



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



**Morfologia, anatomia e histoquímica
de *Noteroclada confluens* Taylor ex Hook. & Wilson
(Pelliaceae, Marchantiophyta).**

Dissertação de Mestrado

Aline Tonin Carvalho

**Porto Alegre
2010**



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



**Morfologia, anatomia e histoquímica de *Noteroclada confluens*
Taylor ex Hook. & Wilson (Pelliaceae, Marchantiophyta).**

Aline Tonin Carvalho

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Pires dos Santos

**Porto Alegre
2010**

*Àqueles que sempre me incentivaram e
que, muitas vezes abriram mãos dos seus
sonhos em favor dos meus. Meus amados,
pai e mãe.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre ao meu lado e me mostrar qual o melhor caminho a seguir.

Aos meus pais, Balduino Tonin e Beloni Irene Dallegrave Tonin, que me ensinaram as coisas mais importantes que já aprendi. Ensinaram-me a ser uma pessoa melhor, sendo exemplos de cidadãos generosos e humildes. Obrigada por apoiarem e contribuírem para minha formação.

Ao meu esposo, meu amor, Paulo Roberto Peres Carvalho, pelo companheirismo, amor e estímulo. Por ser meu porto seguro sempre, por ter as palavras mais confiantes e o abraço mais acolhedor. Obrigada por entender e aceitar o tempo escasso nesses últimos meses.

À minha tia Lourdes Dallegrave, por incentivar meus estudos e me propiciar algumas viagens de cunho científico.

Ao Prof. Dr. Rinaldo Pires dos Santos, professor da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pela orientação e sugestões e por dedicar parte do seu tempo para compartilhar seu conhecimento comigo.

Ao Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath e à Prof. Dra. Alexandra Antunes Mastroberti, ambos professores da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pelos conhecimentos compartilhados e discussões pertinentes.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), seus coordenadores e professores, por me proporcionarem a oportunidade de sempre aprender mais e ampliar meus horizontes.

À diretora do Centro de Microscopia Eletrônica Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Dra. Naira Maria Balzaretto e a todos os funcionários pela disponibilidade e profissionalismo.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dra. Denise Pinheiro Costa (Jardim Botânico do Rio de Janeiro), Prof. Dr. Paulo Oliveira (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) e Prof. Dra. Alexandra Antunes Mastroberti (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), escolhidos por serem exemplos de profissionais, agradeço a disponibilidade em avaliar este trabalho.

Aos meus companheiros do Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (LAVeg), Adriano Silvério, Carla Maria Garlet de Pelegrin, Claudete Pacheco, Daniele Munareto Rodrigues, Érica Duarte Silva, Fernanda dos Santos Silva, Juliana Troiles, Letícia Souto, Lívia Scheunemann dos Santos, Marc Emerim, Marcelo Teixeira, Natividade Ferreira Fagundes, Raquel Inocente Magalhães e Sofia Aumond Kuh, pelo companheirismo, discussões, amizades e apoio principalmente nas horas em que nada parecia dar certo.

Às amigas e confidentes Fernanda Santos Silva, Carla Maria Garlet de Pelegrin e Greta Aline Dettke pelos vários momentos em que abriram mão do seu trabalho para me auxiliar ou simplesmente me acalmar. Suas contribuições foram valiosas. Muito obrigada!

À Profa. Dra. Denise Pinheiro Costa (Jardim Botânico do Rio de Janeiro) pela confirmação da espécie estudada.

À Profa. Dra. Olga Yano (Instituto de Botânica de São Paulo) pelo envio de materiais bibliográficos.

À pesquisadora Juçara Bordin (Instituto de Botânica de São Paulo) por enviar dados sobre a localização da espécie estudada e sugestões de bibliografia.

Ao Prof. Dr. Antônio Batista Pereira (Universidade Federal do Pampa) por ser um exemplo de profissional e por acreditar em mim.

À todos aqueles, familiares, colegas profissionais e amigos, que de alguma maneira contribuíram para que eu chegasse até aqui.

RESUMO

Morfologia, anatomia e histoquímica de *Noteroclada confluens* Taylor ex Hook. & Wilson (Pelliaceae, Marchantiophyta). *Noteroclada confluens* Taylor ex Hook. & Wilson é uma hepática de aparência folhosa, pertencente à família Pelliaceae (Marchantiophyta). Ocorre predominantemente em regiões montanhosas, declives e locais próximos à córregos, em solos argilosos. O presente estudo teve por objetivo descrever a morfologia, anatomia e histoquímica das estruturas do gametófito e esporófito de *N. confluens*, coletados no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, sob microscopia óptica, eletrônica de varredura e confocal de varredura a laser fornecendo, especialmente, dados sobre as estruturas relacionadas com a reprodução sexuada e assexuada, contribuindo para uma melhor caracterização do gênero e da família. O gametófito de *N. confluens* apresenta-se na forma de um talo profundamente lobado, com lobos predominantemente com uma única camada de células. Os lobos são conectados a região mediana, mais espessada, rica em grãos de amido. Na região mediana ventral do gametófito, conectam-se inúmeros rizoides unicelulares. Todo o talo é constituído por um parênquima formado por células de paredes delgadas, de constituição pectocelulósica, sem espessamentos angulares. Cada célula apresenta um único e grande vacúolo e diversos oleocorpos. Os oleocorpos formam grupos de corpos esféricos ou ovalados, constituídos por sesquiterpenoides. Pigmentos flavonóides foram encontrados constituindo as paredes de algumas células do talo. A partir da face ventral, podem emergir tubers de formato arredondados, com um parênquima contendo grãos de amido, funcionando como um órgão armazenador de substâncias de reserva. Nas coletas realizadas no Rio Grande do Sul, foram identificados dois morfotipos: morfotipo 1, com poucos oleocorpos por célula e sem tubers; morfotipo 2, com muitos oleocorpos por célula e presença de tubers. Os gametângios estão distribuídos em fileiras na região mediana, na face dorsal, sendo normalmente duas fileiras, de anterídios, e uma, de arquegônios. Os arquegônios apresentam um material polissacarídico na região do canal do ventre, o que pode facilitar a entrada dos anterozoides. Os anterídios são pedunculados e ovais, apresentam uma única camada de células estéreis protetora e estão inclusos, individualmente, em uma câmara anteridial, com poro apical. Após a fecundação da oosfera, forma-se um esporófito que permanece

circundado pela caliptra e pelo celocaule, até a maturação dos esporos. O esporófito é formado pela cápsula, seta e pé. A parede da cápsula é biestratificada e apresenta espessamentos angulares na epiderme e anelares ou helicoidais, no estrato interno ou subepidérmico. Na base da cápsula, ocorre formação de um denso elateróforo. A cápsula se abre através de quatro fendas longitudinais de deiscência, os estômios, as quais resultam na formação de quatro valvas. A seta é cilíndrica, hialina e levemente estriada, apresentando grãos de amido nas células parenquimáticas da região cortical e epiderme. A elevação ocorre por expansão celular. O pé tem formato de “taça” e apresenta diversos grãos de amido. Na junção gametófito-esporófito (placenta) ocorre um espaço placentar. Não foram encontradas células de transferência na zona da placenta, tanto no gametófito como no esporófito. O tecido esporogênico apresenta células com paredes pectocelulósicas delgadas, a partir do qual se diferenciam dois tipos celulares: os esporócitos, arredondados e com uma parede espessada hialina, e os elaterócitos, mais alongados e com parede espessada de natureza péctica. As células- mãe de esporos são tetralobadas e se individualizam. Nesse estágio apresentam uma parede espessada mais delgada e de natureza hemicelulósica. A meiose leva à formação de quatro esporos unicelulares. Ao redor de cada esporo, deposita-se uma delgada primexina. O desenvolvimento dos esporos é endospórico, e os protonemas jovens, envolvidos ainda pela esporoderme, são esferoidais ou subesferoidais, com células de paredes pectocelulósicas delgadas, muitas vezes repletas de grãos de amido. A esporoderme está estratificada em uma intina, de composição pectocelulósica, e uma exina, impregnada constituída por esporopolenina. A exina forma uma escultura do tipo rugulada. Os elatérios morrem na maturidade e apresentam de duas a três bandas de espessamentos helicoidais, de pigmentação amarronzada e natureza fenólica e polissacarídica. Na exina, a esporoderme apresenta uma região de escultura reduzida.

Palavras- chave: esporogênese, gametângios, hepáticas, ontogênese.

ABSTRACT

Morphology, anatomy and histochemistry of *Noteroclada confluens* Taylor ex Hook. & Wilson (Pelliaceae, Marchantiophyta). *Noteroclada confluens* Taylor ex Hook. & Wilson is a liverwort with a leafy appearance which belongs to the Pelliaceae (Marchantiophyta) family. This species occurs mostly in mountainous regions, descending slopes and places near streams. In this study, the morphology, anatomy and histochemistry of the structures of the gametophyte and sporophyte of *N. confluens* are described. This species was collected in Rio Grande do Sul state, Brazil. The study in light microscopy, scanning electron microscopy and confocal laser scanning provides, especially, data about structures related to sexual and asexual reproduction, contributing to a better understanding of the genus and family. The gametophyte of *N. confluens* presents a form of a deeply lobed stem, the lobes predominantly with a single layer of cells. The lobes are connected to a central region, denser, rich in starch grains. Numerous unicellular rhizoids are connected in the ventral surface of the central region. The entire stem is composed by a parenchyma formed by thin-walled pectin and cellulose cells, with no angular thickening. Each cell has a single large vacuole and several oil bodies. The oil bodies form groups of spherical or oval bodies and present sesquiterpenes in its constitution. Flavonoid pigments were found forming the walls of some cells of the stem. In this ventral surface, round shaped tubers may emerge with a parenchyma containing starch grains, acting as a storage organ for substances. Two morphotypes were identified in a collection in Rio Grande do Sul: morphotype 1, with few oil bodies per cell and without tubers; and morphotype 2, with many oil bodies per cell and the presence of tubers. The gametangia are distributed in rows in the central region on the dorsal surface. Usually there are two rows of antheridia and one of archegonia. The archegonia have a polysaccharide material in the channel region of the venter, which may facilitate the entry of antherozoid. The antheridia are stalked and oval. They have a single protective layer of sterile cells and are included individually in a single antheridial chamber, with apical ostiole. After the fertilization of the egg cell, there is the formation of a sporophyte that remains surrounded by calyptra and the caulocalyx until the maturation of the spores. The sporophyte is formed by the capsule, seta and foot. The capsule wall has two layers of cells and presents angular thickening in the epidermis and annular or helical thickening in the

internal layer. At the base of the capsule there is a formation of a dense elaterophore. The capsule opens in four longitudinal dehiscence cracks, the stomion, which result in the formation of four valves. The seta is cylindrical, hyaline, slightly striated, showing starch grains in parenchyma cells of the cortical region and epidermis. The increase happens by cell expansion. The foot is cup-shaped and it presents several starch grains. In the gametophyte-sporophyte junction (placenta) there is a placental space. Both gametophyte and sporophyte do not present transfer cells in the placenta. The sporogenic tissue has cells with pectin and cellulose walls, which are differentiated in two types: the sporocytes, rounded with a thick hyaline wall, and the elaterocytes, more elongated and presenting a wall of pectin. The spore mother cells are tetralobed and become individualized. On this stage, they have a thinner thickened wall cell and it is made of hemicelluloses. After meiosis, four unicellular spores are formed. Around each spore a thin primexina is deposited. The spore development is endosporic and the young protonemas are spheroidal and still involved by sporoderm. The cells of young protonema have thin cell walls with pectin and cellulose, often presenting many starch grains. The sporoderm presents an intine with pectin and cellulose composition, and an exine, consisting of impregnated esporopolenina. The exine sculpture is rugulate. The elaters die at maturity and have two or three bands of spiral thickening, which have brown pigmentation and a phenolic and polysaccharide composition. In the exine, the sporoderm presents a region of small sculpture.

Keywords: gametangia, liverworts, ontogeny, sporogenesis.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. Caracterização geral das hepáticas	1
1.2. Morfologia e anatomia das hepáticas	4
1.3. Posicionamento taxonômico e caracterização da espécie de estudo	9
2. Objetivos	13
3. Material e Métodos	14
4. Resultados	19
4.1. Morfologia e anatomia do gametófito	19
4.2. Morfologia e anatomia do esporófito	30
4.3. Esporogênese e elaterogênese	38
5. Discussão	45
5.1. Gametófito	45
5.2. Esporófito	51
6. Conclusões e recomendações	56
7. Referências Bibliográficas	58
Anexo I. Tabelas	69

1. INTRODUÇÃO

1. 1. Caracterização geral das hepáticas

As hepáticas constituem um filo de pequenas plantas terrestres avasculares com cerca de 5.000 espécies incluídas em aproximadamente 391 gêneros e 74 famílias (Crandall-Stotler *et al.* 2005; Crandall-Stotler *et al.* 2009a). Estão distribuídas em todos os continentes, incluindo a Antártica, sendo mais diversificadas em florestas das regiões montanhosas do Hemisfério Sul. Para o Brasil, são citadas cerca de 750 espécies (Gradstein & Costa 2003). Com relação à diversidade de hepáticas no Rio Grande do Sul, até o momento são conhecidas cerca de 200 espécies de hepáticas (Yano 2008; Bordin & Yano 2009).

As hepáticas estão agrupadas dentro do filo Marchantiophyta, apresentando como características diagnósticas: gametófito achatado dorsiventralmente que, se folhoso, está diferenciado em duas fileiras laterais de filídios dorsais (nunca com filotaxia helicoidal), uma fileira ventral de filídios (anfigastros, os quais podem ser ausentes); rizoides unicelulares, geralmente hialinos e com paredes finas; associação endossimbiótica com fungos. Além disso, os esporófitos maduros permanecem inclusos no gametófito, a seta é parenquimatosa e se alonga preferencialmente por expansão celular (a divisão celular da seta é mais incomum) e a cápsula não apresenta estômatos, cutícula ou columela (Crandall-Stotler *et al.* 2009b).

O crescimento das hepáticas ocorre de tal forma que o gametófito se desenvolve ao longo de um substrato horizontal ou vertical, apresentando três padrões distintos: folhoso, taloso simples e taloso complexo. O hábito folhoso consiste de três fileiras de filídios ou formas dorsiventrais de duas fileiras laterais, com ou sem uma fileira de reduzidos filídios ventrais, os anfigastros. A sobreposição nos filídios laterais é súcuba (porção superior do filídio é recoberta pela porção basal do filídio subsequente e mais apical) ou íncuba (porção superior do filídio recobre a porção basal do filídio subsequente e mais apical). Segundo Smith (1955), a circulação ascendente de água é

muito mais rápida em espécies súbubas do que em íububas, onde o movimento descendente de água é mais rápido. Isto estaria relacionado com o habitat das formas súbubas, que tendem a crescer em ambientes com abundância de água no solo ou na superfície onde se fixam. Já as formas íububas desenvolvem-se em ambientes onde a água vem de cima, como em superfícies verticais como troncos de árvores. As hepáticas talosas simples apresentam talo simplificado, normalmente com uma região central pluriestratificada e dois lobos laterais uni ou biestratificados. As talosas complexas têm um talo dorsiventralmente distinto. Na região dorsal ocorre uma camada de células clorofiladas com câmaras aeríferas que se abrem por poros. Na região ventral, ocorre um tecido de reserva de nutrientes (Gradstein & Costa 2003). Ressalva-se que essas três categorias não necessariamente envolvem um grupo natural, mas sim uma simples forma de referenciar os padrões de crescimento (Crandall-Stotler *et al.* 2009b).

Tradicionalmente, as hepáticas são divididas em duas classes: Jungermanniopsida Stotl. & Crand- Stotl. e Marchantiopsida Cronquist, Takht. & e W. Zimm. (Crandall-Stotler & Stotler 2000). Esses dois grupos são separados principalmente pelo padrão do desenvolvimento dos anterídios, pelos padrões iniciais do desenvolvimento embrionário, pelo número de camadas celulares da parede da cápsula e a presença ou ausência de lobos no esporócito durante a meiose. A classe Jungermanniopsida apresenta uma maior diversidade taxonômica e é dividida em duas subclasses: Jungermanniidae Engl e Metzgeriidae Barthol- Began. Tais subclasses foram separadas por inúmeros caracteres, dentre eles padrões anatômicos da cápsula e ontogenia dos gametângios. As hepáticas folhosas são as representantes da subclasse Jungermanniopsida e, juntas, representam em torno de 85% das espécies de hepáticas conhecidas. Já a subclasse Metzgeriidae compreende as hepáticas talosas simples. Mesmo sendo diferenciadas pelo padrão de crescimento, ocorrem hepáticas talosas simples em Jungermanniidae e folhosas em Metzgeriidae. Na classe Marchantiopsida estão agrupadas as hepáticas talosas complexas.

Com relação à filogenia do grupo, evidências a partir da morfologia e da gametogênese masculina, suportam a monofilia das hepáticas (Garbary *et al.* 1993). Segundo Qiu *et al.* (1998), evidências baseadas na distribuição de íntrons mitocondriais

indicam que as Marchantiophyta são o grupo irmão de todas as plantas terrestres. Aspectos do metabolismo de auxinas corroboram que as hepáticas foram as primeiras plantas terrestres: as Charophyta e as Marchantiophyta são incapazes de conjugar o ácido indol- acético (AIA), enquanto que Bryophyta, Anthocerothyta e as plantas vasculares conjugam AIA em compostas de amidas e ésteres (Sztein 1995). Sob este ponto de vista, os estômatos seriam então considerados uma inovação nas Anthocerothyta, Bryophyta e em todas as plantas vasculares (Judd *et al.* 2002), suportando um clado “estomatophyto”. Em três análises cladísticas, combinando caracteres morfológicos, ultraestruturais (especialmente ultraestrutura dos anterozóides), moleculares e de desenvolvimento, suportam uma hipótese alternativa: as Anthocerothyta seriam o grupo irmão de todas as plantas terrestres e um clado contendo as hepáticas e os musgos seriam o grupo irmão de todas as plantas vasculares (Renzaglia *et al.* 2000). Essa hipótese implicaria a perda ou evolução independente dos estômatos (Judd *et al.* 2002).

Os trabalhos cladísticos de Crandall-Stotler & Stotler (2000), Forrest *et al.* (2006), He-Nygrén *et al.* (2006) e Qiu *et al.* (2006) suportam a monofilia das Marchantiopsida e das Jungermanniidae e resolvem Metzgeriidae como sendo um agrupamento parafilético. Esses trabalhos corroboram as idéias de Qiu *et al.* (1998), sugerindo que as hepáticas ocupam uma posição crítica na evolução das plantas terrestres, sendo o grupo irmão de todas as outras espécies terrestres. Evidências moleculares sugerem que as Marchantiophyta surgiram no período Ordoviciano Superior. Crandall-Stotler *et al.* (2005) sugeriam que o ancestral comum das hepáticas provavelmente seria uma planta prostrada, com simetria bilateral, folhosa e com características das estruturas reprodutivas e de desenvolvimento das hepáticas do clado das talosas simples.

1. 2. Morfologia e anatomia das hepáticas

Todas as células do gametófito das hepáticas têm origem a partir de única célula apical. São reconhecidos quatro diferentes tipos de células apicais: piramidal, cuneada, lenticular e hemidiscoide (Crandall-Stotler 1981 *apud* Crandall-Stotler *et al.* 2009b). Células apicais tetraédricas estão tipicamente associadas com o hábito folhoso, as lenticulares com talos muito achatados e as cuneadas ou hemidiscoides com as demais formas de crescimento taloso (Renzaglia *et al.* 2000). Dentro das briófitas, as hepáticas apresentam a maior diversidade de células apicais dentro de um mesmo clado. Por exemplo, em Pelliidae, a célula apical pode ser tetraédrica, cuneada ou hemidiscoide (Crandall-Stotler *et al.* 2009b). Muitos táxons desenvolvem modificações ao longo da vida na morfologia da célula apical, com a transformação de células tetraédricas para lenticulares (ou vice-versa), tetraédrica para cuneada ou cuneada para hemidiscoide (Renzaglia 1982 *apud* Crandall- Stotler *et al.* 2009b). Essas mudanças na morfologia podem estar relacionadas com mudanças na orientação do crescimento ou mudanças morfológicas abruptas. A célula apical tetraédrica é considerada uma pleisiomorfia entre as hepáticas e são características de Haplomitriopsida, Jungermanniidae e em Pelliidae. A suposição, proposta por He-Nygrén *et al.* (2004, 2006) de que a geometria cuneada é uma caráter pleisiomórfico e que as geometrias tetraédricas derivaram independentemente em várias linhagens não foi suportada em análises da evolução desse caráter (Crandall-Stotler *et al.* 2005).

Uma característica marcante de Marchantiophyta e que as distingue das outras embriófitas é a presença de oleocorpos, que não são encontrados em todas as hepáticas, porém são amplamente distribuídos entre os diversos táxons do grupo. Essa estrutura celular armazena uma série de terpenoides e outros compostos aromáticos e, aparentemente, não serve como reserva de nutrientes (Shaw & Renzaglia 2004). O interior dos oleocorpos apresenta pequenas gotículas osmofílicas suspensas em um estroma granular rico em proteínas e carboidratos. Nas Jungermanniopsida, a forma, tamanho, coloração, número e distribuição dos oleocorpos são caracteres taxonômicos importantes. Devido aos componentes voláteis dos óleos que os compõem, os

oleocorpos desaparecem rapidamente em indivíduos desidratados. Nas reconstruções filogenéticas, a presença de oleocorpos é uma sinapomorfia de Marchantiophyta e o tipo *Massula* é pleisiomórfico (Crandall-Stotler *et al.* 2005). Sugere-se que esses compostos presentes nos oleocorpos, derivados do metabolismo secundário, possam atuar durante períodos de dormência vegetativa, em secas prolongadas e para deter herbívoros (Perry *et al.* 2008). Alguns desses terpenoides são biologicamente ativos e podem causar reações alérgicas (Asakawa 2008), enquanto outros são citotóxicos, com atividades anti-tumorais em ratos (por exemplo, em leucemia linfocítica), além de atividades vasopressoras e antifúngicas (Asakawa *et al.* 2003, Asakawa 2008, Shahid *et al.* 2009).

Os gametângios das hepáticas são exógenos, superficiais, e estão protegidos por uma camada de células externas. Nas hepáticas folhosas, os gametângios estão associados aos filídios e/ou circundado por eles. Nas hepáticas talosas, ocorre uma série de estruturas e mecanismos para proteger os gametângios, incluindo ramificações ventrais enroladas, câmaras secundárias e formas lamelares crescendo do talo (Renzaglia *et al.* 2000).

O desenvolvimento do arquegônio ocorre a partir do alongamento de uma célula inicial que se divide acima da superfície do talo. O processo envolve três divisões longitudinais, formando um centro axial triangular circundado por três células periféricas (Renzaglia *et al.* 2000). As células da periferia formam o pescoço ou colo, enquanto as células internas formam as células do canal do pescoço (as quais originarão um tubo “gelatinoso” por onde passará o gameta masculino), o ventre e, no seu interior, a oosfera (gameta feminino). As estruturas sexuais multicelulares femininas das hepáticas não servem apenas para proteger os frágeis gametas, mas também protegem o embrião após a fecundação. A sua evolução provavelmente envolveu complexos processos históricos correlacionados com fatores genéticos, fisiológicos e ambientais (Renzaglia *et al.* 2000).

