weight-induced secondary growth in arabisopsis and its transcription phenotype revealed by whole-transcriptome profiling. **Plant Physiology** **135**: 1069–1083.
- MABEE, P.M. 1993. Phylogenetic interpretation of ontogenetic change: sorting out the actual and artefactual in an empirical case study of centrarchid fishes. **Zoological Journal of the Linnean Society** **107**: 175–291.
- MADDISON, W.P. & MADDISON, D.R. 1992. **McClade**. Sinauer Associates, Sunderland.
- MADDISON, W.P. & MADDISON, D.R. 2008. **Mesquite: a modular system for evolutionary analysis** (versão 2.5). <http://mesquiteproject.org>
- MAUSETH, J.D. 2004. Wide-band tracheids are present in almost all species of Cactaceae. **Journal of Plant Research** **117**: 69-76.
- MAUSETH, J.D. & PLEMONS, B.J. 1995. Developmentally variable polymorphic woods in cacti. **American Journal of Botany** **82**: 1199-1205.
- MAUSETH, J.D.; UOZUMI, Y.; PLEMONS, B.J. & LANDRUM, J.V. 1995. Structural and systematic study of an unusual tracheid type in cactic. **Journal of Plant Research** **108**: 517-526.
- MAUSETH, J.D. & PLEMONS-RODRIGUEZ, B.J. 1997. Presence of paratracheal water storage tissue does not alter vessel characters in cactus wood. **American Journal of Botany** **84**: 815–822.
- MAUSETH, J.D. 2006. Wood in the cactus subfamily Opuntioideae has extremely diverse structure. **Bradleya** **24**: 93-106.
- MÜLLER, G. & WAGNER, G.P. 1991. Novelty in evolution: restructuring the concept. **Annual Review of Ecology and Systematics** **22**: 229–256.
- NYFFELER, R. 2002. Phylogenetic relationships in the cactus family (cactaceae) based on evidence from trnk/ matk and trnl-trnf sequences. **American Journal of Botany** **89**: 312–326.
- NYFFELER, R. 2007. The Closest Relatives of Cacti: Insights from Phylogenetic Analyses of Chloroplast and Mitochondrial Sequences with Special Emphasis on Relationships in the Tribe Anacampseroteae. **American Journal of Botany** **94**: 89-101.

- NYFFELER, R., EGGLI, U., OGBURN, M. & EDWARDS, E. 2008. Variations on a theme: repeated evolution of succulent life forms in the Portulacineae (Caryophyllales). **Haseltonia** **14**: 26–36.
- OLSON, M.E. 2005. Wood, bark, and pith anatomy in *Pittocaulon* (Senecio, Asteraceae): water storage and systematics. **Journal of the Torrey Botanical Society** **132**: 173–186.
- OLSON, M.E. 2007. Wood ontogeny as a model for studying heterochrony, with an example of paedomorphosis in *Moringa* (Moringaceae). **Systematics and Biodiversity** **5**: 145–158.
- OLSON, M.E. & ROSELL, J. 2006. Using heterochrony to detect modularity in the evolution of stem diversity in the plant family Moringaceae. **Evolution** **60**: 724–734.
- PACE, M.R., LOHMANN, L.G. & ANGYALOSSY, V. 2009. The rise and evolution of the cambial variant in Bignoniaceae (Bignoniaceae). **Evolution & Development** **11**: 465 - 479.
- POSADA, D. & BUCKLEY, T.R. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Systematic Biology** **53**: 793–808.
- PROCHEL, J., VOGEL, P. & S'ANCHEZ-VILLAGRA, M.R. 2004. Hand development and sequence of ossification in the forelimb of the european shrew *crocidura russula* (Soricidae) and comparisons across therian mammals. **Journal of Anatomy** **205**: 99–111.
- RAFF, R. A. 1996. **The shape of life: genes, development and the evolution of animal form**. Chicago University Press, Chicago.
- RAFF, R. A. 2000. Evo-devo: the evolution of a new discipline. **Nature Reviews - Genetics** **1**: 74–79.
- RAFF, R.A. & WRAY, G.A. 1989. Heterochrony: developmental processes and evolutionary results. **Journal of Evolutionary Biology** **2**: 409–434.
- SCHLEIDEN, M.J. 1845. Beiträge zur Anatomie der Cacteen. **Mém. Acad. Imp. Sci. St-Petérsbourg Divers Savans** **4**: 335-380.
- TERRAZAS, T. & ARIAS, S. 2003. Comparative stem anatomy in the subfamily Cactoideae. **The Botanical Review** **68**: 444-473.
- WAGNER, G. P. 1996. Homologues, natural kinds and the evolution of modularity. **American Zoologist** **36**: 36–43.
- WALLACE, R. S., & J. H. COTA. 1995. An intron loss in the chloroplast gene rpoC1 support a monophyletic origin for the subfamily Cactoideae of the Cactaceae. **Current Genetics** **29**: 275–281.
- WILTSHIRE, R.J.E., MURFET, I.C. & REID, J.B. 1994. The genetic control of heterochrony: Evidence from developmental mutants of *Pisum sativum* L. **Journal of Evolutionary Biology** **7**: 447–465.

