

**MORFOLOGIA E CITOLOGIA DAS CÉLULAS COMPARTIMENTADAS EM**  
*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. (ARAUCARIACEAE)

Alexandra Antunes Mastroberti



Porto Alegre  
2003



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
Instituto de Biociências  
Departamento de Botânica  
Programa de Pós-Graduação em Botânica

**MORFOLOGIA E CITOLOGIA DAS CÉLULAS COMPARTIMENTADAS EM  
*Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KTZE. (ARAUCARIACEAE)**

**Alexandra Antunes Mastroberti**  
**Orientador: Jorge Ernesto de Araujo Mariath**

Tese apresentada na Universidade Federal do Rio Grande do Sul como um dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências: Botânica.

Porto Alegre  
2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

*Reitora*

Wrana Maria Panizzi

*Vice Reitor*

José Carlos Ferraz Hennemann

*Diretor do Instituto de Biociências*

Jorge Ernesto de Araujo Mariath

*Vice Diretor*

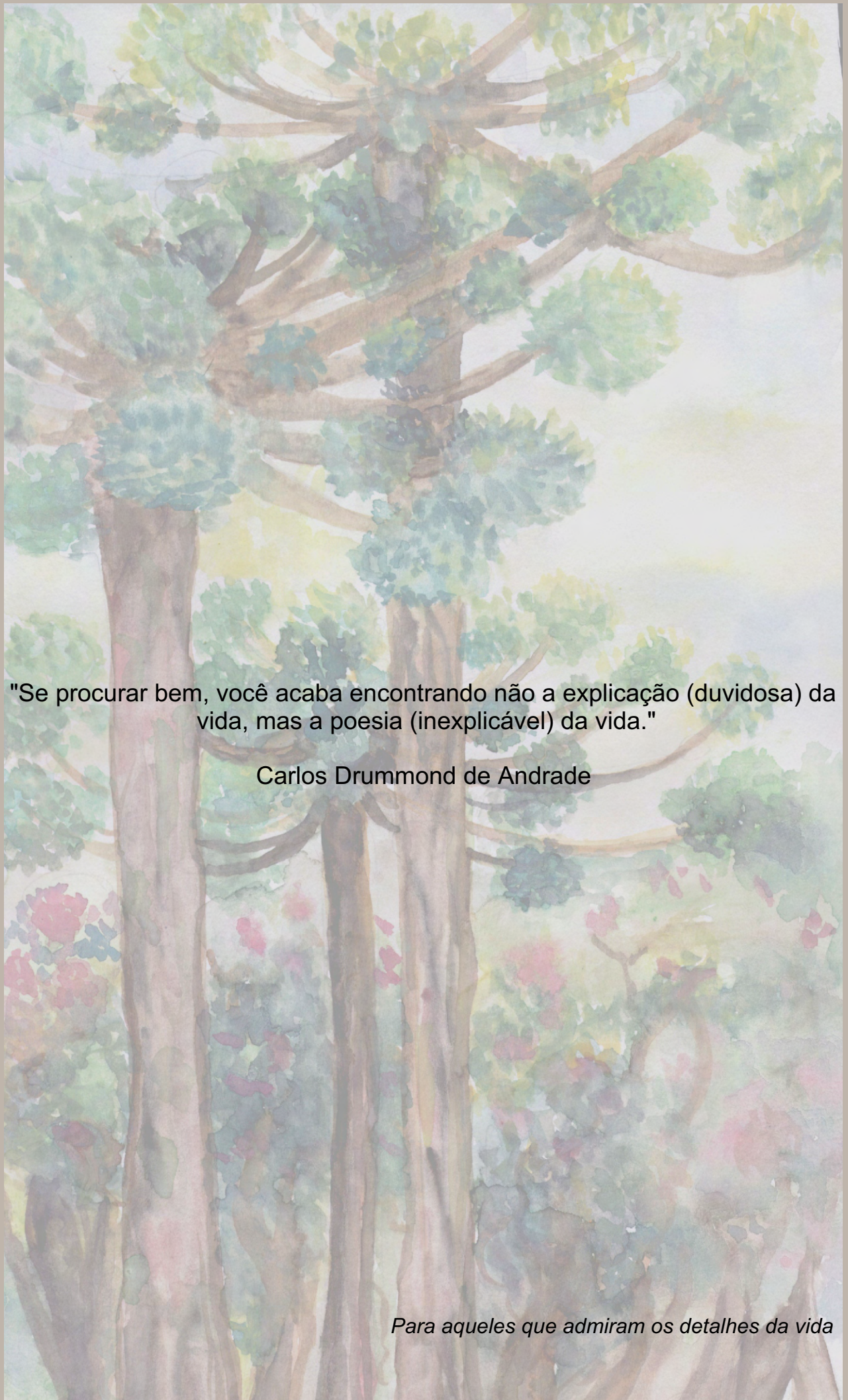
Paulo Luiz de Oliveira

*Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Botânica*

Sílvia Sfoggia Miotto

**Capa**

Pintura em aquarela intitulada *Mata com araucária hipotética*, de Alexandra A. Mastroberti



"Se procurar bem, você acaba encontrando não a explicação (duvidosa) da vida, mas a poesia (inexplicável) da vida."

Carlos Drummond de Andrade

*Para aqueles que admiram os detalhes da vida*

## Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	6
<b>Resumo</b> .....	7
<b>Abstract</b> .....	8
<b>Prefácio</b> .....	9
<b>CAPÍTULO 1- A família Araucariaceae: breve histórico e descrições morfo-anatômicas</b> .....	<b>11</b>
<b>A família Araucariaceae</b> .....	<b>12</b>
O gênero <i>Araucaria</i> .....	14
A espécie <i>Araucaria angustifolia</i> .....	17
<b>Bibliografia citada</b> .....	<b>21</b>
TABELA 1.....	15
FIGURAS.....	25
<b>CAPÍTULO 2- Desenvolvimento das células compartimentadas no mesofilo de <i>Araucaria angustifolia</i> (Araucariaceae)</b> .....	<b>29</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>30</b>
<b>Material e métodos</b> .....	<b>31</b>
Sobre a Floresta Nacional de São Francisco de Paula.....	31
Coleta do material e plantio.....	32
Estádios de desenvolvimento.....	32
Processamento do material para microscopia eletrônica de transmissão.....	33
Processamento do material para microscopia eletrônica de varredura.....	34
Processamento do material para microscopia óptica.....	34
Testes histoquímicos.....	35
Traçador apoplástico fluorescente.....	35
<b>Resultados</b> .....	<b>36</b>
Meristema apical caulinar: breve descrição do desenvolvimento foliar.....	36
Citologia e desenvolvimento das células compartimentadas.....	36
<i>Microscopia óptica</i> .....	36
<i>Testes histoquímicos</i> .....	38
<i>Traçador apoplástico</i> .....	38
<i>Microscopia eletrônica de transmissão</i> .....	39
<i>Microscopia eletrônica de varredura</i> .....	42
<b>Discussão</b> .....	<b>42</b>
Organização do meristema apical caulinar em L1, L2 e L3.....	42
As células compartimentadas são células mucilaginosas.....	43
As células compartimentadas sofrem o processo de morte celular programada.....	48

Implicações da ausência de uma camada de suberina nas células compartimentadas....	50
Uma rota de secreção menos especializada nas células compartimentadas.....	51
Características morfológicas e químicas da mucilagem.....	52
Como atuariam as células compartimentadas?.....	54
Relações evolutivas das células compartimentadas.....	55
<b>Bibliografia citada.....</b>	<b>56</b>
TABELA 1.....	33
TABELA 2.....	38
TABELA 3.....	61
FIGURAS.....	62
 <b>CAPÍTULO 3- Imunocitoquímica das células mucilaginosas em folhas</b>	
<b>imaturas e maduras de <i>Araucaria angustifolia</i> (Araucariaceae).....</b>	<b>82</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>83</b>
<b>Material e métodos.....</b>	<b>85</b>
Coleta dos pinhões, plantio e coleta das folhas.....	85
Processamento do material para imunofluorescência.....	86
Anticorpos monoclonais (Mabs) utilizados.....	86
Incubação das seções para imunofluorescência.....	87
<b>Resultados.....</b>	<b>88</b>
Morfologia das células mucilaginosas de <i>Araucaria angustifolia</i> .....	88
Reconhecimento dos epitopos pécticos entre folhas imaturas e maduras.....	88
<i>Folhas imaturas</i> .....	88
<i>Folhas maduras</i> .....	89
<b>Discussão.....</b>	<b>91</b>
A metil-esterificação dos HGAs é espacialmente regulada na parede celular.....	91
Localização de sais de cálcio ligados às cadeias pécticas.....	94
Galactanos e arabinanos: cadeias laterais dos RGs com diferentes distribuições em uma mesma célula.....	95
Proteínas arabinogalactanos: relacionadas à morte celular programada?.....	97
A secreção das células mucilaginosas possui um gradiente na distribuição dos epitopos pécticos.....	99
<b>Bibliografia citada.....</b>	<b>101</b>
TABELA 1.....	87
TABELA 2.....	105
FIGURAS.....	106
<b>Conclusões.....</b>	<b>111</b>
<b>Anexo 1.....</b>	<b>114</b>
<b>Anexo 2</b>	

## *Agradecimentos*

Ao meu orientador, Mariath, que durante esses seis anos de convívio, sempre contagiou-me com seu otimismo, alegria e amizade. Agradeço por todas as oportunidades (que foram muitas) de aprender e por acreditar em mim. Não tenho palavras para descrever o quanto cresci como pessoa, o que certamente, terão conseqüências muito boas na minha vida profissional. Agradeço por mostrar-me que confiar em si mesmo, torna muitas coisas possíveis.

Aos meus colegas de Laboratório, que não se mostraram só como colegas, mas como grandes amigos. Tenho a certeza que essa amizade tornaram os anos que passei por aqui, muito alegres e produtivos. Agradeço especialmente e com todo o carinho à Maria Cecília (Ceci) e Karen, que foram (e são ainda) minhas amigas “super-poderosas”, essenciais em todos os momentos de minha vida no Laboratório, grandes companheiras de Congressos e de tudo mais...

À Bibiana (Bibi), que também foi e será sempre uma super-amiga, pela paciência, bom senso e sensibilidade. Sempre foi muito essencial para todos nós e para mim em especial, principalmente por responder aquelas questões mais óbvias com ótimo humor.

À Clarice, que sempre estava disposta a ajudar, agradeço pelos ensinamentos bioquímicos, essenciais a minha tese, e que, para minha surpresa, acabei fascinada pelo assunto. Agradeço também pela disponibilidade, interesse e amizade.

Ao CNPq, pela bolsa e ao PPG em Botânica, à Capes e FAPERGS pelo apoio financeiro que possibilitaram, além da execução deste trabalho, a participação em eventos e em cursos.

A todos, que de alguma forma, colaboraram com este trabalho.

### *Agradecimento especial*

Ao meu marido, Leonardo, por estar em minha vida.

## *Resumo*

As células compartimentadas do gênero *Araucaria* Juss. foram primeiramente descritas como células incomuns, caracterizadas pela ocorrência de partições pécticas no lume celular, formando um sistema de compartimentos. Entretanto, várias questões sobre essas células ainda não haviam sido esclarecidas, por isso, o presente trabalho envolveu a observação e descrição dos estádios de desenvolvimento das células compartimentadas nas plantas jovens e adultas da espécie *Araucaria angustifolia*, sob microscopia óptica e eletrônica, além de elucidar as funções e a dinâmica celular desempenhada pelas mesmas.

A diferenciação das células compartimentadas ocorria ainda no ápice caulinar, iniciando quando a célula aumentava de volume (estádio 1). A mucilagem era continuamente secretada, através do Golgi e retículo endoplasmático rugoso, preenchendo o citoplasma e reduzindo o vacúolo (estádio 2). A quantidade citoplasmática se reduzia, praticamente, em torno do núcleo (estádio 3). Finalmente, a célula era totalmente preenchida de mucilagem, constituída por uma rede lamelar, perdendo sua forma poligonal (estádio 4). Núcleo e citoplasma degeneravam. Com base nesses resultados, constatou-se que as células compartimentadas de *Araucaria angustifolia* eram semelhantes às células de mucilagem de algumas famílias de dicotiledôneas. A função de controle hídrico foi comprovada, baseado, principalmente, nos resultados obtidos pelo traçador apoplástico HPTS (hidroxi-ácido pirenetrissulfônico), que demonstrou a rota de translocação e regulação hídrica na folha. A morte celular programada também mostrou-se evidente com a degeneração do vacúolo, condensação e descromatização do núcleo e degeneração geral do sistema de membranas.

A utilização de anticorpos monoclonais para determinados epitopos pécticos, são importantes ferramentas nos estudos da dinâmica da parede celular. Ao longo do desenvolvimento das células compartimentadas (células mucilaginosas), havia um gradiente de distribuição com relação a rápida de-esterificação, ao aumento da concentração de galactanos e ligações de cálcio e diminuição nas concentrações de arabinanos e de proteínas arabinogalactanos (AGPs). Alguns resultados mostraram-se diferentes nas células parenquimáticas, justificando as diferenças na elasticidade da parede celular nas células mucilaginosas de *Araucaria angustifolia*. Observou-se que proteínas arabinogalactanos e pectinas com alto grau de metil-esterificação estavam presentes na mucilagem. A degeneração das AGPs na maturidade das células mucilaginosas, tanto na parede celular, como na mucilagem, poderia estar envolvida no processo de morte celular programada.



## ***Abstract***

The compartmented cells of the genus *Araucaria* Juss. were initially described as unusual cells, characterized by the occurrence of pectic partitions in the cell lumen, forming a system of compartments. However, several questions on those cells had not yet been given an answer. Therefore, this work has involved the observation and description of the development stages of compartmented cells in young and adult plants of the *Araucaria angustifolia* species, under light and electron microscopy, besides elucidating the functions and the cellular dynamics carried out by them.

The differentiation of compartmented cells occurs from the shoot apex, beginning when the cell increases in volume (stage 1). The mucilage was continuously secreted, through the Golgi complex and the rough endoplasmic reticulum (RER), filling the cytoplasm and reducing the vacuole (stage 2). The amount of cytoplasm was reduced, practically, around the nucleus (stage 3). Finally, the cell was completely filled with mucilage, constituted by a lamellar net, losing its polygonal outline (stage 4). Nucleus and cytoplasm degenerated. Based on those results, it was verified that the compartmented cells of *Araucaria angustifolia* were similar to the mucilage cells of some dicotyledoneous families. The function of water control has been proved mostly based on the results obtained by the apoplasmic tracer hydroxy pyrenetrisulfonic acid tri-sodium salt (HPTS), which demonstrated the pathway of translocation and water regulation in the leaf. The programmed cell death also became evident with the degradation of the vacuole, condensation and dechromatinization of the nucleus and general degradation of the membrane system.

The use of monoclonal antibodies for certain pectic epitopes is an important tool in the studies of the dynamics of the cell wall. Along the development of compartmented cells (mucilaginous cells), there was a distribution gradient with regards to the fast de-esterification, to the increase in the concentration of galactans and calcium bondings and the reduction in the concentrations of arabinans and arabinogalactan proteins. Some results have been different for parenchyma cells, justifying the differences in the elasticity of the cell wall in the mucilaginous cells of *Araucaria angustifolia*. It was observed that arabinogalactan proteins (AGPs) and pectins with high degree of methyl-esterification were present in the mucilage. The degradation of AGPs in the maturity of mucilaginous cells, both in the cell wall and in the mucilage, could be involved in the programmed cell death process.

## ***Prefácio***

Durante o período de realização do curso de Mestrado (1997-1999), foram estudadas plantas jovens de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. submetidas a diferentes níveis de estresse hídrico (seca), com o objetivo de verificar o grau de impacto morfológico das estruturas caulinares e foliares em seus primeiros meses de desenvolvimento, e fornecer subsídios para projetos de cultivo e reflorestamento.

Um dos pontos mais importantes desse estudo, foi a constatação e observação de estruturas ainda pouco analisadas, existentes no mesofilo e caule, denominadas de “células compartimentadas”. Essas células foram observadas apenas nos gêneros *Araucaria* Juss e *Wollemia* Jones, Hill & Allen, estando ausentes no gênero *Agathis* Salisb.

Mastroberti e Mariath (2003a) descreveram, detalhadamente, a anatomia foliar de *Araucaria angustifolia* reunindo dados do mestrado acrescidos de resultados dos testes histoquímicos propostos neste doutorado. Esse trabalho intitula-se “Leaf anatomy of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae)”, enviado para a Revista Brasileira de Botânica.

O estudo morfológico das células compartimentadas em *Araucaria angustifolia* também teve seu início no mestrado, quando utilizou-se a técnica de resina de hidroxietilmetacrilato em microscopia óptica, para a descrição dessas células do mesofilo. Esse estudo, mais os resultados preliminares da ultraestrutura obtidos no doutorado, possibilitou a conclusão de outro artigo intitulado “Compartmented cells in the mesophyll of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae)”, enviado para o periódico Australian Journal of Botany (Mastroberti e Mariath 2003b). Ambos os trabalhos estão anexados ao final desta tese (anexo 1 e 2).

Entretanto, várias questões sobre as células compartimentadas ainda não haviam sido esclarecidas, principalmente com relação a dinâmica de seu desenvolvimento, suas funções, sua atividade de secreção e sobre o processo da morte celular programada. Por esses motivos, tal projeto de Doutorado se propôs responder a essas questões, resultando em três capítulos, os quais reúnem, além dos dados obtidos para a tese de doutorado, uma revisão bibliográfica sobre a família Araucariaceae. As figuras que ilustram os diferentes temas, foram acrescentadas ao final dos capítulos.

No Capítulo 1, é descrita a história evolutiva desta família, discutindo-se as relações filogenéticas entre os três gêneros atuais (*Araucaria*, *Agathis* e *Wollemia*),

baseando-se nos trabalhos moleculares e morfológicos existentes na literatura. É dado o enfoque para o gênero *Araucaria*, juntamente com *Araucaria angustifolia*, a qual foi o objeto de estudo para a realização deste trabalho. Também deu-se maior atenção, às descrições morfo-anatômicas, visto o tema aqui proposto.

No Capítulo 2, são discutidos os aspectos de desenvolvimento em nível óptico e ultraestrutural das células compartimentadas. Descreveu-se os estádios, estabeleceu-se comparações com um tipo de células de mucilagem e discutiu-se o modelo de apoptose ou morte celular programada sofrido pelas células compartimentadas.

O Capítulo 3 demonstra que a utilização de anticorpos monoclonais, através de testes imunocitoquímicos, permitiram discutir a dinâmica das células compartimentadas ao longo de seu desenvolvimento. Com esta técnica, foram observadas as variações entre os diferentes epitopos pécticos nas fases juvenis e maduras das células compartimentadas, com relação a parede celular e a secreção de mucilagem.

Desse modo, espera-se que este trabalho contribua com novas perspectivas para os estudos morfo-anatômicos em plantas, inclusive, para uma maior compreensão dos processos de desenvolvimento e dinâmica celular, através da utilização da imunocitoquímica e traçadores, mostrando-se essenciais no âmbito da anatomia funcional.

Os objetivos desse trabalho foram:

1. Observar as etapas de desenvolvimento das células compartimentadas nas plantas jovens e adultas da espécie *Araucaria angustifolia*;
2. Descrever os aspectos morfológicos e citológicos dessas células durante as fases de desenvolvimento sob microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão e varredura;
3. Verificar a função e a dinâmica celular desempenhada pelas mesmas, com base, principalmente, em testes imunocitoquímicos.

A watercolor illustration of a forest scene. In the foreground, several tall, slender tree trunks with textured bark rise vertically. The background is filled with a dense canopy of green foliage and clusters of small, vibrant pink flowers. The overall style is soft and painterly, with visible brushstrokes and a gentle color palette.

## ***CAPÍTULO 1***

A família Araucariaceae: breve histórico e descrições morfo-anatômicas

## *A família Araucariaceae*

Dentro do sistema taxonômico tradicional, a família Araucariaceae Henkel & Hochst., pertence à Divisão Gymnospermae, ordem Coniferales. Na classificação de Cronquist, Takhtajan & Zimmerman ex Reveal (1996), o nome da divisão foi alterado para Pinophyta, ordem Pinales. Entretanto, na classificação biológica atual, essa família está incluída no filo Coniferophyta, ordem Coniferales, em que o termo “gimnospermas” tem sido utilizado informalmente, fora dos sistemas de classificação.

Até o momento, a família consiste de três gêneros bem definidos: *Araucaria* Jussieu, *Agathis* Salisbury e *Wollemia* Jones, Hill & Allen, reunindo cerca de 40 espécies.

A família Araucariaceae está dentre as coníferas mais antigas da história geológica da Terra. Do ponto de vista biogeográfico atual é uma das mais interessantes famílias, com distribuição restrita ao Hemisfério Sul (Austrália, Nova Zelândia, Nova Guiné, Nova Caledônia e outras ilhas do Pacífico Sul), apesar de sua distribuição ter sido mais ampla durante o Mesozóico\* (**Figura 1**). É sugerida, muitas vezes, uma distribuição relictual, devido ao baixo número de espécies atuais e pela localização disjunta nas massas continentais. Kershaw e Wagstaff (2001) descreveram que essa família se originou no período Triássico, expandindo-se em ambos os hemisférios no Jurássico e início do Cretáceo, despontando como um componente importante na vegetação do Gondwana, até o fim do Cenozóico. O desenvolvimento das angiospermas no Cretáceo Médio, provavelmente, provocou a extinção de alguns componentes relacionados à araucária, havendo, também, a evolução de alguns gêneros novos. A diversidade registrada no início do Cenozóico da Austrália era tão alta quanto foi no Cretáceo Inferior. A separação continental associada a um clima mais seco e frio reduziu o aumento progressivo da variabilidade das coníferas. Entretanto, a atividade tectônica e vulcânica, parcialmente associada com a colisão da Austrália com o sudeste da Ásia, induziu, para alguns componentes relacionados à araucária, novas oportunidades nas ilhas da Ásia-Pacífico.

De acordo com Stockey (1994), a família Araucariaceae tem uma distribuição muito restrita nos dias de hoje. O gênero *Araucaria* é representado por bom material fóssil em ambos os hemisférios como aqueles encontrados no início do Jurássico, enquanto *Agathis* é somente conhecido os fósseis do Hemisfério Sul no início do Cretáceo.

---

\* Consultar a escala geológica do tempo para todas as eras e períodos citados (figura 1).

Numa descrição morfológica geral, os membros dessa família são de porte arbóreo e perenes, as folhas frequentemente são arrançadas em helicóide, sendo aciculares ou escamiformes, com venação paralela. São dióicas ou monóicas, cujos microsporófilos se reúnem formando um cone ou estróbilo, com cerca de 12 sacos polínicos e grãos-de-pólen não-alados. Os megasporófilos também formam estróbilos subglobosos a ovóides, maturando em dois anos, e caindo após esta fase. As sementes são cobertas por brácteas ou escamas, aladas ou não, cujo embrião pode conter de 2 a 4 cotilédones (Silba 1986). Segundo Jones *et al.* (1995), os gêneros *Araucaria* e *Agathis* possuem características foliares distintas, assim como os elementos que constituem os cones (escamas bracteais, escama ovulífera e semente). *Wollemia* demonstra características intermediárias entre *Araucaria* e *Agathis*. As axilas foliares de muitas coníferas são desprovidas de tecido formador de gemas ou brotos, ao contrário de várias espécies dos três gêneros de Araucariaceae, as quais possuem um tecido meristemático nas axilas foliares, permitindo a formação de gemas quando o ápice caulinar é removido (Burrows 1987, 1999).

As relações infragenéricas da família Araucariaceae foram recentemente elucidadas pelas análises genéticas (*rbcL*), além de dados morfológicos já descritos (Setoguchi *et al.* 1998, Burrows e Bullock 1999). Na realidade, poucos caracteres morfológicos são válidos para separar-se *Araucaria* de *Agathis* e *Wollemia*, sendo um deles, a anatomia foliar (Burrows e Bullock 1999). Aparentemente, o mais definitivo desses caracteres é a presença ou ausência das células compartimentadas (ausente em *Agathis*), seguido pela distribuição da hipoderme (uma camada contínua em *Araucaria* e *Wollemia*) e se os estômatos estão presentes em ambas as faces foliares (a maioria das espécies de *Agathis* possui estômatos apenas na face abaxial, mas nas espécies de *Araucaria* e *Wollemia*, os estômatos estão presentes em ambas as faces). Entretanto, além da anatomia foliar, o número de cotilédones aparentemente é uma característica importante. Enquanto que em *Araucaria*, esse número pode ser de 2 a 4, em *Agathis* e *Wollemia* há ocorrência de apenas 2 cotilédones (Jones *et al.* 1995, Burrows e Bullock 1999), demonstrando um caráter plesiomórfico de *Araucaria*, segundo Setoguchi *et al.* (1998). Com relação à posição dos microsporófilos nestes três gêneros, observa-se que em *Araucaria*, podem ser terminais ou axiais, em *Agathis* são axiais e em *Wollemia* são terminais. A tendência evolutiva desse caráter é incerta, pois essas mudanças ocorreram mais de uma vez na família ao longo do tempo. Em algumas características morfológicas, *Wollemia* tem maior similaridade com *Araucaria* do que *Agathis* (Burrows e Bullock 1999). Entretanto, dois estudos moleculares demonstraram que *Wollemia* tem uma relação mais próxima à *Agathis* do que *Araucaria* (Gilmore e Hill 1997, Stefanovic *et al.* 1998), ao mesmo tempo em que

Setoguchi *et al.* (1998) e Kurshaw e Wagstaff (2001) descreveram que *Wollemia* derivou primeiro e, posteriormente, surgiram *Agathis* e *Araucaria*. Todos os resultados dessas análises demonstraram que os três gêneros são monofiléticos (**Figura 2**).

