PAULA MARIA ELBL

Exemplar corrigido O original encontra-se disponível no Instituto de Biociências da USP.

ESPESSAMENTO PRIMÁRIO DO SISTEMA CAULINAR EM POALES: MORFOLOGIA, ANATOMIA, EXPRESSÃO DO GENE *SCARECROW*

STEM PRIMARY THICKENING IN POALES: MORPHOLOGY, ANATOMY AND EXPRESSION OF SCARECROW GENE

SÃO PAULO

2012

Paula Maria Elbl

Exemplar corrigido
O original encontrase disponível no Instituto de Biociências da USP.

ESPESSAMENTO PRIMÁRIO DO SISTEMA CAULINAR EM POALES: MORFOLOGIA, ANATOMIA, EXPRESSÃO DO GENE *SCARECROW*

STEM PRIMARY THICKENING IN POALES: MORPHOLOGY, ANATOMY AND EXPRESSION OF SCARECROW GENE

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Botânica

Orientador(a): Nanuza Luiza de Menezes

Co-orientadora: Maria Magdalena Rossi.

SÃO PAULO

2012

Ficha Catalográfica

Elbl, Paula Maria

Espessamento primário do sistema caulinar de Poales: morfologia, anatomia, expressão do gene *scarecrow*

Stem Primary thickening of Poales: morphology, anatomy and expression of *scarecrow* gene

201 páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica

1. Palavra-Chave Principal 2. Palavra-Chave Secundária 3. Palavra-Chave Secundária (os itens 2 e 3 são opcionais) I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).		Prof(a). Dr(a).
Prof(a). Dr(a).		Prof(a). Dr(a).
	Profa. Dra. Nanuza Luiza de Menezes	
	Orientador(a)	

Dedico esta tese aos meus amados pais.

Agradecimentos

Seria impossível citar aqui o nome de todos que, direta ou indiretamente me ajudaram ao longo desta jornada. Foram quatro longos anos de muitos momentos felizes e outros nem tanto, nos quais pude aprender muito e também passar o meu conhecimento adiante. A conclusão desta etapa de minha vida não seria possível sem a ajuda e compreensão de todos os citados.

Agradeço o carinho, compreensão e dedicação da minha querida orientadora Profª Drª Nanuza Luiza de Menezes, que ao longo de todos estes anos esteve ao meu lado esclarecendo minhas dúvidas e me encorajando a seguir em frente e não desistir. Sua sabedoria e apoio foram fundamentais para que este trabalho fosse concluído. Agradeço também a oportunidade de ter iniciado a minha carreira acadêmica ao lado de uma das maiores pesquisadoras botânicas do mundo, pioneira no Brasil e que sem dúvidas elevou a minha experiência acadêmica a um nível que eu jamais havia imaginado. Obrigado Nan por todos os momentos que pude contar com os seus esclarecimentos pontuais, por todos os chás compartilhados e toda a energia positiva que foram fundamentais para a conclusão desta etapa.

Agradeço também a minha co-orientadora Profª Drª Maria Magdalena Rossi, que ao longo dos anos me ofereceu apoio irrestrito e me fez acreditar em minhas capacidades. Serei etermente grata a todos os conselhos e apoio nos meus momentos de fraqueza. Obrigado por toda sua dedicação e empenho em ajudar-me no momento mais complicado do meu doutorado, sem sua orientação nesta "reta final" meus dias teriam sido muito mais complicados.

Obrigado Prof^a Dr^a Gladys Flavia de Albuquerque Melo de Pinna pela amizade construída ao longo destes anos e pelo incentivo em trabalhar com a multidisciplinaridade, unindo anatomia com os estudos moleculares. Lembro com clareza do dia em que você me apresentou ideias que foram fundamentais em meu projeto. Seu entusiasmo e alegria contaginates foram também fatores estimulantes para a conclusão do meu trabalho.

A Prof^a Dr^a Verônica Angyalossy agradeço aos ensinamentos e disposição em esclarecer dúvidas a qualquer momento e por todos os momentos que precisei de

um ombro amigo e corri a bater em sua porta. Seu incentivo e dedicação foram extremamente importantes.

Ao Prof. Dr Gregório Ceccantini pelo apoio nos primeiros passos dentro a USP e pelo suporte irrestrito dos primeiros anos acadêmicos até hoje. Agradeço todas as críticas construtivas durante nossas discussões sobre os mais diversos assuntos. A relação de amizade criada por nós ajudou-me muito nos dias mais difíceis.

Ao Prof Dr Diego Demarco e Prof^a Dr^a Maria Emilia por sua ajuda e conselhos.

A CAPES, CNPQ e FAPESP pelo suporte financeiro.

Ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo pela oportunidade.

Ao departamento de botânica e todas as aulas maravilhosas proporcionadas por todos os professores que participam deste incrível corpo docente.

Aos funcionários do IB pelo constante suporte desde a serralheria até a recepção.

Ao meu amigo/noivo/companheiro Leo Gomes que apesar de ter entrado no barco no meio do caminho, me mostrou que as coisas podem ser mais simples e que preocupar-se demais pode ser o problema. Seu ombro amigo, amor, compreensão e ajuda com ilustrações e estruturação da tese foi de suma importância.

À minha grande amiga Bianca Brasil (Bibi) que junto comigo perdeu noites de sono me auxiliando e colocando em prática coisas que eu não conseguiria sozinha. Obrigado por todo seu empenho, pelas risadas e as incontáveis baladas..

À Mariana Adrioni que acompanhou toda a minha caminhada desde o ínicio em Ponta Grossa até os últimos dias em São Paulo, obrigado pelas longas e confortantes conversas e pelas intermináveis garrafas de vinho.

Ao André Brahma Lima pela parceria, viagens, conselhos e risadas que serão sempre lembrados.

Aos meus amigos Rafael P.O, José Hernandes, Marcelo Pace, Giuliano, Guilherme Freire, Luiza, Aline, Vivi Jono, Julio, Carol, Cauã, Groselha, Bruna Cher, Renata Lemos, Maria Cristina, Emilia, Thais, Rodrigo Tin Tan, Caroline Bachelet, Vitor Barão, Ari, Mario, Muskito, Perdigão, Bira, Auri, Adri Grandes, Amanda Pereira, Junia, Fabi, Juliana, Bruno, Cairo, Bruna Brahma, Cristiane Gonçalves (Irmã de

Endoderme), Karin Peru, Karen Mayumi, Cássia (Fisio), Gisele Costa, Tássia e Silvia por terem me ajudado, aguentado as minhas perguntas e por participarem de todos os momentos desta jornada. Sem vocês meus experimentos e atividades no laboratório não seriam tão prazerosos e divertidos. Torço muito por todos vocês.

Ao Leonardo de Melo Versieux pela amizade e apoio profissional.

Aos BBZ por todas as risadas/churrascadas/cervejadas e demais "adas" ao longo dos anos.

A minha segunda família, Nancy Gomes, Wagner Gomes, Betty Gomes e Roy Presley por todo amor e carinho recebidos.

Aos meus filhos Freddie e Raul por serem os dois animaizinhos/humanos mais lindos deste mundo.

À minha amada família Balthazar Elbl Neto, Rosangela do Carmo Elbl, João Mauricio (Johnny), Mara Elbl, Elis Elbl, Mari Elbl, Ana Flavia Elbl, Gulherme Elbl, Gustavo Elbl, Otavio Elbl, Giovanna Elbl e Marco Elbl e avós Nana e Ilda.

Sou muito feliz por ser parte desta linda família, sem vocês absolutamente nada disso seria possível. Pai e mãe, obrigado por me apoiarem em todas as minhas decisões e por serem tão maravilhosos. O amor de vocês é a coisa mais valiosa que pode existir.

Índice

Introdução Geral	19
Capítulo 1	33
Introdução	35
Objetivo geral	40
Objetivos Específicos	40
Material e Métodos	41
Material vegetal	
Caracterização Morfológica e Anatômica do caule	41
Resultados	43
Tillandsioideae	43
Tillandsia L	43
Tillandsia geminiflora Brongn	45
Tillandsia loliacea Mart	50
Tillandsia tenuifolia L	
Tillandsia usneoides L	
Vriesea Lindl	59
Vriesea atropurpurea Silveira	
Vriesea crassa Mez	65
Vriesea gigantea Mart. ex Schult. f	69
Vriesea minarum L. B. Sm	
Vriesea oligantha (Baker) Mez	
Vriesea segadas-viannae L.B. Sm.	
Vriesea stricta L. B. Sm	
Alcantarea Harms	
Alcantarea burle-marxii (Leme) J.R. Grant	
Alcantarea extensa (L. B. Sm.) J. R. Grant	93
Alcantarea farneyi (Martinelli & A. Costa) J.R. Grant	
Alcantarea nahoumii (Leme) J.R. Grant	100
Alcantarea turgida Versieux & Wand	
Discussão	
Conclusões	
Referências	
Capítulo II	
Introdução	
O espessamento primário	133
0 gene <i>SCR</i> .135	
A família multigênica GRAS	
Objetivo geral	
Objetivos específicos	
Material e Métodos	
Material Vegetal	
Cultivo e coleta de amostras e análise de crescimento de Zea mays	
Hibridização in situ	
Clonagem do SCR de Vriesea gigantea	146

146
148
148
149
150
151
151
álise
151
155
162
167
167
174
178
178
183
186
191
192

RESUMO

Após o estabelecimento do crescimento axial, promovido pelos meristemas apicais, em monocotiledôneas surge abaixo do meristema apical caulinar, uma região entre o córtex e o cilindro central que promove o crescimento em espessura. Este crescimento é promovido através da adição de tecidos vasculares (centripetamente) e de tecidos parenquimáticos (centrifugamente). Durante muitos anos este espessamento foi denominado e interpretado de diferentes formas, sendo demonstrado como um único meristema denominado de meristema de espessamento primário com atividade bidirecional. Recentemente, pesquisas demonstram que o espessamento primário em caule é promovido pela atividade de dois tecidos, a endoderme e o periciclo, ambos em atividade meristemática. Com o intuito de trazer à tona informações detalhadas sobre estes dois tecidos que compõem esta zona meristemática, assim como o seu funcionamento e origem, o Capítulo I traz informações morfológicas e anatômicas detalhadas do caule de 16 espécies de Tillandsioideae (Bromeliaceae). Os representantes escolhidos para esta análise foram os gêneros Alcantarea, Tillandsia e Vriesea que possuem uma ampla variação morfológica permitindo, assim, comparar entre eles o processo de espessamento do caule. Demostrou-se ser a endoderme e o periciclo os tecidos, que juntos, promovem o espessamento e a manutenção do corpo primário dessas plantas. No entanto, mais evidências que suportem a hipótese que o espessamento primário é realizado por dois tecidos são necessárias. Assim o capítulo II aborda a caracterização do espessamento primário sob a luz da expressão gênica do gene SCARECROW (SCR), gene candidato a ser um marcador da atividade endodérmica, permitindo assim separar e caracterizar molecularmente os tecidos que promovem o espessamento primário. Desta forma, analisou-se a expressão do *scr* ao longo do desenvolvimento do caule em Zea mays (Poceae), avaliando a possibilidade do gene SCR ser um marcador de atividade endodérmica. Com a confirmação, o gene ortólogo ao SCR de Vriesea gigantea foi clonado e caracterizado. E finalmente,

analisou-se o padrão de expressão de *SCR* em morfotipos diferentes, *Vriesea* gigantea e *Tillandisia usneoides* espécies escolhidas durante a análise do capitulo I.

ABSTRACT

After the establishment of axial growth, promoted by apical meristems, in monocots appears below the shoot apical meristem, a region between the cortex and central cylinder that promotes the growth in thickness. This growth is promoted by the addition of vascular tissues (centripetally) and parenchyma tissues (centrifugally). During many years this thickening was called and interpreted in different ways and it has been shown as a single meristem called the primary thickening meristem with bidirectional activity. Recently, researches show that the primary thickening in stem is promoted by the activity of two tissues, the endodermis and pericycle, both in meristematic activity. In order to elicit detailed information about these two tissues that compose this meristematic zone, as well as its operation and origin, Chapter I provides detailed anatomical and morphological information about the stems of 16 species of Tillandsioideae (Bromeliaceae). The representatives chosen for this analysis were the genus: Alcantarea, Tillandsia and Vriesea that have a wide morphological variation, thus allowing to compare between the process of stem thickening. It was demonstrated to be the endodermis and pericycle the tissues that together promote the thickening and maintenance of this primary plant body. However, more evidences supporting the hypothesis that the primary thickening is accomplished by two tissues are required. Thus Chapter II deals with the characterization of the primary thickening in the light of gene expression. The SCARECROW (SCR) gene is good candidate to be a marker of endodermal activity, thereby separating and molecularly characterizing the tissues that promote primary thickening. Therefore, it was analyzed the expression of SCR throughout the development of the stem in Zea mays (Poaceae), evaluating the possibility of SCR gene be a marker of endodermal activity throughout the development of a monocot. With the confirmation, the ortholog of SCR gene of *Vriesea gigantea* was cloned and characterized. And finally, the expression pattern of SCR was analyzed in Vriesea gigantea and Tillandisia usneoides species chosen during the analysis of Chapter I.

Introdução Geral

Introdução Geral

O caule de monocotiledôneas da mesma maneira que nas outras espermatófitas, apresenta uma região meristemática lateral determinante na definição do seu padrão de crescimento. Enquanto que as demais espermatófitas, nesta região instala-se um câmbio que irá ser responsável pelo crescimento em espessura do caule formando o corpo secundário (Eames & Macdaniels, 1947; Esau, 1965; Fahn, 1967) em monocotiledôneas esse espessamento pode ocorrer tanto na formação do corpo primário como do secundário (DeMason, 1979a, b; Menezes et al., 2005; Menezes et al., 2011). Localizada entre o córtex e o cilindro central, esta região promove o espessamento primário especialmente em rizomas, cormos e bulbos por meio da adição de tecidos vasculares centripetamente e de tecido parenquimático de modo centrífugo, durante toda a vida da planta ou vir a ser substituído por um meristema que irá formar o corpo secundário.

Portanto, próximo ao ápice, as monocotiledôneas apresentam uma região meristemática lateral que desempenha função semelhante à de um câmbio e esta região é determinante na definição do hábito de crescimento. A maioria dos autores do século XIX e do século XX admitem ser a região limite entre o córtex e o cilindro vascular de grande importância no desenvolvimento do corpo primário em diversas espécies propondo assim vários nomes. Citam-se, como exemplos, a denominação "cambium" por Schleiden (1842), "périméristème" por Guillaud (1878) e "couche dictiogène" (camada geradora de raiz) por Mangin (1882), em seus importantes trabalhos de revisão. No começo do século XX, outros pesquisadores reconheceram uma região próxima ao promeristema, a qual denominaram "primary meristem mantle," "primäre meristemmantel" como Helm (1936) e Eckardt (1941), "zona cambial", por Cheadle (1937) e Chakraverti (1939a) e "meristema de espessamento primário – PTM" (Ball, 1941).

No século XX, vários autores apresentaram propostas para entender o espessamento primário em monocotiledôneas. Admite-se que o termo PTM foi utilizado, primeiramente, por Ball em 1941, em três espécies de Arecaceae: *Phoenix canariensis* Chaub., *Washingtonia filifera* Wats. e *Trachycarpus excelsa* Wendl. O autor embasado na literatura do século XIX e na localização da região meristemática a que denominou de MEP, o relacionou com uma atividade semelhante ao câmbio presente nas demais Spermatophyta (Gimnospermas, Paleoervas e Eudicotiledôneas), concluindo que o mesmo contribuía primeiramente com aumento do diâmetro do caule, promovendo seu espessamento, e depois para o crescimento em comprimento do mesmo.

Alguns anos depois, com os trabalhos de DeMason (1979b; 1979a; 1980), Diggle e DeMason (1983) e Rudall (1991) o termo foi consagrado na literatura. Desde então, passou-se a aceitar que durante o estabelecimento do corpo primário das monocotiledôneas, o espessamento seria realizado pela atividade centrifuga e/ou centrípeta do MEP e que o mesmo promoveria a ligação entre raiz e caule assim como entre caule e folha. A existência do MEP foi proposta inclusive para espécies que possuem caules achatados e folhas dispostas em rosetas (DeMason, 1979b, a, 1980; Rudall, 1991).

Assim, na literatura há uma grande diversidade de interpretações e, consequentemente, diversas denominações para explicar este espessamento. Até 2005, excluindo autores do século XIX e do início do século XX, o espessamento primário em monocotiledôneas foi atribuído pela totalidade dos autores a um meristema por eles denominado: meristema de espessamento primário (MEP – do inglês *Primary Thickening Meristem*, PTM). Já Menezes et al. (2005) apresentaram uma nova interpretação a respeito da origem do espessamento primário não admitindo a existência do MEP.

Durante estes anos, a literatura mundial assimilou o termo MEP, conceituando-o porém de diversas maneiras. No entanto, é consenso para muitos autores que este meristema estaria localizado entre o córtex e o cilindro central. Para esses autores o MEP se localiza na região pericíclica e

possui atividade bidirecional, produzindo células corticais centrifugamente, feixes caulinares centripetamente, raízes adventícias e ainda, promovendo a conexão entre raiz e caule e caule e folha (Cheadle, 1937; DeMason, 1979b, a, 1980; Stevenson & Fisher, 1980; DeMason & Wilson, 1985; Gifford & Bayer, 1995; Sajo & Rudall, 1999; Rodrigues & Estelita, 2002). Outra característica que chama a atenção é a descrição dada por DeMason (1979), ao estudar o caule de *Allium cepa*. Na região do MEP (entre o córtex e o cilindro vascular) um fileira de células tinham se espessado no meio da faixa meristemática que ela denominou de camada endodermóide, pois esta camada de células era contínua com a endoderme da raiz. Este termo também utilizado por Tomlinsom (1969) ao descrever o limite do córtex no caule de Commelinaceae como uma camada distinta de células parenquimáticas unisseriadas com deposito de amido, esclarecendo ser esta camada comumente descrita como endoderme, porem para esse autor a falta de estrias de Caspary descaracterizaria uma verdadeira endoderme, chamando-a de camada endodermóide.

No entanto, como já foi visto desde 2005, uma nova interpretação para essa região foi apresentada por Menezes e colaboradoras que mostraram que o que era apresentado como um único meristema - o MEP - na realidade é composto pela endoderme e pelo periciclo, ambos em atividade meristemática. Diversos autores posteriormente seguiram essa mesma linha de pensamento, (Silva, 2000; Alves et al., 2005; Silva & Menezes, 2006; Silva & Menezes, 2007; Elbl & Menezes, 2007; Elbl, 2008; Lima & Menezes, 2008; Silva, 2009; Cattai & Menezes Menezes, 2010; et al., 2011). Além disso, estes trabalhos demonstram a presença da endoderme e do periciclo na raiz, no caule e na folha, bem como a sua participação no espessamento primário em rizomas, cormos e bulbos, corroborando o que já havia sido demonstrado pelos autores do século XIX e início do século XX.

Portanto, para as autoras acima há uma perfeita continuidade entre todos os tecidos primários da planta, isto é, não apenas a epiderme, o córtex, o

xilema primário e o floema primário são contínuos ao longo do corpo da planta, mas também, a endoderme (camada mais interna do córtex) e o periciclo (camada mais externa do sistema vascular) (Menezes, 1971; Silva, 2000; Menezes & Melo-de-Pinna, 2003; Alves et al., 2005; Menezes et al., 2005; Silva & Menezes, 2006; Silva & Menezes, 2007; Elbl & Menezes, 2007; Elbl, 2008; Lima & Menezes, 2008; Silva, 2009; Cattai & Menezes, 2010 Menezes, et al., 2011). Diante da atual situação dos estudos sobre o espessamento primário do caule em monocotiledôneas, fica claro que a delimitação dos tecidos responsáveis pelo espessamento primário em caule monocotiledôneas estabelecido pelas características anatômicas. Por isso, deixam dúvidas devido à falta de conhecimento dos tecidos vegetais, especialmente da endoderme e do periciclo. No entanto, pesquisas com marcadores moleculares corroboram os trabalhos das autoras acima mencionadas, isto é a presença de atividade meristemática na endoderme.

Concomitantemente as pesquisas descritas acima, em espécies modelo como *Arabidopsis thaliana, Zea mays* e *Oryza sativa*, estudos sobre o controle gênico do desenvolvimento vegetal caracterizaram, por meio da análise de mutantes e de estudos de expressão gênica o gene chamado scarecrow (*SCR*) (Di Laurenzio et al., 1996; Fukaki et al., 1998; Lim et al., 2000; Wysocka-Diller et al., 2000; Nakajima et al., 2001; Kamiya et al., 2003; Lim et al., 2005). Este gene é expresso na endoderme da raiz, do caule, no centro quiescente e no ápice caulinar, mais especificamente, na camada L1. Particularmente, *SCR* é expresso em células do meristema fundamental destinadas a realizar divisões periclinais (Wysocka-Diller et al., 2000).

Anatomicamente, esta característica já foi descrita por alguns autores na fase meristemática da endoderme resultando numa célula derivada (voltada para a região cortical) e uma, inicial endodérmica, que permanece meristemática por mais tempo até se diferenciar na endoderme (Williams, 1947; Van Fleet, 1961; Melo-De-Pinna & Menezes, 2002, 2003; Menezes et al.,

2005). O gene *SCR*, assim como *SHR* (*shoot-root*) codificam fatores de transcrição (FTs) pertencentes à familia GRAS, exclusivos de plantas (Lee et al., 2008) e que promovem o padrão radial do córtex (Di Laurenzio et al., 1996; Fukaki et al., 1998; Lim et al., 2000; Wysocka-Diller et al., 2000).

Enquanto a expressão do *SCR* está principalmente localizada na endoderme, *SHR* é transcrito no estelo. A proteína SHR se move do estelo para a endoderme estimulando a expressão de *SCR*, e assim juntos, regulam o desenvolvimento da endoderme e do córtex. Em arabidopsis foram descritos 33 membros da família GRAS e ortólogos a *SCR* vêm sendo descritos em milho, ervilha, pinus e arroz (Lim et al., 2000; Sassa et al., 2001; Kamiya et al., 2003; Lim et al., 2005; Laajanen et al., 2007). O nome da família deriva do nome dos membros que foram originalmente descritos: GAI, (Gibberellic Acid Insensitive) RGA (Repressor of GAI) e SCR (Scarecrow) (Di Laurenzio et al., 1996; Peng et al., 1997; Pysh et al., 1999; Lim et al., 2000; Bolle, 2004; Lim et al., 2005).

Plantas de *A. thaliana* mutantes para *scr* apresentam uma raiz curta e má formação do padrão radial, tendo como característica a perda da camada mais interna do córtex, a endoderme, a diminuição da atividade do centro quiescente, e ainda a perda da bainha amilífera no caule (que é a endoderme) que leva à perda do sentido gravitrópico em plantas como arabidopsis (Fukaki et al., 1998; Lim et al., 2000; Wysocka-Diller et al., 2000; Lim et al., 2005). Diante dessas evidências, nota-se que a endoderme representa não só uma camada limitante e sim, um tecido com identidade própria e capacitado a produzir células centrifugamente levando ao espessamento do órgão.

Além disso, caracterizar e evidenciar a presença da endoderme em caule destas plantas é de extrema importância, devido ao fato de que sua presença caracteriza o estado primário do corpo vegetativo, pois em monocotiledôneas que apresentam espessamento secundário como *Cordyline* e *Yucca*, a endoderme já foi eliminada, pela produção centrífuga de células

corticais pelo MES (meristema de espessamento secundário), isto é, formando um córtex secundário (Cattai & Menezes, 2010).

Segundo Stevens (2001), a presença/ausência e a natureza do periciclo, assim como detalhes da distribuição e da natureza da endoderme caulinar e foliar podem ter grande interesse sistemático.

Espécies da família Bromeliaceae, principalmente representantes da subfamília Tillandsioideae são um bom modelo para o estudo do papel da endoderme na morfoanatomia do caule, já que apresentam uma imensa gama de hábitos. Adicionalmente há pouca informação existente referente a esse assunto disponível para o grupo, representando assim um bom substrato para o estudo do espessamento primário em monocotiledôneas.

A família Bromeliaceae é um dos principais exemplos de adaptação a condições extremas, ocorrendo desde ambientes oligotróficos e áridos até áreas muito úmidas, desde o nível do mar até o alto da Cordilheira dos Andes (Rauh & Temple, 1990). Estas plantas possuem um corpo vegetativo em geral pouco desenvolvido, hábito principalmente rizomatoso, caule com cavidade armazenadora de água (fitotelma ou "tanque"), e tricomas foliares capazes de absorver água (Benzing, 2000).

A capacidade de armazenar água entre as bainhas das folhas (presença de fitotelma) permite às bromélias capturar a água da chuva e acumular a matéria orgânica disponibilizada pelo ambiente externo, como as cinzas, pólen e esporos que se encontram suspensos no ar (Leopoldo Coutinho 1970) ou proveniente dos diferentes organismos (anfíbios, répteis, insetos e etc.) que podem habitar tais cavidades (Benzing 2000, Nievola et al., 2005).

Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho é o estudo do espessamento primário em monocotiledôneas desde o ponto de vista morfoanatômico e de expressão gênica, utilizando como modelo espécies que serão escolhidas durante a análise anatômica.

Referências

- ALVES, V. G., G. F. MELO-DE-PINNA, R. C. ARRUDA, C. G. SILVA, E. SCREMIM DIAS, AND N. L. MENEZES. 2005. Pericycle and endodermis in monocotyledons. *Abstracts: XVII International Botanical Congress* Vienna, Austria, Europe.
- BALL, E. 1941. The development of the shoot apex and of the primary thickening meristem in *Phoenix canariensis* Chaub., with comparisons to *Washingtonia filifera* Wats. And *Trachycarpus excelsa* Wendl. *American Journal of Botany* 28: 820-832.
- BENZING, D. H. 2000. Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation. Cambridge University Press.
- BOLLE, C. 2004. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* 218: 683-692.
- CATTAI, M. B., AND N. L. MENEZES. 2010. Primary and secondary thickening in the stem of Cordyline fruticosa (Agavaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 82: 653-662.
- CHAKRAVERTI, D. N. 1939a. The occurrence of fugacious cambium in the rizoma of *Curcuma longa* L. *The Philippine Journal of Science* 69: 191-195.
- CHEADLE, V. I. 1937. Secondary growth by means of a thickening ring in certain Monocotyledons. *Botanical Gazette* 98: 535-555.
- COUTINHO, L. M. 1970. Sobre a assimilação noturna de CO2 em orquídeas e bromélias. *Ciência e Cultura* 22: 364-368.
- DEMASON, D. A. 1979a. Function and development of the primary thickening meristem in the Monocotyledon, *Allium cepa* L. *Botanical Gazette* 140: 51-66.
- _____. 1979b. Histochemistry of the primary thickening meristem in the vegetative stem of *Allium cepa* L. *American Journal of Botany* 66: 347-350.
- _____. 1980. Localization of cell division activity in the primary thickening meristem in *Allium cepa* L. *American Journal of Botany* 67: 393-399.
- DEMASON, D. A., M. A. WILSON. 1985. The continuity of primary and secondary growth in Cordyline terminalis (Agavaceae). *Canadian Journal of Botany* 63: 1907-1913.

- DI LAURENZIO, L., J. WYSOCKA-DILLER, J. E. MALAMY, L. PYSH, Y. HELARIUTTA, G. FRESHOUR, M. G. HAHN, K. A. FELDMANN, AND P. N. BENFEY. 1996. The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* 86: 423-433.
- DIGGLE, P. K., D. A. DEMASON. 1983. The relationship between the primary thickening meristem and the secondary thickening meristem in *Yucca whipplei* Torr. I. Histology of the mature vegetative stem. *American Journal of Botany* 70: 1195-1204.
- EAMES, A. J., E L. H. MACDANIELS. 1947. An Introduction to Plant Anatomy. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York and London.
- ELBL, P. M. 2008. Estudos em Commelinaceae (Monocotiledôneas): O papel da endoderme e do periciclo na formação do corpo primário. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ELBL, P. M., AND N. L. d. Menezes. 2007. Espessamento primário em caule e raiz de *Tradescantia zebrina* (Commelinaceae): endoderme e periciclo. 58º Congresso Nacional de Botânica São Paulo SP.
- ESAU, K. 1965. Plant anatomy New York: Wiley.
- T. 1941. Kritische Untersuchungen über das **ECKARDT** primareDickenwachstum bei Monokotylen Ausblick MIT auf dessenVerhaltnis sekundaren Verdickung. Botanisches zur archiv42:289-334.
- FAHN, A. 1967. Plant Anatomy. Oxford; New York: Pergamon Press.
- FUKAKI, H., J. WYSOCKA-DILLER, T. KATO, H. FUJISAWA, P. N. BENFEY, AND M. TASAKA. 1998. Genetic evidence that the endodermis is essential for shoot gravitropism in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* 14: 425-430.
- GIFFORD, E. M., AND D. E. BAYER. 1995. Developmental anatomy of *Cyperus esculentus* (Yellow Nutsedge). *International Journal of Plant Sciences* 156: 622-629.
- GUILLAUD, A. 1878. Rechersches sur l'anatomie comparée et le developpement des tissues de la tige dans les monocotylédones. *Annals Sci Nat Bot Ser* 6 1-176.
 - HELM J. 1936. Das Erstarkungswachstum der Palmer und einigeranderer Monokotylen, zugleich ein Beitrag zur Frage dês Erstarkungswachstum der Monokotylem überhaupt. Planta 26:319–364.

- KAMIYA, N., J. I. ITOH, A. MORIKAMI, Y. NAGATO, AND M. MATSUOKA. 2003. The SCARECROW gene's role in asymmetric cell divisions in rice plants. *Plant Journal* 36: 45-54.
- LAAJANEN, K., I. VUORINEN, V. SALO, J. JUUTI, AND M. RAUDASKOSKI. 2007. Cloning of Pinus sylvestris SCARECROW gene and its expression pattern in the pine root system, mycorrhiza and NPA-treated short roots. *New Phytologist* 175: 230-243.
- LEE, M.-H., B. KIM, S.-K. SONG, J.-O. HEO, N.-I. YU, S. LEE, M. KIM, D. KIM, S. SOHN, C. LIM, K. CHANG, M. LEE, E J. LIM. 2008. Large-scale analysis of the GRAS gene family in Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology* 67: 659-670.
- LIM, J., Y. HELARIUTTA, C. D. SPECHT, J. JUNG, L. SIMS, W. B. BRUCE, S. DIEHN, AND P. N. BENFEY. 2000. Molecular analysis of the SCARECROW gene in maize reveals a common basis for radial patterning in diverse meristems. *The Plant Cell* 12: 1307-1318.
- LIM, J., J. JUNG, C. LIM, M.-H. LEE, B. KIM, M. KIM, W. BRUCE, AND P. BENFEY. 2005. Conservation and Diversification of SCARECROW in Maize. *Plant Molecular Biology* 59: 619-630.
- LIMA, V. F. G. A., AND N. L. D. MENEZES. 2008. Morpho-Anatomical Analysis of the Rhizome in Species of *Scleria* Berg. (Cyperaceae) from Serra do Cipó (MG). *Brazilian Archives of Biology and Technology*.
- MANGIN, L. 1882. Origine et insertion des racines adventives et modifications corrélatives de la tîge chez les monocotylédones. *Ann Sci Nat Bot* 14: 216-363.
- MELO-DE-PINNA, G. F. A., E N. L. MENEZES. 2002. Vegetative organ anatomy of Ianthopappus corymbosus Roque & Hind (Asteraceae-Mutisieae). *Revista Brasileira de Botânica* 25: 505-514.
- MELO-DE-PINNA, G. F. A., E N. L. MENEZES. 2003. Meristematic endodermis and secretory structures in adventitious roots of Richterago Kuntze (Mutisieae-Asteraceae). *Revista Brasileira de Botânica* 26: 1-10.
- MENEZES, N. L. 1971. Traqueídes de transfusão no gênero *Vellozia* Vand. *Ciência e Cultura* 23: 389-409.
- MENEZES, N. L., D. C. SILVA, AND G. F. A. MELO-DE-PINNA. 2003. Folha. *In* B. Appezzato-da-Glória and S. M. Carmelo-Guerreiro [eds.], Anatomia Vegetal, 303-325. UFV, Viçosa.
- MENEZES, N. L. D., D. C. SILVA, R. C. O. ARRUDA, G. F. MELO-DE-PINNA, V. A. CARDOSO, N. M. CASTRO, V. L. SCATENA, E E. SCREMIN-DIAS. 2005. Meristematic

- activity of the Endodermis and the Pericycle in the primary thickening in monocotyledons: considerations on the "PTM". *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 77: 259-274.
- Menezes, N. L. D., P. M. Elbl, G. Cury, B. Appezzato-da-Glória, K. L. M. Sasaki, C. G. da Silva, G. R. Costa, AND V. G. A. Lima. 2011. The meristematic activity of the endodermis and the pericycle and its role in the primary thickening of stems in monocotyledonous plants. *Plant Ecology and Diversity* First: 1-13.
- NAKAJIMA, K., G. SENA, T. NAWY, AND P. N. BENFEY. 2001. Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 413: 307-311.
- PENG, J., P. CAROL, D. E. RICHARDS, K. E. KING, R. J. COWLING, G. P. MURPHY, AND N. P. HARBERD. 1997. The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes & Development* 11: 3194-3205.
- Pysh, L. D., J. W. Wysocka-Diller, C. Camilleri, D. Bouchez, AND P. N. Benfey. 1999. The GRAS gene family in Arabidopsis: Sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant Journal* 18: 111-119.
- RUDALL, P. 1991. Lateral meristems and stem thickening growth in monocotyledons. *Botanical Review* 57: 150-163.
- RAUH, W., AND P. TEMPLE. 1990. The Bromeliad Lexicon. Blandford.
- RODRIGUES, A. C., AND M. E. M. ESTELITA. 2002. Primary and secondary development of *Cyperus giganteus* Vahl rhizome (Cyperaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 25: 251-258.
- SAJO, M. J., AND P. J. RUDALL. 1999. Systematic vegetative anatomy and ensiform leaf development in Xyris (Xyridaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 130: 171-182.
- SASSA, N., Y. MATSUSHITA, T. NAKAMURA, AND H. NYUNOYA. 2001. The Molecular Characterization and in situ Expression Pattern of Pea SCARECROW Gene. *Plant Cell Physiol.* 42: 385-394.
- Schleiden MJ. 1842. Grundzüge der wissenschaftlichen Botanik.Leipzig: Wilhelm Engelmann.
- SILVA, C. G., AND N. L. MENEZES. 2006 O espessamento primário em caule de Curculigo capitulata (Lour.) Kuntze (Hypoxidaceae). 57º Congresso Nacional de Botânica. Gramado-RS.

- _____. 2007. O espessamento primário em rizoma de Zingiber offinale (Zingiberaceae). 58º Congresso Nacional de Botânica São Paulo.
- SILVA, C. G. D. 2009. O espessamento primário no sistema caulinar e a continuidade entre esses tecidos nos órgãos vegetativos de Zingiberaceae e Costaceae: enfoque nos tecidos endoderme e periciclo. Mestrado em Botânica, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SILVA, D. C. 2000. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Lagenocarpus* (Cyperaceae), Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- STEVENS, P. F. 2001 Angiosperm Phylogeny Group, June 2008 [and more or less continuously updated."http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/.
- STEVENSON, D. W., AND J. B. FISHER. 1980. The Developmental Relationship between Primary and Secondary Thickening Growth in Cordyline (Agavaceae). *Botanical Gazette* 141: 264-268.
- TOMLINSON, P. B. 1969. III Commelinales-Zingiberales. In Anatomy of the Monocotyledons (C.R. Metcalfe, ed.). Clarendon Press Oxford, .
- VAN FLEET, D. S. 1961. Histochemistry and function of the endodermis. *The Botanical Review* 27: 165-220.
- WILLIAMS, B. C. 1947. The structure of the meristematic root tip and origin of the primary tissues in the roots of vascular plants. *American Journal of Botany* 34: 455-462.
- Wysocka-Diller, J. W., Y. Helariutta, H. Fukaki, J. E. Malamy, AND P. N. Benfey. 2000. Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development* 127: 595-603.

Capítulo I

Caracterização do sistema caulinar de 16 espécies de Tillandsioideae: o papel da endoderme e do periciclo no espessamento primário

1 Introdução

A família Bromeliaceae é considerada um grupo monofilético, membro da ordem Poales (Stevens, 2001), com 56 gêneros e 3010 espécies. A distribuição é estritamente Neotropical, com exceção da espécie *Pitcairnia feliciana* (A. Chevalier) Harms & Mildbraed, que ocorre na costa oeste do continente africano, na Guiné (Smith, 1934; Smith & Downs, 1974; Jacques-Félix, 2000; Luther, 2004).

Diversas filogenias realizadas com dados moleculares e morfológicos suportam a monofilia desta família (Ranker et al., 1990; Terry et al., 1997; Nandi et al., 1998; Chase et al., 2000; Hilu et al., 2003), no entanto, as relações filogenéticas a nível intrafamiliar permanecem pouco resolvidas, principalmente quanto ao parentesco entre as subfamílias e a circunscrição de gêneros em Bromelioideae e Tillandsioideae (Faria et al., 2004; Brown & Leme, 2005). Diversos estudos, morfológicos e moleculares, foram realizados para inferir as relações entre estas subfamílias e seus gêneros, entretanto, os dados morfológicos apresentaram muitas homoplasias, limitando as pesquisas ou levando a interpretações errôneas do parentesco entre os taxa (Smith & Downs, 1974; Smith & Downs, 1979; Smith & Till, 1998; Givnish et al., 2007).

Recentemente, Bromeliaceae foi dividida em oito subfamílias (Brochinioideae, Lindmanioideae, Tillandsioideae, Hechtioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideaee Bromelioideae) que se caracterizam principalmente pela morfologia das flores, frutos, sementes, e dados moleculares (Givnish et al., 2007, Givnish et al., 2011).

A subfamília Tillandsioideae é o maior grupo dentro de Bromeliaceae com aproximadamente 1100 espécies, representadas por nove gêneros: *Alcantarea* (22

spp.), Catopsis (21 spp.), Glomeropitcairnia (2 spp.), Guzmania (176 spp.), Mezobromelia (9 spp.), Racinaea (56 spp.), Tillandsia (551 spp.), Vriesea (188 spp.) e Werauhia (73 spp.) sensu Smith & Till, (1998); Versieux & Wanderley (2007). É reconhecida como grupo monofilético, mas a delimitação dos gêneros é ainda pouco compreendida e considerada inconsistente por Barfuss et al. (2005), baseando-se em dados moleculares. Neste mesmo estudo, os gêneros Vriesea e Tillandsia foram considerados parafiléticos, enquanto o gênero Alcantarea foi considerado monofilético.

Versieux et al. (2012) *Alcantarea* é bem suportado como monofilético mas as seções de *Vriesea*, representados pelas espécies do leste do Brasil, aparecem parafiléticas.

O monofilismo da subfamília Tillandsioideae é corroborado não apenas pelos estudos baseados em dados moleculares, mas também por diversas características morfológicas, fisiológicas e adaptativas muito peculiares, que reforçam sua identidade como grupo natural. A presença de tricomas foliares absortivos, epifitísmo - incluindo as epífitas atmosféricas (*Tillandisia*)-, fotossíntese CAM (Mercier et al., 1997; Benzing, 2000; Nievola et al., 2005) e síndrome ornitófila (Benzing, 2000; Barfuss et al., 2005; Givnish et al., 2007) são alguns dos exemplos de tais características.

Apesar da importância ecológica que os membros dessa subfamília desempenham nos ambientes onde ocorrem, as pesquisas relativas à morfologia e anatomia são escassas e se restringem, na maior parte das publicações, a estudos de anatomia foliar ligados a processos fisiológicos ou para fins taxonômicos (Medina, 1974; Benzing et al., 1978; Smith & Griffith, 1986; Loeschen et al., 1993; Nelson et al., 2005; Souza et al., 2005; Versieux et al., 2010).

Existem poucos trabalhos que abordam a anatomia do caule, que geralmente é descrito como inconspícuo e curto, completamente ocultado pelas bainhas foliares (Smith & Downs, 1974, Rauh & Temple, 1990). Entretanto, percebe-se que alguns autores vêm, desde o século XIX, voltando sua atenção a este órgão, inclusive observando características de espessamento primário (tabela 1.1).

Estes estudos abrangem diversas espécies de Bromeliaceae. Ressaltam-se os trabalhos de Petersen (1892 e 1893 apud Steveson & Popham 1973) que, ao estudar várias famílias de Monocotiledôneas, observou uma região meristemática entre o córtex e o cilindro vascular em Bromeliaceae, a qual foi denominada zona intermediária.

Essa mesma zona meristemática foi encontrada por Krauss (1948), ao estudar a anatomia do caule do abacaxizeiro (*Ananas comosus*), que a denominou de camada dictiogênica – "*dictyogenous layer*" apoiando os autores do século XIX, o que significa "camada geradora de raiz". Esta camada meristemática limita o córtex do cilindro central e produz cordões vasculares centripetamente, constituídos de xilema e floema. Associados aos cordões vasculares são produzidas células parenquimáticas no sentido centrífugo, que geralmente tornam-se espessadas em regiões maduras. Menezes et al. (2005) demonstraram que o que parecia um único meristema (como descrito acima), na realidade eram dois tecidos com atividade meristemática: periciclo com função centrípeta e endoderme com função centrífuga.

Tomlinson (1969) realizou uma análise anatômica abrangente da família, com espécies das três subfamílias. De acordo com o autor, no caule das bromélias o cilindro central é delimitado do córtex por uma zona estreita de 2-4 camadas de células alongadas, que se torna esclerótica em partes maduras do caule. O autor comenta ainda que esta zona é descrita como "endoderme" em estudos prévios de outros autores, porém adverte que a falta de um espessamento de suberina nas paredes destas células descaracterizaria esta camada como uma típica endoderme, denominando-a de camada **endodermóide**.