Fig 3-4. Reconstrução dos estados ancestrais do caráter “Hábito”. 3- Análise em máxima parcimônia (MP). 4- Análise em máxima verossimilhança (ML).

Fig 5-6. Reconstrução dos estados ancestrais do caráter “WBT”. 5- Análise em máxima parcimônia (MP). 6- Análise em máxima verossimilhança (ML).

Fig 7-8. Reconstrução dos estados ancestrais do caráter “Sequência ontogenética do lenho”. 7- Análise em máxima parcimônia (MP). 8- Análise em máxima verossimilhança (ML).

Fig 9. Hipóteses de evolução da ontogênese do lenho e do hábito em Cactaceae. Note que o hábito colunar evoluiu após o aparecimento da segunda fase de diferenciação do lenho, o lenho fibroso. A hipótese filogenética utilizada na reconstrução foi retirada de Nyffeler 2002.

CONCLUSÕES GERAIS

O estudo da morfologia oferece a oportunidade de diálogo com diversas áreas da botânica, sem deixar de ter, contudo, a profundidade de uma ciência madura. Este trabalho busca este diálogo ao abordar a estrutura bioquímica das traqueídes vasculares, e a evolução de alguns caracteres morfológicos de interesse na família.

No primeiro capítulo, vimos que as traqueídes vasculares em Cactaceae seguem um padrão de diferenciação no xilema secundário semelhante ao padrão descrito para elementos de vaso. Tal sequência promove um aumento na deposição de parede secundária no lenho do ápice para a base, possivelmente relacionada a uma maior capacidade de sustentação. As traqueídes encontradas nos traços de aréolas de *Pilosocereus aurisetus* incentivaram um maior estudo dessa estrutura, caracterizando-a, com especial interesse na sua vascularização.

Inferências quanto à função das traqueídes foram mais elaboradas ao se analisar a estrutura da parede celular destas células em nível bioquímico. Vimos que pectinas estão presentes na parede primária, em especial cadeias ramificadas com galactano, um dos polímeros mais flexíveis de parede. O galactano é depositado na região em que as células já estão diferenciadas, e é encontrado também nas grandes células da medula, possivelmente garantindo a potencial expansão celular que permite maior armazenamento de água. Também vimos que ocorre aumento de manano do ápice para base, sendo este monossacarídeo possivelmente responsável por maior rigidez na região basal.

Ao mapear a ontogênese do lenho na hipótese filogenética mais aceita, observamos que o lenho dimórfico apareceu uma vez em Cactoideae. Após o surgimento do novo estágio ontogenético, o lenho fibroso, os cactos poderiam atingir maior altura, propiciando o aparecimento de cactos colunares. Também vimos que em

outros casos a evolução do lenho também parece estar correlacionada à evolução do hábito, como ocorre em epífitas.

Por fim, dentre os aspectos levantados no presente estudo, os mais relevantes foram: a contribuição para o conhecimento da ontogênese das traqueídes vasculares de um cacto colunar, bem como da anatomia do ápice e da aréola em Cactaceae; o registro da ocorrência de traqueídes vasculares nos traços de aréola de um cacto colunar; a descrição da composição de monossacarídeos das traqueídes vasculares de *Pilosocereus aurisetus*, além da localização espacial e temporal de epitopos de pectina relevantes para a função da célula, e dos monossacarídeos que variam durante o desenvolvimento do tecido; e a discussão quanto à evolução da ontogênese do lenho em Cactoideae, e o papel do polimorfismo na evolução do hábito, testando a hipótese de heterocronia como explicação para os diferentes tipos de lenho.