A ontogênese dos anterídios envolve desenvolvimento de estruturas globosas ou alongadas. O padrão de divisão caracteriza os diferentes clados das hepáticas. Os anterozoides, biflagelados em todas as hepáticas, são estruturalmente formados para obterem uma eficiente natação no ambiente terrestre (Renzaglia *et al.*

2000). Durante a espermatogênese, células parenquimáticas indiferenciadas são progressivamente transformadas, envolvendo a produção do aparelho locomotor (flagelos).

O esporófito das hepáticas está parcialmente ou totalmente incluso no gametófito e é dependente fisiologicamente dele até a liberação dos esporos. Na sua fase adulta, o esporófito apresenta um pé, em contato com as células do gametófito e um esporângio terminal, a cápsula, elevada pela seta. A seta pode ser clorofilada ou hialina quando jovem, mas sempre é esbranquiçada quando madura (Glime 2007). Em muitas hepáticas, após a esporogênese ser completada, as células da seta se alongam até vinte vezes seu comprimento original, elevando a cápsula para longe do gametófito. Esse processo envolve captação de água e é mediado por auxinas, podendo envolver síntese de novas substâncias na parede celular (Thomas & Doyle 1976).

O embrião, a fase juvenil do esporófito, pode estar protegido apenas pelos tecidos originados do arquegônio (formando uma caliptra verdadeira) ou por tecidos originados a partir gametófito e do arquegônio (caliptra vestigial). Na caliptra verdadeira, grande parte do tecido tem origem apenas do ventre do arquegônio, ocorrendo pouca penetração do pé no talo gametofítico. Já na caliptra vestigial, após a fecundação, as células do talo são estimuladas a se dividir, fazendo com que o pé e a parte basal da seta fiquem inclusos no tecido gametofítico. A parte superior da seta e a cápsula serão circundadas por células derivadas do ventre do arquegônio (Crandall-Stotler *et al.* 2009b). Outro tipo de proteção para o embrião é o celocaule, estrutura gametofítica, a qual se desenvolve após a fecundação. Neste tipo, o esporófito está completamente imerso no tecido gametofítico. Estruturas adicionais como o perianto (originado a partir de filídios modificados que circundam o arquegônio na maioria das hepáticas folhosas) e o pseudoperianto (invólucro mais interno dos dois invólucros que envolvem o arquegônio de algumas hepáticas talosas) desenvolvem-se externamente à caliptra ou caliptra vestigial, envolvendo o arquegônio fecundado.

No interior da cápsula são produzidos os esporos e os elatérios. O formato da cápsula, a estrutura das paredes celulares e as propriedades de deiscência são caracteres de valor taxonômico. O formato varia de oval, esférico, elipsóide ou cilíndrico alongado. Em todas as Jungermanniopsida, a cápsula apresenta duas ou mais

camadas celulares, onde ocorre a formação de paredes secundárias, que contribuem para a deiscência do esporângio, com liberação dos esporos após alongamento da seta. A deiscência ocorre, geralmente, por suturas longitudinais, dividindo a cápsula em valvas. A natureza química dos espessamentos secundários e os mecanismos de regulação dessa deposição são desconhecidos (Crandall-Stotler *et al.* 2009b), porém sua autofluorescência e sua aparência, em microscopia óptica, sugerem que sejam constituídos por compostos fenólicos.

Os elatérios separam os esporos e facilitam a sua dispersão. Os seus movimentos higroscópicos auxiliam na deiscência da cápsula e auxiliam na liberação dos esporos (Ingold 1939). Os elatérios são unicelulares e apresentam finos e alongados espessamentos secundários helicoidais constituindo as suas paredes celulares. A sua origem se dá a partir de divisões mitóticas do tecido esporogênico durante a esporogênese. Essas divisões iniciam-se logo após a delimitação das células-mãe de elatérios e, na maturidade, apresentam morte celular. A proporção de elatérios frequentemente é fixa para cada táxon e, na maioria das hepáticas, é de quatro elatérios para cada esporo (Crandall- Sotler & Stotler 2000). Nas Pelliaceae, os elatérios organizam-se em um “tufo” de células ligadas a células estéreis na base da cápsula, formando o elateróforo.

A esporogênese e a morfologia dos esporos são caracteres conservados nas embriófitas e fornecem dados filogenéticos importantes (Brown & Lemmon 1990). O esporócito (célula- mãe de esporo) das hepáticas Haplomitriopsida e Jungermanniopsida apresenta formato tetralobado durante a meiose. Já nas Marchantiidae, eles não apresentam lobos e são esféricos. Essa diferença na morfologia do esporócito é muito utilizada para separar as marchantioides do restante das hepáticas (Schuster 1984). Quanto aos plastídios, as Marchantiidae apresentam um único plastídio durante a meiose, enquanto as demais hepáticas apresentam muitos plastídios nessa fase do desenvolvimento.

Os esporos variam muito quanto ao seu tamanho, formato e ornamentação, sendo menores e mais ornamentados nas Jungermaniidae e Metzgeriidae do que nas Pelliidae e Marchantiopsida (Schuster 1984). A parede do esporo das hepáticas apresenta, em sua estrutura, uma intina geralmente péctico-celulósica e uma exina

ornamentada e impregnada com esporopolenina (Blackmore & Barnes 1987). Em muitos táxons, a exina está relacionada com a deposição de calose na fase de prófase do esporócito (Brown & Lemmon 1986). Ocorre uma primexina durante a citocinese meiótica e esta camada fornece um molde para a deposição das camadas posteriores. As hepáticas são isosporadas e a maioria libera seus esporos na forma de mônade. Cada esporo contém abundantes substâncias de reserva, tipicamente amido e óleos.

A germinação dos esporos resulta na formação de um simples gametófito por esporo. Ela tem início com a divisão celular do esporo, formando um protonema multicelular. No crescimento exospórico, o protoplasto rompe a parede do esporo antes de iniciar a mitose (normalmente após sair da cápsula). O crescimento endospórico é muito comum em hepáticas e ocorre em todas as ordens de hepáticas, com exceção de Sphaerocarpaceles (Crandall-Stotler *et al.* 2009a). Neste tipo, as divisões celulares começam antes da deiscência da cápsula. Os padrões de germinação ou crescimento de esporos podem ser relacionados com o ambiente em que vivem. Normalmente, espécies de briófitas xerófitas (epífitos ou saxícolas) tendem a apresentar um desenvolvimento endospórico. Exceções ocorrem, por exemplo, nos gêneros *Pellia* e *Conocephalum*, uma vez que apresentam desenvolvimento endospórico e crescem em locais com muita umidade (Nehira 1987 *apud* Crandall-Stotler 2009b).

Com relação a importância ecológica do grupo, as hepáticas participam do processo de sucessão vegetacional dos ecossistemas, uma vez que desenvolvem-se agrupadas, formando extensos tapetes que recobrem determinadas áreas. Esses tapetes evitam a erosão do solo e servem de substrato para o desenvolvimento de outras plantas. Além disso, Lisboa & Ilkiu-Borges (1995) citam a importância das hepáticas nos ciclos do carbono e nitrogênio, formação do solo e como componentes importantes da biomassa. Muitos estudos médicos evidenciam o uso de hepáticas para o tratamento de doenças cardiovasculares e da pele. Elas podem possuir propriedades antissépticas, diuréticas, antibióticas e antitumorais (Ando & Matsuo 1984).

Algumas espécies de hepáticas são utilizadas como bioindicadoras já que são sensíveis às variações ambientais (Lisboa & Ilkiu-Borges 1995). Em determinadas regiões, são apreciadas na horticultura como aditivos no solo, meio para germinação de sementes, em vasos de bonsai para retenção da umidade e estabilidade do solo, em

jardinagem e em aquários, por proporcionarem oxigênio aos peixes e substrato para a deposição dos ovos (Ando & Matsuo 1984).

1.3. Posicionamento taxonômico e caracterização de *Noteroclada confluens*

O gênero *Noteroclada* Taylor ex Hook. f. & Wilson é monoespecífico, sendo representando apenas por *Noteroclada confluens* (Hook. f. & Taylor) Spruce. O gênero está posicionado na classe Jungermanniopsida, subclasse Pellidae, ordem Pelliales, família Pelliaceae (Crandall- Stotler *et al.* 2009a) e, atualmente, possui suas relações filogenéticas bem estabelecidas. Entretanto, ao longo do estudo do grupo existiram divergências quanto ao posicionamento taxonômico e o esclarecimento das relações de parentesco.

No século XIX, o gênero *Noteroclada* apresentava um grupo bem maior de espécies. Estudos taxonômicos posteriores, reposicionaram muitas dessas espécies, sendo três inseridas no gênero *Fossombronia*. Na América Latina, *Noteroclada* é ainda muito confundida com *Fossombronia*. Todavia, esses gêneros são facilmente diferenciados pelas características do gametófito: *Noteroclada* apresenta o talo mais largo e os rizoides hialinos; os rizoides de *Fossombronia* são avermelhados ou em tons de roxo. Com relação ao esporófito, a abertura da cápsula de *Noteroclada* ocorre sempre por quatro valvas e, em *Fossombronia*, a abertura é irregular (Freire 2002).

Na classificação proposta por Crandall-Stotler & Stotler (2000), *Noteroclada* pertence a Fossombroniales, na subordem Pelliineae, Pelliaceae, que também inclui o gênero *Pellia*.

Desde os estudos morfológicos de Schiffner (1911), muitos autores relacionam os gêneros *Noteroclada* e *Pellia*. Segundo Crandall-Stotler *et al.* (2005), *Noteroclada* é considerada grupo irmão de *Pellia*, com suporte de 85% de bootstrap. Pelliaceae é resolvida como monofilética apresentando cinco sinapomorfias: pé do esporófito com formato cônico, elatérios com mais de duas bandas de espessamentos, germinação precoce e endospórica e espécies monóicas.

Frey & Stech (2005), baseados em caracteres morfológicos e moleculares, inserem *Noteroclada* dentro da família Noterocladaceae. Contudo, seus resultados evidenciam que essa família apresenta uma posição ambígua dentro de uma superclasse maior (Super classe III).

Noteroclada foi resolvida como grupo irmão de *Metzgeria* Raddi e *Pleurozia* Dumort. (He-Nygrén *et al.* 2004). Todavia, análises posteriores indicaram que as sequências de genes do GenBank tiveram o nome incorreto associados e por isso as análises não estavam corretas (Forrest *et al.* 2006). Posteriormente, He-Nygrén *et al.* (2006) não incluíram *Noteroclada* em suas análises, justamente pela incerteza da sequência de dados dessa espécie. Com relação à família Pelliaceae, esses autores sugerem que ela tenha um arranjo sistemático independente dentro do clado das hepáticas talosas simples.

Segundo Forrest *et al.* (2006), *Pellia* e *Noteroclada* formam um clado bem sustentado. Este clado é um dos primeiros a divergir dentro das Talosas Simples I sendo, de acordo com essa análise filogenética, grupo irmão de Fossombroniineae. Essa topologia difere de Heinrichs *et al.* (2005) principalmente na posição das linhagens iniciais. Nesse estudo, *Makinoa* Miyake é primeira linhagem a divergir dentro das talosas simples I e *Noteroclada* está inserida em Fossombroniineae. Esse resultado pode ser explicado pela ausência de *Pellia* nas análises. Trabalhos anteriores explicam que a ausência de grupos bem caracterizados como, por exemplo, *Pellia*, podem alterar drasticamente a estrutura dos agrupamentos com divergência evolutiva precoce (Crandall-Stotler *et al.* 2005).

A classe Jugermanniopsida caracteriza-se por apresentar hepáticas talosas ou folhosas, com oleocorpos normalmente presentes em todas as células e rizoides monomórficos, com paredes lisas. Além disso, são características desta classe a origem dos anterídios, a partir de duas células androgoniais iniciais, o colo (ou “pescoço”) arquegonial normalmente formado por cinco fileiras de células, o embrião filamentososo, a seta do esporófito com alongamento pronunciado, a parede da cápsula formada por dois ou mais estratos celulares, os esporócitos lobados e os esporos com variação criptopolar a apolar, raramente polares (Crandall-Stotler *et al.* 2009a).

As hepáticas da subclasse Pellidae são principalmente talosas simples e, se folhosas, com filídios organizados em duas fileiras. As ramificações são terminais ou intercalares, laterais ou ventrais. Os anterídios localizam-se no meio do talo (na superfície dorsal) ou no caulídeo e podem, ou não, possuir perigônio. Os gametângios femininos normalmente são anacrogíneos (arquegônios formados a partir de células iniciais superficiais, sem a perda da função da célula apical) e posicionam-se no meio do talo, na superfície dorsal ou no caulídeo (Crandall-Stotler *et al.* 2009a).

A ordem Pelliales apresenta hepáticas talosas ou folhosas, estando os filídios inseridos de modo súcubo. A célula apical pode ser tetraédrica, cuneada ou hemidiscoide. Podem ocorrer papilas ou pêlos unisseriados na face ventral (distribuídos em duas fileiras). Os rizoides variam de hialinos a acastanhados ou tem coloração vermelho pálido. São raras as ramificações ventrais. Os anterídios estão organizados em duas fileiras, espalhados ou agrupados no talo, cada um dentro de uma câmara cônica com um ostíolo apical. Os arquegônios estão desprovidos de proteção e arranjam-se normalmente em duas fileiras ao longo do meio do talo ou em aglomerações anacrogíneas protegidos pelo periquécio. O esporófito está envolvido pela caliptra, pseudoperianto ou celocaule. As cápsulas são esféricas, com um elateróforo basal, e abrem-se por quatro valvas. A germinação do esporo é endospórica (Crandall-Stotler *et al.* 2009a).

A família Pelliaceae está formada pelos gêneros *Noteroclada* e *Pellia*. Embora o esporófito seja muito semelhante, esses dois gêneros são facilmente distinguidos pela morfologia do gametófito. *Pellia* é claramente talosa e *Noteroclada* apresenta hábito folhoso (Crandall-Stotler *et al.* 2009b).

. *Noteroclada confluens* distribui-se principalmente nas regiões montanhosas da América do Sul e Central (do México até a Terra do Fogo na Argentina), crescendo em solos úmidos, declives ou próximas a córregos (Gradstein & Costa 2003). No Brasil, *N. confluens* é descrita para áreas de Mata Atlântica e Cerrado nas regiões sul, sudeste e centro-oeste. Indivíduos de *N. confluens* já foram coletados nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo (Yano 2008) e Rio Grande do Sul (Bordin & Yano 2009). No Rio Grande do Sul, é encontrado em beira de estradas de chão, ocorrendo em áreas de desníveis elevados, como barrancos (Fig. 1A e B).

O gametófito é considerado folhoso (Fig. 1C), ramificando-se por extensas regiões sobre os solos úmidos. Prevaecem os talos monóicos, sendo os dióicos (ou unisexuados) raros. Os anterídios e arquegônios estão dispostos em fileiras na superfície dorsal. Os rizoides apresentam coloração marrom claro ou são hialinos. O esporófito apresenta uma seta longa e delgada (2-10 cm) com uma cápsula esférica (Fig. 1D) que se abre por quatro valvas. Os esporos são verdes, multicelulares e grandes, com cerca de 50 a 100 μm , sendo o seu desenvolvimento endospórico (Grandstein & Costa 2003; Bordin & Yano 2009).

Esta dissertação de mestrado foi motivada pelos escassos dados a respeito da anatomia de *Noteroclada confluens*, de outras espécies de hepáticas e mesmo das briófitas *latu sensu*. Através de estudos de cunho anatômico, é possível resolver diversos problemas taxonômicos e filogenéticos, contribuindo para um melhor entendimento do grupo como um todo.



Figura 1. A- B. Habitat de *Noteroclada confluens*. C. Detalhe do gametófito, em vista dorsal. D. Detalhe do esporófito.

2. OBJETIVOS

A presente dissertação teve por objetivos: descrever a morfologia e anatomia do gametófito de *Noteroclada confluens*, especialmente o desenvolvimento dos gametângios, no que diz às suas características citológicas; descrever a morfologia e anatomia do esporófito de *Noteroclada confluens*; caracterizar os principais estádios de desenvolvimento do esporófito e a esporogênese; descrever a estrutura e citoquímica dos esporos; caracterizar a esporoderme (exina e intina); fornecer dados morfológicos que possam ser utilizados em análises filogenéticas posteriores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Gametófitos e esporófitos de *Noteroclada confluens*, foram coletados em terrenos úmidos nos municípios de Porto Alegre (30°04'09"S 51°08'18,4"W) e Caxias do Sul (29°08'22,76"S 51°09'06,88"W), estado do Rio Grande do Sul, Brasil, entre os meses de março de 2008 a outubro de 2009. Em laboratório, o material coletado foi analisado em microscópio estereoscópico Leitz M7 e fotografado com câmera digital Canon EOS 300D, equipado com lente Sigma 150 APO Macro DG. A identificação do material seguiu Grandstein & Costa (2003). O material testemunho foi depositado no Herbário ICN do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob números 163043 e 188555.

A classificação taxonômica adotada seguiu Crandall-Stotler *et al.* (2009a). A terminologia das estruturas está de acordo com Magil (1990) e Crandall-Stotler *et al.* (2009b).

3.1. Microscopia óptica

Porções dos gametófitos foram seccionadas com auxílio de lâmina de barbear e fixados em uma mistura de glutaraldeído 2,5% e formaldeído 2%, em tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,2 à temperatura ambiente, sob baixa pressão (Roland & Vian 1991). As amostras fixadas foram lavadas em tampão fosfato de mesma osmolaridade e pH (três lavagens, 15 minutos cada) e desidratadas em série crescente de etanol. Iniciou-se a desidratação com etanol 10%, seguido da adição gradual de etanol 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%, com intervalos de 15 minutos, mantendo-se metade do volume anterior, com objetivo de realizar uma troca mais gradual. Para a inclusão em resina acrílica a base hidroxietilmetacrilato (Technovit® 7100, Kulzer), as amostras foram transferidas para uma solução de pré-infiltração, uma mistura (1:1) de etanol absoluto e resina, por 8 horas, em constante agitação e, após, para resina pura,

por mais 8 horas, seguido de polimerização com adição de catalizador (Gerrits & Smid 1983).

Esporófitos em diferentes estádios de desenvolvimento foram dissecados sob microscópio estereoscópico e fixados em solução fixadora idêntica a empregada para a fixação do gametófito. Em muitos casos, tecidos gametofíticos foram preservados juntamente com os esporofíticos, quando o esporófito apresentou dimensões muito reduzidas. Os esporófitos permaneceram estocados no fixador, a pressão ambiente, por um período que variou de 24 horas a quatro meses. As amostras foram lavadas em tampão fosfato de mesma osmolaridade e pH (três lavagens de 15 minutos cada). Após, o material foi desidratado em série crescente de etanol (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%, 15 minutos cada). Na sequência, as amostras foram tratadas em série de etanol-clorofórmio (3:1, 1:1, clorofórmio puro, 1:1, 3:1 e etanol absoluto, 20 minutos cada). O material foi transferido para solução de pré- infiltração, permanecendo por 8 horas. Finalmente, as amostras foram incluídas em resina acrílica pura, a qual foi polimerizada com adição de catalizador.

Seções semifinas de 2 a 4 μm de espessura foram obtidas em micrótomo de rotação Zeiss, Microm HM 340 E, equipado com navalha de vidro, e em micrótomo de guias Leitz 1400, equipado com navalha de aço perfil "D".

As seções foram distendidas em água e montadas em lâminas histológicas de vidro sobre placa aquecedora, a aproximadamente 50°C.

Como corante geral, isoladamente, foi utilizado o Azul de Toluidina O (C.I. 52040) 0,05% em solução aquosa, pH 4,4 (O'Brien & McCully 1981), também empregado em seções submetidas à reação de PAS (ácido periódico-Reagente de Schiff, O'Brien & McCully 1981). Alternativamente, foi empregada, a combinação de Azul de Astra (C.I. 34195) 0,05% em solução aquosa, seguido de reação de PAS e Fucsina Básica (C.I. 42500) 0,05%, em solução aquosa (Kraus *et al.* 1998, modificado) .

Para os testes histoquímicos, em seções histológicas de 3 μm de espessura (em resina acrílica), cortes à mão livre ou material não seccionado, foram empregados os seguintes corantes/técnicas: Coomassie Blue Brilhante R-250 (C.I. 42660), com concentração de 0,25% em solução acética 7%, para proteínas totais (Southworth 1973); Alcian Blue 8GX 1% (C.I. 74240), em solução acética 3%, para

mucopolissacarídeos ácidos (Lillie 1965); Ácido Periódico-Reagente de Schiff (PAS), para polissacarídeos totais (O'Brien & McCully 1981); Auramina O (C.I. 41000), em concentração 0,01% em tampão Tris HCl, seguido de excitação sob luz ultravioleta (340-380 nm), para identificação de esporopolenina (Heslop-Harrison 1977; Nepi & Franchi 2000); Calcofluor White (C.I. 40622), seguido de excitação sob luz ultravioleta (340-380 nm), para celulose (Hughes & McCully 1975); Fucsina Básica (C.I. 42500) 0,05%, em solução alcoólica 2,5%, para a identificação de compostos de natureza fenólica e exina (Faegri & Iversen 1964; Punt *et al.* 2007); floroglucinol-HCl (Sass 1940), teste de Maule (Johansen 1940) e ou Acridine Orange, sob luz ultravioleta de 502 nm (Stockert *et al.* 1984), para localização de lignina; Azul de Astra (C.I. 34195) 0,5%, em solução aquosa, para pectinas (Gerlach 1984); reação de Schiff modificada (a base de iodeto de propídio), seguido de excitação sob luz ultravioleta (488nm), para compostos polissacarídicos (Truernit *et al.* 2008); Sudan Black B (C.I. 26150), saturado em solução alcoólica a 70%, para identificação de compostos de natureza lipídica (Jensen 1962); ácido sulfúrico concentrado, para detecção de sesquiterpenoides (Geismann & Griffin 1971); Azul de Anilina (C.I. 42755), em concentração 0,1% em tampão fosfato pH 8,5, sob luz ultravioleta (395 nm), para calose (Martin 1959).

Seções de 3 μm de espessura, montadas em lâminas histológicas, foram tratadas com hemicelulase 2%, (Guerra & Souza 2002), por 40 min, lavadas em água destilada e submetidas à reação de PAS. O resultado de coloração nas paredes celulares foi comparado ao resultado de coloração das mesmas estruturas, em seções não tratadas com hemicelulase. Ausência de coloração (reação negativa) nas paredes celulares, simultânea a uma reação positiva (presença de coloração) no controle, permitiu identificar a composição hemicelulósica das paredes celulares.

Todas as preparações histológicas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio óptico de campo claro, polarização e epifluorescência Leica DM R, equipado com câmera fotográfica digital Leica DFC 500.

Para análises das dimensões dos protonemas, cápsulas do esporófito, em início de deiscência, foram esmagadas em água destilada, entre lamínula e lâminas de vidro. Foram medidos os diâmetros de 300 protonemas, em dez cápsulas.

Para análise da densidade de gametângios na superfície ventral do gametófito, sob microscópio, foram analisados 450 indivíduos, coletados entre os meses de abril a outubro de 2009.

3.2. Microscopia confocal de varredura a laser

Para as análises em microscopia confocal de varredura a laser, porções do gametófito ou esporófito foram tratadas segundo protocolo descrito por Truernit *et al.* (2008). As amostras foram fixadas em uma mistura de metanol 50%, ácido acético 10% e água, à temperatura de 4°C, por 12h. Após, o material foi transferido para etanol 80%, à temperatura de 80°C, por 1 minuto, e recolocado no fixador por mais uma hora. As amostras foram lavadas em água destilada e transferidas para ácido periódico 1%, a temperatura ambiente, durante 40 min. Após nova lavagem, o material foi transferido, por duas horas, para reagente de Schiff modificado (a base de iodeto de propídio). O material foi montado em lâmina histológica escavada e observado e fotomicrografado em microscópio confocal de varredura a laser Olympus FV1000. No caso da captura de uma seqüência de seções ópticas (ao longo do eixo Z), a reconstrução das seções foi feita no programa Bitplane Imaris v. 6.3.1..