Parece haver consenso na literatura sobre a existência desta zona meristemática nas monocotiledôneas, entretanto os autores divergem ao caracterizar sua estrutura e atividade. Como visto na introdução geral, desde o século XIX vários autores já haviam detectado que a região limite entre o córtex e o cilindro vascular possuía uma grande participação do desenvolvimento do corpo primário em diversas espécies. Esta característica os levou a propor vários nomes, para esta região, citam-se, como exemplos, "cambium" por Schleiden (1842), "périméristème" por Guillaud (1878) e "couche dictiogène" (camada geradora de

raiz) por Mangin (1882). No começo do século XX, outros pesquisadores reconheceram uma região próxima ao promeristema, a qual denominaram "primary meristem mantle" ("primäre meristemmantel" como Helm (1936) e Eckardt (1941), "zona cambial", por Cheadle (1937) e Chakraverti (1939a) e "meristema de espessamento primário – PTM" (Ball, 1941).

Assim, se formou uma grande diversidade de interpretações e diversas denominações para explicar este espessamento (Silva, 2000; Menezes et al., 2005; Elbl, 2008; Silva, 2009; Menezes et al., 2011). Até 2005, excluindo autores do século XIX e do início do século XX, o espessamento primário em monocotiledôneas foi atribuído pela totalidade dos autores a um meristema por eles denominado: meristema de espessamento primário (MEP – do inglês *Primary Thickening Meristem,* PTM). Já Menezes et al., (2005) conforme já visto, apresentaram uma nova interpretação a respeito da origem do espessamento primário não admitindo a existência do MEP.

Com o intuito de trazer à tona informações detalhadas sobre os tecidos que compõem esta zona meristemática, assim como seu funcionamento, foram selecionadas 16 espécies dentro da subfamília Tillandsioideae, que é reconhecida por possuir a mais ampla diversidade de tipos caulinares na família.

Essa ampla variação somente poderá ser entendida em sua plenitude após a caracterização da origem e do funcionamento desta zona meristemática, que é responsável pela manutenção do corpo primário da planta, podendo vir a determinar sua forma caulinar final, tanto em caules extremamente desenvolvidos, como de *Alcantarea turgida*, quanto em caules inconspícuos, como de *Tillandsia usneoides* (Rauh & Temple, 1990).

Tabela 1.1: Trabalhos realizados com anatomia e morfologia do caule de Bromeliacaeae.

Autor	Espécie	Órgãos analisados	
Falkenberg (1876 apud Mangin 1882)	Aechmeafulgens, Nidularium rigidum	Caule	
Petersen (1983 <i>apud</i> Stevenson e Popham 1973)	Ananas comosus e Pitcairnia	Caule	
Ross (1895 <i>apud</i> Tomlinson 1969)	Bromelia fastuosa Lindl., Quesnelia caynensis Bak.	Caule	
Billings (1904 <i>apud</i> Tomlinson 1969)	Tillandsia usneoides L.;	Todos	
Boresch (1908 apud Tomlinson 1969)	Aechmea pineliana, Pitcairnia roelii, Quesnelia roseo-marginata	Caule	
Birge (1911 <i>apud</i> Tomlinson 1969)	Tillandsia recurvata L.	Todos	
Holm (1915 <i>apud</i> Tomlinson 1969)	Ananassa sativa LindL. (Ananas comosus)	Todos	
Chodat e Vischer (1916 apud Tomlinson 1969)	Tillandsia.polytrichioides (now T.tricholepis); T. pseudo-stricta.	Caule	
Philipp (1923 apud Tomlinson 1969)	Bilbergia zebrina, Nidularium meyerdorffil Abromeitiella sp., Acanthostachys	Caule	
Schulz (1930 <i>apud</i> Tomlinson 1969)	strobilacea, Aechmea glaziovii, Ananas sativus,, Billbergia vittata, Bromelia humills, Cryptanthus acaulls, Dyckia alrissima, D revifolia, Guzmaniacardinalls, Nidularium paxianum, Pitcairnia undulata, Puya spathacea, Tillandsia juncea,T. leiboldiana, T. usneoides,	Caule	
Krauss (1948)	Ananas comosus (L). Merr.	Todos	
Borchert (1966)	Tillandsia incarnata H. B. K.	Caule e raiz	
Tomlinson (1969)	Diversos gêneros	Todos	
Pita e Menezes (1997)	Dyckia Schult. f., Encholirium Mart. ex Schult	Caule e raiz	
Segecin e Scatena (2004 a e b)	Tillandsia L.	Escapo, rizoma	

2 Objetivo geral

O objetivo geral deste capítulo é angariar informações detalhadas sobre a morfologia e anatomia do caule de Tillandsioideae, que permitam uma maior compreensão do espessamento primário no grupo.

2.1 Objetivos Específicos

- * Caracterizar a estrutura caulinar de três gêneros de Tillandsioideae (Alcantarea, Vriesea e Tillandsia) com ênfase na atividade meristemática da endoderme e do periciclo.
- * Compreender a contribuição da endoderme e do periciclo na formação do corpo primário e no crescimento em espessura das monocotiledôneas.

3 Material e Métodos

3.1 Material vegetal

Foram analisadas 16 espécies da subfamília Tillandsioideae (tabela:1.2). O material testemunho foi depositado no herbário SPF da Universidade de São Paulo e alguns exemplares estão disponíveis na Coleção Viva do Bromeliário do Instituto de Botânica (IBt), com exceção da espécie *Vriesea gigantea* que é cultivada no fitotério do Instituto de Biociências da USP.

Tabela 1.2: Lista dos táxons analisados no presente estudo.

Taxa	Forma de vida	Material-	Ambiente Área de coleta			
	t	testemunho				
1. Alcantarea burle-marxii	Rupícola	Versieux 420	Inselberg em Mata Atlântica,			
(Leme) J.R. Grant			Nordeste de MG.			
2. Alcantarea extensa a (L. B. Sm.) J. R. Grant)	Rupícola	Versieux 344	Mata Atlântica			
3. <i>Alcantarea farneyi</i> (Martinelli & A. Costa) J.R. Grant	Rupícola	Versieux 245	Inselberg em Mata Atlântica, norte do RJ			
4. Alcantarea turgida Versieux & Wand.	Rupícola	Versieux 260	Campo rupestre, Serra do Cipó, MG			
5. Alcantarea nahoumii (Leme) J.R. Grant.	Rupícolala	Versieux 418	Inselberg em Mata Atlântica, RJ			
6. Tillandsia geminiflora Brongn	Epífita	Versieux 489	Campo rupestre, Serra do Cipó, MG			
7. Tillandsia loliacea Mart	Epífita/Rupícola	Versieux 476	Campo rupestre, Diamantina, MG.			
8. Tillandsia tenuifolia L.	Epífita/Rupícola	Versieux 482	Campo rupestre, Diamantina e Serra do Cipó, MG. Mata atlântica, RJ, SP.			
9. Tillandsia usneoides L.	Epífita	Elbl 10	Campo rupestre, Serra do Cipo, Mata atlântica, SP e RJ.			
10. Vriesea atropurpurea Silveira	Rupícola	Versieux 297	Campo rupestre, Serra do Cipó.			
11. Vriesea crassa Mez	Rupícola/Terrícol a	Versieux 484	Campo rupestre, Serra do Cipó.			
12. Vriesea minarum L.B. Smith	Rupícola	Versieux 140	Campo rupestre, Serra da Piedade, MG.			
13. Vriesea oligantha (Baker) Mez	Epífita/Rupícola	Versieux 441	Campo rupestre, Serra do Cipó, MG.			
14. Vriesea segadas-viannae L.B. Sm.	Epífita obrigatória	Versieux 440	Campo rupestre, Serra do Cipó.			
15. Vriesea stricta LB. Sm	Rupícola	Versieux 258	Campo rupestre, Serra do Cipó			
16. Vriesea gigantea Mart. ex Schult.f.	Epífita	Cultivada no IB	Mata Atlântica, SP e RJ			

3.1.1 Caracterização Morfológica e Anatômica do caule

Para análise morfológica e anatômica foram coletados dois exemplares de cada espécie Nesta etapa, foram observadas as seguintes características: hábito, formato do caule, filotaxia, padrão morfológico da roseta, forma de crescimento, local de origem das raízes intracorticais, tipo de feixe vascular, tipo de idioblasto, formato do ápice caulinar* e padrão de divisão celular da endoderme e do periciclo e seus produtos.

Amostras de caule foram fixadas em FAA (formaldeído 37%, ácido acético glacial, etanol 50% 1:1 18 v/v) (Johansen, 1940), ou em 4% paraformaldeído por 24 horas, seguindo-se de desidratação em série etílica até a deposição de material em etanol 50%, sendo então incluídas em parafina segundo a metodologia descrita por Sass (1951), Johansen (1940) e Kraus e Arduim (1997). Cortes histológicos seriados longitudinais e transversais, obtidos através de micrótomo rotativo, foram corados com Azul de Astra e Safranina (Kraus & Arduim 1997).

As análises anatômicas foram realizadas em microscópio óptico com as principais imagens registradas no sistema de digitalização IM50, acoplado ao microscópio Leica DMBL.

4 Resultados

Tillandsioideae

As espécies da subfamília Tillandsioideae são herbáceas, podendo ter hábito epífiticoo ou rupícola, e em sua maioria possuem crescimento geotrópico negativo. Os caules variam tanto no comprimento, podendo ser inconspícuos ou caulescentes, quanto em espessura, que varia de 0,1 a 20,0 cm de diâmetro. A maioria possui filotaxia espiralada e folhas congestas dispostas em rosetas, sendo pouco frequente a existência de filotaxia dística. O fitotelma varia de acordo com o formato da roseta, sendo desenvolvido em rosetas infundibuliformes e pouco desenvolvido em rosetas estreito-infundibuliformes e sub-buldosas.

Tillandsia L.

Gênero de plantas xerófitas, que inclui espécies exclusivamente epífitas extremas, como *Tillandsia usneoides e T. geminiflora*, e espécies de hábito variável, podendo ser rupícolas ou epífitas, como *T. tenuifolia*, *e T. loliacea*. Apresentam caules pouco a bem evidentes, pendentes ou eretos, mas nunca com formação de fitotelma (figura 1.1).

T. loliacea, T. geminiflora e T. tenuifolia possuem caule curto com folhas congestas e dispostas em roseta. T. usneoides difere de todas as espécies analisadas pois, além da filotaxia dística, possui caule de tamanho variável e aspecto filiforme, o que o torna facilmente confundível com as folhas, também filiformes. Além disso, apresenta nós e entrenós conspícuos, o que difere dos nós congestos e entrenós curtos observados nas demais espécies analisadas. Não foi observada a formação de escapos e nem de raízes adventícias.

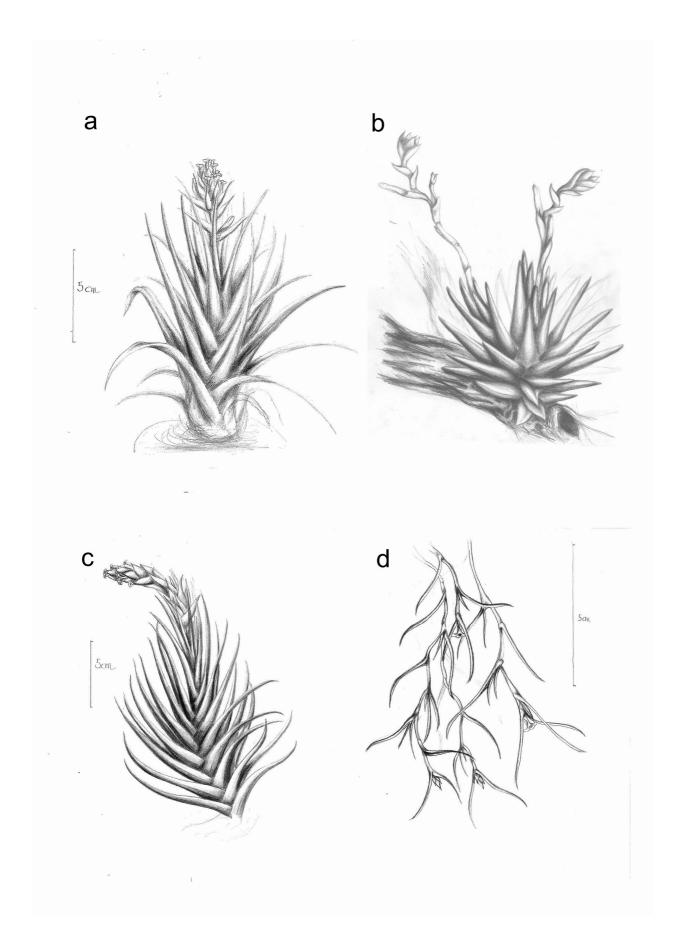


Figura 1.1: Hábitos de *Tillandsia geminiflora* (a), *Tillandsia loliaceae* (b). *Tillandsia tenuifolia* (c) e *Tillandsia usneoides* (d). Ilustrações feitas por Ubirajara Gomes de Mello Neto.

Tillandsia geminiflora Brongn

O caule curto e ereto de *T. geminiflora* demonstra-se, em seção longitudinal (figuras 1.2 a-h e 1.3 a), evidentemente espesso e com grande quantidade de raízes adventícias intracorticais, formadas pelo periciclo, próximo a região do meristema apical caulinar (figuras 1.2 b). Com um cilindro central bem distinto do córtex (figuras 1.2 a-b), próximo ao ápice, (figuras 1.2 c-e) nota-se uma faixa na região da endoderme contendo alta quantidade de células com núcleos evidentes, o que indica uma atividade meristemática na região (figura 1.2 e). Em regiões mais diferenciadas (figuras 1.2 f-h e 1.3 a), os núcleos não são mais observados e nota-se também, a presença de um espessamento acentuado do caule, confirmando a ocorrência de inúmeras divisões no sentido centrífugo (figuras 1.2 a-h). Esta maior taxa de divisões celulares em regiões distantes ao ápice caulinar é o que confere ao caule um formato de abóbada ao ápice (figura 1.2 a). Estas divisões originam células denominadas de derivadas da endoderme meristemática (figura 1.2 e), as quais se organizam de forma radiada e que aumentam de tamanho em direção à periferia do córtex (figuras 1.2 e-h). Em suma, pode-se dizer que esta radiação é oriunda da camada mais interna do córtex, a endoderme, que nas figuras 1.2 c-e está em atividade meristemática, sendo, portanto, denominada de inicial endodérmica (figura 1.2 e).

Quando o caule atinge seu diâmetro máximo, pode-se observar que a endoderme encontra-se já diferenciada, assumindo fase parenquimática. Nesta fase, o periciclo ainda está em atividade, produzindo feixes caulinares colaterais, com metaxilema e metafloema, na periferia do cilindro vascular. (1.2 f-h e 1.3 a). Nota-se também a presença de raízes adventícias intracorticais, também oriundas do periciclo (figuras 1.2 b e 1.3 a-e).

Em cortes transversais, (figura 1.3 b-h e 1.4 a-c) observa-se que o córtex é composto de células parenquimáticas e idioblastos com ráfides, sendo atravessado por traços foliares que se deslocam do centro para a periferia durante a diferenciação do órgão, e que rompem a zona limitante constituída pelo periciclo e pela endoderme (figuras 1.3 b-d). As derivadas da endoderme, e a própria

endoderme, se mantém parenquimáticas mesmo nas porções mais maduras, podendo-se observar neste corte que elas são tangencialmente maiores que as células do periciclo (figura 1.3 d). Observa-se também que o periciclo forma primeiramente o metafloema e depois o metaxilema, formando os feixes caulinares que se agrupam na periferia do cilindro central (figura 1.3 d). Aliás, esse agrupamento de feixes na região pericíclica é uma evidência da origem pericíclica desses feixes.

A endoderme das raízes intracorticais (figuras 1.3 e-f), que apresenta espessamento de parede, é contínua à endoderme do caule, que permanece parenquimática, evidenciando a perfeita continuidade dos tecidos primários no corpo da planta.

Ainda em corte transversal (figuras 1.3 g-h) das regiões diferenciadas observam-se raízes adventícias intracorticais ocupando parte do córtex caulinar. Estas raízes possuem cilindro central lignificado, córtex interno com canais de ar e córtex externo esclerificado (figura 1.4 a).

Nesta mesma região do caule, o periciclo como camada mais externa do cilindro central se mantém parenquimático (figura 1.4 b), sendo responsável pela formação de feixes na periferia do cilindro vascular e de raízes adventícias.

O sistema vascular do caule de *T. geminiflora* é complexo, pois o estelo (do tipo atactostelo) possui feixes caulinares que se concentram na periferia, enquanto que em posição mais interna (figura 1.4 c-d), observam-se feixes caulinares e traços foliares com distribuição aleatória e esparsa.

Os feixes que constituem os traços foliares diferem dos feixes caulinares pois apresentam protoxilema e protofloema além do metaxilema e metafloema (figura 1.4 d). Nesta espécie, em particular, os traços que se encontram dentro do cilindro não apresentam fibras ao seu redor (figura 1.4 d).

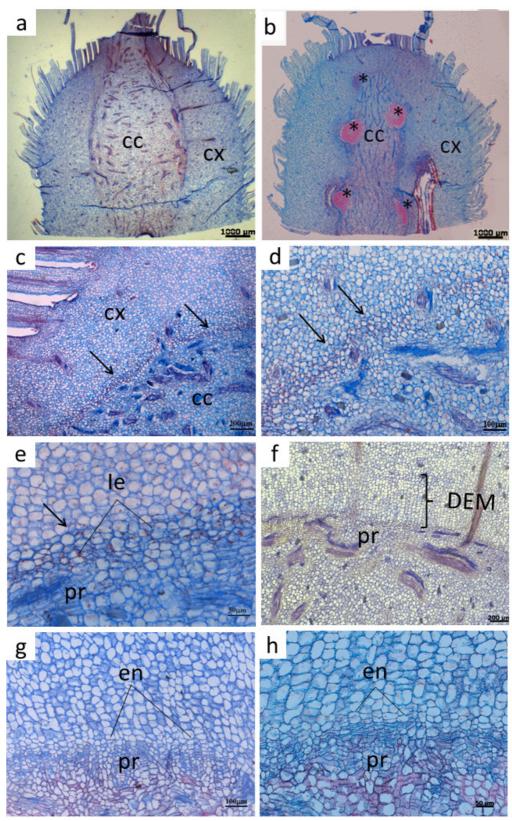


Figura 1.2: Seções longitudinais (a-h) de Tillandsia geminiflora.

Em **a-c** aspecto geral do caule, onde se nota o cilindro central (cc) e córtex (cx) bem distintos. Os asteriscos (*) indicam as raízes adventícias(ra) intracorticais. Em **d-e**, observa-se a faixa de células com núcleos evidentes (setas) e inicial endodérmica (ie) em **e**. Em regiões mais diferenciadas (**f-h**), observam-se as derivadas da endoderme meristemática (DEM), a endoderme (en) e o periciclo (pr).

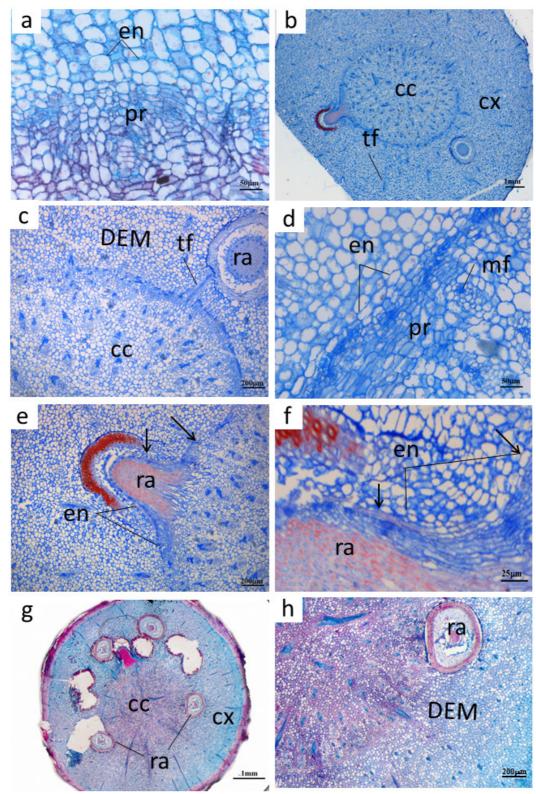


Figura 1.3: Seções longitudinal (a) e transversais (b-h) de Tillandsia geminiflora.

Em **a**, detalhe da região mais diferenciada das figuras 1.2 **g** e **h**, onde se nota a endoderme (en) e o periciclo (pr) originando feixes. Em **b-f**, o caule cilíndrico com córtex parenquimático, interrompido por traços foliares (tf) e raízes adventícias (ra). As células da endoderme e as suas derivadas (DEM) são maiores tangencialmente (**d**) e na figura **e** e **f** observa-se a continuidade da endoderme da raiz com a endoderme do caule; verifica-se que a endoderme da raiz apresenta espessamento nas suas paredes e a endoderme do caule possui células parenquimáticas (n -setas). Em **g** aspecto geral do caule com inúmeras raízes adventícias, na figura **h**, as derivadas da endoderme meristemática ao lado de uma raiz adventícia. As siglas correspondem a: cc: cilindro central, cx: córtex.

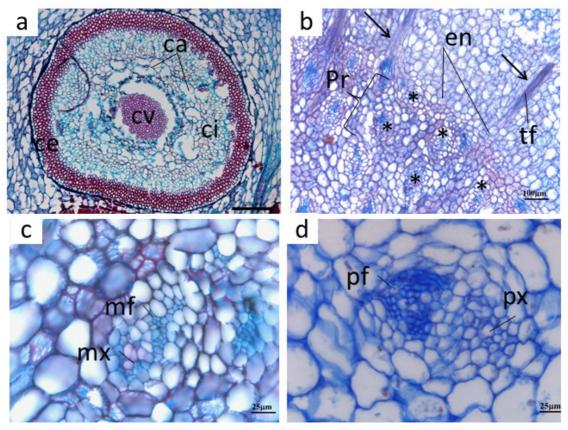


Figura 1.4: Seções transversais de Tillandsia geminiflora (a-d).

Em **a** aspecto geral de uma raiz adventícia (ra) intracortical com córtex externo (ce) espessado, córtex interno (ci) parenquimático com canais de ar (ca) e cilindro vascular (cv) lignificado. Traços foliares (tfsetas) e observa-se também, na região pericíclica (pr) uma concentração de feixes caulinares (**b** – asteriscos *). Feixe caulinar em **c** com metaxilema (mx) e metafloema (mf) e um traço foliar (**d**), observados no interior do cilindro central (cc), com protoxilema (px) e protofloema (pf) além de metaxilema e metafloema.

Tillandsia loliacea Mart

Espécie atmosférica diminuta e rígida (figura 1.1. b), podendo assumir hábito rupícola ou epifítico. Possui caule ereto e curto, de aproximadamente 1 mm de diâmetro. Folhas com bainha largo-oval formando roseta infundibuliforme sem fitotelma.

Em seção transversal (figuras 1.5 a-f e h) observa-se que o caule de *T. loliacea* é composto por súber estratificado, córtex parenquimático e um cilindro central atactostélico (figura 1.5 a-b). O córtex é ocupado, quase integralmente, por raízes adventícias intracorticais, originadas próximo ao ápice (dado não ilustrado). O espessamento primário é inconspícuo, não sendo fácil a visualização das derivadas da endoderme meristemática no caule. Estas derivadas, de organização radiada, tornam-se visíveis apenas na conexão entre a raiz adventícia e parte do córtex do caule (figura 1.5 c). A endoderme da raiz e do caule apresentam espessamento em "O", sendo que neste último ela é menos evidente (figura 1.5 d). Ainda no córtex, foram observados idioblastos com cristais estilóides (figura 1.5 e).

O cilindro central é composto de um periciclo que é formado por duas a três camadas de células espessadas (figuras 1.5 f), feixes colaterais com calotas de fibras adjacentes ao floema (figura 1.5 f-g) e medula desprovida de espessamento nas células (figura 1.5 f).

Nas raízes o córtex externo apresenta-se esclerificado, enquanto o córtex interno, residual, é parenquimático (figura 1.5 h).

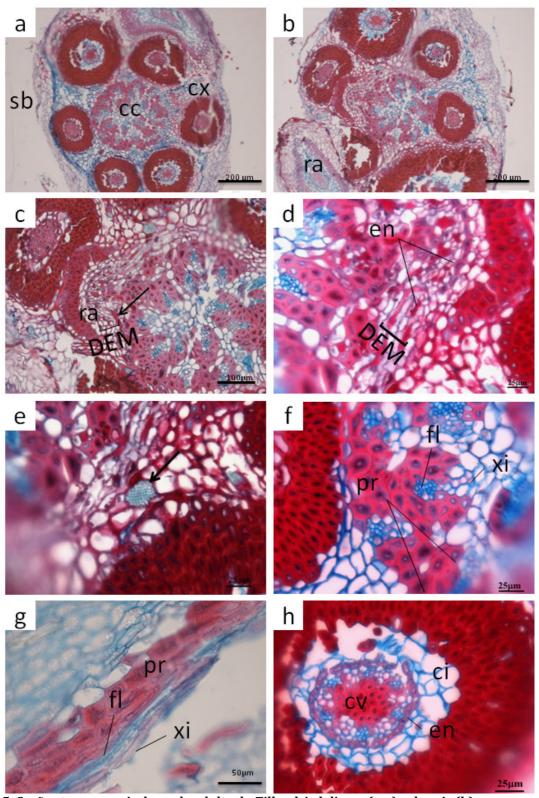


Figura 1.5: Seções transversais do caule adulto de *Tillandsia loliacea* (a-g) e de raiz (h).

Na figura a e b observa-se o aspecto geral do caule. Nota-se, também, o cilindro central (cc) do tipo atactostelo e as raízes adventícias (ra) intracorticais ocupando quase todo o córtex (cx). Na figura c, uma raiz adventícia sendo formada e as derivadas da endoderme meristemática (DEM) na conexão entre o caule e a raiz. As DEM, são vistas em detalhes na figura d. Na mesma figura a endoderme (en) da raiz com reforço em "o", figura d. Nas figuras e e f xilema (xi) e floema (fl) com calota de fibras pericíclicas (pr). As siglas correspondem a: ce: córtex externo, ci: córtex interno, sb: súber estratificado.

Tillandsia tenuifolia L.

Espécie de hábito rupícola ou epifítico (figura 1.1 c), possui caule longo, estreito e entrenós conspícuos. Folhas em arranjo espiralado formando roseta infundibuliforme sem fitotelma.

O caule longo e rizomatoso possui um súber estratificado, córtex amplo com células de paredes finas hexagonais e inúmeros idioblastos de ráfides (figura 1.6 a-b), e cilindro central do tipo atactostelo. As derivadas da endoderme meristemática (DEM) são observadas na porção mais interna do córtex nas figuras 1.6 c-d. Observa-se, também, um cilindro central amplo com um aspecto reticulado na periferia devido à presença de traços foliares, que interrompem a faixa de fibras pericíclicas (figura 1.6 c). Nas figuras 1.6 d-e, a camada mais interna do córtex, a endoderme, é parenquimática e apresenta estrias de Caspary. Na mesma figura, observam-se, também, inúmeros idioblastos com ráfides no córtex e no cilindro central (figura 1.6 e).

A presença de raízes adventícias intracorticais (figuras 1.6 f - g) é observada em regiões afastadas das regiões indiferenciadas. A raiz intracortical possui o córtex externo amplo, esclerificado, enquanto que o córtex interno é parenquimático e inconspícuo, a endoderme possui células com reforço em "0", e o periciclo parenquimático, envolvendo os cordões de xilema e floema diminutos. Mais internamente observa-se o cilindro vascular (medula) com células espessadas (figura 1.6 g).

No caule atactostélico (1.7 a-d), o periciclo é multisseriado e espessado e envolve os feixes caulinares periféricos, formados apenas de metaxilema e de metafloema. Não foram observados feixes periféricos anastomosados, formando rede complexa (figura 1.7 b).

No interior da medula, os traços foliares e os feixes caulinares (1.7 b-d) são envolvidos por fibras, as quais iniciam sua diferenciação no polo floemático (figuras 1.7 d). Todos os feixes observados são colaterais, possuindo xilema composto por células parenquimáticas e traqueídes com lumens inconspícuos, e floema com elementos de tubos crivados diminutos (figuras 1.7 b-d).

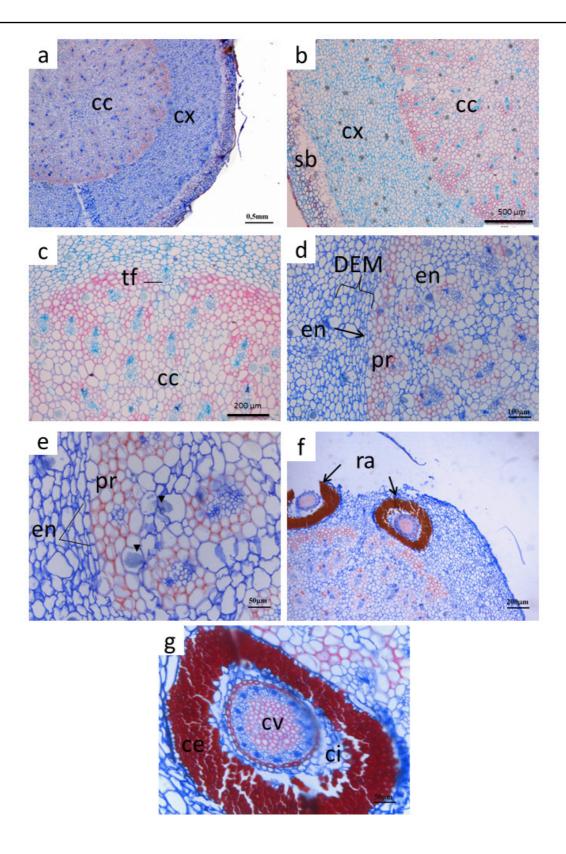


Figura 1.6: Seções transversais (a-g) do caule de Tillandsia tenuifolia.

Em **a-b**, aspecto geral, onde se nota a presença do súber (sb) estratificado, córtex (cx) e cilindro central (cc). O córtex e o cilindro central apresentam inúmeros idioblastos com ráfides (b). Na figura **c**, o traço foliar (tf) interrompe a faixa de fibras pericíclicas (pr). Em **d-e** nota-se a endoderme (en) e as duas derivadas imediatas (DEM); em **e**, observa-se a presença de estrias de Caspary. Percebe-se, também, na mesma figura o periciclo multisseriado e espessado e os idioblastos com ráfides (cabeça de seta). Na figura **f-g** raízes adventícias (ra) intracorticais já diferenciadas, com córtex externo (ce) esclerificado, córtex interno (ci) diminuto, endoderme com espessamento em "O" e medula espessada no interior do cilindro vascular (cv).

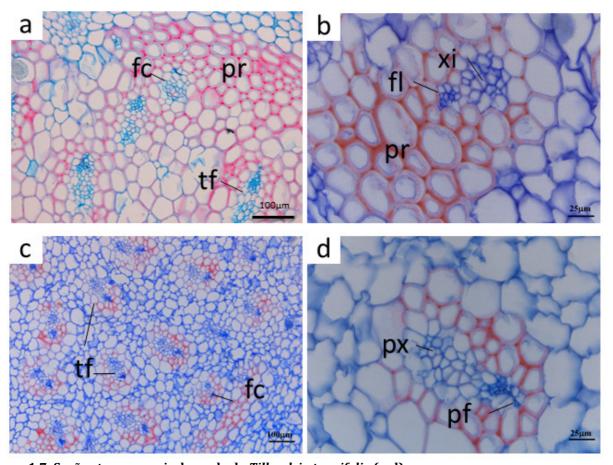


Figura 1.7: Seções transversais do caule de *Tillandsia tenuifolia* (a-d).

O caule do tipo atactostelo é visualizado em a e c com feixes caulinares colaterais (fc) na periferia e no cilindro central (b-c) e traços foliares colaterais no interior do caule dispostos de forma difusa (c-d).

Tillandsia usneoides L.

Epífita obrigatória, com caule longo, pendente de formato filiforme semicircular com aproximadamente 1 mm de diâmetro sem fitoltema (figura 1.1 d). Agravitrópica, *T. usneoides* apresenta filotaxia dística e possui ramificação dicotômica escorpióide (figura 1.8 a). Esta ramificação é oriunda de gemas laterais que se desenvolvem de maneira alternada. Assim, um novo caule com duas folhas é formado ora para a esquerda, ora para a direita e esta característica segue sucessivamente por toda a vida da planta (figura 1.8 a).

Na figura 1.8 b pode-se observar a organização geral do caule onde estão representadas as zonas de crescimento formadas pelo meristema apical caulinar. Entre dois nós consecutivos (figuras 1.8 c-d) estas zonas de crescimento podem ser detectadas facilmente, pois apresentam uma evidente concentração de figuras mitóticas.

As regiões formadas pelas zonas de crescimento estão demonstradas nas figuras 1.8 c-i. Nota-se a epiderme unisseriada coberta integralmente por tricomas peltados e mais internamente, o córtex amplo e parenquimático. A porção interna do caule é ocupada pelo cilindro central, que nesta fase possui inúmeras células em diferenciação. As figuras 1.8 e e f representam a região inferior da figura b, nessas figuras percebe-se que o cilindro central encontra-se totalmente esclerificado. É interessante ressaltar que não há uma variação gradual entre os tecidos indiferenciados e diferenciados, ou seja, abruptamente o tecido esclerificado do caule se conecta a uma gema axilar e com folhas que ainda estão em processo de diferenciação.

As figuras 1.8 g-i mostram o caule maduro, em secção transversal, onde se nota o cilindro central de *T. usneoides* composto de um tecido esclerificado, que ocupa todo o volume do cilindro. Desta maneira, os feixes colaterais diminutos são totalmente envolvidos e mergulhados por um cilindro lignificado. O córtex, como nas folhas é composto de parênquima clorofiliano e sua camada mais interna é formada pela endoderme que nesta espécie é parenquimática. Adjacente a ela, o periciclo multisseriado composto de três a quatro camadas de células é totalmente espessado e se confunde com as fibras que compõe o cilindro central (figura 1.8 h).

Os feixes colaterais apresentam-se interrompidos formando ilhotas de xilema e de floema diminutos. Na figura 1.8 i, a folha em corte transversal, é semelhante ao caule até a região vascular, pois no caule o cilindro central é esclerificado com feixes diminutos imersos e a folha possui três feixes colaterais de floema e xilema diminutos sem esclerificação.

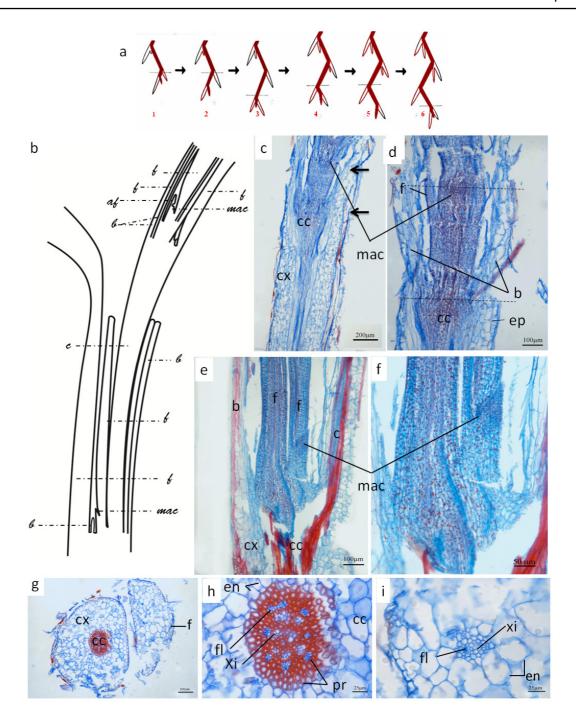


Figura 1.8: Representação esquemática (a-b), seções longitudinais (c-f) e transversais (g-i) de *T. usneoides*.

Em ${\bf a}$, o padrão de desenvolvimento dicotômico do caule. Em ${\bf b}$, representação das zonas de crescimento, onde se nota o meristema apical caulinar (mac), a bainha (b), as folhas (f) e os caules (c), oriundos do crescimento dicotômico. Em ${\bf c}$, seção longitudinal das regiões em atividade meristemática, sendo o cilindro central (cc) reduzido e com células nucleadas e o córtex (cx) amplo já diferenciado com células parenquimáticas isodiamétricas. Observa-se em ${\bf c}$ e ${\bf d}$ o meristema apical caulinar e a bainha que envolve todo o caule. Ainda nas figuras ${\bf e}$ e ${\bf f}$ observam-se regiões diferenciadas ao lado de regiões com atividade meristemática, esta última sendo constituída pelo meristema apical caulinar e folhas em estágio de diferenciação. Em seções transversais (${\bf g}$ - ${\bf i}$), nota-se o caule semicircular ao lado de uma folha (f), percebe-se que a principal diferença anatômica é constituída pelo sistema vascular, que no caule é composto de um cilindro esclerificado com floema e xilema diminutos e na folha feixes colaterais sem apresentar células espessadas ao redor. As siglas correspondem a: af: ápice foliar, en: endoderme, fl: floema, .

Um resumo dos caracteres será encontrado ao final da descrição de todos os gêneros em forma de tabela. De forma resumida os caracteres morfológicos e anatômicos encontrados nas espécies de *Tillandsia* constam na tabela 1.3.

Tabela 1.3: Caracteres morfoanatômicos e seus respectivos estados em *Tillandsia*. A sigla nd corresponde

a dados não determinados.

a dados não determinados.				
	Tillandsia geminiflora Brongn	Tillandsia loliacea Mart	Tillandsia tenuifolia L.	Tillandsia usneoides L.
Ápice caulinar: abobadado (0), cônico (1), levemente cônico (2), subplano (3), plano-abobadado (4), plano (5).	0	nd	nd	nd
Caule: longo (0) curto (1)	1	1	0	0
DEM (derivadas da endoderme meristemática): ausência (0), presença (1), presença na conexão caule raiz (2)		2	1	0
Endoderme do caule: parenquimática (0), em U (1), em O (2)	0	2	0	0
Espessamento: evidente (0), não evidente (1)	0	1	0	1
Filotaxia: dística (0), espiralada (polística) (1)	1	1	1	0
Forma de vida: estritamente rupícola (0), estritamente epifítico (1), estritamente terrícola (2), rupícola+ epifítica+ terrícola (3), rupícola+ epifítica (4)	1	4	4	1
Padrão morfológico da roseta: infudibuliforme (0), tubular (estreito-infundibuliforme) (1)	0	0	0	nd
Periciclo: parenquimático (0), espessado (1)	0	1	1	1
Nós e entrenós conspícuos: ausência (0), presença (1)	0	0	1	1
Raízes intracorticais origem: próximo ao ápice (0), região mediana (1), não possui (2)		0	1	2
Tipo de feixes Traços/feixes caulinares: colateral (0) , colateral e compostos aparentemente concêntricos (1)	0	0	0	0
Tipos de idioblastos: ráfides (0), estilóides (1) ausentes (2).	0	1	1	2

Vriesea Lindl.

As espécies de *Vriesea* podem ser epífitas, rupícolas ou terrícolas São ervas com folhas inteiras amplas de filotaxia espiralada. O caule é ereto, geralmente curto e espessado de porte variável. O formato da roseta varia de infundibuliforme a estreito-infundibuliforme (figura 1.9).



Figura 1.9: Hábitos das espécies *Vriesea gigantea* (a), *V. minarum* (b), *V. olighanta* (c) e *V. stricta.* (d). Ilustrações feitas por Ubirajara Gomes de Mello Neto.

Vriesea atropupurea Silveira

V. atropupurea possui o hábito rupícola com roseta infundibuliforme de filotaxia espiralada com fitotelma desenvolvido. O caule é ereto, curto e rizomatoso com aproximadamente cinco centímetros de comprimento e três centímetros de diâmetro.

Com relação à anatomia, o ápice do caule de *V. atropupurea* possui forma de abóbada (figuras 1.10 a-b). Este formato pode ser atribuído, em parte, às derivadas da endoderme meristemática que se originam a partir da endoderme (inicial endodérmica) e se dividem inúmeras vezes no interior do córtex com mais intensidade em regiões mais distantes do meristema apical caulinar (figuras 1.10 c a e). Mais internamente, a presença do periciclo é evidente por suas células apresentarem características peculiares como a densa coloração e os núcleos alongados. Na sua adjacência, e visualizada pela presença do periciclo, observam-se as iniciais endodérmicas com paredes delgadas, lumen amplo e núcleos arredondados (figuras 1.10 e), apenas perceptíveis neste aumento. Ainda na figura e, observa-se também, outra característica importantíssima, o perfeito padrão radiado das derivadas da endoderme meristemática e a sua descontinuidade com as células do periciclo, demonstrando a origem distinta destes tecidos isto é, o periciclo de origem procambial e a endoderme do meristema fundamental.

Em *V. atropurpurea* o caule maduro possui um súber estratificado e um córtex parenquimático estreito em relação à medula (figura 1.10 f). O sistema vascular é do tipo atactostelo com feixes distribuídos ao acaso no interior do cilindro. Na região pericíclica a concentração de feixes aumenta o que evidencia ser a região formadora de novos feixes (figuras 1.10 f-g). Nesta região limite, nota-se a presença de dois tecidos importantes no corpo primário da planta: a endoderme e o periciclo (figura 1.10 h e 1.11 a). A concentração de feixes na região pericíclica – evidencia ser ele o formador dos feixes caulinares.

A endoderme diferenciada apresenta espessamento em "0", na região afastada do ápice, a natureza deste espessamento não foi verificada (figura 1.11 a) e o periciclo é constituído de três a quatro camadas que envolvem os feixes colaterais

periféricos, formados por ele em fases anteriores de desenvolvimento, como se vê na figura 1.11 a.