RESUMO

Os estudos com traqueídes vasculares em Caryophyllales têm focalizado questões filogenéticas e funcionais. Embora sejam descritas como traqueídes, com espessamento da parede secundária superior a 2µm, o relato de WBTs em diferentes tecidos em outras famílias evidencia que a definição dessas células não está bem estabelecida. O objetivo deste trabalho é compreender a ontogenia das traqueídes vasculares de *Pilosocereus aurisetus* (cacto colunar), descrevendo a sua estrutura em nível celular e bioquímico, bem como suas implicações funcionais e evolutivas. Para isso foi descrita a ontogênese, como base para o estudo de composição de parede, e anticorpos foram utilizados para melhor entendimento das moléculas de relevância funcional. Além disso, uma revisão anatômica que sintetiza o conhecimento atual sobre ocorrência das WBT, polimorfismo do lenho e diversidade de hábitos foi inserida em um contexto filogenético, a fim de esclarecer o papel do polimorfismo do lenho na evolução de Cactoideae. Plântulas foram incluídas em parafina para obtenção de cortes seriados, analisados em microscopia óptica e confocal. A análise de composição de parede celular foi feita com tecido xilemático de plântulas, cujos polissacarídeos foram sujeitos a hidrólise ácida, seguida de análise em cromatografia. Na imunolocalização foram utilizados os anticorpos anti-galactano LM5 e anti-arabinano LM6, para pectinas, e anti-manano, para hemiceluloses. Dados sobre a presença de traqueídes vasculares e do tipo de lenho em Cactaceae foram coletados da literatura e mapeados em uma filogenia robusta. A grande proporção de parede primária, associada à deposição de galactano, permite a função de armazenamento de água. Além disso, o aumento de parede secundária associada à deposição de manano na base, sugere função de sustentação nesta região, ainda que, somente a formação do lenho fibroso pareça fornecer o suporte necessário para que um cacto colunar atinja a altura de um adulto. Tal processo parece ter sido a predisposição anatômica crucial para a evolução dos cactos colunares. O presente estudo fornece um panorama amplo e novas evidências sobre a origem e função das traqueídes vasculares de Cactaceae.

Palavras-chave: cactos, elementos traqueais, lenho, parede celular, pectinas, xilema.

ABSTRACT

*Studies with wide-band tracheids have addressed phylogenetic and functional questions. Although these cells have been described as tracheids, with secondary cell walls thicker than 2µm, their recent register in different tissues of other families has pointed out that this definition may not be well established. The aim of the present study is to understand the ontogeny of the wide-band tracheids in *Pilosocereus aurisetus* (a columnar cactus), describing their structure at both cellular and biochemical levels, and to investigate their possible functional and evolutionary implications for the Cactoideae as a whole. Therefore, *Pilosocereus aurisetus* ontogeny was studied as basis to cell wall composition analyses. Such analyses involved the use of antibodies and the identification of molecules of functional relevance. Furthermore, an anatomical review that summarizes the current knowledge about wide-band tracheid occurrence, wood polymorphism, and habit diversity was analyzed within a phylogenetic framework to investigate the role of polymorphic wood in Cactoideae evolution. Seedlings were embedded in paraffin, and the resulting sections were analyzed in optical and confocal microscopy. Studying the cell wall composition in seedling xylem involved the use of acid hydrolization of polysaccharides followed by chromatography analysis. The antibodies used for immunocytolocalization were anti-galactan LM5 and anti-arabinan LM6, for pectins, and anti-mannan, for hemicelluloses. Data about wide-band tracheids occurrence and wood polymorphism in Cactaceae were collected from the literature and mapped in a robust phylogeny for the subfamily. The prevalent proportion of primary cell wall with galactan suggests a water storage function for the wide-band tracheids. Furthermore, the rise of secondary cell wall deposition, and the high concentration of mannan in the cactus base suggest a sustaining function for this region. However, the fibrous wood development alone seems to provide enough support to sustain a mature columnar cactus. Such process may have been the most important anatomical prerequisite in the evolution of columnar cacti. The present study offers an overview and new evidences for the origin and function of wide-band tracheids.*

Keywords: cacti, cell wall, tracheary elements, wood, xylem.