3.3. Microscopia eletrônica de varredura

Para a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), porções do gametófito e do esporófito foram fixadas segundo o protocolo descrito para preparação em microscopia óptica. As amostras foram lavadas em solução tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,2, desidratadas em série crescente de etanol, transferidas para acetona 100% e secadas em secador de ponto crítico Balzers CPD 030. Sob microscópio estereoscópico, o material foi montado sobre fita adesiva condutora de carbono, sob

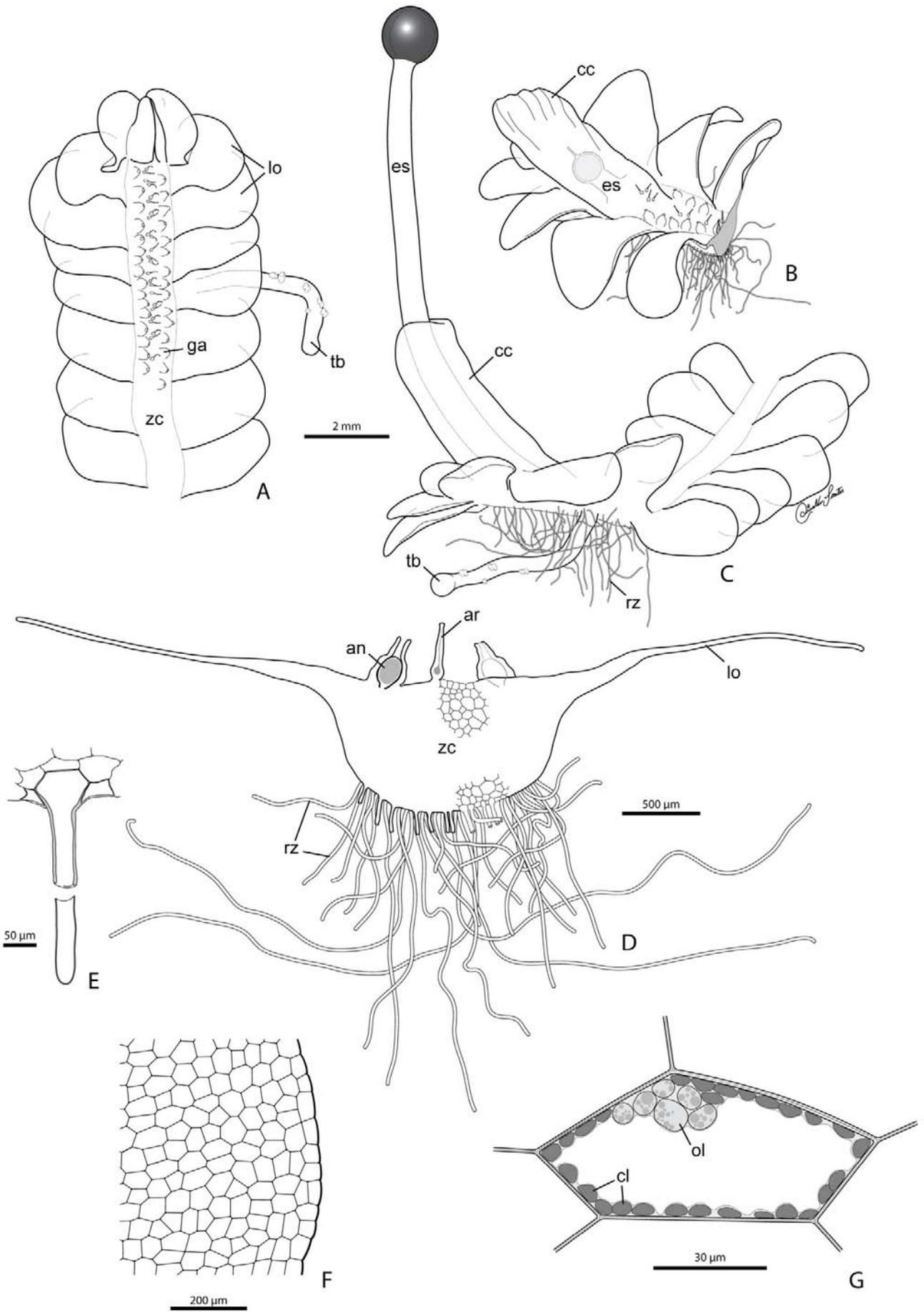
suportes de alumínio (“stubs”). Cápsulas foram manualmente rompidas, sob estereomicroscópio e com o auxílio de pinça de aço de ponta fina, para liberação dos protonemas e elatérios. Todo material foi recoberto com uma camada de 10 a 15 nm de platina, em metalizador tipo “sputtering” Balzers SCD 050. As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6060, sob 20 kV.

4. RESULTADOS

4.1. Morfologia e anatomia do gametófito

O gametófito de *Noteroclada confluens* caracteriza-se por ser um talo de aparência folhosa (Figs. 2A-C), achatado dorsiventralmente, crescendo sempre prostrado ao solo, em terrenos inclinados ou totalmente verticais, de natureza geralmente argilosa. O talo apresenta coloração verde intensa, podendo variar do claro ao escuro. Ocasionalmente, pode possuir cor avermelhada ou amarronzada nas margens ou junto aos gametângios (Fig. 3A). O comprimento do talo não ultrapassa cinco centímetros e a largura pode variar de 0,4 à 0,9 centímetros. Morfologicamente, o gametófito apresenta-se profundamente lobado, constituindo-se em uma sequência longitudinal de lobos súbucos, planos ou levemente convexos, ovados, com margens inteiras (Figs. 2A-C e 3B). Os lobos mostram-se conectados a uma faixa plana central, mais clara, com até 1mm de largura. Os indivíduos são monóicos, podendo ser identificados gametângios masculinos e femininos distribuídos, freqüentemente, em três fileiras dorsais e longitudinais, ao longo da região mediana do talo (Figs. 2A, 2D, 3A e 3B). Também podem ser encontrados talos totalmente desprovidos de gametângios, assim como apresentando somente fileiras de anterídios.

Figura 2. O gametófito de *Noteroclada confluens*. **A.** Aspecto geral do talo, em vista dorsal, mostrando a distribuição súbuca dos lobos (lo), os gametângios (ga) ao longo da região mediana e um tuber (tb) ligado à face ventral do talo por um pedúnculo sinuoso. **B.** Vista lateral do talo mostrando o celocaule (cc), próximo ao ápice, recobrimdo o esporófito (es) em desenvolvimento. **C.** Vista lateral do talo, mostrando o celocaule (cc) rompido pelo esporófito (es), os rizoides (rz) emergindo da face ventral e um tuber (tb). **D.** Esquema de uma seção transversal do talo. Estão representadas duas fileiras de anterídios (an) e uma de arquegônios (ar). Nota-se a espessura dos lobos (lo), uniestratificados na sua maior extensão, e da região mediana (zc) do talo, de se ligam os numerosos rizoides (rz). **E.** Detalhe de base e ápice de um rizoide. **F.** Células da margem de um lobo. **G.** Detalhe de uma célula do talo, mostrando os cloroplastos (cl) e os oleocorpos (ol). Em A, B e C, todos na mesma escala (em A).



O talo é totalmente constituído por células que formam um tecido parenquimático clorofilado. A região mediana do talo é formada por um parênquima com várias camadas de células (Fig. 2D), contendo plastídios que armazenam grãos de amido de dimensões relativamente grandes (Fig. 3C). Pode possuir até 15 camadas de células poligonais, às vezes alongadas, com paredes celulares primárias bastante delgadas, sem espessamentos angulares visíveis. Algumas células podem alcançar até 150 μm , no seu eixo maior.

Nos lobos, as células são poliédricas, de paredes sempre delgadas, retas ou levemente curvadas (Figs. 2F, 2G e 5A). Apresentam dimensões médias de 62 μm , em seu eixo maior, e 35 μm , em seu eixo menor, podendo alcançar um comprimento máximo de 90 μm . De forma similar à região mediana, as células dos lobos não apresentam espessamentos angulares. Na maior parte dos lobos, incluindo as margens, ocorre apenas uma única camada de células. Contudo, nas regiões mais centrais lobos e nas de conexão com a região mediana do talo, o parênquima pode apresentar até duas camadas de células (Fig. 2D). A cutícula é sempre lisa (Fig. 3D). Cloroplastos, com grãos de amido relativamente diminutos, são abundantes e distribuídos junto a todas as paredes celulares (Figs. 2G, 3D e 5A), comprimidos por um único vacúolo central, sem qualquer tipo de pigmentos ou outro tipo de substância ergástica.

As paredes celulares do talo têm constituição polissacarídica, especificamente pectinas e celulose (Fig. 3E, Tab. 1) Não foi detectada a presença de ligninas. Quando submetidos à luz ultravioleta (340-380nm), as paredes celulares de *N. confluens* mostraram uma autofluorescência azul-esverdeada (Fig. 3F). Identificou-se, em alguns indivíduos de ambientes mais ensolarados, nas células dos lobos (Fig. 3G), uma coloração púrpura nas paredes celulares, presente também nas células dos gametângios. Esta coloração não se estendia a todo o lobo, mas apenas em algumas regiões.

A maior parte das células parenquimáticas do talo possui oleocorpos. Estes têm formato esférico a oval e são localizados em agrupamentos junto à parede celular, raramente isolados (Figs. 2G, 5A e 5B). Internamente, apresentam uma clara granulosidade (Fig. 2G). Testes para determinar a composição dos oleocorpos foram

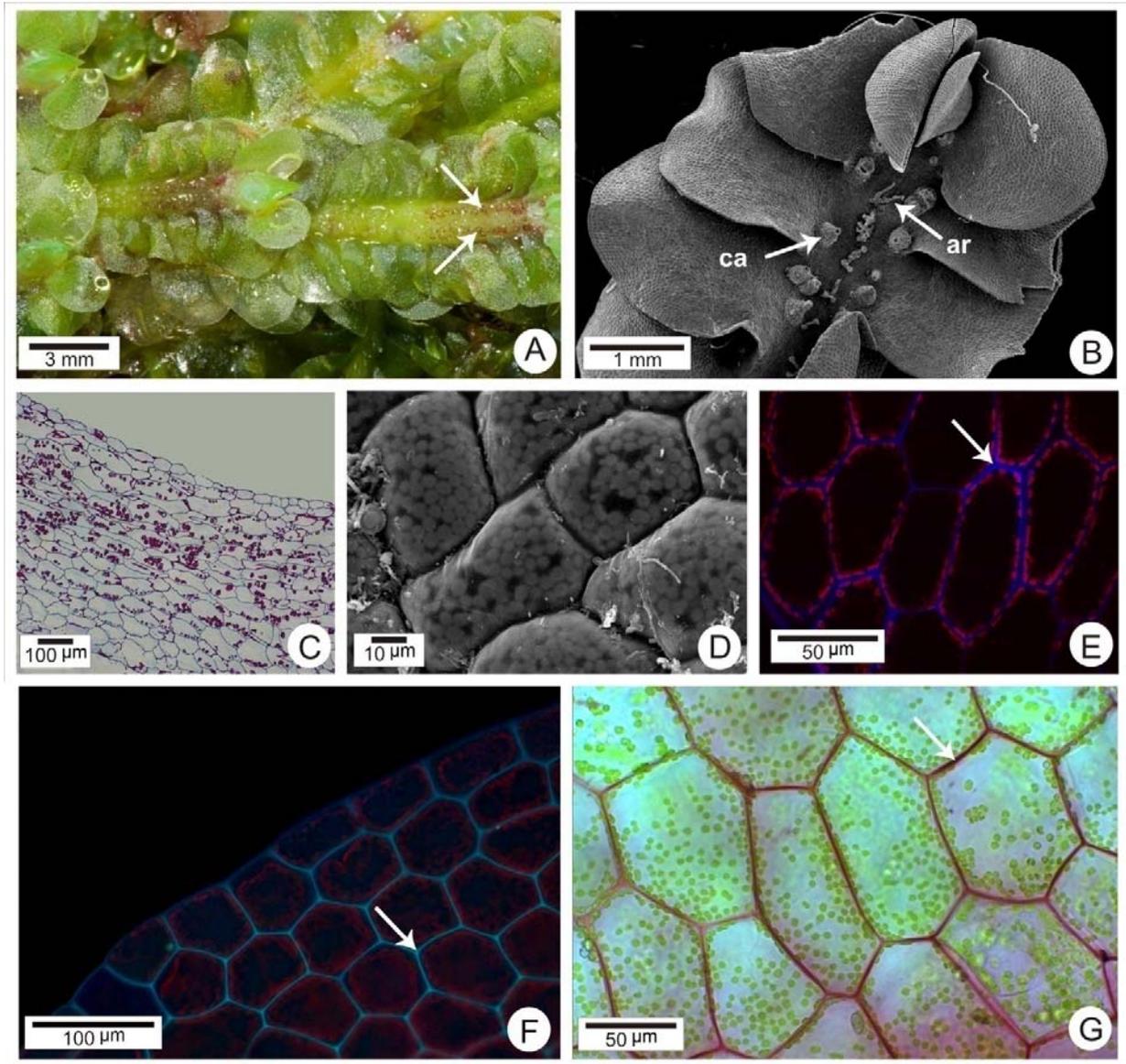


Figura 3. Morfologia e anatomia do gametófito de *Notoecloada confluens*. **A.** Aspecto geral do talo, em vista dorsal, onde nota-se uma pigmentação púrpura nas paredes das câmaras anteridiais (setas). **B.** Vista dorsal do talo, em microscopia eletrônica de varredura (MEV), mostrando as câmaras anteridiais (ca) e arquegônios (ar), distribuídos em fileiras. **C.** Seção transversal do talo, na região mediana, contendo células com diversos grãos de amido (PAS-Azul de Astra). **D.** Vista frontal da superfície do talo, nos lobos, em MEV, mostrando as células recobertas por uma cutícula lisa. Cloroplastos podem ser identificados pela delgada espessura da parede celular. **E.** Detalhe das células parenquimáticas do talo, em microscopia confocal de varredura a laser, evidenciando a parede celular de constituição celulósica (seta). A autofluorescência da clorofila evidencia os cloroplastos, de cor avermelhada. **F.** Autofluorescência das paredes celulares das células do talo (seta), em microscopia de fluorescência. **G.** Células dos lobos com parede celular contendo pigmentação púrpura (seta).

negativos para substâncias de natureza lipídicas e polissacarídicas. Porém, foi comprovada a sua natureza sesquiterpenoide (Tab. 1).

Os rizoides são encontrados na superfície ventral do gametófito, originando-se na região mediana e mais espessa do talo (Figs. 2C, 2D e 4A). Os rizoides são abundantes e se entrelaçam. São sempre unicelulares (Figs. 2D, 2E e 4B), hialinos ou levemente amarronzados, com paredes celulares lisas e delgadas (Figs. 2E e 4C). A base dos rizoides é levemente dilatada, enquanto o ápice é arredondado (Figs. 2E e 4B). Possuem comprimento variável, podendo alcançar até 3 mm, com diâmetro médio de 20 μm .

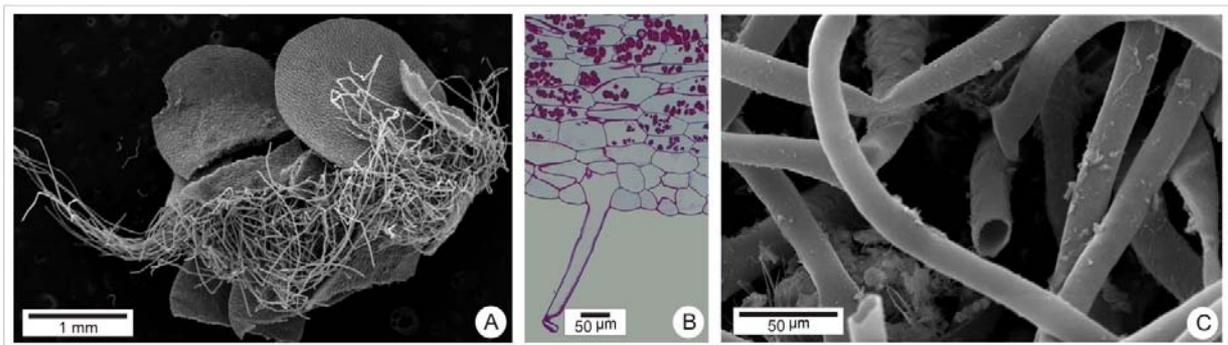


Figura 4. Morfologia e anatomia dos rizoides em *Noteroclada confluens*. **A.** Visão geral dos rizoides, na face ventral do talo, em microscopia eletrônica de varredura (MEV). **B.** Seção transversal do talo, na região mediana, evidenciando a base de um rizoide unicelular (PAS- Azul de Toluidina). **C.** Detalhe dos rizoides, em MEV, mostrando a parede celular lisa.

Tubers foram identificados emergindo de alguns gametófitos. Morfologicamente, estes constituem-se em estruturas globosas, com até 0,7 mm de diâmetro, de cor amarelo-esverdeado. Os tubers são ligados à face ventral do talo, entre os rizoides, através de um longo pedúnculo cilíndrico e sinuoso (Figs. 2A e 2C). Geralmente, foram encontrados imersos em solo bastante úmido. O pedúnculo é formado por células parenquimáticas contendo poucos grãos de amido. Possui sempre menor diâmetro que o tuber e comprimento variável (até 1 cm). O tuber é constituído por um parênquima de reserva, com paredes celulares delgadas, rico em grandes grãos de amido (Fig. 5C e 5D). Grãos de amido estão presentes, também, nas células epidérmicas do tuber. O meristema apical é arredondado, sendo recoberto

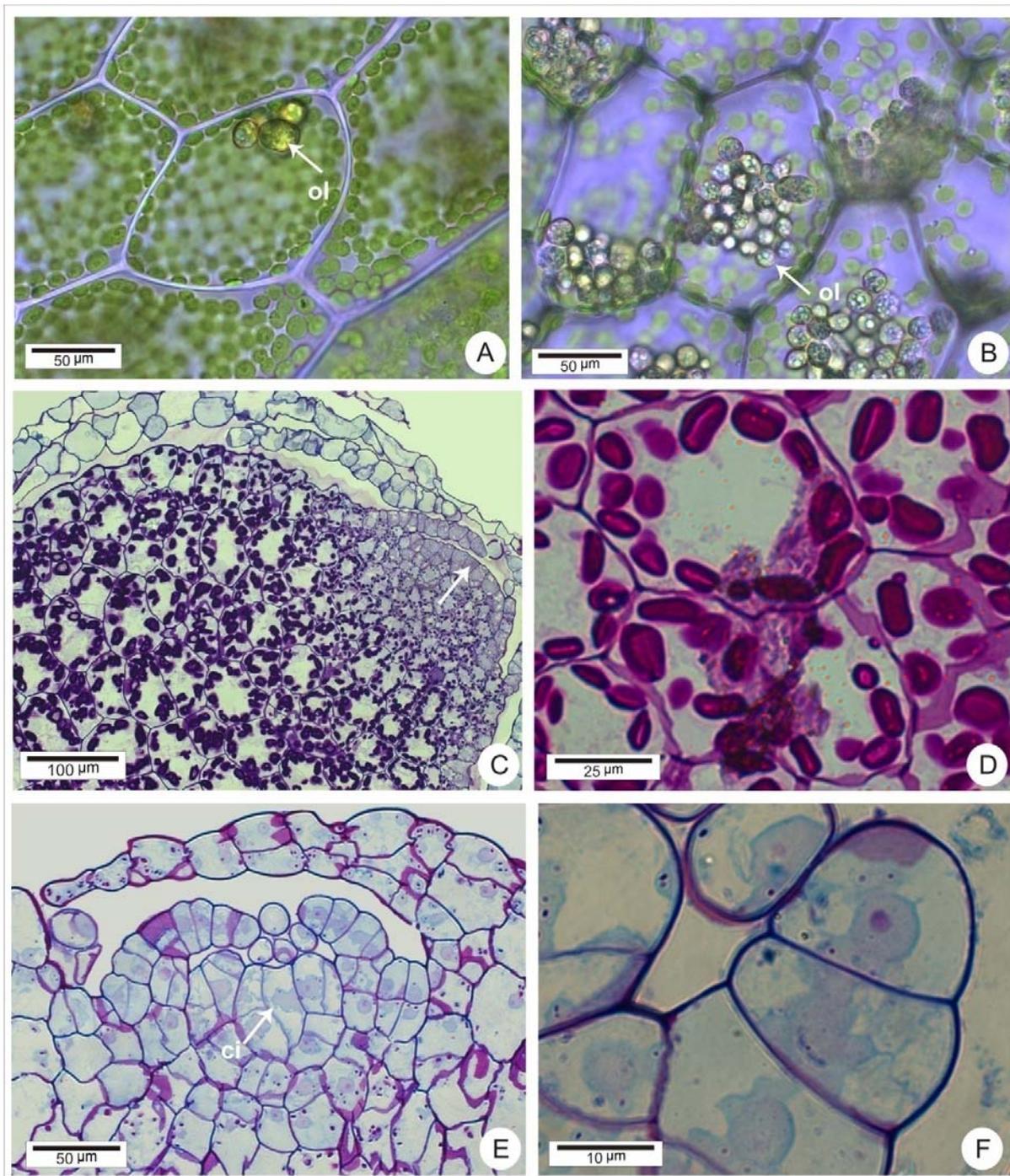


Figura 5. Oleocorpos, tuber e meristema apical de *Noteroclada confluens*. **A.** Oleocorpos (ol) em célula do talo, no Morfotipo 1. **B.** Oleocorpos (ol) em célula do talo, no Morfotipo 2. **C.** Seção longitudinal do tuber, evidenciando a grande quantidade de grãos de amido. A região apical e meristemática do tuber está indicada por uma seta (PAS- Azul de Toluidina) **D.** Detalhe de células do tuber, com grãos de amido (PAS) **E.** Meristema apical, com célula inicial (ci) com formato cuneiforme (seta) (Azul de Astra- PAS). **F.** Detalhe dos primórdios dos lobos (Azul de Astra- PAS).

por camadas laminares uniestratificadas, originadas no meristema apical. Estas camadas uniestratificadas formam uma cobertura que reverte todo o tuber (Fig. 5C).

O meristema apical do talo contém uma única célula inicial apical, cuneiforme nas seções histológicas obtidas (Fig. 5E). Da célula apical, originam-se células derivadas que, progressivamente e a poucos micrômetros da inicial, diferenciam-se e começam a acumular pequenos grãos de amido. Nas seções do meristema apical, podem ser identificados primórdios curvados, de uma única camada de células (em seção, similares a tricomas), os quais se diferenciarão nos lobos do talo (Fig. 5E). Estes parecem se alongar mediante sucessivas divisões anticlinais das células que compõem cada primórdio (Fig. 5E). Mesmo ainda muito próximo ao ápice, os lobos em diferenciação, ainda curtos em extensão, já apresentam cloroplastos que começam a armazenar pequenos grãos de amido (Fig. 5F). Estes mesmos lobos, também, mantêm-se curvados sobre o meristema apical. Não foram identificados, no ápice meristemático, quaisquer tipos de tricomas secretores ou idioblastos.