No cilindro central, ocorrem traços foliares e feixes caulinares (figuras 1.10 h e 1.11 a-d). Os feixes caulinares (metaxilema e metafloema) são oriundos da atividade centrífuga do periciclo, e ocupam a região perimedular (figura 1.10 g-h e 1.11 a e em detalhe na figura 1.11 b). Já os feixes que constituem os traços foliares são originados do procâmbio, ou seja, originados durante a formação do primórdio foliar pela sinalização da diferenciação dos tecidos vasculares; ocupam as porções mais internas da medula (figuras 1.11 c-d). Estes feixes possuem além de metafloema e metaxilema, possuem protoxilema e protofloema. Os feixes caulinares de origem procambial e os de origem pericíclica são formados apenas de metaxilema e metafloema. Outra característica é o tamanho maior do lumen da traqueíde do xilema formado a partir do periciclo (figura 1.11 b) quando comparado ao elemento traqueal do traço foliar. Todos os feixes, observados nas regiões diferenciadas, apresentaram fibras ao seu redor, sendo as fibras dos traços foliares e dos feixes caulinares originadas do procâmbio, e dos feixes caulinares da região pericíclica originadas do periciclo. Além da produção de feixes periféricos, o periciclo é responsável pela formação de raízes adventícias intracorticais (figura 1.11 e). Estas raízes possuem córtex externo espessado, córtex interno parenquimático, endoderme com reforço em "O" e periciclo espessado (figuras 1.11 e-g). Ocorrem diversos polos de floema e de xilema (este, com dimensões semelhantes a das fibras) a medula também se encontra espessada (figuras 1.11 ef). Os tecidos vasculares da raiz se conectam ao do caule da mesma maneira que se observa a continuidade da endoderme do caule com a endoderme da raiz. As derivadas da endoderme meristemática também são contínuas (figuras 1.11 f-g). As raízes nesta espécie possuem origem na região mediana do caule.

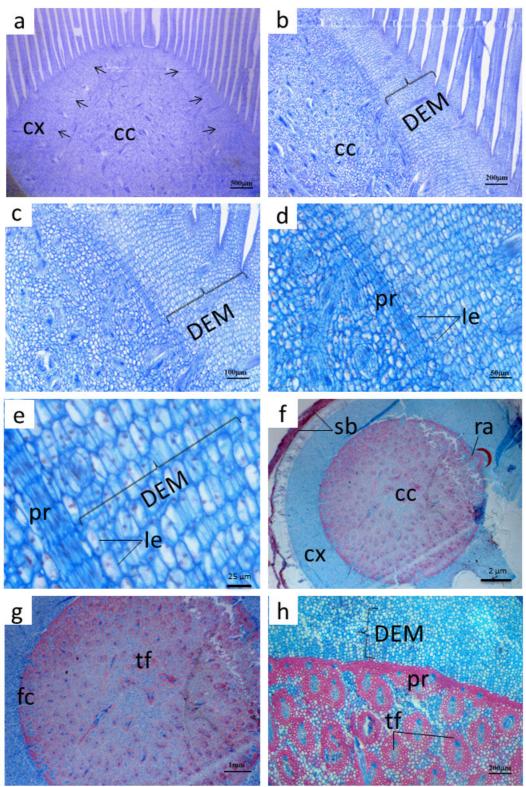


Figura 1.10: Seções longitudinais (a-e) e transversais (f-h) do caule de *Vriesea atropurpurea*. No ápice em forma de abóbada (a), setas mostram a direção das divisões das derivadas da endoderme meristemática (DEM) mostrando bem o limite do cilindro central (a-c). Na figura b, observa-se o cilindro central (cc) e as derivadas da endoderme meristemática, melhor vistas em c, o tracejado marca o limite entre o córtex (cx) e o cilindro central (cc). Na figura d, o periciclo (pr) em divisão e a inicial endodérmica (ie), melhor visualizada na figura e. Em f-h nas seções transversais do caule maduro, observa-se do exterior para o interior do caule: o súber (sb) estratificado, o córtex e o cilindro central do tipo atactostelo (g-h) cilindro central com uma concentração de feixes caulinares (fc) na periferia e traços foliares (tf) distribuídos ao acaso entre feixes caulinares no interior da medula Na figura h percebem-se as derivadas da endoderme meristemática e o periciclo. As siglas correspondem a: ra: raiz adventícia.

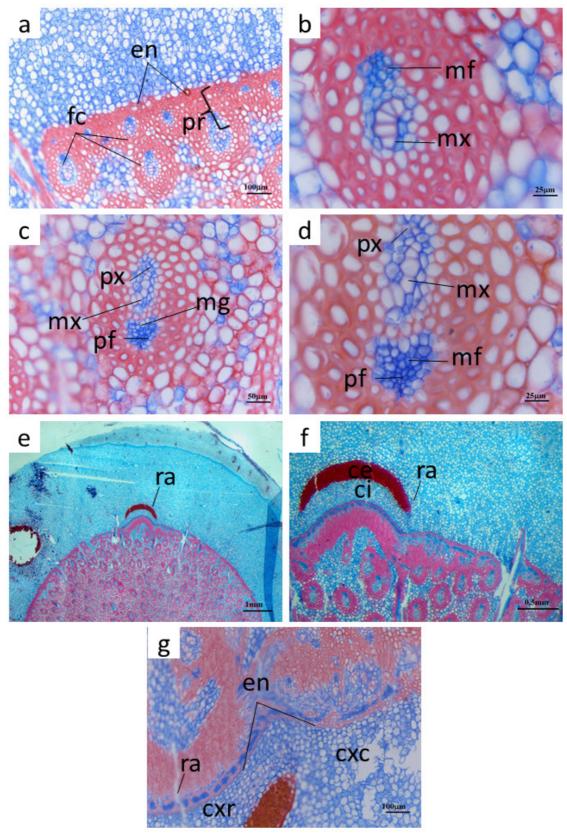


Figura 1.11: Seções transversais (a-g) do caule de Vriesea atropurpurea.

A endoderme (en) e o periciclo (pr) estão com paredes espessadas e percebe-se a formação de feixes caulinares no periciclo (a-b). Na figura b, feixe caulinar periférico de origem pericíclica e nas figuras c e d, o traço foliar envolvido por fibras e em detalhe o protoxilema (px) e o protofloema (pf). Nas figuras e-f, uma raiz adventícia (ra) intracortical já diferenciada com córtex externo (ce) esclerificado, córtex interno (ci) parenquimático. Na figura g, observa-se a endoderme da raiz em continuidade com a endoderme do caule, e observa-se também, a continuidade do córtex da raiz (cxr) com o córtex do caule (cxc)

Vriesea crassa Mez

Espécie rupícola ou epífita, de médio a grande porte com roseta infundibuliforme e fitotelma desenvolvido. O caule é curto, ereto e rizomatoso (figura 1.9).

O exemplar coletado estava em fase reprodutiva e possuía um escapo terminal, por isso, não houve a possibilidade de analisar o seu ápice vegetativo.

Abaixo do escapo, na região outrora ocupada pelo ápice vegetativo, em corte transversal, pode-se observar o padrão básico do caule, sendo formado por um súber estratificado, um córtex amplo com ráfides e um cilindro central ocupado por diversos feixes caulinares e traços foliares (figura 1.12 a-d). Em maior aumento, verifica-se que o córtex é organizado em um padrão radiado e próximo ao complexo de feixes que correm longitudinalmente, há uma camada clara (figura 1.12 b). A presença da camada clara (lúcida) indica uma alta taxa de divisão celular nesta área (figura 1.12 c).

Adjacente a esta camada, estão os feixes produzidos pelo periciclo, constituídos de metaxilema e metafloema (figura 1.12 c-f).

Em corte transversal (figuras 1.12 d-g), esta mesma camada lúcida é percebida em áreas em estágio intermediário de diferenciação, região que corresponde à região mediana do caule. Percebe-se nesta área, uma intensa atividade meristemática, na qual é verificada a presença de células menores, que estão em intensa divisão na região entre o córtex e o cilindro central (figura 1.12 d-e).

Pode-se notar que as células estão sendo produzidas em sentido centrífugo e centrípeto (figura 1.12 d-e). Os produtos da atividade celular do periciclo são feixes, denominados de feixes caulinares, que possuem menos elementos vasculares, (figuras 1.12 f) quando comparados aos produzidos pelo procâmbio (figuras 1.12 g), além disso, os feixes caulinares sempre ocupam a periferia do cilindro central: a região pericíclica (figuras 1.12 f, h e 1.13 a). Já as células que estão sendo produzidas centrifugamente, são oriundas da inicial endodérmica e possuem um padrão de divisão periclinal o que dá o aspecto radiado do córtex caulinar. Esta

característica marcante difere das células produzidas pelo periciclo que possui divisões irregulares. A camada ocupada pela endoderme e pelo periciclo é interrompida por traços foliares, como se vê na figura 1.12 f.

Nas regiões maduras do caule (figura 1.12 h), o córtex se mantém parenquimático e é ocupado por raízes intracorticais e traços foliares. Observa-se que nesta espécie ocorre uma modificação na conformação dos feixes periféricos que se anastomosam e esta concentração de feixes indica a origem diretamente do periciclo (figuras 1.12 h e 1.13 a-d). Na figura 1.13 b, observa-se o floema em posição lateral e não oposta ao xilema, este feixes compõem o plexo periférico. Nesta porção, observa-se também que a endoderme e parte de suas derivadas estão com as paredes espessadas (figura 1.13 b). Ora esta camada apresenta-se lúcida (figura 1.12 c-d), ora apresenta-se espessada (figura 1.12 b). As raízes desta espécie também se diferenciam totalmente ainda no caule (figuras 1.12 h e 1.13 a, c, e). Possuem córtex externo esclerificado, córtex interno parenquimático e radiado, endoderme em U, com 49 a 60 polos de protoxilema e uma medula não esclerificada (figura 1.13 e).

Os feixes encontrados em *V. crassa* variam de traços foliares colaterais (figura 1.13 f) e feixes caulinares que possuem padrão colateral no interior da medula a compostos aparentemente concêntricos localizado principalmente na periferia (figura 1.13 f-g)

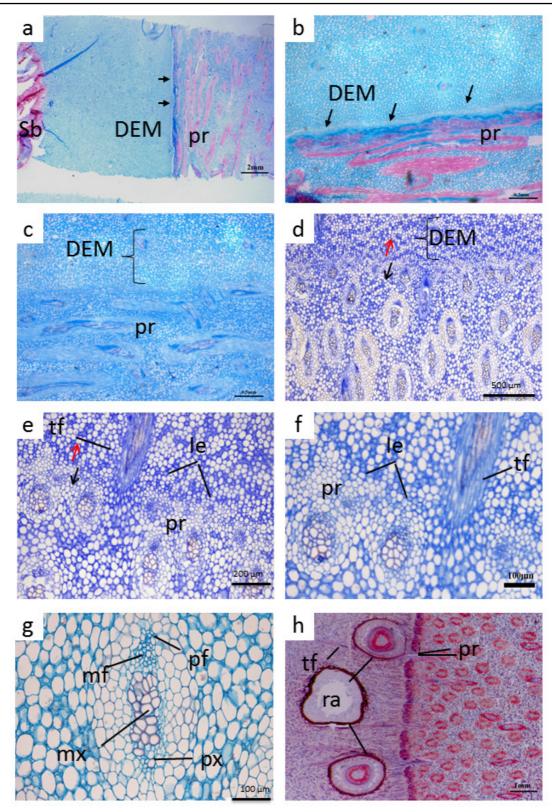


Figura 1.12: Seções longitudinais (a-c) e transversais (d-h) do caule de *Vriesea crassa*.

Em **a-c** observam-se o súber (sb) estratificado, as derivadas da endoderme meristemática (DEM); as setas fechadas indicam a camada lúcida adjacente ao periciclo (pr). Em seções transversais do caule imaturo (**d-g**) observa-se a região de atividade meristemática do periciclo (seta preta) que indica à direção da produção de tecidos produzidos e na região da inicial endodérmica (seta vermelha) indicando a direção da formação das derivadas da endoderme meristemática, respectivamente figuras **d** e **e**. Na figura **f**, observa-se a inicial endodérmica e os feixes caulinares periféricos na região pericíclica, na figura **g**, observa-se um traço foliar com protoxilema (px) e protofloema (pf). Região madura do caule (**h**), na qual as células da camada lúcida as derivadas da endoderme meristemática são espessadas e observam-se raízes adventícias (ra) intracorticais.

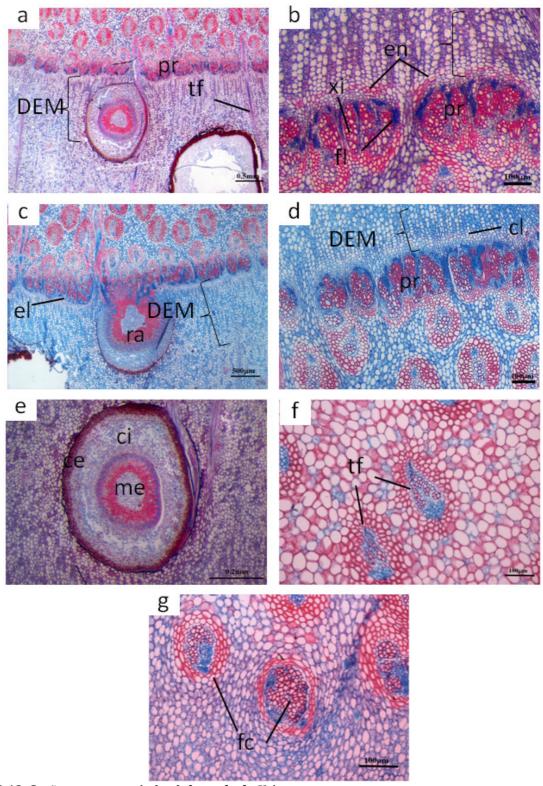


Figura 1.13: Seções transversais (a-g) do caule de Vriesea crassa.

Como se observou na figura **1.12 h**, em **a-b**, a camada lúcida (cl) formada derivadas imediatas da endoderme meristemática que podem ser espessadas nas primeiras camadas (**b**), ou parenquimáticas com se observa nas figuras **c-d**. Ainda nessas figuras, é notável a constatação da origem dos feixes caulinares da região pericíciclica (concentração de feixes junto ao periciclo) Ocorre a formação de inúmeras raízes intracorticais que se diferenciam ainda no interior do caule (**a**, **c**, **e**). As raízes (**e**) possuem um padrão básico: córtex externo (ce) com esclereídes, córtex interno (ci) parenquimático e radiado, polos de xilema e floema envolvidos por fibras e medula (me) parenquimática. Os traços foliares (tf) em (**f**) e os feixes caulinares (fc) em (**g**) apresentam fibras ao seu redor.

Vriesea gigantea Mart. ex Schult. f.

Uma das maiores espécies analisadas do gênero *Vriesea*. Planta epífita com caule curto, roseta infundibuliforme e fitotelma bem desenvolvido (figura 1.9 a).

Em corte longitudinal, o caule jovem de *V. gigantea* apresenta ápice plano abobadado (figura 1.14 a-b), pois há uma atividade meristemática moderada próximo ao ápice e intensa na região onde se inicia a expansão do mesofilo da folha (figura 1.14 b). A alta atividade é evidenciada pela radiação conspícua do córtex caulinar (figura 1.14 c), vista em detalhes na figura 1.14 d. Ainda, na figura 1.14 d, verificam-se as derivadas da endoderme meristemática, oriundas da inicial endodérmica, com divisão periclinal constante. Ao seu lado uma região composta por inúmeros feixes periféricos imaturos, oriundos do periciclo.

Em corte transversal (figura 1.14 e), observa-se o limite entre o córtex e o cilindro central marcado pelas células pequenas e mais densamente coradas do periciclo (figura 1.14 f). Nesta mesma figura, verificam-se vários traços foliares atravessando a camada limitante do córtex e do cilindro central (figura 1.10 e-f).

A inicial endodérmica pode ser observa na figura 1.14 g-h, bem como, suas derivadas imediatas. Na figura 1.15 a, o periciclo forma feixes caulinares periféricos formando um aglomerado, com metaxilema e metafloema (detalhe na figura 1.15 b).

O estelo do tipo atactostelo possui feixes caulinares e traços foliares (figura 1.15 b, c, respectivamente). Os traços foliares são compostos de protoxilema e protofloema além de metaxilema e metafloema (1.15 c).

As raízes intracorticais são formadas na porção mediana do caule (figura 1.15 d), e a continuidade entre os seus tecidos e do caule é perfeitamente observada nas figuras 1.15 d e "e". e verifica-se que a endoderme da raiz é contínua com a endoderme do caule. Em regiões basais (1.15 f-g), observa-se a endoderme e o periciclo multisseriado com paredes espessadas envolvendo os feixes caulinares produzidos por ele e, nota-se também, os feixes caulinares e traços foliares localizados no interior do caule totalmente envolvidos por fibras. As raízes (1.15 d-f), que nesta espécie iniciam sua diferenciação em porções jovens do caule possuem córtex externo lignificado, endoderme com reforço em "O" e medula lignificada.

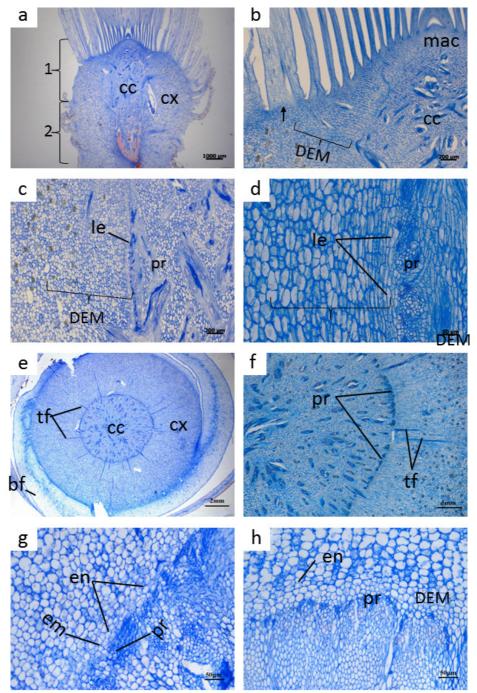


Figura 1.14: Seções longitudinais (a-d) e transversais (e-h) do caule de Vriesea gigantea.

Em a observa-se o aspecto geral do caule com o córtex (cx) e o cilindro central (cc), indistintos na região do ápice (1), porém distintos na base do caule (2) devido à lignificação do cilindro central. Nesta mesma figura, observa-se que região apical do caule possui o formato de abóbada seguido de uma depressão. Na figura b, nota-se que o aspecto abobadado-plano, é dado por uma maior taxa de divisão na região abaixo da folha que está se expandindo (seta). O padrão radiado do córtex pode ser visualizado, em maiores detalhes, nas figuras c e d. Na figura c, que corresponde à região plana, observa-se a região pericíclica (pr) formada por elementos vasculares com floema (mais densamente corado) ainda em diferenciação, vista em detalhe, na figura d. Ainda na figura d, observa-se o córtex radiado com divisões periclinais oriundas da inicial endodérmica (ie). Na figura e, verifica-se que o córtex apresenta-se amplo em relação ao cilindro central, nota-se também, os traços foliares (tf) que surgem na região perimedular e atravessam perpendicularmente parte do córtex. Na figura f, a região pericíclica apresenta-se interrompida pelos traços foliares e verifica-se, também, que os feixes estão distribuídos de forma difusa (atactostelo). O padrão radiado é mais uma vez demonstrado na figura g e h, com o periciclo em atividade meristemática enquanto que a endoderme já está em uma fase acima de diferenciação, sendo parenquimática e suas derivas compondo uma camada lúcida.

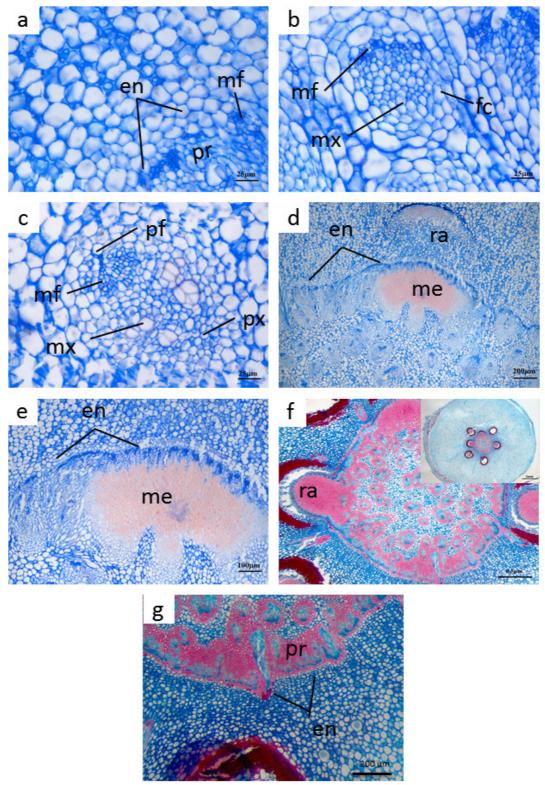


Figura 1.15: Seções transversais (a-h) do caule de Vriesea gigantea.

Na figura **a**, o periciclo (pr) está em plena atividade produzindo feixes caulinares que nesta fase se apresentam apenas com metafloema (mf). Ainda na região pericíclica, em porções mais diferenciadas, observam-se os feixes caulinares com metaxilema (mx) e metafloema em (**b**). Na figura **c**, o traço foliar (tf) apresenta-se em corte transversal com protoxilema (px), protofloema (pf), além de metaxilema e metafloema. A continuidade dos tecidos pode ser vista na figura **d**, onde a endoderme da raiz é a mesma endoderme do caule. Em **e**, a medula (me) da raiz apresenta-se totalmente esclerificada. Nas figuras **f-g**, observam-se, o caule com tecidos diferenciados, feixes caulinares (fc) e traços foliares envoltos por fibras. A concentração de feixes na periferia indica sua origem pericíclica.

Vriesea minarum L. B. Sm

Planta rupícola, endêmica de afloramentos ferríticos, possui um caule curto, ereto, com roseta infundibuliforme e fitotelma desenvolvido.

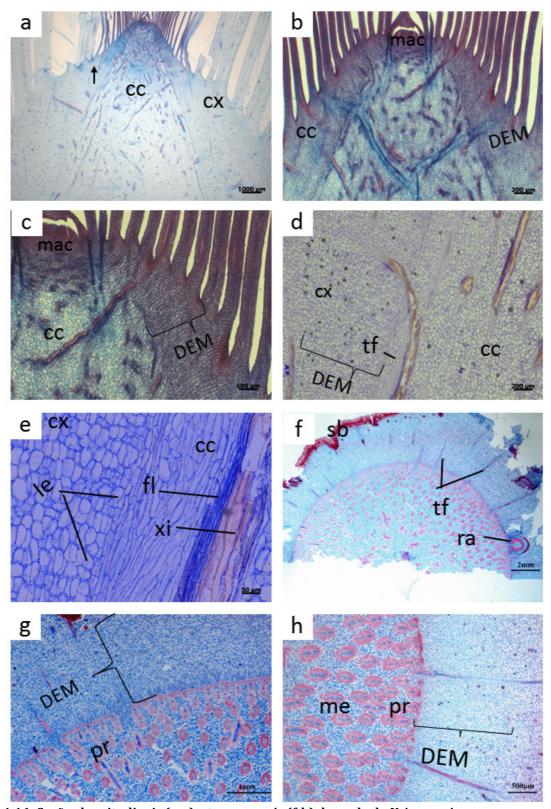
O ápice de *V. minarum* possui o formato cônico (figura 1.16 a-c e). Na região apical percebe-se o limite entre o córtex e o cilindro central, no entanto, afastandose do ápice ele torna-se indistinto na região mediana. O formato cônico do caule é acompanhado pelo limite entre o córtex e o cilindro central (figura 1.16 a). Este formato é consequência do local e da taxa de divisões das células das derivadas da endoderme meristemática, que compõem o córtex. Do ápice até região mediana (figura 1.16 a), as células que formam o córtex são adicionadas imediatamente abaixo do ápice (figuras 1.16 b-c) e esta adição aumenta, gradativamente, ao se afastar do ápice na região onde a folha se expande.

Na região mediana, (figura 1.16 d), verifica-se a presença de um traço foliar e das derivadas da endoderme meristemática, perfeitamente radiadas, em maiores detalhes na figura 1.16 e. Ainda na figura 1.16 e, observa-se a inicial endodérmica e a região pericíclica com floema e xilema em vista longitudinal; nota-se que não há protoxilema.

O córtex é mais estreito que o cilindro central (figura 1.16 f-h e 1.17 a-g) e do exterior para o interior do caule observam-se o súber, o córtex formado de células parenquimáticas, traços foliares que interrompem a endoderme e o periciclo espessado (figura 1.16 f). Nesta região o periciclo envolve os feixes periféricos de fibras onde se nota uma alta concentração de feixes, indicando ser pericíclica a origem destes feixes (figura 1.16 f-h e 1.17 a-b). Em 1.16 g, percebem-se os feixes periféricos formando um cordão vascular contínuo e externamente, verificam-se as células radiadas formadas pela endoderme em fase meristemática, vistas em mais detalhes nas figuras 1.16 h e 1.17 a. O periciclo apresenta de três a quatro camadas de células espessadas que incluem muitos feixes caulinares colaterais compostos de metaxilema e metafloema. Desta forma, é notável a formação de feixes na região pericíclica (pela concentração de feixes na periferia). Na figura 1.17b, verifica-se que o córtex é ocupado por raízes intracorticais, que se originam do periciclo na

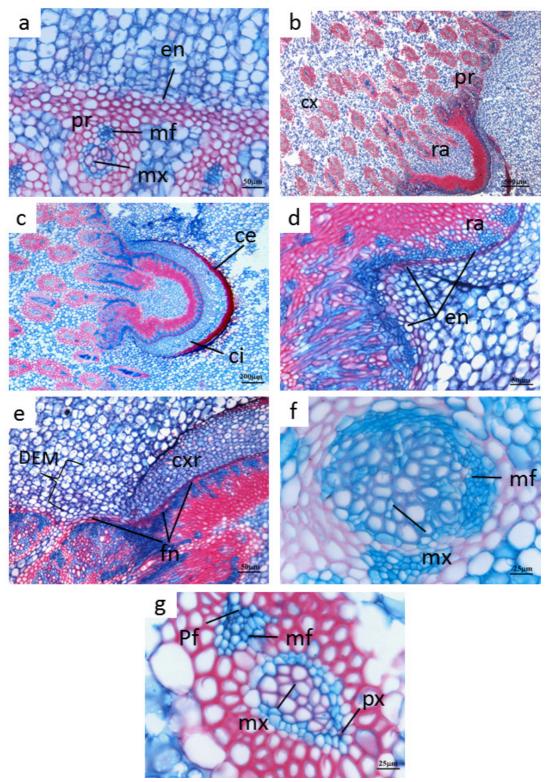
região mediana do caule. Os tecidos da raiz são contínuos com os tecidos do caule, nota-se que a endoderme da raiz em "O" é contínua com a endoderme do caule (figuras 1.17 b-d). Na figura 1.17 e, o córtex radiado da raiz tem a mesma origem das células radiadas do córtex, a inicial endodérmica.

O atactostelo nesta espécie possui além dos feixes caulinares e traços foliares colaterais, que ocupam a medula do cilindro central, f observa-se um feixe com xilema e floema difusos, denominado neste estudo de compostos aparentemente concêntricos (figura 1.17). Estes feixes foram observados na região pericíclica próximos às raízes, constituído somente de metaxilema e metafloema. Na figura 1.17 g, um feixe constituído de um traço foliar perfeitamente colateral com protofloema e protoxilema, além de metaxilema e metafloema.



Figuras 1.16: Seções longitudinais (a-e) e transversais (f-h) do caule de *Vriesea minarum*.

Em a observa-se o aspecto geral do caule com o córtex (cx) e o cilindro central (cc), distintos desde a região do ápice. Nesta mesma figura, observa-se que região apical do caule possui o formato cônico, a maior taxa de divisão é a partir do início da expansão foliar (seta). Na figura **b**, nota-se que o aspecto cônico é moldado pelas divisões periclinais das derivadas da endoderme meristemática (DEM). O padrão radiado do córtex (cx) pode ser visualizado, em maiores detalhes, nas figuras **c-e**. Em **f**, observa-se o córtex estreito em relação ao cilindro central do tipo atactostelo e os traços foliares (tf) que atravessam perpendicularmente parte do córtex. Na figura **g e h**, o padrão radiado é mais uma vez observado. As siglas correspondem a: fl: floema, ie: inicial endodérmica, me: medula, pr: periciclo, ra: raiz adventícia, xi: xilema.



Figuras 1.17: Seções transversais (a-g) do caule de Vriesea minarum.

Na figura **a**, observam-se o periciclo (pr) e a endoderme (en) já diferenciados, o periciclo espessado possui de três a quatro camadas de células menores e com padrão irregular se comparadas com as células corticais oriundas de endoderme. Ainda na região pericíclica observam-se os feixes caulinares sendo originados (**a-b**). Na Figura **b-c**, raiz adventícia (ra) intracortical com córtex interno (ci) parenquimático e córtex externo (ce) espessado. A continuidade dos tecidos pode ser vista nas figuras **d-e**, onde a endoderme da raiz é a mesma endoderme do caule. Os feixes caulinares compostos (aparentemente concêntricos) com apenas metaxilema (mx) e metafloema (mf) em (**f**) e observam-se os traços foliares (tf) constituídos de protoxilema (px), protofloema (pf), metaxilema e metafloema em (**g**) todos envoltos por fibras. A sigla corresponde a: cxr: córtex da raiz.

Vriesea oligantha (Baker) Mez.

Planta epífita ou rupícola de caule curto, porte médio, com roseta estreitoinfundibuliforme e fitotelma pouco desenvolvido (figura 1.9).

O ápice do caule de *V. oligantha* é de formato abobadado (figura 1.18 a), este formato é devido ao tecido parenquimático cortical que é adicionado, por divisões periclinais, de maneira homogenia, ou seja, com a taxa de divisão celular constante. As células radiadas são facilmente visualizadas, mas, não há um limite claro entre o córtex e o cilindro central (figura 1.18 b). Verifica-se que as divisões periclinais ocorrem imediatamente abaixo e lateralmente do meristema apical caulinar. Em seção transversal, em regiões mais diferenciadas do caule (figura 1.18 d), observase o limite entre o córtex e o cilindro central do tipo atactostelo. Na camada limitante, entre o córtex e o cilindro central ocorre a formação de raízes adventícias intracorticais que se formam na região mediana do caule (figuras 1.18 d-f).0 córtex externo e interno da raiz é parenquimático e radiado. O cilindro vascular apresenta cordões de tecidos vasculares intercalado de floema e de xilema em diferenciação e uma medula parenquimática (figura 1.18 f). Da mesma forma que a raiz intracortical o córtex do caule, também se apresenta radiado (figura 1.18 g), o caule em corte transversal apresenta uma radiação muito acentuada (figura 1.18 g-h). Estas células possuem muitos grãos de amido e são tangencialmente maiores e aumentam de tamanho em direção á periferia do caule (figura 1.18 g). A endoderme e o periciclo marcam o limite entre o córtex e o cilindro central (figura 1.18 g). As células do periciclo (figura 1.18 h) apresentam um tamanho menor e possuem padrão irregular, adjacente a estas células os feixes caulinares periféricos produzidos pelo próprio periciclo (figuras 1.18 g-h). Além dos feixes caulinares periféricos, o caule do tipo atactostelo possui traços foliares com protoxilema, metaxilema, protofloema e metafloema (figura 1.19 a). Na porção madura do caule (figura 1.19 b-g) as raízes intracorticais ocupam parte do córtex. Na figura 1.19 c, observa-se a raiz adventícia intracortical ao lado das derivadas da endoderme meristemática. Nesta mesma região, observam-se as DEM, a região pericíclica e os feixes periféricos (figura 1.19 d). Em regiões mais diferenciadas, dentro do cilindro, os traços foliares e os feixes caulinares passam a possuir uma calota de fibras que os envolve inteiramente (figuras 1.19 e-f). As raízes diferenciadas possuem córtex externo esclerificado e medula com células totalmente espessadas (figura 1.19 g).

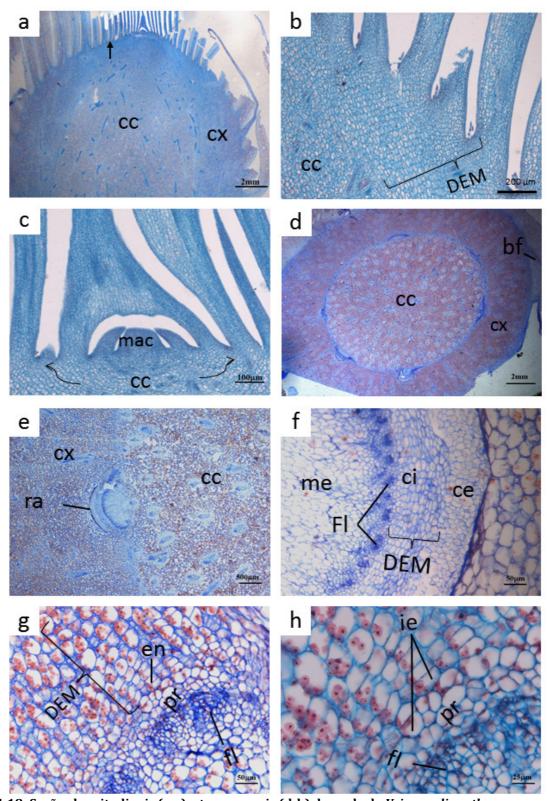


Figura 1.18: Seções longitudinais (a-c) e transversais (d-h) do caule de *Vriesea oligantha*.

Em a, notam-se o aspecto geral do caule com formato de abóbada, o córtex (cx) e o cilindro central (cc) com limite indistinto. As derivadas da endoderme meristemática (DEM) com radiação em (b). O início da atividade meristemática das células derivadas abaixo do meristema apical caulinar (mac) podem ser observadas, as setas indicam a direção da divisão celular das DEM (c). Seção transversal do caule (d) com grãos de amido, raízes adventícias (ra) intracorticais, DEM, endoderme (en) e periciclo (pr). Em f-h, observase o floema (fl) já diferenciado na região do periciclo e o xilema ainda em diferenciação, tanto na raiz quanto no caule. Em g-h observam-se as derivadas da endoderme meristemáticas perfeitamente radiadas, a endoderme e o periciclo; os últimos, em detalhe, na figura h.

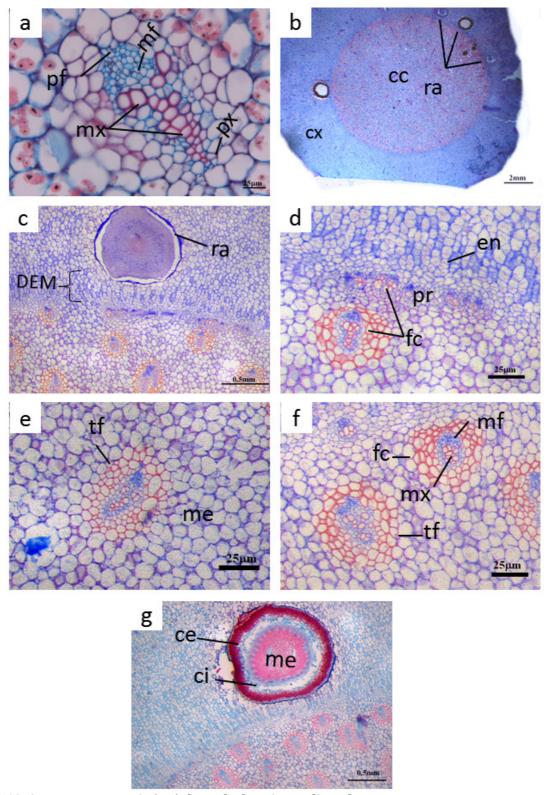


Figura 1.19: Seções transversais (a-g) do caule de Vriesea oligantha.

Em a, observa-se em detalhe um traço foliar com protoxilema (px), protofloema (pf), metaxilema (mx) e metafloema (mf).O caule maduro em (a-g) possui um cilindro distinto do córtex que possui raízes adventícias (ra) intracorticais próximas ao cilindro central, tendo as DEM como limite. Em d, observa-se a endoderme parenquimática e, os feixes caulinares (fc) periféricos sendo ainda produzidos pelo periciclo (pr). Em e e f, um feixe constituído de traço foliar (tf) e um feixe caulinar formado apenas de metaxilema e metafloema ambos com calotas de fibras. Em g, raiz completamente diferenciada. As siglas correspondem a: ce: córtex externo, ci: córtex interno e me: medula.

Vriesea segada-viannae L.B. Sm.

Epífita com caule curto, ereto de médio porte e de roseta estreito infundibuliforme com fitotelma pouco desenvolvido.

O padrão apical é semelhante ao de *Vriesea gigantea* plano abobadado, que se deve, em parte, a atividade meristemática da endoderme no desenvolvimento do córtex com atividade moderada próximo ao meristema apical caulinar (figura 1.20 a-b). Em Vriesea segadas-viannae observam-se raízes adventícias intracorticais e a produção de células derivadas da endoderme com atividade meristemática (figuras 1.20 c-d). Ainda há a continuidade de endoderme da raiz com a endoderme do caule (figura 1.20 d). Em corte transversal (figuras 1.20 e-f) observam-se também inúmeras raízes, o córtex e o cilindro central com feixes dispostos aleatoriamente, sendo um estelo do tipo atactostelo (figura 1.20 e-h). Apesar da endoderme inconspícua (figuras 1.20 g-h), ela é delimitada pela região pericíclica que possui células menores. Abaixo destas células, surge uma faixa de tecidos que correm paralelos a endoderme (plexo periférico - figura 1.20 g) que constituirá a vascularização da raiz. Além do plexo, percebe-se que os feixes caulinares da região pericíclica estão envoltos por fibras. Seguindo o limite da região pericíclica, figura 1.21 i, percebe-se a perfeita continuidade entre a endoderme da raiz (seta dois) e a endoderme caulinar (seta um); a endoderme, contínua, apresenta na raiz espessamento em 0 e no caule em U (figuras 1.21 i-k). As raízes intracorticais são formadas na região mediana.

Além dos feixes formados pelo periciclo observam-se os feixes do cilindro central os traços foliares e os feixes caulinares. Nota-se uma raiz adventícia intracortical ainda em fase de diferenciação (figura 1.21 n).

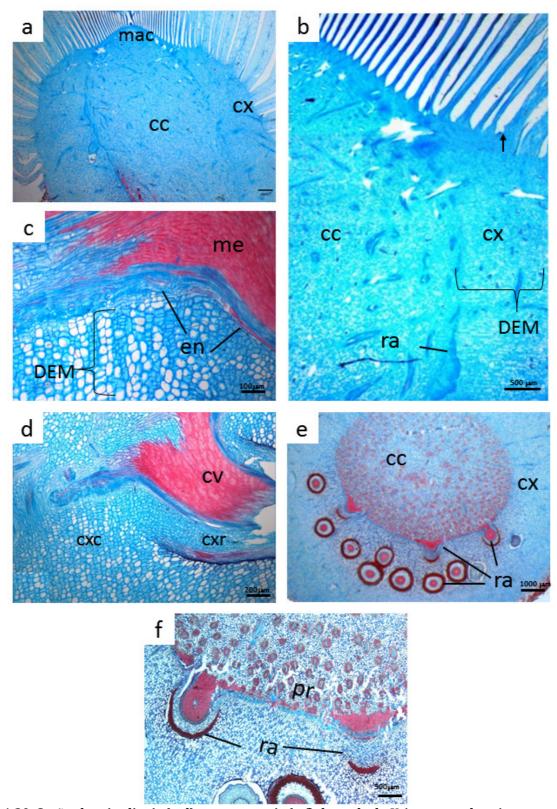


Figura 1.20: Seções longitudinais (a-d) e transversais (e-f) do caule de *Vriesea segadas-viannae*. Em a e b, aspecto geral do caule, onde se observa o cilindro central (cc) e o córtex (cx) distintos; em b as derivadas da endoderme meristemática (DEM) na mesma direção da folha que está iniciando a expansão do mesofilo (seta fechada). Mais abaixo raízes adventícias (ra) intracorticais, vista em seção longitudinal em c e d. Observa-se, também nessas figuras, a continuidade dos tecidos pela presença da endoderme no caule e na raiz. Além disso, o córtex da raiz (cxr) é contínuo com o córtex do caule (cxc) em (d). Na figura e, observa-se o caule, em corte transversal, com o córtex possuindo inúmeras raízes adventícias (ra) intracorticais. Em f, o atactostelo com feixes distribuídos ao acaso. A sigla corresponde a: cv: cilindro vascular.

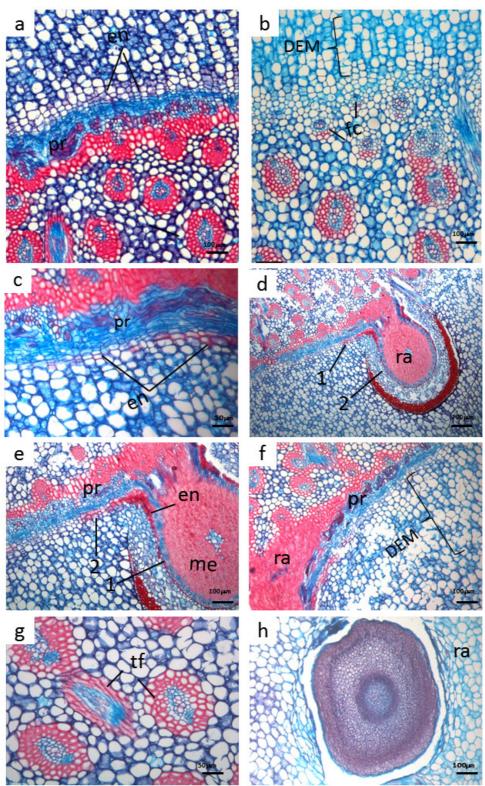


Figura 1.21: Seções transversais (a-h) do caule de Vriesea segadas-viannae.

Em **a-b**, a endoderme (en) é percebida por possuir um aspecto diferente das células do periciclo (pr) que se apresentam menores, além disso, a presença do plexo periférico também reforça a presença da endoderme. Nas regiões mais maduras a endoderme do caule apresenta-se com paredes espessadas (**c**), e este espessamento é contínuo com a endoderme da raiz adventícia (ra), 2 e 1, respectivamente (**d-e**). Em **f**, observam-se os tecidos vasculares do periciclo são os mesmos da raiz. Em **g**, notam-se os traços foliares (tf) no interior do cilindro central. Na figura **h**, observa-se uma raiz ainda em processo de diferenciação. A sigla corresponde a: DEM: derivadas da endoderme meristemática.