### ***O gênero Araucaria***

O gênero *Araucaria* é encontrado inteiramente no Hemisfério Sul, atualmente caracterizado por uma distribuição geográfica muito restrita (Page 1990). Espécies desse gênero encontram-se distribuídas descontinuadamente em Nova Guiné, Nova Caledônia, Queensland (Austrália), Ilha de Norfolk e sul da América do Sul (sul do Brasil, Argentina, Paraguai e Andes austrais no sul do Chile), compreendendo os paralelos 0° e 45°S na Oceania e entre 20°S e 40°S na América do Sul (Backes 1999, **Figura 3**).

O ápice da distribuição geográfica do gênero *Araucaria* ocorreu no período Jurássico, abrangendo adicionalmente o Hemisfério Norte (sul da Ásia e Inglaterra) e Índia (Stewart 1983). Na América do Sul, formas relacionadas ao gênero ocorreram no sul da Patagônia, Argentina, quando existiram imensas florestas sob um clima temperado quente. Essa região situava-se em uma paleolatidade de 60° S, evidenciando climas mais quentes em altas latitudes.

Muitas localidades do gênero no período Cretáceo se encontravam na Europa, África e América do Norte (Stewart 1983). Ainda há dúvidas sobre como essas formas chegaram ao sul da Patagônia Argentina durante o Jurássico, mas, provavelmente, os continentes do Hemisfério Norte seriam uma ponte para a dispersão dessas espécies antes da deriva continental (Setoguchi *et al.* 1998). Conforme Taylor e Taylor (1993) e Kershaw e Wagstaff (2001), é possível que o declínio da população araucariana tenha se iniciado com o aparecimento das angiospermas no Cretáceo. No Terciário, os representantes do gênero *Araucaria* já se encontravam confinados no Hemisfério Sul (Stewart 1983).

As espécies do gênero *Araucaria* estão localizadas, em sua maioria, em áreas descontínuas, geralmente distantes umas das outras no hemisfério austral (Hill 1994). Essa distribuição resultou como resposta aos diferentes locais, às mudanças meteorológicas diárias e sazonais e aos processos reprodutivos. O seu desaparecimento na maior parte de áreas primitivas e a distribuição agregada atual constitui uma das questões da paleofitogeografia até hoje não suficientemente esclarecida. A distribuição atual de *Araucaria* poderia ser considerada como um relicto.

Atualmente, são conhecidas 19 espécies do gênero *Araucaria* (*sensu* De Laubenfels 1988), divididas em quatro seções, seguindo a proposta de Wilde e Eames (1952): *Araucaria* (*Columbea*) (2 spp.), *Bunya* (1 spp.), *Intermedia* (1 spp.) e *Eutacta* (15 spp., sendo que 13 são endêmicas da Nova Caledônia). As espécies estão identificadas na **Tabela 1**:

**Tabela 1. Espécies do gênero *Araucaria* e suas respectivas seções (De Laubenfels 1988)**

Seções	Espécies	Distribuição geográfica
<i>Araucaria</i>	<i>A. angustifolia</i> (Bert.) O Ktze.	Brasil, Argentina, Paraguai
	<i>A. araucana</i> (Mol.) K. Koch	Andes austrais (sul do Chile), Província Argentina de Neuquén.
<i>Bunya</i>	<i>A. bidwillii</i> Hook.	Queensland (Austrália)
<i>Intermedia</i>	<i>A. hunsteinii</i> K. Schum.	Nova Guiné
<i>Eutacta</i>	<i>A. heterophylla</i> (Salisb.) Franco	Ilha Norfolk
	<i>A. cunninghamii</i> Ait.	Queensland (Austrália)
	<i>A. bernieri</i> Buchholz	Nova Caledônia
	<i>A. biramulata</i> Buchholz	Nova Caledônia
	<i>A. columnaris</i> (Forst.) Hooker	Nova Caledônia
	<i>A. humboldtensis</i> Buchholz	Nova Caledônia
	<i>A. laubenfelsii</i> Corbasson	Nova Caledônia
	<i>A. luxurians</i> (Brongn. et Gris) de Laub.	Nova Caledônia
	<i>A. montana</i> (Brongn. et Gris)	Nova Caledônia
	<i>A. muelleri</i> (Carrière)	Nova Caledônia
	<i>A. nemorosa</i> de Laub.	Nova Caledônia
	<i>A. rulei</i> F. Muell	Nova Caledônia
	<i>A. schmidii</i> de Laubenfels	Nova Caledônia
<i>A. scopulorum</i> de Laub.	Nova Caledônia	
<i>A. subulata</i> Vieillard	Nova Caledônia	

Ohsawa *et al.* (1995) posteriormente descreveram uma seção, *Yezonia*, contendo uma espécie extinta (*A. vulgaris*) que teve sua origem no Cretáceo (no nordeste do Japão). As seções caracterizam-se pelos diferentes padrões morfológicos e anatômicos das folhas; orientação e distribuição dos estômatos; características embriológicas, como posição, número de suprimentos vasculares das brácteas e tipo de deiscência dos estróbilos, número de cotilédones e germinação (Burrows 1987). Stockey e Taylor (1978) e Stockey e Ko (1986) encontraram padrões cuticulares semelhantes entre *Araucaria-Bunya* e *Intermedia-Eutacta*, associando-as evolutivamente. Setoguchi *et al.* (1998), através das análises moleculares, confirmaram a existência dessas quatro seções. Essas mesmas análises indicaram que as



seções *Bunya* e *Eutacta* são os grupos mais antigos, embora haja ainda dúvidas se as formas relacionadas à seção *Eutacta*, encontradas no Mesozóico, com ampla distribuição no Hemisfério Norte, não deveriam ser associadas à seção *Yezonia* proposta por Ohsawa *et al.* (1995). Nas outras duas seções, a distribuição, seja de espécies extintas ou atuais, sempre se restringiu ao Hemisfério Sul (Setoguchi *et al.* 1998).

Conforme Rambo (1951) e Reitz e Klein (1966), este gênero pertence ao elemento florístico Austral-antártico. Entretanto, Morat *et al.* (1986) sugeriram que, devido à maioria das espécies de *Araucaria* estar situada inclusive na faixa dos trópicos da Oceania e existirem apenas duas espécies neotropicais (*Araucaria angustifolia* e *Araucaria araucana*), seria mais adequado atribuir para este gênero uma distribuição anfi-pacífica.

Reitz e Klein (1966) e Mattos (1994) descreveram, basicamente, que este gênero se caracteriza por árvores perenes, a maioria dióica, raramente monóica, com distribuição regular dos ramos. As plantas jovens possuem forma cônica, com os ramos até o solo; os indivíduos adultos possuem normalmente uma copa densa na porção superior da árvore e normalmente achatada. As folhas juvenis são acículas, finas, levemente imbricadas, arranjadas em helicóide. As folhas maduras podem ser acículas ou escamas, arranjadas em helicóide ou em duas fileiras muito próximas, quase imbricadas. As folhas possuem grande longevidade. Os estróbilos, de microsporófilos, têm disposição terminal, solitários ou em grupos, onde cada microsporófilo contém cerca de 8 sacos polínicos ou microsporângios. Os estróbilos de megasporófilos são globosos deiscentes na maturidade, amadurecendo em 2 ou 3 anos, constituídos por escamas bracteais com pequenos espinhos e com um rudimento seminal por escama. O rudimento seminal e as sementes são unidas com a escama bracteal. As sementes são, comumente, aladas nas bordas, algumas vezes, comestíveis. O principal material de reserva das sementes ou pinhões das espécies da seção *Eutacta* é lipídica; e das demais seções, é amilácea (Tompsett 1984).

Em geral, a morfologia das espécies da seção *Eutacta* possui folhas pequenas (escamiformes), muitas delas apresentando heterofilia (ocorrendo também folhas aciculadas). Podem ser uninérvias (algumas podem ser divididas), com orientação dos estômatos facilmente distinguíveis, distribuídos em duas linhas ou grupos. A posição do microsporófilo é terminal, observando-se a ocorrência de quatro cotilédones no embrião. Para as seções *Araucaria*, *Bunya* e *Intermedia*, as folhas são relativamente maiores e multivenadas (Hill e Bodribo 1999), normalmente aciculadas. A orientação dos estômatos é paralela, com distribuição em linhas. A posição do microsporófilo é axial, observando-se sempre a ocorrência de dois cotilédones no embrião. Haines (1983a, 1983b) observou semelhanças na

formação da semente e embrião entre *Araucaria bidwillii* e *A. angustifolia* (seções *Bunya* e *Araucaria*, respectivamente), separando-as de *A. cunninghamii*, *A. heterophylla* (seção *Eutacta*) e *A. hunsteinii* (seção *Intermedia*). O autor também confirmou a existência das quatro seções propostas por Wilde e Eames (1952), mas sugere maiores evidências para a aproximação das seções *Bunya–Araucaria* e *Intermedia–Eutacta*, conforme a proposta de Stockey e Taylor (1978).

Os conhecimentos da estrutura morfológica e anatômica dos tipos de folhas do gênero *Araucaria* podem ser encontrados em uma série de trabalhos, os quais descrevem várias espécies (Seward e Ford 1906, Barsali 1909, Thomson 1914, Florin 1931, Griffith 1950, Napp-Zinn 1966, Vasiliyeva 1969, Hu e Yao 1981) ou em trabalhos gerais incluindo aspectos de toda a planta (Chamberlain 1935).

### ***A espécie Araucaria angustifolia***

*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze., é conhecida popularmente como o pinheiro brasileiro ou pinheiro do Paraná. Nativa do Brasil, Argentina e Paraguai, ocorre em grande parte no sul do Brasil (**Figura 4**), nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Concentrações menores são encontradas nos estados de São Paulo (serra de Paranapiacaba, Campos do Jordão), Rio de Janeiro, Minas Gerais (serra da Mantiqueira) e Espírito Santo (Pico da Bandeira). Backes (1988, 1999) observou uma relação inversa entre o gradiente de latitude e o de altitude, onde a mata com araucária expande-se do sul em direção à região tropical, até a latitude de 20°S, ocupando sempre a parte superior do Planalto Meridional e os pontos mais altos da serra de Paranapanema, da Mantiqueira, dos Órgãos e do Caparaó, em altitudes que variam de 200m no extremo sul (31°S), até mais de 1500m, acima do nível do mar, na serra da Mantiqueira (22°S). Na Argentina e Paraguai, encontra-se essa espécie em altitudes de 500-2300 m (Silba 1986).

*Araucaria angustifolia* é a única representante dessa família nativa do Brasil, e como foi descrito anteriormente, essa espécie, assim como outros representantes do gênero, possui características peculiares e exclusivas quanto à anatomia e comportamento frente às variações ambientais e, por isso, tem despertado o interesse de muitos pesquisadores de várias entidades brasileiras.

Segundo Klein (1960), o pinheiro brasileiro é nitidamente heliófito e está entre os pioneiros na sucessão mata-campo. Entretanto, Duarte *et al.* (2002) avaliaram a intensidade de luz sobre o desenvolvimento de *Araucaria angustifolia* em três tipos de cobertura vegetal, e

concluíram que a tolerância ao sombreamento indica que essa espécie não é estritamente heliófita ou pioneira.

O bioma da floresta com Araucária ou floresta Ombrófila Mista, distribuía-se, originalmente, numa superfície de cerca de 200.000 km<sup>2</sup>, ocupando aproximadamente 73.780 km<sup>2</sup> no Paraná (40% da superfície), 56.693 km<sup>2</sup> em Santa Catarina (31%), 46.483 km<sup>2</sup> no Rio Grande do Sul (25%) e 5.340 km<sup>2</sup> em São Paulo (3%) (Hueck 1972). Apesar de mostrar uma distribuição relictual, associa-se à grande diminuição dessa espécie, o longo processo histórico de ocupação do Sul do Brasil, iniciado a partir de 1895, assistindo-se a uma rápida eliminação de sua cobertura florestal, tanto para fins de extração de madeira, como para dar espaço a atividades agropecuárias. Em 1980, Machado e Siqueira constataram que a distribuição de *Araucaria angustifolia* foi reduzida para 3.166 km<sup>2</sup> de floresta no Paraná, 1.800 km<sup>2</sup> em Santa Catarina e 657 km<sup>2</sup> no Rio Grande do Sul. Segundo o Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal (IBDF) de 1984, estes dados mantiveram-se. Embora não existam dados oficiais mais recentes, acredita-se que, na última década, a situação deve ter se agravado ainda mais.

O padrão de distribuição atual da espécie é dito como relictual, mantendo-se em locais onde as condições gerais de clima são menos favoráveis para o desenvolvimento de formações tropicais.

De um modo bastante amplo, *Araucaria angustifolia* encontra-se numa vastíssima área de clima temperado chuvoso. Segundo a classificação climática de Koeppen, podem ser incluídos os três estados sulinos dentro do tipo Cf, ou seja, clima temperado chuvoso, sem estação seca. No estado do Rio Grande do Sul, a região de ocorrência do pinheiro brasileiro compreende aquela de clima Cfb (clima temperado chuvoso, sem estação seca, verão ameno), e também aquela de clima Cfa, ou seja, clima temperado chuvoso, sem estação seca e verão quente (Mattos 1994).

*Araucaria angustifolia* está entre as espécies de maior valor econômico, pelo valor nutritivo de suas sementes (ricas em amido, proteínas e gorduras), pelos variados usos industriais e pela madeira que reúne maior variedade de aplicações. Já foi utilizada para forros, soalhos, vigas e utensílios domésticos (Lorenzi 1998).

Segundo Reitz e Klein (1966) a espécie *Araucaria angustifolia* é uma “árvore alta com 20 a 50 m de altitude, 1 a 2 m ou mais de diâmetro, tronco em geral cilíndrico, reto, raras vezes ramificado em dois ou mais; casca grossa (até 15 cm), resinosa, cuja superfície externa se desprende em placas, cinzento escura. Árvores adultas com ramos dispostos em 8 a 15 verticilos cujo afastamento se reduz gradualmente até o ápice, restando em árvores velhas

somente uma umbela terminal. Árvores novas com copa cônica. Ramos primários cilíndricos, curvos por cima, maiores os inferiores e menores os superiores. Ramos secundários (grimpas) alternas, agrupadas no ápice dos ramos primários. As folhas têm de 3 a 6 cm de comprimento, 4 a 10 mm de largura, simples, pouco decurrentes, soltamente imbricadas, coriáceas, sésseis, lanceoladas, agudíssimo-pungentes, verde-escuras. Plantas dióicas, raramente monóica, por traumas ou doenças, com flores micro ou megasporangiadas (flores unissexuadas)\*\*. Os estróbilos de microsporófilos (cones ou estróbilos masculinos)\*\* constituem um amento cilíndrico ou "mingote" com 10 a 15 cm de comprimento e 2 a 4 cm de diâmetro. Cada microsporófilo (flor masculina) é constituído de uma escama coriácea, mais ou menos côncava, achatada, pedicelada e com sacos polínicos (anteras)\*\*, presos na face ventral de cada escama. Estes se abrem, longitudinalmente, deixando cair o pólen sobre a escama inferior. As escamas se arranjam nos cones em helicóide e abrem, primeiramente, as da base para deixarem o pólen livre e à disposição do vento, sendo transportado até o estróbilo de megasporófilos (estróbilo feminino)\*\*. Os megasporófilos (flores femininas) constituem um estróbilo ou cone sub-arredondado, no ápice de um pedúnculo, protegido por numerosas folhas muito próximas umas das outras com cerca de 1000 brácteas escamiformes, coriáceas sem asas, com espinho recurvo no ápice, inseridas sobre um eixo central, levemente cônico, com base mais ou menos cilíndrica. As brácteas escamiformes férteis, ou escamas seminíferas, sustentam em sua base, apenas um rudimento seminal (óvulo)\*\*, as quais, após a fecundação, vão envolvendo-o à medida que o pinhão se desenvolve, soldando seus bordos com os da bráctea superior ou escama tectriz. Cada estróbilo contém 10 a 150 sementes ou "pinhões" com 3 a 8 cm de comprimento e 1 a 2 cm de diâmetro. Os pinhões ou sementes são obovado-cuneiformes, lisos, achatados ou não, com um espinho achatado e curvo para a base do estróbilo. A amêndoa branca ou rosado-clara é constituída, principalmente, de matéria amilácea, envolvida pelas brácteas ventral e dorsal, soldadas pelos contornos, com exceção da base, na qual podem ficar parcialmente ligadas. No centro, encontra-se o embrião branco ou rosa-claro, com cotilédones retos ou com a extremidade dobrada, de seção plano-convexa,

---

\*\* Por uma questão conceitual, a utilização de "feminino" ou "masculino" não é considerada adequada para as estruturas da geração esporofítica, portanto, os termos para as estruturas reprodutivas correspondentes ao que Reitz e Klein (1966) descreveram, foram modificados. Os termos do texto original de Reitz e Klein (1966) estão entre parênteses.

constituindo 5/6 do comprimento do embrião. O embrião é cilíndrico, constituído ainda do hipocótilo e da radícula. Na inserção dos cotilédones encontra-se o tecido meristemático que formará o caulículo.”

Várias abordagens envolveram estudos com *Araucaria angustifolia*, como a composição florística de comunidades de altitude (Klein 1960, Hueck 1972, Reitz e Klein 1966, Ferreira e Irgang 1979), aspectos ecofisiológicos, principalmente relacionados à planta jovem (Yamasaki e Dillenburg 1999, Duarte e Dillenburg 2000, 2002) biologia reprodutiva (Shimoya 1958, 1962), embriologia (Burlingame 1913, 1914 e 1915, Hertel 1976, Haines e Prakash 1980) e estudos do desenvolvimento de embriões em cultura *in vitro* (Astarita e Guerra 1998, 2000, Santos *et al.* 2002). Inúmeros trabalhos também foram realizados sobre o desenvolvimento da semente (Hertel 1963, Ferreira 1977, Ferreira e Handro 1979, Ferreira *et al.* 1979, Ferreira 1981, Áquila e Ferreira 1984, Franco 1985, Franco e Ferreira 1987 e Rosado *et al.* 1994) e purificação de lectinas da semente (Datta *et al.* 1991, 1993).

Alguns estudos envolveram aspectos morfo-anatômicos de diferentes órgãos vegetativos de *Araucaria angustifolia* (Seward e Ford 1906, Barsali 1909, Thomson 1914, Monteiro *et al.* 1977). A caracterização do lenho dessa espécie também já foi amplamente estudada por Thomson (1914), Bamber (1979), Seitz e Kanninen (1989), Marchiori (1996) e Wehr e Tomazello Filho (2000). Porém, poucos estudos voltaram-se à anatomia foliar de *Araucaria angustifolia* (Vasiliyeva 1969, Monteiro *et al.* 1977), tanto em plantas jovens como em indivíduos adultos. Devido à carência de dados encontrados na literatura, Mastroberti e Mariath (2003a) detalharam as descrições anatômicas das folhas imaturas e maduras de *Araucaria angustifolia*, tanto em indivíduos jovens, como em adultos (**anexo 1**).

Bamber *et al.* (1978) observaram células incomuns presentes no mesofilo do gênero *Araucaria*, denominadas de células compartimentadas. Essas células foram assim chamadas por causa de partições pécticas que pareciam subdividir o lume celular. Entretanto, Mastroberti e Mariath (2003b, **anexo 2**) demonstraram que, em *Araucaria angustifolia*, as células compartimentadas eram muito semelhantes às células mucilaginosas de cactáceas e lauráceas, atribuindo-as uma função de translocação ou armazenamento de água, conforme Baker e Smith (1910) e Vasiliyeva (1969) já haviam sugerido. Além disso, assim como nas células mucilaginosas, observa-se a perda do protoplasto na senescência das células compartimentadas, sugerindo que elas sofrem o processo de morte celular programada.

Entretanto, várias questões sobre essas células ainda não haviam sido esclarecidas, principalmente com relação à dinâmica de seu desenvolvimento, suas funções, sua atividade de secreção e sobre o processo da morte celular programada.

## ***Bibliografia citada***

- ÁQUILA MEA, FERREIRA AG (1984) Germinação de sementes escarificadas de *Araucaria angustifolia* em solo. **Ciência e Cultura** **36**, 1583-1590.
- ASTARITA LV, GUERRA MP (1998) Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia*- induction and maintenance of embryonal-suspensor mass cultures. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** **10**, 113-118.
- ASTARITA LV, GUERRA MP (2000) Conditioning of the culture medium by suspension cells and formation of somatic proembryo in *Araucaria angustifolia* (Coniferae). **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant** **36**, 194-200.
- BACKES A (1988) Condicionamento climático e distribuição geográfica de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. no Brasil. **Pesquisas Botânica** **0**, 5-40.
- BACKES A (1999) Condicionamento climático e distribuição geográfica de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. no Brasil-II. **Pesquisas Botânica** **49**, 5-40.
- BAMBER RK (1979) Longitudinal parenchyma and resin plugs in Araucariaceae wood. **IAWA Bulletin** **4**, 75-77.
- BAMBER RK, SUMMERVILLE R, GREGORY J (1978) Unusual cells in the mesophyll zone of leaves of *Araucaria*. **Australian Journal of Botany** **26**, 177-187.
- BARSALI E (1909) Studio sul gen. *Araucaria* Juss. **Atti Sociedad Toscana Science** **25**, 145-184.
- BURLINGAME LL (1913) The morphology of *Araucaria brasiliensis*. I. The staminate cone and male gametophyte. **Botanical Gazette** **55**, 97-114.
- BURLINGAME LL (1914) The morphology of *Araucaria brasiliensis*. II. The ovulate cone and female gametophyte. **Botanical Gazette** **57**, 490-507.
- BURLINGAME LL (1915) The morphology of *Araucaria brasiliensis*. III. Fertilization, the embryo and the seed. **Botanical Gazette** **59**, 1-69.
- BURROWS GE (1999) The Wollemi pine (*Wollemia nobilis*, Araucariaceae) possesses the same unusual leaf axil anatomy the other investigated members of the family. **Australian Journal of Botany** **47**, 61-68.
- BURROWS GE, BULLOCK S (1999) Leaf anatomy of Wollemi pine (*Wollemia nobilis*, Araucariaceae). **Australian Journal of Botany** **47**, 795-806.
- BURROWS GE (1987) Leaf axil anatomy in the Araucariaceae. **Australian Journal of Botany** **35**, 631-640.
- CHAMBERLAIN CJ (1935) **Gymnosperms. Structure and evolution**. (Dover Publications Inc: New York)
- DATTA PK FIGUEROA MODCR, LAJOLO FM (1991) Purification and characterization of two major lectins from *Araucaria brasiliensis* syn. *Araucaria angustifolia* seeds (pinhão). **Plant Physiology** **97**, 856-862.
- DATTA PK FIGUEROA MODCR, LAJOLO FM (1993) Chemical modification and sugar binding properties of two major lectins from pinhão (*Araucaria brasiliensis*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **41**, 1851-1855.
- DE LAUBENFELS DJ (1988) Araucariaceae. **Flora Malesiana Series** **10**, 419-442.
- DUARTE LS, DILLENBURG LR (2000) Ecophysiological responses of *Araucaria angustifolia* seedlings to different irradiance levels. **Australian Journal of Botany** **48**, 531-537.
- DUARTE LS, DILLENBURG LR, ROSA LMG (2002) Assessing the role of light availability in the regeneration of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Australian Journal of Botany** **50**, 741-751.