Na análise do gametófito, foram identificados dois morfotipos, diferenciados quanto às variações no número e distribuição de oleocorpos e a presença ou a ausência de tubers. No morfotipo 1, o mais frequente nas populações estudadas, os oleocorpos não estão presentes em todas as células e, quando presentes, estão em número de 1 à 4 por célula (Fig. 5A). Neste morfotipo, não ocorrem tubers. No morfotipo 2 (Fig. 5B), os oleocorpos estão presentes na maioria das células do talo, são bastante numerosos e ultrapassam mais de 20 unidades por célula, tendo menor tamanho que os oleocorpos presentes nas células do morfotipo 1. Ainda, no morfotipo 2, ocorrem tubers. Outras variações morfológicas ou anatômicas não foram encontradas. Além disso, todos os gametófitos analisados (morfotipo 1 ou 2) foram coletados em solo úmido.

No talo, foram encontradas gemas, contendo meristemas, próximo ao meristema apical e ao longo da superfície ventral. A partir destes meristemas que se originam as ramificações ventrais do talo que, após maturidade, podem fragmentar-se, formando um novo indivíduo.

Os gametângios estão distribuídos na face dorsal do talo (Figs. 2D e 6A), ao longo da região mediana. Geralmente, quando presentes (já que em alguns talos não

foram encontrados gametângios), distribuem-se ao longo de todo o talo, desde a zona apical até as mais distais. Estão organizados em três ou quatro fileiras longitudinais: uma ou duas centrais, formadas exclusivamente por arquegônios, e duas mais externas (uma de cada lado), formada apenas por anterídios (Figs. 2D e 6A). Em alguns talos, os arquegônios formam grupos de três ou quatro ou, então, se concentram na região apical do talo. Em talos monóicos, no final da fileira de arquegônios, os anterídios não se organizam em apenas duas fileiras, mas em três ou quatro ou, ainda, distribuem-se de modo não uniforme na região mediana do talo. Em talos que não apresentam arquegônios, não há uma distribuição uniforme de anterídios. Os anterídios normalmente estão presentes nos primeiros dois terços do talo (a partir do ápice), enquanto a distribuição de arquegônios ocorre, preferencialmente, até o meio do talo.

Foram encontrados, em média, 18 anterídios por cm^2 , com até 93 gametângios masculinos num mesmo talo (com comprimento médio de 2,7 cm). Quanto aos arquegônios, a média foi de 6 por cm^2 e, em um mesmo indivíduo, o número máximo de gametângios femininos foi igual a 58. (Tab. 2). O número de gametângios sobre os gametófitos variou ao longo do período de trabalho, sendo que um maior número de gametângios masculinos foi encontrado em talos coletados no mês de agosto, enquanto um maior número de arquegônios foi encontrado em talos coletados no mês de outubro.

Os arquegônios apresentam duas regiões distintas: ventre e colo ou pescoço (Fig. 6B). O ventre é ovalado e apresenta de duas a quatro camadas de células que protegem a oosfera. Cada arquegônio liga-se ao talo sem a presença de um pedúnculo. As células do ventre, em seção longitudinal do arquegônio, são retangulares e têm delgadas paredes de composição pectocelulósca (Figs. 6C e 6D). O colo tem aproximadamente 300 μm de comprimento, com até 10 células de altura. A dissolução das células centrais do colo origina um canal, o qual é preenchido por substâncias que coram com o Azul de Astra (Fig. 6E, Tab.1). Após a fecundação, as células do arquegônio proliferam-se e formarão a caliptra que envolverá o embrião (Fig. 6F). Externamente à caliptra, observa-se a base de um invólucro curto e clorofilado, o celocaulo, o qual que protegerá o embrião até o rompimento da caliptra após alongamento da seta (Fig. 6F). O arquegônio que contém uma oosfera fecundada, e

que originará um esporófito, é predominantemente apical. Raramente, foram observados esporófitos desenvolvendo-se distantes do ápice do talo.

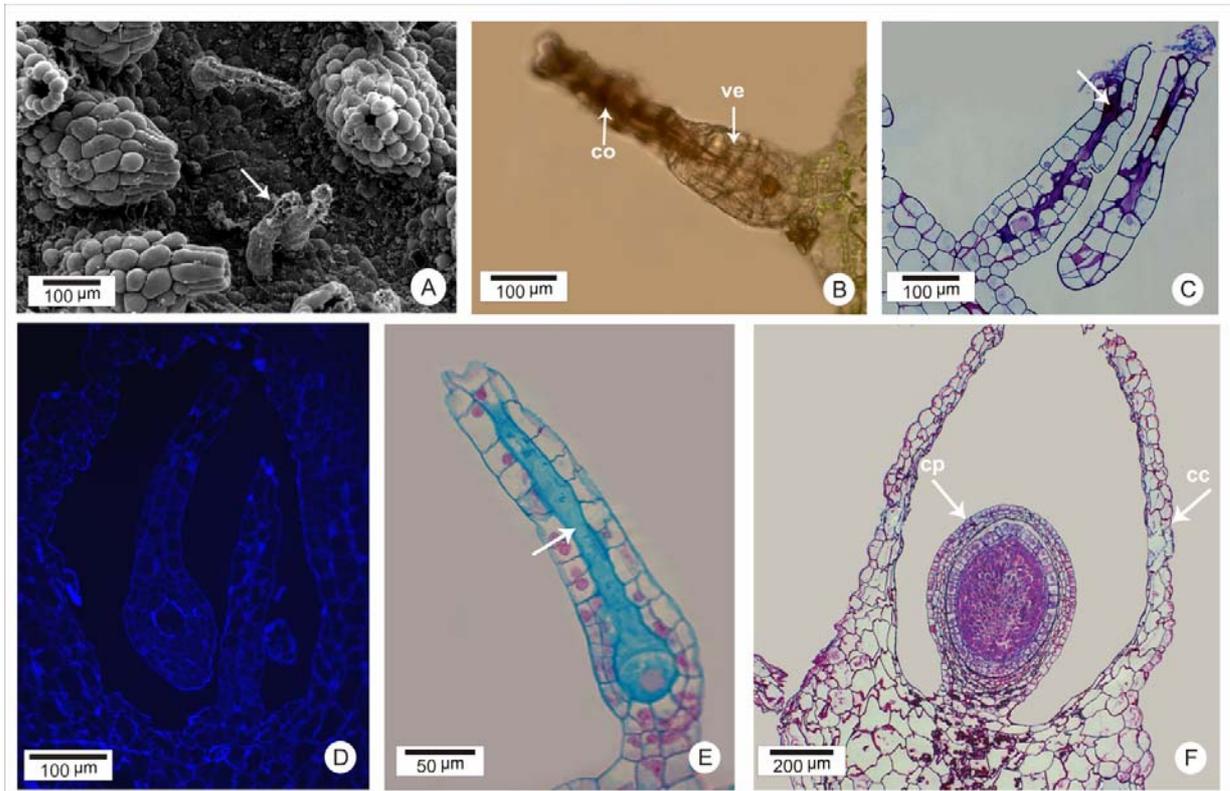


Figura 6. Morfologia e anatomia dos arquegônios de *Noteroclada confluens*. **A.** Distribuição dos arquegônios na face dorsal do talo (seta), em microscopia eletrônica de varredura (MEV). **B.** Arquegônio, mostrando a região do ventre (ve) e colo (co). **C-E.** Seções longitudinais do arquegônio. **C.** Canal do colo, com substância PAS-positiva (seta) (PAS-Azul de Toluidina). **D.** Arquegônios, em microscopia eletrônica de fluorescência, mostrando a composição celulósica das paredes celulares. **E.** Detalhe do canal do colo (seta), mostrando substâncias coradas com o Azul de Astra (Azul de Astra–Fucsina Básica). **F.** Esporófito em desenvolvimento (cápsula) circundado pela caliptra (cp) e celocaule (cc).

Os anterídios são ovais, sempre isolados e ligados ao talo através de um curto pedúnculo (Fig. 7A e 7E). São originados de células do talo, próximas à célula apical. Apresentam uma coloração amarelada (Fig. 7B). Individualmente, cada anterídio está envolvido por uma câmara anteridial, com cerca de 200 µm de altura, com formato de cone e que apresenta um poro (ostíolo) apical (Fig. 7C). Cada câmara anteridial

possui uma única camada de células. As células que circundam e delimitam o poro são mais alongadas que as demais células que forma a câmara, mais curtas e globosas. A câmara anteridial tem cutícula lisa (Fig. 7C).

Durante a ontogênese dos anterídios, uma célula inicial anteridial emerge do talo e divide-se periclinamente, formando uma célula interna ou proximal (célula basal) e uma externa ou distal, que emerge um pouco acima da superfície do talo (Fig. 7D). A célula externa originará o “corpo” do anterídio, enquanto que a interna formará a ligação entre este e as demais células do talo, na forma de um curto pedúnculo. A célula distal divide-se mitoticamente várias vezes e forma uma camada protetora uniestratificada, a qual envolve um conjunto de células androgoniais primárias (Fig. 7E). Por sucessivas divisões celulares, ocorre um aumento no número de células androgoniais, poliédricas, e que se tornam menores a cada divisão (Fig. 7F). A última geração de células androgoniais formará as células-mãe de andrócito (Fig. 7G). Cada célula-mãe de andrócito divide-se em duas, formando dois andrócitos, envolvidos por uma espessa parede PAS-positiva (Fig. 7H). Esta parede também apresenta composição celulósica (Fig. 7A). O anterídio maduro contém centenas de anterozoides, os quais formam uma compacta massa celular (Fig. 7I). Com o rompimento do estrato parietal e liberação dos anterozoides para o meio, restos de paredes celulares permanecem no interior da câmara anteridial (Fig. 7J).

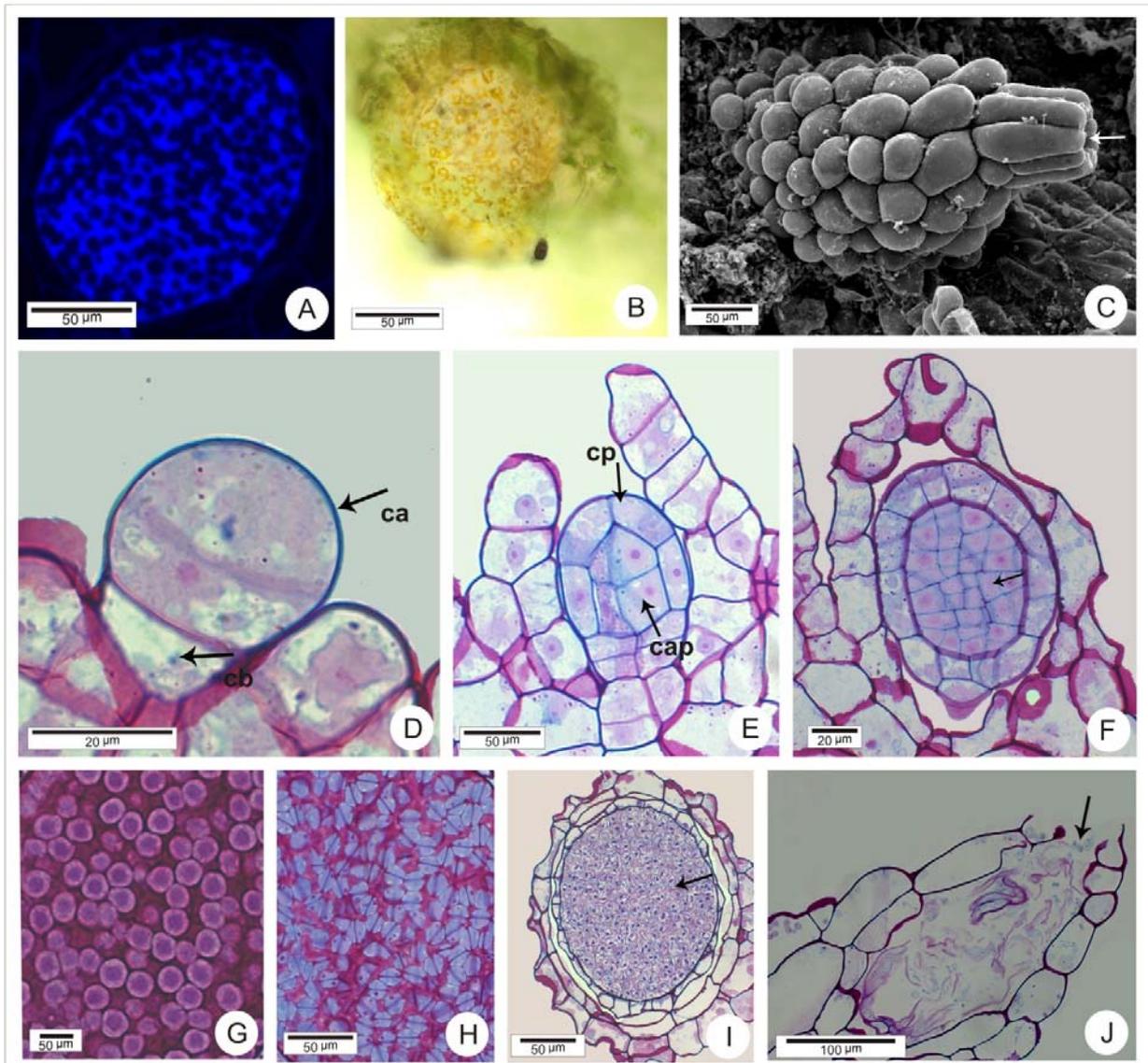


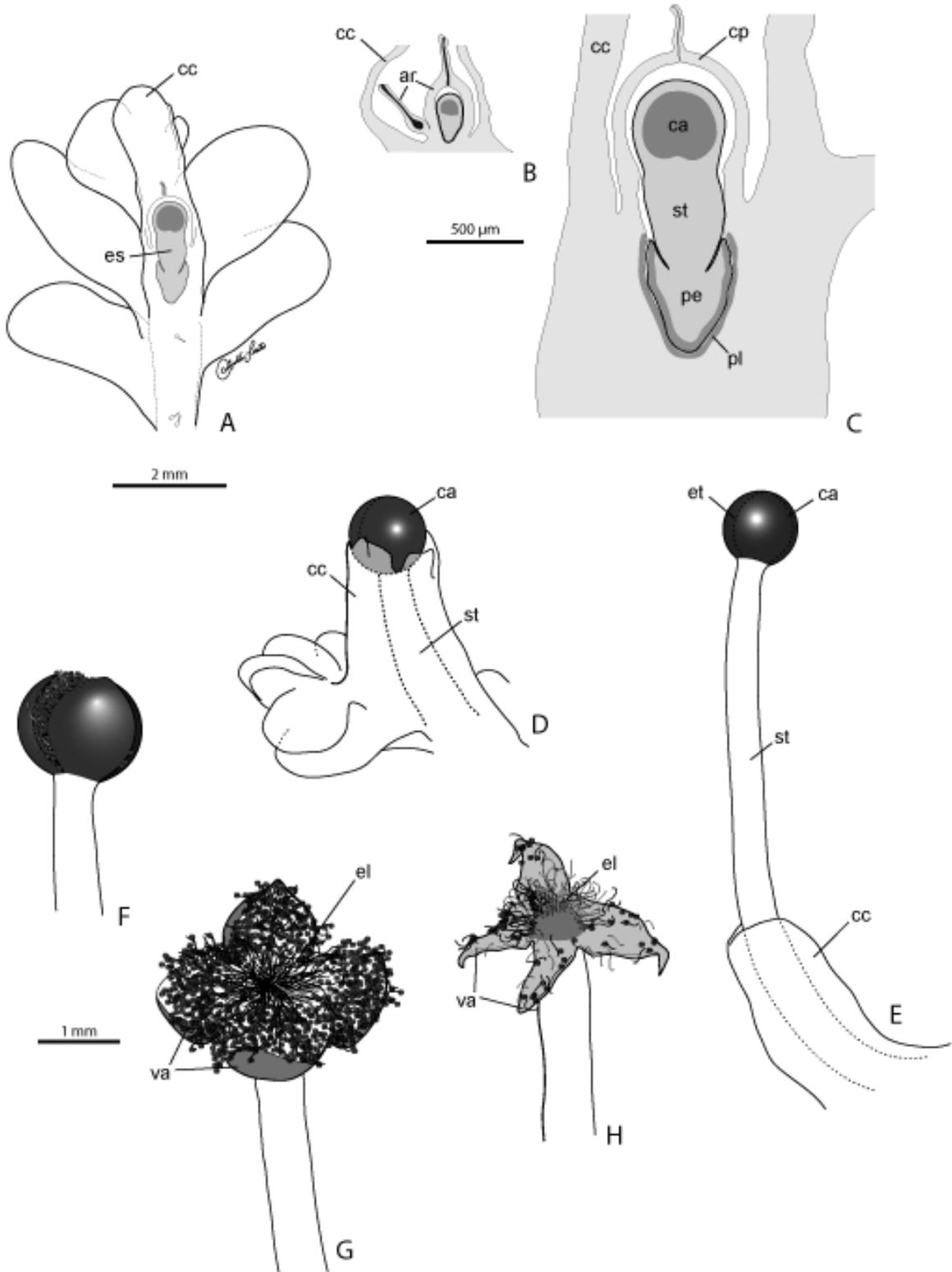
Figura 7. Morfologia, anatomia e ontogênese dos anterídios de *Noteroclada confluens*. **A.** Seção longitudinal do anterídio, em microscopia óptica de fluorescência, mostrando uma espessa parede celular celulósica ao redor dos andróцитos. **B.** Pigmentação amarelada de um anterídio. **C.** Câmara anteridial, em microscopia eletrônica de varredura, mostrando o poro formado por células alongadas (seta). **D-J.** Ontogênese dos anterídios. **D.** Célula basal (cb) e célula apical (ca), apresentando divisão periclinal (Azul de Astra-PAS-Fucsina Básica). **E.** Câmara anteridial em formação e anterídio com estrato parietal (cp) uniestratificado e células androgonais primárias (cap) (Azul de Astra-PAS-Fucsina Básica). **F.** Células androgonais primárias (seta) em um estágio posterior que em 4E. A câmara anteridial já recobre todo o anterídio (Azul de Astra-PAS-Fucsina Básica). **G.** Células-mãe de andrócito (PAS). **H.** Andróцитos com paredes espessadas, PAS-positivas (Azul de Astra-PAS-Fucsina Básica). **I.** Massa de anterozóides no interior de anterídio maduro (Azul de Astra-PAS-Fucsina Básica). **J.** Vestígios do anterídio após liberação dos anterozóides (PAS-Azul de Toluidina).

4.2. Morfologia e anatomia do esporófito

Noteroclada confluens apresenta um único esporófito sobre o talo. O esporófito desenvolve-se, predominantemente, próximo ao ápice do gametófito (Figs. 2C, 8A e 8B), embora, em raras vezes, possa estar presente em zonas mais medianas do talo. Durante o seu desenvolvimento, quando ainda bastante jovem e reduzido, o esporófito não apresenta orientação perpendicular à superfície dorsal do talo, mas tem acentuada inclinação, sempre tendo o seu eixo longitudinal voltado para o meristema apical do gametófito (Figs. 8A e 9A). Quando muito jovem, o esporófito está totalmente envolvido pelos tecidos do gametófito, como a caliptra e o celocaule (Fig. 6F), ambos clorofilados. O celocaule, também, mostra-se inclinado em direção ao ápice do talo (Fig. 8A), acompanhando a orientação do esporófito.

O esporófito é composto por uma cápsula apical, uma seta e um pé (Figs. 8C e 9A). No topo do esporófito maduro, encontra-se o esporângio na forma de uma cápsula esférica, de cor verde escura, superfície lisa e brilhante (Figs. 8E e 9B). O diâmetro que pode variar de 0,7 a 1,3 mm. Externamente, podem ser distinguidas

Figura 8. O esporófito de *Noteroclada confluens*. **A.** Vista dorsal do talo, mostrando a posição do esporófito em desenvolvimento (es) no interior do celocaule (cc). **B.** Arquegônios (ar) fecundado e não fecundado, contendo um esporófito em diferenciação. O celocaule (cc) envolve dois arquegônios. **C.** Desenho esquemático de uma seção longitudinal do esporófito jovem, durante a esporogênese. O esporófito, formado pela cápsula (ca), seta ainda curta (st) e um pé (pe), está recoberto pela caliptra (cp) e pelo celocaule (cc), cuja base está representada. A placenta (pl) está destacada com um tom de cinza mais escuro. **D.** Esporófito rompendo o celocaule (cc), expondo a cápsula (ca), devido ao início do alongamento da seta (st). **E.** Esporófito com seta mais alongada (st), elevando a cápsula (ca). Uma faixa longitudinal de deiscência ou estômio (et) está sendo indicada. Sob o celocaule (cc), base da seta apresenta uma curvatura. **F.** Cápsula do esporângio em início de deiscência. **G.** Cápsula aberta, mostrando as valvas (va), o elatoróforo (el) e inúmeros protonemas. **H.** Cápsula totalmente desidratada, mostrando a mudança no aspecto das valvas (va) e o elateróforo (el) ainda com elatérios. Figs. A, D e E, todas na mesma escala (em A). Figs. B e C, na mesma escala (em B). Figs. F, G e H, todas na mesma escala (em F).



quatro linhas longitudinais de deiscência (Fig. 8E), equidistantes e que se encontram no topo do esporângio. A elevação da cápsula ocorre pelo alongamento de uma seta cilíndrica (Figs. 8E e 11A), hialina ou levemente esverdeada, finamente estriada (Fig. 11B), com cerca de 0,6 mm de diâmetro e comprimento médio de 4,5 cm (3 a 5,6 cm). O alongamento da seta, inicialmente, ocasiona a ruptura da extremidade distal do celocaule (Fig. 8D). A base da seta sempre permanece escondida pelo celocaule (Fig. 8C). Pode-se observar, pela leve transparência do celocaule, que a seta apresenta, na base, uma curvatura, resultante do seu alongamento sempre perpendicular à superfície do talo (Fig. 8E).

A deiscência da cápsula madura é um processo bastante rápido e ocorre, quase sempre, no máximo alongamento da seta. A abertura leva à formação de quatro valvas (Figs. 8F-H), de forma e dimensão similares (Fig. 9E), que permanecem unidas pela base. A deiscência expõe um denso conjunto de protonemas e elatérios (Fig. 9F), os quais permanecem reunidos, em sua maioria, na forma de um denso elateróforo central, ligado à base da cápsula (Figs. 8G e 9F). Após a dispersão dos protonemas, ocorre uma rápida e progressiva redução no tamanho das valvas e o elateróforo permanece, ainda visível, no centro da cápsula aberta (Fig. 8H).

A cápsula madura possui dois estratos parietais, um externo formado por uma epiderme geralmente uniestratificada (podendo ser bi- ou triestratificada em algumas regiões), e um interno, subepidérmico, geralmente uniestratificado (Fig. 10A). Ambos os estratos apresentam grãos de amido. As células da epiderme possuem espessamentos angulares na parede celular (Fig. 10B e 10E), de cor amarelado-alaranjado. No estrato subepidérmico, no entanto, os espessamentos são anelares e helicoidais (Figs. 10C e 10D). Quimicamente, os espessamentos da parede celular reagem positivamente para Acridine Orange, Fucsina Básica, Azul de Toluidina (verde-azulado) e para o teste de Maule (Tab. 3). As células que compõem os estratos parietais da cápsula possuem de 1 a 3 oleocorpos, sempre dispersos e nunca agrupados (Fig. 10E), diferentemente do que ocorre nas células do gametófito.