Vriesea stricta L. B. Sm

Planta rupícola, com caule de porte médio possuindo roseta estreitoinfundibuliforme com fitotelma pouco desenvolvido.

No caule levemente cônico (figura 1.22 a), se observa que a produção de células corticais ocorre não imediatamente abaixo do meristema apical caulinar e sim a partir da terceira folha (figura 1.22 b).

Na figura 1.22 c, a radiação do córtex é evidente, porém nesta região a distinção do limite entre o córtex e o cilindro central exigem mais detalhes da área. Mais abaixo, em detalhe, verifica-se uma região com células nucleadas e paralelas aos feixes cortados longitudinalmente. As células nucleadas são formadas pela primeira camada que irá compor as iniciais endodérmicas e as suas derivadas (figura 1.22 e).

Em corte transversal, o caule de *V. stricta* (figura 1.22 f) apresenta um cilindro central mais amplo que o córtex. No limite entre o córtex e o cilindro central ocorre a formação de raízes adventícias, de células derivadas da endoderme meristemática para o exterior e formação de feixes periféricos e de plexos radiculares para o interior. Na mesma região (figura 1.22 g), observam-se no córtex os traços foliares que correm perpendicularmente e paralelamente ao eixo do caule atravessando a região meristemática.

Os responsáveis por esta atividade meristemática são a endoderme e o periciclo ambos em atividade meristemática. A endoderme é reconhecida pela presença do periciclo e pela presença das células radiadas, no córtex, as DEM (figura 1.22 h). O periciclo camada adjacente, possui células menores e produz feixes caulinares com apenas metaxilema e metafloema (figura 1.22 h). Mais internamente (figura 1.23 b), no cilindro central, observam-se os traços foliares formados durante a formação dos primórdios foliares e os feixes caulinares. Na figura 1.23 c, é possível observar a conspícua radiação das células originadas da endoderme e a contínua formação de feixes na região pericíclica, este fato indica uma atividade diferenciada destes dois tecidos. Na figura 1.23 d, notam-se as raízes adventícias intracorticais

originadas na região mediana apresentando o mesmo padrão das espécies anteriores. Na mesma figura notam-se o córtex externo espessado, o córtex interno parenquimático, a endoderme em "O" e a medula parcialmente espessada (figura 1.23 d). Na região de formação de raízes, observa-se uma concentração maior de elementos vasculares que unem a vascularização do caule com a da raiz (figura 1.23 e-f), nota-se, também que a endoderme demonstra ser contínua do caule para a raiz (figura 1.23 g).

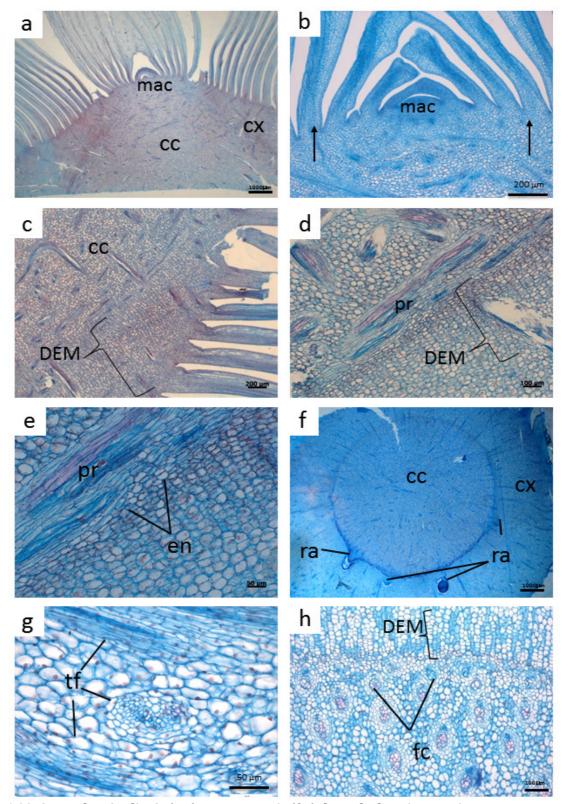


Figura 1.22: Seções longitudinais (a-e) e transversais (f-o) do caule de Vriesea stricta.

A figura **a** representa o aspecto geral do caule levemente cônico; na figura **b** observa-se o início da atividade meristemática da endoderme (en) abaixo da folha que está em expansão (seta fechada). Em **c**, observam-se as derivadas da endoderme meristemática (DEM). Nas figuras **d** e **e**, detalhe da região meristemática, percebem-se o periciclo (pr) e a endoderme localizada em uma região composta de células nucleadas. Esta mesma região é vista em corte transversal, na figura **f** como uma região contínua, porém, as vezes, esta região é interrompida por traços foliares (tf). O estelo do tipo atactostelo possui externamente o periciclo produzindo feixes caulinares (fc) para o interior do cilindro central. Na figura **h**, nota-se a presença de traços foliares e de feixes caulinares no interior do cilindro central (cc).

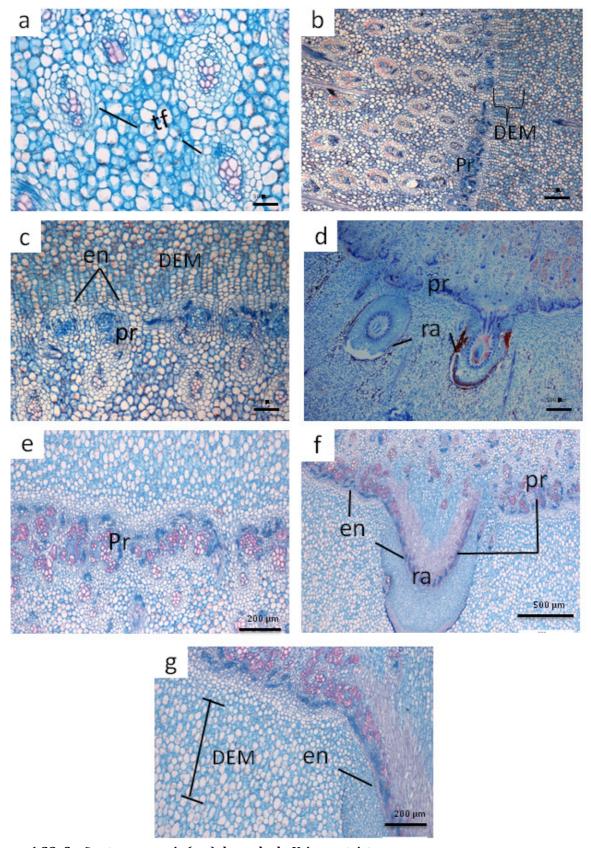


Figura 1.23: Seções transversais (a-g) do caule de Vriesea stricta.

Em a, observam-se traços foliares (tf) originados do procâmbio. Na figura b-c, verificam-se as células das derivadas da endoderme meristemática (DEM) em perfeita radiação (b-c). Em d, pode-se notar o periciclo (pr) produzindo raízes adventícias (ra) intracorticais. E em detalhe, na figura e, se verifica a formação de novos feixes caulinares. Observam-se que os tecidos vasculares do caule são conectados aos tecidos da raiz, onde a endoderme (en) é a contínua na raiz e no caule (d-g).

De forma resumida os caracteres morfológicos e anatômicos encontrados nas espécies de *Vriesea* constam na tabela 1.4.

Tabela 1.4: Caracteres morfo-anatômicos e seus respectivos estados em Vriesea.											
	Vriesea atropurpurea Silveira	Vriesea crassa Mez	Vriesea gigantea Mart. ex Schult.f.	Vriesea minarum L.B. Smith	Vriesea oligantha (Baker) Mez	Vriesea segadas-viannae L.B. Sm.	Vriesea stricta LB. Sm				
Ápice caulinar: abobadado (0), cônico (1), levemente cônico (2), sub-plano (3), plano-abobadado (4), plano (5).	0	?	4	1	0	4	2				
Caule: longo (0), curto (1).	1	1	1	1	1	1	1				
DEM (derivadas da endoderme meristemática): ausência (0) , presença (1) , presença na conexão caule raiz (2) .	1	1	1	1	1	1	1				
Endoderme do caule: parenquimática (0), em U (1), em O (2).	2	1	2	2	0	0	0				
Espessamento: evidente (0), não evidente (1)	0	0	0	0	0	0	0				
Filotaxia: dística (0), espiralada (polística) (1).	1	1	1	1	1	1	1				
Forma de vida: estritamente rupícola (0), estritamente epifítica (1), estritamente terrícola (2), rupícola+ epifítica+ terrícola (3), rupícola+ epifítica (4).	0	3	3	0	3	1	0				
Padrão morfológico da roseta: infudibuliforme (0), tubular (estreito-infundibuliforme) (1).	0	0	0	0	1	0	1				
Periciclo: parenquimático (0), espessado (1).	1	1	1	1	0	1	1				
Nós e entrenós conspícuos: ausência (0), presença (1).	0	0	0	0	0	0	0				
Raízes intracorticais -origem: próximo ao ápice (0), região mediana (1), não possui (2)	1	1	1	1	1	1	1				
Tipo de feixes Traços/feixes caulinares : colateral (0) , colateral e compostos (aparentemente concêntricos) (1)	0	1	1	1	0	0	0				
Tipos de idioblastos: ráfides (0), estilóides (1), ausentes (2).	0	0	0	0	2	0	1				

Alcantarea Harms

Plantas rupícolas, endêmicas do Brasil, com caules pequenos e totalmente oculto pelas bainhas foliares, a caules robustos e desenvolvidos, com roseta geralmente infundibuliforme, podendo ser ainda tubular ou graminiforme. O fitotelma apresenta desenvolvimento variável, desde bem desenvolvido até pouco desenvolvido (figura 1.24).

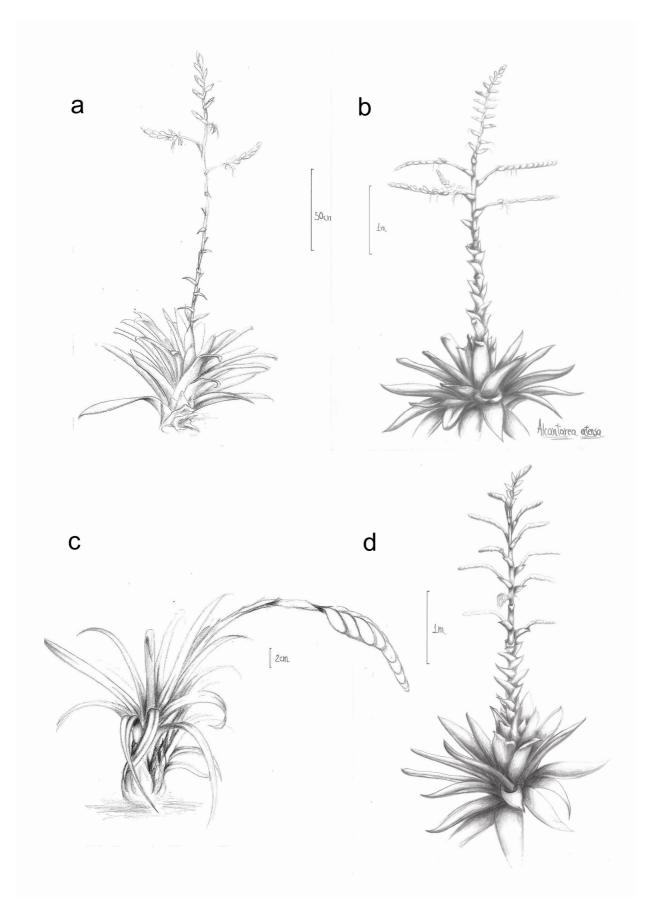


Figura 1.24: Hábitos das espécies *Alcantarea burle-marxii* (a), *A. extensa* (b), *A.farneyi* (c) e *A. turgida.* Ilustrações feitas por Ubirajara Gomes de Mello Neto.

Alcantarea burle-marxii (Leme) J.R. Grant

Planta rupícola com caule curto, porém evidente, e roseta infundibuliforme com fitotelma desenvolvido (figura 1.24 a). Com o aspecto subplano, o ápice se comporta como um platô, onde os primórdios estão quase na mesma altura das folhas expandidas (figuras 1.25 a-c).

Próximo ao meristema apical caulinar observam-se as derivadas de endoderme meristemática que seguem paralelamente em direção às folhas (figuras 1.25 b-c). A atividade destas células aumenta a medida que aumenta distância do ápice (figura 1.25 d). Estas células perfeitamente enfileiradas são acompanhas por um traço foliar que atravessa o córtex. A camada de células composta pelas inicias endodérmicas está em plena atividade meristemática, produzindo células com paredes mais delgadas, característica que conferem a essas um aspecto mais claro do que as demais (figura 1.25 f), já o periciclo possui paredes densamente coradas com lumen menor. Observa-se aqui outra característica importante: o desencontro entre as paredes das iniciais endodérmicas e as células meristemáticas do periciclo; a inicial endodérmica e suas derivadas formam uma fileira contínua de dentro para fora, de formato e tamanho semelhantes, e ao acompanhar esta fileira de células, em sentido centrípeto, percebe-se que não há continuação, pois o padrão celular do periciclo, quanto ao formato e tamanho modifica-se, sendo esta o início da camada mais externa do cilindro vascular (figura 1.25 f).

Nesta espécie e nas anteriores, a atividade destes dois tecidos (endoderme e periciclo) é percebida logo abaixo do meristema apical caulinar, sendo o periciclo com atividade centrípeta, formando feixes e a endoderme formando o córtex, no sentido centrífugo.

Na região mediana o periciclo passa a ter mais uma atividade: a formação de raízes intracorticais (figura 1.25 g, 1.26 c, d), juntamente com formação de tecidos vasculares (figuras 1.25 h, 1.26 a-b). As derivadas da endoderme meristemática são percebidas na figura 1.26 b, e nesta região observam-se mais raízes (detalhe na figura 1.26 e). Esta espécie apresenta feixes caulinares e traços foliares colaterais (figura 1.26 f-g).

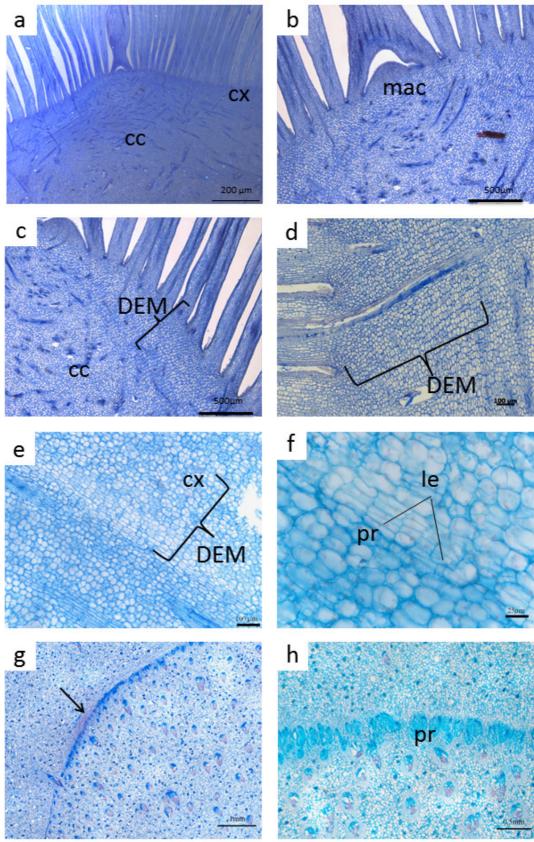


Figura 1.25: Seções longitudinais (a-f) e transversais (g-h) do caule de *Alcantarea burle-marxii*. Na figura a, nota-se aspecto geral do caule subplano; e em b, observa-se o detalhe do meristema apical caulinar (mac). Em c, observa-se o início da atividade meristemática da endoderme (en), e em d, percebem-se as derivadas da endoderme meristemática (DEM) vistas em detalhes nas figuras e. Na figura f, observa-se o detalhe da região meristemática com a inicial endodérmica (ie). Na figura g, o limite entre o córtex (cx) e o cilindro central (cc) com o início da formação de uma raiz (seta). Em h, o periciclo (pr) parenquimático aparece originado feixes caulinares (fc).

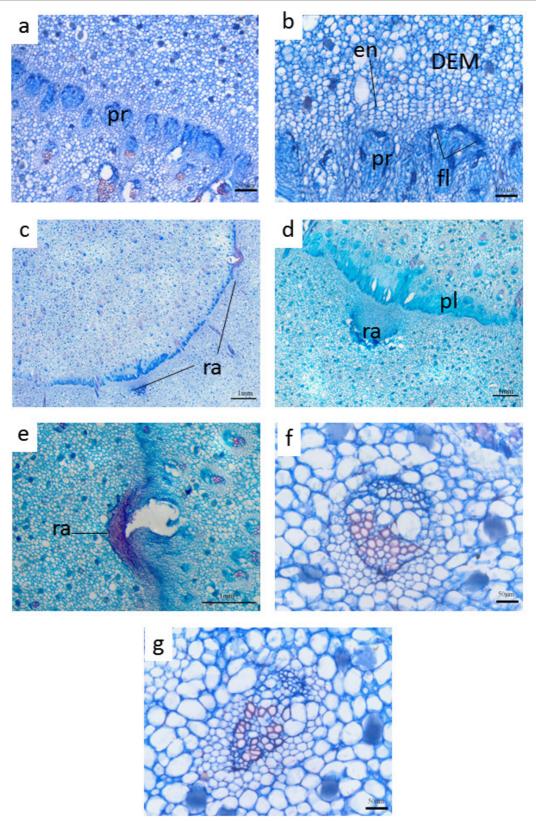


Figura 1.26: Seções transversais (a-g) do caule de Alcantarea burle-marxii.

Em **a**, percebe-se a formação de tecidos vasculares pelo periciclo (pr). Em maior aumento, na figura **b** o floema (fl) já está diferenciado e, percebe-se também, a endoderme e suas derivadas (DEM) Em **c-d**, nota-se a formação de raízes adventícias (ra) intracorticais com plexo periférico (pl); a raiz é vista detalhe na figura **e**. O estelo do tipo atactostelo possui feixes caulinares (fc) e traços foliares (tf) (figuras **f-g**).

Alcantarea extensa (L. B. Sm.) J. R. Grant

Planta rupícola com caule conspícuo, roseta infundibuliforme e fitotelma desenvolvido. O padrão do ápice é semelhante de *A. burle marxii*, sendo classificado com subplano. No ápice caulinar, as células do córtex se apresentam mais claras (menos coradas) que as células do cilindro central, tornando fácil a distinção entre as duas regiões (figura 1.27 a).

A atividade da endoderme e do periciclo também é iniciada diretamente abaixo do ápice (figuras 1.27 b-c). Em maior aumento (figura 1.27 e), se observa o padrão radiado do córtex e os cordões de prôcambio no cilindro central.

Observam-se as derivadas da endoderme meristemática, perfeitamente, enfileiradas originadas das iniciais endodérmicas (figura 1.27 f-g). Além das células oriundas da endoderme, feixes são continuamente formados na região pericíclica (figura 1.27 h). Ainda na região pericíclica, raízes adventícias intracorticais são formação na região mediana do caule (figura 1.28 a).

A raiz em diferenciação (figuras 1.28 a-d) possui os tecidos corticais e vasculares conectados com os tecidos do caule, este último constitui o plexo caulinar. No córtex da raiz um padrão de divisão gera uma conspícua radiação semelhante ao padrão de divisão do caule, devido à atividade endodérmica semelhante nesses dois órgãos (figura 1.28 e).

Os feixes nesta espécie como nas espécies citadas anteriormente, possuem duas origens: os feixes gerados diretamente do procâmbio e os feixes do periciclo na região pericíclica, formando respectivamente, os traços foliares e os feixes caulinares (figuras 1.28 f-g).

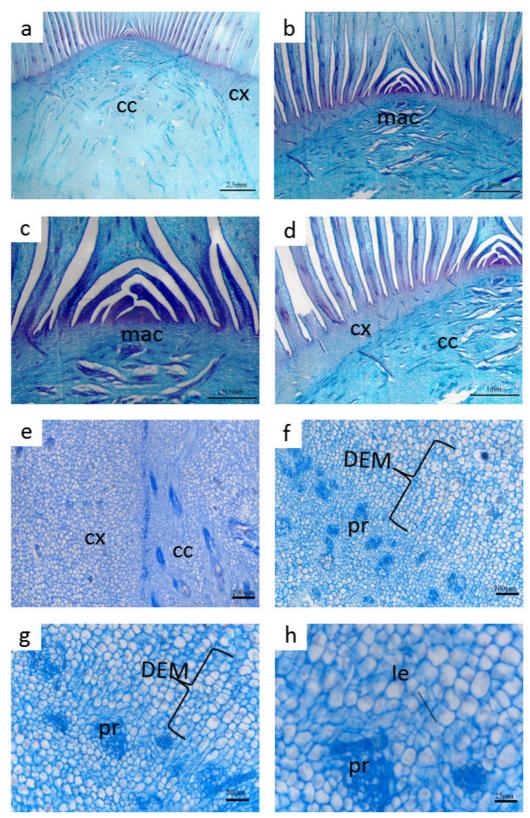


Figura 1.27: Seções longitudinais (a-e) e transversais (f-g) do caule de *Alcantarea extensa*. Em a e b, observa-se o aspecto geral do ápice do caule, com formato subplano, o cilindro central (cc) e o córtex (cx) distintos. Em c, detalhe da região do meristema apical caulinar (mac). As derivadas da endoderme meristemática (DEM) aparecem formando a região clara do caule em seção longitudinal (d-e). As mesmas células podem ser vistas em corte transversal nas figuras f-h. As siglas correspondem a: ie: inicial endodérmica, pr: periciclo.

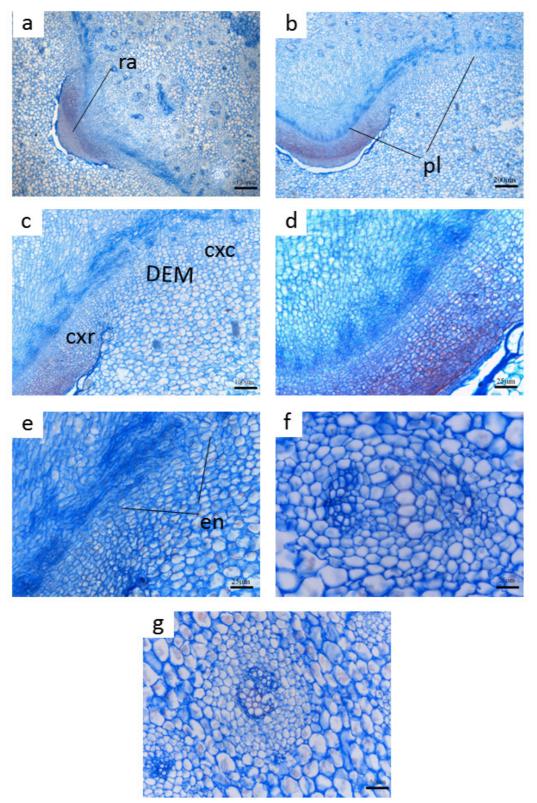


Figura 1.28 continuação: Seções transversais (a-g) do caule de *Alcantarea extensa*.

Na região mediana $(\mathbf{a} \cdot \mathbf{b})$ são observadas raízes adventícias (\mathbf{ra}) intracorticais e observa-se continuidade dos tecidos entre a raiz e caule . Em \mathbf{c} e \mathbf{e} observa-se a presença das derivadas da endoderme no caule e na raiz; além disso, o córtex da raiz (\mathbf{cxr}) é contínuo com o córtex do caule (\mathbf{cxc}) . Em \mathbf{e} percebe-se a endoderme da raiz. O traço foliar (\mathbf{tf}) e o feixe caulinar (\mathbf{fc}) podem ser vistos na figura \mathbf{f} e \mathbf{g} , respectivamente.

Alcantarea farneyi (Martinelli & A. Costa) J.R. Grant

Planta rupícola, com caule curto, cespitoso, roseta sub-bulbosa e fitotelma pouco desenvolvido.

O caule em corte longitudinal (figura 1.29 a-h) possui o ápice plano com as folhas compactadas que dá o aspecto bulboso ao caule. O córtex e o cilindro central são distintos e as derivadas da endoderme meristemática (DEM) possuem aspecto mais claro (menos coradas) e apresentam paredes delgadas (figura 1.29 a-e).

Próximo ao ápice onde se observam muitos traços foliares, não foi observado atividade intensa do periciclo. Já nas regiões medianas o periciclo inicia a formação de feixes caulinares periféricos, sendo assim o formador de tecidos vasculares (figuras 1.29 g-h e 1.30 a). Observa-se, também, que o periciclo apresenta atividade na formação de raízes adventícias (figura 1.30 b). Nas figuras 1.30 c e d verifica-se que o floema, na região pericíclica, se diferencia antes dos elementos do xilema e nota-se também que a inicial endodérmica está se dividindo para formar o córtex.

As raízes adventícias intracorticais compartilham os mesmos tecidos com caule, a endoderme com paredes espessadas, o córtex radiado e nesta mesma região, observam-se que os feixes também já estão diferenciados (figura 1.30 e-g) O plexo radicular, observado a partir da região mediana e formado durante o desenvolvimento das raízes, ocupa toda a zona periférica formando uma rede de tecidos vasculares complexos (figura 1.31 a-c).

As raízes possuem córtex externo esclerificado, córtex interno parenquimático, endoderme com reforço em "0" e medula com células espessadas. As espécies possuem duas formas básicas de feixes: os caulinares (figura 1. 31 f) e os traços foliares (figuras 1.31 g-h).

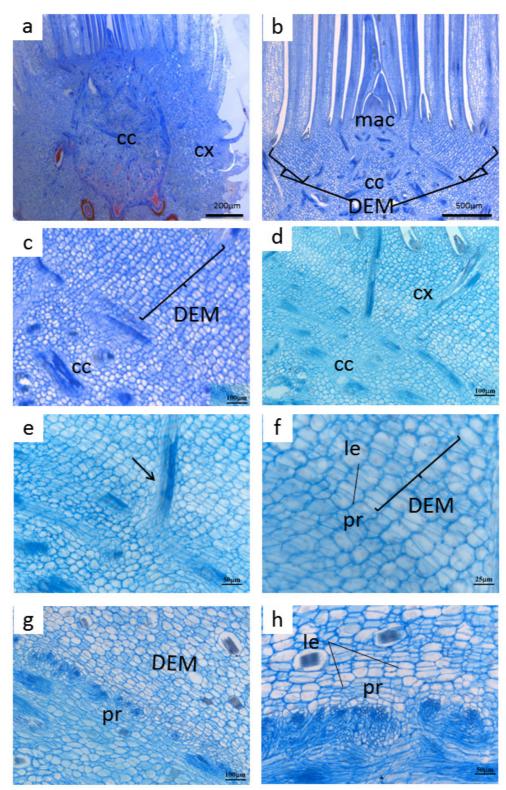


Figura 1. 29: Seções longitudinais (a-h) de Alcantarea farneyi.

Em **a** observa-se o aspecto geral do caule curto, ereto, com o córtex (cx) e o cilindro central (cc) distintos na região do ápice. Nesta mesma figura, observa-se que a região apical do caule possui o formato plano; nota-se também, a formação de raízes adventícias (ra) intracorticais. Na figura **b**, percebe-se que aspecto plano é originado da alta taxa de divisões periclinais das derivadas da endoderme meristemática (DEM). O padrão radiado do córtex pode ser visualizado, em maiores detalhes, nas figuras **c** a **f**. Na figura **g**, observa-se a região pericíclica (pr) formada por elementos vasculares com floema (mais densamente corado) ainda em diferenciação, e o córtex radiado com divisões periclinais da camada mais interna do córtex a endoderme (en) em atividade meristemática, denominada nesta fase de diferenciação de inicial endodérmica (ie) melhor evidenciada na figura **h**.

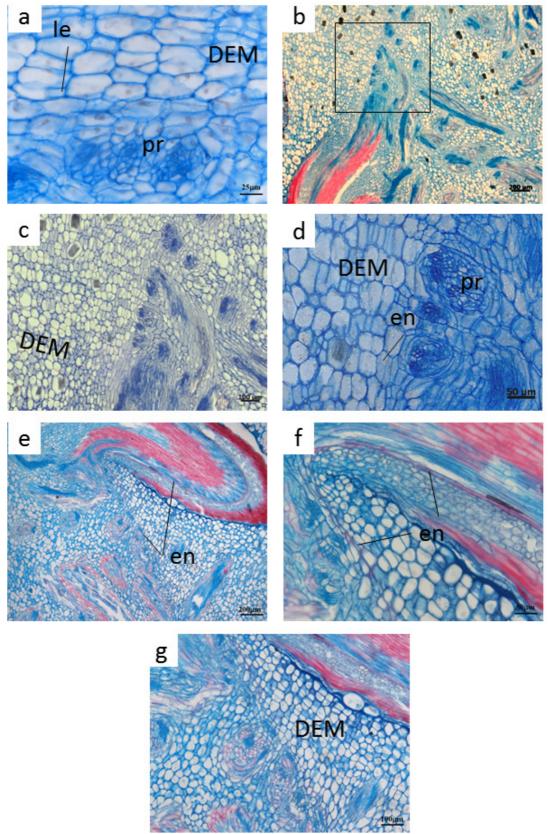


Figura 1.30: Seções longitudinais (a-g) de Alcantarea farneyi.

Na Figura **a**, notam-se a inicial endodérmica (ie), as suas derivadas imediatas (DEM), e os feixes sendo formados na região do periciclo (pr). Nas figuras **b-d**, observa-se a região mediana do caule, com os feixes formados pelo periciclo. Nesta mesma figura as raízes apresentam-se diferenciadas na base, (**e-g**) com as DEM e a endoderme parenquimáticas. Nas figuras **e-f** observa-se, ainda, a continuidade da endoderme da raiz com a endoderme do caule (**f**); as suas derivadas (DEM) são vistas na figura **g**.

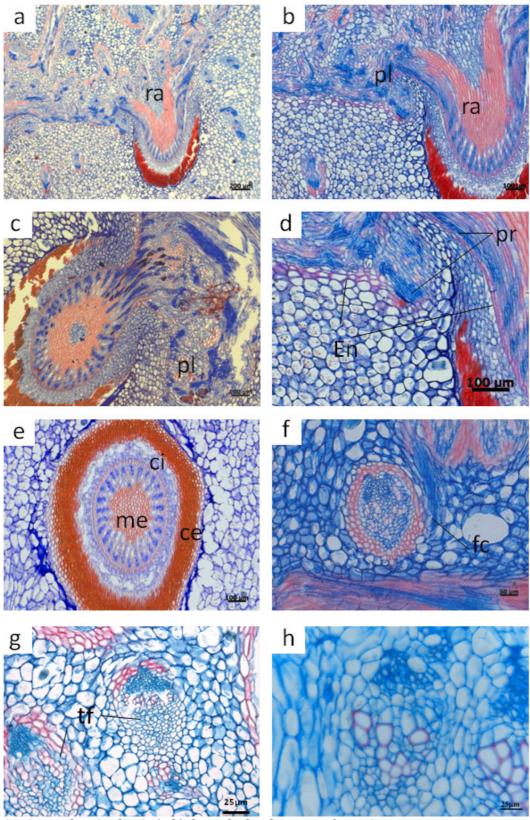


Figura 1. 31: Seções longitudinais (a-h) do caule de *Alcantarea farneyi*. A continuidade dos tecidos pode ser vista na figura a-c, onde a endoderme (en) da raiz adventícia (ra) intracortical é contínua com a endoderme do caule. Em d-e, nota-se que medula (me) da raiz está totalmente esclerificada. Na figura f, observa-se o feixe caulinar (fc) envolto por fibras, já nas figuras g-h, os traços foliares (tf) não estão envoltos por fibras (g-h).

Alcantarea nahoumii (Leme) J.R. Grant.

Planta rupícola com caule de médio porte, roseta infundibuliforme e fitotelma desenvolvido.

Em corte transversal o caule é formado por súber, córtex amplo, raízes intracorticais e cilindro central diminuto. O estelo é do tipo atactostelo (figuras 1.32 a-c) com traços foliares (figura 1.32 c) e feixes caulinares localizado no interior do cilindro central e periféricos (figura 1.32 d-e). As derivadas da endoderme meristemática (figura 1.32 f) nesta espécie apresentam radiação até a região mediana do caule (figura 1.32 g). As raízes intracorticais, originadas do periciclo, na região mediana (figura 1.32 h, 1.33 a-c) são formadas de córtex externo esclerificado, córtex interno radiado e parenquimático, endoderme com reforço em "O" e medula lignificada. Na figura 1.33 c, o traço foliar é envolto por fibras.

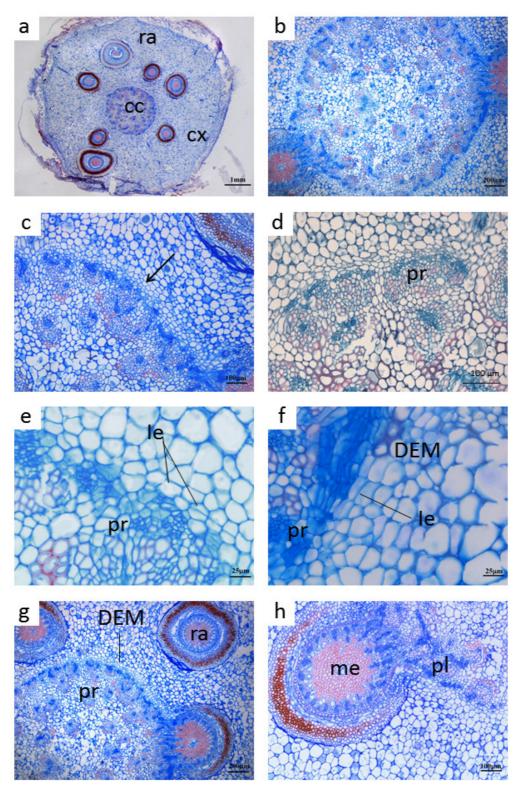


Figura 1.32: Seções transversais (a-h) do caule de Alcantarea nahoumii.

Aspecto geral do caule (**a-b**), onde se nota a presença do súber (sb) estratificado e do cilindro central (cc) reduzido que correspondente a ¼ do diâmetro total do caule. Na figura **c**, observam-se a radiação do córtex formando uma região mais clara composta pelas derivadas da endoderme meristemática (DEM). Em **d**, notam-se os feixes caulinares na região pericíclica, indicando que o periciclo (pr) é o tecido formador de feixes caulinares. Nas figuras **e-f**, observam-se as iniciais endodérmicas (ie) e suas derivadas imediatas. Em **f**, notam-se os feixes caulinares (fc) na periferia do cilindro central sendo produzidos ao lado de células do córtex. Nas figuras **g-h** observam-se raízes adventícias (ra) intracorticais diferenciadas com medula (me) espessada e o plexo periférico que conecta o caule à raiz.

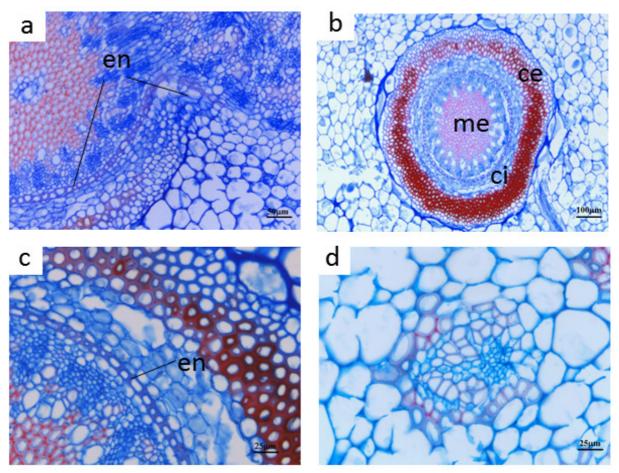


Figura 1.33: Seções transversais (a-h) do caule de *Alcantarea nahoumii*. Na figura **a**, a endoderme (en) do caule é contínua com a endoderme da raiz, que em detalhe na figura **b**, se apresenta com córtex externo (ce) esclerificado, córtex interno (ci) menos espesso e parenquimático e, ainda, observa-se a medula espessada (me), Na figura **c**, percebe-se que endoderme da raiz apresenta espessamento em "O". Na figura **d**, nota-se um traço foliar (tf).

Alcantarea turgida Versieux & Wand.

Planta rupícola de grande porte com caule curto, roseta infundibiliforme e fitotelma desenvolvido. O caule é composto de um súber estratificado, um córtex parenquimático e um cilindro central amplo e distinto (figura 1.34 a). Observam-se as derivadas da endoderme meristemática e os feixes caulinares (figura 1.34 b-c). Estes feixes, localizados na região pericíclica foram denominados de compostos (aparentemente concêntrico) por possuírem um padrão diferente do colateral típico, pois há floema à frente a ao redor do xilema (na figura 1.34 d).

Em sentido centrífugo, observa-se a endoderme parenquimática e as suas derivadas imediatas, as DEM (figura 1.34 e-h). Na figura 1.34 f, verifica-se que o periciclo mantém a atividade meristemática e a endoderme, nesta mesma fase, se encontra diferenciada. Desta forma, os tecidos apresentam diferenciação temporal assincrônica, revelando que os tecidos responsáveis pelo espessamento desta planta são a endoderme e o periciclo, e não um tecido único com atividade bidirecional. Na figura 1.34 h, observa-se plexo periférico da raiz.

Em corte transversal, observa-se que o caule não possui um perfeito limite entre o córtex e o cilindro central (figura 1.35 a). Os traços foliares colaterais, com protoxilema e metaxilema, ocorrem de maneira difusa na medula. (figura 1.35 a-b) Já na periferia do caule verificam-se, mais uma vez, os feixes que possuem floema e xilema difusos (figura 1.35 c-e) denominado compostos; ao lado destes feixes ocorrem traços foliares com fibras ao seu redor (figura 1.35 f). Nesta espécie não foi possível observar as raízes.

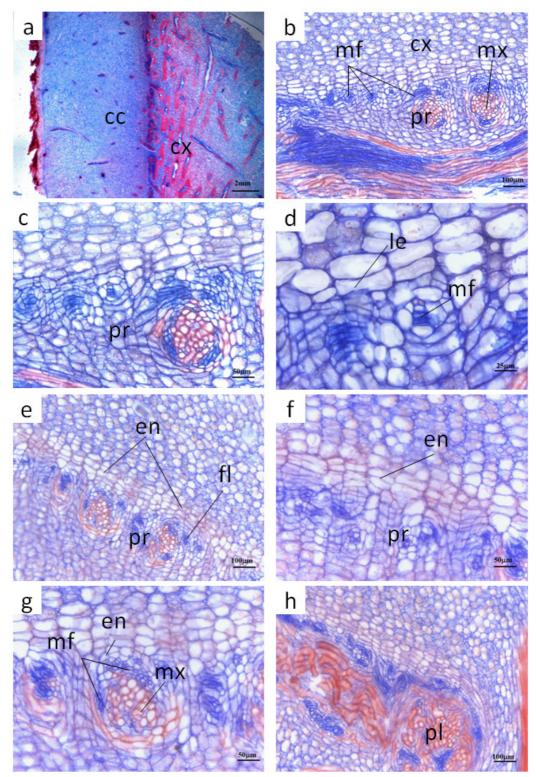


Figura 1.34: Seções longitudinais (a-h) do caule de Alcantarea turgida.

Em **a**, observam-se o súber (sb) estratificado, as derivadas da endoderme meristemática (DEM) e o periciclo (pr) como região geradora de feixes caulinares (fc). Em **c-d**, observam-se a inicial endodérmica (ie), e o periciclo produzindo feixes caulinares; nesta região nota-se que o os elementos de metafloema são diferenciados antes do metaxilema. Mais abaixo, em regiões mais diferenciadas (**e-f**), percebe-se que e a endoderme se encontra diferenciada ao lado do periciclo que ainda produz feixes. Na figura **g**, observam-se os tecidos já diferenciados e na figura **h**, um plexo periférico (pl). As siglas correspondem a: mf: metafloema e metaxilema: mx.

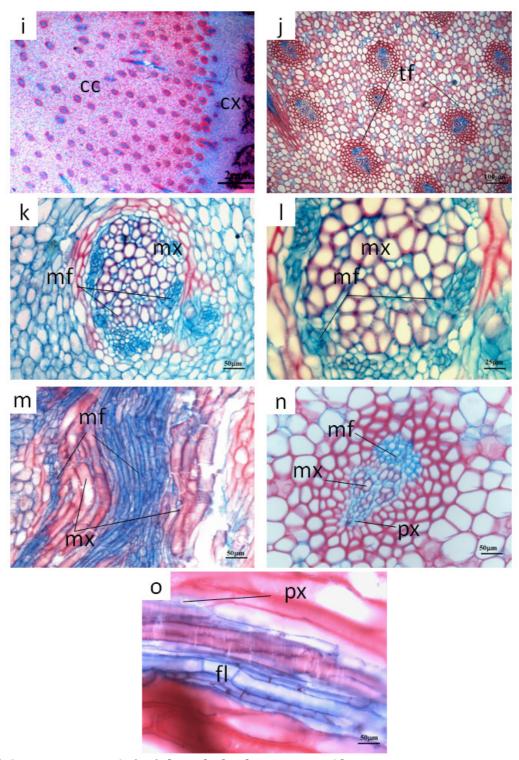


Figura 1.35: Seções transversais (a-g) do caule de Alcantarea turgida.

Em **a**, observam-se o caule do tipo atactostelo,com inúmeros feixes concentrados na periferia, o córtex (cx) e o cilindro central (cc). Na figura **b**, os feixes localizados no interior do cilindro central são constituídos de traços foliares colaterais. Na figura **c-e**, observa-se o feixe caulinare composto, aparentemente concêntrico, com metaxilema (mx) e metafloema (mf). Visualizado, também, em seção longitudinal na figura **e**. Na figura **f-g**, nota-se um traço foliar com protoxilema (px) e protofloema (pf), além de metaxilema e metafloema também observado longitudinalmente.

De forma resumida os caracteres morfológicos e anatômicos encontrados nas espécies de *Alcantarea* encontram-se na tabela 1.5.