- FERREIRA AG (1977) *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Germinação da semente e desenvolvimento da plântula**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil.
- FERREIRA AG (1981) Aspectos estructurales de las semillas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Iheringia** **26**, 3-7.
- FERREIRA AG, DIETRICH SMC, HANDRO W (1979) Changes in the metabolism of *Araucaria angustifolia* during the early phases of germination and growth. **Revista Brasileira de Botânica** **2**, 76-81.
- FERREIRA AG, HANDRO W (1979) Aspects of seed germination in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Revista Brasileira de Botânica** **2**, 7-13.
- FERREIRA AG, IRGANG BE (1979) Regeneração natural de *Araucaria* nos Aparados da Serra. In: **Anais do XXIII Congresso Nacional de Botânica**. (Campo Grande: Brasil)
- FLORIN R (1931) Untersuchungen zur stammesgeschichte der Coniferales und Cordaitales. **Kungliga Svenska vetenskapsakademiens Handlingar** **10**, 1-588.
- FRANCO ETH (1985) **Crescimento e desenvolvimento juvenil de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze**. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.
- FRANCO ETH, FERREIRA AG (1987) Germination and early development of *Araucaria angustifolia*. **Acta Botanica Brasilica** **2**, 32-46.
- GILMORE S, HILL KD (1997) Relationships of the Wollemi Pine (*Wollemia nobilis*) and a molecular phylogeny of the Araucariaceae. **Telopea** **7**, 275-291.
- GRIFFITH MM (1950) **A study of the shoot apex and leaf histogenesis in certain species of *Araucaria***. Ph.D. Thesis, University of California, Berkeley.
- HAINES RJ (1983a) Embryo development and anatomy in *Araucaria* Juss. **Australian Journal of Botany** **31**, 125-140.
- HAINES RJ (1983b) Development of the seed in *Araucaria* Juss. **Australian Journal of Botany** **31**, 255-267.
- HAINES RJ, PRAKASH N (1980) Proembryo development and suspensor elongation in *Araucaria* Juss. **Australian Journal of Botany** **28**, 511-522.
- HERTEL RJG (1963) Descrição morfológica do fruto; a germinação. **Boletim do Instituto de Defesa do Patrimônio Natural** **4**, 1-25.
- HERTEL RJG (1976) Estudos sobre *Araucaria angustifolia* II. A constituição do estróbilo. **Acta Biológica Paranaense** **5**, 3-25.
- HILL RS (1994) **History of the Australian vegetation. Cretaceous to recent**. (Cambridge University Press: Australia)
- HILL RS, BRODRIBB (1999) Southern conifers in time and space. **Australian Journal of Botany** **43**, 217-280.
- HU Y-S, YAO B-J (1981) Transfusion tissue in gymnosperms leaves. **Botanical Journal of Linnean Society** **83**, 263-272.
- HUECK K (1972) As florestas da América do Sul. (Ed. Polígono: São Paulo).
- IBDF-INSTITUTO BRASILEIRO DE DESENVOLVIMENTO FLORESTAL (1984). **Inventário Nacional**. Florestas Nativas. Paraná e Santa Catarina. (Brasília).
- JONES WG, HILL KD, ALLEN JM (1995) *Wollemia nobilis*, a new living Australian genus and species in the Araucariaceae. **Telopea** **6**, 173-176.

- KERSHAW AP, WAGSTAFF BE (2001) The southern conifer family Araucariaceae: history, status, and value for palaeoenvironmental reconstruction. **Annual Review of Ecology and Systematics** **32**, 397-414.
- KLEIN RM (1960) O aspecto dinâmico do pinheiro brasileiro. **Sellowia** **12**, 17-44.
- LORENZI H (1998) **Árvores Brasileiras. Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. Vol. 1. 2ª ed. (Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA: Nova Odessa)
- MACHADO SA, SIQUEIRA JDP (1980) Distribuição natural da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. In: **Problemas Florestais do gênero Araucaria**. (ed. FUPEF: Curitiba).
- MARCHIORI JNC (1996) **Dendrologia das Gimnospermas**. (Ed. UFSM: Santa Maria)
- MASTROBERTI AA, MARIATH JEA (2003a) Leaf anatomy of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Revista Brasileira de Botânica** (no prelo).
- MASTROBERTI AA, MARIATH JEA (2003b) Compartmented cells in the mesophyll of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Australian Journal of Botany** **51** (no prelo).
- MATTOS JR (1994) **O Pinheiro Brasileiro**. Volume 1. 2ª ed. (Artes Gráficas Princesa LTDA: Lages)
- MONTEIRO SM, FERREIRA AG, FLORES FEV (1977) Anatomia da plântula de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. (Nota prévia). In **XXI Congresso Nacional de Botânica**. (Curitiba: Brasil).
- MORAT PH, VEILLON J-M, MacKEE HS (1986) Floristic relationships of New Caledonian rainforest phanerogams. **Telopea** **2**, 631-679.
- NAPP-ZINN K (1966) **Anatomie des Blattes. I. Gymnospermen. Handbuch der Pflanzenanatomie**. (Gebrüder Borntraeger: Berlin)
- OHSAWA T, NISHIDA H, NISHIDA M (1995) *Yezonia*, a new section of *Araucaria* (Araucariaceae) based on permineralized vegetative and reproductive organs of *A. vulgaris* comb. nov. from the upper Cretaceous of Hokkaido, Japan. **Journal of Plant Research** **108**, 25-39.
- PAGE CN (1990) General Traits of Conifers. In: KUBITZKI K. (ed.). **The families and genera of vascular plants. Pteridophytes and gymnosperms. Vol. I**. (Spring-Verlag: New York).
- RAMBO B (1951) O elemento andino no pinhal riograndense. **Sellowia** **3**, 7-39.
- REITZ R, KLEIN R (1966) Araucariáceas. In: REITZ R (ed.). **Flora Ilustrada Catarinense**. (Tipografia e Livraria Blumenauense: Itajaí).
- ROSADO RM, FERREIRA AG, MARIATH JEA, COCUCCHI AE (1994) Amido no megagametófito de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze., degradação durante a germinação e desenvolvimento do esporófito. **Acta Botanica Brasilica** **8**, 35-43.
- SANTOS ALW, SILVEIRA V, STEINER N, VIDOR M, GUERRA MP (2002) Somatic embryogenesis in parana pine *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Brazilian Archives of Biology and Technology** **45**, 97-106.
- SEITZ RA, KANNINEN M (1989) Tree ring analysis of *Araucaria angustifolia* in Southern Brazil: preliminary results. **IAWA Bulletin** **10**, 170-174.
- SETOGUCHI H, OSAWA TA, PINTAUD J-C, JAFFRÉ T, VEILLON J-M (1998) Phylogenetic relationships within Araucariaceae based on rbcL gene sequences. **American Journal of Botany** **85**, 1507-1516.
- SEWARD AC, FORD SO (1906) The Araucariaceae, recent and extinct. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B** **198**, 305-412.



- SHIMOYA C (1958). Nota prévia sobre a formação do arquegônio, fertilização e desenvolvimento do proembrião em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Ceres** **10**, 286-287.
- SHIMOYA C (1962) Contribuição ao estudo do ciclo biológico de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Experientiae** **4**, 519-546.
- SILBA J (1986) Encyclopaedia Coniferae. **Phytologia Memoirs** **8**, 217.
- STEFANOVIC S, JAGER M, DEUTSCH J, BROUTIN J, MASSELOT M (1998) Phylogenetic relationships of conifers inferred from partial 28S rRNA gene sequences. **American Journal of Botany** **85**, 688-697.
- STEWART WN (1983) **Paleobotany and evolution of plants**. (Cambridge University Press: New York).
- STOCKEY R, TAYLOR TN (1978) Cuticular features and epidermal patterns in the genus *Araucaria* de Jussieu. **Botanical Gazette** **139**, 490-498.
- STOCKEY RA (1994) Mesozoic Araucariaceae: morphology and systematic relationships. **Journal of Plant Research** **107**, 493-502.
- STOCKEY RA, KO H (1986) Cuticle micromorphology of *Araucaria* de Jussieu. **Botanical Gazette** **147**, 508-548.
- TAYLOR TN, TAYLOR EL (1993) **The biology and the evolution of fossil plants**. (Prentice-Hall, Inc.)
- THOMSON RB (1914) On the comparative anatomy and affinities of the Araucarineae. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B** **204**, 1-50.
- TOMPSETT PB (1984) Desiccation studies in relation to the storage of *Araucaria* seed. **Annals of Applied Biology** **105**, 581-586.
- VASILYIEVA GV (1969) A contribution to the comparative anatomy of leaves of the species of *Araucaria* Juss. **Botanicheskii Zhurnal** **54**, 448-459.
- WEHR NJ, TOMAZELLO FILHO M (2000) Caracterização dos anéis de crescimento de árvores de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze., através da microdensitometria de raios X. **Scientia Forestalis** **58**, 161-170.
- WILDE MH, EAMES AJ (1952) The ovule and seed of *Araucaria bidwillii* with discussion of the taxonomy of the genus II. Taxonomy. **Annals of Botany** **16**, 27-47.
- YAMASAKI S, DILLEMBURG LR (1999) Measurements of leaf relative water content in *Araucaria angustifolia*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** **11**, 69-75.

ERAS	IDADE EM MILHÕES DE ANOS	GEOCRONOLOGIA	
<b>CENOZÓICO</b>	0,01	Quartenário	Recente
	1,6		Pleistoceno
<b>MESOZÓICO</b>	65	Terciário	Plioceno
			Mioceno
	140	Cretáceo	Oligoceno
			Eoceno
180	Jurássico	Paleoceno	
		Superior	
	Triássico	Inferior	
		Superior	
<b>PALEOZÓICO</b>	230	Permiano	Médio
			Inferior
	280	Carbonífero	Superior
			Inferior
		Devoniano	Superior
			Médio
570	Siluriano	Inferior	
	Ordoviciano		

**Figura 1.** Escala geológica do tempo (modificado de Stewart 1983).

# Araucariaceae

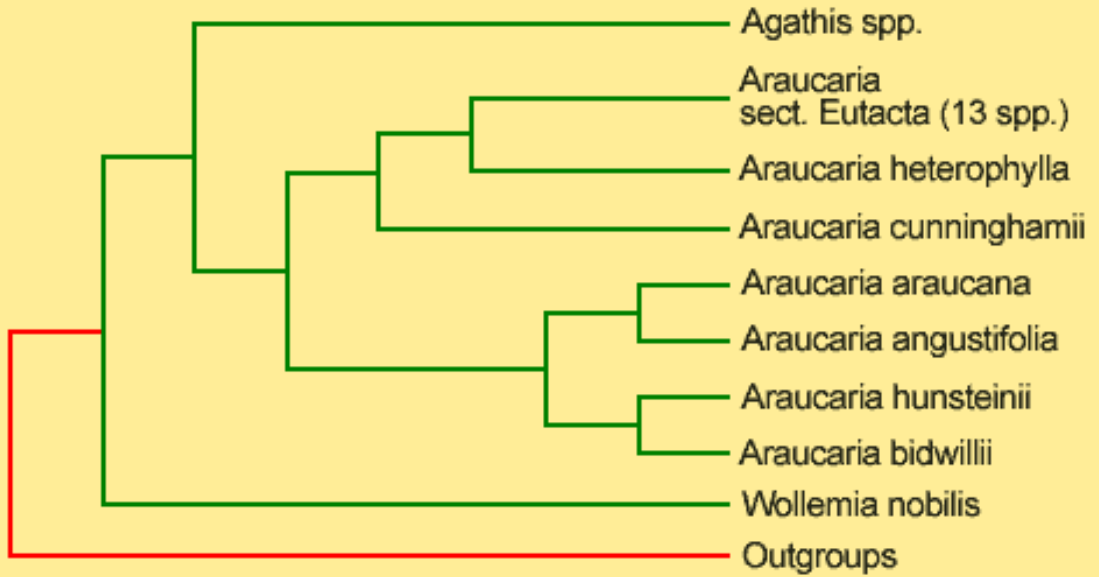


Figura 2. Cladograma da família Araucariaceae (Kershaw e Wagstaff 2001)



Figura 4. Mata com araucária na Floresta Nacional de São Francisco de Paula. Observar a altura das árvores de *Araucaria angustifolia* (seta preta) em relação ao grupo de pessoas (seta branca). No canto inferior à esquerda, um detalhe do ápice caulinar de uma planta jovem (Barra= 2 cm).

A watercolor illustration of a forest scene. In the foreground, several tall, slender tree trunks with textured bark stand vertically. The background is filled with a dense canopy of green foliage and clusters of small, vibrant pink and purple flowers. The overall style is soft and painterly, with visible brushstrokes and a gentle color palette.

## **CAPÍTULO 2**

Desenvolvimento das células compartimentadas no mesofilo de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae)

## ***Introdução***

As células compartimentadas já haviam sido observadas desde o início do século XX, com os estudos de anatomia foliar do gênero *Araucaria* Juss. de Barsali (1909), que as descreveu erroneamente como "grandes espaços intercelulares". Griffith (1950) e Vasiliyeva (1969) as descreveram como grandes células ausentes de cloroplastídios, enquanto Monteiro *et al.* (1977), estudando as plantas jovens de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze., observaram que tais células "gigantes" formariam outro tecido no mesofilo, caracterizando-se por possuírem escassos e pequenos cloroplastídios.

Finalmente, Bamber *et al.* (1978), estudando-as em ultraestrutura, observaram que essas células incomuns, distribuídas no mesofilo, apresentavam partições que subdividiam o lume celular, formando numerosos compartimentos. Por causa dessas partições reticuladas, os autores as denominaram de "células compartimentadas". Testes histoquímicos demonstraram apenas a presença de pectinas no "sistema de compartimentos", termo denominado por Bamber *et al.* (1978).

Observando unicamente folhas maduras de indivíduos adultos, os autores as caracterizaram como anucleadas, desprovidas de citoplasma, sem vacúolo ou outros materiais citoplasmáticos.

Mastroberti e Mariath (2003a) descreveram a anatomia foliar de plantas jovens de *Araucaria angustifolia* e observaram que em folhas imaturas e folhas maduras da porção mediana do caule ocorriam células compartimentadas nucleadas, as quais, em determinado estágio de desenvolvimento, núcleo e citoplasma se degeneravam, sugerindo ser um processo de morte celular programada.

Em gimnospermas, a ocorrência dessas células é exclusiva aos gêneros *Araucaria* e *Wollemia* Jones, Hill & Allen, estando ausentes no gênero *Agathis* Salisb. (Burrows e Bullock 1999).

A função dessas células ainda não está esclarecida. Bamber *et al.* (1978), sugeriram relacioná-las à estocagem de carboidratos. Os autores descartaram a possibilidade das células compartimentadas armazenarem água, como sugeriram Baker e Smith (1910) e Vasiliyeva (1969).

Apesar de Bamber *et al.* (1978) terem obtido importantes resultados ao nível ultraestrutural, ainda assim, pouco se sabe sobre o desenvolvimento e função dessas células. O processo de maturação das células compartimentadas, bem como a degeneração nuclear e a morte celular, permanece desconhecido e, por isso, merecendo

uma análise mais detalhada. A morte celular programada está sendo estudada em plantas, mas ainda é escasso o conhecimento da dinâmica desse processo nos vegetais.

A abundância das células compartimentadas e a distribuição no mesofilo indicam um importante papel fisiológico. Nesse capítulo, será descrito brevemente o desenvolvimento foliar, cujo enfoque é o de descrever os aspectos morfológicos e citológicos dessas células durante as fases de desenvolvimento sob microscopia óptica, microscopia eletrônica de transmissão e varredura e o de investigar suas funções.

## ***Material e métodos***

### ***Sobre a Floresta Nacional de São Francisco de Paula***

A FLONA de São Francisco de Paula, onde foram realizadas as coletas, localiza-se entre 29°23' e 29°27' de latitude sul e 50°23' e 50°25' de longitude oeste na Serra Gaúcha, nordeste do Rio Grande do Sul, microrregião dos Campos de cima da Serra, no município de São Francisco de Paula, numa altitude de 930m acima do nível do mar.

Esse parque é gerenciado pelo IBAMA desde 1990. Conforme folheto explicativo do local, ao todo, a FLONA de São Francisco de Paula possui 1606,60 ha. O clima, segundo classificação de Koeppen, é do tipo “cfbl”, isto é, uma região de clima temperado chuvoso onde as temperaturas do mês mais frio estão entre 18°C e -3°C e a média da temperatura do mês mais quente é de 27°C (Mattos 1994).

Não há estação seca; o verão é fresco, ocorrendo geadas no outono, inverno e primavera. Registra-se com frequência a ocorrência de neve no inverno. A precipitação pluviométrica é elevada em todos os meses e a média anual é de 2.252 mm, sendo a região onde são registrados os maiores índices pluviométricos do estado (Backes 1988).

O solo possui textura argilo-siltosa, substrato basáltico de teor ácido com teores de alumínio.

A FLONA de São Francisco de Paula integra-se, na Serra Gaúcha, a quatro outras reservas florestais públicas que protegem habitats e mantêm suporte alimentar para a fauna silvestre. É uma unidade de conservação de uso direto com cobertura florestal de espécies com predominância nativa, destinada à produção florestal economicamente sustentada.

Segundo sua composição florística, a FLONA de São Francisco de Paula é caracterizada como Floresta Ombrófila Mista com araucária. A vegetação nativa abrange 56% da área, equivalendo a 901,9 ha (fonte: IBAMA).

### ***Coleta do material e plantio***

Foram coletados os pinhões de *Araucaria angustifolia*, selecionando aqueles que não apresentavam perfurações e contaminação por fungos ou rachaduras.

Os períodos de coleta dos pinhões se concentraram entre os meses de maio a julho durante três anos (1999-2001).

As sementes foram banhadas em uma solução de três partes de água destilada e uma parte de hipoclorito de sódio para a desinfecção. Posteriormente, lavados em água corrente.

A cada ano, cerca de 20 pinhões foram cultivados, a sol pleno, em sacos plásticos com terra. O período para o cultivo foi entre julho a setembro e as plantas jovens utilizadas para o estudo possuíam cerca de 4 meses de idade. A observação do desenvolvimento das plantas e a coleta das folhas foram conduzidas em telado, do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

### ***Estádios de desenvolvimento***

No primeiro ano (1999), foram realizados testes-piloto, estabelecendo-se, primeiramente, 12 estádios foliares para verificar-se o processo de desenvolvimento das células compartimentadas:

1. Foram medidas as alturas das plantas de 4 meses de idade.
2. Estipularam-se segmentos de dois em dois centímetros do caule, após o ápice caulinar (folhas não-expandidas), medindo-as em comprimento/ largura.
3. Os ápices caulinares também foram coletados para a observação dos primeiros estádios foliares.

Após várias análises durante os testes-piloto, pôde-se estabelecer quatro estádios de desenvolvimento, com relação às células compartimentadas, tanto em microscopia óptica (MO), como em microscopia eletrônica de transmissão (MET). Em MET, o estágio 1 foi subdividido em estágio 1A e 1B, devido aos eventos que se diferenciam no protoplasto, os quais não podem ser observados em MO. A **Tabela 1** demonstra um exemplo de alguns valores medidos nas folhas (indivíduos 1 ao 6, dos 20 analisados), relacionando-os com os quatro estádios estabelecidos.



**Tabela 1. Valores medidos nas plantas jovens de *A. angustifolia* relacionados aos estádios de desenvolvimento das células compartimentadas.**

Indivíduos		1	2	3	4	5	6
Regiões coletadas	Estádios	Comprimento/largura das folhas (mm)					
AC*	1-2	3 x 3	3 x 3	3 x 3	3x3	3x3	3x3
2 cm	2	15 x 1	7 x 1	3 x 1	15x1	17x1	15x1
4 cm	2	30 x 3	15 x 1,5	20 x 3	20x2	23x3	25x1
6 cm	2	35 x 3	25 x 2	25 x 3	25x5	27x3	35x3
8 cm	2	40 x 4	30 x 2	27 x 3	27x5	30x5	30x5
10 cm	2	42 x 4	32 x 4	27 x 3	27x5	30x5	25x4
12 cm	2	45 x 5	41 x 4	27 x 3	27x5	28x5	25x4
14 cm	2-3	45 x 5	45 x 4	34 x 4	35x5	28x5	22x4
16 cm	3	40 x 5	50 x 4	34 x 4	35x5	28x5	22x4
18 cm	3	39 x 5	50 x 4	34 x 4	24x5	25x5	15x4
20 cm	3	31 x 4	49 x 4	34 x 4	23x5	20x4	11x3
22 cm	3-4	20 x 3,5	49 x 4	30 x 4	20x4	13x4	10x3
24 cm	3-4	15 x 3	45 x 4	30 x 4	15x4	10x3	
26 cm até 35 cm	4	11 x 3	42 x 4	30 x 4	12x3		
<b>Altura</b>		28 cm	35 cm	29 cm	26 cm	24 cm	23 cm

\* Ápice caulinar

***Processamento do material para microscopia eletrônica de transmissão***

Os ápices caulinares e a porção mediana das folhas foram seccionados em pequenas porções de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>. O material foi fixado em uma solução de paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio pH 7,2 0,1M por um período mínimo de 48 horas (Roland e Vian 1991) e lavado em tampão fosfato de sódio pH 7,2 0,1M (Gabriel 1982). Efetuou-se uma etapa de pós-fixação, utilizando-se uma solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato de sódio pH 7,2 0,2 M e ferricianeto de potássio (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>), numa proporção de 1:1, mantendo o material no escuro e agitando com frequência por 12 horas aproximadamente (Weber 1992). As amostras foram novamente lavadas em tampão fosfato de sódio pH 7,2 0,1 M e, em seguida, lavadas em água destilada. Posteriormente, desidratou-se o material em uma série de acetona ascendente 30%, 50%, contração em bloco com acetato de urânio em acetona 70%, 90% (duas trocas) e 100% (duas trocas), por 30 min cada etapa. Para a inclusão, utilizou-se a resina epóxi de baixa viscosidade (Spurr 1969). Primeiramente, colocou-se o material em uma solução 1:1 de resina e acetona 100%, por aproximadamente 12 horas. Posteriormente, o mesmo foi colocado em uma solução 3:1 de resina e acetona 100% pelo mesmo período, finalizando com a inclusão do material em resina pura por dois a três dias. Utilizaram-se cápsulas de gelatina como suporte, colocando-as em estufa a 70°C, por um período de 8 horas ou até polimerizar.

O material foi seccionado no Ultramicrótomo Leica Ultracut UCT, em navalha de vidro (confeccionadas em Knifemaker Leica EM KMR2) e navalha de diamante

Drukker 45° com fio de 2 mm. As seções ultrafinas (70-80 nm) foram colocadas em suportes (“grids”) de cobre de 200 mesh ou 50-75 mesh (com polímero ultrafino Butvar B98 ou Formvar).

Para uma contrastação adicional do material no suporte, utilizou-se uma solução de acetato de uranila 2% aquoso (Bozzola e Russel 1998) e solução de chumbo (Hanaich *et al.* 1986) ou em uma solução aquosa de permanganato de potássio (KMnPO<sub>4</sub>) 1% e solução de chumbo (Bray e Wagenaar 1978).

Observação e análise do material foram efetuadas no microscópio eletrônico de transmissão, Jeol 1200, do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS.

### ***Processamento do material para microscopia eletrônica de varredura***

A porção mediana das folhas maduras foi fixada em glutaraldeído 1% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio pH 7,2 0,1M (McDowell e Trump 1976) por um período mínimo de 48 horas. As lavagens, pós-fixação, desidratação e inclusão seguiram-se conforme o protocolo descrito para microscopia eletrônica de transmissão. Confeccionaram-se seções semifinas (350-500 nm) no Ultramicrotomo Leica Ultracut UCT em navalha de vidro, aderidas posteriormente em lamínulas de vidro. A resina foi retirada por meio de uma solução saturada de hidróxido de sódio e etanol absoluto. Em seguida, as lamínulas com o material sem resina foram aderidas em suporte de alumínio (“stubs”) e metalizadas com uma fina camada de ouro (4 nm de cobertura em 40 mA) através do sistema “sputtering”, marca Balzers SCD 050.

Observou-se o material em microscópio eletrônico de varredura, marca Jeol 5800 do CME da UFRGS.

### ***Processamento do material para microscopia óptica***

Parte do material foi processado seguindo-se a fixação com glutaraldeído 1% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio pH 7,2 0,1 M por um período mínimo de 48 horas (McDowell e Trump 1976), lavado em tampão fosfato de sódio pH 7,2 0,1 M (Gabriel 1982) e desidratado em série etílica ascendente (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100%), 30 min cada etapa. Posteriormente, seguiu-se a desidratação em soluções de clorofórmio e etanol absoluto (1:3, 1:1, 3:1, 1:1, 1:3), finalizando com uma etapa de etanol absoluto. O material foi pré-infiltrado com uma solução 1:1 de hidroxietilmetacrilato (Gerrits e Smid 1983) e etanol absoluto durante 12 horas e infiltração com a resina pura de hidroxietilmetacrilato por, aproximadamente, 4 horas. O

material foi emblocado com esta resina em suporte de Teflon até polimerizar. Para as seções, utilizou-se o micrótomo de rotação Microm HM 340 E com navalha de vidro, confeccionadas em Knifemaker Leica EM KMR2. Obtiveram-se seções de 3 µm, aderindo-as em lâminas de vidro.

Esse material foi observado em microscópio Leica DM R, em campo claro, corados com Azul de Toluidina O (C.I. 52040)\* 0,05% pH 4,4 (Feder e O'Brien 1968) e contraste interferencial. Do mesmo material processado para a microscopia eletrônica de transmissão, obtiveram-se seções semifinas (350-500 nm), aderidas em lâminas de vidro e coradas com Azul de Toluidina O 1% pH 8-9 (Souza 1998).

### ***Testes histoquímicos***

Alguns dados sobre a composição básica da secreção das células compartimentadas foram adquiridos com a realização de alguns testes histoquímicos.

O material fresco ou fixado seccionado a mão livre da porção mediana das folhas imaturas e maduras foram submetidos aos testes de Sudan III C.I. 26100 (Sass 1951) para compostos lipídicos (suberina) e Sudan Black B C.I. 26150 (O'Brien e McCully 1981) para fosfolipídios; ácido periódico-reativo de Schiff (reação de PAS) (O'Brien & McCully 1981), para a identificação de polissacarídeos totais e Coomassie Blue Brilhante R-250 (C.I. 42660) 0,25% em ácido acético (Southworth 1973) para proteínas totais.