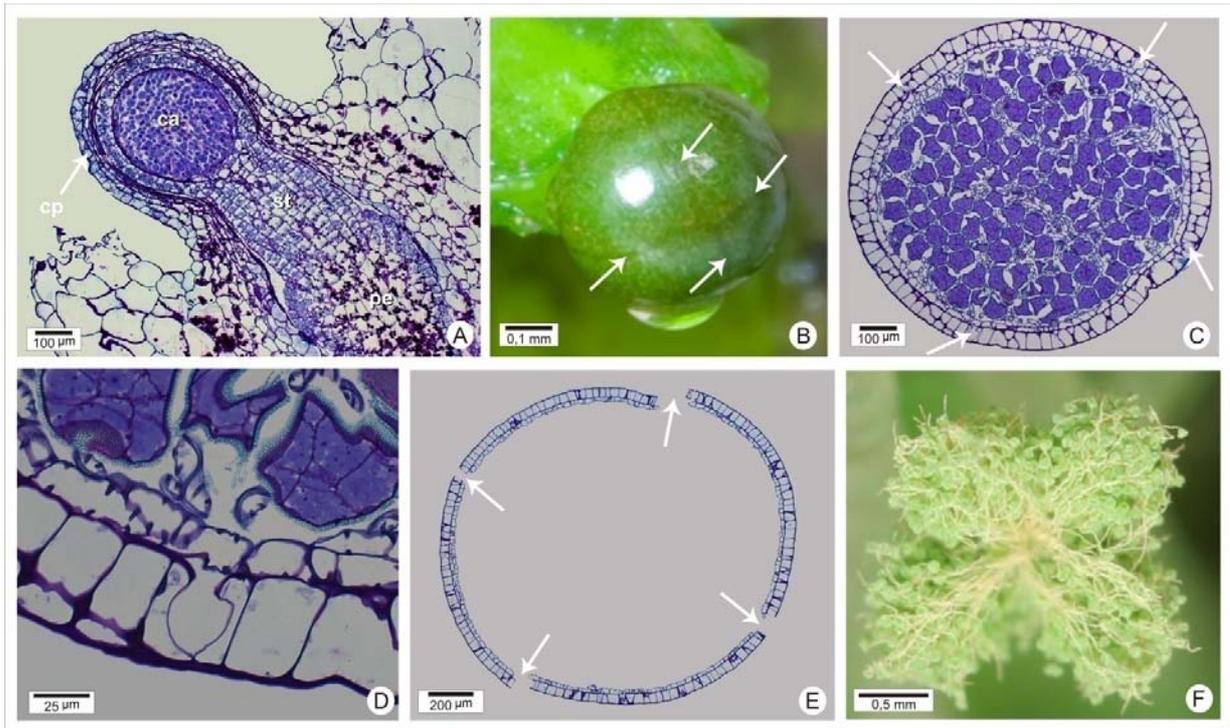


Figura 9. Morfologia e anatomia do esporófito de *Neteroclada confluens*. **A.** Seção longitudinal do esporófito, ainda recoberto pela caliptra (cp), evidenciando a cápsula (ca), seta (st) e pé (pe) (PAS-Azul de Toluidina). **B.** Detalhe da cápsula, mostrando quatro linhas de deiscência (setas). **C.** Seção transversal da cápsula madura, mostrando as quatro zonas de deiscência ou estômios (setas) (PAS-Azul de Toluidina). **D.** Detalhe de estômio (PAS-Azul de Toluidina). **E.** Seção transversal da cápsula madura, mostrando as quatro valvas separadas pelos estômios (setas). Os protonemas e elatérios foram removidos durante o processamento da amostra (PAS-Azul de Toluidina). **F.** Cápsula madura, deiscente, com as quatro valvas abertas, expondo o denso conjunto de protonemas e elatérios.

As células da epiderme originam-se da diferenciação da protoderme (Fig. 10F), a qual circunda uma camada subdérmica, de citoplasma mais denso, originado de um conjunto de células iniciais que formarão o tecido esporogênico do esporângio. Em estágio posterior, durante a esporogênese, a epiderme (ainda uniestratificada) apresenta uma maior expansão celular que a camada subepidérmica, tornando-a 3 a 4 vezes maior em espessura (Fig. 10G). Quanto à camada interna, apresenta-se comprimida pelas células-mãe de espora e elatérios. Ambos os estratos parietais, nesta etapa, já apresentam grãos de amido (Fig. 10G).

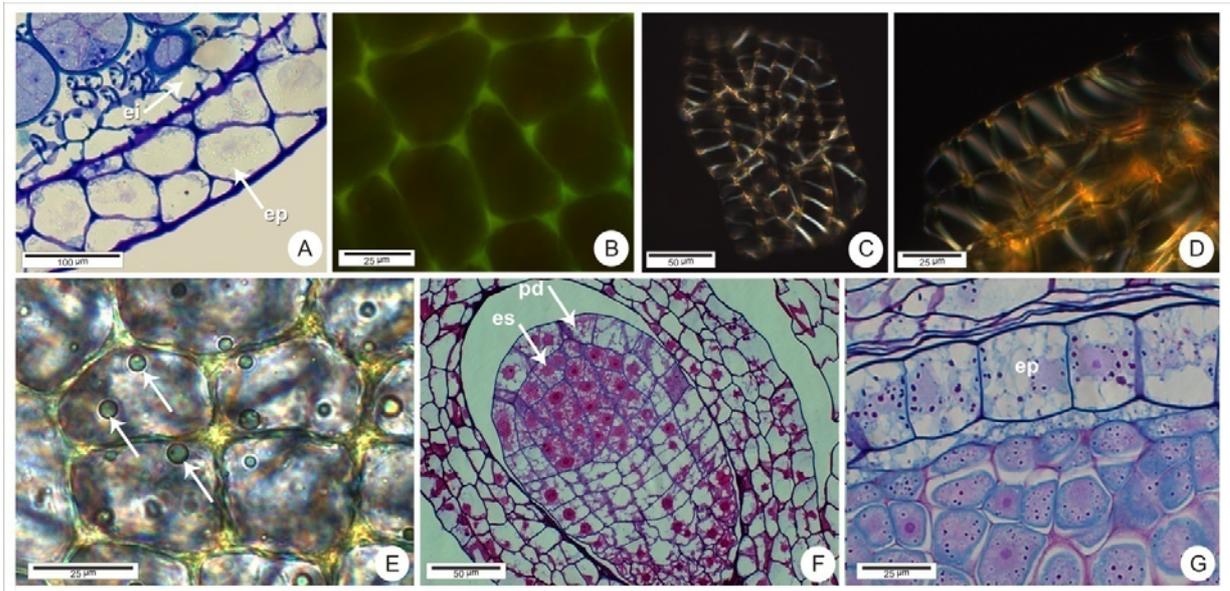


Figura 10. Anatomia da cápsula do esporófito de *Noteroclada confluens*. **A.** Detalhe dos estratos parietais da cápsula madura, mostrando a epiderme (ep) e o estrato subepidérmico ou interno (ei) (Azul de Toluidina). **B.** Espessamentos angulares na epiderme (Acridine Orange). **C.** Espessamentos anelares, em microscopia óptica de luz polarizada, no estrato subepidérmico. **D.** Espessamentos helicoidais, em microscopia óptica de luz polarizada, no estrato subepidérmico. **E.** Oleocorpos (setas) na epiderme. **F.** Protoderme (pd) e estrato subdérmico (es) no esporângio no esporófito em desenvolvimento (PAS-Azul de Astra-Fucsina Básica). **G.** Epiderme uniestratificada (ep), durante a esporogênese, contendo grãos de amido (PAS-Azul de Astra).

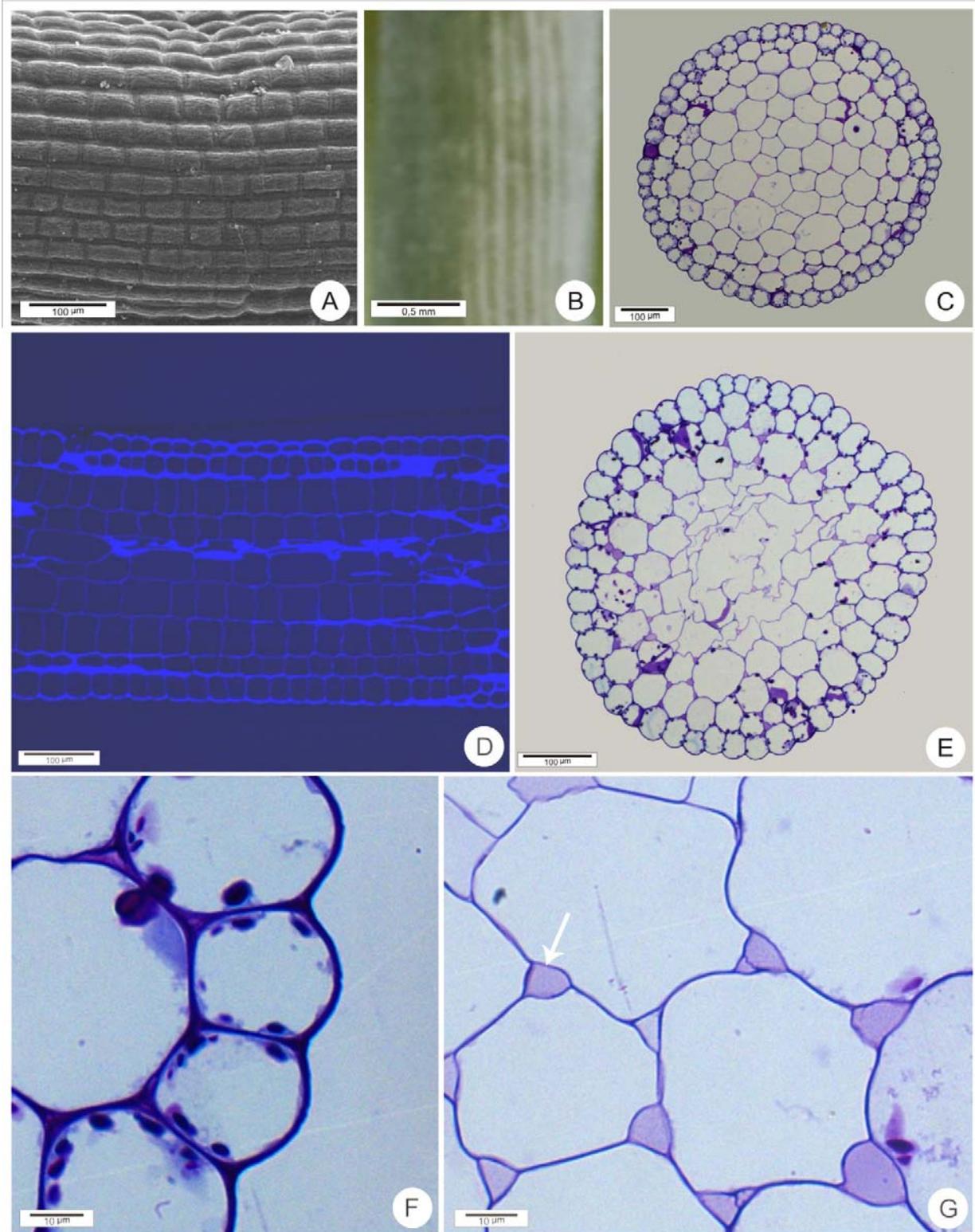
Cada uma das quatro zonas de deiscência da cápsula (Fig. 9C) são delimitadas por duas células epidérmicas mais estreitas, de paredes curvadas, as quais formam quatro distintos estômios (Fig. 9D), regularmente espaçados. A deiscência ocorre pela separação destas células epidérmicas, provavelmente a partir da dissolução da sua lamela média. Esta separação inicia-se na epiderme e, posteriormente, estende-se às células do estrato parietal interno (Fig. 9D). Não foram observadas variações nos espessamentos da parede celular da epiderme ou estrato interno próximo aos estômios.

A seta é formada por células parenquimáticas, de paredes delgadas e pectocelulósicas (Figs. 11C e D). Na base da seta, após o seu alongamento, ocorre ruptura da parede celular de algumas células da região medular (Fig. 11E). Na região

cortical as células apresentam grãos de amido, os quais são encontrados, também, na epiderme (Fig. 11F). É comum a presença de material PAS-positivo nos espaços intercelulares (Fig. 11G), tanto em células da região cortical como nas da região medular.

O pé do esporófito tem formato de “taça” e aprofunda-se no tecido gametofítico (Figs. 8C e 12A). No esporófito maduro, tem extensão de até 800 μm e diâmetro máximo de 350 μm . O pé envolve parcialmente a base da seta, em até de 600 μm . É formado por um tecido parenquimático, com grãos de amido. A epiderme é formada por células de cutícula lisa, alongadas no sentido longitudinal, com extremidades arredondadas (Figs. 12B e 12C), sem grãos de amido. Na junção esporófito-gametófito (placenta) ocorre um espaço placentar (Fig. 12D). Nesta região, no gametófito, algumas células mostram acentuado achatamento (Fig. 12E). Na placenta, tanto no esporófito como no gametófito, não foram identificadas células de transferência contendo invaginações das paredes celulares (Fig. 12E).

Figura 11. Morfologia e anatomia da seta do esporófito de *Noteroclada confluens*. **A.** Detalhe, em microscopia eletrônica de varredura, da superfície da seta madura. **B.** Detalhe, mostrando finas estriações na superfície da seta madura. **C.** Seção transversal da seta, mostrando a região cortical com grãos de amido (PAS-Azul de Toluidina) **D.** Seção longitudinal da seta, em microscopia óptica de fluorescência, mostrando a extensão das células e a constituição celulósica das paredes celulares **E.** Seção transversal da região basal da seta, mostrando ruptura da parede celular na região medular (PAS-Azul de Toluidina). **F.** Detalhe da epiderme e região cortical, com grãos de amido. **G.** Detalhe de células da zona medular, com espaços intercelulares contendo material PAS-positivo (seta).



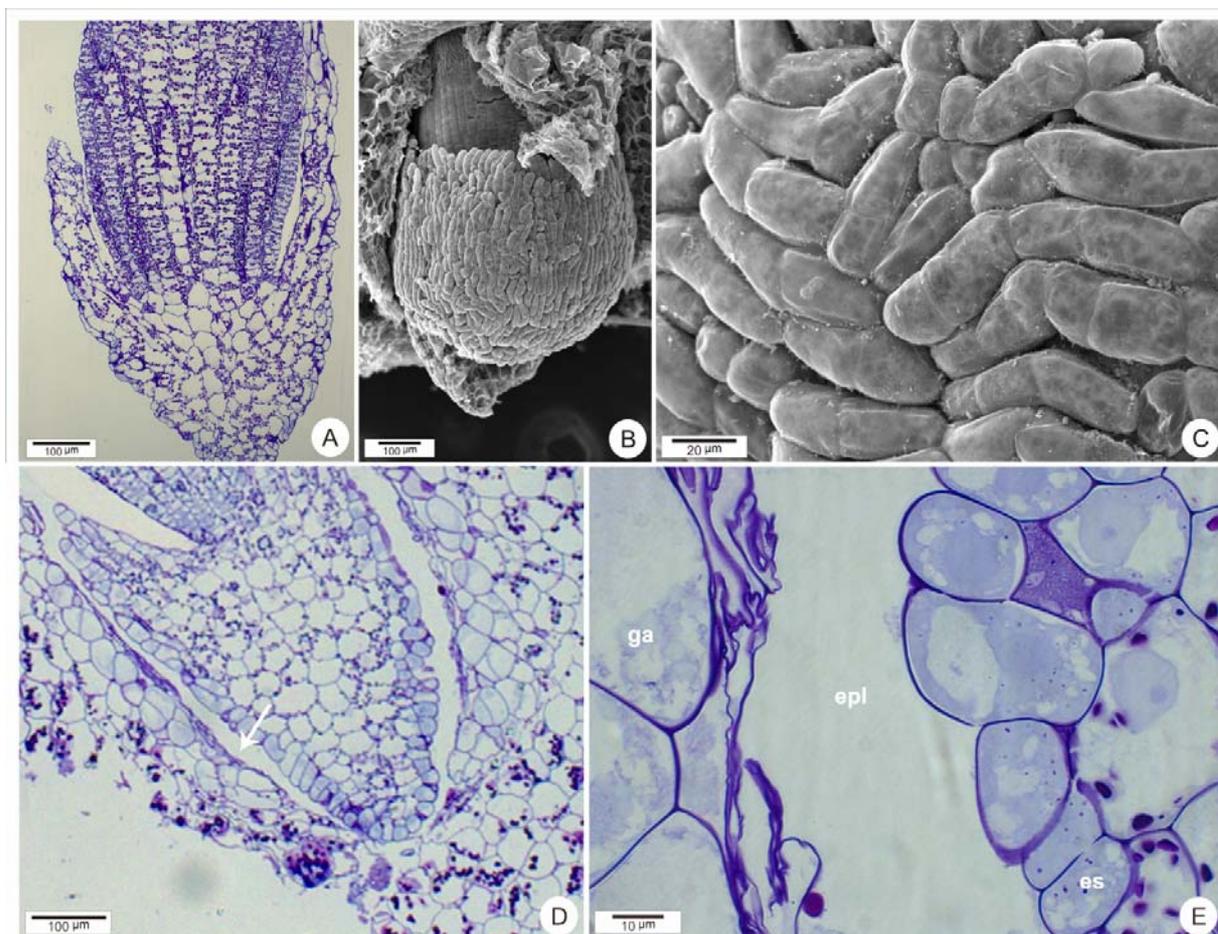


Figura 12. Morfologia e anatomia do pé do esporófito de *Noteroclada confluens*. **A.** Seção longitudinal do esporófito, mostrando o pé em formato de “taça” e células contendo grãos de amido. **B.** O pé, em microscopia eletrônica de varredura. **C.** Detalhe da superfície do pé, mostrando as células da epiderme com formato alongado e extremidades arredondadas. **D.** Seção longitudinal da conexão gametófito-esporófito (placenta), mostrando o espaço placentar (seta). **E.** Detalhe do espaço placentar (epl), mostrando células do gametófito (ga) e esporófito (es) sem células de transferência (PAS-Azul de Toluidina).

4.3. Esporogênese e elaterogênese

Nos primeiros estádios de diferenciação do esporófito, ainda recoberto pelos tecidos gametofíticos (Fig. 8B), o esporângio apresenta um conjunto de células que compõem uma massa de tecido esporogênico, recoberto por duas camadas de células estéreis (Fig.13A). As paredes primárias do tecido esporogênico são delgadas, de paredes retas e natureza pectocelulósica. O núcleo é normalmente central, com um ou dois nucléolos bem evidentes. Inicialmente, não há o acúmulo de grãos de amido nos plastídios. A medida que o número de células é incrementado, há uma diferenciação do tecido esporogênico em dois domínios distintos: células- mãe de esporos (esporócitos) e células mãe de elatério (elaterócitos). Simultaneamente, ocorre alteração no formato celular. Os esporócitos adquirem formato arredondado, enquanto os elaterócitos, um formato mais alongado. Ambos os tipos celulares apresentam grãos de amido e um estrato de parede espessada, abaixo de parede primária péctica, contudo não celulósica (Tab. 3).

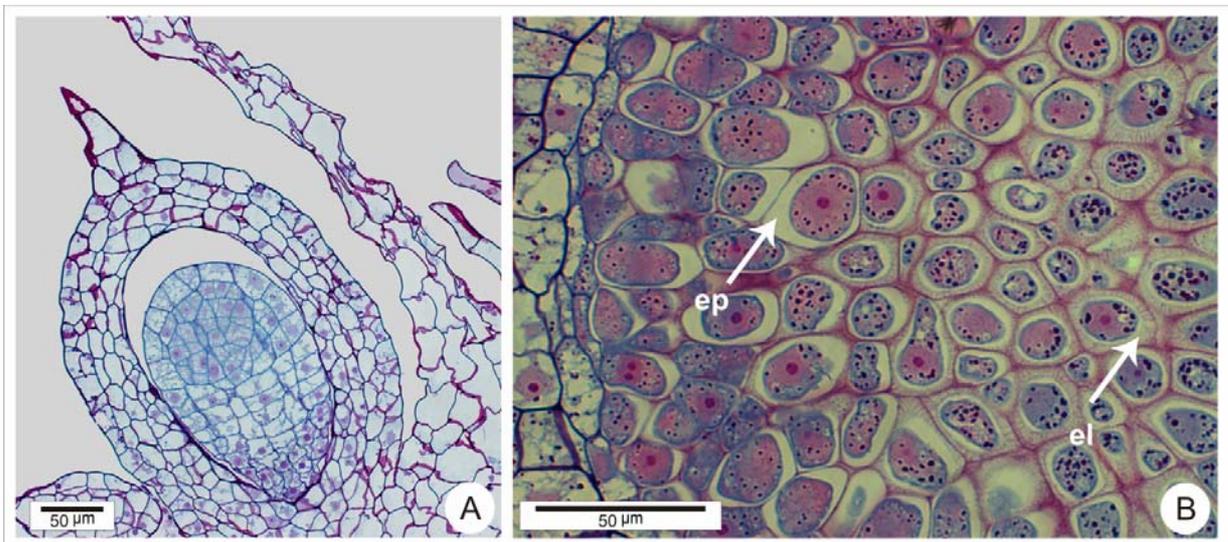


Figura 13. Esporogênese em *Noteroclada confluens*. **A.** Esporófito jovem, em seção longitudinal, recoberto pela caliptra, mostrando células iniciais que originarão o tecido esporogênico (PAS-Azul de Astra-Fucsina Básica). **B.** Esporócitos (ep) com camada de parede celular hialina (seta) e elaterócito (el) com parede PAS-positiva (PAS-Azul de Astra).

Nos elaterócitos, a parede espessada tem composição péctica (Fig. 13B e *Tab. 3*), enquanto que nos esporócitos, o espessamento mostra-se sempre hialino (Fig. 13B e *Tab. 3*), não ocorrendo reação positiva para nenhum dos testes histoquímicos utilizados. Em seção longitudinal do esporângio, os esporócitos formam um tecido compacto, em formato de “U” invertido, logo abaixo dos estratos parietais. Os elaterócitos, por sua vez, formam um conjunto central, com espaços intercelulares, conectado às células da seta. Isso contribuirá para a futura formação do elateróforo.

As células- mãe de esporos progressivamente separam-se e adquirem formato tetralobado (Figs. 14A e 14B), tetraédrico ou tetragonal, com núcleos volumosos e centrais. A parede celular espessada hialina torna-se mais delgada, pelo aumento do volume celular e, ao mesmo tempo, adquire composição PAS-positiva (*Tab. 3*). Foi confirmada a natureza hemicelulósica deste estrato uma vez que, após tratamento com hemicelulase, não mais apresentou reação PAS-positiva. Nas células mãe de esporos, cada lobo é densamente preenchido por cloroplastos contendo diversos grãos de amido. Ainda neste estágio, as células mãe de elatério adquirem um formato mais alongado, com parede delgada pectocelulósica (Fig. 14C e *Tab. 3*), persistindo os grãos de amido. Com a separação dos esporócitos, há a formação de um fluido locular, PAS-positivo, e as células- mãe de elatério são encontradas em todas as partes do esporângio, predominantemente na base.

A meiose leva a formação de quatro núcleos que, inicialmente, permanecem na região central da célula- mãe (Fig. 14D). Cada lobo ainda é recoberto por uma parede hemicelulósica, contudo menos espessa. Sob esta, há a deposição de uma fina parede pectocelulósica, a primexina (Fig. 14E). Somente após este evento, há a formação de uma fina parede pectocelulósica entre os núcleos, que movem-se em direção a cada um dos quatro lobos (Fig. 14F).