Tabela 1.5: Caracteres morfoanatômicos e seus respectivos estados em Alcantarea									
	Alcantarea burle-marxii (Leme) J.R. Grant	"Alcantarea extensa (L. B. Sm.) J. R. Grant)	Alcantarea farneyi (Martinelli & A. Costa) J.R.	Alcantarea nahoumii (Leme) J.R. Grant.	Alcantarea turgida Versieux & Wand.				
Ápice caulinar : abobadado (0) , cônico (1) , levemente cônico (2) , subplano (3) , plano-abobadado (4) , plano (5) .	3	3	5	nd	nd				
Caule: longo (0), curto (1).	1	1	1	1	1				
DEM (derivadas da endoderme meristemática): ausência (0) , presença (1) , presença na conexão caule raiz (2) .	1	1	1	1	1				
Endoderme do caule: parenquimática (0), em U (1), em O (2).	0	0	0	0	0				
Espessamento: evidente (0), não evidente (1)	0	0	0	0	0				
Filotaxia: dística (0), espiralada (polística) (1).	1	1	1	1	1				
Forma de vida : estritamente rupícola (0) , estritamente epifítica (1) , estritamente terrícola (2) , rupícola+ epifítica+ terrícola (3) , rupícola+ epifítica (4) .	0	0	0	0	0				
Padrão morfológico da roseta: infudibuliforme (0), tubular (estreito-infundibuliforme) (1).	0	1	1	0	0				
Periciclo: parenquimático (0), espessado (1).	0	0	0	0	0				
Nós e entrenós conspícuos: ausência (0), presença (1).	0	0	0	0	0				
Raízes intracorticais -origem: próximo ao ápice (0), região mediana (1), não possui (2)	1	1	1	1	1				
Tipo de feixes traços/feixes caulinares : colateral (0) , colateral e compostos aparentemente concêntricos (1)	0	0	1	1	3				
Tipos de idioblastos: ráfides (0), estilóides (1), ausentes (2).	0	0	0	0	0				

nd: não determinado

5 Discussão

As espécies de Tillandsioideae cujos caules foram estudados estão distribuídas em duas tribos (Barfuss et al., 2005): Tillandsieae (Tillandsia) e *Vrieseeae (Alcantarea e Vriesea*). Os caules encontrados nas espécies geralmente são curtos com exceção de *Tillandsia tenuifolia* e *T. usneoides* que se apresentam caulescentes. A filotaxia encontrada em geral é espiralada com exceção de T. usneoides que apresenta filotaxia dística, característica do subgênero de Tillandsia Diaphoranthema (Gilmartin & Brown 1986). De acordo com Tomlinsom (1970) e Benzing (2000) dentro das Tillandsia, T. usneoides é considerada especializada por apresentar características juvenis quando adulta como: a filotaxia dística, o agravitropismo e miniaturização. Sendo este um caso de heterocromia, do tipo neotenia, Benzing (2000) ilustra tal fenômeno para toda subfamília Tillandsioideae. O mesmo autor propõe que um ancestral com folhas em roseta com fitotelma desenvolvido originaria descendentes que não formam tanque e nem sistema radicular e ao invés disso, exibiram uma miniaturização do corpo vegetal acompanhada pela redução ou incremento de nós. Isto é perfeitamente observado nas espécies de Tillandsia estudadas, e observa-se em T. usneoides o grau máximo de redução do caule.

Com relação ao hábito, todas as espécies de *Alcantarea* apresentaram hábito rupícola, característica compartilhada com três espécies de *Vriesea: V. atropurpurea, V. minarum* e *V. stricta.* O hábito epifítico foi observado em *V. gigantea, V. oligantha, V. segadas-viannae, T. geminiflora, T. tenuifolia, e T. usneoides. As espécies <i>V. crassa e T. loliaceae* podem apresentar os dois hábitos. Outra adaptação ecológica importante observada, e ligada ao hábito, foi o padrão morfológico da roseta que variaram, neste estudo, de estreito infundibuliforme em *A. farneyi, V. oligantha e V. stricta* a infundibuliforme nas demais espécies. O padrão da roseta reflete diretamente na presença do

fitotelma, que é pouco desenvolvido em *A. farneyi, V. oligantha e V. stricta* e ausente nas *Tillandsias*.

A colonização de ambientes extremos como rochas e a casca de outras plantas exigem uma grande capacidade de tolerância a estes substratos e diferentes estratégias de obtenção e economia de água. A partir de Poales ancestrais que, segundo Linder & Rudall (2005), provavelmente cresciam em substratos úmidos e pobres em nutrientes, apenas metade das Bromeliaceae e poucas Rapateaceae escaparam da competição com outras plantas e dos locais temporariamente alagados, fixando-se sobre árvores desenvolvendo, concomitantemente, uma série complexa de adaptações, que possibilitavam sua sobrevivência durante curtos períodos de estresse hídrico (Benzing 2000). Tais características adaptativas incluem suculência, escamas foliares absorventes, roseta-tanque, além de metabolismo CAM (Benzing 2000). Linder & Rudall (2005) mencionam que as plantas CAM fixam o CO2 durante a noite quando a perda de água é reduzida, e sugerem que o desenvolvimento desse metabolismo pré-adaptou essas linhagens a sobreviverem à baixa concentração de CO2 que caracterizou o Plioceno e o Pleistoceno. Ao mesmo tempo em que as Bromeliaceae se fixaram sobre árvores e rochas, ambientes onde aparentemente as raízes se destinam mais à fixação do que à absorção (Benzing 2000), elas desenvolveram dois tipos de hábito de crescimento: num deles, as folhas possuem bainhas amplas e imbricadas, formando um tanque onde se acumulam água e detritos, que são absorvidos por escamas; no outro, as folhas são estreitas e densamente cobertas por escamas que absorvem água e nutrientes quando a superfície está úmida (Benzing et al., 1976; Benzing, 2000).

As espécies de *Alcantarea*, que colonizam rochas, apresentam fitotelmas desenvolvidos, bem como, as espécies de *Vriesea* que apresentam formas de vidas epifíticas e rupícolas; já as *Tillandsia* não apresentam fitotelma e são predominantemente epífitas. Estas condições, acerca da presença de fitotelma e o hábito, refletem no surgimento de diversas funções

ecológicas e de adaptações nas diferentes espécies dentro de uma linhagem levando ao sucesso de adaptação à condição xerófita (Givnish *et al.*, 2007). Uma destas características é o metabolismo CAM (Metabolismo Ácido das Crassuláceas), característica que, junto com o hábito epífito, representam apomorfias para a família por serem raros ou ausentes nas outras Poales (Crayn *et al.*, 2004). Segundo Crayn et al. (2004), as duas características surgiram independentemente e várias vezes durante a história evolutiva das subfamílias, sendo que em Tillandsioideae, grupo predominantemente epifítico, o metabolismo CAM aparece em todas as *Tillandsia* epífitas atmosféricas sem fitotelmas (Martin, 1994), enquanto que em *Vriesea* com fitotelmas desenvolvidos, onde os representantes são rupícolas e epifíticos, ocorrem metabolismo C3 e CAM (Martin, 1994), para *Alcantarea* não há dados sobre seu modo de metabolismo do carbono.

Segundo Martin (1994) as espécies que apresentam folhas estreitas rígidas e cobertas por tricomas exibem metabolismo CAM, enquanto aquelas com folhas amplas delgadas e com poucos tricomas são plantas tipicamente C3. De acordo com Barfuss *et al.* (2005), as primeiras linhagens divergentes de Tillandsioideae, são terrestres mesofíticos e com fitotelma ultrapassam as xerófitas (*Alcantarea, Vriesea*). Em *Tillandsia*, que está em uma posição terminal, formas epífitas xerófitas são comuns e, de longe, superam as espécies com fitotelmas (Till, 2000). Isso se reflete pela falta ou rara ocorrência de fotossíntese CAM em Vriesea *senso lato* e os numerosos registros de *Tillandsia* (Martin, 1994; Crayn, 2004).

Benzing (2000), embasado nos estudos de Pittendrigh (1948) segregou a família Bromeliaceae, em cinco categorias ecofisiológicas baseado na seguintes características: arquitetura do caule, sistema radicular, tricomas, síndrome fotossintética e hábito. Tillandsioideae estudadas neste trabalho se enquadram nos tipos IV e V desta classificação. *Vriesea* e *Alcantarea* são representadas pelo tipo IV, pois o caule apresenta fitotelma bem desenvolvido em sua grande maioria, sistema radicular mecânico e condicionalmente

absortivo, tricomas foliares absortivos na base da folha (Versieux *et al.*, 2010), possivelmente apresentam síndrome fotossintética C3, já as *Tillandsia* apresentam caule sem fitotelma, neotenia e são miniaturizadas. As raízes podem ser mecânica ou ausentes como no caso de *T. usneoides*, os tricomas estão presentes em toda a planta e metabolismo fotossintético é predominantemente CAM.

No entanto, recentes pesquisas mostram que muitas plantas podem apresentar ambos os tipos de metabolismos fotossintéticos, C3 ou CAM, alternando-os conforme variações nas condições ambientais ou fases do desenvolvimento (Sleslak et al., 2003). A transição entre os tipos de assimilação de CO2 pode ser induzida por estresse hídrico (Freschi et al., 2010a), aumento da intensidade luminosa que atinge as folhas (Maxwell et al., 1994; Haslam et al., 2003; Sleslak et al., 2003) ou por variações termoperiódicas (Nievola et al., 2005). A mudança de C3 para o CAM pode acontecer independentemente entre diferentes regiões da planta. A espécie *Guzmania monostachia* (Tillandsioideae) tem a capacidade de expressar o CAM e a fotossíntese C3, simultaneamente, mas em diferentes porções foliares, sob déficit hídrico.

Além disso, segundo Freschi et al. (2010a), *G. monostachia* após passar por um período de seca exibe reversão do CAM à via C3, quando retoma-se às condições normais de disponibilidade de água. De forma oposta, plantas de *Ananas comosus in vitro* quando induzidas ao CAM não retornam ao metabolismo C3 (Freschi et al. 2010c). Outros fatores que influenciam na expressão do CAM seriam a deficiência nutricional verificada em *G. monostachia* (Pereira, 2012) e o fotoperíodo como visto em *Tillandsia pohliana* (Nievola & Mercier, 2001; Freschi et al., 2010b).

A transição evolutiva de formas terrestre para formas de vida epífitas parece ter sido intimamente ligada à elaboração dos tricomas absorventes da epiderme característica da família (Benzing, 2000).

Os caules com espessamento evidente ocorreram em todas as espécies de Vriesea, de *Alcantarea* e em apenas duas espécies de *Tillandsia: T. geminiflora e T. tenuifolia.*

A maior parte das espécies analisadas possuem o caule com gravitropismo negativo, como o observado na maioria das plantas superiores. No entanto, *T. usneoides* apresentou agravitropismo, ou seja, não apresenta resposta gravitrópica. De acordo com Sack (1987, 1991) o gravitropismo dos caules é dado pelos amiloplastos encontrados na camada mais interna do córtex, a endoderme. Estas células são chamadas de estatócitos, pois apresentam grão de amido que desempenham o papel de estatólitos na região parenquimática perivascular do caule (Ferreira & Fett-Neto, 2004).

O padrão anatômico do caule também se mostrou semelhante entre tres gêneros analisados, com súber estratificado, córtex diferenciado em parênquima, composto principalmente de células derivadas da endoderme meristemática. A endoderme variou de parenquimática a espessada com reforço em U e O. O cilindro central constituído de um atactostelo verdadeiro com inúmeros feixes distribuídos ao acaso, com periciclo ora espessado ora não espessado é um padrão compartilhado e esperado para todas as monocotiledôneas (Tomlinson, 1969; Benzing, 2000).

O súber estratificado nas espécies de *T. tenuifolia, T. loliacea, V. crassa, V. atropurpurea, V. minarum , A. nahoumii e A. turgida* é denominado de periderme por Tomlinson (1969), mesmo na ausência de um câmbio, e de acordo com o autor este tecido pode ser originado de camadas meristemáticas secundárias das partes antigas do caule e ao redor das folhas. A denominação periderme é aplicada erroneamente, nestas espécies, pois como o Tomlinsom descreveu, não há "crescimento secundário" em bromélias e por isso não há formação de câmbio e nem de felogênio como ocorrem em eudicotiledôneas. Na realidade, este tecido é formado a partir de grupos de células do parênquima cortical, que se dividem periclinalmente e originam várias camadas de células, cujas paredes se suberificam. Como observado em *Dyckia*

e *Encholirium*, por Pita e Menezes (2002), a presença de caule com tecido protetor, que constitui súber estratificado de origem parenquimática e em *T. gardneri* e *T. streptocarpa* por Segecin e Scatena (2004).

O córtex é estreito em relação ao cilindro central em *T. tenuifolia V. atropurpurea, V. crassa, V. oligantha, V. minarum, V. stricta, A. extensa, A. burlemarxii, A. farneyi e A. turgida. O córtex amplo é encontrado nas espécies <i>V. gigantea, V. segadas-viannae, A. nahoumii, T. geminiflora, T. loliacea e T. usneoides.* Na literatura, o córtex é descrito como estreito e diferenciado em duas regiões, uma externa com células de paredes espessadas e lignificadas e a mais interna constituída de células parenquimáticas, que às vezes, apresentam grão de amido (Tomlinson, 1969; Benzing, 2000). Acredita-se que esta variação pode estar ligada as diferentes taxas de divisão da endoderme e do periciclo.

O córtex é constituído de células que se dividem periclinalmente, a partir da inicial endoderme, originando as denominadas derivadas da endoderme meristemática (DEM) (Menezes et al., 2005; Menezes et al., 2011). A atividade destas células reflete diretamente no padrão morfológico do ápice caulinar, gerando diferentes formatos que vão de cônico a planos (figura 1.36). No gênero Alcantarea os ápices variaram de plano a subplano, pois a derivadas seguem paralelamente as folhas, em Tillandsia observou-se o caule em formato de abobada que possui divisões mais intensas distantes do ápice e em Vriesea foram verificados o plano-abobadado, que possui atividade moderada próximo ao meristema apical caulinar, o abobadado que possui as divisões mais intensas distantes do ápice, o cônico onde as DEM são adicionadas imediatamente abaixo do meristema apical caulinar (mac) e o levemente cônico a adição das células ocorre a partir da terceira folha.

A maior variedade de formato de ápices foi observada no gênero *Vriesea*. Isto reflete na diversidade dentro do próprio gênero o qual ocupa uma variedade de habitas. Assim, a capacidade meristemática da endoderme reflete no estabelecimento do formato do ápice e de toda planta. O mesmo foi

observado por Rudall (1991), no entanto a autora dizia ser o meristema de espessamento primário o responsável pelo formato dos ápices e hábito de crescimento nas monocotiledôneas. Neste trabalho demonstra-se que o hábito de crescimento e o formato do ápice é dado pelo balanço da atividade da endoderme e do periciclo. Esta característica foi descrita, anteriormente, em caules espessados como anatomia em coroa por Esau (1965) e por DeMason (1983).

Idioblatos com ráfides ocorreram no caule e nas raízes da maioria das espécies analisadas, fato já observado por Segecin e Scatena (2004) em dez espécies de *Tillandsia*. Ao analisar a forma das ráfides, notou-se uma variação conspícua em seu formato, sendo observados idioblastos com ráfides nas espécies de *Alcantarea*, *Vriesea crassa*, *V. atropurpurea*, *V. minarum*, *V. segadas-viannae*, *V. gigantea*; *T. geminiflora e T tenuifolia*. Cristais estilóides foram observados em *T. loliacea*, *T. usneoides* e *V. stricta*. Não foram observadas ráfides em *V. oligantha*, porém a espécie apresentou uma grande quantidade de grãos de amido.

A presença de grão de amido pode estar relacionada ao fato de seu uso gerar energia para o processo de respiração celular, além se fornecer esqueletos carbônicos para a síntese e acúmulo de ácidos orgânicos durante a noite nas folhas induzidas ao CAM. Em plantas CAM, a utilização do fosfoenolpiruvato (PEP) proveniente da quebra do amido, para a síntese e acúmulo de malato é um fator adicional para a redução noturna do conteúdo amiláceo (Popp et al., 2003; Takahashi & Mercier, 2011,).

De acordo com Silva e Scatena (2011) a presença de idioblastos contendo cristais do tipo ráfides nas raízes pode ser interpretada como sinapomorfia da família, uma vez que sua ocorrência é relatada para todas as Bromeliaceae estudadas até o momento. Nas duas espécies do subgênero Diaphoranthema foram observadas cristais estilóides. Para Poales em geral, a presença de idioblastos de cristais foi sugerida como caráter plesiomórfico (Proença & Sajo 2008). Além disso, acredita-se que esse caráter pode ser

considerado como resposta adaptativa das plantas às condições xerofíticas (Fahn & Cuttler 1992) e também pode atuar na prevenção contra ataque de herbívoros (Prychid & Rudall 2004).

Em regiões mais afastadas do ápice, as derivadas da endoderme meristemática param de ser produzidas e a endoderme se torna-se espessada com reforço em "U" em *V. crassa* e em "O" nas espécies *V. gigantea, V. atropurpurea, V. minarum e T. loliacea.* Em todas *Alcantarea* a endoderme do caule manteve-se parenquimática. A presença desta camada é suportada por suas características anatômicas e por sua própria topologia, pois é reconhecida por diversos autores como camada mais interna do córtex, por possui um sistema fisiológico único e não apenas uma camada de células com estrias de Caspary; ela pode apresentar além das estrias, suberina, amido, cristais, espessamento celulósico e ainda atividade meristemática (Van Fleet, 1942a; Van Fleet, 1942b, 1950a, b; Van Fleet, 1961; Menezes, 1971; Xifreda, 1990; Lersten, 1997; Lux & Luxová, 2003; Menezes *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2006; Morita *et al.*, 2007; Elbl, 2008; Silva, 2009; Menezes *et al.*, 2011).

Tomlinsom (1969) reporta que o cilindro central das bromélias é delimitado do córtex por uma zona estreita composta de 2-4 células que se torna esclerótica e pontoada. O mesmo autor comenta que esta zona é descrita como endoderme por autores anteriores a ele. Ainda o autor conclui, que esta região não seria uma endoderme, pois não foi observado a apresenta células suberificadas. No entanto, cita que esta zona é mais ou menos contínua com a endoderme da raiz. Portanto, baseando-se nas observações deste trabalho, pode-se afirmar que a interpretação de Tomlinsom é equivocada quanto à identidade dessa camada de células que delimita o cilindro central em bromélias. Na realidade, esta zona corresponde às células do periciclo que adjacente à endoderme formam um *continuum* de tecidos entre o caule e a raiz. Krauss (1948) se refere a esta região como um esclerênquima periférico semelhante a uma endoderme. Esta autora também estaria se referindo ao

periciclo, pois a endoderme nas bromélias é constituída por uma única camada de células e não uma região de células.

O cilindro esclerificado seria o periciclo multisseriado, que se torna espessado em todas as espécies de Tillandsia e de Vriesea com exceção de V. oligantha, e de todas as espécies de Alcantarea. Verificou-se neste trabalho que o periciclo possui origem do procâmbio como já tido por Menezes et al., (2005) e Menezes et al., (2011) e o limite entre esses dois tecidos contínuos é a formação de raízes adventícias. Krauss (1948) e Tomlinsom (1969) discutem exaustivamente sobre uma região, entre o córtex e o cilindro central, esclerificada com células de paredes finas denominada de camada dictogênica [camada geradora de raiz- Mangin (1882) diz que esta região é responsável pela formação de raízes adventícias e a ligação vascular entre o córtex e o cilindro central formando o plexo radicular periférico]. Tomlinsom (1969) cita que muitos autores denominam esta camada de periciclo e que mais externamente é ligado aos plexos das raízes. Assim, percebe-se que o limite entre córtex e o cilindro central traz inúmeras interpretações, pois a endoderme é confundida com o periciclo e sua presença muitas vezes é ignorada ou até mesmo não percebida.

Portanto as raízes intracorticais são formadas pelo periciclo. Em sua grande maioria, na região mediana do caule, com exceções: *T. usneoides*, apresenta formação de raízes apenas no início do desenvolvimento perdendo-as na fase adulta e *A. farneyi* e *T. geminiflora* apresentam a formação de raízes próxima ao ápice. Mangin (1882) notou a presença de um tecido meristemático, no limite do cilindro vascular o qual dava origem às raízes adventícias denominando-o de camada dictiogênica. De acordo com o mesmo autor este tecido se comporta de maneiras diferentes entre as monocotiledôneas. As espécies analisadas possuem atividade efêmera e limitada deste tecido sendo ativo até diferenciação das raízes. Este tipo de atividade seria uma característica comum às plantas herbáceas onde sua atividade seria condicionada a formação de raízes e plexos vasculares

periférico no cilindro vascular. Este fenômeno foi observado em todas as espécies que apresentaram espessamento evidente. Observam-se a diferenciação de todos os tecidos abaixo da região onde ocorreu a formação de raízes adventícias.

A presença da endoderme e do periciclo como camada limite entre o córtex e o cilindro central denominado estelo encontrado em todas as espécies como um atactostelo verdadeiro. Menezes (1971) confirma ser o estelo a unidade composta de xilema e floema primários envolvidos por periciclo e situado internamente à endoderme, respectivamente. Os caules aqui analisados corroboram o tipo de estelo descrito por Brebner (1902) onde o estelo é composto por cordões ou feixes dispersos difusamente = atactostelo.

Os feixes vasculares observados no estelo são colaterais e se diferenciam em dois tipos: os feixes que apresentaram protoxilema e protofloema, bem como, metafloema e metaxilema, os quais correspondem aos traços foliares; e os feixes que apresentam somente metaxilema e metafloema denominado de feixes caulinares. Observações semelhantes foram feitas para Velloziaceae por Menezes (1971), em *Cordyline fruticosa* por Cattai e Menezes (2010) e em varias monocotiledôneas por Menezes et al., (2011). A presença de protoxilema e protofloema nos traços foliares confirma o princípio geral das monocotiledôneas de que os feixes das folhas são formados por elementos de protoxilema protofloema (Zimmermann & Tomlinson, 1967; Tomlinson & Spangler, 2002). Mas Menezes (1971) demonstra que nos feixes das folhas ocorre protoxilema, metaxilema, protofloema e metafloema. Na periferia do caule observou-se uma grande concentração de feixes caulinares indicando ser o periciclo o formador dos mesmos. Assim o padrão geral observado no cilindro vascular é de feixes vasculares difusos no centro e congesto na periferia o que corrobora os estudos de Krauss (1948) com Ananas comosus.

De acordo com Falkenberg (1876 apud Tomlinson 1969) e De Barry (1884 apud Tomlinson 1969) há dois sistemas vasculares no caule: o primeiro constituído de feixes periféricos, que nunca abandonam o caule e o segundo formado pelos feixes do cilindro central, que constituem o sistema foliar. Além disso, os feixes do cilindro central mantém o padrão abaxial-adaxial das folhas pois, apesar da distribuição difusa em todo o cilindro central, o xilema é formado na parte interna/superior, ou seja, no polo adaxial, o floema se desenvolve na periferia/inferior abaxial, o que sugere a sua origem foliar (Dettmer et al., 2009). Menezes (1971) demonstrou que os traços foliares são formados por cordões de procâmbio situados no centro do caule, entremeados por cordões de procâmbio que originam feixes caulinares.

Os tecidos vasculares e a regulação da diferenciação dos tecidos condutores são dados pelo transporte de auxina (Aloni, 1987; Hamann et al., 2002). Já as diferenças estruturais que envolvem a diferenciação dos elementos traqueais do xilema são reguladas por brassinoesteroides (Yamamoto, 2001) e pelos genes *VND6* e *VND7* que determinam se o cordão de procâmbio será diferenciado, em parte, em metaxilema ou em protoxilema, respectivamente, este dois genes são fatores de transcrição regulados positivamente por auxinas, citocininas e brassinoesteroides (Dettmer et al., 2009)

Desta forma, os traços foliares originados diretamente do procâmbio ocupam as posições centrais e se deslocam à periferia para manter a vascularização das folhas. Na periferia do cilindro vascular, continuamente, são formados novos feixes caulinares apenas com metaxilema e metafloema e, como ficou aqui demostrado da origem pericíclica. É importante salientar que o periciclo sáo forma feixes caulinares (Menezes et al., 2005; Cattai & Menezes, 2010; Menezes et al., 2011) Estes feixes possuem traqueídes com menores diâmetros e são descritos como feixes corticais e muitas vezes possuem somente floema.

Todas características anatômicas aliadas às características as morfológicas encontradas neste estudo se mostram como adaptações permitiram a ocupação selecionadas que de diferentes principalmente devido à presença de caracteres anatômicos como: estelo com inúmeros feixes espalhados aleatoriamente (atactostelo), produção contínua de raízes adventícias e a ausência de câmbio (Holttum, 1955; DeMason & Wilson, 1985).

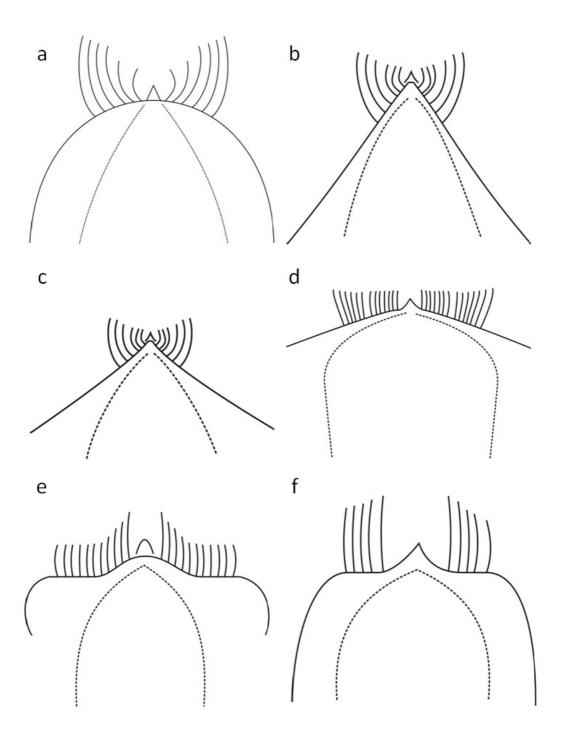


Figura 1.36: Representação esquemática do padrão do ápice caulinar encontrado nas espécies analisadas.

Em a, o padrão abobadado, em b, o cônico; c: levemente cônico; d, sub-plano; e: plano-abobadado, f: plano. Figuras baseadas na interpretação feita por (DeMason, 1983) para anatomia em coroa de caules espessados de (Esau, 1965). A linha tracejada representa o limite entre o córtex e o cilindro central.

6 Conclusões

- As espécies estudadas apresentaram muitas semelhanças morfológicas e anatômicas. Dentre estas, a presença da endoderme e do periciclo como camadas promovedoras do processo de espessamento primário do caule. No entanto, a atividade desses tecidos apresentou-se desigual no espaço e no tempo. A endoderme com um singular padrão de divisão possui como produto único o córtex radiado composto de células derivadas dessa endoderme, enquanto meristemática. Já o periciclo, por sua vez, com divisões desiguais produz feixes caulinares com metaxilema e metafloema e raízes adventícias, ambos localizados na periferia do cilindro central, ou seja, no próprio periciclo.
- ✓ Verificou-se também, que a atividade da endoderme e do periciclo contribuem para a forma final do caule.
- Além dos diferentes tecidos produzidos, a endoderme e o periciclo apresentam uma variação temporal no processo de diferenciação, pois enquanto a endoderme já produziu todas as derivadas e se diferenciou, o periciclo continua a produzir feixes e raízes. Reunindo todas as características comuns e não comuns entre as espécies estudadas, foram identificados morfotipos extremos para análise de expressão gênica de um possível marcador de atividade endoderme que será tratado no capítulo 2.
- As espécies escolhidas foram *Vriesea gigantea* e *Tillandsia usneoides*. *V. gigantea* foi escolhida como a representante das espécies que possuem espessamento conspícuo, gravitropismo negativo e alta produção de raízes adventícias; e com padrão totalmente diferenciado, *T. usneoides* foi escolhida por apresentar filotaxia dística, agravitropismo, ausência de raízes na fase adulta e ausência de espessamento do caule. As duas primeiras características coferem a esta espécie o status de neotênica, pois mantém as características juvenis quando adulta.

7 Referências

- ALONI, R. 1987. Differentiation of vascular tissues. *Annual review of plant physiology* 38: 179-204.
- BALL, E. 1941. The development of the shoot apex and of the primary thickening meristem in *Phoenix canariensis* Chaub., with comparisons to *Washingtonia filifera* Wats. And *Trachycarpus excelsa* Wendl. *American Journal of Botany* 28: 820-832.
- BARFUSS, M. H. J., R. SAMUEL, W. TILL, e T. F. STUESSY. 2005. Phylogenetic relationships in subfamily tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. *American Journal of Botany* 92: 337-351.
- BENZING, D. H. 2000. Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation. Cambridge University Press.
- Benzing, D. H., K. Henderson, B. Kessel, e J. A. Sulak. 1976. The absorptive capacities of bromeliad trichomes. *American Journal of Botany*: 1009-1014.
- BORCHERT, R. 1966. Innere Wurzeln als Festigungselement der epiphytischen Bromeliacee Tillandsia incarnata H. *BK Ber. dtsch. bot. Ges* 79: 253-258.
- Brebner, G. 1902. On the anatomy of *Danaea* and other Marattiaceae. *Annals of Botany* 16: 517-552.
- BROWN, G. K., e E. M. C. LEME. 2005. The re-establishment of Andrea (Bromeliaceae: Bromelioideae), a monotypic genus from Southeastern Brazil threatened with extinction. . *Taxon* 54: 63-70.
- CATTAI, M. B., e N. L. MENEZES. 2010. Primary and secondary thickening in the stem of Cordyline fruticosa (Agavaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 82: 653-662.
- CHAKRAVERTI, D. N. 1939a. The occurrence of fugacious cambium in the rizoma of *Curcuma longa* L. *The Philippine Journal of Science* 69: 191-195.
- CHASE, M. W., D. E. SOLTIS, P. S. SOLTIS, P. J. RUDALL, M. F. FAY, W. H. HAHN, S. SULLIVAN, J. JOSEPH, M. MOLVRAY, P. J. KORES, T. J. GIVNISH, J. SYSTMA, e C. PIRES. 2000. Higherlevel systematic of the monocotyledons: an assessment of current knowledge and a new classification. *In* K. L. Wilson and D. A. Morrinson [eds.], Monocots: Systematic and Evolution, 3-16. CSIRO Melbourne.

- CHEADLE, V. I. 1937. Secondary growth by means of a thickening ring in certain Monocotyledons. *Botanical Gazette* 98: 535-555.
- CRAYN, D. M., K. WINTER, e J. A. C. SMITH. 2004. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 3703-3708.
- DEMASON, D. A. 1983. The primary thickening meristem: definition and function in Monocotyledons. *American Journal of Botany* 70: 955-962.
- DEMASON, D. A., e M. A. WILSON. 1985. The continuity of primary and secondary growth in Cordyline terminalis (Agavaceae). *Canadian Journal of Botany* 63: 1907-1913.
- DETTMER, J., A. Elo, e Y. HELARIUTTA. 2009. Hormone interactions during vascular development. *Plant molecular biology* 69: 347-360.
- **ECKARDT** T. 1941. Kritische Untersuchungen das über primareDickenwachstum Monokotylen Ausblick bei MIT auf dessenVerhaltnis sekundaren Verdickung. Botanisches zur archiv42:289-334.
- ELBL, P. M. 2008. Estudos em Commelinaceae (Monocotiledôneas): O papel da endoderme e do periciclo na formação do corpo primário. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo,.
- ESAU, K. 1965. Plant anatomy New York: Wiley.
- FAHN, A., e F. D. CUTLER. 1992. Xerophytes. Encyclopedia of Plant Anatomy, Berlin: Gebruder Borntraeger.
- FARIA, A. P. G., T. WENDT, e G. K. BROWN. 2004. Cladistics Relationship of Aechmea (Bromeliaceae, Bromelioideae) and allied genera. *Annals Missouri Botanic Garden* 91: 303-319.
- FERREIRA, A. G E FETT-NETO, A.G. 2004. Movimento em plantas. In: Kerbauy, G. B. 2004. Fisiologia Vegetal. Guanabara Koogan.
- Freschi, L.; Takahashi, C.A.; Cambuí, C.A.; Semprebom, T.R.; Cruz, A.B.; Mioto, P.T.; Versieux, L.M.; Calvente, A.; Latansio-Aidar, S.R.; Aidar, M.P.M.; Mercier, H. (2010a). Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. *Journal of Plant Physiology*, 167 (7): 526-533
- FRESCHI, L.; RODRIGUES, M.A.; TINÉ, M.A.S.; MERCIER, H. (2010b). Correlation between citric acid and nitrate metabolisms during CAM cycle in the

- atmospheric bromeliad *Tillandsia pohliana*. *Journal of Plant Physiology*, 167: 1577-1583.
- FRESCHI L.; RODRIGUES, M.A.; DOMINGUES, D.S.; PURGATTO, E.; VAN SLUYS, M.A; MAGALHÃES, J.R.; KAISER, W.M.; MERCIER, H. (2010c) Nitric oxid mediates the hormonal control of crassulacean acid metabolism expression in young pineapple plants. *Plant physiology* 4: 1971-1985.
- GILMARTIN, A. J., e G. K. BROWN. 1986. Cladistic Tests of Hypotheses Concerning Evolution of Xerophytes and Mesophytes within Tillandsia Subg. Phytarrhiza (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* 73: 387-397.
- GIVNISH, T. J., K. C. MILLIAM, P. E. BERRY, e K. J. SYTSMA. 2007. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from ndhF sequence data. *Aliso* 23: 3–26.
- GIVNISH, T. J., T. M. EVANS, M. L. ZJHRA, T. B. PATTERSON, P. E. BERRY, e K. J. SYTSMA. 2000. Molecular Evolution, Adaptive Radiation, And Geographic Diversification in the Amphiatlantic Family Rapateaceae: Evidence From Ndhf Sequences And Morphology. *Evolution* 54: 1915-1937.
- GUILLAUD, A. 1878. Rechersches sur l'anatomie comparée et le developpement des tissues de la tige dans les monocotylédones. *Annals Sci Nat Bot Ser* 6 1-176.
- HAMANN, T., E. BENKOVA, I. BEURLE, M. KIENTZ, e G. JÜRGENS. 2002. The Arabidopsis BODENLOS gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes & development* 16: 1610-1615.
- HASLAM, R.; BORLAND, A.; MAXWELL, K.; GRIFFITHS, H. 2003. Physiological responses of the CAM epiphyte Tillandsia usneoides L. (Bromeliaceae) to variations in light and water supply. *Journal of Plant Physiology*, 160: 627–634.
- HELM J. 1936. Das Erstarkungswachstum der Palmer und einigeranderer Monokotylen, zugleich ein Beitrag zur Frage dês Erstarkungswachstum der Monokotylem überhaupt. Planta 26:319–364.
- HILU, K. W., T. BORSCH, K. MULLER, D. E. SOLTIS, P. S. SOLTIS, V. SAVOLAINEN, M. W. CHASE, M. P. POWELL, L. A. ALICE, E R. EVANS. 2003. Angiosperm phylogeny based on matk sequence information. *American Journal of Botany* 90: 1758.
- HOLTTUM, R. E. 1955. Growth-habits of monocotyledons-variations on a theme. *Phytomorphology* 5: 399-413.

- JACQUES-FÉLIX, H. 2000. The discovery of a bromeliad in Africa: Pitcairnia feliciana. *Selbyana* 21: 118-124.
- JOHANSEN, D. A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York.
- KRAUS, J. E., e M. ARDUIN. 1997 Manual Básico de Métodos em Anatomia Vegetal. EDUR (Ed. Universidade Rural), Rio de Janeiro.
- KRAUSS, B. H. 1948. Anatomy of the Vegetative Organs of the Pineapple, Ananas comosus (L.) Merr Merr. I. Introduction, Organography, the Stem, and the Lateral Branch or Axillary Buds. *Botanical Gazette* 110: 159-217.
- LERSTEN, N. R. 1997. Occurrence of endodermis with a casparian strip in stem and leaf.(Interpreting Botanical Progress). *The Botanical Review* 63: 265-268.
- LINDER, H. P., e P. J. RUDALL. 2005. Evolutionary history of Poales. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36: 107-124.
- LUTHER, H. E. 2004. An Alphabetical List of Bromeliad Binomials. *The Bromeliad Society International* 9th ed: Sarasota, Florida, USA.
- Lux, A., e M. Luxová. 2003. Growth and Differentiation of Root Endodermis in Primula acaulis Jacq. *Biologia Plantarum* 47: 91-97.
- MANGIN, L. 1882. Origine et insertion des racines adventives et modifications corrélatives de la tîge chez les monocotylédones. *Ann Sci Nat Bot* 14: 216-363.
- MARTIN, C. E., D. A. GRAVATT, e V. S. LOESCHEN. 1994. Crassulacean Acid Metabolism in Three Species of Commelinaceae. *Annals of Botany* 74: 457-463.
- MAXWELL, C.; GRIFFITHS, H.; YOUNG, A.J. (1994) Photosynthetic acclimation to light regime and water stress by the C,-CAM epiphyte *Guzmania monostachia*: gas-exchange characteristics, photochemical efficiency and the xanthophyll cycle. Functional Ecology, 8:746-754.
- MEDINA, E. 1974. Dark CO2 fixation, habitat preference and evolution within the Bromeliaceae. *Evolution*: 677-686.
- MENEZES, N. L. 1971. Traqueídes de transfusão no gênero *Vellozia* Vand. *Ciência e Cultura* 23: 389-409.
- MENEZES, N. L. D., D. C. SILVA, R. C. O. ARRUDA, G. F. MELO-DE-PINNA, V. A. CARDOSO, N. M. CASTRO, V. L. SCATENA, e E. SCREMIN-DIAS. 2005. Meristematic activity of the Endodermis and the Pericycle in the primary thickening

- in monocotyledons: considerations on the "PTM". *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 77: 259-274.
- MENEZES, N. L. D., P. M. ELBL, G. CURY, B. APPEZZATO-DA-GLÓRIA, K. L. M. SASAKI, C. G. DA SILVA, G. R. COSTA, e V. G. A. LIMA. 2011. The meristematic activity of the endodermis and the pericycle and its role in the primary thickening of stems in monocotyledonous plants. *Plant Ecology and Diversity* First: 1-13.
- MERCIER, H., G. B. KERBAUY, B. SOTTA, e E. MIGINIAC. 1997. Effects of NO3-, NH4+ and urea nutrition on endogenous levels of IAA and four cytokinins in two epiphytic bromeliads. *In* W. O. Library [ed.], 387-392. *Plant Cell & Environment.*
- MORITA, M. T., C. SAITO, A. NAKANO, e M. TASAKA. 2007. Endodermal-amyloplast less 1 is a novel allele of SHORT-ROOT. *Advances in Space Research* 39: 1127-1133.
- NANDI, O. I., M. W. CHASE, e P. K. ENDRESS. 1998. A combined cladistic analysis of angiosperms using rbcL and non-molecular data sets. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 85: 137-212.
- NELSON, E. A., T. L. SAGE, e R. F. SAGE. 2005. Functional leaf anatomy of plants with crassulacean acid metabolism. *Functional Plant Biology* 32: 409-419.
- NIEVOLA, C. C., J. E. KRAUS, L. FRESCHI, B. M. SOUZA, e H. MERCIER. 2005. Temperature determines the occurrence of CAM or C 3 photosynthesis in pineapple plantlets grown in vitro, 832-837. IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY PLANT.
- NIEVOLA, C.C.; MERCIER, H.; MAJEROWICZ, N. (2001) Levels of nitrogen assimilation in bromeliads with different growth habits. *Journal of Plant Nutrition* 24(9): 1387-1398.
- PEREIRA, P. N. 2012. Divisão espacial da atividade das enzimas PEPC e NR e sua regulação por citocininas em folhas de *Guzmania monostachia* induzidas ao CAM. Dissertação (Mestrado), Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 66 p.
- PITA, P. B. 1997. Estudo anatômico dos órgãos vegetativos de Dyckia Schultz f. e Encholirium Mart ex Schultz f.(Bromeliaceae) da Serra do Cipó-MG, Dissertação (Mestrado)-Universidade de São Paulo, São Paulo.
- PITA, P. B., e N. L. MENEZES. 2002. Anatomia da raiz de espécies de Dyckia Schult. f. e Encholirium Mart. ex Schult. & Schult. f.(Bromeliaceae,

- Pitcairnioideae) da Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil), com especial referência ao velame. *Revista Brasileira de Botânica* 25: 25-34.
- PITTENDRIGH, C. S. 1948. The bromeliad-Anopheles-malaria complex in Trinidad. I-The bromeliad flora. *Evolution*: 58-89.
- POPP, M.; JANETT, H.P.; LÜTTGE, U.; MEDINA, E. (2003) Metabolite gradients and carbohydrate translocation in rosette leaves of CAM and C3 bromeliads. *New Phytologist.* 157:649-656.
- PROENÇA, S. L., e M. D. G. SAJO. 2008. Anatomy of the floral scape of Bromeliaceae. *Revista Brasileira de Botãnica* 31: 399-408.
- PRYCHID, C. J., P. J. RUDALL, e M. GREGORY. 2004. Systematics and Biology of Silica Bodies in Monocotyledons. *The Botanical Review* 69: 377-440.
- RANKER, T. A., D. E. SOLTIS, P. S. SOLTIS, e A. J. GILMARTIN. 1990. Subfamilial phylogenetic relationships of the Bromeliaceae: evidence from chloroplast DNA restriction site variation. *Systematic Botany* 15: 425-434.
- RAUH, W., e P. TEMPLE. 1990. The Bromeliad Lexicon. Blandford.
- RUDALL, P. 1991. Lateral meristems and stem thickening growth in monocotyledons. *Botanical Review* 57: 150-163.
- SACK, F. D. 1987. The structure of the stem endodermis in etiolated pea seedlings. *Canadian journal of botany. Journal canadien de botanique* 65: 1514-1519.
- _____. 1991. Plant gravity sensing. *International Review of Cytology* 127: 193-252.
- SASS, J. E. 1951. Botanical Microtechnique Iowa State College Press.
- Schleiden MJ. 1842. Grundzüge der wissenschaftlichen Botanik.Leipzig: Wilhelm Engelmann.
- SEGECIN, S., e V. L. SCATENA. 2004a. Morfoanatomia de rizomas e raízes de Tillandsia L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, PR, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 18: 253-260.
- _____. 2004b. Anatomia de escapos de Tillandsia L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais do Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 27: 515-525.
- SILVA, C. G. D. 2009. O espessamento primário no sistema caulinar e a continuidade entre esses tecidos nos órgãos vegetativos de

- Zingiberaceae e Costaceae: enfoque nos tecidos endoderme e periciclo. Mestrado em Botânica, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SILVA, D. C. 2000. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Lagenocarpus* (Cyperaceae), Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SILVA, I. V., e V. L. SCATENA. Anatomy of the roots of nine species of Bromeliaceae (Poales) from the Amazon, Mato Grosso, Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 25: 618-627.
- SLESLAK, I.; KARPINSKA, B.; SURÓWKA, E.; MISZALSKI, Z.; KARPINSKI, S. 2003 Redox changes in the chloroplast and hydrogen peroxide are essential for regulation of C3-CAM transition and photooxidative stress responses in the facultative CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Cell Physiol*. 44: 573-581.
- SMITH, L. B. 1934. Geographical evidence on the lines of evolution in the Bromeliaceae. . Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie 66: 446-468.
- SMITH, L. B., e R. J. DOWNS. 1974. Pitcairnoideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica* 14: 1–658.
- _____. 1979. Bromelioideae (Bromeliaceae). Flora Neotropica 14: 1493–2142.
- SMITH, L. B., e W. TILL. 1998. Bromeliaceae. *In* K. Kubitzki [ed.], The Families and Genera of Vascular Plants. IV Flowering Plants Monocotyledons, Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae). 584. Springer, Berlin.
- Stevens, P. F. 2001 Angiosperm Phylogeny Group, June 2008 [and more or less continuously updated since]." will do. http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/..
- STEVENSON, D. W., e R. A. POPHAM. 1973. Ontogeny of the primary thickening meristem in seedlings of *Bougainvillea spectabilis*. *American Journal of Botany* 60: 1-9.
- TAKAHASHI, C. A., e H. MERCIER. 2011. Nitrogen metabolism in leaves of a tank epiphytic bromeliad: Characterization of a spatial and functional division. *Journal of Plant Physiology* 168: 1208-1216.
- TERRY, R. G., G. K. BROWN, e R. G. OLMSTEAD. 1997. Examination of Subfamilial Phylogeny in Bromeliaceae Using Comparative Sequencing of the Plastid Locus ndhF. *American Journal of Botany* 84: 664-670.