O material emblocado em hidroxietilmetacrilato foi submetido aos testes de Vermelho de Rutênio (Johansen 1940) para a identificação de ácidos pécticos, Lugol (Sass 1951) para amido e Calcoflúor White 2MR (Sigma) 0,01% em solução aquosa para detecção de celulose (Pacini *et al.* 1999). As lâminas foram observadas em campo claro no microscópio Leica DM R, com exceção do teste de Calcoflúor cujas seções foram analisadas em epifluorescência (filtro de excitação 340-380 nm) no mesmo microscópio.

### ***Traçador apoplástico fluorescente***

O material fresco foi mergulhado durante 1 hora em uma solução aquosa 0,02%

---

\* Índice de cores (C.I. = Color Index), segundo Lillie (1977)

de 8-hidroxi-1,3,6-ácido pirenetrissulfônico, com sal tri-sódio (HPST, Sigma) (Oparka e Read 1994). A seguir, seccionou-se o material manualmente, colocando-o entre lâmina e lamínula em meio aquoso, examinando-o em epifluorescência (filtro de excitação 340-380 nm) no microscópio Leica DM R.

## ***Resultados***

### ***Meristema apical caulinar: breve descrição do desenvolvimento foliar***

O meristema apical caulinar era caracterizado por três camadas de células: L1, L2 e L3, além de uma zona central. As duas primeiras camadas apresentavam divisões predominantemente anticlinais, enquanto que na terceira, ocorria em todas as direções. As células da zona central, apresentavam grande densidade citoplasmática dispostas, aproximadamente, em 6-8 camadas. Abaixo desta, correspondendo à zona de diferenciação, observou-se o aumento de vacuolação, iniciando o tecido medular (**Figura 1**). Na L2 foram observadas divisões anticlinais e periclinais. Apenas essa camada participava da formação dos primórdios foliares (**Figuras 2 e 3**), sendo acompanhada pela L1. O desenvolvimento das células compartimentadas era seqüencial, ou seja, simultâneo ao desenvolvimento da folha, sofrendo diferenciação basípeta como os demais tecidos em formação (**Figuras 4 e 5**) e ocupando grande parte do mesofilo quando a folha ainda era muito jovem.

### ***Citologia e desenvolvimento das células compartimentadas***

#### ***Microscopia óptica***

As células compartimentadas se diferenciavam rapidamente e próximas ao meristema apical caulinar (estádios 1 e 2, **Figura 6, setas**). Nos estádios iniciais, não foi possível a observação das diferenças morfológicas entre as células compartimentadas e demais células do mesofilo (**Figura 7**).

**ESTÁDIO 1.** Nesse estágio, havia células com denso citoplasma, apresentando pequenos e vários vacúolos; outras, com vacúolos maiores e núcleo mais denso. Observou-se, também, que essas últimas sofriam um aumento de volume, indicando ser a célula compartimentada muito jovem (**Figura 8, setas**). Essas células apresentavam o início de uma secreção polissacarídica em seu lume, evidenciado pela cor púrpura

quando coradas com Azul de Toluidina (**Figura 8, setas**) e tênue coloração rosa com a utilização do Vermelho de Rutênio (**Figura 9**). Na **Figura 10**, observa-se um detalhe de uma célula compartimentada jovem no início da secreção (seta).

**ESTÁDIO 2.** As células compartimentadas atingiam grande volume e eram abundantes (**Figura 11**). Observou-se que o vacúolo central estava sendo delimitado pela mucilagem, localizado ainda na porção central do lume celular, demonstrando que a secreção se dava entre o citoplasma e o vacúolo. Observou-se com Azul de Toluidina, que a secreção corava-se de púrpura, evidenciando a presença de pectinas. A atividade de secreção era oriunda de regiões citoplasmáticas, cuja atividade produtiva era direcionada ao interior da célula (**Figura 12, seta maior**), comprimindo o vacúolo (**Figura 12, setas menores**). O citoplasma apresentava cloroplastídios pequenos em relação às demais células do mesofilo, mas com a presença de grãos-de-amido, conforme demonstrado pelo teste de Lugol (**Figura 26**). Em seções paradérmicas, as células compartimentadas formavam uma distribuição seriada concentrada, principalmente no terço inferior da folha.

**ESTÁDIO 3.** As células compartimentadas continuavam abundantes, entretanto, raramente se observavam núcleos (**Figura 13**). A quantidade citoplasmática diminuía, reduzindo-se, praticamente, a um resíduo perinuclear que se tornava mais denso (**Figura 14**). As seções coradas com Vermelho de Rutênio mostraram uma intensa reação na secreção das células compartimentadas, evidenciando um aumento na concentração de pectinas (**Figura 15**).

Em seções paradérmicas, observou-se que a distribuição seriada das células compartimentadas era mantida (**Figura 16**). A delimitação do vacúolo era, às vezes, observada em algumas células (**Figura 17, setas menores**) e, a secreção tornava-se mais reticulada com a presença de adensamentos lamelares (**Figura 17, setas maiores**). Em algumas células, o núcleo já estava ausente.

**ESTÁDIO 4.** Núcleo e citoplasma não eram mais observados. A célula estava totalmente preenchida de mucilagem péctica com lamelas bem definidas, formando um sistema reticulado. A forma poligonal das células compartimentadas tornava-se deformada, com paredes onduladas (**Figuras 18 e 19**). Essa morfologia estava presente nas folhas basais das plantas jovens de *Araucaria angustifolia* (**Figura 19**) e nas folhas

maduras de indivíduos adultos (**Figura 20, seta e Figura 22**). Em seções longitudinais, observou-se a descontinuidade da distribuição em série formada nos primeiros estádios (**Figura 21, setas**), pois as células compartimentadas sofreram uma deformação na parede celular, desconectando-se umas das outras. Além disso, as células compartimentadas em folhas maduras de indivíduos adultos eram constituídas de uma secreção lamelar mais desenvolvida (**Figura 22**).

Em contraste interferencial, foram observados alguns vestígios vacuolares, delimitados pela mucilagem (**Figura 28**).

### *Testes histoquímicos*

Em todas as fases analisadas observaram-se as mesmas reações aos testes histoquímicos utilizados (**Tabela 2**). Os testes com PAS e Vermelho de Rutênio (**Figura 23**) demonstraram a presença intensa de pectinas (principalmente no estágio 4) e com Coomassie Blue, uma reação tênue para proteínas totais na mucilagem (**Figura 24**). Entretanto, a mucilagem reagiu negativamente aos testes de Calcoflúor e Lugol, indicando a ausência de celulose (**Figura 25**) e amido (**Figuras 26 e 27**), respectivamente. Além disso, também não foi demonstrada a presença de lipídios (Sudan III) como suberina ou fosfolipídios (Sudan Black) na mucilagem (não apresentada).

**Tabela 2. Testes histoquímicos das células compartimentadas em *A. angustifolia***

Reagentes	Parede celular	Mucilagem
Sudan III (suberina)	-	-
Sudan Black (fosfolipídios)	-	-
Lugol (amido)	-	-
PAS (polissacarídeos totais)	++	+++
Vermelho de Rutênio (pectinas)	++	+++
Coomassie Blue (proteínas totais)	-	+
Calcoflúor (celulose)	++	-

(+) presente

(++) presença intensa

(+++) presença muito intensa

(-) ausente

### *Traçador apoplástico*

O teste efetuado com o traçador apoplástico HPTS, em folhas maduras das plantas jovens, indicou a presença de água armazenada nas células compartimentadas através da mucilagem péctica. A água foi, primeiramente, absorvida pela epiderme,

passando apoplasticamente até alcançar o mesofilo, onde houve grande absorção hídrica pelas células compartimentadas (**Figuras 29 e 30**).

#### *Microscopia eletrônica de transmissão*

**ESTÁDIO 1A.** Inicialmente, as células compartimentadas começavam a se distinguir das demais células parenquimáticas vizinhas, pelo aumento de volume (cerca de 30 µm de diâmetro, obtido no ponto médio da seção da célula) e pelo núcleo que se constituía de cromatina mais contrastada ou densa (**Figura 31**). O citoplasma apresentava um vacuoma mais desenvolvido, em comparação com as células do mesofilo nesse estágio (**Figura 31, setas**). Apresentavam fino, mas denso citoplasma, com cloroplastídios que continham grandes grãos-de-amido, porém sem tilacóides (**Figura 32**). Havia muitos ribossomos, maior quantidade de mitocôndrias com microvilosidades ainda não-definidas e retículo endoplasmático liso (SER) dispostos por todo citoplasma, principalmente próximos ao núcleo. Não havia diferença em quantidade de dictiossomos como observado com as mitocôndrias. A presença de uma cisterna *trans* do dictiossomo de forma anelar, englobando vesículas, era observada (**Figura 33, seta**). Havia formação de pequenos vacúolos oriundos do SER (**Figura 34, seta maior**), ao qual se fundiam ou englobavam vesículas dictiossômicas e corpos multivesiculares (**Figura 34, setas menores**). Grande parte do complexo Golgi tinha sua face *trans* voltada para a plasmalema, indicando a formação da parede celular. As faces *mediana* e *trans* possuíam maior contraste entre as membranas do que a face *cis* (**Figura 35**). Morfologicamente, as cisternas dos dictiossomos eram muito delgadas, contendo em média 6-8 cisternas (**Figuras 33 e 35**). O retículo endoplasmático rugoso (RER) era curto, localizando-se paralelamente à plasmalema (**Figura 36, seta**).

**ESTÁDIO 1B.** Os pequenos vacúolos formados do SER pareciam se fundir, aumentando de volume (**Figura 37, setas**). A atividade do Golgi aumentou, mas o número de cisternas dos dictiossomos permanecia como da fase anterior (entre 6-8). Observou-se também que, nesse estágio, as vesículas liberadas do dictiossomo aumentavam de volume, formando “grupos vesiculares” no citoplasma (**Figura 38, seta**). O complexo Golgi encontrava-se esparsos com a face *trans* ora voltada para a plasmalema, ora voltada para o vacúolo, observando-se muitas vesículas liberadas diretamente ao vacúolo (**Figura 39, setas**) de menor tamanho do que as vesículas dos “grupos vesiculares” formados. Tilacóides delgados começavam a ser observados nos

cloroplastídios, porém com formação de grana reduzidos (**Figura 40, seta**). Os grãos-de-amido diminuía de volume e gotas de óleo apresentavam-se no estroma (**Figura 40**). Peroxissomos ocorriam no citoplasma (**Figura 41**). Nesse estágio, observou-se grande quantidade de mitocôndrias, já bem desenvolvidas e caracterizadas por microvilosidades bem definidas (**Figura 42**).

Os grupos vesiculares oriundos dos dictiossomos, acrescidos de vesículas derivadas do SER, eram direcionados ao vacúolo (**Figura 43**). Esses corpos vesiculares resultavam em um sistema de cisternas dilatadas e vesículas que pressionavam o tonoplasto para o interior do vacúolo (**Figura 44, seta**). O citoplasma estava repleto de ribossomos (**Figura 45**). O tonoplasto se retraía continuamente para o interior celular, simultaneamente à formação e fusão de vesículas, onde ocorria um preenchimento entre o citoplasma e vacúolo (**Figuras 46, 47 e 48**). Esse material secretado poderia contribuir com o processo de lise do protoplasto, pois à medida que a secreção se expandia, era observada a degeneração do citoplasma (**Figura 49, seta**). As cisternas *trans* apareciam muito eletrodensas, produzindo grande quantidade de vesículas secretoras (**Figura 49, asterisco**).

**ESTÁDIO 2.** A célula compartimentada, média, nesse estágio, aproximadamente 80-150  $\mu\text{m}$  de diâmetro (**Figura 50**). O vacúolo era praticamente inexistente, sendo substituído pela secreção de mucilagem (**Figura 50, seta**), que comprimia o protoplasto junto à parede celular. Em algumas células era possível observar que a mucilagem, além de apresentar um sistema de retículos delgados, formava um sistema de lamelas mais espesso situado paralelamente ao citoplasma (**Figura 51, seta**). O núcleo apresentava-se muito denso, mostrando elevada electrodensidade (**Figuras 52**). Os cloroplastídios eram menos desenvolvidos que os de outras células vizinhas, caracterizados pela redução dos grãos-de-amido, tilacóides e grana (raros). Entretanto, estavam presentes muitas gotas lipídicas no estroma (**Figura 53**). Continuava a presença de muitos ribossomos no citoplasma, como no estágio anterior. A atividade dos dictiossomos estava no seu ápice, sendo que vários estavam dispostos em diferentes direções, liberando as vesículas das faces *trans* e *mediana*. As vesículas aumentaram em volume e quantidade (**Figuras 54 e 55**), estavam repletas de mucilagem e eram direcionadas ao interior celular, onde a membrana vesicular provavelmente se desintegrava, liberando seu conteúdo (**Figura 56, seta maior**). Era também observada uma maior electrodensidade nas extremidades das cisternas dos dictiossomos (**Figura 56**). Vesículas originadas do RER mantinham os



ribossomos marginais distanciados pela expansão de seu lume, contribuindo com a síntese protéica da mucilagem (**Figura 56, seta menor**). Algumas delas pareciam ser originadas de uma dilatação das cisternas do dictiossomo, tendo como consequência, a aparente redução do número de cisternas dessa organela (2-3) (**Figura 57, seta**). Muitas vezes eram observadas vesículas gigantes, ocupando, significativamente, o volume do citoplasma (**Figuras 58 e 59**). Observou-se grande quantidade de RER distribuído pelo citoplasma (**Figura 59**).

**ESTÁDIO 3.** A intensa secreção de mucilagem ocorria ao mesmo tempo que se observava uma gradual degeneração do protoplasto. A célula atingia cerca de 180  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Os sistemas de membranas mostravam sinais de degeneração. Observou-se um engrossamento nas lamelas pécticas da mucilagem que se distribuíam paralelas ou próximas ao citoplasma, apresentando ramificações ou reticulação bem definida (**Figura 60, seta**). A matriz do citoplasma era desfeita e as organelas restantes estavam dispersas (**Figura 61**). A redução do tamanho do núcleo era perceptível, apresentando uma cromatina rarefeita, concentrando-se próxima à membrana, caracterizando, assim, uma descromatização nuclear (**Figura 62**). O núcleo possuía zonas em que as membranas dilatavam-se, indicando sua degeneração (**Figuras 62 e 63, seta maior**). Os cloroplastídios possuíam a mesma morfologia do estágio 2, porém com as membranas externas dilatadas (**Figura 62, seta**). O dictiossomo era bastante reduzido, com cerca de três cisternas que sofreram dilatação, ao mesmo tempo em que liberavam vesículas (**Figura 63, seta menor**). As microvilosidades das mitocôndrias também começavam a dilatar-se, tornando a matriz menos densa.

**ESTÁDIO 4.** Esse estágio foi caracterizado pela degeneração do protoplasto. A célula era preenchida por mucilagem e, em algumas regiões, a parede celular tornava-se muito eletrodensa (**Figura 64**). A mucilagem se apresentava em dois padrões morfológicos conformacionais, inicialmente do tipo reticulado e, posteriormente, com lamelação que circunscrevia grandes áreas reticuladas (**Figuras 64 e 65, seta maior**). Estavam presentes, adjacentes à plasmalema, camadas definidas por bandas mais eletrodensas e outras menos eletrodensas. Essas camadas foram atribuídas a resquílios protoplasmáticos ou enovelados de membranas agregados às zonas persistentes da plasmalema (**Figura 65, seta menor**). A face interna da parede celular apresentava ondulações (**Figura 66, seta**) e, mesmo nas zonas menos contrastadas, observava-se

maior electrodensidade nas paredes das células compartimentadas comparadas com as paredes das células vizinhas. (**Figura 66**). A célula perdia sua forma poligonal inicial, mas em folhas maduras dos indivíduos adultos, observava-se mais nitidamente essa característica, as quais se apresentavam retorcidas ou achatadas (**Figura 67, seta**), normalmente unidas apenas com outra célula compartimentada vizinha em algumas zonas da parede celular (**Figura 68, seta menor**). Quando contrastadas com permanganato de potássio (KMnPO<sub>4</sub>), as paredes celulares e as lamelas da mucilagem tornavam-se muito eletrodensas, indicando alta concentração polissacarídica (**Figura 68, seta maior**). Nessas células, observava-se também uma camada mais eletrodensa junto à parede celular, demonstrando, que, mesmo após longos períodos (talvez meses ou anos), as células compartimentadas poderiam manter os resquícios do sistema de membranas protoplasmáticas comprimidas, como observado nas plantas jovens (**Figura 69, setas**).

#### *Microscopia eletrônica de varredura*

Observou-se a secreção mucilaginosa das células compartimentadas maduras e constatou-se que ela seria formada por um sistema principal de cordões mucilaginosos e pequenos retículos preenchendo toda a célula. Parecia haver mais de uma deposição lamelar, constituindo este sistema (**Figuras 70, 71 e 72**).

Em resumo, os quatro estádios de desenvolvimento das células compartimentadas se caracterizaram pela redução do volume do protoplasto à medida que a mucilagem péctica foi depositada entre o vacúolo e citoplasma, até que essas células atingissem grande volume e perdessem sua forma poligonal, ocorrendo a degeneração do citoplasma e núcleo. Estas etapas estão sumariadas na **Figura 73**, onde não foi considerada a proporção das estruturas, com a finalidade de destacar a atividade das organelas mais representativas durante a secreção.

## ***Discussão***

### ***Organização do meristema apical caulinar em L1, L2 e L3***

Conforme os dados de Griffith (1952), as espécies de *Araucaria* estudadas apresentavam uma organização do tipo túnica e corpo, sendo que *A. bidwillii* e *A.*

*araucana*, possuíam duas camadas de túnica, o mesmo observado para *A. angustifolia* no presente trabalho. Entretanto, aqui foram adotados os termos L1 e L2 (Bowman e Eshed 2000) para se denominarem as duas camadas de túnica referidas por Griffith, e como L3, aquela que corresponde ao corpo. Assim como descreveu Griffith (1952) para outras espécies desse gênero, a L2 também originaria os primórdios foliares em *A. angustifolia*. Trabalhos de revisão sobre o meristema caulinar em gimnospermas (Gifford e Corson 1971, Brunkener 1977) sustentaram o mesmo tipo de organização observado por Griffith (1952) nas espécies de *Araucaria*.

### ***As células compartimentadas são células mucilaginosas***

Ao longo da maturação foliar, observou-se que o desenvolvimento das células compartimentadas ocorria rapidamente. O estágio 2 era o mais longo e se iniciava ainda no ápice caulinar com intensa secreção de mucilagem, até um pouco abaixo da porção mediana do caule das plantas jovens de 4 meses de idade. Próximo à base do caule, podia-se observar que a degeneração protoplasmática era muito rápida, alcançando, posteriormente, a senescência dessas células. Isso significaria que a morte celular das células compartimentadas ocorria quando a planta ainda era jovem, entretanto, sem ocorrer a dissolução e reabsorção celular, mesmo em folhas de maior longevidade, no caso dos indivíduos adultos.

No estágio 1 em MET, as células compartimentadas começavam a aumentar o volume significativamente, sendo a primeira característica que se poderia distinguir de uma célula parenquimática do mesofilo, pois com relação ao citoplasma e organelas não havia indicações morfológicas de sua diferenciação. Além disso, quase todo seu desenvolvimento podia ser observado muito próximo às regiões meristemáticas, de maneira gradual ou seqüencial, ou seja, acompanhando a maturidade foliar. Em geral, células mucilaginosas também apresentam essas características nos estádios iniciais (Trachtenberg e Fahn 1981, Bakker *et al.* 1991 e Bakker e Gerritsen 1992). De acordo com Gregory e Baas (1989), forma e tamanho de células mucilaginosas poderiam variar, consideravelmente, entre as espécies. Em *Cinnamomum burmanni* Bl. o maior diâmetro medido chegava, aproximadamente, a 21  $\mu\text{m}$  (Bakker *et al.* 1991), 90  $\mu\text{m}$  em *Hibiscus schizopetalus* (Mast.) Hook.f. (Bakker e Gerritsen 1992) e 180  $\mu\text{m}$  em *Araucaria angustifolia*. Mesmo que praticamente todo o desenvolvimento dessas células seja observado próximo às regiões meristemáticas, nem sempre é seqüencial, como observado em *Araucaria angustifolia*. Trachtenberg e Fahn (1981) observaram que

células imaturas de mucilagem de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. ocorriam juntamente com células maduras na região apical do caule. O mesmo era observado para algumas espécies de *Cinnamomum*, inclusive no mesofilo foliar (Bakker *et al.* 1991). Em *Opuntia polyacantha* Haw., Mauseth (1980) descreveu que o desenvolvimento dessas células era muito rápido, pois as folhas tinham longevidade curta. Mesmo assim, o autor também distinguiu um desenvolvimento não-sequencial para as células mucilaginosas. O mesmo padrão de desenvolvimento das células compartimentadas em *Araucaria angustifolia* havia sido descrito, anteriormente, para as células mucilaginosas de *Aloe arborescens* Mill. (Trachtenberg 1984) e *Hibiscus schizopetalus* (Bakker e Gerritsen 1992), ou seja, era sequencial, acompanhando a maturidade foliar.

A distribuição das células compartimentadas parecia ao acaso quando as folhas eram seccionadas transversalmente. Entretanto, em seções paradérmicas, observou-se nitidamente que essas células estavam arranjadas em cordões como já descrito por Mastroberti e Mariath (2003b). Esse tipo de distribuição só estava presente em *Hibiscus schizopetalus* (Bakker e Gerritsen 1992).

Células de mucilagem secretam, principalmente, polissacarídeos e ocorrem em diversos grupos de plantas. A morfologia dessas células varia na forma de idioblastos solitários, tricomas, ductos ou cavidades (Fahn 1979, Kronstedt-Robards e Robards 1991).

Com base nessas características gerais e nos dados ultraestruturais, constatou-se que as células compartimentadas de *Araucaria angustifolia* possuíam semelhanças citológicas e de desenvolvimento, comparadas com os idioblastos de mucilagem solitários de algumas famílias de dicotiledôneas, como Cactaceae (Trachtenberg e Fahn 1981), Lauraceae (Bakker *et al.* 1991) e Malvaceae (Bakker e Gerritsen 1992). Nem todas as células mucilaginosas apresentam as mesmas características citológicas, entretanto, são observadas semelhanças com relação ao desenvolvimento, às organelas e à localização no tecido, seja ele foliar ou caulinar. A **Tabela 3** demonstra, resumidamente, as principais diferenças e similaridades entre as células compartimentadas e células de mucilagem ocorrentes em algumas famílias de dicotiledôneas e uma de monocotiledônea.

Outra característica observada nas células compartimentadas, comum também em células mucilaginosas, era a precocidade da formação de um grande vacúolo, não observado em células parenquimáticas na mesma fase de desenvolvimento foliar. Em

*Hibiscus esculentus* Pods., entretanto, o desenvolvimento desse tipo de vacúolo aparecia durante a fase de secreção (Mollenhauer 1967).

A cromatina nuclear mais densa em células compartimentadas imaturas foi observada apenas em *Araucaria angustifolia*. Outros autores não fizeram menção dessa característica em células mucilaginosas, apenas que o núcleo aumentaria significativamente suas dimensões nas células secretoras dos tricomas de *Psychotria bacteriophila* Val. (Horner e Lersten 1968).

No estágio 2, as células compartimentadas apresentavam, como característica marcante, cloroplastídios de morfologia diferente daqueles ocorrentes nas células parenquimáticas. Inicialmente, os cloroplastídios também possuíam grandes grãos-de-amido como nas células vizinhas. Entretanto, podia-se observar que, mesmo nas folhas imaturas, essas organelas eram quase insignificantes, com tilacóides e grana reduzidos nas células compartimentadas. O mesmo ocorre para todas as células de mucilagem das espécies estudadas, mencionadas acima. Inclusive nas células mucilaginosas de *Aloe arborescens* Mill., onde Trachtenberg (1984) acreditou que o recurso para a síntese de mucilagem seria oriundo dos grãos-de-amido presentes nos cloroplastídios. Não é difícil explicar a razão para essa redução. A principal função desses idioblastos não seria fotossintética, como as demais células do mesofilo (Dickison 2000). Monteiro *et al.* (1977) observaram que os cloroplastídios das células compartimentadas eram raros e de tamanho reduzido. Baseado nas análises estereológicas de Mauseth (1980) para *Opuntia polyacantha* e Trachtenberg e Mayer (1981c) para *Opuntia ficus-indica*, os cloroplastídios das células mucilaginosas poderiam ter em média 2,32% do volume no citoplasma, contra 23,9% das células parenquimáticas no mesofilo. Para esse gênero, gotas de óleo eram raras nas células de mucilagem, mas para as células compartimentadas, essa quantidade tendia a aumentar ao longo do desenvolvimento celular. A presença de grande quantidade de gotas lipídicas em plastídios está associada aos cromoplastídios, considerados como não-fotossintetizantes ativos (Clowes e Juniper 1968). Com a degeneração das organelas, essas gotas de óleo poderiam ser outra fonte de energia para o processo de secreção, uma vez que os cloroplastídios das células compartimentadas persistiam até muito próximas à morte celular e não possuíam, provavelmente, uma função fotossintética.