Após a citocinese, a parede hemicelulósica das células- mãe desaparece, ocorrendo a individualização de quatro esporos unicelulares, com núcleos centrais, os quais ainda permanecem adjacentes (Fig. 15A). Em cada esporo, percebe-se uma delgada exina e, imediatamente, as primeiras divisões mitóticas, caracterizando o desenvolvimento endospórico. A primeira divisão (Fig. 15B) do esporo pode ser simétrica ou assimétrica. A segunda divisão mitótica pode ocorrer primeiramente em

apenas uma das células, perpendicular à primeira (Fig. 15C). Nesse estágio, a estrutura da exina torna-se mais evidente. Nesta fase do desenvolvimento, os elatérios iniciam uma deposição de espessamentos helicoidais, e o número de grãos de amido diminui (Fig. 15D).

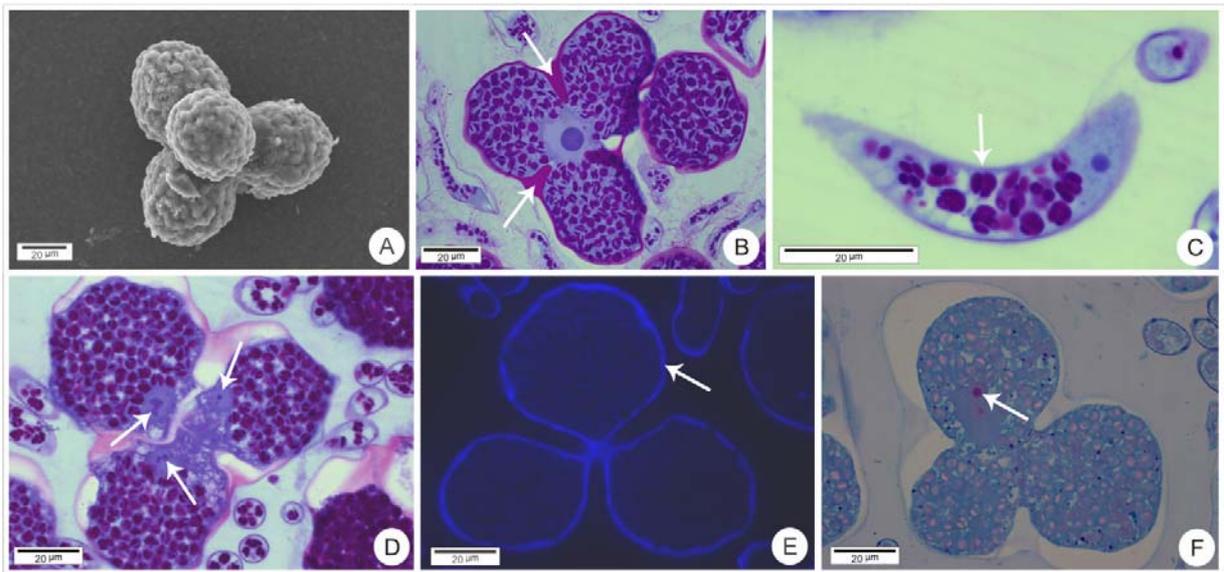


Figura 14. Esporogênese e elaterogênese. **A.** Célula- mãe de esporos (CME) tetralobada e tetraédrica, em microscopia eletrônica de varredura. **B.** CME com parede celular espessa hemicelulósica (setas) (PAS-Azul de Toluidina). **C.** Elatério imaturo, com parede celular primária delgada e grãos de amido (seta) (PAS-Azul de Toluidina). **D.** Final da meiose da CME, resultando em quatro núcleos haplóides na região central (setas) (PAS-Azul de Toluidina). **E.** Primexina celulósica (seta), sob microscopia óptica de fluorescência, ao redor dos esporos recém-formados. **F.** Núcleo de um dos esporos (seta) migrando para a região central do citoplasma, repleto de cloroplastos (Azul de Astra-Fucsina Básica).

A continuidade de diversos ciclos mitóticos ocasiona a formação de um protonema multicelular esferoidal ou subesferoidal (diâmetro médio de 65 μm). Devido à grande quantidade de cloroplastídios, os protonemas são verdes (Fig. 15E). No citoplasma, em cada cloroplasto são encontrados diversos grãos de amido (Fig. 15F). As paredes que individualizam cada célula do protonema são delgadas e tem constituição polissacarídica, especificamente péctica e celulósica (Figs. 15F, 15G e Tab.3). A esporoderme está diferenciada em intina e exina (Fig. 16A). A intina é

delgada e apresenta menos de $1\mu\text{m}$ de espessura e é regular em toda sua extensão (Fig. 15G). Não foram observados espessamentos em qualquer região. Possui constituição pectocelulósica (Tab. 3). A exina (Fig. 16B), com cerca de $6\mu\text{m}$, apresenta estrutura do tipo rugulada (Fig. 16C). Testes histoquímicos com Auramina O e Fucsina básica, além da coloração com Azul de Toluidina (verde-azulado), demonstraram a presença de esporopolenina (Tab. 3). Após o teste de Maule, a exina adquiriu uma tonalidade amarelo-ouro. Na exina, a esporoderme apresenta uma região diferenciada, menos espessa e com escultura reduzida (Fig. 16D).

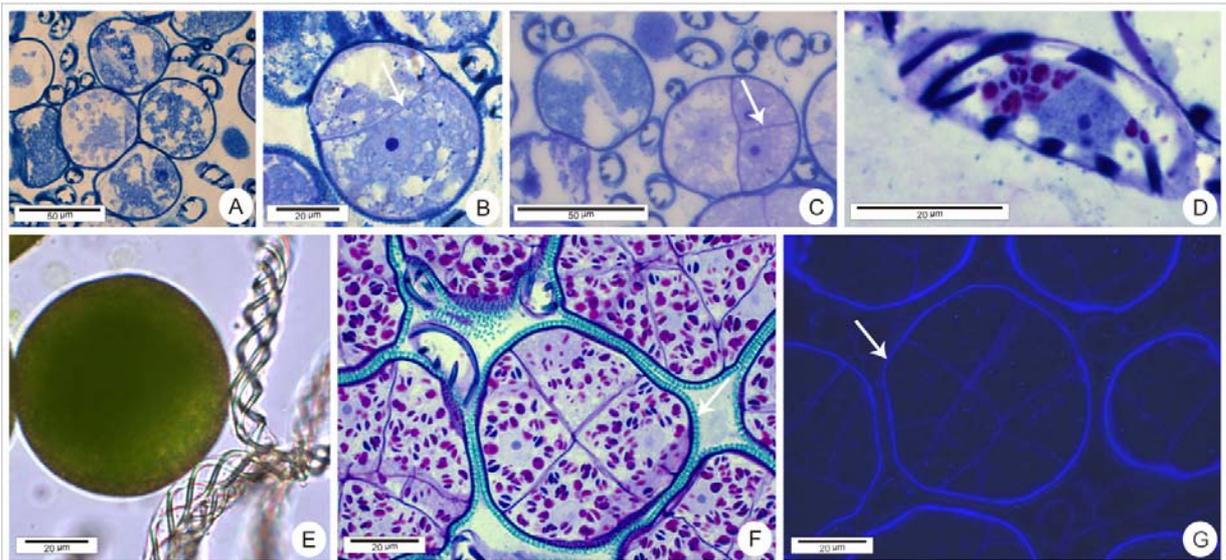


Figura 15. Desenvolvimento do esporo, diferenciação dos elatérios e formação do protonema em *Noteroclada confluens*. **A.** Esporos unicelulares logo após separação da tétrade (Azul de Toluidina). **B.** Primeira divisão mitótica do esporo, com formação de uma fina parede celular (seta) (Azul de Toluidina). **C.** Segunda divisão mitótica, com formação de parede celular perpendicular à primeira (seta), originando um protonema tricelular (Azul de Toluidina). **D.** Formação de espessamentos secundários helicoidais em elatério, ainda contendo grãos de amido (PAS-Azul de Toluidina). **E.** Protonema, com intensa coloração esverdeada, devido ao grande número de cloroplastídios, e elatério maduro, desprovido de citoplasma. **F.** Protonemas multicelulares com delgadas paredes polissacarídicas e cloroplastos contendo grãos de amido. Uma exina azul-esverdeada (seta) pode ser identificada (PAS-Azul de Toluidina). **G.** Intina (seta) e paredes celulares do protonema com constituição celulósica, em microscopia óptica de fluorescência.

Na cápsula madura, os elatérios têm extremidades afiladas (Fig. 17A) e não apresentam citoplasma, restando uma fina parede pectocelulósica e duas ou três faixas de espessamento helicoidal (Fig. 17B), de coloração naturalmente amarronzada (Figs. 15E), ao longo de toda a sua extensão. Os espessamentos secundários apresentam espessura média de 1,4 μm . O seu comprimento variou de 90 μm a 500 μm (média de 231 μm) e o diâmetro central tem, em média, 10 μm . Houve reação positiva aos testes para compostos fenólicos (Fig. 17C), polissacarídios (Fig. 17A) e negativa para identificação de celulose (Tab. 3). Sob luz polarizada, os espessamentos secundários dos elatérios apresentam birefringência. Na região central da cápsula está localizado o elateróforo (Fig. 17D), o qual permanece conectado às células da parede da cápsula.

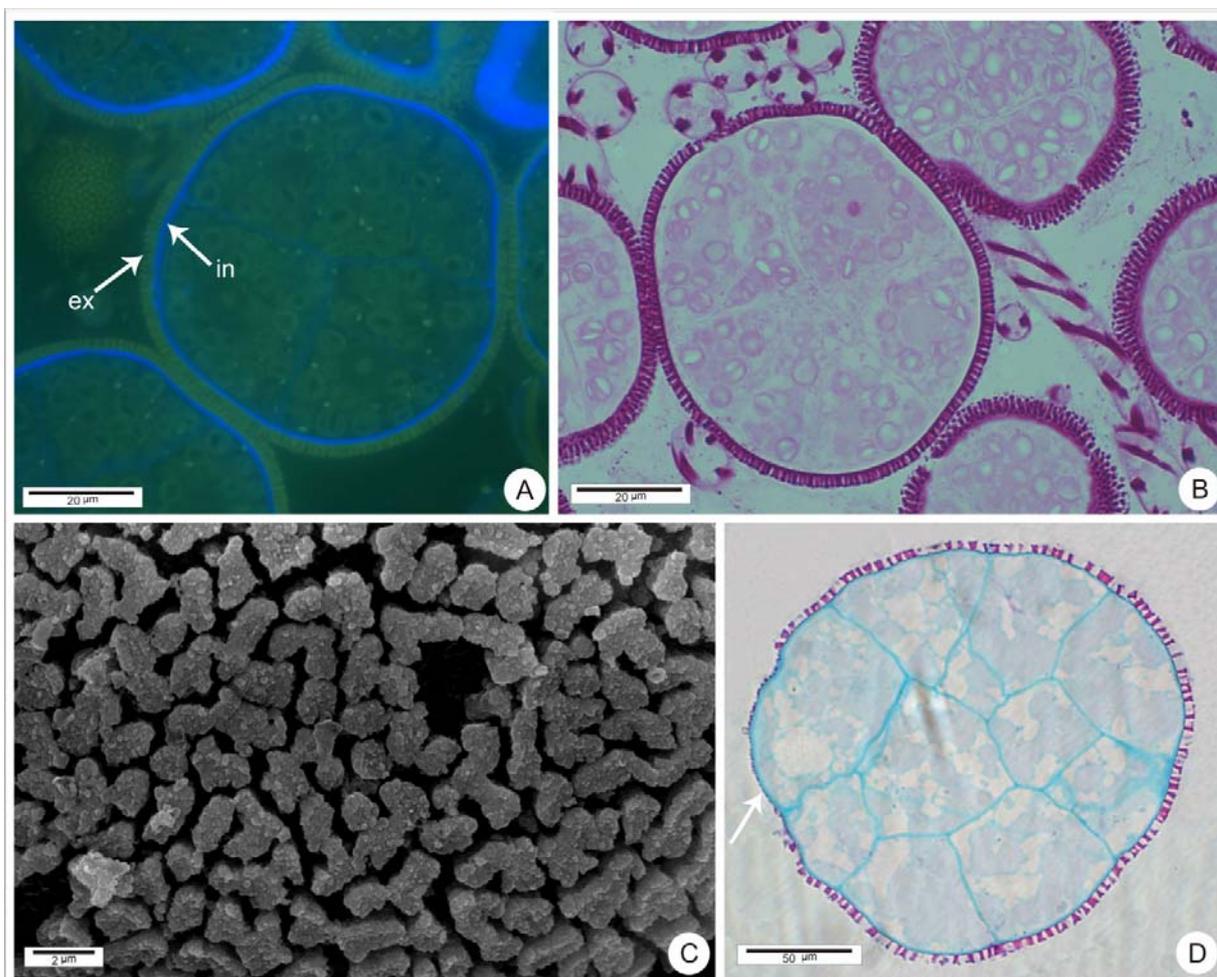


Figura 16. A esporoderme de *Noteroclada confluens*. **A.** Estratos da esporoderme, em microscopia óptica de fluorescência (Calcofluor White-Auramina). A exina (ex) apresenta uma fraca fluorescência amarelada. A intina (in) é celulósica. **B.** Exina e espessamentos dos elatérios corados com Fucsina Básica. **C.** A esporoderme, em microscopia eletrônica de varredura, mostrando a estrutura rugulada da exina. **D.** Exina, com região com menor deposição de esporoderme (seta) (Azul de Astra+ Fucsina Básica).

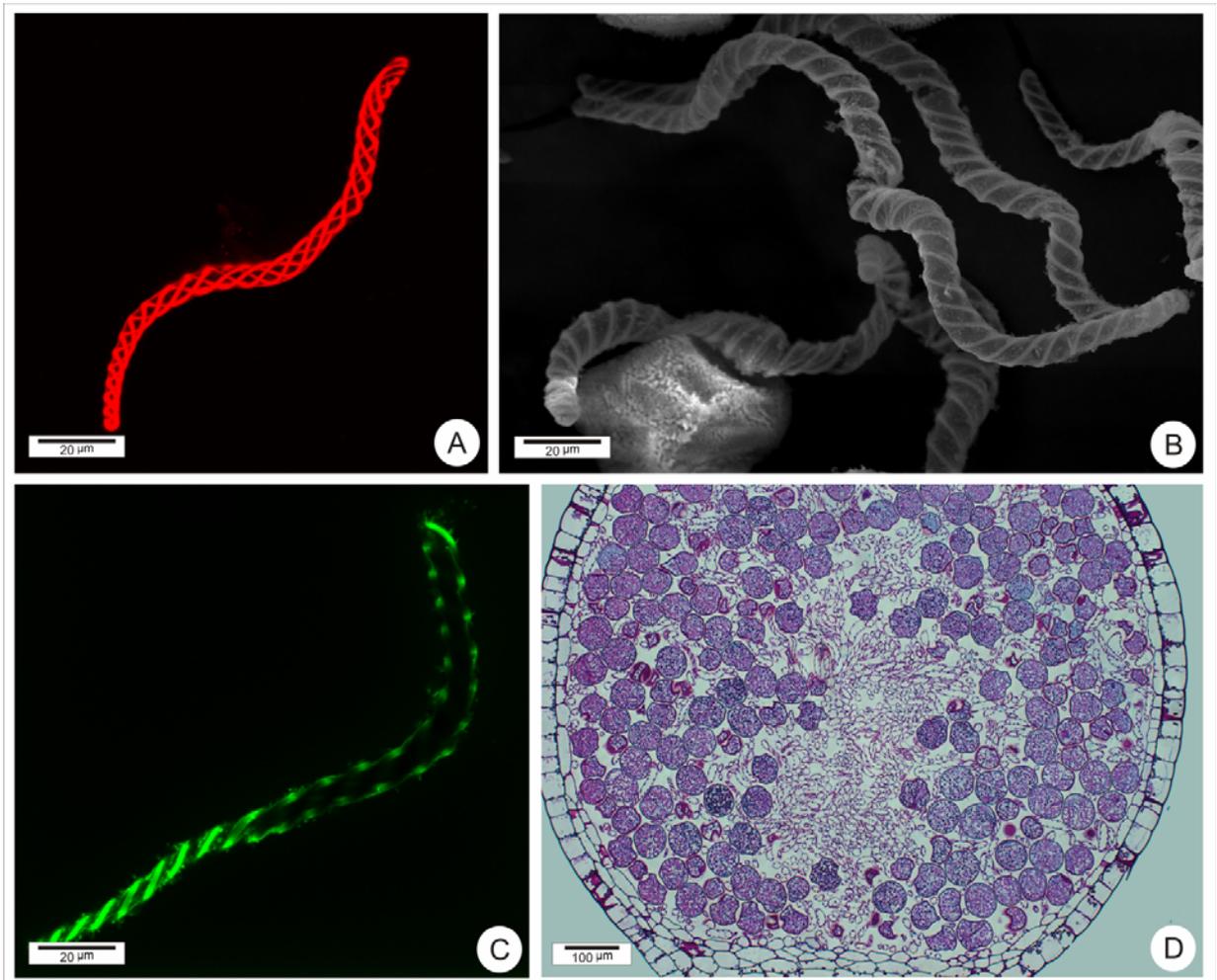


Figura 17. Morfologia e anatomia dos elatérios de *Noteroclada confluens*. **A.** Reconstrução de elatério, em microscopia confocal de varredura a laser (MCVL), mostrando os espessamentos secundários helicoidais da parede celular (PAS usando Reagente de Schiff modificado a base de Iodeto de Propídio). **B.** Detalhe dos elatérios, em microscopia eletrônica de varredura, evidenciando os espessamentos helicoidais. **C.** Seção óptica de elatério, em MCVL, evidenciando a constituição fenólica dos espessamentos helicoidais (Acridine Orange) **D.** Seção longitudinal da cápsula, mostrando conjunto de elatérios formando um elateróforo conectado à base do esporângio (PAS-Azul de Astra-Fucsina Básica).

5. DISCUSSÃO

5.1. Gametófito

O presente estudo apresenta um protocolo de processamento do gametófito que se mostrou eficaz para a manutenção da morfologia celular mais próxima da realidade, significando um ganho na interpretação histológica. Os protocolos usados geralmente são os mesmos utilizados para as plantas vasculares. Logo, como são mais delicadas, as células do gametófito das briófitas normalmente ficam alteradas pelo processamento químico. O protocolo desenvolvido neste trabalho realiza uma troca mais gradual do etanol. Isso contribuiu para uma melhor preservação das estruturas celulares do gametófito.

Segundo He-Nygrén *et al.* (2006), os filídios das hepáticas folhosas não são homólogos ao talo das hepáticas talosas, já que os dois grupos tem diferenças nas características das células apicais. Da mesma forma, os filídios das hepáticas folhosas também não são homólogos aos filídios encontrados nos musgos. Assim, parece estranho empregar uma mesma terminologia (filídios) para estruturas laminares não homólogas. Do ponto de vista morfológico e mesmo evolutivo, isso gera uma certa confusão. *Noteroclada confluens*, em muitos estudos taxonômicos, é descrita como uma espécie folhosa, apresentando filídios ao longo de um caulídeo (Grandstein & Costa 2003; Bordin & Yano 2009). As ilustrações do gametófito mostram, muitas vezes, um caulídeo de simetria radial. Entretanto, este estudo não identificou um caulídeo cilíndrico, mas apenas uma região mediana mais espessada, na qual se ligam, de maneira suave, as porções uniestratificadas do talo. Sendo *Noteroclada* considerada uma espécie talosa, e assim é neste trabalho, o talo deve ser considerado de “aparência folhosa” e não verdadeiramente folhoso. Portanto, recomenda-se o uso o termo “lobo”, substituindo o termo “filídio”, já que o talo é, morfológicamente, profundamente lobado e não folhoso de fato. O resultado deste trabalho corrobora com os recentes trabalhos

filogenéticos (Crandall- Stotler *et al.* 2005; Frey & Stech 2005; Crandall- Stotler *et al.* 2009) que inserem *N. confluens* dentro das hepáticas talosas simples.

Segundo Frey e Stech (2005), o gênero *Noteroclada*, juntamente com as hepáticas pertencentes aos gêneros *Fossombronia*, *Haplomitrium*, *Phyllothallia*, *Pleurozia*, *Sphaerocarpos* e *Treubia*, representariam transições entre a condição talosa e a folhosa e, assim, seriam relíquias das primeiras diversificações das hepáticas. O aspecto folhoso de *N. confluens* deve estar relacionado com uma atividade da célula apical tetraédrica que, segundo Renzaglia *et al.* (2000), ocorre principalmente em hepáticas folhosas. A partir do meristema apical, surgem estruturas morfologicamente laminares (primórdios), de uma única camada de células, que se expandem e se sobrepõem de forma súbica. Contudo, há a ausência de divisão celular na face ventral do talo, sem a formação de filídios ventrais (anfigastros), como em muitas hepáticas folhosas, tampouco a formação de um caulídeo. Logo, não se pode considerar a atividade da célula apical em *N. confluens* como típica das hepáticas folhosas.

Empregou-se o termo celocaule para designar o invólucro que cobre a caliptra e o esporófito em desenvolvimento. Essa terminologia foi sugerida por Crandall-Stotler *et al.* (2009b) para designar aquelas estruturas de origem talosa que surgem após a fecundação e circundam a caliptra e o esporófito. É sugerido que o termo perianto, usado em descrições taxonômicas de *N. confluens*, seja restrito aquela estrutura derivadas do interior do periquécio. O termo perianto deveria, então, ser evitado, já que *N. confluens* é uma espécie talosa e o perianto corresponderia a um conjunto de filídios modificados que circundam o arquegônio.

Como a maiorias das demais hepáticas incluídas dentro do clado talosas simples (Crandall-Stotler *et al.* 2005), o talo de *N. confluens* apresentou-se bastante homogêneo, sem quaisquer outros tecidos que o parenquimático. No que se refere à histoquímica do gametófito das hepáticas, ainda há muito a avançar para a identificação dos compostos químicos presentes na parede celular. Os testes para identificação de lignina, usando floroglucinol-HCl foram negativos, porém as células do talo apresentaram uma autofluorescência típica das ligninas, quando submetidas à luz ultravioleta. Essa autofluorescência amarelo esverdeada já foi relatada em outras hepáticas por Ligrone *et al.* (2008). Tais autores sugerem que essa autofluorescência

esteja relacionada com a presença de compostos fenólicos, uma vez que a mesma ocorre em tecidos lignificados das traqueófitas. Kodner & Graham (2001) também indicam que a autofluorescência na parede celular das células de musgos esteja relacionada à presença de compostos fenólicos. Atualmente, se aceita que esses compostos estejam relacionados com a proteção aos ataques de microorganismos e à radiação UV (Ligrone *et al.* 2008).