- TILL, W. 2000. Tillandsia and Racinaea. *In* H. Benzig [ed.], Bromeliaceae, profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press. Cambridge, 573-586.
- Tomlinson, P. B., e M. H. Zimmermann. 1969. Vascular anatomy of monocotyledons with secondary growth– an introduction. *Journal Arnold Arbor* 50: 159-179.
- TOMLINSOM, P.B. 1970. Monocotyledons-Towards an under- standing of morphology and anatomy. Pp. 205- 292 in Advances in botanical research, vol. 3, ed. R.D. Preston. London and New York: Academic Press
- TOMLINSON, P. B., e R. SPANGLER. 2002. Developmental features of the discontinuous stem vascular system in the rattan palm Calamus (Arecaceae-Calamoideae-Calamineae). *American Journal of Botany* 89: 1128-1141.
- VAN FLEET, D. S. 1942a. The development and distribution of the endodermis and an associated oxidase system in monocotyledonous plants. *American Journal of Botany* 29: 1-15.
- _____. 1942b. The significance of oxidation in the endodermis. *American Journal of Botany* 29: 747-755.
- _____. 1950a. A comparison of histochemical and anatomical characteristics of the hypodermis with the endodermis in Vascular Plants. *American Journal of Botany* 37: 721-725.
- _____. 1950b. The cell forms, and their common substance reactions, in the parenchyma-vascular boundary. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 77: 340-353.
- _____. 1961. Histochemistry and function of the endodermis. *The Botanical Review* 27: 165-220.
- VERSIEUX, L. M., e M. D. G. L. WANDERLEY. 2007. Two new species of Alcantarea (Bromeliaceae, Tillandsioideae) from Brazil. *Brittonia* 59: 57-64.
- VERSIEUX, L. M., T. BARBARA, M. DAS GRAÇAS LAPA WANDERLEY, A. CALVENTE, M. F. FAY, e C. LEXER. 2012. Molecular phylogenetics of the Brazilian giant bromeliads (Alcantarea, Bromeliaceae): implications for morphological evolution and biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 64: 177-189.
- WATANABE, H., M. SAIGUSA, e S. MORITA. 2006. Identification of Casparian bands in the mesocotyl and lower internodes of rice (Oryza sativa L.)

- seedlings using fluorescence microscopy. *Plant Production Science* 9: 390-394.
- XIFREDA, C. C. 1990. Sobre la presencia de una vaina cristalifera en el tallo de algunas especies de *Dioscorea* (DIOSCOREACEAE). *Darwiniana* (ARGENTINA) 30: 137-142.
- YAMAMOTO, R., S. FUJIOKA, T. DEMURA, S. TAKATSUTO, S. YOSHIDA, e H. FUKUDA. 2001. Brassinosteroid levels increase drastically prior to morphogenesis of tracheary elements. *Plant physiology* 125: 556-563.
- ZIMMERMANN, M. H., e P. B. TOMLINSON. 1967. Anatomy of the palm Rhapis excelsa, IV. Vascular development in apex of vegetative aerial axis and rhizome. *Journal of the Arnold Arboretum* 48: 122-142.

Capítulo II

Expressão do gene *SCARECROW* (*SCR*) durante o desenvolvimento do sistema caulinar em Poales

1 Introdução

1.1 O espessamento primário

O corpo primário das plantas começa a ser formado durante a embriogênese através da primeira divisão celular assimétrica que estabelece o padrão apical-basal no embrião. Este importante evento é denominado de polaridade e gera o suspensor e o pró-embrião, sendo o primeiro passo para o desenvolvimento dos organismos (Jügens, 1997; Mayer 1998; Raven et al., 2004). Após o estabelecimento do padrão apical-basal, divisões posteriores geram os três meristemas apicais - procâmbio, meristema fundamental e protoderme - que compõem o padrão radial (, Esau 1965; Mayer 1993). Posteriormente, durante a fase cordiforme da embriogênese, surgem os prómeristemas apical do caule e subapical da raiz. A onipresença destes prómeristemas que futuramente promoverão o crescimento pós-embrionário axial em plantas, sugere que a polaridade é um evento comum a todas as espermatófitas. Embora exista uma vasta diversidade no estabelecimento da polaridade nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário entre os diferentes grupos (ex. monocotiledôneas e eudicotiledôneas), já foram descritos alguns genes que determinam esta identidade meristemática e que são altamente conservados filogeneticamente, o que reforça a existência deste padrão de polaridade (Chandler 2008).

Assim, o desenvolvimento do corpo da planta ocorre por intermédio da atividade sequencial dos meristemas apicais e promeristemas. Estes últimos promovem através de divisões celulares a formação de todos os tecidos primários da planta (Meyerowitz, 1997, Dornelas, 2003, Wolters, 2009).

Em monocotiledôneas, além do crescimento axial promovido pelos meristemas apicais, ocorre crescimento primário em espessura (aqui chamado

de *espessamento primário*) que gera córtex no sentido centrífugo e feixes vasculares no sentido centrípeto do cilindro central, promovendo desta forma o chamado *espessamento primário* (Rudall 1991, Menezes et al., 2005, Menezes et al., 2011, DeMason 1979 a, b).

Estudos sobre espessamento primário vêm sendo realizados desde o século XIX. De acordo com diversos autores, este processo determina o crescimento em espessura em monocotiledôneas que possuem rizomas, cormos e bulbos e caules curtos com folhas dispostas em rosetas (DeMason 1979a, b e Rudall, 1991). Esses trabalhos foram unânimes em concluir que o espessamento se origina a partir da região limítrofe entre o sistema vascular e o córtex, porém a nomenclatura dada à esta região ainda não é consensual Citam-se, como exemplos, a denominação *cambium* (Schleiden, 1842), *périméristème* (Guillaud, 1878) e *couche dictiogène* (camada geradora de raiz, Mangin 1882).

No começo do século XX, baseados especialmente em observações de monocotiledôneas, vários pesquisadores reconheceram uma região próxima ao pró-meristema apical, a qual denominaram primary meristem mantle (Helm, 1936; Eckardt, 1941), zona cambial (Cheadle, 1937, Chakraverti, 1939) e meristema de espessamento primário - MEP - (Ball, 1941). Posteriormente, Zimmermann (1967) e Tomlinson (1969) propuseram o termo meristematic cap e sugeriram que o termo MEP deveria ser descartado, já que o tecido que realmente merece o nome de MEP está localizado difusamente abaixo do tecido para o qual o termo foi originalmente empregado. De acordo com esse autores, o *meristematic cap* seria responsável apenas pela expansão da região periférica do córtex. No entanto, o termo MEP foi retomado nos trabalhos de DeMason (1979 a, b) e Rudall (1991). DeMason (1979 a, b), acompanhando o desenvolvimento do bulbo de cebola (*Allium cepa* L.), demonstrou a existência meristema atividade bidirecional de um único com produzindo centripetamente sistema vascular por divisões periclinais, e centrifugamente parênquima cortical. Rudall (1991) em seu trabalho de revisão sobre MEP concluiu que para a maioria dos autores, esse meristema (MEP) apresenta atividade bidirecional e está localizado na região pericíclica, embora outros autores propusessem a existência de um MEP com atividade centrífuga (Gifford & Bayer, 1995).

Menezes et al. (2005, 2011) contestaram a existência do MEP, propondo que apenas o meristema fundamental forma córtex e apenas o procâmbio forma sistema vascular na raiz, no caule e na folha. As autoras demonstram que quando a endoderme do caule apresenta atividade meristemática, esse tecido com o periciclo simulam um único meristema. Desta forma, de acordo com as autoras, ambos os tecidos seriam os responsáveis pelo espessamento primário do caule.

É importante salientar que Menezes et al. (2005, 2011), Lima e Menezes (2009) e Cattai e Menezes (2010), em concordância com os pesquisadores do século XIX (Van Tieghem 1898) afirmaram que apenas o procâmbio forma xilema primário, floema primário e periciclo e posteriormente o periciclo é que dá continuidade funcional ao procâmbio produzindo tecidos vasculares.

Diante das controvérsias expostas, surge a necessidade de determinar a origem do espessamento primário do caule em monocotiledôneas. Isto é, se o tecido vascular e o cortical surgem a partir de um único tecido (homogêneo), o MEP, ou se existem dois tecidos, endoderme e periciclo, originando córtex e tecido vascular, respectivamente. Desta maneira, é altamente desejável identificar um gene marcador que permita discriminar os dois tecidos através da "territorialidade" do seu padrão de expressão.

1.2 O gene SCR.

O gene *scarecrow* (*SCR*) foi identificado pela primeira vez na raiz da planta modelo *Arabidopsis thaliana* como um gene que determina a formação do padrão radial (Scheres et al., 1995, Di laurenzio, 1996, Scheres & Benfey, 1999) Nestes trabalhos os autores observaram que plantas mutantes para os genes *wooden, gollum, fass, shortroot* (*shr*), *scarecrow* (*scr*) e *pinochio* resultam em alterações fenotípicas na organização radial do embrião e da raiz, sendo

que os três últimos afetam particularmente a endoderme e as demais camadas do córtex.

Di laurenzio et al. (1996) analisaram o padrão de expressão do SCR durante o desenvolvimento embrionário e pós-embrionário de A. thaliana. Durante a embriogênese a expressão do SCR foi detectada a partir estágio cordiforme, especificamente nas células do meristema fundamental antes da divisão periclinal que gera córtex e endoderme. Após a divisão do meristema fundamental a expressão se restringiu à endoderme. Da mesma forma, já na fase pós-embrionária, na raiz a expressão do gene ocorreu na endoderme e na célula córtex/inicial endodérmica (CEI), célula adjacente ao centro quiescente da raiz. Di laurenzio et al. (1996) concluíram que a expressão de SCR está intimamente relacionada às duas divisões assimétricas. A primeira divisão da CEI é anticlinal e gera duas células com destinos distintos: a célula próxima ao CQ irá continuar a funcionar como inicial, enquanto a outra passa por uma segunda divisão – periclinal - que gera córtex e endoderme. No mutante scr, a segunda divisão assimétrica é eliminada, resultando em uma única camada de células. Da mesma maneira, durante o desenvolvimento embrionário do mutante, o meristema fundamental não se divide para formar córtex e endoderme.

Fukaki et al. (1998), identificaram dois mutantes de *A. thaliana, sgr1* e *sgr7*, que apresentaram comprometimento do gravitropismo. Análises genéticas demonstraram que essas mutações são variações alélicas dos genes *scr e shr*, respectivamente. A caracterização destes mutantes revelou a ausência de uma endoderme no hipocótilo e no caule aéreo, sugerindo então que a endoderme é essencial para a percepção do sentido gravitrópico neste órgão. Adicionalmente, as análises revelaram que, além do papel no padrão de radiação radicular, *SCR e SHR* determinam a organização radial também no caule. Com o intuito de investigar a relação entre a formação do padrão radial em caule e raiz, Wysocka-Diller et al. (2000) realizaram um estudo aprofundado sobre o perfil de expressão de *SCR* e o fenótipo da mutante. Além de confirmar o padrão de expressão descrito na raiz por Di laurenzio et al.

(1996), foi verificado que *SCR* é expresso também na bainha amilífera do hipocótilo, do caule aéreo e nas chamadas bainhas dos feixes vasculares das folhas. Desta forma a expressão do *SCR* é detectada na camada adjacente aos tecidos vasculares. Isto é particularmente evidente durante o desenvolvimento da folha, quando a expressão do *SCR* se torna progressivamente restrita às camadas de células localizadas na proximidade dos elementos vasculares. Isto sugere que vascularização é um pré-requisito para padronização do tecido fundamental e que é mediada pelo *SCR* (Wysocka-Diller et al., 2000).

Resumindo, o padrão de expressão observado se correlaciona com o padrão de defeitos tanto em raiz quanto em caule sugerindo assim, a existência de um mecanismo regulatório molecular comum na determinação do padrão radial em ambas as partes da planta.

Posteriormente aos trabalhos realizados em *A. thaliana*, estudos sobre o controle gênico do desenvolvimento em monocotiledôneas caracterizaram o papel do gene *SCR* em *Zea mays* e *Oryza sativa* (Lim et al., 2000; Kamiya, 2003, Lim et al., 2005). Lim et al. (2000, 2005) ao analisar o desenvolvimento do embrião de *Z. mays* demonstraram que *SCR* é expresso na endoderme da raiz, no primórdio foliar e ao redor do feixe da folha expandida. Mutantes para *scr* em milho apresentam deformidade dos tecidos do mesofilo da folha, porém mantém a organização do tecido vascular apesar de diminuir a quantidade dos mesmos (Lim, 2001). Em arroz (Kamiya et al., 2003), a expressão do *SCR* se mostrou muito semelhante ao de milho. Adicionalmente, foi observado que além do envolvimento na divisão assimétrica que gera córtex e endoderme, o *SCR* participa da formação dos estômatos e da lígula.

1.3 A família multigênica GRAS.

O gene *SCR*, assim como *SHR* (*shoot-root*) codificam fatores de transcrição (FTs) pertencentes à família multigênica GRAS (Lee et al., 2008). Como mencionado acima, enquanto a expressão do *SCR* está principalmente localizada na endoderme, *shr* é transcrito no estelo. A proteína SHR produzida no cilindro vascular é direcionada à endoderme, onde estimula a expressão de

SCR. Assim juntos, SCR e SHR regulam o desenvolvimento da endoderme e do córtex. Em arabidopsis foram descritos 33 membros da família GRAS, e ortólogos a SCR vêm sendo descritos em milho, ervilha, pinus e arroz (Lim et al., 2000; Sassa et al., 2001; Kamiya et al., 2003; Lim et al., 2005; Laajanen et al., 2007). O nome da família deriva do nome dos membros originalmente descritos: GAI (Gibberellic Acid Insensitive), RGA (Repressor of GAI) e SCR (Scarecrow) (Di Laurenzio et al., 1996; Peng et al., 1997; Pysh et al., 1999; Lim et al., 2000; Bolle, 2004; Lim et al., 2005). As proteínas da família GRAS são FTs específicos de plantas (Lee et al., 2008) que surgiram antes da divergência das eudicotiledôneas e monocotiledôneas entre 150 e 300 milhões de anos atrás (Wolf et al., 1989; Wikstrom et al., 2001; Tian et al., 2004). Estas proteínas terminal variável possuem extremo amino com repetições um homopoliméricas do tipo Molecular Recognition Features que viabilizam a interação proteína-proteína dos FTs com múltiplos parceiros mediando assim o sinal frente a múltiplos estímulos (Sun et al., 2011). Já o extremo carboxi terminal (C-terminal) contém os cinco domínios conservados característicos: VHIID, flanqueado por duas regiões ricas em leucina (LHRI e LHRII), PFYRE e SAW (Bolle et al., 2004) (Figura 2.1.).

Um estudo recente (Lim et al., 2005) descreveu a existência de 9 clados na família GRAS, são eles: PAT1, DELLA, SCL3, SCL4/7, LAS (SCL18), HAM, LISCL, SCR e SHR (figura 2.2). Os produtos proteicos desta família têm sido associados a diversos processos do desenvolvimento vegetal, tais como: a iniciação de meristemas axilares (LAS; Schumacher et al., 1999, Greb et al., 2003), a manutenção do meristema apical caulinar (HAM; Stuurman et al., 2002), a transdução de sinal de giberelinas (DELLA, Peng et al., 1997, 1999, Silverstone et al., 1998, Ikeda et al., 2001), a transdução de sinal luminoso (PAT1, Bolle et al., 2000), , o alongamento das células da endoderme em raiz. (SCL3, Heo et al., 2011), a resposta a estresse ambiental (SCL4/7, Ma et al., 2010), e microsporogênese (LISCL, Morohashi et al., 2003). Finalmente, o clado SCR é o que contém os genes *SCR* para os quais foi demonstrado o envolvimento na atividade endodérmica e a organização radial da raiz e do

caule previamente descrito (Di Laurenzio et al., 1996, Kamyia et al., 2003 e Lim et al., 2000 e 2005).

A conservação e a divergência da família GRAS entre monocotiledôneas e as eudicotiledôneas foi estudada por Lim et al., (2005), que demonstra uma duplicação do gene *SCR*, revelendo um novo gene: o scl23. Segundo o autor o gene *scl23* é conservado em arroz, arabidopsis, e milho, sugerindo fortemente a relação ortólogos entre *ZmSCR* e *AtSCR*. As evidências a respeito dos padrões de expressão gênica somadas aos fenótipos descritos em plantas mutantes para o gene *scr* sugerem claramente a sua associação com a atividade endodérmica. Desta maneira, este gene se apresenta como um candidato interessante a ser testado como marcador com o intuito de discriminar a putativa homogeneidade tissular do MEP.

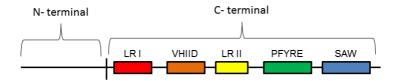


Figura 2.1: Estrutura das proteínas da família GRAS.

Representação esquemática das proteínas GRAS. A porção amino-terminal (N- terminal) região é altamente variável. A porção carboxi-terminal (C- terminal) apresenta cinco domínios conservados com as sequencias aminoacídicas indicadas no gráfico.

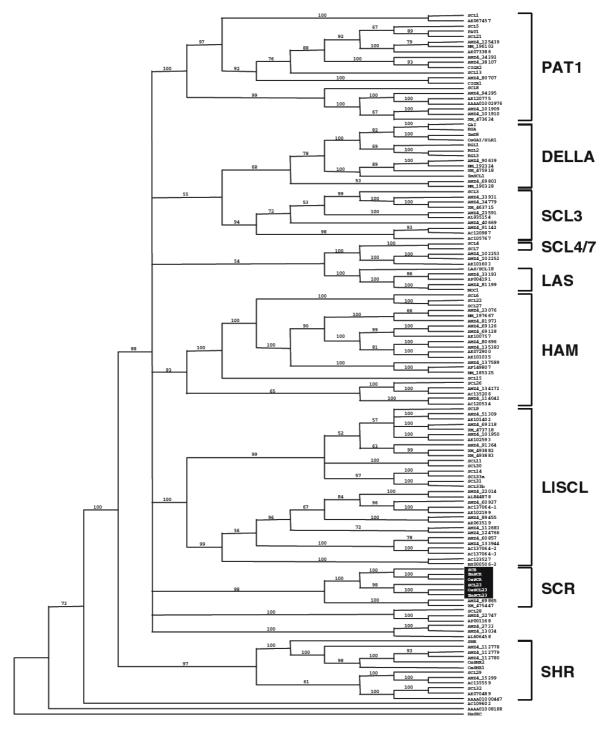


Figura 2.2: Relações fenéticas das sequencias das proteínas da familia GRAS.

53 taxa sendo 33 de *Arabidopsis thaliana*, 50 de *Zea mays*, 52 de *Oryza sativa*. As distâncias genéticas foram inferidas utilizando o método Neighbor-Joining. A árvore foi enraizada usando a proteína humana STAT (HsSRC) como grupo externo como reportado por (Bolle 2004 e Lim et al., 2005). O bootstrap utilizado foi de 2000 réplicas. O clado SCR está ressaltado em preto e em detalhe a sequência SCR e SCL23. Os números de acesso de cada terminal podem ser encontrados no corpo do texto e material suplementar de Lim et al., (2005).

2 Objetivo geral

Verificar a associação entre o espessamento primário e a expressão do SCR em Tillandsioideae

2.1 Objetivos específicos

- 1. Avaliar se *SCR* é um marcador de atividade endodérmica na planta modelo *Zea mays*.
- 2. Clonagem e caracterização de SCR de Vriesea gigantea.
- 3. Analisar o padrão de expressão de *SCR* em morfotipos diferentes de Tillandsioideae

3 Materiais e Métodos

3.1 Material Vegetal.

Para a avaliação de *SCR* como possível marcador da atividade endodérmica foram realizados experimentos de morfometria e ontogênese acoplados à analise de hibridização in situ para avaliação do padrão de expressão em *Zea* mays L. (cultivar Pionner 30k75).

Para a clonagem do gene *SCR* de *Vriesea gigantea* (Mart. ex Schult. f.) Mez foram utilizadas plantas cedidas pelo Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências-USP (Profa. Helenice Mercier).

Para os experimentos de expressão gênica de Tillandsioideae foram utilizadas as espécies *Vriesea gigantea* e *Tillandsia usneoides* (L.) L. Esta última coletada na Serra do Cipó (Tabela 1.2, Capítulo I) e mantida no fitotério do Instituto de Biociências-USP.

3.2 Cultivo e coleta de amostras e análise de crescimento de Zea mays

As sementes foram germinadas em incubadora sobre papel filtro em câmara úmida a 25ºC e fotoperíodo de 16h. Após a emissão da radícula as plântulas foram cuidadosamente transferidas para um dispositivo construído especialmente com o intuito de quantificarmos a taxa de crescimento das plântulas (raiz primária/parte aérea) onde cresceram durante 22 dias (figura 2.3). As plântulas foram regadas diariamente com água filtrada e a cada quatro dias forneceu-se fornecido meio nutritivo MS líquido (Murashige & Skoog, 1962). Durante toda a análise as plântulas foram mantidas em uma sala de cultura a 25ºC e com fotoperíodo de 16h.

Durante os 22 dias foram realizados medições e coletas diárias. Para manter o caráter aleatório da coleta foi realizado um sorteio de números

utilizando o programa R (R Development Core Team, 2011). Foram coletados quatro exemplares por dia, sempre às 18h. Para avaliar os parâmetros de crescimento, foram tomadas fotos para posterior medição as quais foram registradas sempre às 10 horas da manhã. As medições da parte aérea (desde a base do hipocótilo até o início da expansão da folha), e da raiz primária (desde a base do hipocótilo até o ápice radicular) foram realizadas utilizando o programa Image J (Rasband, 1997). Além disso, foram feitas anotações sobre as emissões de todas as estruturas durante o desenvolvimento da planta (raízes seminais, raízes adventícias, nós, entrenós, folhas e etc). Para análise de taxa de crescimento foi utilizado o programa Microsoft Excel®.

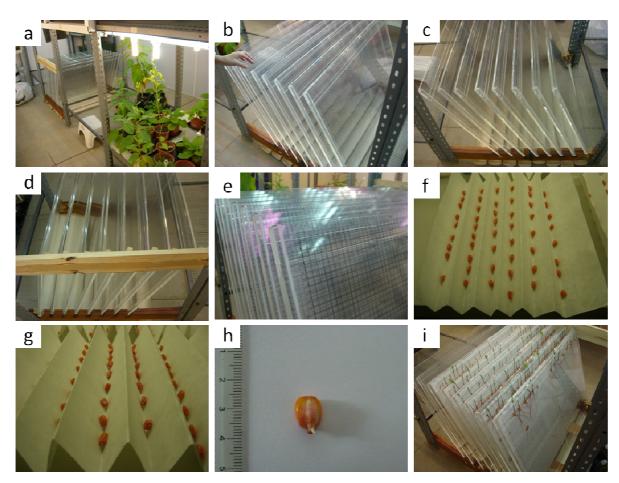


Figura 2.3: Montagem e instalação do dispositivo para análise do crescimento de plântulas de Zea mays

Em **a-e**, visão geral do dispositivo. Em **f-g**, local de geminação em incubadora. Na figura **h**, a semente e em **i**, as plântulas em crescimento.

3.3 Hibridização in situ

Tanto as amostras de *Z. mays* quanto as de *V. gigantea* e *T. usneoides* foram fixadas em paraformaldeído 4% a 4° C por no máximo 16 h. Posteriormente, foram submetidos à desidratação etanólica até álcool 100 Gl, seguida de inclusão em paraplast (Ruzin, 1999). No material emblocado realizaram-se cortes seriados de 10μ m, posteriormente as lâminas foram montadas e mantidas a 4° C.

A sonda utilizada para *Zea mays* foi um fragmento de 330 pb contendo o último exón e a região 3'UTR (untranslated region) do RNAm do gene scarecrow de *Z. mays*. O clone foi gentilmente cedido pelo Prof. Jun Lim da Universidade de Konkuk, Coréia. A sonda específica de *Vriesea gigantea* foi clonada neste trabalho e está detalhada nos itens a seguir.

As sondas foram obtidas e simultaneamente marcadas por transcrição *in vitro* utilizado o Kit DIG-dUTP (Roche cat# 11175025910). Para os dois genes estudados no trabalho foram obtidas sonda antisenso (para identificação do RNAm correspondente) e senso (controle negativo) a partir da transcrição dos promotores T7 e Sp6, respectivamente (figura 2.4).

Durante o tratamento da pré-hibridização, a parafina foi removida com duas lavagens de xilol de 10 minutos cada. Posteriormente, os cortes foram lavados duas vezes com etanol 100% por 2 minutos. Finalmente, foi realizado um tratamento com Proteinase K (1µg/ml em 0,05M Tris-HCl pH 7,5) por 10 minutos a 37°C. A hibridização foi realizada a 42°C por 16h, em solução de hibridização (1mM Tris-HCl, pH7,5; 1mMNaCl; 50% formamida; 5mM EDTA, pH8,0; 1xDenhardts e 50% Dextran Sulfato) contendo 300-600ng de sonda marcada. Para *Zea mays*, foram realizadas quatro lavagens de 20 minutos cada, a 42°C, sendo duas lavagens com 4xSSC/20% e duas com 2xSSC/20% formamida. Já para as espécies de Tillandsioideae foram realizadas quatro lavagens de 20 minutos cada, a 42°C, sendo duas lavagens com 4xSSC e duas com 2xSSC. A detecção da sonda foi realizada utilizando um anticorpo anti-DIG (Roche) conjugado à fosfatase alcalina a qual foi revelada com o substrato

NBT/BCIP (PIERCE, USA) segundo Ruzin (1999) e Santa-Catarina et al. (2004). Após essas etapas, o material foi submetido à série de desidratação em EtOH/xilol e montado em Permount para posterior visualização em fotomicroscópio Leica do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências-USP.

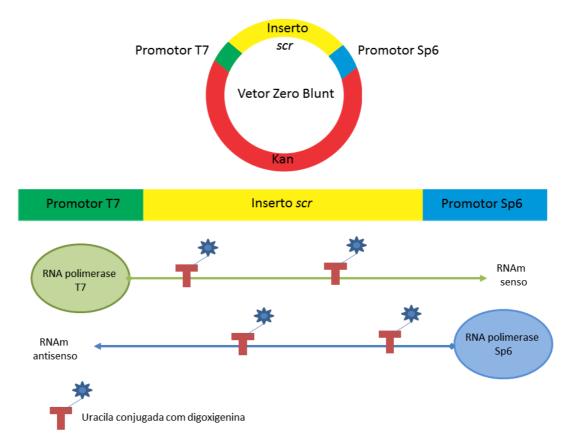


Figura 2.4. Obtenção das sondas para os experimentos de hibridação in situ. Representação esquemática do vetor contendo um fragmento do cDNA do gene *SCR* (de *Zea mays* ou *Vriesea gigantea*) para obtenção das sondas sendo e antisenso. A sonda antisenso (para identificação do RNAm) e senso (controle negativo) foram obtidas por transcrição in vitro a partir da dos promotores T7 e Sp6, respectivamente.

3.4 Clonagem do SCR de Vriesea gigantea

3.4.1 . Análise de sequências e iniciadores

Para o desenho de iniciadores e posterior clonagem do gene *SCR* de *V. gigantea* foi realizado um levantamento das sequências homólogas disponíveis no GenBank (http:://www.ncbi.nlm.nih.gov) e Phytozome (http://www.phytozome.net) (tabela 2.1) seguido de uma posterior análise fenética. As sequências de aminoácidos foram alinhadas e analisadas utilizando os programas CLUSTALW (http://www.clustalw.genome.ad.jp.) e MEGA 4.1 (http://www.megasoftware.net) respectivamente. As distâncias genéticas foram inferidas utilizando o método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) e o *boostrap* calculado a partir de 1.500 réplicas.

Para amplificação do gene *SCR* de *V. gigantea* foram desenhados iniciadores específicos sobre regiões conservadas das sequências dos genes *SCR* de *Z. mays, S. bicolor* e *O. sativa* utilizando o programa Oligo Analyzer 3.1 (http://www.idtdna.com). Os iniciadores satisfizeram as seguintes premissas: presença de pelo menos 40 % de GC, e sem a formação de grampos estáveis, homo e heterodímeros. Para determinar a identidade do gene *SCR* clonado de *V. gigantea* foi realizado um alinhamento local utilizando o programa BLAST (Altschul et al., 1997) para comparação com o banco de dados do GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Para avaliar a identidade do fragmento gênico clonado com os correspondentes ortólogos foi realizado um alinhamento global no EMBL (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/).

Tabela 2.1: Proteínas da família GRAS utilizadas na análise fenética¹.

GENE	Código de acesso	Banco de dados			
At4g00150	AAM08829.1	GenBank			
AtAC012561_8	AAF87875.1	GenBank			
AtPAT1	Q9LDL7.1	GenBank			
AtPAT1(2)	NP_974903.1	GenBank			
AtPAT1b	NP_199626.1	GenBank			
AtSCL1	NP_173566	GenBank			
AtSCL11	NP_200753	GenBank			
AtSCL15	023210.2	GenBank			
AtSCL21	NP_178566.1	GenBank			
AtSCL23	Q9FHZ1.1	GenBank			
AtSCL3	NP_175459	GenBank			
AtSCL30	Q9SNB8.1	GenBank			
AtSCL31	Q3EDH0.1	GenBank			
AtSCL32	Q9SN22.1	GenBank			
AtSCL33	P0C883.1	GenBank			
AtSCL34	P0C884.1	GenBank			
AtSCL5	NP_175475	GenBank			
AtSCL6	AAD24406.1	GenBank			
AtSCL9	NP_181301	GenBank			
AtSclp	CAB82667.1	GenBank			
AtSclp 2	CAB62330.1	GenBank			
AtSCR	AAB06318	GenBank			
AtSHR	NP_195480	GenBank			
OsAC	AAM08829.1	GenBank			
OsCGR	AAL61821.1	GenBank			

OSHR2	NP_001060149	GenBank
OsPAT1	BAG90429.1	GenBank
OsSCL11	NP_001068548	GenBank
OsSCL1c	BAD27680.1	GenBank
OsSCL1d	BAD27679.1	GenBank
OsSCL3	NP_001045391	GenBank
OsSCL5	NP_001049245	GenBank
OsSCL9 2	NP_001044771	GenBank
OsSclr	NP_001060023	GenBan
OsSCR	AB180961.1	GenBank
PsySCR	ABH85406.1	GenBank
Sb0160.1	Sb01g015760.1	Phytozome
Sb0550.1	Sb05g027750.1	Phytozome
Sb0570.1	Sb05g027770.1	Phytozome
Sb0580.1	Sb05g027780.1	Phytozome
Sb0583.1	Sb05g027783.1	Phytozome
Sb0940.1	Sb09g001140.1	Phytozome
Sb0950.1	Sb09g020850.	Phytozome
SbSCL23	Sb02g036680.1	Phytozome
SbSCR	Sb05g001500.1	Phytozome
SbSCR2	Sb03g041760.1	Phytozome
VvSCR	CBI31126.3	GenBank
ZmSCL1	AAC98090.1	GenBank
ZmSCL23	AAR15507.1	GenBank
ZmSCR	AAG13663	GenBank

 $^{^{\}rm 1.}$ $\,$ A nomenclatura dos genes corresponde ao código utilizado pelos respectivos Bancos de dados.

3.4.2 Extração do DNA genômico de Vriesea gigantea

A extração de DNA genômico de *V. gigante* foi realizada segundo o método de Fulton et al. (1995) com modificações. 100mg de folhas jovens e foram macerados com 200μl Tampão Micropep (Sorbitol 150mM, Tris 130mM, EDTA 20mM, NaCl 850mM, CTAB 0,85% p/v, Sarkosyl 0,85% p/v, bissulfito de sódio 35mM, pH =7,0). Adicionaram-se 550μl mais de Tampão Microprep e, após agitoção, a preparação foi incubada por 1h a 65 °C. Em seguida foram adicionados 650μl de clorofórmio:isoamílico (24:1) e a amostra foi misturada por inversão. Após centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos em 22°C (centrífuga MPW-350R, rotor nº 11469). A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionou-se 80% do volume de isopropanol gelado. O DNA foi precipitado por centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos. Depois de lavar com etanol 70% e secar a amostra. O DNA foi ressuspendido em 50 μl de água milliQ. A integridade do DNA purificado foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% p/v em TBE 0,5X (Tris 45mM, ácido bórico 45mM e EDTA 1mM).

3.4.3 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de PCR foram realizadas utilizando como molde 100ng de DNA em 50 μL contendo 1X de tampão (Invitrogen® cat# 11708-013), 10 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2,5 mM de MgSO₄, 10 pmol de cada iniciador (senso: 5′GCCCCCAAGGTGGTGACAATGG 3′ e antisenso: 5′GCAGAGGTCCTTCCACCCGAGC 3′) e 5U de polimerase de DNA Taq Platinum *pfx* (Invitrogen® cat# 11708-013). A amplificação foi realizada em um termociclador (Biocycler, modelo MJ96G) com o seguinte programa: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 64°C por 30 segundos e 68°C por 3 minutos, seguido de um ciclo final de extensão de

 68° C por 10 minutos. Alíquotas de 5 µL dos produtos de PCR foram separados por eletroforese a 60 volts em gel de agarose 0,8% p/v em tampão TBE 1/2X (450 mM de Trisborato e 1 mM de EDTA) e coradas com brometo de etídeo.

O fragmento amplificado de tamanho esperado contendo 390 pb foi purificado diretamente da reação de PCR com o kit GFX TM PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, cat # 28-9034-70) seguindo as orientações do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram verificados por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE 1/2X. Os produtos foram submetidos à reação de ligação no vetor pCR- Blunt® II TOPO (Invitrogen cat# 45-0245) segundo as especificações do fabricante. A ligação compreendeu em: aproximadamente 10 ng do fragmento purificado, 1μl de solução salina, 10 ng de vetor pCR- Blunt® II TOPO e água milliQ até o volume de 6 μl. A reação foi incubada por 40 minutos em temperatura ambiente.

3.4.4 Transformação

O produto de ligação foi introduzido em *Escherichia coli* (cepa DH10B) por choque térmico. Adicionaram-se 2 μl do produto da ligação a 50 μl de células competentes. As células foram incubadas no gelo por 30 minutos e submetidas a choque térmico por 45 segundos a 42°C. Posteriormente, adicionaram-se 500 μl de LB (Luria Bertani – 10g/L de bactotriptona, 5g/L de extrato de levedura e 10g/L de NaCl) à mistura de transformação para recuperação das bactérias e incubadas por 40 minutos em agitação de 200 rpm a 37°C. Em seguida, 250 μl de cada transformação foram plaqueados em meio LB sólido com 50 μl/ml de canamicina, 40 μl/ml de X-gal (5-bromo-4-chloro-indolyl-beta-D-galactopyranoside) e 250 μl/ml de IPTG (isopropyl beta-D-1-thiogalactopyranoside). As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas. As colônias brancas recombinantes foram cultivadas em 4 ml de meio LB líquido com 50 μl/ml canamicina a 37°C por 16 horas sob agitação. Para

estoque 500 μl deste cultivo mais 500 μl de glicerol 50% foram colocados em *criotubo* e armazenados a -80º C. A partir do cultivo restante foi extraído DNA plasmidial utilizando o kit Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen cat# 12143). A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% p/v em tampão TBE 1/2X.

3.4.5 Sequenciamento

Os fragmentos clonados foram sequenciamentos a partir dos iniciadores universais do vetor utilizando BigDye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems® cat# 4337455) seguindo-se as especificações do fabricante. Os produtos das reações de sequenciamento foram posteriormente lidos no sequenciador ABI3130 (Laboratório de Genética Molecular de Plantas do IB-USP).

4 Resultados

- 4.1 O gene scarecrow (ZmSCR) como marcador de atividade endodérmica na planta modelo Zea mays.
- 4.1.1 Estudo morfométrico para determinação da melhor fase de desenvolvimento para a análise temporal e espacial da expressão de SCR.

Para analisar a correlação entre expressão de *ZmSCR* e a atividade da endoderme, foi realizado um estudo morfométrico acoplado a uma análise morfológica e anatômica que permitiu definir temporalmente a formação de todos os tecidos primários da planta. Assim, foi analisado o crescimento de plântulas de milho desde a emergência da radícula por 22 dias acompanhando o surgimento de novas estruturas associadas à alta divisão celular.

Durante o período analisado, a parte aérea apresentou uma taxa de crescimento menor (2,95 mm/dia) que a raiz primária (15,46 mm/dia). No entanto, é possível observar que ambas as partes apresentam o mesmo ciclo de flutuações (figura 2.5).

O monitoramento morfológico e anatômico permitiu definir seis fases na formação do corpo primário do caule em *Zea mays* (figura 2.6). Entre o primeiro e o quarto dia (1-4 DDG) foi observado o surgimento da raiz primária que permaneceu ativa durante os 22 dias da análise. O epicótilo se alonga e inúmeros cordões de procâmbio são formados na região da plúmula. Na segunda fase (4-5 DDG) surgem raízes adventícias seminais a partir do nó cotiledonar e do epicótilo. Na fase 3 (5-6 DDG) a concentração de cordões procambiais na plúmula aumenta e, próximo ao ápice, ocorre a formação da primeira raiz adventícia. Concomitantemente, surge uma região composta por figuras mitóticas ao redor de todo o cilindro vascular formando o atactostelo com endoderme e periciclo. Nesta fase, o periciclo começa a produzir feixes caulinares com metaxilema e metafloema. Na fase

4 (6-7 DDG) o primeiro nó é detectado e surge a primeira folha do coleóptilo que se alonga conspicuamente. Um córtex radiado se torna evidente. Após este evento, durante a fase 5 (7-9 DDG) a plântula continua a produzir inúmeras raízes adventícias, observam-se inúmeros feixes caulinares na região do periciclo e a primeira folha se expande. Posteriormente, na fase 6 os entrenós se alongam (9-13 DDG). A partir deste momento, nós que estavam congestos se desenvolvem dando inicio a um ciclo de eventos modulares que se repetem até a planta atingir a fase reprodutiva. Desta forma, o estudo realizado permitiu concluir que, até o 13º dia todas as estruturas que compõem o corpo primário de *Zea mays* (cultivar Pionner 30k75) estão formadas. A partir dos resultados obtidos foi proposta a avaliação da expressão do gene *ZmSCR* nas primeiras 5 fases descritas.

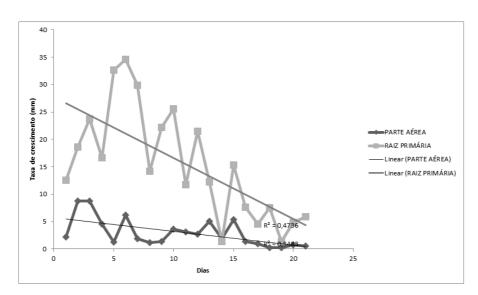
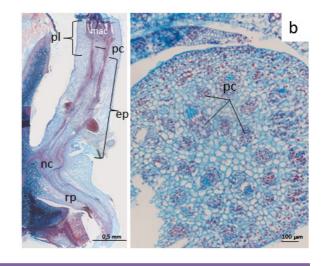


Figura 2.5: Taxa de crescimento de Zea mays. As plantas foram analisadas durante 22 dias de crescimento.

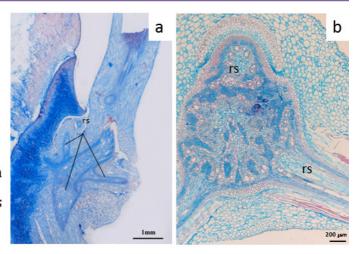
1

1-4 DDG: Formação da raiz primária (rp) e de inúmeros cordões de procâmbio (pc) formados próximos ao meristema apical caulinar (mac). Nesta fase a plântula é formada por raiz primária, nó cotiledonar (nc), epicótilo (ep) e plúmula (pl).