O citoplasma na etapa de início de secreção era bastante organizado, possuindo mitocôndrias em grande quantidade, que aumentavam de volume, permanecendo nesse estado durante quase todas as fases observadas em MET. A quantidade de mitocôndrias

poderia ser explicada pela necessidade de energia para o transporte e processos biossintéticos dentro da célula, principalmente, na fase de secreção. Bakker e Gerritsen (1990) e Bakker *et al.* (1991) não descreveram sobre as mitocôndrias das células mucilaginosas de *Cinnamomum* e *Annona*, e a grande quantidade dessa organela observada no gênero *Opuntia* não era significativa em comparação às células vizinhas, conforme as análises estereológicas de Mauseth (1980). Com base nesses resultados, o autor sugeriu que as mitocôndrias não tinham função direta como fonte de energia para a secreção de mucilagem em idioblastos solitários, embora estudos efetuados em tricomas de *Inula viscosa* L. (Aiton) (Werker e Fahn 1981), tenham descrito sobre essa participação das mitocôndrias na secreção. Segundo esses autores, a dupla membrana seria rompida, onde pequenas vesículas eram detectadas próximas a essa região, sugerindo envolver as mitocôndrias na síntese de resinas e gomas.

Características do SER e o RER nas células compartimentadas e nas de mucilagem pareceram semelhantes. Inicialmente, a dilatação do SER formava pequenas vesículas. Esse evento é comum em quase todas as células parenquimáticas (Dickison 2000). O que ocorria nas células compartimentadas era a participação do SER, além do Golgi na formação inicial do espaço que seria preenchido pela mucilagem, através de vesículas que pressionavam o tonoplasto para o interior celular. Foi observado que em *Opuntia ficus-indica* a dilatação do SER também resultou na formação de pequenas vesículas, ao mesmo tempo em que começava a redução do vacúolo central devido ao aumento da secreção de mucilagem. Esses pequenos vacúolos estariam auxiliando no transporte de material a ser secretado entre a plasmalema e a parede celular (Trachtenberg e Fahn 1981). A grande quantidade de ER, bem como o conceito de ser o "maior sistema de membranas" e atuar como recurso para outras organelas, deixaria claro a participação, mesmo que indireta, do processo de secreção da mucilagem. Horner e Lersten (1968) já haviam descrito essa participação do ER nos tricomas de *Psychotria bacteriophila* e Meyberg (1988) em *Nymphoides peltata* (Gmel.) Kuntze. Entretanto, as análises estereológicas realizadas por Trachtenberg e Mayer (1981c) demonstraram que o aparente aumento de RE não seria significativo, mas indicaram significância no volume e área do RER. Nas células compartimentadas, o RER também aumentava em quantidade e participava da secreção, liberando vesículas revestidas com ribossomos em direção à mucilagem.

Como descrito acima, é notório que na grande maioria das células, tricomas ou cavidades de mucilagem, a secreção mucilagínosa é sintetizada no Golgi e liberada

através de vesículas (Fahn 1979), mesmo com a participação indireta de outras organelas, como o RE, já mencionadas acima. Nas células compartimentadas, observou-se o mesmo.

Para a maioria das células mucilaginosas já estudadas (Mollenhauer 1967, Bouchet 1971 e 1973, Trachtenberg e Fahn 1981, Trachtenberg 1984, Bakker *et al.* 1991, Bakker e Gerritsen 1992), a secreção se acumula entre a parede celular e a plasmalema, pressionando o protoplasto para o interior celular, juntamente com o vacúolo central. Posteriormente, o protoplasto degenera, observando-se apenas alguns resquícios, tornando-se uma massa mais eletrodensa quando observada em MET. Nas células compartimentadas, ao contrário, o acúmulo da secreção localizava-se entre o vacúolo e o citoplasma. O citoplasma era pressionado contra a plasmalema e parede, tornando-se rarefeito pela degeneração de membranas. O vacúolo era restrito à porção mais interna da célula, vindo a desaparecer. Os resquícios do protoplasto também apareciam mais electrodensos em MET. Essa comparação da rota de secreção entre uma célula mucilaginosa e uma célula compartimentada está sumariada na **Figura 74**.

Em células mucilaginosas, o número de cisternas dos dictiossomos em média é de 6 a 8 e pode chegar a 16 ou 18 cisternas, além de alta atividade na fase de secreção. Trachtenberg e Mayer (1981c) acreditaram que, inicialmente, o SER era abundante e participava do aumento das cisternas dos dictiossomos. Quando a secreção alcançava o seu ápice, a quantidade de RE decrescia rapidamente. Embora alguns autores tenham descrito que o número de dictiossomos das células mucilaginosas aumentava com relação aos das células parenquimáticas (Bakker *et al.* 1991, Bakker e Gerritsen 1992), Mauseth (1980) e Trachtenberg e Mayer (1981c), através das análises estereológicas, comprovaram que o aumento em número não foi significativo. Existia, de fato, uma maior atividade do Golgi, segundo esses autores.

Os dictiossomos nas células compartimentadas se caracterizavam por serem muito ativos na fase de secreção. Não eram hipertróficos, como na maioria das células de mucilagem, mas as vesículas que eram liberadas aumentavam muito de tamanho, comparadas com o comportamento da organela em células parenquimáticas vizinhas. O conteúdo dessas vesículas era reticulado, muito semelhante à mucilagem secretada, o que deixa evidente sua participação na secreção.

Nem sempre o Golgi foi descrito como o responsável pela liberação de vesículas com formação de mucilagem. Kristen *et al.* (1982) encontraram uma direta liberação de polissacarídeos e proteínas pelos componentes tubulares do ER em *Isoetes lacustris* L..

Trachtenberg (1984), estudando a secreção de mucilagem em *Aloe arborescens*, encontrou polissacarídeos e mudanças estruturais, principalmente nos cloroplastídios de folhas jovens. Em folhas maduras, evidências de secreção foram encontradas na plasmalema. Como o dictiossomo não era hipertrófico e não estava presente em grande quantidade, o autor acreditou que essa organela não seria a responsável pela produção de polissacarídeos que fariam parte da mucilagem. O amido e outros açúcares dos cloroplastídios seriam o recurso para a produção dessa secreção liberada no citoplasma e, então, vesículas da plasmalema envolveriam o material, levando-o para o vacúolo.

Yakovleva (1988) também registrou a ocorrência de mucilagem nos vacúolos em 13 espécies de diversas famílias. De acordo com a revisão de Gregory e Baas (1989), algumas observações sobre vacúolos mucilaginosos mereceriam uma análise mais crítica, devido à falta de estudos ontogenéticos e ultraestruturais.

#### ***As células compartimentadas sofrem o processo de morte celular programada***

A degeneração protoplasmática já havia sido descrita para a maioria das células mucilaginosas, como em *Opuntia ficus-indica* e *O. polyacantha* (Trachtenberg e Fahn 1981, Mauseth 1980), *Aloe arborescens* (Trachtenberg 1984), *Cinnamomum burmanni* (Bakker *et al.* 1991, Bakker e Gerritsen 1989), *Hibiscus schizopetalus* (Bakker e Gerritsen 1992), etc. Esses são exemplos de células solitárias, pois muitos idioblastos de mucilagem em tricomas não apresentam esse processo, visto a continuidade de secreção para o exterior até mesmo após atingir a maturidade celular. É o caso de tricomas de *Inula viscosa* (Werker e Fahn 1981) e *Nymphoides peltata* (Meyberg 1988). Entretanto, em alguns tipos de tricomas, a morte celular é essencial para a especialização dessas células (Greenberg 1996, Pennel e Lamb 1997).

A morte celular programada em plantas foi estudada por Jones e Dangl (1996), Greenberg (1996) e Pennel e Lamb (1997), reforçando o importante papel desse processo na xilogênese, reprodução, senescência e na defesa contra o ataque de patógenos.

Esse processo está envolvido na eliminação seletiva de células, necessária para o crescimento e sobrevivência, ocorrendo em pequenas áreas ou em grande escala no corpo da planta. No caso de elementos traqueais, a degeneração ocorre apenas no protoplasto, cuja função está na condução de água após a “morte”, sem eliminação celular (Jones e Dangl 1996). As células compartimentadas sofriam esse tipo apoptótico.



As características morfológicas que evidenciam a morte celular programada ou apoptose é a condensação e a marginalização da cromatina no núcleo, denominada também de heterocromatina por Buzek *et al.* (1998), degeneração do citoplasma (sistemas de membranas) e fragmentação do DNA. Ning *et al.* (2002), através do método de hibridização *in situ* e Candra *et al.* (2002) comprovaram diferenças morfológicas e bioquímicas nos cromossomos, revelando a condensação da cromatina e sugerindo a morte celular programada em algumas espécies de Liliaceae. Durante o estágio 3 das células compartimentadas, foi observado que o núcleo apresentava uma fase de descromatização e dissociação da membrana nuclear, evidenciando, morfológicamente, o processo de morte celular.

Vários elementos estão sendo estudados para a compreensão bioquímica desses eventos e, principalmente, quem são os reguladores da morte celular programada. Greenberg (1996) e Matile (1997) descreveram sobre a participação do vacúolo na morte celular programada, sendo que este último sugeriu que certas proteínas no citoplasma degenerariam os fosfolipídios do tonoplasto, liberando endonucleases para a fragmentação do DNA nuclear, assim como compostos tóxicos e hidrolases.

Inúmeros trabalhos em tecido animal relacionaram as proteínas quinases como indutoras da morte celular programada. Utz e Anderson (2000), em um trabalho de revisão sobre eventos apoptóticos, descreveram que as quinases e outras proteínas de sinalização atuariam como perfeitos reguladores na decisão da vida ou morte das células. Em plantas, Raven *et al.* (1999) descreveram que proteínas quinases são uma classe de enzimas que podem ser ativadas pelo  $\text{Ca}^{++}$  ou outros mensageiros secundários. As proteínas quinases poderiam modificar as proteínas “alvo” (“target proteins”) pela transferência de grupos fosfato para certos aminoácidos dessa proteína (fosforilação), alterando sua atividade. Essas proteínas “modificadas” contribuiriam para uma diversidade de respostas celulares a determinados hormônios (auxinas e citoquininas). Dessa forma, uma célula programada para morrer teria esses hormônios modificando a conformação dos canais de íons como  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{H}^+$ . Conseqüentemente, o potencial de membranas também é alterado, possibilitando uma futura degeneração no sistema de membranas da célula (Matile 1997). A degeneração de membranas em células apoptóticas foi observada por Obara *et al.* (2001) e Yu *et al.* (2002), os quais descreveram que o tonoplasto seria a primeira membrana a sofrer rupturas, liberando enzimas que favoreceriam a despolarização de outros sistemas de membranas, inclusive a rápida degeneração do núcleo (em torno de 10 a 20 minutos). Entretanto, nenhum

adensamento na cromatina foi observado por esses autores. Haveria indicação que a ruptura do vacúolo ativaria a degeneração nuclear, caracterizando um tipo único de morte celular programada.

Nas células compartimentadas, o vacúolo central sofria uma drástica redução durante a fase de secreção, sendo pressionado para o interior celular até sua completa degeneração. As enzimas liberadas para a secreção mucilaginosa poderiam atuar no processo de autólise das organelas, à medida que a mucilagem preencheria a célula.

Uma outra evidência apoptótica foi observada por Sineonova *et al.* (2000) em cloroplastídios de *Nicotiana tabacum* L., os quais detectaram uma redução ou degeneração total dos tilacóides durante a senescência das folhas. Nas células compartimentadas observou-se o mesmo, cujos cloroplastídios sofriam grandes alterações, como a redução tanto dos grana, como dos tilacóides.

Esses eventos, como a redução do vacúolo e dos tilacóides nos cloroplastídios, os quais antecederiam a descromatização da cromatina e a dilatação da membrana nuclear nas células compartimentadas, poderiam ser atribuídos ao mesmo modelo apoptótico que aquele proposto por Sineonova *et al.* (2000) e Obara *et al.* (2001).

O número de células compartimentadas, aparentemente, decrescia pelo aumento de volume da seção foliar e diferenciação dos diferentes tecidos. Entretanto, o que se comprovou é a permanência delas com um aspecto comprimido, conforme relatado anteriormente, caracterizando a senescência desse tipo celular. Por outro lado, o número de células mucilaginosas em Malvaceae parece ampliar, e em Chlaenaceae, essas células tendem a desaparecer com a maturidade da planta (Gregory e Baas 1989).

No estágio 4, as células compartimentadas, após a morte celular, apresentavam resquícios protoplasmáticos, assim como as células mucilaginosas de Lauraceae e Malvaceae, (Bakker *et al.* 1991 e Bakker e Gerritsen 1992). O protoplasto sofre completa degeneração nas células mucilaginosas de *Opuntia ficus-indica* e *O. polyacantha* (Mauseth 1980, Trachtenberg e Fahn 1981). A descrição de células mucilaginosas anucleadas na maturidade é comum (Gregory e Baas 1989), entretanto, nada se sabe sobre uma possível ocorrência de morte celular programada para essas células.

#### ***Implicações da ausência de uma camada de suberina nas células compartimentadas***

As paredes de algumas células mucilaginosas, como *Hibiscus schizopetalus*, se rompem, formando canais mucilaginosos (Bakker e Gerritsen 1992). Esse evento

poderia estar relacionado à ausência de uma camada de suberina adjacente à parede celular, como ocorre em espécies de Lauraceae (Bakker e Gerritsen 1989) e Annonaceae (Bakker e Gerritsen 1990). A camada de suberina, segundo os autores, teria a função de prevenir o escoamento da mucilagem no tecido circundante. Outros autores sugeriram que essa camada poderia impedir a perda de água (Botha *et al.* 1982, Bakker e Baas 1993) ou contra o estresse sob baixas temperaturas (Kolattukudy 1984). Assim mesmo, em *Cinnamomum burmanni* (Lauraceae) foi demonstrado que a parede sofria uma pequena quebra, permitindo a penetração de mucilagem na célula vizinha parenquimática (Bakker *et al.* 1991). Apesar de terem sido observadas camadas em bandas mais ou menos eletrodensas adjacentes à plasmalema na maturidade das células compartimentadas, os testes histoquímicos realizados não demonstraram a presença de suberina, que deveria estar presente na porção apoplástica da célula. Essas bandas mais claras e escuras foram interpretadas como sucessivas deposições de resquícios protoplasmáticos ou envelados de membranas. A ausência desta camada poderia estar relacionada a uma maior deformação da célula compartimentada, através da ondulação da parede celular e aumentando os espaços intercelulares, pois não se observaram rompimentos na parede, como em *Hibiscus schizopetalus* (Bakker e Gerritsen 1992).

### ***Uma rota de secreção menos especializada nas células compartimentadas***

Como se observou anteriormente, as rotas de secreção de mucilagem pareciam variar. Normalmente, a secreção em células de mucilagem é por exocitose, onde as vesículas preenchidas com mucilagem liberadas do Golgi direcionam-se à plasmalema, liberando o conteúdo entre esta e a parede celular, com auxílio do ER ou não. No caso dos idioblastos solitários, a mucilagem ocupa toda a célula e assim permanece. Em tricomas, ductos, cavidades e células epidérmicas diferenciadas em idioblastos, a mucilagem secretada é liberada para o meio externo (Fahn 1979, 1987). Entretanto, as células compartimentadas de *Araucaria angustifolia* e as células mucilaginosas de *Aloe arborescens* (Trachtenberg 1984) pareciam não seguir um tráfego de vesículas por exocitose, pois em *Aloe arborescens*, essas células tinham sua secreção transportada de vesículas da plasmalema para o vacúolo, enquanto que nas células compartimentadas, a secreção era liberada, através de vesículas do Golgi, entre o citoplasma e o vacúolo, ou melhor, em uma direção preenchendo o protoplasto, pressionando-o em direção parietal; e em outra direção, reduzindo o vacúolo. Em primeira instância, a secreção das células mucilaginosas de *Aloe arborescens* parecia seguir o transporte por endocitose;

entretanto, não comprovado, uma vez que as organelas envolvidas na endocitose, como vesículas revestidas por clatrina e corpos multivesiculares, não foram observadas no trabalho de Trachtenberg (1984). Além disso, o papel mais importante da endocitose é a reciclagem e o reparo da plasmalema, através da eliminação de materiais por vesículas oriundas desta, passando por organelas específicas e liberando seu conteúdo no vacúolo (Fowke *et al.* 1991, Battey *et al.* 1999). O mesmo problema ocorre para as células compartimentadas de *Araucaria angustifolia*, cuja rota poderia ser considerada como menos especializada. Battey *et al.* (1999), ao estudarem essas rotas vesiculares em diversas plantas, argumentaram que uma vesícula poderia ser transportada por exocitose, endocitose ou limitada a outros destinos diferentes do que a membrana plasmática, sendo esta última rota uma característica diferente da célula animal. Além disso, a rota do tráfego de vesículas varia muito de acordo com as necessidades da célula e estágio de desenvolvimento. Há ainda muito que compreender sobre o papel desempenhado pela exocitose e endocitose no desenvolvimento vegetal, conforme esses mesmos autores.

### ***Características morfológicas e químicas da mucilagem***

A mucilagem das células compartimentadas se caracterizava pela formação de lamelas pécticas, envolvendo uma rede mucilaginosa, não formando compartimentos, conforme as descrições de Bamber *et al.* (1978). Essa constituição seria semelhante ao encontrado em células mucilaginosas de *Opuntia ficus-indica* (Trachtenberg e Fahn 1981) e células epidérmicas mucilaginosas de *Hibiscus schizopetalus*. Johnson e Thurston (1972), Mauseth (1980) e Bakker e Gerritsen (1989) descreveram que a mucilagem parecia se agregar em cordões, embora há dúvidas com relação à *Opuntia polyacantha* descrita por Mauseth (1980). Seria possível que as descrições para explicar a forma de lamelas ou cordões seriam, na verdade, semelhantes, pois em microscopia eletrônica de varredura, a deposição de lamelas de pectinas descritas para as células compartimentadas parecia ter, em determinado ângulo, forma de cordões.

O termo “mucilagens pécticas” foi descrito por Frey-Wyssling (1976) e mencionado por Bredenkamp e Van Wyk (1999), para diferenciar idioblastos de mucilagem e células com parede mucilaginosa encontradas em *Passerina* (Thymelaeaceae). A mucilagem das células compartimentadas parece se adequar ao termo “mucilagem péctica” mencionado por Bredenkamp e Van Wyk (1999).

A secreção, de muitas células mucilaginosas é composta por ácidos complexos e/ou polissacarídeos neutros de alto peso molecular, contituído, basicamente, por pectinas, proteínas (Fahn 1987) e taninos, presentes principalmente em células epidérmicas (Gregory e Baas 1989).

Na realidade, a constituição química das mucilagens é muito complexa, pois varia conforme a estrutura secretora (células solitárias, tricomas, ductos, cavidades), desempenhando, por sua vez, diferentes funções. Geralmente são descritas como heteropolissacarídeos, variando o conteúdo de ácidos urônicos, associados a sais de cálcio ou magnésio e formando géis. Nos vegetais superiores, a base para sua composição são as substâncias pécticas. As carragenas e agaroses são encontradas nas algas e bactérias, assim como os alginatos e xantanas (Guignard 1985, Bruneton 1993).

Trachtenberg e Fahn (1981) descreveram que em *Opuntia ficus-indica*, não havia presença de proteínas, efetuando o teste de Coomassie Blue. Para Trachtenberg e Mayer (1981b), a mucilagem nas células de *Opuntia ficus-indica* seria constituída de polissacarídeos ácidos com sais de cálcio e magnésio (este em menor quantidade). A falta de nitrogênio e aminoácidos comprovou a ausência de proteínas. Segundo os autores, os componentes mais comuns da mucilagem em diversas espécies de *Opuntia* são: arabinoses, galactoses, ramnose e ácidos galacturônicos. Em *Opuntia fulgida* Engelm. encontrou-se também xilose, e em *Aloe vera* L., detectou-se manose (Roboz e Haagen-Smit 1948).

Johnson e Thurston (1972) observaram que as células mucilaginosas epidérmicas de *Tragia ramosa* Torr. (Euphorbiaceae) reagem positivamente ao PAS, Vermelho de Rutênio e Azul do Nilo. Eles sugeriram que a secreção é o resultado da quebra de compostos da parede celular, contendo uma mistura de carboidratos insolúveis, substâncias pécticas e fosfolípidios. Willats *et al.* (2001) observaram os polissacarídeos pécticos na mucilagem secretada pelas sementes de *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae), através da reação ao Vermelho de Rutênio. Com a utilização de Calcoflúor, constataram a presença de celulose. Entretanto, essa mucilagem era secretada para o meio externo, sendo muito comum encontrar compostos de parede celular das sementes na secreção, como a celulose, visto o rompimento da mesma.

Em células de mucilagem solitárias não é comum a presença de celulose, conforme observado também nas células compartimentadas em *Araucaria angustifolia*, mesmo porque não havia secreção apoplástica ou para o meio externo.

### ***Como atuam as células compartimentadas?***

Segundo Trachtenberg e Mayer (1981a), há uma relação funcional entre células de mucilagem e cristais de oxalato de cálcio, verificada através de estudos estereológicos. Várias análises envolvendo as células mucilaginosas permitiram a estes autores concluir que os cristais de oxalato de cálcio presentes em idioblastos de *Opuntia* contribuíam com o cálcio livre encontrado na mucilagem de algumas espécies desse gênero (Trachtenberg e Mayer 1982a, 1982b). Entretanto, não foram encontradas descrições a respeito da presença de cristais relacionados com células mucilaginosas em outras famílias estudadas, como Lauraceae (Bakker *et al.* 1991) e Malvaceae (Bakker e Gerritsen 1992), assim como em Araucariaceae (células compartimentadas) (Bamber *et al.* 1978, Burrows e Bullock 1999, Mastroberti e Mariath 2003b).

Existem muitas funções atribuídas às células de mucilagem: adesivo para dispersão de sementes, regulação da germinação, captura de insetos pelas plantas carnívoras, lubrificante do ápice radicular em crescimento e como armazenadoras de água, além de outras ainda não descritas (Fahn 1987).

De acordo com Esau (1965) e Fahn (1979), polissacarídeos contribuiriam para a resistência à seca. É notório que as pectinas possuem uma natureza hidrofílica, e essas substâncias são a base da composição de mucilagem, conforme descrito acima.

A capacidade de envolver a água estaria na forma de ácidos livres e sais de cálcio. Entretanto, conforme os dados de Trachtenberg e Mayer (1982b) para *Opuntia ficus-indica*, não houve qualquer mudança desses compostos quando efetuadas alterações induzidas na umidade relativa do ar. Portanto, o envolvimento hídrico da mucilagem não explicaria a tolerância ou resistência à seca. A mucilagem poderia contribuir contra danos em regiões de baixa temperatura ou congelamento, como foi sugerido por Clarke *et al.* (1979).

A função de economia de água, principalmente em suculentas e plantas de zonas áridas e semi-áridas, deveria ser repensada segundo Trachtenberg e Mayer (1981a). Os autores descreveram que a capacidade da mucilagem de reter água estaria na presença do cálcio. A interação com cálcio causaria a formação de pequenos volumes hidrodinâmicos em solução e géis mais fortes ou resistentes. A mucilagem teria um efeito quelante ou tamponante do cálcio, atribuindo uma função mais voltada ao controle deste íon do que armazenamento hídrico.

Nas células compartimentadas, entretanto, pectinas eram abundantes na maioria dos estádios de desenvolvimento, e o resultado obtido através da utilização do traçador

apoplástico HPTS indicou que essas células teriam um importante papel fisiológico no armazenamento e na translocação de água, também através da distribuição seriada dessas células.

*Araucaria angustifolia* é uma espécie xeromórfica que vive em regiões de clima temperado chuvoso, onde as temperaturas do mês mais frio estão entre 18°C e -3°C e a média da temperatura do mês mais quente é de 27°C (Mattos 1994). Seria possível que a mucilagem das células compartimentadas também desempenhassem uma função contra o estresse de temperatura, conforme sugerido por Clarke *et al.* (1979), mas por localizarem-se em regiões úmidas, se diferenciam das funções das células mucilaginosas de Cactaceae, as quais situam-se, predominantemente, em regiões áridas. O resultado obtido com o traçador apoplástico evidenciou a captação hídrica (umidade do ar) por canais da epiderme, que chegava às células compartimentadas preenchendo-as de água, funcionando, portanto, como regulador hídrico nos períodos desfavoráveis, como o frio, ou para o estabelecimento da planta ao ambiente, quando ainda é muito jovem. Talvez, por isso, essas células se diferenciem tão rapidamente.

### ***Relações evolutivas das células compartimentadas***

Como descrito anteriormente, Botha *et al.* (1982) e Bakker e Baas (1993) sugeriram que a camada de suberina em células mucilaginosas poderia impedir a perda de água ou atuar contra o estresse sob baixas temperaturas (Kolattukudy 1984). Entretanto, a falta da camada de suberina foi considerada uma característica sinapomórfica, segundo Bakker e Gerritsen (1992), não explicando essa ausência nas células compartimentadas de *Araucaria angustifolia*. Contudo, considerou-se que os idioblastos de mucilagem solitários antecederam, ao longo da evolução, a formação de ductos e cavidades e, posteriormente, na diferenciação de tricomas secretores (Fahn 1988). Seguindo essa linha de pensamento, faz sentido a ocorrência desse tipo de células solitárias em *Araucaria*, bem como em Lauraceae, cuja família se encontra na base do clado filogenético.