Os gametófitos de *N. confluens*, coletados em ambientes mais expostos à luminosidade, apresentaram uma intensa pigmentação púrpura na parede celular primária. Essa pigmentação pode estar relacionada com uma maior proteção contra os efeitos nocivos da alta irradiação solar, garantindo uma maior resistência à planta quando encontrada em ambientes mais expostos à luminosidade. Os dados aqui apresentados corroboram com os descritos por Hooijmaijers & Gould (2007), que sugerem que gametófitos com coloração avermelhada tenham maior proteção contra os efeitos da alta irradiação que gametófitos com coloração verde da mesma espécie. Gametófitos avermelhados apresentam, proporcionalmente, um maior número de carotenóides (xantofilas e caroteno) por unidade de cloroplasto. As xantofilas facilitam a dissipação do excesso de energia excitada e assim, protegem os centros do fotossistema II em períodos de alta irradiância. Otero *et al.* (2008) realizaram um estudo com diversos gêneros de briófitas e concluíram que *N. confluens* foi a espécie que apresentou a maior capacidade de absorver a luz UV. Além disso, sugeriram que a presença de compostos na parede celular (provavelmente flavonóides) esteja relacionada com o alto índice de absorção UV. Embora o presente trabalho não tenha estudado a natureza química desse pigmento presente na parede celular das células do talo, trabalhos anteriores (Benz *et al.* 1962; Kunz & Becker 1995) descrevem pigmentos similares ao encontrado na parede celular de *Noteroclada* como sendo compostos relacionados com antocianinas. Nas plantas superiores, as antocianinas são mais comumente encontradas no vacúolo e estão envolvidas com a proteção contra stress hídrico, herbivoria e alta luminosidade. Para as briófitas, existem poucas informações sobre a natureza química desses compostos, uma vez que sua extração é dificultada já que este pigmento está fortemente impregnado na parede celular.

Todavia, Kunz *et al.* (1994) sugere que esses compostos seriam moléculas de antocianidinas ou compostos estruturalmente similares.

A presença de tubers em *N. confluens* foi primeiramente descrita por Zhang *et al.* (2005), caracterizando-os como estruturas que emergem ventralmente do gametófito, tendo formatos elipsoidal ou esferoidal. Segundo esses autores, os tubers elipsoidais seriam mais comuns em populações provenientes do sul do Brasil, enquanto as formas esferoidais seriam mais comuns nas demais populações (do México à Terra do Fogo, estudadas nesse trabalho). Tubers também já foram descritos para o gênero *Fossombronia* (Crandall-Stotler *et al.* 2009b). Em *Noteroclada*, foi sugerido que os tubers teriam como função primária, o armazenamento de substâncias de reserva e, secundariamente, atuariam como propágulos na reprodução assexuada (Zhang *et al.* 2005). A ocorrência de tubers com um parênquima rico em grãos de amido nas populações estudadas no presente trabalho, corroboram a ideia de um importante órgão de armazenamento de polissacarídeos insolúveis. Embora os tubers não tenham sido freqüentemente encontrados nos talos coletados, quando presentes, concentravam-se em indivíduos encontrados em solos argilosos, bastante úmidos onde, teoricamente, o ambiente seria mais propício para a reprodução sexuada, já que havia grande disponibilidade de água. Tal dado pode indicar que, em *N. confluens*, os tubers estão mais relacionados à reserva de nutrientes, já que não foram observados a formação de talos a partir de tubers. Bordin & Yano (2009), em um trabalho recente acerca da ocorrência de antóceros e hepáticas do Rio Grande do Sul, não descrevem a presença de tubers em *Noteroclada*. Logo, sua ocorrência pode ser bastante rara e restrita a determinados ambientes. Assim como nos resultados de Zhang *et al.* (2005), os tubers analisados possuem um meristema apical arredondado, o qual é recoberto por camadas laminares uniestratificadas. Estas camadas, aparentemente, parecem ter como função a proteção do tuber dos danos mecânicos decorrentes do seu crescimento no interior do substrato, minimizando os efeitos do atrito com as partículas do solo. Diferentemente dos resultados de Zhang *et al.* (2005), não foram observadas a formação de tubers a partir do meristema apical do talo.

Os oleocorpos de *N. confluens* são compostos por sesquiterpenoides. Em *Pellia epiphylla* (L.) Corda, também são conhecidos diferentes tipos de

sesquiterpenoides para os oleocorpos (Asakawa 2004). Nesse sentido, a presença deste composto químico é um caráter que pode ser utilizado para a caracterização da família Pelliaceae, uma vez que muitos dados químicos de hepáticas vêm sendo aplicados na classificação taxonômica de gêneros e famílias. Segundo a classificação morfológica dos oleocorpos proposta por Grandstein *et al.* 1977 *apud* Crandall- Stotler (2009b), os oleocorpos de *N. confluens* são do tipo *Massula*, pequenos, homogêneos e não opacos.

Outro aspecto observado nos gametófitos de *N. confluens* foram as ramificações que surgem a partir de zonas meristemáticas ao longo do talo. Aparentemente, essas ramificações são produzidas em um período de menor disponibilidade hídrica. Em períodos de muita chuva, a planta investe seus recursos na reprodução sexuada. Logo, sugere-se que a propagação vegetativa esteja vinculada à indisponibilidade de acúmulo de água para a reprodução sexuada. A regeneração do gametófito de *N. confluens* e *Blasia pusilla* L. já havia sido relatada por Allsopp & Ilahi (1970), que afirmam que as regenerações ocorrem em ápices dormentes ao longo do caulídeo. Ressalta-se que as ramificações partem da região ventral, a partir da região mediana mais espessada do talo.

Em *N. confluens*, foram identificados indivíduos com gametângios masculinos e femininos (monóicos ou hermafroditas) e indivíduos apenas com anterídios (unissexuados). As análises sugerem que *N. confluens* seja monóica, já que se observou uma separação temporal na formação dos gametângios. Os primeiros a surgir são os anterídios. Assim, entende-se que a observação de um talo dióico esteja relacionada a um estágio de desenvolvimento de um talo monóico. Estes dados discordam dos descritos por Schiffner (1911), que enfatiza a presença de indivíduos dióicos (unissexuada) e monóicos (hermafrodita) para essa espécie. Quanto à distribuição dos gametângios, Schiffner (1911) afirmou que os gametângios de *N. confluens* são relativamente organizados, estando os arquegônios aleatoriamente dispersos entre duas fileiras de anterídios. Todavia, observou-se que os arquegônios organizam-se em uma ou mais fileiras entre as fileiras de anterídios.

A dissolução das células do colo do arquegônio, em *N. confluens*, ocasiona o acúmulo de substâncias polissacarídicas nesta região. Esse acúmulo provavelmente

facilita a entrada dos anterozoides no arquegônio, visando o encontro com a oosfera. A presença de substâncias de caráter mucilaginoso também já foram observadas por Smith (1955).

O estudo dos anterídios de *N. confluens* evidenciou que estes são suportados por um curto pedículo que conecta o anterídio às demais células do tecido gametofítico. Esse dado é diferente dos apresentados por Smith (1955). Segundo esse autor, os anterídios de Jungermanniales (antiga ordem onde estavam inseridos os gêneros atualmente inclusos em Pelliaceae) são suportados por um longo pedículo. No entanto, foi estudado apenas o gênero *Pellia*, não sendo representado o gênero *Noteroclada*. Já Schiffner (1911) acreditava que *Noteroclada* não apresentava pedículo, uma vez que não ocorre desenvolvimento de uma estrutura que eleve o anterídio em relação ao talo. Ainda com relação aos anterídios, as características ontogenéticas observadas em *N. confluens* são semelhantes as descritos por Smith (1955) para a ordem Jungermanniales. Em *N. confluens*, ao longo da ontogênese dos anterídios, ocorre deposição de grandes quantidades de substâncias polissacarídicas na parede celular da célula mãe de andrócito. Em muitas hepáticas, essa substância é identificada como calose (Kazmierczak 2008). Entretanto, para *N. confluens*, não foi confirmada a presença de calose e sim de celulose. Esse acúmulo de celulose também deve estar relacionado ao isolamento dos andrócitos antes de sofrerem diferenciação em anterozoides.

Embora Pelliaceae seja bem sustentada nas recentes análises filogenéticas (Crandall-Stotler *et al.* 2005), o presente trabalho traz grandes contribuições sobre a anatomia e histoquímica do gametófito de *N. confluens*. Esses dados poderão contribuir para futuras análises filogenéticas que envolvam a família e outros grupos taxonômicos de Marchantiophyta.

5.2. Esporófito

Embora já tenham sido publicados resultados a cerca de algumas características do esporófito de *Noteroclada confluens* (Crandall-Stotler *et al.* 2005), os resultados aqui obtidos com as análises anatômicas são inéditos, apresentando a caracterização do esporófito e sua histoquímica em diferentes estádios do desenvolvimento. Além disso, traz contribuições para um melhor entendimento do processo de formação do esporófito como um todo.

Nos recentes estudos filogenéticos, os gêneros *Noteroclada* e *Pellia* formam uma família bem sustentada (Crandall-Stotler *et al.* 2005). Os resultados aqui apresentados confirmaram que muitas características do esporófito de *N. confluens* assemelham-se às espécies de *Pellia* já estudadas (Watson & Richards 1968), dentre elas: a deiscência da cápsula ocorre quando a seta apresenta cerca de 4cm de comprimento, morfologia da seta, formato globoso da cápsula, germinação endospórica, tamanho do protonema ao ser liberado pela cápsula (cerca de 60 μm).

Em *N. confluens*, observou-se grãos de amido nas células da seta imatura. Este amido é uma importante fonte de nutrientes para esporófitos em desenvolvimento (Smith 1955) e já havia sido relatado para a espécie (Schiffner 1911). Com relação à anatomia da seta de *N. confluens*, esta apresenta espaços intercelulares ricos em substâncias polissacarídicas. Essa característica é inédita e retifica a descrita por Schiffner (1911), que interpretou os espaços intercelulares como espessamentos de parede celular primária. Espessamentos angulares na parede celular, como observados em colênquimas, provavelmente dificultariam a expansão celular durante o processo de alongamento celular, durante a elevação da seta.

Na cápsula de *N. confluens*, foram observados padrões de espessamentos da parede celular, diferentes na epiderme e na camada sub-epidérmica (camada interna) . Os espessamentos helicoidal ou anelar aumentam a rigidez da camada sub-epidérmica, provavelmente ajudando no dobramento das valvas para fora, levando à deiscência do esporângio. Não foram avaliadas diferenças na distribuição dos espessamentos na cápsula como um todo e, assim, não foi possível avaliar a mecânica do seu processo de abertura. Embora Schiffner (1911) tenha caracterizado a morfologia

desses espessamentos, informações sobre a composição química destes ainda são escassos para *N. confluens*. Os resultados encontrados neste estudo sugerem que os espessamentos secundários da parede celular das células da cápsula são de natureza fenólica. Culmann *et al.* (1996), num estudo de *Pellia epiphylla*, descreveram a presença de uma lignana. As lignanas são compostos fenólicos com a função de deter insetos (Mac Rae & Towers 1984; Vermeris & Nicholson 2008).

Embora o teste com floroglucinol-HCl tenha resultados negativos para lignina, os resultados dos testes histoquímicos de Maule e uso de Acridine Orange foram positivos para tal componente. Esses dados sugerem que um composto fenólico muito semelhante à lignina faça parte da parede celular secundária dos espessamentos, como já relatado por Ligrone *et al.* (2008). Estes trouxeram as primeiras evidências da presença de compostos fenólicos imunologicamente semelhantes às ligninas nas paredes celulares de hepáticas, usando anticorpos policlonais. O resultado negativo para floroglucinol-HCl, na parede da cápsula de *N. confluens* e nos resultados obtidos por Ligrone *et al.* (2008), não invalida a presença de compostos relacionados com ligninas, já que o floroglucinol tem especificidade para outras unidades componentes do polímero de lignina que não as unidades fenilpropanoides mais comumente encontradas (Pomar *et al.* 2002).

Noteroclada confluens foi descrita como uma espécie de esporófitos com cápsulas dotadas de quatro valvas, as quais se abrem irregularmente (Bordin & Yano, 2009). Entretanto, nos indivíduos estudados neste trabalho, observou-se que desde antes do alongamento da seta, ocorrem quatro linhas de deiscência (estômios) regularmente espaçadas e bem definidas na parede do esporângio. Assim, em *N. confluens*, não se pode afirmar que a deiscência é irregular. Isso pode ter ocorrido pela observação de poucos esporófitos ou pela análise de cápsulas já deiscentes. Assim, conclui-se que a observação apenas da estrutura madura do esporângio pode levar à equívocos de interpretação. Portanto, evidencia-se a importância de estudos morfológicos e anatômicos para a caracterização de estruturas utilizadas como caráter taxonômico no grupo das hepáticas.

Com relação à esporogênese, o estudo de *N. confluens* reforça os resultados de muitas investigações sobre o desenvolvimento do esporo em briófitas. *N. confluens*

apresenta células-mãe de esporo tetralobadas, concordando com Schuster (1984) que postulou uma básica dicotomia entre as hepáticas: as folhosas e talosas simples têm células-mãe de esporos tetralobadas e as talosas complexas não. Esse aspecto tetralobado é adquirido logo no início da meiose. Um padrão semelhante já foi observado em *Pellia epiphylla* (Willis 1957) e em *Aneura pinguins* (Brow & Lemmon (2004). Diferentemente do que ocorre nas plantas vasculares, a presença de uma célula- mãe tetralobada nas hepáticas parece abreviar a citocinese, já que não há a necessidade de formação de grande quantidade de parede celular para separar o citoplasma que constituirá cada um dos esporos. Nesta caso, apenas uma fina parede pectocelulósica permite a separação na região central da célula mãe, logo após a formação dos quatro núcleos haploides.

Embora a calose esteja bem descrita no processo da esporogênese das hepáticas (Brown & Lemon 1987), a tétrade de esporos de *N. confluens* é envolvida por uma parede celular constituída por hemicelulose, sendo a calose ausente. Essa parede celular, PAS positiva, assim como a calose, é responsável pelo isolamento das etapas finais da meiose. A natureza hemicelulósica dessa parede celular, nesse estágio da esporogênese, foi descrita também para *Riccardia pinguis* (Horner *et al.* 1996). A presença de hemiceluloses do tipo xiloglucanos também foi detectada em várias briófitas (O'Neill 2003 *apud* Carafa *et al.* 2005). Carafa *et al.* (2005), em um estudo imunocitoquímico, não encontraram resultados positivos para os anticorpos LM10 (xilanos) e LM11 (arabinoxilanos) em células do esporófito de hepáticas. Dentre as estruturas analisadas, estavam tétrades e elatérios maduros de *Pellia endiviifolia*. Contudo, a ausência da marcação desses anticorpos não exclui a possibilidade de ocorrer estruturas semelhantes à xiloglucanos, já que LM10 e LM11 são anticorpos específicos para outros tipos de hemicelulose. Embora em *N. confluens* tenha sido detectada hemiceluloses, desconhece-se sua composição química mais detalhada.

Após a meiose e a formação dos quatro esporos unicelulares a partir da célula- mãe tetraédrica, os esporos de *N. confluens* apresentaram um desenvolvimento endospórico. Este padrão de crescimento já havia sido observado em *Pellia epiphylla* e *P. nessiana* (Gottsche) Limpr. (Bartholomew-Began 1996). Contudo, nessas duas espécies, o padrão ontogenético é caracterizado pela produção inicial de um protonema

composto por uma linha de quatro células, enquanto que, em *N. confluens*, o protonema é esférico e determinado desde as primeiras divisões celulares.

Este estudo procurou adotar a terminologia mais condizente com as estruturas analisadas. Para *N. confluens*, assim como para muitas outras hepáticas endospóricas, o termo esporo ou “esporo” multicelular não é o recomendado para referir-se à unidade liberada após a deiscência do esporângio, uma vez o esporo é uma estrutura unicelular (Punt *et al.* 2007). Como em *N. confluens* o desenvolvimento é precocemente endospórico, sendo os protonemas já formados no interior da cápsula, a estrutura liberada é pluricelular e a terminologia mais coerente é seria o use de protonema jovem, tendo em vista que Magil (1990) sugere que este termo corresponda à estrutura resultante da germinação do esporo. Nas hepáticas, o desenvolvimento endospórico provavelmente está mais correlacionado com uma adaptação ecológica para ambientes secos do que com relações filogenéticas, uma vez que tal forma de desenvolvimento ocorre isoladamente em diversos agrupamentos filogenéticos do grupo (Nehira 1987). Contudo, *N. confluens* é uma espécie que cresce, preferencialmente, em solos bastante úmidos. Talvez essa condição endospórica tenha sido adquirida por *N. confluens* quando esta ainda ocupava um ambiente mais seco, assim como já inferido por Nehira (1987) para os gêneros *Pellia* e *Conocephalum*.

Ainda com relação ao protonema jovem de *N. confluens*, este apresenta uma intina pectocelulósica, de espessura regular em toda sua extensão. Em *Pellia epiphylla*, a intina é mais espessa na região proximal dos esporos na tétrade, sendo mais fina e mucilaginosa no restante (Wills 1957). Não foi identificado a presença de calose em nenhuma região da esporoderme, sendo que, em algumas briófitas, a calose está envolvida na expansão da abertura durante o desenvolvimento da parede (Schuette *et al.* 2009). Quanto à escultura da esporoderme, *N. confluens* apresenta esporos com uma escultura densa do tipo rugulada, mantida nos protonemas. Isso é contrário às observações de Schiffner (1911) que, através de estudos apenas em microscopia óptica, concluiu que a superfície da esporoderme de *N. confluens* continha verrugas. Em *N. confluens*, no protonema jovem, ocorre uma zona com menor deposição de exina. Essa região corresponde ao local onde os esporos estavam unidos na tétrade. Provavelmente, está relacionada com a região de germinação do

protonema, após a deiscência da cápsula e sua liberação para o meio externo. O crescimento *in vitro* do protonema globoso seria útil para confirmar esta hipótese.

Ainda com relação ao protonema, *N. confluens* apresentou desenvolvimento endospórico. Ao se liberado, após a deiscência da cápsula, o protonema jovem apresenta muitas células.

A parede primária dos elatérios de *N. confluens* apresenta constituição polissacarídica, especificamente celulósica e pectica. Esses mesmos componentes já foram encontrados em elatérios de *Radula buccinifera* (Kremer *et al.* 2004), em análises imunocitoquímicas, obtendo resultados positivos para diferentes epitopos da molécula pectica. Não foi detectada celulose na parede secundária dos elatérios de *N. confluens*, assim como observado em *R. buccinifera* (Kremer *et al.* 2004). A presença de um pigmento marrom nos espessamentos secundários helicoidais dos elatérios de *N. confluens* pode estar mascarando a marcação utilizada para a localização de celulose, assim como já inferido por Kremer *et al.* (2004). Com relação ao número de bandas de espessamento dos elatérios, *N. confluens* apresenta duas ou três faixas, concordando com a revisão de Crandall-Stotler *et al.* (2009a), que caracterizam a família Pellieaceae como apresentando elatérios com duas ou mais bandas de espessamentos secundários.

Em *N. confluens* ocorre um elateróforo basal. Essa característica não é comum a todas as hepáticas, sendo um caráter de valor taxonômico no grupo (Crandall-Stotler *et al.* 2009a). A massa de elatérios presentes no elateróforo apresenta movimentos induzidos higroscopicamente, que auxiliam na liberação do conjunto de protonemas jovens após da abertura da cápsula (Crandall-Stotler *et al.* 2009a).

Ainda existem muitas dúvidas quanto à natureza química de vários compostos encontrados na parede celular do gametófito e esporófito de *N. confluens* e que não foram possíveis de serem solucionadas com os testes histoquímicos utilizados durante o estudo realizado. Logo, outras análises envolvendo técnicas de imunocitoquímica poderiam contribuir para um melhor entendimento da estrutura química das paredes celulares desta hepática.

6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

O presente trabalho pretendeu ampliar o conhecimento sobre as características do gênero *Noteroclada*. Percebeu-se que existem uma série de características anatômicas e histoquímicas que podem ser utilizadas em futuras análises filogenéticas, dentre elas a composição química de oleocorpos e paredes celulares das estruturas do gametófito e esporófito. Contudo, os estudos com anatomia de hepáticas ainda estão restritos a poucas espécies, sendo necessários estudos com mais grupos para um bom entendimento da evolução dessas características dentro das hepáticas.

De modo geral, as características do gametófito e esporófito de *Noteroclada confluens* assemelham-se às já descritas para a classe Jungermanniosida. *Noteroclada* e *Pellia* apresentam várias características em comum no esporófito, o que justifica a monofilia e o alto valor de *bootstrap* dessa família em muitos estudos filogenéticos.

Alguns pontos desse estudo são inéditos para o gênero *Noteroclada*:

- Composição química dos oleocorpos;
- Pigmentação avermelhada na parede celular das células do talo;
- Ontogênese dos anterídios;
- Padrão dos espessamentos da cápsula;
- Composição química do estrato que envolve a tétrade;
- Histoquímica do protonema.

Por fim, dentre as características descritas no presente trabalho, algumas geram questionamentos e merecem destaque em abordagens futuras:

- Quais os compostos conferem autofluorescência nas células do talo?
- Qual é a composição química dos pigmentos encontrados naqueles indivíduos mais expostos à luminosidade?
- Durante a fase inicial da célula mãe de esporo, qual é o componente químico do estrato hialino?
- Qual o tipo de hemicelulose que envolve a célula mãe de esporo na fase tetralobada?

- Qual é a natureza química dos compostos fenólicos dos espessamentos das células da parede da cápsula e dos elatérios?

Para responder tais questionamentos, sugerem-se novos estudos com *N. confluens* envolvendo análises de microscopia eletrônica de transmissão e estudos imunocitoquímicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDO, H. & MATSUO, A. 1984. Applied Bryology, p. 133-224. In.: W. SCHULTZE-MOTEL (Ed.). **Advances in Bryology** vol. 2, J. Cramer, Vaduz.
- ALLSOPP, A. & ILAHI, I. 1970. Studies in the Metzgeriales (Hepaticae). VII. Regeneration in *Noteroclada confluens* and *Blasia pusilla*. **Phytomorphology** 20 (2): 173-182.
- ASAKAWA, Y.; TOYOTA, M.; KONRAT, M. & BRAGGINS, J.E. 2003. Volatile components of selected species of liverwort genera *Frullania* and *Schusterella* (Frullaniaceae) from New Zealand, Australia and South America: a chemosystematic approach. **Phytochemistry** 62: 439-452.
- _____. 2004. Chemosystematics of the Hepaticae. **Phytochemistry** 65: 623–669.
- _____. 2008. Liverworts-Potential Source of Medicinal Compounds. **Current Pharmaceutical Design** 14: 3067-3088.
- BARTHOLOMEW, S. E. & CRANDALL-STOTLER, B. J. 1986. The sporeling ontogeny of *Monoclea gottschei* subsp. *elongata*. **Bryologist** 97: 244-252.
- _____. 1996. The sporeling ontogeny of *Pellia epiphylla* (L.) Corda and *Pellia neesiana* (Gott.) Limpr. with special reference to the protonema. **Journal of the Hattori Botanical Laboratory** 79:115-128.
- BARTHOLOMEW-BEGAN, S. 2009. Juvenile gametophyte development in the Blasiales. 3.Sporeling ontogeny of *Cavicularia densa*. **The Bryologist** 112(2): 354–358.
- _____.; JONES, N.L. 2005. Juvenile Gametophyte Development in the Blasiales (Marchantiophyta; Metzgeriidae). 1.Receptacular Gemma/ Gemmaling Ontogeny of *Blasia pusilla*. **The Bryologist** 108(4):497-505.
- BENDZ, G; MARTENSSON, O; TERENIUS, L. 1962. Moss pigments. I. The anthocyanins of *Bryum cryophilum*. **Acta Chemica Scandinavica** 16:1183-1190.