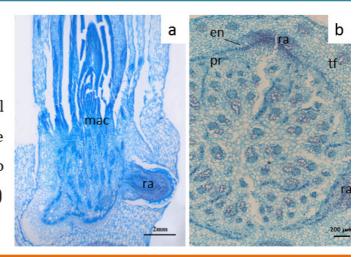
2

4-5 DDG: Na região do nó cotiledonar a são produzidas diversas raízes adventícias seminais (rs) .

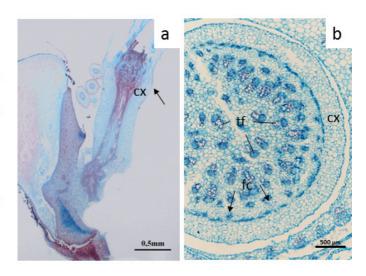


3

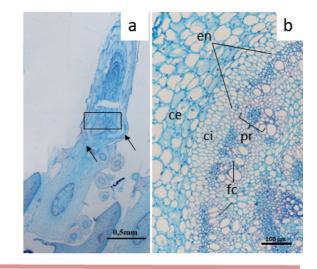
5-6 DDG: Próximo ao meristema apical caulinar (mac) ocorre a formação de raízes adventícias (ra), e a formação do atactostelo envolto pela endoderme (en) e periciclo (pr).



6-7 DDG: O primeiro nó é detectado (seta) e do coleoptile emerge a primeira folha (dado não ilustrado). Nesta etapa o córtex (cx) radiado se torna evidente. E o periciclo começa a produzir feixes caulinares (fc -setas).



5 7-9 DDG: Intensa produção de raízes adventícias (setas). O primeiro nó tornase conspícuo, apresentado um córtex interno (ci) e um externo (ce). Na região do periciclo (pr) observam-se inúmeros feixes caulinares e a endoderme (en) finalmente inicia a sua diferenciação.



6

<u>9-13 DDG</u>: Início da expansão dos entrenós que estavam compactados

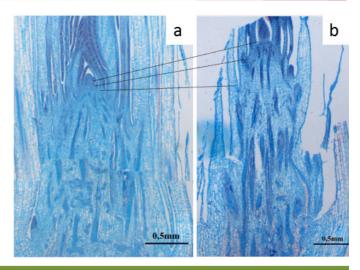


Figura 2.6: Detalhamento da análise morfológica e anatômica do estudo morfométrico Zea mays.

O desenvolvimento do corpo primário da planta foi classificado em seis fases. DDG: dias depois germinação. As seções longitudinais e transversais das respectivas fases de forma detalhada o surgimento dos tecidos primários e das estruturas correspondentes a cada fase. As siglas correspondem a: cx: córtex, en: endoderme, ep: epicótilo, mac: meristema apical caulinar, nc: nó cotiledonar, ra: raiz adventícia, rp: raiz primária, rs: raiz seminal, pl: plúmula, pc: procâmbio, pr: periciclo, tf: traço foliar.

4.1.2 Padrão de expressão de ZmSCR em Zea mays.

A partir da análise morfométrica e anatômica descrita no item anterior, foi proposta a avaliação qualitativa temporal e espacial de *ZmSCR* durante as cinco primeiras fases do desenvolvimento da plântula de *Zea mays* durante as quais todos os órgãos e tecidos do corpo primário da planta são formados (figuras 2.6). Para isto foram obtidas lâminas a partir do material coletado e realizados experimentos de hibridização *in situ* utilizando uma sonda complementar ao RNAm de *ZmSCR*.

Na fase 1 (1-4 DDG) *ZmSCR* é expresso na região imediatamente abaixo do meristema apical caulinar em todos os cordões de procâmbio; verificou-se também, que a expressão ao redor dos feixes vasculares nas folhas adjacentes. É oportuno mencionar que a epiderme das folhas em desenvolvimento apresentou marcação (figuras 2.7 a-h). Na fase 2, (figuras 2.8 a-c) o sinal da sonda de *ZmSCR* foi observado especificamente na endoderme do epicótilo e na endoderme das raízes seminais.

Posteriormente, na fase 3 (5-6 DDG) foi possível identificar o RNAm de *ZmSCR* associado ao surgimento das raízes adventícias. Ainda mais, a forte expressão do *ZmSCR* se amplia formando uma linha contínua revelando a endoderme ao redor do atactostelo. Finalmente, tanto os feixes vasculares da folha quanto do os feixes do interior do atactostelo, traços foliares, também expressam *ZmSCR* ao seu redor(figura 2.9 a-f). Na fase 4 (6-7 DDG) o córtex já evidente composto por células radiadas não apresenta expressão de *SCR*, enquanto que a endoderme que o originou continua revelando a presença de RNAm do gene marcador, pois produzirá ainda o córtex interno evidente na fase 5. O periciclo nesta fase inicia a formação de feixes caulinares com apenas metaxilema e metafloema. O contorno dos traços foliares ainda apresenta-se marcado (figura 2.10). Na fase 5 (7-9 DDG) a endoderme deixa de expressar *ZmSCR* e o RNAm do gene que é unicamente identificado nas raízes adventícias. Nota-se, também, uma região composta

de inúmeros feixes caulinares na região do periciclo que não apresentam expressão (figura 2.11).

Concluímos assim, que a expressão de *SCR* se restringe à endoderme meristematicamente ativa demonstrando a sua utilidade para identificar atividade endodérmica como proposto no presente trabalho.

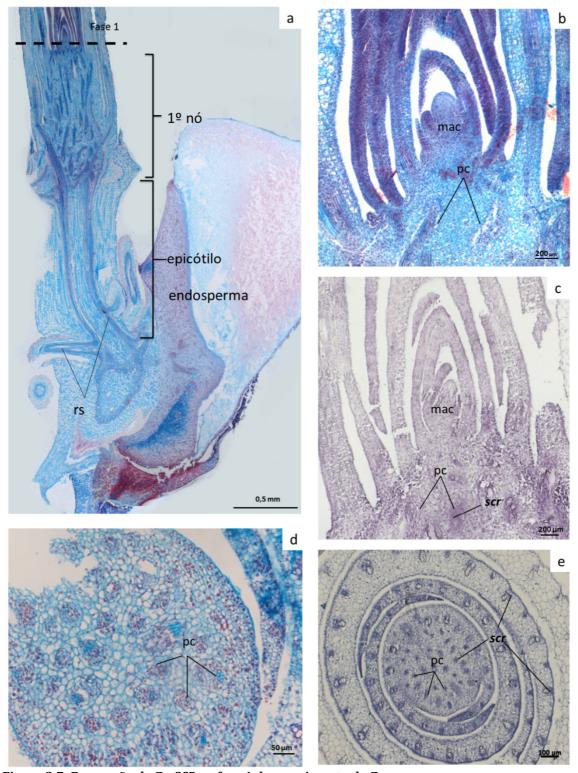


Figura 2.7: Expressão de *ZmSCR* na fase 1 de crescimento de *Z. mays*. Seções longitudinais (a-c) e transversais (d-e) de plântulas de milho. Em a, plântula com 13 dias, com todos os órgão e tecidos vegetativos definidos, foto incluída apenas para indicar a região em fase 1. Em a-b e d seções coradas com azul de astra e safranina. O meristema apical caulinar (mac) em seção longitudinal em d e em seção transversal em d. Nas figuras c e e os cortes foram submetidos à técnica de hibridização *in situ*. O precipitado roxo indica a presença do RNAm antisenso do gene *ZmSCR* nos cordões de procâmbio (pc). A sigla corresponde a: rs: raízes seminais

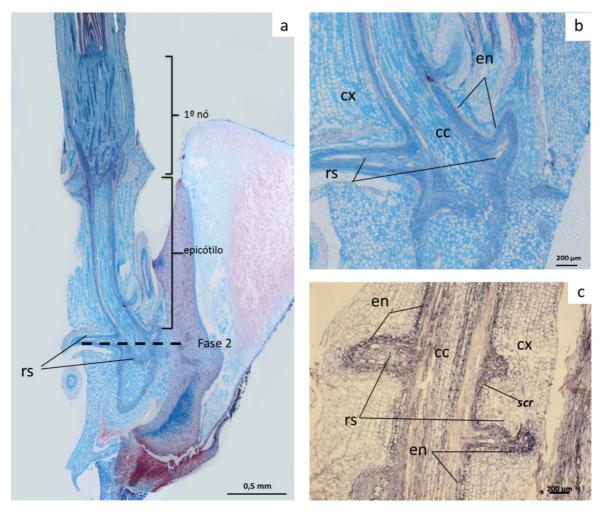


Figura 2.8: Expressão de ZmSCR na fase 2 de crescimento de Z. mays.

Seções longitudinais (**a-c**) de plântulas de milho. Em **a**, plântula com 13 dias, com todos os órgão e tecidos vegetativos definidos, foto incluída apenas para indicar a região onde ocorreu a fase 2. E **a** e **b** cortes corados com azul de astra e safranina. Na figura **c** os corte submetido à técnica de hibridização *in situ*. O precipitado roxo indica a presença do RNAm antisenso do gene *ZmSCR* na endoderme (en) do epicótilo e na endoderme da raiz seminal. As siglas correspondem a: cc: cilindro central, cx: córtex, en: endoderme, rs: raízes seminais.

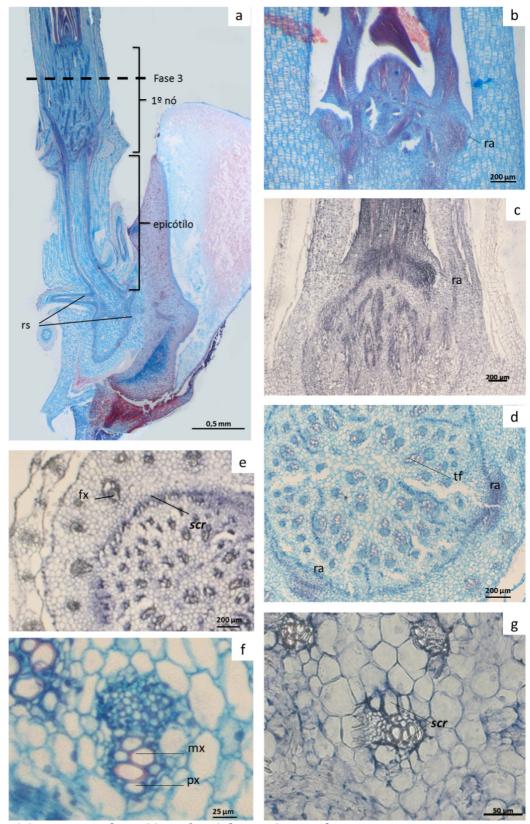


Figura 2.9: Expressão de *ZmSCR* na fase 3 de crescimento de *Z. mays*. Seções longitudinais (a-c) e transversais (d-g) de plântulas de milho. Em a, plântula com 13 dias, com todos os órgão e tecidos vegetativos definidos, foto incluída apenas para indicar a região onde ocorreu a fase 3. E a-b, d e f cortes corados com azul de astra e safranina. Nas figuras c, e e g os cortes foram submetidos à técnica de hibridização *in situ* . O precipitado roxo indica a presença do RNAm antisenso do gene *ZmSCR* nas raízes adventícias (ra), ao redor do atactostelo em e e ao redor do feixe vascular em g. correspondem a: mx: metaxilema, px: protoxilema, tf: traço foliar.

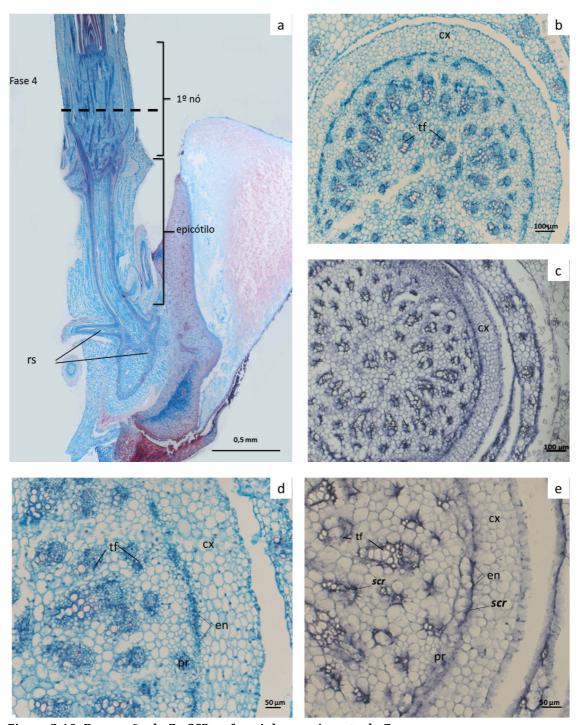


Figura 2.10: Expressão de *ZmSCR* **na fase 4 de crescimento de** *Z. mays***.** Seções longitudinais (**a**) e transversais (**b-e**) de plântulas de milho. Em **a**, plântula com 13 dias, com

Seções longitudinais (a) e transversais (b-e) de plantulas de milho. Em a, plantula com 13 dias, com todos os órgão e tecidos vegetativos definidos, foto incluída apenas para indicar a região onde ocorreu a fase 4. E a-b e d cortes corados com azul de astra e safranina. Nas figuras c e e os cortes foram submetidos à técnica de hibridização *in situ*. O precipitado roxo indica a presença do RNAm antisenso do gene *ZmSCR* ao redor do atactostelo evidenciando a endoderme após a produção do córtex (cx), visto em detalhe na figura e. As siglas correspondem a: cx: córtex, en: endoderme, pr: periciclo, tf: traço foliar

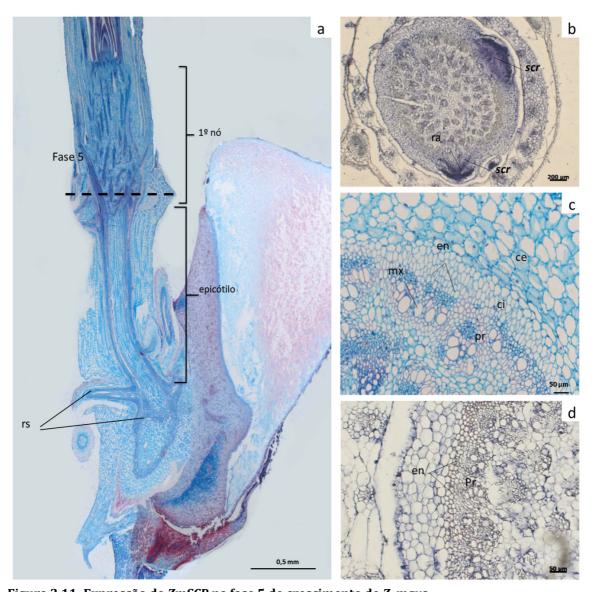


Figura 2.11: Expressão de ZmSCR na fase 5 de crescimento de Z. mays.

Seções longitudinais (a) e transversais (c-d) de plântulas de milho. Em a, plântula com 13 dias, com todos os órgão e tecidos vegetativos definidos, foto incluída apenas para indicar a região onde ocorreu a fase 5. E a e c cortes corados com azul de astra e safranina. Em c, a endoderme encontrase diferenciada. Nas figuras b e d os cortes foram submetidos à técnica de hibridização in situ. O precipitado roxo indica a presença do RNAm antisenso do gene SCR. Nestas figuras em b, a expressão do ZmSCR ocorre nas raízes adventícias e na endoderme não ocorre expressão. Ce: córtex externo, ci: córtex interno. As siglas representam: ce: córtex externo, ci: córtex interno, en:

a

endoderme, mx: metaxilema, pr: periciclo.

Figura 2.12: Controle negativo, sonda senso do *ZmSCR* de *Z. mays* (a) e controle branco (b).0 controle branco passa por todo processo da *in situ*, sem a sonda marcada.

4.2 Clonagem e caracterização do gene SCR de <u>Vriesea gigantea</u>.

Havendo demonstrado que o gene *SCR* é um bom marcador da atividade endodérmica em *Zea mays*, foi proposta a clonagem do gene ortólogo de *Vriesea gigantea*. Esta espécie foi selecionada durante a análise anatômica (Capítulo I) por apresentar conspícuo espessamento primário do caule.

Como foi descrito na introdução, o gene SCR pertence à família multigênica GRAS a qual possui 9 clados: PAT1, DELLA, SCL3, SCL4/7, LAS (SCL18), HAM, L1SCL, SCR e SHR (Lim et al., 2005), sendo que SCR é o que compreende os genes associados à atividade endodérmica (Di Laurenzio et al., 1996, Kamyia et al., 2003 e Lim et al., 2000 e 2005). Desta maneira, o primeiro passo foi realizar um levantamento de todas as sequências homólogas disponíveis em bancos de dados públicos utilizando os genes SCR de Arabidopsis thaliana e Zea mays para os quais já existiam estudos funcionais (Di Laurenzio et al., 1996, Kamyia et al., 2003 e Lim et al., 2000 e 2005). Foram identificadas 50 sequências (Tabela 2.1) e realizado um estudo fenético com o intuito de identificar o clado SCR e desenhar os iniciadores a partir das sequências das espécies mais próximas a Tillandsioideae. Como grupo externo da árvore foi utilizada a proteína humana STAT (HsSRC, NP004374) como descrito em Bolle (2004) e Lim et al., (2005). Na árvore resultante é possível identificar seis dos supramencionados clados (figura 2.13). Desta forma foram alinhadas as sequências das espécies de monocotiledôneas do clado SCR, S. bicolor, Z. mays e O. sativa, e foi desenhado um par de iniciadores para amplificar um fragmento de 390 pb do segundo éxon com a sequência de milho e sorgo (figura 2.14).

A figura 2.15 apresenta o produto de PCR obtido a partir do DNA genômico de *V. gigantea* apresentando o tamanho esperado. Após purificação, o fragmento foi clonado e sequenciado a fim de confirmar a sua

identidade. A análise da sequência obtida revelou que o amplicon clonado era homólogo aos genes *SCR* de *S. bicolor, Z. mays* e O. *sativa*. Quando a sequência de *V. gigantea* foi incorporada, a topologia da árvore se manteve evidenciando os seis clados. Como esperado, a nova sequência agrupou no clado SCR (Figura 2.13b). A localização da sequência de *V. gigantea* na árvore foi confirmada pela análise das porcentagens de identidade (Tabela 2.2). Finalmente, foi realizada uma análise da proteína codificada pelo fragmento amplificado onde foi possível identificar os dois Domínios conservados característicos da família GRAS: SAW e PFYRE (figura 2.16).

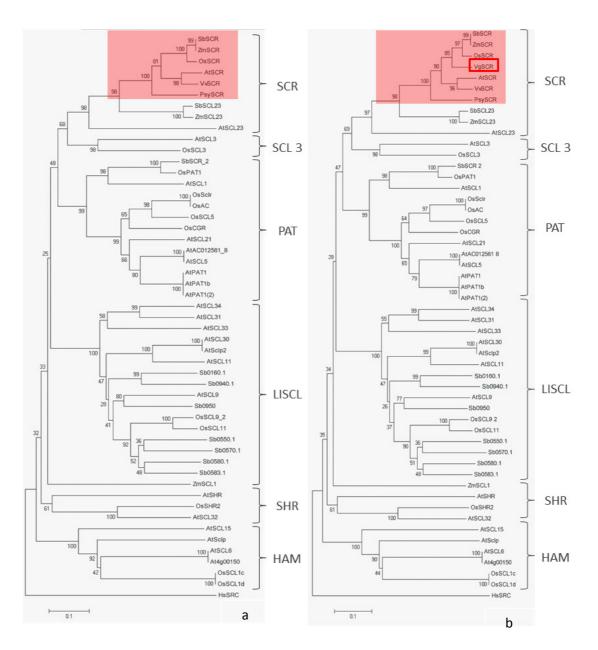
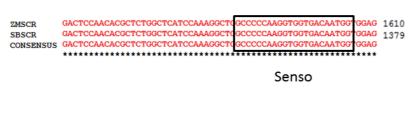
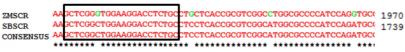


Figura 2.13: Relações fenéticas das sequências proteicas da familia GRAS.

a: 50 taxa. sendo 19 de *Arabidopsis thaliana* (AtXXX), três de *Zea mays* (ZmXXX), 12 de *Oryza sativa* (OsXXX), nove de *Sorghum bicolor* (SbXXX), *Pinus silvestris* (PsySCR) e *Vitis vinífera* (VvSCR). **b**: os mesmos 51 taxa mais a sequência clonada de *V. gigantea*. As distâncias genéticas foram inferidas utilizando o método Neighbor-Joining. A árvore foi enraizada usando a proteína humana STAT (HsSRC) como grupo externo como reportado por (Bolle 2004 e Lim et al., 2005). O bootstrap utilizado foi de 1500 réplicas. O clado SCR está ressaltado em vermelho e em detalhe a sequência de *V. gigantea*.





Reverso

Figura 2.14: Iniciadores utilizados para amplificação de *SCR* de *V. gigantea*. Desenho dos iniciadores sobre regiões

sobre regiões conservadas das sequências dos genes SCR de Z. mays e S. bicolor.

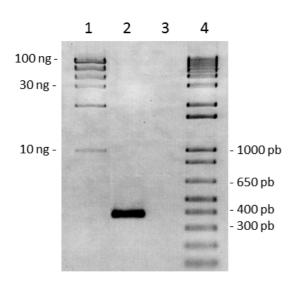


Figura 2.15: Amplificação do fragmento de *SCR* de *Vriesea gigantea*.

1: Marcador de massa High Mass (Invritrogen Cat#10496-016). 2: Amplicon de *V. gigantea* de 390 pb. 3: Controle negativo de PCR. 4: Marcador de peso molecular 1 Kb (Invritrogen Cat#: 10787-018).

Tabela 2.2: Identidade de aminoácidos da proteína SCR entre os diferentes taxa.

		SbSCR	ZmSCR	OsSCR	VgSCR	Atscr	VvSCR
90 99 99 99 90 90 90 90 90 90 90 90 90 9	SbSCR						
	ZmSCR	100%					
	OsSCR	96%	96%				
	VgSCR	82%	90%	89%			
	AtSCR	81%	81%	79%	89%		
	VvSCR	83%	83%	82%	86%	89%	
	PsySCR	76%	76%	76%	79%	78%	77%

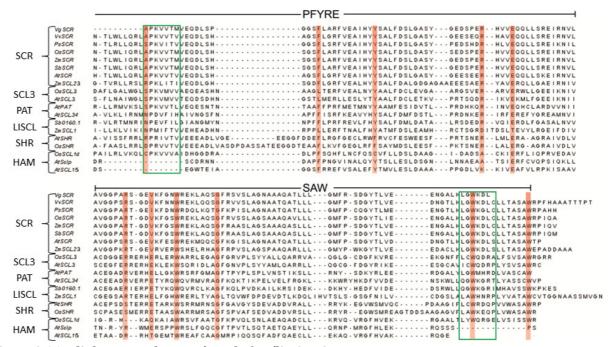


Figura 2.16: Alinhamento de proteínas da família GRAS.

A figura apresenta os aminoácidos conservados (hachurados em vermelho) dois domínios PFYRE e SAW. Os quadros verdes mostram a região sobre a qual foram desenhados os iniciadores para a clonagem do gene *SCR* de *Vriesea gigantea*. As sequências estão ordenadas segundo o clado da família GRAS ao qual pertencem, os quais estão indicados à esquerda.

4.3 Padrão de expressão do gene SCR em diferentes morfotipos de Tillandsioideae.

De posse do fragmento do gene *VgSCR* de *V. gigantea* foram realizados experimentos de hibridização *in situ* para verificar a associação entre o espessamento primário, atividade endodérmica e a expressão do *VgSCR* em Tillandsioideae. Para isso, foram escolhidas duas espécies para as quais as análises morfológicas e anatômicas do capítulo 1 revelaram morfotipos contrastantes: *V. gigantea* com um conspícuo espessamento caulinar e *Tillandsia usneoides* planta diminuta e sem espessamento.

4.3.1 Vriesea gigantea

A expressão tecido-específica de *VgSCR* foi estudada ao longo do caule de *V. gigantea*, e a figura 2.17 apresenta de forma esquemática as regiões correspondentes aos cortes onde foi avaliada.

A expressão de *VgSCR* foi detectada nas regiões de produção de raízes adventícias e nas regiões em fase de diferenciação. O meristema apical não apresentou expressão de *VgSCR*. Da mesma forma que o observado em milho, na epiderme das folhas em desenvolvimento e nos seus feixes, assim como, nos cordões de procâmbio localizados imediatamente abaixo do ápice foi detectado o RNAm de *VgSCR*. (figuras 2.18 a-c). Na região mediana do caule (figura 2.18 d-g), o sinal da sonda de *VgSCR* foi observado formando uma linha revelando a endoderme em atividade meristemática. (figuras 2.18 a, d e f). Na figura 2.18 f-i, traços foliares que em detalhe, apresentam expressão de *SCR* ao seu redor (figura 2.18 h).

Transversalmente, o córtex composto por células radiadas que não apresentam expressão de *VgSCR*, enquanto que a endoderme que o originou continua revelando a presença do RNAm (figura 2.19 a-d). Na figura 2.19 c se evidencia a diferente estrutura dos traços foliares com respeito aos feixes caulinares. Os primeiros, provindos do procâmbio, apresentam endoderme ao

redor da qual se identifica expressão de *VgSCR*. Já nos feixes caulinares provindos do periciclo não se observa a presença do RNAm de *VgSCR* em maior detalhe na figura 2.19 e. No início do desenvolvimento, verifica-se expressão de *VgSCR* ubíqua sendo observado em todo ápice radicular (figura 2.19 g-h). Já em regiões do caule mais diferenciadas, a endoderme deixa de expressar *VgSCR* e o RNAm do gene *é* unicamente identificado na endoderme das raízes adventícias (figura 2.20 a-d).

De forma geral, o padrão de expressão do gene *VgSCR* observado em *V. gigantea* foi concordante com aquele observado na planta modelo *Z. mays.* Resumindo, a figura 2.21 esquematiza os resultados obtidos identificando a expressão do gene marcador nas diversas regiões onde foi avaliada.

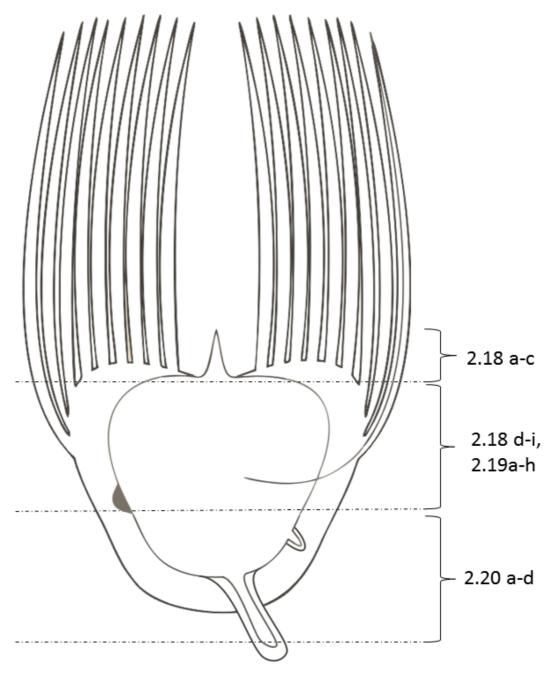


Figura 2.17: Representação esquemática do caule de $\it V.~gigantea$ indicando todas as regiões analisadas por hibridação $\it in~situ$.

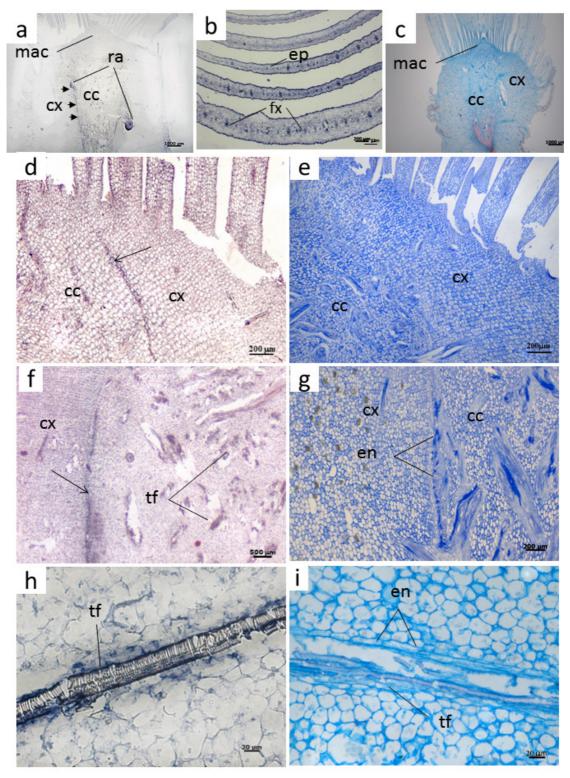


Figura 2.18: Expressão de VgSCR em Vriesea gigantea.

Seções longitudinais (a,c, e-g) e transversais (b, h-i) de *Vriesea gigantea*. Nas figuras a-b, d, f, e h os cortes foram hibridizados com a sonda antisendo de *VgSCR* evidenciada pelo precipitado roxo. Nas figuras c-e, g e i os cortes foram corados com azul de astra e safranina. As siglas correspondem a; cx: córtex, cc: cilindro central, ra: raízes adventícias, ep: epiderme, fc: feixes caulinares, fx: feixes vasculares da folha, tf: traços foliares.

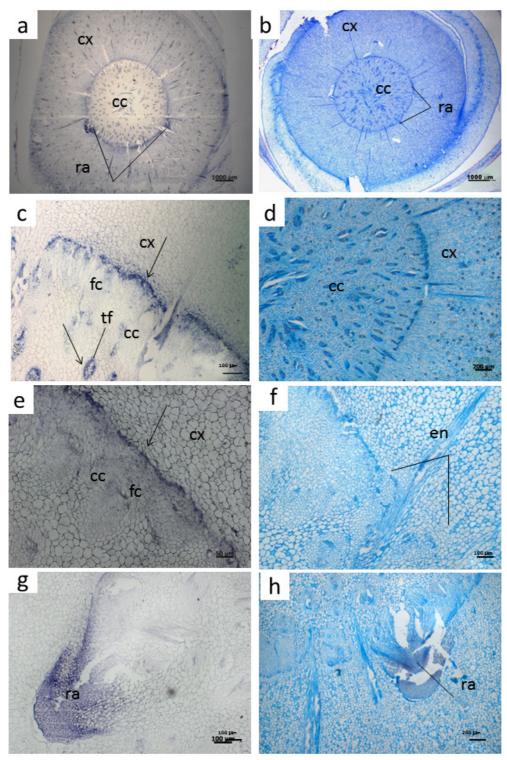


Figura 2.19: Expressão de *VgSCR* em *Vriesea gigantea*.

Seções transversais (**a-h**) de *Vriesea gigantea*. Nas figuras **a,c**, **e** e **g** os cortes foram hibridizados com a sonda antisendo de *VgSCR* evidenciada pelo precipitado roxo. Nas figuras **b**, **d**, **f** e **h** os cortes foram corados com azul de astra e safranina. As siglas correspondem a: cx: córtex, cc: cilindro central, en: endoderme. fc: feixes caulinares ra: raízes adventícias, tf: traço foliar.

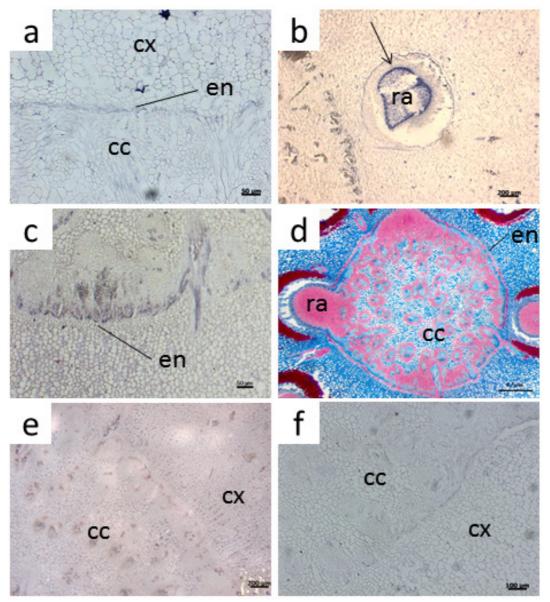


Figura 2.20. Expressão de VgSCR em Vriesea gigantea.

Seções transversais (a-f) de *Vriesea gigantea*. Região madura do caule (**a-d**) e controle negativo e branco (**e-f**), respectivamente. Nas figuras **a-c** os cortes foram hibridizados com a sonda antisendo de *SCR*. A seta na figura b indica o *VgSCR* na endoderme da raiz. Na figura **d** os cortes foram corados com azul de astra e safranina. As siglas representam: cc: cilindro central, cx: córtex, en: endoderme, ra: raiz adventícia.

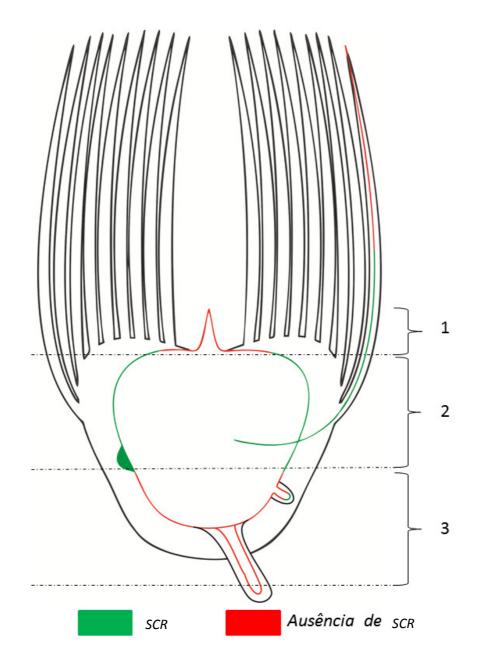


Figura 2.21: Representação esquemática do caule de *V. gigantea* indicando as regiões que apresentaram expressão de *VgSCR*. 1. zona apical, 2. mediana e 3. diferenciada.

4.3.2 Tillandsia usneoides

A expressão tecido-específica de *VgSCR* foi estudada ao longo do corpo primário de *T. usneoides* e a figura 2.22 apresenta de forma esquemática as regiões correspondentes aos cortes onde foi avaliada.

Em *T. usneoides* a presença do RNAm de *VgSCR* foi observado de forma ubíqua nas regiões de crescimento, incluindo todos os meristemas apicais, córtex e cilindros centrais imaturos. Do mesmo modo, a epiderme e os feixes vasculares das folhas jovens também apresentaram expressão de *VgSCR* (figura 2.23 a-d). Ao se afastar da região de crescimento a expressão de *VgSCR* diminui até que ela não possa ser mais detectada nas regiões totalmente diferenciadas (figura 2.23 e-g).

O padrão de expressão do gene *VgSCR* observado em *T. usneoides* foi discrepante com o observado nas espécies anteriormente analisadas, sendo principalmente surpreendente a expressão ubíqua em toda a extensão do córtex. A figura 2.24 esquematiza os resultados obtidos identificando a expressão do gene marcador nas diversas regiões onde foi avaliada.

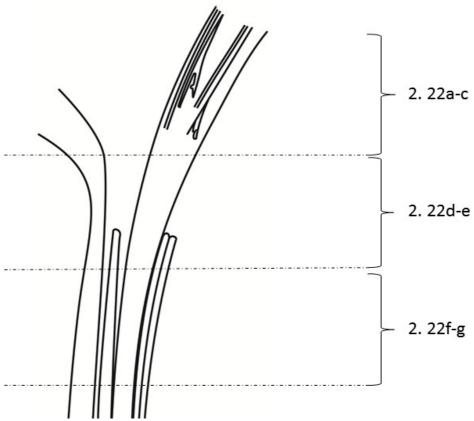


Figura 2.21: Representação esquemática do caule de *Tillandsia usneoides*. O esquema indica todas as regiões analisadas por hibridação *in situ*

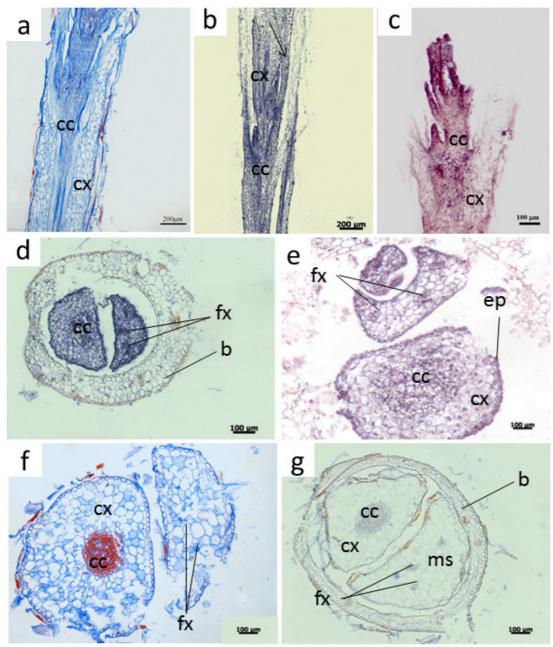


Figura 2.22. Expressão de *VgSCR* **em** *Tillandsia usneoides.*Seções longitudinais (**a-c**) e transversais (**d-g**). Nas figuras **b**, **c**, **d**, **e**, e **g** os cortes foram hibridizados com a sonda antisendo de *SCR* Nas figuras **a-f** os cortes foram submetidas à coloração de azul de astra e safranina. As siglas correspondem a: b: bainha, cc: cilindro central, cx: córtex, ep: epiderme, fx: feixe vascular e ms: mesofilo

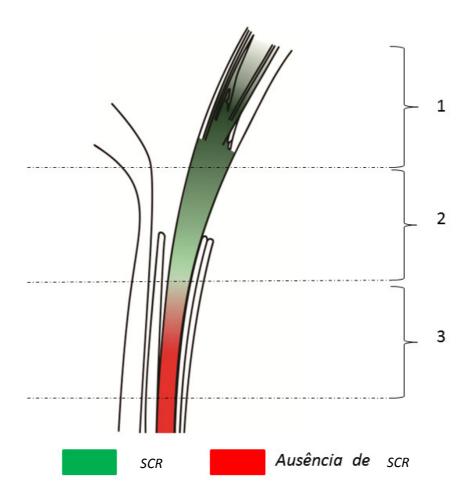


Figura 2.23: Representação esquemática do caule de *T. usneoides*Indicando as regiões que apresentaram expressão de *VgSCR*. 1 Zona apical, 2 mediana e 3 diferenciada.

5 Discussão

Trabalhos que envolvem a ontogênese de órgãos e tecidos em plantas acoplados a análise expressão gênica são amplamente referidos na literatura (Di Laurenzio et al., 1996; Fukaki et al., 1998; Mayer & Jürgens, 1998; Helariutta et al., 2000; Lim et al., 2000; Wysocka-Diller et al., 2000; Lim, 2001; Nakajima et al., 2001; Friml, 2003; Kamiya et al., 2003; Morohashi et al., 2003; Aida et al., 2004; Friedman, Moore, & Purugganan, 2004; Gallagher et al., 2004; Haecker et al., 2004; Blázquez et al., 2006; Cui et al., 2007; Laajanen et al., 2007; Sanchez et al., 2007; Burger, Chapman, & Burke, 2008; Chandler, Nardmann, & Werr, 2008; Koentges, 2008; Petricka & Benfey, 2008; Tomescu, 2008; Cui & Benfey, 2009; Wolters & Jürgens, 2009; Cruz-Ramírez et al., 2012; Yoshida et al., 2012). No, entanto, a maioria dos trabalhos abordam temas relacionados ao desenvolvimento de embriões, desenvolvimento floral, e ao desenvolvimento de raízes. Ainda mais, geralmente estes trabalhos avaliam a expressão gênica de forma muito restrita temporal e espacialmente. Por outro lado, não há dados de estudos que tenham analisado a expressão gênica em relação à diversidade morfológica. Neste sentido, o presente trabalho significa um avanço na integração multidisciplinar visando a compreensão dos determinantes genéticos que participam do desenvolvimento do corpo primário vegetal.

5.1 O gene scarecrow (ZmSCR) como marcador de atividade endodérmica na planta modelo <u>Zea mays</u>.

Trabalhos que abordam o desenvolvimento de órgãos de *Z. mays*, seja por meio de estudos morfológicos ou análises de mutantes, tem sido publicados (Sheridan & Clark, 1993; Hochholdinger et al., 2004). No entanto, nenhum deles apresenta o surgimento dos órgãos e seus tecidos de forma integrada, o que leva a uma informação ontogenética era fragmentada.

Assim, com o intuito de determinar as fases do desenvolvimento apropriadas para avaliar a relação entre o surgimento dos tecidos, atividade endodérmica e a expressão de *ZmSCR*, fez-se necessário realizar uma análise morfoanatômica acoplada a morfometria. Os resultados obtidos forneceram dados minuciosos que permitiram identificar seis fases principais do desenvolvimento pós-embrionário de *Zea mays* que pontuam, espacial e temporalmente, o surgimento de todas as estruturas do corpo primário da planta. Cronologicamente, estas fases compreenderam a morfogênese de: raiz primária, raízes seminais, raízes adventícias, primórdios foliares, caule (atactostelo) e entrenós; assim como a formação dos tecidos primários que os compõem. Em continuação são discutidos alguns pontos relevantes a respeito da morfogênese dos tecidos e órgãos ao longo das seis fases descritas.