Na família Araucariaceae, estas células estão ausentes em *Agathis*. O gênero *Wollemia* apresenta uma anatomia foliar de maior similaridade com *Araucaria* do que com *Agathis*, possuindo, também, células compartimentadas no mesofilo (Burrows e Bullock 1999). Entretanto, dois estudos moleculares demonstraram que *Wollemia* tem relação mais próxima à *Agathis* do que *Araucaria* (Gilmore e Hill 1997, Stefanovic *et al.* 1998). Em contraste, Setoguchi *et al.* (1998) demonstraram, em outro estudo

molecular, que *Wollemia* derivou primeiro e, posteriormente, *Agathis* e *Araucaria*. Por esse motivo, seria plausível supor que o caráter “célula compartimentada” poderia ser uma sinapormofia para o clado *Wollemia*, *Agathis* e *Araucaria*, com uma reversão na linha evolutiva de *Agathis*.

### ***Bibliografia citada***

- BAKER RT, SMITH HG (1910) **A research on the Pines of Australia**. (Government Printer: Sydney)
- BAKKER ME, BAAS P (1993) Cell walls in oil and mucilage cells. **Acta Botanica Neerlandica** **42**, 133-139.
- BAKKER ME, GERRITSEN AF (1989) A suberized layer in the cell wall of the mucilage cells of *Cinnamomum*. **Annal of Botany** **63**, 441-448.
- BAKKER ME, GERRITSEN AF (1990) Ultrastructure and development of oil idioblasts in *Annona muricata* L. **Annals of Botany** **66**, 673-686.
- BAKKER ME, GERRITSEN AF (1992) The development of mucilage cells in *Hibiscus schizopetalus*. **Acta Botanica Neerlandica** **41**, 31-42.
- BAKKER ME, GERRITSEN AF, VAN DER SCHAAF JP (1991) Development of oil and mucilage cells in *Cinnamomum burmanni*. An ultrastructural study. **Acta Botanica Neerlandica** **40**, 339-356.
- BAMBER RK, SUMMERVILLE R, GREGORY J (1978) Unusual cells in the mesophyll zone of leaves of *Araucaria*. **Australian Journal of Botany** **26**, 177-187.
- BARSALI E (1909) Studio sul gen. *Araucaria* Juss. **Atti Sociedad Toscana Science** **25**, 145-184.
- BATTEY NH, JAMES NC, GREENLAND AJ, BROWNLEE C (1999) Exocytosis and endocytosis. **The Plant Cell** **11**, 643-659.
- BOTHA CEJ, EVERT RF, CROSS RHM, MARSHALL DM (1982) The suberin lamella, a possible barrier to water movement from the veins to the mesophyll of *Themeda triandra* Forsk. **Protoplasma** **112**, 1-8.
- BOUCHET P (1971) Localisation et ultrastructure des cellules à mucilage différenciées de la Rose trémière *Althaea rosea* Cav. **Bulletin de la Société Botanique France** **118**, 37-46.
- BOUCHET P (1973) Étude ultrastructurale de la sécrétion du mucilage chez deux espèces de Tiliacées: *Tilia vulgaris* e *Entelera arborescens*. **Bulletin de la Société Botanique France** **120**, 279-292.
- BOWMAN JL, ESHED Y (2000) Formation and maintenance of shoot apical meristem. **Trends in Plant Science** **5**, 110-115.
- BOZZOLA JJ, RUSSEL LD (1998) **Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologists**. (Jones e Bartlett Publishers: Boston)
- BRAY DF, WAGENAAR EB (1978) A double staining technique for improved contrast of thin sections from Spurr embedded tissue. **Canadian Journal of Botany** **56**, 129-132.
- BRENDENKAMP CL, VAN WYK AE (1999) Structure of mucilaginous epidermal cell walls in *Passerina* (Thymelaeaceae). **Botanical Journal of Linnean Society** **129**, 223-238.
- BRUNETON J (1993) **Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales**. (Lavoisier: Paris).



- BRUNKENER L (1977) Spore-producing and apical meristems in vascular plants- a comparison. **Bot. Notiser** **130**, 189-201.
- BURROWS G, BULLOCK S (1999) Leaf anatomy of Wollemi pine (*Wollemia nobilis*, Araucariaceae). **Australian Journal of Botany** **47**, 795-806.
- BUZEK J, EBERT I, RUFFINI-CASTIGLIONE M, SIROKY J, VYSKOT B, GREILHUBER J (1998) Structure and DNA methylation patterns of partially heterochromatinised endosperm nuclei in *Gagea lutea* (Liliaceae). **Planta** **204**, 506-514.
- CANDRA E, MATSUNAGA K, FUJIWARA H, MINAKI Y, KURODA M, SASHIDA Y, OHIZUMI Y. (2002) Potent apoptotic effects of saponins from Liliaceae plants in L1210 cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** **54**, 257-262.
- CLARKE AE, ANDERSON RL, STONE BA (1979) Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. **Phytochemistry** **18**, 521-540.
- CLOWES FAL, JUNIPER BE (1968) **Plant Cells**. Vol.8. (Blackwell Scientific Publications: Oxford)
- DICKISON WC (2000) **The integrative plant anatomy**. (Academic Press: London).
- ESAU K (1965) **Plant anatomy**. 2<sup>a</sup> ed. (John Wiley & Sons Inc.: New York).
- FAHN A (1979) **Secretory tissues in plants**. (Academic Press: London).
- FAHN A (1987). Secretory tissues in vascular plants. **Taney Review** **14**, 16-257.
- FAHN A. (1988). Secretory tissues and factors influencing their development. **Phyton** **28**, 13-26.
- FEDER N, O'BRIEN TP (1968) Plant microtechnique. Some principles and new methods. **American Journal of Botany** **55**, 123-142.
- FOWKE LC, TANCHAK MA, GALWAY ME (1991) Ultrastructural cytology of the endocytotic pathway in plants. *In*: HAWES CR, COLEMAN JOD, EVANS DE (eds) **Endocytosis, exocytosis and vesicle traffic in plants** (University Press: Cambridge).
- FREY-WYSSLING, A (1976) **The plant cell wall**. (Gebrüder Borntraeger: Berlin).
- GABRIEL BL (1982) **Biological electron microscopy**. (Van Nostrand Reinhold Company, New York).
- GERRITS PO, SMID L (1983) A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy** **132**, 81-85.
- GIFFORD EM, CORSON GE (1971) The shoot apex in seed plants. **The Botanical Review** **37**, 143-229.
- GILMORE S, HILL KD (1997) Relationships of the Wollemi Pine (*Wollemia nobilis*) and a molecular phylogeny of the Araucariaceae. **Telopea** **7**, 275-291.
- GREENBERG JT (1996) Programmed cell death: a way of life for plants. **Proceedings of National Academy of Sciences** **93**, 12094-12097.
- GREGORY M, BAAS P (1989). A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. **Israel Journal of Botany** **38**, 125-174.
- GRIFFITH MM (1950) **A study of the shoot apex and leaf histogenesis in certain species of *Araucaria***. Ph.D. Thesis, University of California, Berkeley.
- GRIFFITH MM (1952) The structure and growth of the shoot apex in *Araucaria*. **American Journal of Botany** **39**, 253-263.
- GUIGNARD J-L, COSSON L, HENRY M (1985) **Abrégé de Phytochimie**. (Masson Publishing: USA).

- HANAICH T, SATO T, IWAMOTO T, MALAVASIYAMASHIRO J, HOSHIRO M, MIZUNO N (1986) A stable lead by modification of Sato method. **Journal of Electron Microscopy** **35**, 304-306.
- HORNER HT, LERSTEN NR (1968). Development structure and function of secretory trichomes in *Psychotria bacteriophila* (Rubiaceae). **American Journal of Botany** **55**, 1089-1099.
- JOHANSEN DA (1940) **Plant micro technique**. (McGraw-Hill: New York)
- JOHNSON JL, THURSTON EL (1972) Histochemistry and ultrastructure of epidermal mucilage cells in *Tragia ramosa* (Euphorbiaceae). **American Journal of Botany** **59**, 652.
- JONES AM, DANGL JL (1996) Logjam at the Styx: programmed cell death in plants. **Trends in Plant Science** **4**, 105-132.
- KOLATTUKUDY PE (1984) Biochemistry and function of cutin and suberin. **Canadian Journal of Botany** **62**, 2918-2933.
- KRISTEN U, LIEBEZEIT G, BIEDERMANN M (1982) The ligule of *Isoetes lacustris*: ultrastructure, mucilage composition, and possible pathway of secretion. **Annals of Botany** **49**, 570-584.
- KRONESTEDT-ROBARDS E, ROBARDS AW (1991) Exocytosis in gland cells. In: HAWES CR, COLEMAN JOD, EVANS DE (eds) **Endocytosis, exocytosis and vesicle traffic in plants** (University Press: Cambridge).
- LILLIE RD (1977) **H.J. Conn's Biological Stains**. 9 ed. (Sigma Chemical Company: Saint Louis)
- MASTROBERTI AA, MARIATH JEA (2003a) Leaf anatomy of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Revista Brasileira de Botânica** (no prelo).
- MASTROBERTI AA, MARIATH JEA (2003b) Compartmented cells in the mesophyll of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Australian Journal of Botany** **51** (no prelo).
- MATILE P (1997) The vacuole and cell senescence. In: LEIGH RA, SANDERS D (eds) **The Plant Vacuole** (Academic Press Inc: London)
- MATTOS JR (1994) **O Pinheiro Brasileiro**. Volume 1. 2ª ed. (Artes Gráficas Princesa LTDA: Lages)
- MAUSETH JD (1980) A stereological morphometric study of the ultrastructure of mucilage cells in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). **Botanical Gazette** **141**, 374-378.
- MEYBERG M (1988). Cytochemistry and ultrastructure of the mucilage secreting trichomes of *Nymphoides peltata* (Menyanthaceae). **Annals of Botany** **62**, 537-547.
- McDOWELL EM, TRUMP BF (1976) Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine** **100**, 405-414.
- MOLLENHAUER HH (1967) The fine structure of mucilage secreting cells of *Hibiscus esculentus*. **Protoplasma** **63**, 353-362.
- MONTEIRO SM, FERREIRA AG, FLORES FEV (1977) Anatomia da plântula de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. (Nota prévia). In **XXI Congresso Nacional de Botânica**. (Curitiba: Brazil).
- NING SB, WANG L, SONG YC. (2002) Identification of programmed cell death *in situ* in individual plant cells *in vivo* using a chromosome preparation technique. **Journal of Experimental Botany** **53**, 651-658.

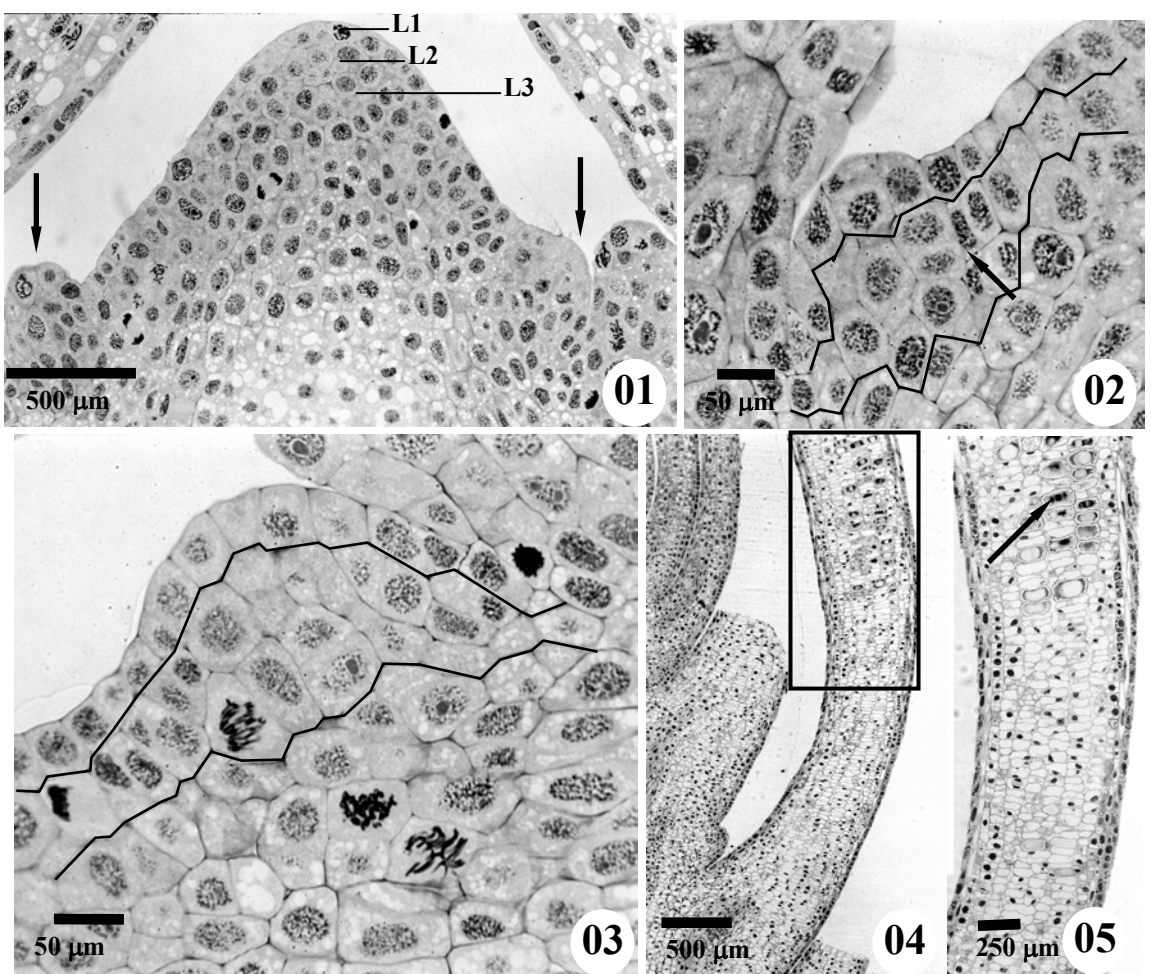
- OBARA K, KURIYAMA H, FUKUDA H (2001) Direct evidence of active and rapid nuclear degradation triggered by vacuole rupture during programmed cell death in *Zinnia*. **Plant Physiology** **125**, 615-626.
- O'BRIEN TP, MCCULLY ME (1981) **The study of plant structure principles and selected methods**. (Temacarphi Pty, Ltd: Melbourne).
- OPARKA KJ, READ ND (1994) The use of fluorescent probes for studies of living plant cells. In: HARRIS N, OPARKA KJ (eds). **Plant Cell Biology. A practical approach**. (Oxford University Press: London) .
- PACINI E, FRANCHI GG, RIPACCIOLI M (1999) Ripe pollen structure and histochemistry of some gymnosperms. **Plant Systematic and Evolution** **217**, 81-99.
- PENNEL RI, LAMB C (1997) Programmed cell death in plants. **The Plant Cell** **9**, 1157-1168.
- ROBOZ E, HAAGEN-SMIT AJ (1948). A mucilage from *Aloe vera*. **Journal of the American Chemical Society** **70**, 3248-3249.
- ROLAND JC, VIAN B (1991) General preparation and staining of thin sections. In: HALL JL e HAWES E (eds.). **Electron Microscopy of Plant Cells**. (London Academic Press).
- SASS JE (1951) **Botanical microtechnique**. (Iowa State University Press, Ames).
- SETOGUCHI H, OSAWA TA, PINTAUD J-C, JAFFRÉ T, VEILLON J-M (1998) Phylogenetic relationships within Araucariaceae based on rbcL gene sequences. **American Journal of Botany** **85**, 1507-1516.
- SINEONOVA E, SIKORA A, CHARZYNSKA M, MOSTOWSKA A (2000) Aspects of programmed cell death during leaf senescence of mono- and dicotyledonous plants. **Protoplasma** **214**, 93-101.
- SOUTHWORTH D (1973) Cytochemical reactivity of pollen walls. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry** **21**, 73-80.
- SOUZA W (1998) Introdução à imunocitoquímica. In: SOUZA W (ed.). **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. (Rio de Janeiro)
- SPURR AR (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructural Research** **26**, 31-34
- STEFANOVIC S, JAGER M, DEUTSCH J, BROUTIN J, MASSELOT M (1998) Phylogenetic relationships of conifers inferred from partial 28S rRNA gene sequences. **American Journal of Botany** **85**, 688-697.
- TAYLOR TN, TAYLOR EL (1993) **The biology and the evolution of fossil plants**. (Prentice-Hall, Inc.)
- TRACHTENBERG S (1984) Cytochemical and morphological evidence for the involvement of the plasma membrane and plastids in mucilage secretion in *Aloe arborescens*. **Annals of Botany** **53**, 227-236.
- TRACHTENBERG S, FAHN A (1981). The mucilage cells of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.- development ultrastructure, and mucilage secretion. **Botanical Gazette** **142**, 206-213.
- TRACHTENBERG S, MAYER AM (1981a) Calcium oxalate crystals in *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Development and relation to mucilage cells- a stereological analysis. **Protoplasma** **109**, 271-283
- TRACHTENBERG S, MAYER AM (1981b) Composition and properties of *Opuntia ficus-indica* mucilage. **Phytochemistry** **20**, 2665-2668.

- TRACHTENBERG S, MAYER AM (1981c) A stereological analysis of the succulent tissue of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. II. Ultrastructural development of the mucilage cells. **Journal of Experimental Botany** **32**, 1105-1113.
- TRACHTENBERG S, MAYER AM (1982a) Biophysical properties of *Opuntia ficus-indica* mucilage. **Phytochemistry** **21**, 2835-2843.
- TRACHTENBERG S, MAYER AM (1982b) Mucilage cells, calcium oxalate crystals and soluble calcium in *Opuntia ficus-indica*. **Annals of Botany** **50**, 549-557.
- UTZ PJ, ANDERSON P (2000) Life and death decisions: regulation of apoptosis by proteolysis of signaling molecules. **Cell Death and Differentiation** **7**, 589-602.
- VASILYIEVA GV (1969) A contribution to the comparative anatomy of leaves of the species of *Araucaria* Juss. **Botanicheskii Zhurnal** **54**, 448-459.
- WEBER M (1992) The formation of pollenkit in *Apium nodiflorum* (Apiaceae). **Annals of Botany** **70**, 573-577
- WERKER E, FAHN A (1981) Secretory hairs of *Inula viscosa* (L.) Ait.- development, ultrastructure, and secretion. **Botanical Gazette** **142**, 461-476.
- WILLATS WGT, McCARTNEY L, KNOX, JP (2001) *In-situ* analysis of pectic polysaccharides in seed mucilage and at the root surface of *Arabidopsis thaliana*. **Planta** **213**, 37-44.
- YAKOVLEVA OV (1988) Slime cells of the leaf epidermis in the dicotyledons plants (electron microscope data). **Botanicheskii Zhurnal** **73**, 977-987.
- YU XH, PERDUE TD, HEINER YM, JONES AM (2002) Mitochondrial involvement in tracheary element programmed cell death. **Cell Death and Differentiation** **9**, 189-198.

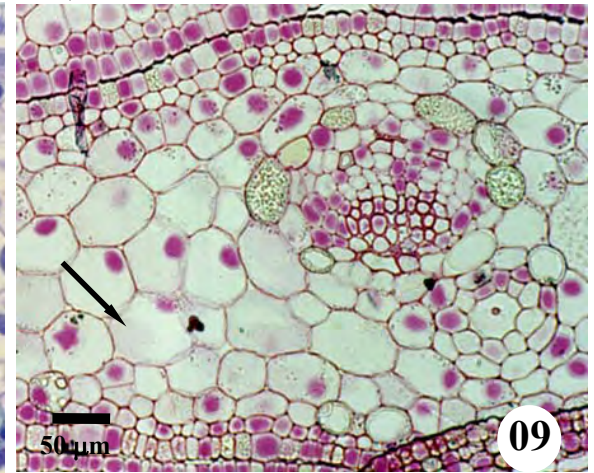
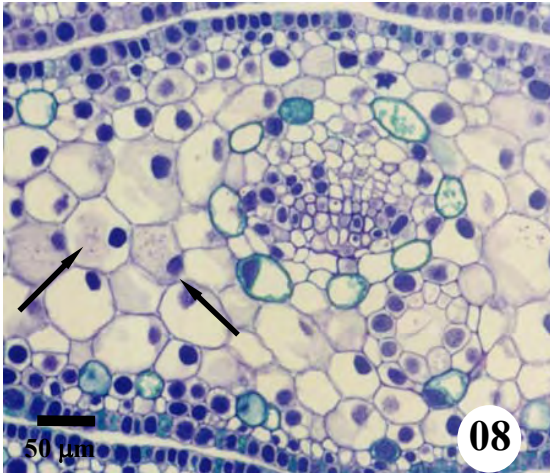
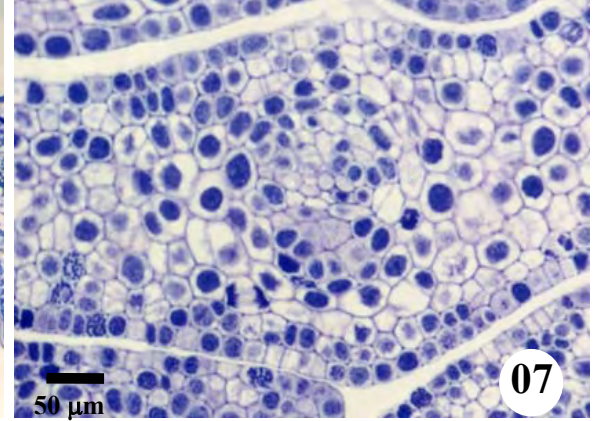
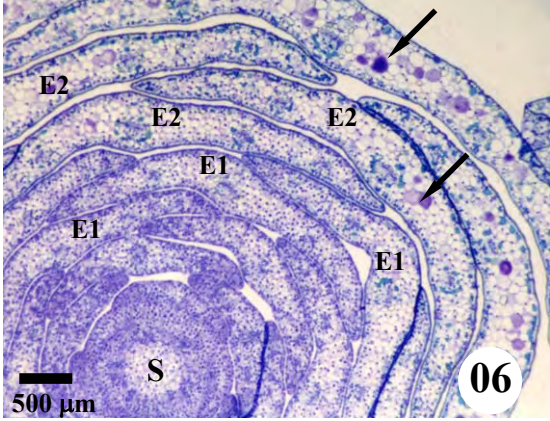
**Tabela 3. Principais diferenças e similaridades entre células de mucilagem de diferentes famílias e células compartimentadas de *Araucaria angustifolia***

Espécie (família)	Características gerais	Distribuição	Desenvolvimento	Estrutura morfológica da mucilagem	Composição química básica da mucilagem	Local de síntese da mucilagem	Local de secreção da mucilagem	Função	Camada de suberina	Cloroplastídios	Golgi
<i>Opuntia ficus-indica</i> (Cactaceae)  (Trachtenberg e Fahn 1981)	-Numerosas -↑ Volume	-ao acaso	-Não-seqüencial -Maioria dos estádios ocorre no ápice caulinar	-Lamelar	-Polissacarídeos não-sulfurados -Ausência de proteínas	-Golgi	-Entre plasmalema e parede celular	-Controle da liberação de cálcio	-Ausente	-↓ Tilacóides -↓ Gotas de óleo e grana	-Hipertrófico -↑ Atividade
<i>Opuntia polyacantha</i> (Cactaceae)  (Mauseth 1980)	-Numerosas -↑ Volume	- ao acaso	-Não-seqüencial. -Maioria dos estádios ocorre no ápice caulinar	-Fibrilar (?)	-Polissacarídeos	-Golgi	-Entre plasmalema e parede celular	-	-Ausente	-↓ Tilacóides -↓ Gotas de óleo	-Hipertrófico -↑ Atividade -Grandes vesículas
<i>Cinnamomum burmanni</i> (Lauraceae)  (Bakker <i>et al.</i> 1991)	-Numerosas -↑ Volume (21 µm) -vacúolo central desenvolvido	- ao acaso	-Não-seqüencial. -Maioria dos estádios ocorre no ápice caulinar	-Fibrilar (?)	-Polissacarídeos	-Golgi	-Entre plasmalema e parede celular	-	-Presente	-↓ Tilacóides -Grãos-de-amido persistentes	-Hipertrófico -↑ Atividade -Numerosos
<i>Hibiscus schizopetalus</i> (Malvaceae)  (Bakker e Gerritsen 1992)	-↑ Volume (90 µm) -Vacúolo central desenvolvido	-Fileiras ou pares no mesófilo e ápice caulinar -Solitárias na epiderme	-Seqüencial. -Maioria dos estádios ocorre no ápice caulinar	-Granular (mesófilo) -Lamelar (epiderme)	-	-Golgi	-Entre plasmalema e parede celular	-	-Ausente	-↓ Grãos-de-amido -↓ Tilacóides	-Hipertrófico -↑ Atividade -Numerosos
<i>Aloe arborescens</i> (Liliaceae)  (Trachtenberg 1984)	-Numerosas -↑ Volume (300 µm) -Vacúolo central desenvolvido	-	-Seqüencial. -Acompanha maturidade foliar	-Granular	-Polissacarídeos, principalmente amido	-Cloroplastídios (através do amido) -Vesículas oriundas da plasmalema	-Vacúolo -Entre plasmalema e parede celular	-Armazenamento de água	-Ausente	-Grãos-de-amido de grande volume -↓ Tilacóides	-↓ Número
<i>Araucaria angustifolia</i> (Araucariaceae)	-Numerosas -↑ Volume (180 µm) -Vacúolo central desenvolvido	-Fileiras	-Seqüencial. -Maioria dos estádios ocorre no ápice caulinar -Acompanha maturidade foliar	-Lamelar-reticulado	-Polissacarídeos, principalmente pectinas e tênue presença de proteínas	-Golgi e RER	-Entre citoplasma e vacúolo	-Armazenamento de água	-Ausente	-↑ Gotas de óleo -↓ Tilacóides e grana	-↑ Atividade - Grandes vesículas