- BLACKMORE, S. & BARNES, S. H. 1987 Embryophyte spore walls: origin, development, and homologies. **Cladistics** 3: 185-195.
- BORDIN, J. & Yano, O. 2009. Novas ocorrências de antóceros e hepáticas para o Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** 32: 189-211.
- BROWN, R.C.; LEMMON, B. E. 1986. Involvement of callose in determination of exine patterning in three hepatics of the subclass Jungermanniidae. **Memoirs of the New York Botanical Garden** 45:111–121.
- _____. 1990. Sporogenesis in bryophytes, pp.55–94 In BLACKMORE & R.B. KNOX (Ed.). **Microspores, Evolution and Ontogeny**. London: Academic Press. 347 Pp.
- _____. 2004. γ -Tubulin, microtubule arrays, and quadripolarity during sporogenesis in the hepatic *Aneura pinguis* (Metzgeriales). **Journal Plant Research** 117:371–376.
- _____; _____ 2006. Polar organizers and girdling bands of microtubules are associated with γ -tubulin and act in establishment of meiotic quadripolarity in the hepatic *Aneura pinguis* (Bryophyta). **Protoplasma** 227: 75-85.
- _____; _____ & RENZAGLIA, K. S. 1986. Sporocytic control of spore wall pattern in liverworts. **American Journal of Botany** 73: 593–596.
- CARAFÀ, A.; DUCKETT, J.G & LIGRONE, R. 2003. The placenta in *Monoclea forsteri* Hook. and *Treubia lacunose* (Col.) Prosk: Insights into Placental Evolution in Liverworts. **Annals of Botany** 92: 299-307.
- _____; _____; KNOX, J.P & LIGRONE, R. 2005. Distribution of cell-wall xylans in bryophytes and tracheophytes: new insights into basal interrelationships of land plants. **New Phytologist** 168: 231–240.
- CRANDALL-STOTLER, B. 1981 *apud* CRANDALL-STOTLER; STOTLER, R.E. & LONG, D.G. 2009. Morphology and classification of the Marchantiophyta, p. 1-54. In: SHAW, A.J. & GOFFINET, B. (Eds.). **Bryophyte Biology**. Second Edition. Cambridge: Cambridge University Press. 565Pp.

- _____ & STOTLER, R. 2000. Morphology and classification of the Marchantiophyta, p. 1-70. In: SHAW, A.J. & GOFFINET, B. (Eds.). **Bryophyte Biology**. Cambridge: Cambridge University Press. 476 Pp.
- _____; FORREST, L. & STOTLER, R.E. 2005. Evolutionary trends in the simple thalloid liverworts (Marchantiophyta, Jungermanniopsida subclass Metzgeriidae). **Taxon** 54(2): 299-316.
- _____; STOTLER, R.E. & LONG, D.G. 2009a. Phylogeny and classification of the Marchantiophyta. **Edinburgh Journal of Botany** 66(1):155–198.
- _____; _____; _____ 2009b. Morphology and classification of the Marchantiophyta, p. 1-54. In: SHAW, A.J. & GOFFINET, B. (Eds.). **Bryophyte Biology**. Second Edition. Cambridge: Cambridge University Press. 581Pp.
- CULLMANN, F.; ADAM, K; ZAPP, J. & BECKER, H. 1996. Pelliatin, a macrocyclic lignan derivative from *Pellia epiphylla*. **Phytochemistry** 41(2): 611-615.
- DUCKETT, J.G. & LIGRONE, R. 1995. The formation of catenate foliar gemmae and the origin of the oil bodies in the liverwort *Odontoschima denudatum* (Mart.) Dum. (Jungermanniales): a light and electron microscope study. **Annals of Botany** 76: 406-419.
- FAEGRI, K. & J. IVERSEN. 1964. **Textbook of pollen analysis**. Oxford, Blackwell Scientific Publications. 328 Pp.
- FORREST, L.L., DAVIS, E.C., LONG, D.G., CRANDALL-STOTLER, B.J., CLARK, A & HOLLINGSWORTH, M.L. 2006. Unraveling the evolutionary history of the liverworts (Marchantiophyta): multiple taxa, genomes and analysis. **Bryologist** 109: 303–334
- FREIRE, V. A. 2002. A Revision of the Genus *Fossombronia* in Latin America. Tese de doutorado, Southern Illinois University at Carbondale.
- FREY, W. & STECH, M. 2005. A morpho-molecular classification of the liverworts (Hepaticophytina, Bryophyta). **Nova Hedwigia** 81: 55-78.

- GARBARY, D.J.; RENZAGLIA, K.S.; DUCKETT, J.G. 1993. The phylogeny of land plants: a cladistic analysis based in male gametogenesis. **Plant Systematics and Evolution** 188: 237-269.
- GEISMANN, T.A & GRIFFIN, T.S. 1971. Sesquiterpene lactones: acid-catalyzed color reactions as an aid in structure determination. **Phytochemistry** 10: 2475- 2485.
- GERLACH, D. 1984. **Botanische Mikrotechnik**. Thieme, Stuttgart. 331 p.
- GERRITS, P.O. & SMID, L. 1983. A new, less polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy** 132: 81-85.
- GLIME, J.M. 2007. **Bryophyte Ecology**. Physiological Ecology. Vol 1. Michigan Technological University. Disponível em <http://www.bryoecol.mtu.edu/>. Acesso em: 20 dez. 2009.
- GRADSTEIN, S.R.; CLEEF, A.M. & FULFORD, M.H. 1977 *apud* CRANDALL-STOTLER; STOTLER, R.E. & LONG, D.G. 2009. Morphology and classification of the Marchantiophyta, p. 1-54. In: SHAW, A.J. & GOFFINET, B. (Eds.). **Bryophyte Biology**. Second Edition. Cambridge: Cambridge University Press. 565Pp.
- GRADSTEIN, S.R. & COSTA, D.P. 2003. The Hepaticae and Anthocerotae of Brazil. **Memoirs of the New York Botanical Garden** 87: 1-318.
- GUERRA, M. & M.J. SOUZA. 2002. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto, SP: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto. 131 Pp.
- HEINRICH, J.; GRADSTEIN, S.R.; WILSON, R. & SCHNEIDER, H. 2005. Towards a natural classification of liverworts (Marchantiophyta) based on the chloroplast gene *rbcL*. **Cryptogamie Bryologie** 26: 131-150.
- HE-NYGRÉN, X.; AHONEN, I.; JUSLÉN, A.; GLENNY, D. & PIIPPO, S. 2004. Phylogeny of liverworts—beyond a leaf and a thallus. **Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden** 98: 87-118.

- _____; JUSLEN, A.; AHONEN, I.; GLENNY, D. & PIIPPO, S. 2006. Illuminating the evolutionary history of liverworts (Marchantiophyta)-towards a natural classification. **Cladistics** 22: 1–31.
- HESLOP-HARRISON, Y. 1977. The pollen–stigma interaction: pollen-tube penetration in *Crocus*. **Annals of Botany** 41: 913–922.
- HOFMEISTER, W. 1851 **Vergleichende Untersuchungen der Keimung, Entfaltung und Fruchtbildung höherer Kryptogamen**. Leipzig: Friedrich Hofmeister.
- HOOIJMAIJERS, C.A.M & GOULD, K.S. 2007. Photoprotective pigments in red and green gametophytes of two New Zealand liverworts. **New Zealand Journal of Botany** 45: 451-461.
- HORNER, H.T; LERSTEN, N.R & BOWEN, C.C. 1966. Spore development in the liverwort *Riccardia pinguis*. **American Journal of Botany** 53(10): 1048-1064.
- HUGHES, J.; MCCULLY, M.E. 1975. The use of an optical brightener in the study of plant structure. **Stain Technol** 50: 319–329.
- INGOLD, C.T. 1939. **Spore Discharge in Land Plants**. Oxford: Clarendon Press.
- JENSEN, W.A. 1962. **Botanical histochemistry: principles and practice**. San Francisco, W.H. Freeman and Company. 408 Pp.
- JOHANSEN, D.A. 1940. **Plant Microtechnique**. New York, Mc Graw- Hill Book Company. 523p.
- JONES, N.L & BARTHOLOMEW-BEGAN, S. 2007. Juvenile gametophyte development in the Blasiales (Metzgeriidae). 2.Gemma/ gemmaling ontogeny of *Cavicularia densa*. **The Bryologist** 110(3): 453–464.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. & DONOGHUE, M.J. 2002. **Plant Systematics: A Phylogenetic Approach**. Second Edition. Sunderland, Sinauer Associates, Inc.

- KAZMIERCZAK. 2008. Cell number, cell growth, antheridiogenesis, and callose amount is reduced and atrophy induced by deoxyglucose in *Anemia phyllitidis* gametophytes. **Plant Cell Reports** 27: 813-821.
- KODNER, R.B & GRAHAM, L.E. 2001. High-temperature, acid-hydrolyzed remains of *Polytrichum* (Musci, Polytrichaceae) resemble enigmatic silurian- devonian tubular microfossils. **American Journal of Botany** 88: 462–466.
- KRAUS, J.E; SOUSA, H.C.; REZENDE, M.H; CASTRO, N.M; VECCHI, C; LUQUE, R. 1998. Astra blue and basic Fuchsin Double Staining of Plant Material. **Biotechnic & Histochemistry** 73(5): 235-243.
- KREMER, C.; PETTOLINO, F; BACIC, A. & DRINNAN, A. 2004. Distribution of cell wall components in *Sphagnum hyaline* cells and in liverwort and hornwort elaters. **Planta** 219: 1023–1035.
- KUNZ S.; BURKHARDT G.; BECKER H. 1994, Riccionidins A and B, anthocyanidins from the cell walls of the liverwort *Ricciocarpus natans*. **Phytochemistry** 35 (1): 233-235.
- _____ & BECKER, H. 1995. Cell wall pigment formation of *in vitro* cultures of the liverwort *Ricciocarpus natans*. **Zeitschrift für Naturforschung** 50: 235-240.
- _____; BURKHARDT, G & BECKER, H. 2001. Riccionidins a and b, anthocyanidins from the cell walls of the liverwort *Ricciocarpus natans*. **Phytochemistry** 35(1): 233-235.
- LEITGEB, H. 1874–1881. **Untersuchungen über die Lebermoose .I–VI; I. *Blassia pussila* ,1874; II. Die Foliosen Jungermannieen, 1875 ;III Die Frondosen Jungermannieen,1877; IV. Die Riccieen, 1879; V. Die Anthoceroteen,1879; VI. Die Marchantieen,1881. Vols.I–III, Jena: O. Deistung's Buchhandlung; vols. IV–VI, Graz: Leuschner & Lubensky.**
- LIGRONE, R.; CARAFA, A.; DUCKETT, J.G; RENZAGLIA, K.S; RUEL, K. 2008. Immunocytochemical detection of lignin-related epitopes in cell walls in bryophytes and the charalean alga *Nitella*. **Plant Systematics and Evolution** 270: 257-272.

- LILLIE, R. D. 1965. **Histopathologic technic and practical histochemistry**. 3^a ed. New York, McGraw-Hill Co. 715 Pp.
- LISBOA, R.C.L. & ILKIU-BORGES, A.L. 1995. Diversidade das briófitas de Belém (PA) e seu potencial como indicadores de poluição. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, série Botânica 11(2): 131-293.
- MAC RAE, W.D. & TOWERS, G.H.N. 1984. Biological activities of lignans. **Phytochemistry** (23): 207–1220.
- MAGIL, R.E (ED.). 1990. Glossarium polyglottum bryologiae. Monogr. Syst. **Botanical Missouri Garden** 33: 1-297. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/tropicos/most/Glossary/glosefr.html>. Acesso em: 03 jan. 2010.
- MARTIN, F.W. 1959. Staining and observing pollen tubes in styles by means of fluorescence. **Stain Technology** 34:12.
- NEHIRA, K. 1983 *apud* CRANDALL-STOTLER; STOTLER, R.E. & LONG, D.G. 2009. Morphology and classification of the Marchantiophyta, p. 1-54. In: SHAW, A.J. & GOFFINET, B. (Eds.). **Bryophyte Biology**. Second Edition. Cambridge: Cambridge University Press. 565Pp.
- NEHIRA, K. 1987. Some Ecological Correlations of Spore Germination Patterns in Liverworts. **The Bryologist** 90(4): 405-408.
- NEPI, M. & G.G. FRANCHI. 2000. Cytochemistry of mature angiosperm pollen. **Plant Systematic and Evolution** 222: 45-62.
- O'BRIEN, T.P. & M.E. MCCULLY. 1981. **The study of plant structure - principles and selected methods**. Melbourne, Termarcarphi Pty. 345p.
- O'NEILL, M.A & YORK, W.S. 2003 *apud* CARAFA, A; DUCKETT, J.G; KNOX, J.P & LIGRONE, R. 2005. Distribution of cell-wall xylans in bryophytes and tracheophytes: new insights into basal interrelationships of land plants. **New Phytologist** 168: 231–240.

- OTERO ,S.; CEZON,K.; MARTINEZ-ABAIGAR, J. & NUNZ-OLIVERIA, E. 2008. Ultraviolet- absorbing capacity of aquatic bryophytes from Tierra del Fuego (Argentina). **Journal of Bryology** 30: 290-296.
- PERRY, N.B; BURGESS, E.J; FOSTER, L.M; GERARD. P.J; TOYOTA,M & ASAKAWA, Y. 2008. Insect Antifeedant Sesquiterpene Acetals from the Liverwort *Lepidolaena clavigera*. 2. Structures, Artifacts, and Activity. **Journal of Natural Products** 71(2): 258-261.
- POMAR, F.; MERINO, F. & ROS BARCELÓ, A. 2002. O-4-linked conifer land sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the main targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction. **Protoplasma** 220:17–28.
- PUNT, W., HOEN, P.P.; BLACKMORE, S.; NILSSON, S. & THOMAS, A. 2007. Glossary of pollen and spore terminology. **Review of Paleobotany and Palynology** 143: 1-81.
- QIU, Y.L.; CHO, J.C.; COX, J.C & PALMER, J.D. 1998. The gain of three mitochondrial introns identifies liverworts as the earliest land plants. **Nature** 394: 671-674.
- QIU, Y.-L.; LI, L.; WANG, B. et al. 2006. The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, U.S.A., 103: 15511–16.
- RENZAGLIA, K.S. 1982. *apud* CRANDALL-STOTLER; STOTLER, R.E. & LONG, D.G. 2009. Morphology and classification of the Marchantiophyta, p. 1-54. In: SHAW, A.J. & GOFFINET, B. (Eds.). **Bryophyte Biology**. Second Edition. Cambridge: Cambridge University Press. 565Pp.
- RENZAGLIA, K.S.; BROWN, R.C.; LEMMON, B.E.; DUCKETT, J.G. & LIGRONE, R. 1994. Occurrence and phylogenetic significance of monoplastidic meiosis in liverworts. **Canadian Journal of Botany** 72: 65-72.
- _____; MC F ARLAND, K.D. & SMITH, D.K. 1997. Anatomy and ultrastructure of the sporophyte of *Takakia ceratophylla* (Bryophyta). **American Journal of Botany** 84(10): 1337-1350.

- RENZAGLIA, K.S.; DUFF, R.J.; NICKRENT, D.L. & GARBARY, D.J. 2000. Vegetative and reproductive innovations of early land plants: implications for a unified phylogeny. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London** 355: 769-793.
- ROLAND, J.C. & VIAN, B. 1991. General preparation and staining of thin sections, p.1-66. *In*: J.L Hall & C. Hawes (Eds.). **Electron microscopy of plant cells**. London, Academic Press.
- SASS, J.E. 1940. **Elements of Botanical Microtechnique**. New York, McGraw-Hill Book Company, INC. 221 Pp.
- SCHIFFNER, V. 1911. Zur Morphologie von *Noteroclada*. **Oesterreiche Botanische Zeitschrift** 61: 325-332.
- SCHUETTE,S; WOOD, A.J; GEISLER, M; GEISLER-LEE, J; LIGRONE, R & RENZAGLIA, K.S. 2009. Novel localization of callose in the spores of *Physcomitrella patens* and phylogenomics of the callose synthase gene family. **Annals of Botany** 103:749–756.
- SCHUSTER, R.M. 1984. Comparative anatomy and morphology of the Hepaticae, p. 760-891. *In*: SCHUSTER, R.M. (Ed.). **New Manual of Bryology**, vol. 2, Nichinan: Hattori Botanical Laboratory.
- SHAHID, M.; SHAHZAD, A.; TRIPATHI, T.; SOBIA, F. SAHAI,A.; SINGH, A.; MALIK, A.; SHUJATULLAH, F. & KHAN, H.M. 2009. Recent Trends in Plant-Derived Antifungal Agents. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry** 8: 36-49.
- SHAW, J. & RENZAGLIA, K.S. 2004. Phylogeny and diversification of bryophytes. **American Journal of Botany** 91(10): 1557-1581.
- SHIMAMURA, M.; FURUKI, T. & DEGUCHI, H. 2005. Sporophyte Anatomy of *Cavicularia densa* (Blasiaceae). **The Bryologist** 108(3): 420- 426
- SMITH, G.M. 1955. **Botânica Criptogâmica**. II Volume: Briófitos e Pteridófitos. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian. 386p.

- SOUTHWORTH, D. 1973. Cytochemical reactivity of pollen walls. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry** 21: 73-80.
- STEINKAMP, M.P & DOYLE, W.T. 1979. Spore wall ultrastructure in four species of the liverwort *Riccia*. **American Journal of Botany** 66(5): 546- 556.
- _____; _____ 1981. Spore wall ultrastructure in the liverwort *Athalamia hyaline*. **American Journal of Botany** 68(3): 395-401.
- STOCKERT, J.C.; CANETTE, M. & COLMAN, O.D. 1984. Histochemical mechanism for the orthochromatic staining and fluorescence action of lignified tissues. **Cellular and Molecular Biology** 30(6): 503–508.
- STOTLER, R.E. & CRANDALL-STOTLER, B.J. 2008. Correct author citations for some upper rank names of liverworts (Marchantiophyta). **Taxon** 57: 289-292.
- SUIRE, C. 2000. A comparative transmission electron microscopic study on the formation of oil-bodies in liverworts. **Journal of the Hattori Botanical Laboratory** 89:209–32.
- SZTEIN, A.E. 1995. Auxin metabolism in representative land plants. **American Journal of Botany** 82: 1514-1521.
- THOMAS, R.T. & DOYLE, W.T. 1976. Changes in the carbohydrate constituents of elongating *Lophocolea heterophylla* setae (Hepaticae). **American Journal of Botany** 63: 1054-1059.
- TRUERNIT, E.; BAUBY, H.; DUBREUCQ, B.; GRANDJEAN, O.; RUNIONS, J.; BARTHKLKMY, J & PALAUQUI, J. 2008. High-Resolution Whole-Mount Imaging of Three-Dimensional Tissue Organization and Gene Expression Enables the Study of Phloem Development and Structure in *Arabidopsis*. **The Plant cell** 20 (6): 1494-1503.
- VALENTE, E.B. & PÔRTO, K.C. 2006. Novas ocorrências de hepáticas (Marchantiophyta) para o Estado da Bahia, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 20(1): 195-201.

VERMERRIS, W. & NICHOLSON, W. 2008. **Phenolic compounds biochemistry**. Gainesville, Springer Verlag. 267 Pp.

WATSON, V. & RICHARDS, P. 1968. **British Mosses and Liverworts**. 2^o ed. New York, Cambridge University Press 495Pp..

WILLIS, A.J. 1957. Spore formation in *Pellia epiphylla*. **Nature** 179 (4555): 380-381.

YANO, O. 2008. Catálogo de antóceros e hepáticas brasileiros: literatura original, basiônimo, localidade-tipo e distribuição geográfica. **Boletim do Instituto de Botânica** (São Paulo) 19: 1-110.

ZHANG, L.; CRANDALL-STOTLER, B.J & STOTLER, R.E. 2005. The occurrence of tubers in *Noteroclada confluens* Taylor ex Hook. & Wilson. Resumo. **XVII International Botanical Congress**. Vienna, Austria: Austria Center Vienna, 17–23 July 2005. Abstracts: 328–329.

ANEXO I- TABELAS

Tabela 1. Testes histoquímicos realizados em estruturas do gametófito de *Noteroclada confluens*.

Técnica Histoquímica	Microscopia	PCP do Talo	Conteúdo Celular Oleocorpo	Gema	Tuber	Rizoide	Arquegônio	Anterídio				
				PCP**	PCP	PCP	PCP	PCP	Célula androgonial	Célula mãe de andrócito		
PAS	CC*	+	NT**	+	+	NT	+	NT	+	(parede celular e conteúdo interno)	+	(parede celular)
Ácido Sulfúrico	CC	NT	+ marrom alaranjado	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Alcian Blue	CC	+	NT	NT	NT	NT	NT	+	NT	+	(parede celular)	NT
Azul de Toluidina	CC	+ púrpura	-	+ púrpura	+ púrpura	+ púrpura	+ púrpura	+ púrpura	+ Púrpura	+	NT	NT
Azul de Astra	CC	+	NT	+	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	NT
Calcofluor White	UV*	+	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	+	parede
Comassie Blue	CC	NT	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	+	conteúdo interno
Floroglucinol	CC	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Fucsina Básica	CC	-	N	-	NT	NT	-	NT	NT	NT	NT	NT
Sudan Black B	CC	NT	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

* Microscopia CC: microscopia óptica de campo claro; Microscopia UV: microscopia de epifluorescência;

** PCP: parede celular primária; NT: não testado.

Tabela 2. Presença de gametângios em *Notoaclada confluens* nos meses de março a outubro de 2009.

	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro
Número de anterídios por cm ²	17,76	9,54	13,26	16,63	17,02	8,31	13,56
Número de arquegônios por cm ²	3,42	0,76	3,10	4,05	5,91	3,02	6,00
Presença de esporófito	0%	0%	0%	25%	69%	41%	14%
Presença de ramificações	9%	27%	12%	24%	2%	4%	0%

Tabela 3. Testes histoquímicos realizados em estruturas do esporófito de *Noteroclada confluens*.

Técnica Histoquímica	Microscopia	Cápsula		Elatérios			Esporócito		Célula mãe de esporo tetralobada		Protonema Jovem		Seta	Pé
				Imaturo	Maduro		EH**	PCP	EH	PCP	Intina	Exina	PCP	PCP
		PCP**	Espessamento	PCP	PCP	Espessamento								
Acridine Orange	UV*	+-	+ verde	NT**	NT	+	NT	NT	NT	NT	-	+ verde	NT	NT
PAS	CC*	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
Alcian Blue	CC	-	-	-	-	-	-	NT	-	NT	+	-	NT	NT
Azul de Toluidina	CC	+ púrpura	+ azul-esverdeado	+ púrpura	+ púrpura	+ azul-esverdeado	-	+ azul-esverdeado	-	+ púrpura	+ púrpura	+ azul-esverdeado	+ azul	+ púrpura
Auramina O	UV	-	-	NT	NT	-	-	-	-	-	-	+	NT	NT
Azul de Anilina	UV	-	-	NT	NT	NT	-	-	-	-	-	-	NT	NT
Azul de Astra	CC	+	-	+	+	-	-	+	-	+	NT	-	+	+
Calcofluor White	UV	+	-	+	+	-	-	NT	-	+	+	-	+	+
Comassie Blue	CC	-	-	-	-	-	-	NT	-	NT	-	-	NT	NT
Floroglucinol	CC	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-	NT	NT
Fucsina Básica	CC	-	+	NT	-	+	-	NT	-	NT	-	+	NT	NT
Teste de Maule	CC	-	+ marrom	NT	NT	+ marrom	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

* Microscopia CC: microscopia óptica de campo claro; Microscopia UV: microscopia de epifluorescência;

** PCP: parede celular primária; EH: estrato hialino; NT: não testado.