A avaliação qualitativa temporal e espacial do padrão de expressão do gene ZmSCR se mostrou, de forma geral, em concordância com os estudos de Lim et al. (2000, 2005) e de Wysocka-Diller et al. (2000). Os dados aqui apresentados demonstraram que num primeiro momento o ZmSCR é expresso nos primórdios foliares e nos feixes vasculares da folha. .Adicionalmente, e de forma inédita, foi identificada a expressão do RNAm de ZmSCR nos cordões de procâmbio próximo ao meristema apical caulinar (mac). O padrão de expressão do SCR observado nos cordões de procâmbio do caule é semelhante ao observado nos feixes vasculares da folha e esta similaridade sugere que a origem e os mecanismos de diferenciação destes feixes são também comuns. Além disso, cabe ressaltar que a presença de inúmeros cordões de procâmbio nos primeiros dias após a germinação, é devido ao fato do milho apresentar uma dormência tardia durante a embriogênese que leva à formação de 5-6 primórdios foliares (Sheridan, 1995 e Heckel et al., 1999). Os cordões procambiais próximos ao mac são iniciados em resposta à formação de primórdios foliares (Pizzolato e Sundberg, 1999) e devido ao fluxo polar de auxina oriundo dos tecidos vasculares destes órgãos (Dengler, 2006). Desta maneira, nota-se que nos primeiros dias de desenvolvimento do caule de milho são observados apenas cordões procambiais, e estes posteriormente constituirão os traços foliares. Sendo assim, o sistema vascular é constituído pela ligação dos traços foliares no epicótilo com o sistema raiz-hipocótilo-cotilédone (Phillips 1937, Hayward 1938). Em regiões mais diferenciadas do caule, o gene *SCR* se tornou progressivamente restrito ao redor dos traços foliares e na bainha do feixe da folha localizando a endoderme dos feixes. Este mesmo padrão foi observado por Wysoka-Diller et al. (2000), que sugeriu ainda que o gene *SCR* estaria envolvido na formação dos feixes vasculares da folha. Estes resultados demonstram que cada traço é constituído de uma unidade vascular, corroborando os estudos de Menezes (1971).

Inesperadamente, o RNAm de *ZmSCR* foi detectado na epiderme da folha de milho. Kamyia et al. (2003) observou expressão de *OsSCR* em células estomáticas antes da formação das células-guarda em *O. sativa*, concluindo que este gene estaria envolvido na formação do complexo estomático. Os resultados deste trabalho revelam expressão em toda epiderme, não sendo possível observar restrição do sinal para inferir alguma relação com a formação de estruturas epidérmicas. Desta forma, propõe-se que o sinal observado seja hibridação cruzada decorrente da expressão de algum outro membro da família parálogo ao gene analisado.

Como esperado, foi identificado o RNAm de *ZmSCR* ao redor do cilindro vascular do epicótilo (endoderme) em continuidade com a endoderme das raízes seminais. Em arabidopsis, a expressão foi visualizada na endoderme do hipocótilo e no eixo caulinar aéreo (Wysocka-Diller et al., 2000) porém, não havia raízes sendo formadas. As raízes adventícias seminais surgem depois do alongamento do epicótilo (entre o 4º e 5º dia após a germinação) na região do nó cotiledonar e no epicótilo, mais especificamente a partir do periciclo. De acordo com diversos autores estas raízes surgem no embrião entre o 22º ± 40º dia após a polinização (Sass,

1977; Erdelska e Vidovencova, 1993; Feldman, 1994) e o número de raízes seminais é variável por plântula e depende do genótipo (Kiesselbach, 1949; Sass, 1977; Feldman, 1994). Alguns autores observaram que as raízes primárias e seminais morrem após a formação de o sistema radicular na região nodal (fase que será discutida posteriormente) (Lawson e Hanway, 1977; Feldman, 1994).

Outro fato inédito verificado foi a associação do *ZmSCR* com o surgimento das raízes adventícias na região nodal. O sinal de expressão do gene foi observado no primórdio radicular de forma ubíqua, porém restrito à endoderme em regiões distantes do ápice. Esta relação pode ser explicada pelo fato deste gene participar da especificação do centro quiescente (CQ) da raiz, juntamente com gene *short-root* (*SHR*) e de forma paralela ao gene pletora (*PLT*) (Sabatini et al., 2003; Aida et al., 2004). De acordo com Sabatini et al. (2003) todas as células que expressam *SCR* são competentes para adquirir a identidade de CQ no entanto esta competência depende da distribuição de auxina.

Além do sinal de expressão observado nas raízes, o RNAm de *ZmSCR* foi detectado ao redor de todo cilindro central, evidenciando o início da atividade endodérmica na formação do córtex externo Como citado anteriormente, o mesmo padrão é também observado nos feixes da folha e ao redor de cada traço foliar. Desta forma, o fato da endoderme dos traços foliares e do caule apresentar o mesmo padrão de expressão de *ZmSCR* reforça mais uma vez a hipótese de Menezes (1971) segundo a qual os feixes do caule do milho, na realidade, são todos traços foliares, cada um envolvido por uma endoderme, portanto cada um, um monostelo, como nos escapos florais.. Esta hipótese foi proposta a partir evidências anatômicas coletadas por diversos autores (Van Fleet, 1961; Silva, 2000; Melo-de-Pinna & Menezes, 2003; Alonso, Moraes-Dallaqua, & de Menezes, 2004; Alves et al., 2005; Menezes et al., 2005; Elbl & Menezes, 2006; Silva & Menezes, 2006; Silva & Menezes, 2007; Elbl, 2008; Lima & Menezes, 2008a; Lima & Menezes,

2008b; Cattai & Menezes, 2010; Menezes et al., 2011). Por outro lado, Cui e Benfey (2009) demonstraram funcionalmente o papel de *SCR*, e da sua interação com o produto dos genes *SHR* e *LHP1*, na regulação da atividade endodérmica promovendo ou restringindo a proliferação das células do córtex em raiz de arabidopsis.

Simultaneamente à formação de córtex a partir da endoderme, o periciclo começa a produzir feixes caulinares, os quais não apresentam expressão do *SCR* ao redor. O periciclo como produtor de feixes caulinares compostos apenas de metaxilema e metafloema foi observado em diversos trabalhos de anatomia (Alves et al., 2005; Menezes et al., 2005; Elbl, 2008; Lima & Menezes, 2008a; Lima & Menezes, 2008b; Cattai & Menezes, 2010; Menezes et al., 2011).

Após a formação do córtex interno, a endoderme perde sua capacidade meristemática e se diferencia, fato que coincide com a perda de expressão de *ZmSCR*, enquanto que o periciclo continua a produzir tecidos vasculares. Esta falta de sincronia revela que estes tecidos possuem identidades e funcionalidades diferentes, pois os produtos observados são distintos.

Pelos argumentos expostos acima, foi possível concluir que a expressão do gene *SCR* está associada à atividade meristemática da endoderme resultando assim em um marcador apropriado para avaliar a origem do espessamento primário em Tillandsioideae.

É importante esclarecer acerca da relação entre endoderme e o gene *SCR* proposta ao longo deste trabalho. A endoderme tem identidade histológica associada à "camada mais interna do córtex" dando origem ao córtex nas plantas com espessamento primário (Menezes et al., 2005; Lima & Menezes, 2008; Menezes et al., 2011). Desde o ponto de vista fisiológico, esta entidade tem sido descrita como responsável pelo gravitropismo em caule (Fukaki et al., 1998). Desde o ponto de vista fenotípico, foi demonstrado que as mutantes *scr* de *A. thaliana* apresentam uma alteração

na endoderme/córtex e falta de gravitropismo. Frente a estas evidências, este trabalho associa à atividade meristemática da endoderme com a expressão do gene *SCR* selvagem. No entanto, a "identidade celular" envolve uma ampla e intrincada rede de sinais que estabelecem um padrão de expressão gênica determinada, sendo *SCR* apenas um único gene deste amplo espectro.

5.2 Expressão do gene VgSCR e atividade endodérmica em Tillandsioideae

A análise de homologia indicou que o fragmento gênico de 390 pb clonado corresponde à região esperada do gene de *V. gigantea*. A sequência obtida se posicionou externamente as gramíneas na árvore fenética, o qual coincide com a relação filogenética entre as espécies, pois *V. gigantea* pertence à família Bromeliaceae que é considerada um grupo basal dentro de Poales, enquanto que as gramíneas representam um dos grupos mais derivados (Stevens, 2001). Estes resultados demonstraram que o fragmento clonado corresponde ao gene *SCR* de *V. gigantea* (*VgSCR*) ortólogo aos previamente descritos funcionalmente em *A. thaliana* (Scheres et al., 1995) e *Z. mays* (Lim et al., 2000, 2005).

A avaliação do padrão de expressão do gene *VgSCR* em *V. gigantea* se mostrou, de forma geral, semelhante ao padrão de expressão observado em milho. Desta maneira, os locais onde o *VgSCR* foi detectado coincidem com regiões de atividade meristemática da endoderme. O sinal de expressão do RNAm de *VgSCR* foi observado nos cordões procambiais que, ao se diferenciarem em traços foliares apresentam o sinal restrito à uma única camada ao seu redor, a endoderme. É importante ressaltar a estrutura diferencial dos traços foliares com respeito aos feixes caulinares. Os primeiros, provindos do procâmbio, apresentam protoxilema, protofloema, metaxilema e metafloema. Já os feixes caulinares, provindos do periciclo,

apresentam apenas metaxilema e metafloema e não revelam expressão de *SCR* nem a presença de endoderme ao seu redor. A respeito da endoderme do caule, a mesma revelou a presença do RNAm de Vg*SCR*, enquanto que a camada à qual deu origem, o córtex, não apresenta sinais da expressão do gene.

Como, descrito no capítulo 1, *T. usneoides* apresenta juvenilização das suas estruturas. Como consequência desta característica, a espécie não possui espessamento de caule, formação de feixes caulinares a partir do periciclo, produção de raízes adventícias e nem possui senso gravitrópico. Desta forma, o córtex é composto por células sem organização radial e em concordância com o seu morfotipo particular, o padrão de expressão do gene *VgSCR* obtido não foi condizente com os dados obtidos para milho e *V. gigantea. T. usneoides* apresentou expressão ubíqua no caule em desenvolvimento refletindo a sua anatomia simples. Isto sugere que este grupo sofreu, ao longo da evolução, um processo de regressão na complexidade do padrão de expressão gênico e consequentemente anatômica e morfológica.

Os resultados dos experimentos de hibridização *in situ* demonstraram claramente que *VgSCR* possui padrão de expressão diferencial em ambas as espécies analisadas, refletindo a diferente identidade histológica do córtex. A análise integrada dos resultados juntamente com dados publicados nas espécies modelo *A. thaliana* (Scheres & Benfey, 1999; Wysoka-Diller et al., 2000; Dolan, 2007; Cui & Benfey, 2009; Carlsbercker, 2010) e *Z. mays* (Lim et al., 2000; Lim, 2001; Lim et al., 2005) permite propor um modelo para explicar a relação entre a expressão de *SCR* e o espessamento primário caulinar nos diferentes morfotipos de Tillandsioideae (figura 2.24). Enquanto que em *V. gigantea* (que apresenta espessamento primário) o córtex é formado pela divisão celular periclinal das células da endoderme em sentido centrífugo seguindo um padrão comum, em *T. usneoides* (que não apresenta espessamento primário) o córtex é formado por células sem

organização espacial e que apresentam o mesmo padrão de expressão de *SCR* que a endoderme. Isto poderia sugerir que o "córtex" em *T. usneoides* está formado por células endodérmicas que se multiplicaram sem padrão determinado.

Surpreendentemente enquanto que o mac em *Vriesea gigantea* não apresentou *VgSCR*, todos os mac presentes de *T. usneoides* apresentaram expressão. Desta maneira os resultados apresentados neste trabalho sugerem que o pull de genes expressos nos meristemas apicais caulinares de ambas as espécies são diferentes. Para aprofundar no entendimento das diferenças funcionais de ambos os sistemas seria interessante avaliar em paralelo a expressão de genes característicos determinantes da identidade do mac, como por exemplo o *wuschel* (restrito ao centro organizador do mac) ou *shoot meristemless* (expresso em todas as células do mac) (Wolters & Jürgens, 2009).

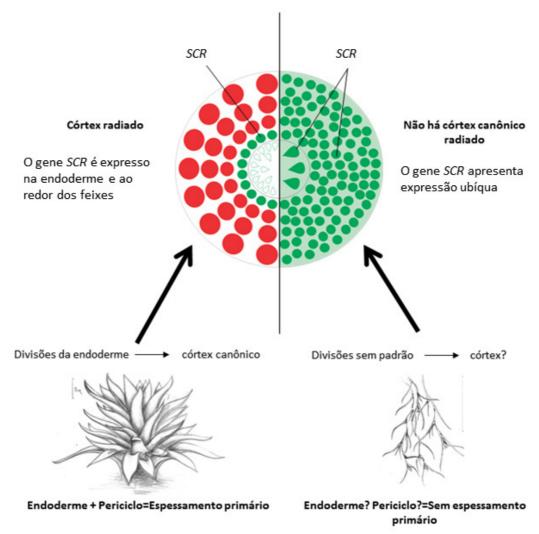


Figura 2.24: Padrão de expressão diferencial de *SCR* e sua relação com a formação de córtex em *Tillandsioideae*.

Lado esquerdo, o padrão de expressão em *V. gigantea* demonstrando a origem do córtex canônico pela atividade meristemática da endoderme. Lado direito, demonstrando o córtex de *T. usneoides* sem organização radial. Em verde estão indicadas as células que apresentam RNAm de *SCR*. Em vermelho estão indicadas as células que não expressam *SCR*.

5.3 O gene SCR participa tanto na proliferação de tecidos fundamentais quanto vasculares

Estudos previamente publicados para a espécie modelo *A. thaliana* (Scheres & Benfey, 1999; Wysoka-Diller et al., 2000; Dolan, 2007; Cui e Benfey, 2009; Carlsbercker, 2010) revelaram a participação de SCR tanto no

estabelecimento dos tecidos fundamentais primários quanto dos tecidos vasculares em raiz. A extrapolação dos mecanismos moleculares de ação descritos para SCR ao sistema caulinar de Tillandsioideae permite explicar a sequência de eventos relacionados ao surgimento das diferentes estruturas de forma conjunta ao perfil de expressão observado.

Cui e Benfey (2009) propuseram que SCR estimula ou restringe a proliferação celular, do córtex da raiz, dependendo da sua interação com outras proteínas tanto na endoderme do traço foliar quanto na localizada entre o córtex e o cilindro central. A proteína SHR (short-root) produzida no estelo é transportada para a endoderme onde se liga à porção C-ternimal da proteína SCR induzindo as divisões que promovem a formação dos tecidos fundamentais e estimulando por feedback a própria síntese de SCR (Di Laurenzio et al., 1996; Lim et al., 2000; Wysocka-Diller et al., 2000; Sassa et al., 2001; Kamiya et al., 2003; Sabatini et al., 2003; Aida et al., 2004; Cui et al., 2007; Dolan, 2007; Cui et al., 2009). Tem sido reportado que a mutação do gene scr gera a desorientação das células do mesofilo da folha e a menor produção de feixes (Lim et al., 2001) demonstrando a forte correlação entra a formação dos traços foliares com o parênquima medular que os envolve. De forma complementar, Wysocka-Diller et al. (2000) propõe que a vascularização é um pré-requisito para a padronização do tecido fundamental e é mediado pelo SCR. Ou seja, o padrão ubíquo de expressão no cordão procambial e a restrição da expressão do gene na endoderme do traço, em áreas mais diferenciadas, sugere que a medula e o córtex são produzidos centrifugamente. Com a diferenciação dos tecidos os níveis de SHR diminuem e consequentemente SCR interage preferencialmente com LHP1 (Like heterocromatin protein 1) inibindo as divisões. Desta forma, a proporção entre os complexos SHR/SCR e LPH1/SCR irá ditar se o mecanismo predominante é a divisão celular ou a interrupção das mesmas, respetivamente (figura 2.25).

A presença do *VgSCR* em todas as células do córtex de *T. usneoides* à luz do modelo proposto sugere que nesta espécie não há formação do complexo SCR/SHR, o qual restringiria a endoderme a uma única camada de células (Dolan, 2007). Esta hipótese pode ser testada através da clonagem do alelo do gen *SCR* de *T. usneoides*, com intuito de verificar a presença da região conservada que interage com SHR, assim como elucidar o padrão de expressão de *SHR*.

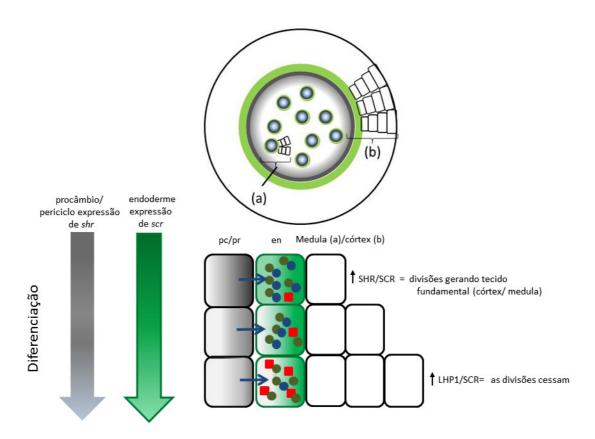


Figura 2.25: O papel do *SCR* na proliferação das células do córtex. Representação esquemática do caule durante a formação da medula (a) e do córtex. Detalhes do mecanismo atribuído neste trabalho ao *SCR* na proliferação do córtex. As siglas correspondem a: en endoderme, pc: procâmbio, pr: periciclo.

A relação da proteína SCR com o estabelecimento dos tecidos vasculares está fundamentada em um estudo de Carlsbecker *et al.* (2010). Neste trabalho, os autores demonstram que o complexo SHR/SCR descrito acima induz na endoderme a transcrição do *micro RNA miR165/6*. O mesmo é deslocado para o estelo onde degrada o seu alvo: o RNAm do gene *PHABULOSA* (*phb*). Este gene codifica para um fator de transcrição do tipo

HD-ZIP III (*class III homeodomain-leucine zipper*) que atua na diferenciação do xilema de forma dependente da sua concentração: altos níveis de PHB determinam metaxilema e baixos níveis geram primeiramente protoxilema.

Em Tillandsioideae e *Z. mays* observam-se dois tipos de elementos vasculares: os feixes caulinares com apenas metaxilema e metafloema, e os traços foliares com protoxilema, protofloema, metaxilema e metafloema como proposto por Menezes (1971). Transpondo o mecanismo molecular descrito para as observações feitas no caule de Tillandsioideae e de *Z. mays*, propõe-se que os feixes caulinares são produzidos, na região pericíclica quando o RNAm de *SCR* está restrito à endoderme, ou seja, quando a concentração de *SCR* diminui. Nestas condições, há uma menor transcrição de *RNAmi165/6* na endoderme e uma maior concentração de PHB no estelo, favorecendo assim, a produção de elementos vasculares com metaxilema. Este modelo explica também a falta de sincronia na formação do tecido fundamental e a formação dos tecidos vasculares, ou seja, o córtex já estava presente quando os elementos vasculares da região pericíclica iniciaram sua diferenciação. Cabe relembrar que os feixes oriundos desta região não possuem expressão de *SCR*.

Já nos traços foliares, a diferenciação dos elementos vasculares ocorre ao mesmo tempo em que a medula é produzida, o que significa que há uma sincronia na formação dos dois tecidos. No início do desenvolvimento os traços foliares apresentam uma forte expressão do *SCR*, o que leva a diferenciação, num primeiro momento, de elementos de protoxilema. Pois altos níveis de SCR ativam a transcrição de *RNAmi165/6* o qual degrada o RNAm de *PHB* resultando na formação de protoxilema. Com a diferenciação dos feixes, a expressão de *SCR* se restringe à endoderme resultando na produção de elementos de metaxilema. (figura 2.26).

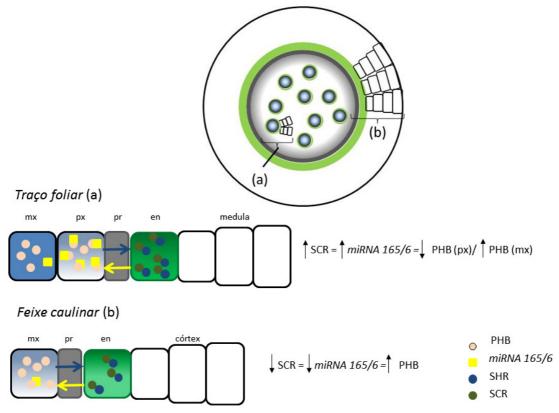


Figura 2.26: Papel do SCR na diferenciação dos tecidos vasculares.

Em (a), detalhes do mecanismo do *SCR* na diferenciação do traço foliar Em (b), detalhes da diferenciação dos feixes caulinares com apenas metaxilema. As siglas correspondem a: en endoderme, mx: metaxilema, pr: periciclo e px: protoxilema.

6 Conclusões

- ✓ Foi possível organizar o desenvolvimento do corpo primário de *Zea mays* em seis fases.
- ✓ Em *Zea mays* e *V. gigantea* a expressão do gene *SCR* esteve sempre associada à endoderme meristematicamente ativa, ou seja, durante a produção de córtex, ao redor dos traços foliares e no surgimento das raízes.
- ✓ Nem o periciclo nem os feixes caulinares derivados da sua atividade apresentaram expressão de *SCR* reforçando que *SCARECROW* é um marcador de atividade endodérmica.
- ✓ Em *T. usneoides* todo o caule apresentou expressão do gene marcador, não sendo possível distinguir a camada de endoderme do periciclo. Desta forma, as evidências indicam que o córtex é produto da divisão celular desordenada da endoderme e que essas células não se diferenciam daquelas que lhes deram origem.
- ✓ A análise dos dados obtidos juntamente com dados bibliográficos permitiu propor modelos moleculares que permitem explicar o papel do gene *SCR* na formação dos tecidos fundamentais e dos feixes vasculares.

7 Referências

- AIDA, M., D. BEIS, R. HEIDSTRA, V. WILLEMSEN, I. BLILOU, C. GALINHA, L. NUSSAUME, Y. NOH, R. AMASINO, e B. SCHERES. 2004. The PLETHORA genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* 119: 109-120.
- ALONSO, A. A., M. A. MORAES-DALLAQUA, e N. L. DE MENEZES. 2004. Endoderme com atividade meristemática em raiz de Canna edulis Kerr-Gawler (Cannaceae). *Acta Botanica Brasilica* 18(3): 693-699.
- ALVES, V. G., G. F. MELO-DE-PINNA, R. C. ARRUDA, C. G. SILVA, E. SCREMIM DIAS, e N. L. MENEZES. 2005. Pericycle and endodermis in monocotyledons. *Abstracts: XVII International Botanical Congress* Vienna, Austria, Europe.
- BLÁZQUEZ, M., C. FERRÁNDIZ, F. MADUEÑO, e F. PARCY. 2006. How Floral Meristems are Built. *Plant Molecular Biology* 60: 855-870.
- BOLLE, C. 2004. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* 218: 683-692.
- BURGER, J. C., M. A. CHAPMAN, e J. M. BURKE. 2008. Molecular insights into the evolution of crop plants. *Am. J. Bot.* 95: 113-122.
- CARLSBECKER, A., JI-YOUNG LEE, CHRISTINA J ROBERTS, JAN DETTMER, SATU LEHESRANTA, OVE LINDGREN, MIGUEL A. MORENO-RISUENO, ANNE VATEN, SIRIPONG THITAMADEE, ANA CAMPILHO, JOSE SEBASTIAN, JOHN L. BOWMAN, YKA HELARIUTTA, e P. BENFEY. 2010. Mobile miRNA165/6 target HD-ZIP III in the root stele perifery for proper xylem patterning. 21ST INTERNATIONAL CONFERENCE ON ARABIDOPSIS RESEARCH, Yokohama Japão, 501737440.
- CATTAI, M. B., e N. L. MENEZES. 2010. Primary and secondary thickening in the stem of Cordyline fruticosa (Agavaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 82: 653-662.
- CHAKRAVERTI, D. N. 1939a. The occurrence of fugacious cambium in the rizoma of *Curcuma longa* L. *The Philippine Journal of Science* 69: 191-195.
- CHANDLER, J., J. NARDMANN, e W. WERR. 2008. Plant development revolves around axes. *Trends in Plant Science* 13: 78-84.

- CHEADLE, V. I. 1937. Secondary growth by means of a thickening ring in certain Monocotyledons. *Botanical Gazette* 98: 535-555.
- Cruz-Ramírez, A., S. Díaz-Triviño, I. Blilou, V. Grieneisen, R. Sozzani, C. Zamioudis, P. Miskolczi, J. Nieuwland, R. Benjamins, P. Dhonukshe, J. Caballero-Pérez, B. Horvath, Y. Long, A. P. Mähönen, H. Zhang, J. Xu, J. A. H. Murray, P. N. Benfey, L. Bako, A. F. M. Marée, e B. Scheres. 2012. A Bistable Circuit Involving SCARECROW-RETINOBLASTOMA Integrates Cues to Inform Asymmetric Stem Cell Division. *Cell* 150: 1002-1015
- Cui, H., e P. N. Benfey. 2009a. Cortex proliferation: Simple phenotype, complex regulatory mechanisms. *Plant signaling & behavior* 4: 551-553.
- _____. 2009b. Interplay between SCARECROW, GA and LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 in ground tissue patterning in the Arabidopsis root. *The Plant Journal* 58: 1016-1027.
- Cui, H., M. P. Levesque, T. Vernoux, J. W. Jung, A. J. Paquette, K. L. Gallagher, J. Y. Wang, I. Blilou, B. Scheres, e P. N. Benfey. 2007. An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants. *Science* 316: 421-425.
- DEMASON, D. A. 1979a. Function and development of the primary thickening meristem in the Monocotyledon, *Allium cepa* L. *Botanical Gazette* 140: 51-66.
- _____. 1979b. Histochemistry of the primary thickening meristem in the vegetative stem of *Allium cepa* L. *American Journal of Botany* 66: 347-350.
- DENGLER, N. G. 2006. The shoot apical meristem and development of vascular architectureThis review is one of a selection of papers published on the Special Theme of Shoot Apical Meristems. *Canadian Journal of Botany* 84: 1660-1671.
- DI LAURENZIO, L., J. WYSOCKA-DILLER, J. E. MALAMY, L. PYSH, Y. HELARIUTTA, G. FRESHOUR, M. G. HAHN, K. A. FELDMANN, e P. N. BENFEY. 1996. The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* 86: 423-433.
- DOLAN, L. 2007. Scarecrows at the border. Science 316: 377-378.

- DORNELAS, M. C. 2003. Transdução de sinal, divisão celular, diferenciação e desenvolvimento: mecanismos unificadores para padrão de formação em plantas. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 15: 1-8.
- ELBL, P. M. 2008. Estudos em Commelinaceae (Monocotiledôneas): O papel da endoderme e do periciclo na formação do corpo primário. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo,.
- ELBL, P. M., e N. L. D. MENEZES. 2006. Endoderme e Periciclo em Caule e Raiz de Floscopa glabrata (Kunth) Hassk.(Commelinaceae). 57º Congresso Nacional de Botânica. Gramado-RS.
- ENGSTROM, E. M., C. M. ANDERSEN, J. GUMULAK-SMITH, J. HU, E. ORLOVA, R. SOZZANI, e J. L. BOWMAN. Arabidopsis Homologs of the Petunia HAIRY MERISTEM Gene Are Required for Maintenance of Shoot and Root Indeterminacy. Plant Physiology 155: 735-750.
- ECKARDT T. 1941. Untersuchungen das Kritische über primareDickenwachstum bei Monokotylen MIT Ausblick auf dessenVerhaltnis sekundaren Verdickung. Botanisches zur archiv42:289-334.
- ERDELSKA O, VIDOVENCOVA Z. 1993. Development of adventitious seminalroot primordia during embryogenesis. Biologia, Bratislava 48: 85-88.
- ESAU, K. 1965. Plant anatomy New York: Wiley.
- FELDMAN L. 1994. The maize root. In: Freeling M, Walbot V, eds. Themaize handbook. New York: Springer.
- FRIEDMAN, W. E., R. C. MOORE, e M. D. PURUGGANAN. 2004. The evolution of plant development, 1726-1741.
- FRIML, J. 2003. Auxin transport de shaping the plant. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 7-12.
- FUKAKI, H., J. WYSOCKA-DILLER, T. KATO, H. FUJISAWA, P. N. BENFEY, e M. TASAKA. 1998. Genetic evidence that the endodermis is essential for shoot gravitropism in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* 14: 425-430.
- FULTON, T. M., J. CHUNWONGSE, e S. D. TANKSLEY. 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 13: 207-209.
- GALLAGHER, K. L., A. J. PAQUETTE, K. NAKAJIMA, e P. N. BENFEY. 2004. Mechanisms Regulating SHORT-ROOT Intercellular Movement. *Current Biology* 14: 1847-1851.

- GARCIA BELLIDO, A., P. RIPOLL, e G. MORATA. 1976. Developmental compartmentalization in the dorsal mesothoracic disc of Drosophila. *Developmental Biology* 48: 132-147.
- GIFFORD, E. M., e D. E. BAYER. 1995. Developmental anatomy of *Cyperus esculentus* (Yellow Nutsedge). *International Journal of Plant Sciences* 156: 622-629.
- GREB, T., O. CLARENZ, E. SCHäFER, D. R. MÜLLER, R. N. HERRERO, G. SCHMITZ, e K. THERES. 2003. Molecular analysis of the LATERAL SUPPRESSOR gene in Arabidopsis reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *Genes & Development* 17: 1175-1187.
- GUILLAUD, A. 1878. Rechersches sur l'anatomie comparée et le developpement des tissues de la tige dans les monocotylédones. *Annals Sci Nat Bot Ser* 6 1-176.
- HAECKER, A., R. GROß-HARDT, B. GEIGES, A. SARKAR, H. BREUNINGER, M. HERRMANN, e T. LAUX. 2004. Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 131: 657-668.
- HAYWARD, HE, 1938. The structure of economic plants. Macmillan, New York.
- HECKEL, T., K. WERNER, W. F. SHERIDAN, C. DUMAS, e P. M. ROGOWSKY. 1999. Novel phenotypes and developmental arrest in early embryo specific mutants of maize. *Planta* 210: 1-8.
- HELARIUTTA, Y., H. FUKAKI, J. WYSOCKA-DILLER, K. NAKAJIMA, J. JUNG, G. SENA, M. T. HAUSER, e P. N. BENFEY. 2000. The SHORT-ROOT Gene Controls Radial Patterning of the Arabidopsis Root through Radial Signaling. *Cell* 101: 555-567.
 - HELM J. 1936. Das Erstarkungswachstum der Palmer und einigeranderer Monokotylen, zugleich ein Beitrag zur Frage dês Erstarkungswachstum der Monokotylem überhaupt. Planta 26:319–364.
- HEO, J.-O., K. S. CHANG, I. A. KIM, M.-H. LEE, S. A. LEE, S.-K. SONG, M. M. LEE, e J. LIM. 2011. Funneling of gibberellin signaling by the GRAS transcription regulator SCARECROW-LIKE 3 in the Arabidopsis root. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 2166-2171.
- IKEDA, A., M. UEGUCHI-TANAKA, Y. SONODA, H. KITANO, M. KOSHIOKA, Y. FUTSUHARA, M. MATSUOKA, e J. YAMAGUCHI. 2001. slender Rice, a Constitutive Gibberellin Response Mutant, Is Caused by a Null Mutation of the SLR1 Gene, an Ortholog of the Height-Regulating Gene GAI/RGA/RHT/D8. The Plant Cell Online 13: 999-1010.

- JÜRGENS, G., M. GREBE, e T. STEINMANN. 1997. Establishment of cell polarity during early plant development. *Current Opinion in Cell Biology* 9: 849-852.
- KAMIYA, N., J. I. ITOH, A. MORIKAMI, Y. NAGATO, e M. MATSUOKA. 2003. The SCARECROW gene's role in asymmetric cell divisions in rice plants. *Plant Journal* 36: 45-54.
- KIESSELBACH TA. 1949. The structure and reproduction of corn. Nebrasca Agriculture Experiment Station Research Bulletin 161: 3-96.
- KOENTGES, G. 2008. Evolution of anatomy and gene control. *Nature* 451: 658-663.
- LAAJANEN, K., I. VUORINEN, V. SALO, J. JUUTI, e M. RAUDASKOSKI. 2007. Cloning of Pinus sylvestris SCARECROW gene and its expression pattern in the pine root system, mycorrhiza and NPA-treated short roots. *New Phytologist* 175: 230-243.
- LAWSON WE, HANWAY JJ. 1977. Corn production. In: Sprague GF, ed.Corn and corn improvement. Madison: American Society of Agronomy Publishers, 625-669.
- LEE, M.-H., B. KIM, S.-K. SONG, J.-O. HEO, N.-I. YU, S. LEE, M. KIM, D. KIM, S. SOHN, C. LIM, K. CHANG, M. LEE, e J. LIM. 2008. Large-scale analysis of the GRAS gene family in Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology* 67: 659-670.
- LIM, J. 2001. Molecular-genetic Analysis of *Zea mays* SCARECROW (*ZmSCR*) in Maize. New York University, Graduate School of Arts and Science.
- LIM, J., Y. HELARIUTTA, C. D. SPECHT, J. JUNG, L. SIMS, W. B. BRUCE, S. DIEHN, e P. N. BENFEY. 2000. Molecular analysis of the SCARECROW gene in maize reveals a common basis for radial patterning in diverse meristems. *The Plant Cell* 12: 1307-1318.
- LIM, J., J. JUNG, C. LIM, M.-H. LEE, B. KIM, M. KIM, W. BRUCE, e P. BENFEY. 2005. Conservation and Diversification of SCARECROW in Maize. *Plant Molecular Biology* 59: 619-630.
- LIMA, V. F. G. A., e N. L. D. MENEZES. 2009. Morpho-Anatomical Analysis of the Rhizome in Species of *Scleria* Berg. (Cyperaceae) from Serra do Cipó (MG). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52 (6): 1473-1483
- LIMA, V. G. A., e N. L. D. MENEZES. 2008. Endodermis with meristematic activity in roots of species of *Scleria* Berg. (Cyperaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 26(1): 1-6.

- MA, H.-S., D. LIANG, P. SHUAI, X.-L. XIA, e W.-L. YIN. 2010. The salt- and drought-inducible poplar GRAS protein SCL7 confers salt and drought tolerance in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany* 61: 4011-4019.
- MANGIN, L. 1882. Origine et insertion des racines adventives et modifications corrélatives de la tîge chez les monocotylédones. *Ann Sci Nat Bot* 14: 216-363.
- MAYER, U., e G. JÜRGENS. 1998. Pattern formation in plant embryogenesis: A reassessment. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 9: 187-193.
- MAYER, U., G. BUTTNER, e G. JURGENS. 1993. Apical-basal pattern formation in the Arabidopsis embryo: studies on the role of the gnom gene. *Development* 117: 149-162.
- MENEZES, N. L. 1971. Traqueídes de transfusão no gênero *Vellozia* Vand. *Ciência e Cultura* 23: 389-409.
- Menezes, N. L. D., D. C. Silva, R. C. O. Arruda, G. F. Melo-de-Pinna, V. A. Cardoso, N. M. Castro, V. L. Scatena, e E. Scremin-Dias. 2005. Meristematic activity of the Endodermis and the Pericycle in the primary thickening in monocotyledons: considerations on the "PTM". *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 77: 259-274.
- MENEZES, N. L. D., P. M. ELBL, G. CURY, B. APPEZZATO-DA-GLÓRIA, K. L. M. SASAKI, C. G. DA SILVA, G. R. COSTA, e V. G. A. LIMA. 2011. The meristematic activity of the endodermis and the pericycle and its role in the primary thickening of stems in monocotyledonous plants. *Plant Ecology and Diversity* First: 1-13.
- MEYEROWITZ, E. M. 1997. Genetic control of cell division patterns in developing plants. *Cell* 88: 299-308.
- MOROHASHI, K., M. MINAMI, H. TAKASE, Y. HOTTA, e K. HIRATSUKA. 2003. Isolation and Characterization of a Novel GRAS Gene That Regulates Meiosis-associated Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 278: 20865-20873.
- MURASHIGE, T., e F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15: 473-497.
- NAKAJIMA, K., G. SENA, T. NAWY, e P. N. BENFEY. 2001. Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 413: 307-311.
- PENG, J., P. CAROL, D. E. RICHARDS, K. E. KING, R. J. COWLING, G. P. MURPHY, e N. P. HARBERD. 1997. The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway

- that negatively regulates gibberellin responses. *Genes & Development* 11: 3194-3205.
- PETRICKA, J. J., e P. N. BENFEY. 2008. Root layers: complex regulation of developmental patterning. *Current Opinion in Genetics & Development* 18: 354-361.
- PHILLIPS WS, 1937. Seedling anatomy of *Cynara scolymus*. Bot Gaz 98:711–23
- PINHEIRO, J., D. BATES, S. DEBROY, e D. SARKAR. The R Development Core Team 2011 nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-102. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: http://cran. r-project.org/web/packages/nlme/index.html.
- PIZZOLATO, T. D., e M. D. SUNDBERG. 2002. Initiation of the Vascular System in the Shoot of Zea mays L. (Poaceae). II. The Procambial Leaf Traces. *International Journal of Plant Sciences* 163: 353–367
- Pysh, L. D., J. W. Wysocka-Diller, C. Camilleri, D. Bouchez, e P. N. Benfey. 1999. The GRAS gene family in Arabidopsis: Sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant Journal* 18: 111-119.
- RASBAND, W. S. 1997. ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.
- RAVEN, P. H., R. F. EVERT, e S. E. EICHHORN. 2004. Biology of plants. WH Freeman.
- RUDALL, P. 1991. Lateral meristems and stem thickening growth in monocotyledons. *Botanical Review* 57: 150-163.
- RUZIN, S. E. 1999. Plant microtechnique and microscopy. Blackwell Synergy.
- SABATINI, S., R. HEIDSTRA, M. WILDWATER, e B. SCHERES. 2003. SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem, 354-358. Cold Spring Harbor Lab.
- SAITOU, N., e M. NEI. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* 4: 406-425.
- SANCHEZ, C., J. S. M. VIELBA, E. FERRO, G. COVELO, A. SOLÉ D. ABARCA, B. N. S. DE MIER, e C. DIAZ-SALA. 2007. Two SCARECROW-LIKE genes are induced in response to exogenous auxin in rooting-competent cuttings of distantly related forest species 27: 1459-1470.

- SASS JE. 1977. Morphology. In: Sprague GF, ed. Corn and corn improvement. Madison: American Society of Agronomy Publishers.
- SASSA, N., Y. MATSUSHITA, T. NAKAMURA, e H. NYUNOYA. 2001. The Molecular Characterization and in situ Expression Pattern of Pea SCARECROW Gene. *Plant Cell Physiol.* 42: 385-394.
- Scheres, B., e P. N. Benfey. 1999. Asymmetric cell division in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 505-537.
- Scheres, B., L. Di Laurenzio, V. Willemsen, M. T. Hauser, K. Janmaat, P. Weisbeek, e P. N. Benfey. 1995. Mutations affecting the radial organisation of the Arabidopsis root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* 121: 53-62.
- SCHUMACHER, K., T. SCHMITT, M. ROSSBERG, G. SCHMITZ, e K. THERES. 1999. The Lateral suppressor (Ls) gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 290-295.
- SHERIDAN, W. F. 1995. Genes and embryo morphogenesis in angiosperms. *Developmental genetics* 16: 291-297.
- SILVA, C. G., e N. L. MENEZES. 2006 O espessamento primário em caule de Curculigo capitulata (Lour.) Kuntze (Hypoxidaceae). 57º Congresso Nacional de Botânica. Gramado-RS.
- _____. 2007. O espessamento primário em rizoma de Zingiber offinale (Zingiberaceae). 58º Congresso Nacional de Botânica São Paulo.
- SILVA, D. C. 2000. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Lagenocarpus* (Cyperaceae), Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SILVERSTONE, A. L., C. N. CIAMPAGLIO, e T.-P. SUN. 1998. The Arabidopsis RGA Gene Encodes a Transcriptional Regulator Repressing the Gibberellin Signal Transduction Pathway. *The Plant Cell Online* 10: 155-170.
- Schleiden MJ. 1842. Grundzüge der wissenschaftlichen Botanik.Leipzig: Wilhelm Engelmann.
- STEVENS, P. F. 2001 Angiosperm Phylogeny Group, June 2008 [and more or less continuously updated since]." will do. http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/..
- Sun, X., B. Xue, W. Jones, E. Rikkerink, A. Dunker, e V. Uversky. 2011. A functionally required unfoldome from the plant kingdom: intrinsically disordered N-terminal domains of GRAS proteins are involved in

- molecular recognition during plant development. *Plant Molecular Biology* 77: 205-223.
- TIAN, C., P. WAN, S. SUN, J. LI, e M. CHEN. 2004. Genome-wide analysis of the GRAS gene family in rice and Arabidopsis. *Plant molecular biology* 54: 519-532.
- TOMESCU, A. M. F. 2008. The endodermis: A horsetail's tale. *New Phytologist* 177: 291-295.
- TOMLINSON, P. B. 1961. Morphological and anatomical characteristics of the Marantaceae. *J. Linn. Soc.(Bot.)* 58: 55-78.
- VAN TIEGHEM, P. H. 1898. Éléments de Botanique. I Botanique Généralex. Masson Et Cie, Paris.
- WIKSTRÖM, N., V. SAVOLAINEN, e M. W. CHASE. 2001. Evolution of the angiosperms: calibrating the family tree. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 268: 2211-2220.
- WOLFE, K. H., M. GOUY, Y. W. YANG, P. M. SHARP, e W. H. Li. 1989. Date of the monocot-dicot divergence estimated from chloroplast DNA sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86: 6201-6205.
- WOLTERS, H., e G. JÜRGENS. 2009. Survival of the flexible: Hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nature Reviews Genetics* 10: 305-317.
- WYSOCKA-DILLER, J. W., Y. HELARIUTTA, H. FUKAKI, J. E. MALAMY, e P. N. BENFEY. 2000. Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development* 127: 595-603.
- YOSHIDA, S., T. MANDEL, e C. KUHLEMEIER. 2012. Stem cell activation by light guides plant organogenesis. *Genes & Development* 25: 1439-1450.
- ZIMMERMANN, M. H., e P. B. TOMLINSON. 1967. Anatomy of the palm Rhapis excelsa, IV. Vascular development in apex of vegetative aerial axis and rhizome. *Journal of the Arnold Arboretum* 48: 122-142.