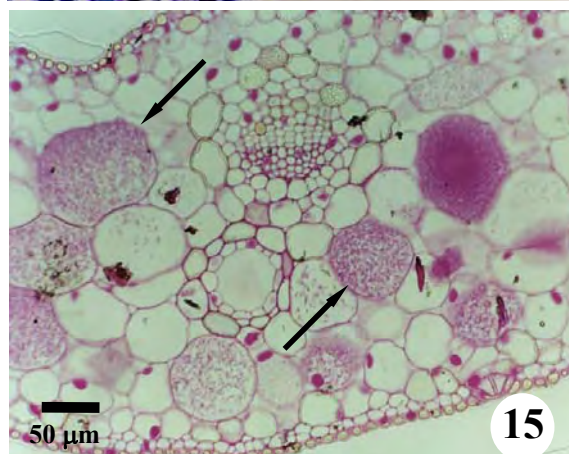
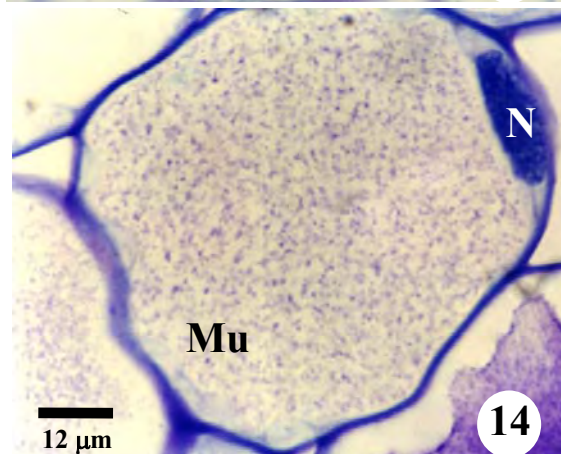
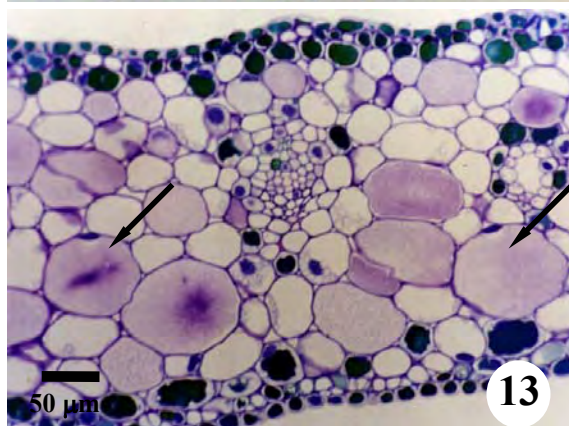
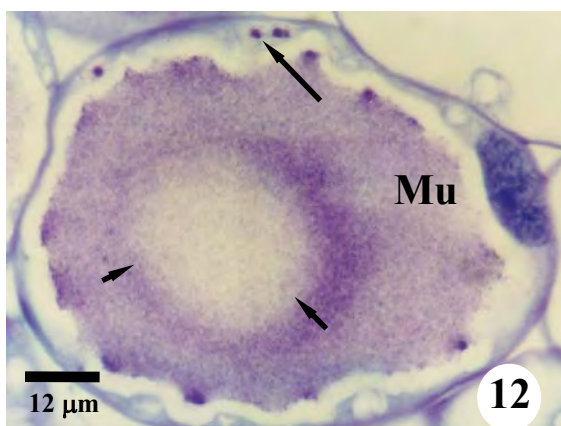
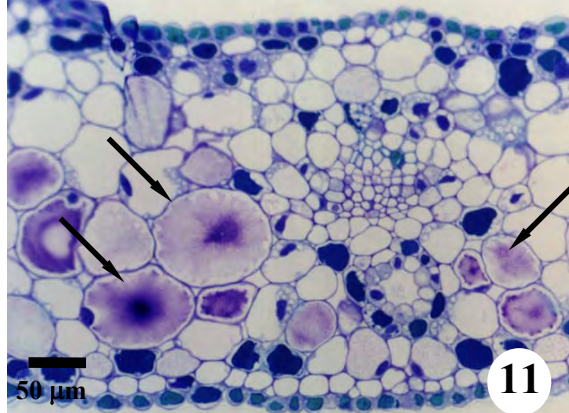
(-) ausência de informação    (↓) redução    (↑) aumento



**Figuras 1-5.** Microscopia óptica (MO) em campo claro. Seção longitudinal do ápice caulinar de *Araucaria angustifolia*. Inclusão em hidroxietilmetacrilato. **Figura 1.** Organização do meristema apical caulinar demonstrando as camadas L1, L2 e L3. As setas indicam os primórdios foliares. **Figura 2.** Primórdio foliar originado de divisões periclinais e anticlinais (seta) da L2 (zona demarcada). **Figura 3.** Alongamento do primórdio foliar, através das divisões periclinais da L2 (zona demarcada). **Figura 4.** Seção longitudinal das folhas imaturas no ápice caulinar. A zona demarcada demonstra a diferenciação basípeta das células compartimentadas. **Figura 5.** Detalhe da figura 4, demonstrando a diferenciação ainda no ápice caulinar e a ocorrência dessas células (seta) em grande quantidade .

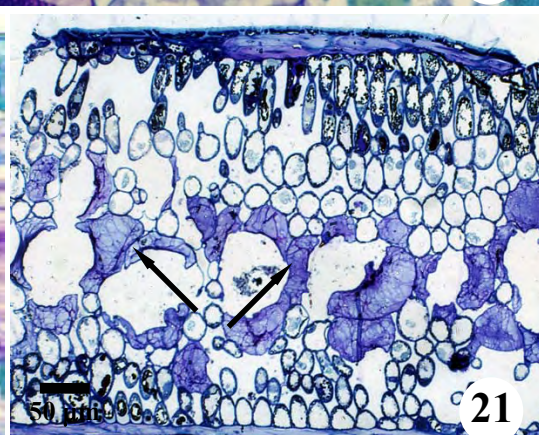
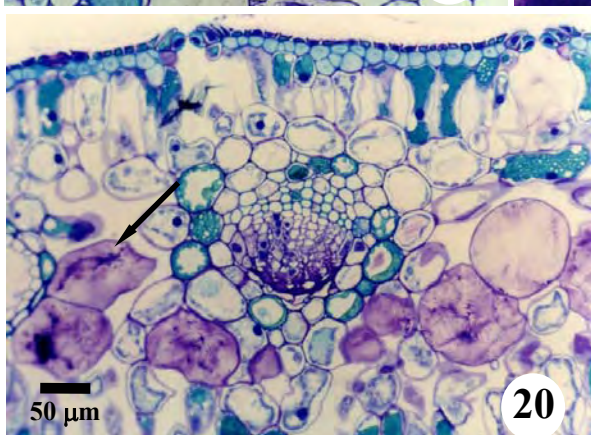
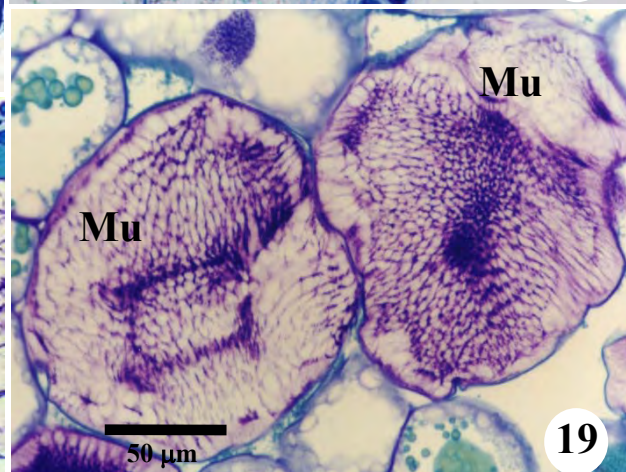
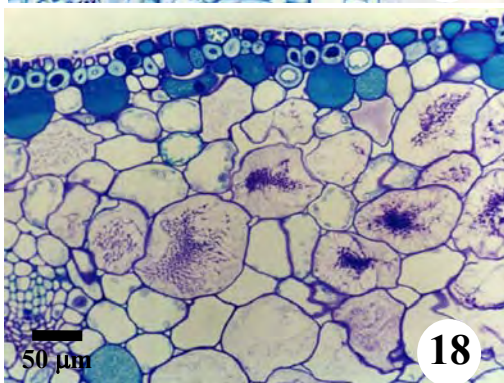
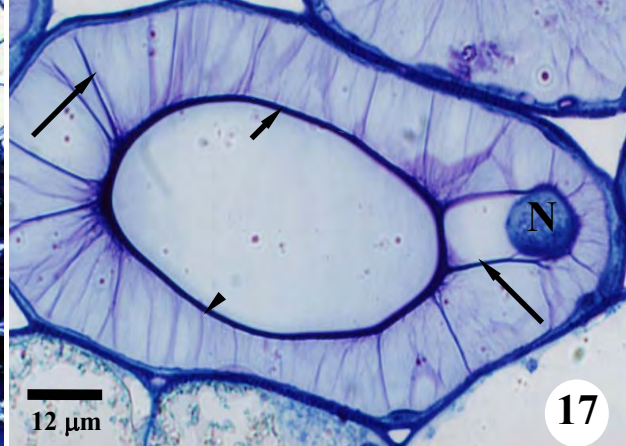
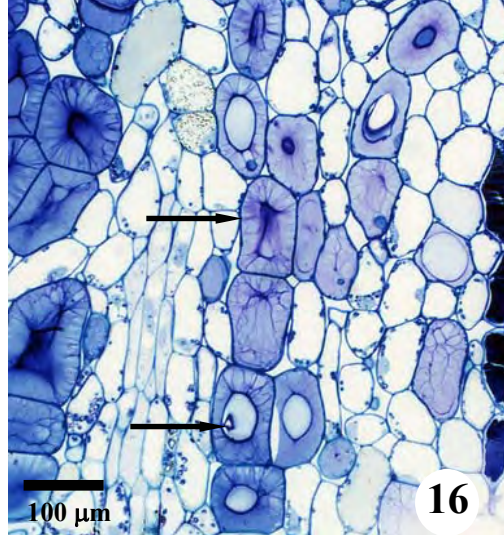


**Figuras 6-9.** MO em campo claro. Seção transversal do ápice caulinar. Inclusão em hidroxietilmetacrilato. **Figura 6.** Porção apical do caule (S), demonstrando que as células compartimentadas se diferenciavam rapidamente (setas), observando-se o estádios 1 (E1) e 2 (E2). **Figura 7.** Inicialmente, o mesofilo indiferenciado não permitia distinguir as células compartimentadas. **Figura 8.** Estádio 1. Observou-se o início da secreção das células compartimentadas (setas), corando-se levemente de púrpura utilizando Azul de Toluidina. **Figura 9.** Estádio 1. Com Vermelho de Rutênio observou-se uma reação muito tênue no citoplasma de algumas células (rosa), provavelmente, células compartimentadas (seta).

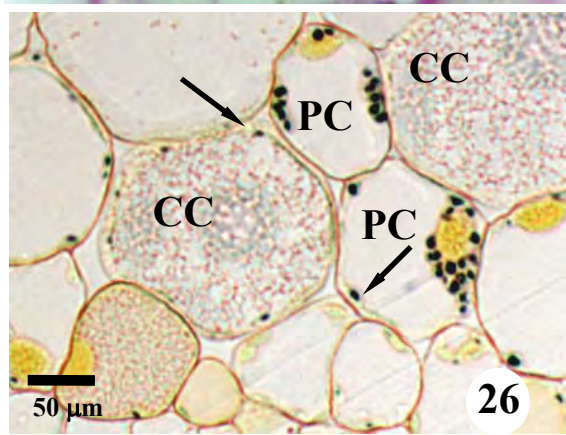
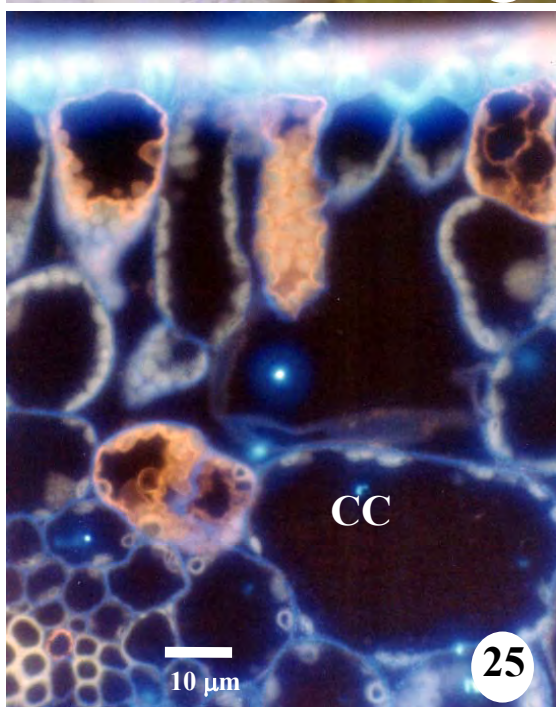
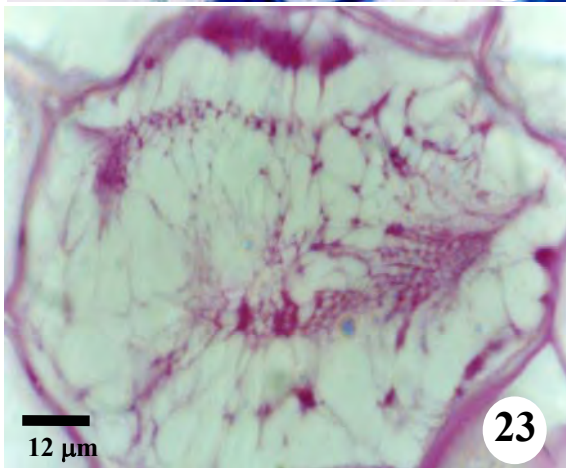
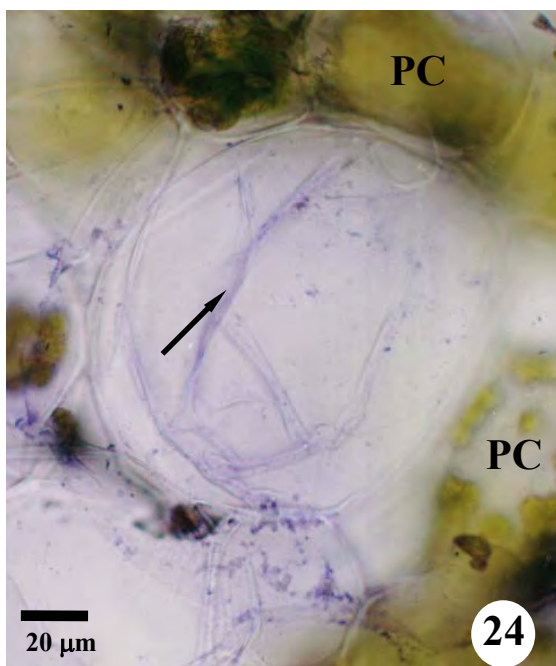
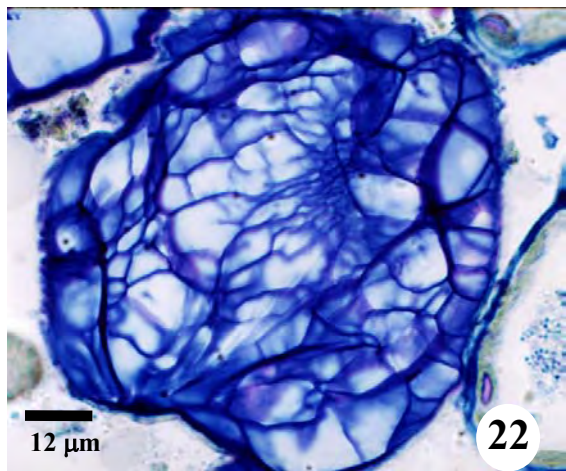


**Figuras 10-15.** MO em campo claro. Inclusão em hidroxietilmetacrilato. **Figura 10.** Estádio 1. Célula compartimentada iniciando secreção afastando o protoplasto (seta). N=Núcleo. **Figura 11.** Estádio 2. Seção transversal da folha. Células compartimentadas (setas) apresentando maior tamanho com relação às células vizinhas. **Figura 12.** Detalhe da figura 11. Célula compartimentada na fase de secreção, onde a mucilagem (Mu) preenchia quase todo o lume. A atividade de secreção se originava de regiões citoplasmáticas, direcionando-a ao interior da célula (seta maior), comprimindo a delimitação do vacúolo (setas menores). **Figura 13.** Estádio 3. Seção transversal da folha. As folhas apresentavam numerosas células compartimentadas, entretanto, era rara a presença de núcleos (setas). **Figura 14.** Detalhe da figura 14. Célula compartimentada com citoplasma reduzido. **Figura 15.** Estádio 3. Observou-se uma alta concentração de pectinas na mucilagem (setas) quando coradas com Vermelho de Rutênio.

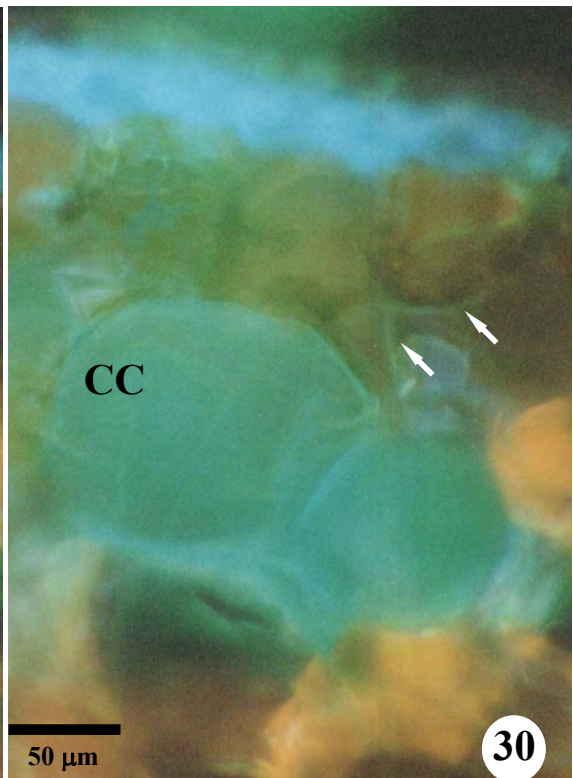
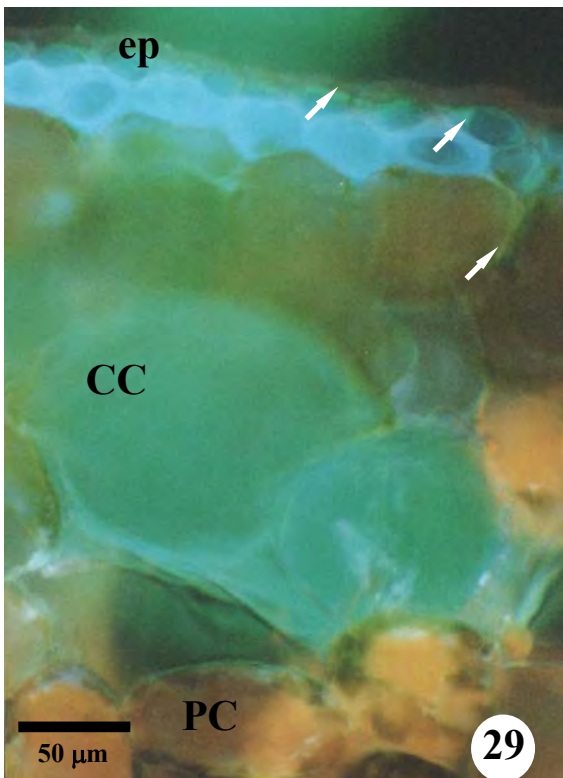
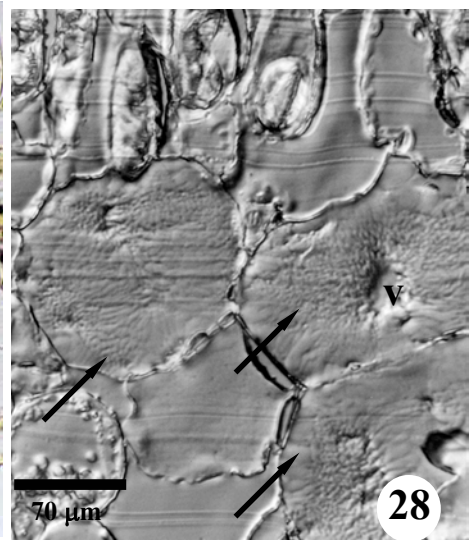
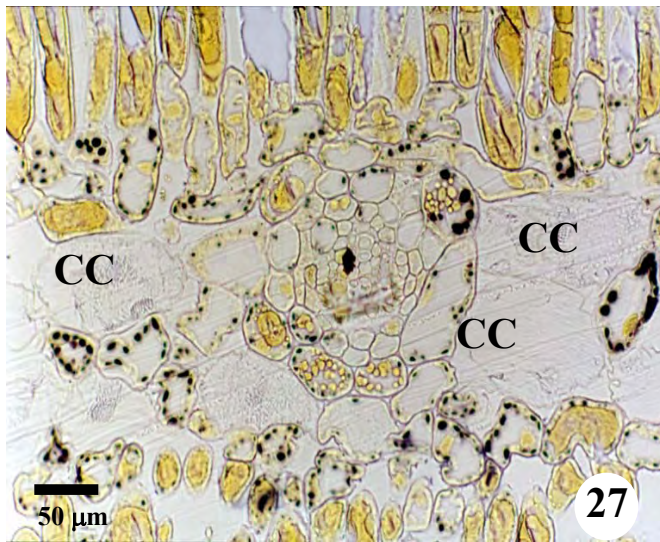




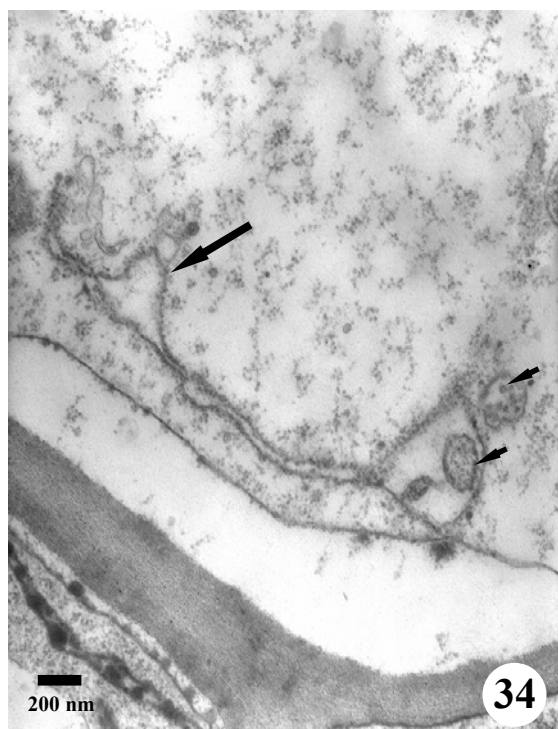
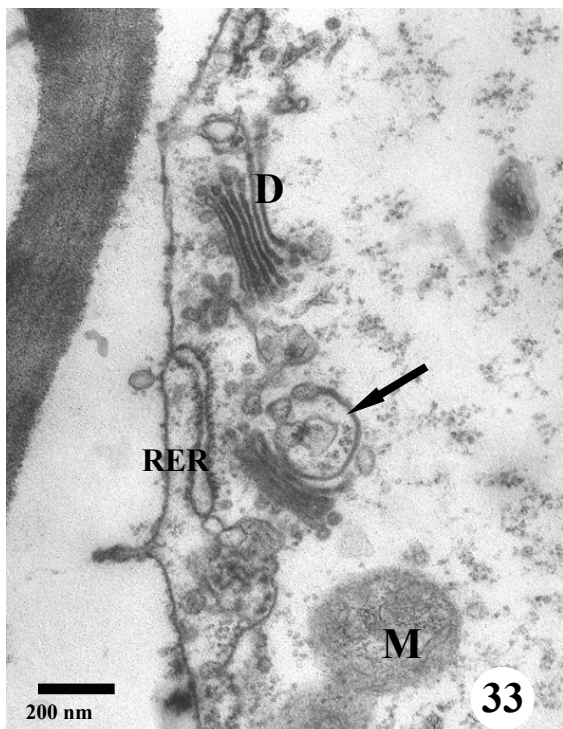
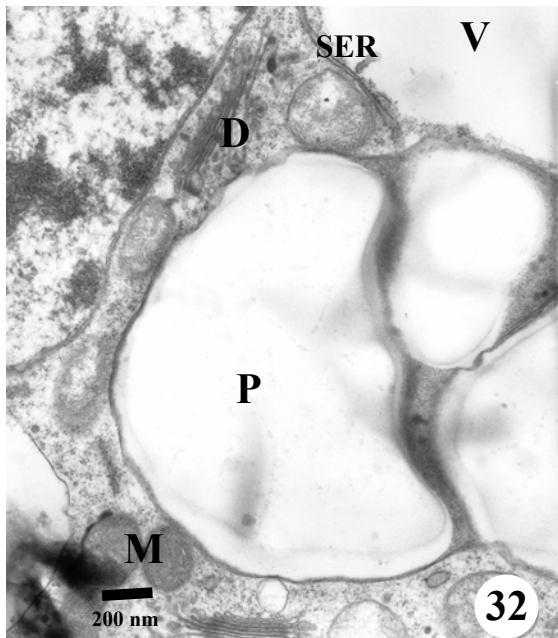
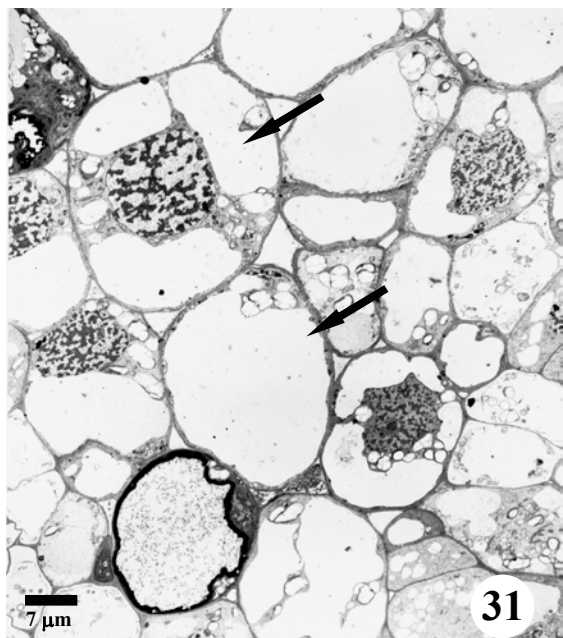
**Figuras 16-17.** MO em campo claro. Inclusão em Spurr. Estádio 3. **Figura 16.** Seção paradérmica, demonstrando a distribuição seriada das células compartimentadas (setas). **Figura 17.** Célula compartimentada ainda apresentando núcleo (N). A mucilagem apresentava-se lamelada (setas maiores) e, às vezes, era observada a delimitação do vacúolo (setas menores). **Figuras 18-20.** MO em campo claro. Inclusão em hidroxietilmetacrilato. Estádio 4. **Figura 18.** Seção transversal da folha basal da planta jovem. **Figura 19.** A forma poligonal das células compartimentadas dava lugar a um contorno amorfo. A mucilagem (Mu) formava um sistema lamelar mais desenvolvido. **Figura 20.** As paredes onduladas eram também observadas nas células compartimentadas em folhas mais velhas de indivíduos adultos (seta). **Figura 21.** MO em campo claro. Inclusão em Spurr. Seção longitudinal da folha madura do indivíduo adulto. Observou-se a descontinuidade das séries das células compartimentadas devido a deformação na parede celular (setas).



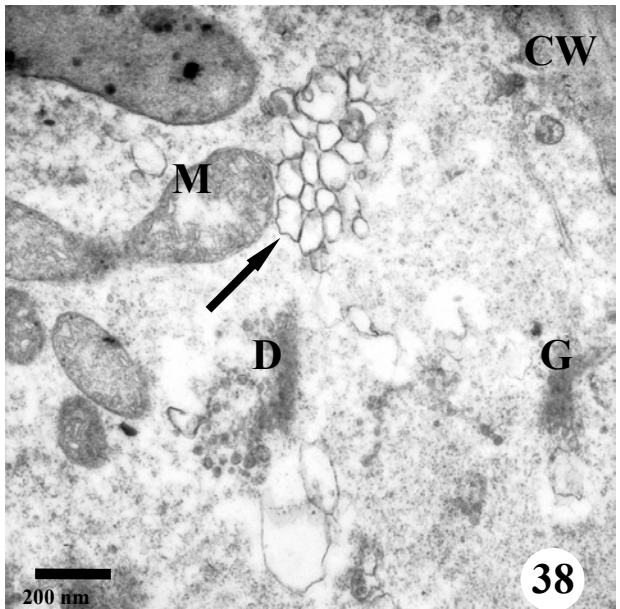
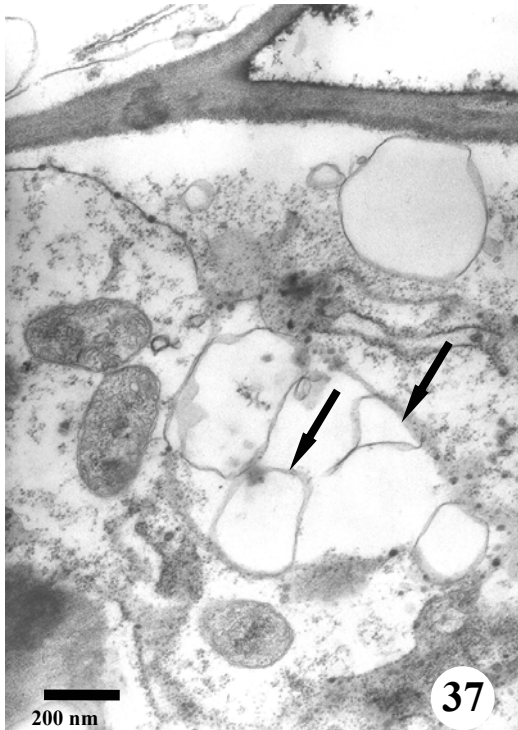
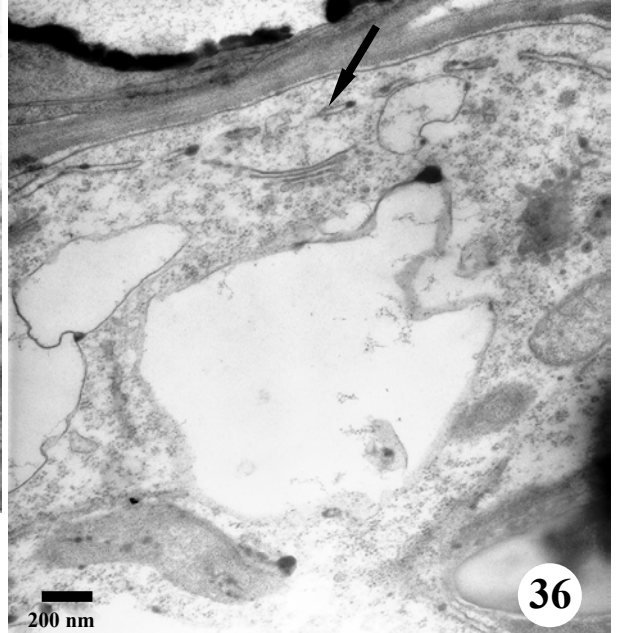
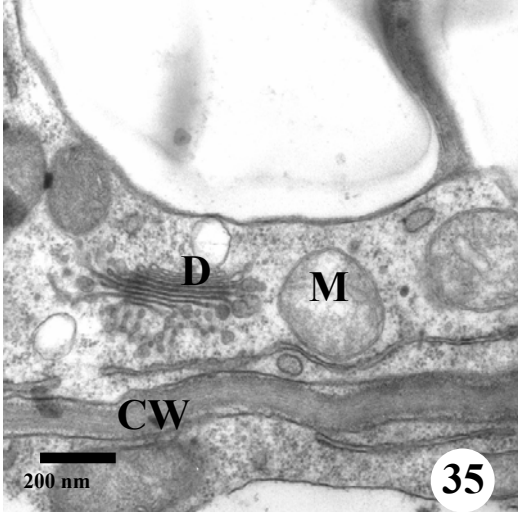
**Figuras 22-24.** MO em campo claro. Seção transversal da folha. Estádio 4. **Figura 22.** Inclusão em Spurr. Detalhe de uma célula compartimentada na folha madura de um indivíduo adulto. Mucilagem com sistema lamelar mais desenvolvido. **Figura 23.** Inclusão em hidroxietilmetacrilato. Teste histoquímico com Vermelho de Rutênio, demonstrando a presença intensa de pectinas nas lamelas mucilaginosas da célula madura. **Figura 24.** Material fresco. Teste histoquímico com Coomassie Blue. A reação positiva na mucilagem, embora tênue, indicava a presença de proteínas totais (seta). As células parenquimáticas (PC) do mesofilo eram identificadas pela presença de cloroplastos. **Figura 25.** MO em fluorescência (filtro de excitação 340-380 nm). Inclusão em hidroxietilmetacrilato. Seção transversal da folha. Teste com Calcoflúor, indicando a ausência de celulose na mucilagem das células compartimentadas (CC). Todas as paredes reagem positivamente. **Figura 26.** MO em campo claro. Inclusão em hidroxietilmetacrilato. Seção transversal da folha. Teste com Lugol em folhas imaturas (estádio 2). Ausência de amido na mucilagem das células compartimentadas. As células parenquimáticas vizinhas possuíam maior número de grãos-de-amido (setas) nos cloroplastídios em comparação com os das



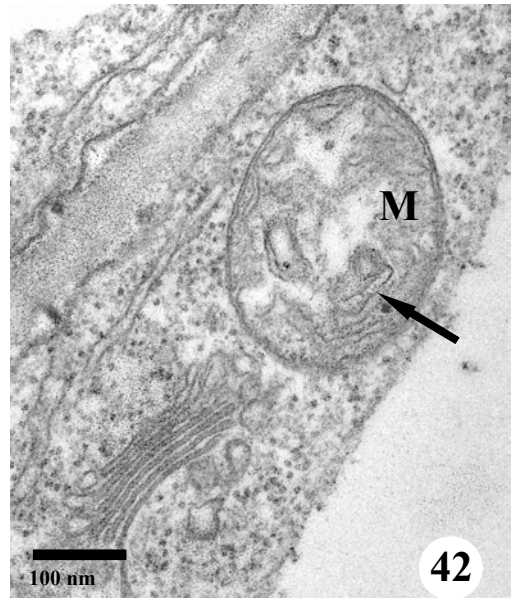
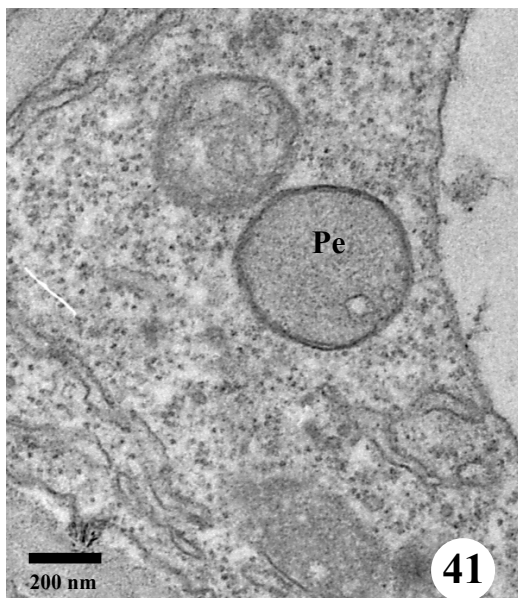
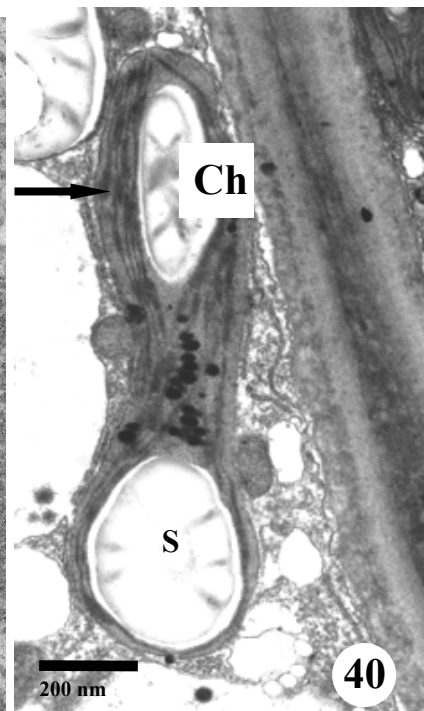
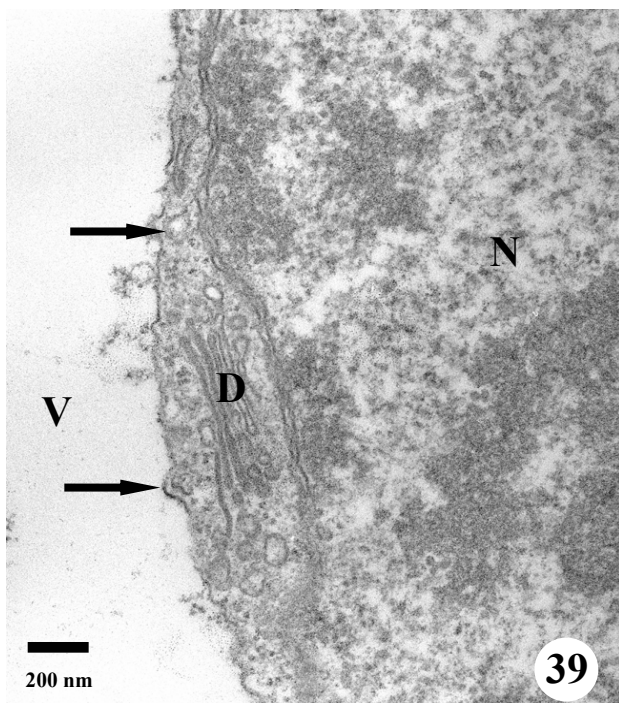
**Figura 27.** MO em campo claro. Inclusão em hidroxietilmetacrilato. Seção transversal da folha. Estádio 4. Os grãos-de-amido estavam ausentes nas células compartimentadas maduras (CC). **Figura 28.** MO em contraste interferencial. Inclusão em hidroxietilmetacrilato. Seção transversal. As células compartimentadas eram preenchidas com mucilagem (setas). Observou-se a redução do vacúolo (V). **Figuras 29-30.** MO em fluorescência (filtro de excitação 340-380 nm). Seção transversal do material fresco da folha madura de uma planta jovem. Teste com o traçador apoplástico HPTS. Observou-se dois planos de foco mostrando a passagem de água (setas) da epiderme (ep) para as células compartimentadas, indicando a função de armazenamento de água pela mucilagem. Isso não ocorria nas demais células parenquimáticas do mesofilo (PC).



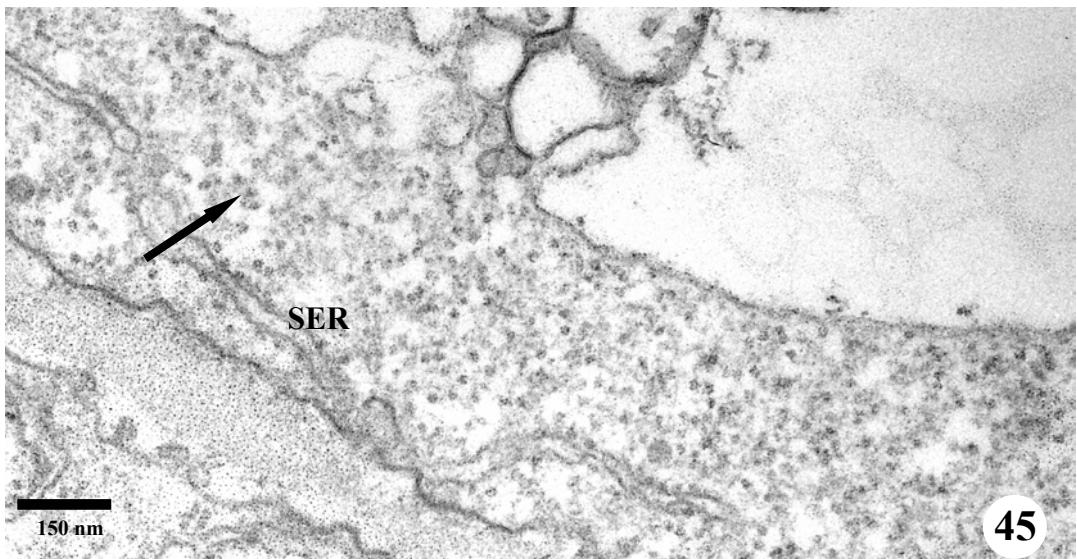
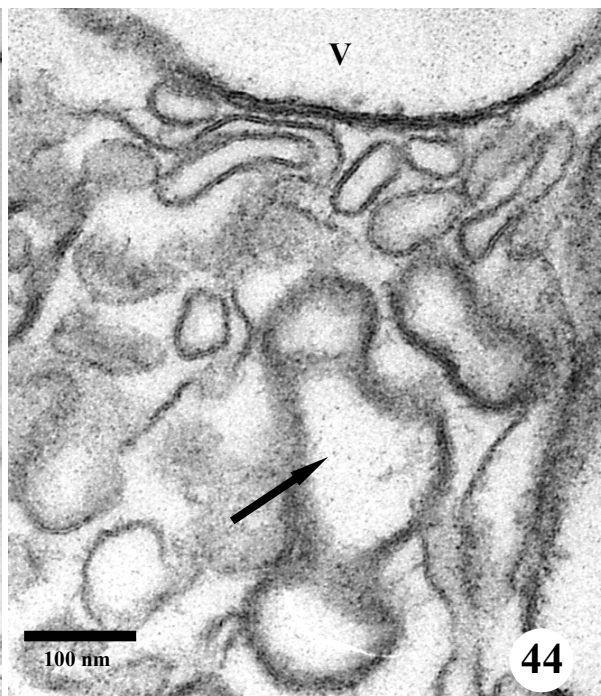
**Figuras 31-34.** Microscopia eletrônica de transmissão (MET). Estádio 1A. **Figura 31.** Células compartimentadas imaturas apresentando aumento de volume. Núcleo de cromatina mais densa em relação às células vizinhas. O vacuoma apresentava-se mais desenvolvido (setas). **Figura 32.** Ocorrência de várias mitocôndrias (M), dictiossomas (D), retículo endoplasmático liso (SER) distribuídos pelo citoplasma e grãos-de-amido ocupando quase todo o volume do cloroplastídeo sem tilacóides (P). V= vacúolo. **Figura 33.** As mitocôndrias não apresentavam microvilosidades bem definidas. O dictiossomo era constituído por 6-8 cisternas. Observou-se a presença de uma cisterna *trans* do dictiossomo (seta) de forma anelar, englobando vesículas. O retículo endoplasmático rugoso (RER) era curto e paralelo à plasmalema. **Figura 34.** Havia formação de pequenos vacúolos oriundos do SER (seta maior), ao qual se fundiam ou eram englobadas vesículas dictiossômicas e corpos multivesiculares (setas menores).



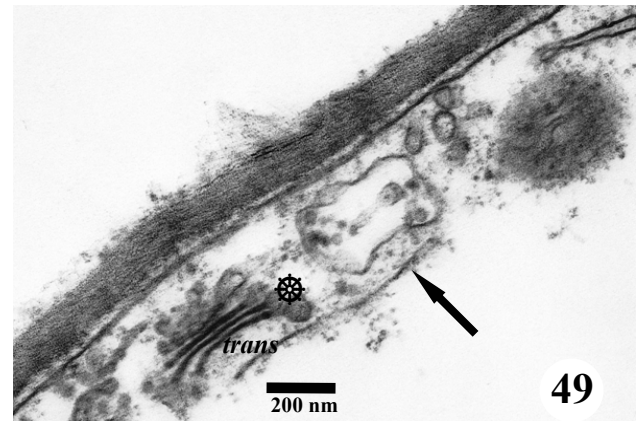
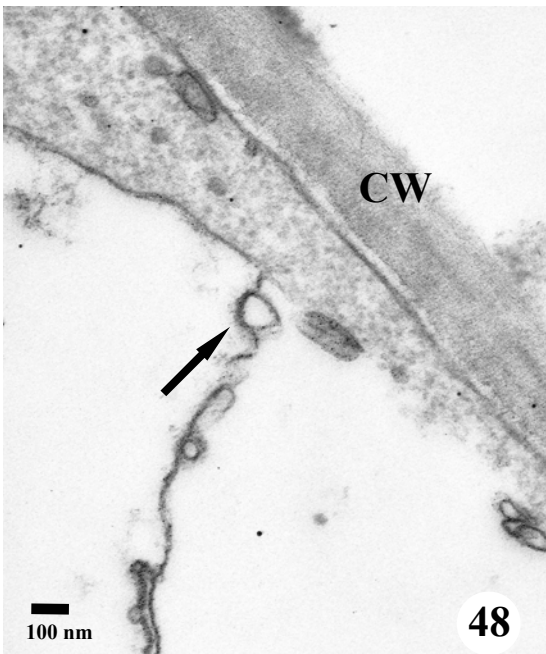
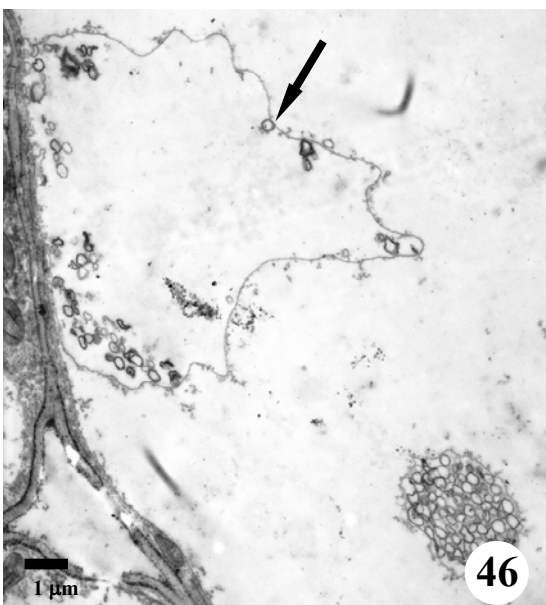
**Figuras 35-36.** MET. Estádio 1A. **Figura 35.** Dictiossomo (D) liberando muitas vesículas (seta) em direção à parede (CW), indicando crescimento celular. As mitocôndrias (M) eram abundantes. **Figura 36.** Numerosos e pequenos RER estavam dispostos paralelos à plasmalema (seta). **Figuras 37-38.** Estádio 1B. **Figura 37.** Os pequenos vacúolos formados do SER pareciam se fundir, aumentando de volume (setas). **Figura 38.** A atividade dos dictiossomos aumentou, originando vesículas que ampliavam de volume originando “grupos vesiculares” no citoplasma (seta).



**Figuras 39-42.** MET. Estádio 1B. **Figura 39.** Os dictiossomos (D), próximos ao núcleo (N), também liberavam vesículas diretamente ao vacúolo (V) (setas). **Figura 40.** O cloroplastídio (Ch) apresentava tilacóides delgados com grana pouco desenvolvidos (seta). O volume dos grãos-de-amido (S) era reduzido. **Figura 41.** Peroxissomos (Pe) estavam presentes. **Figura 42.** Nesse estágio, as mitocôndrias (M) apresentavam microvilosidades bem definidas (seta).

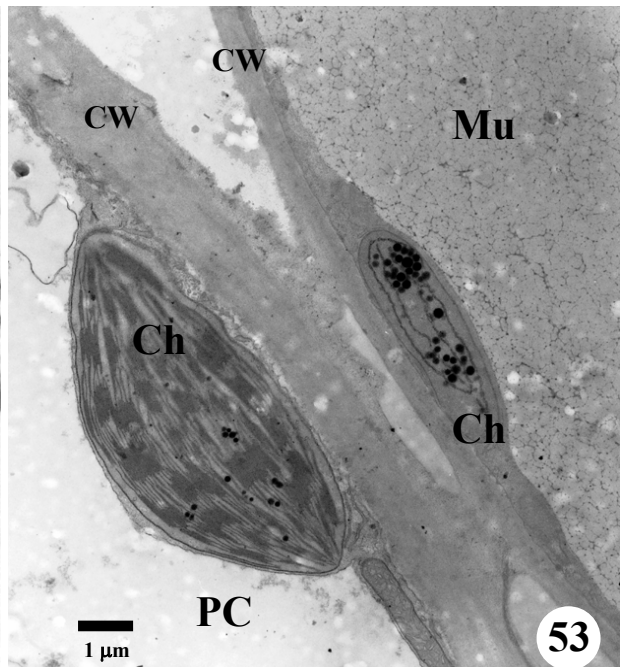
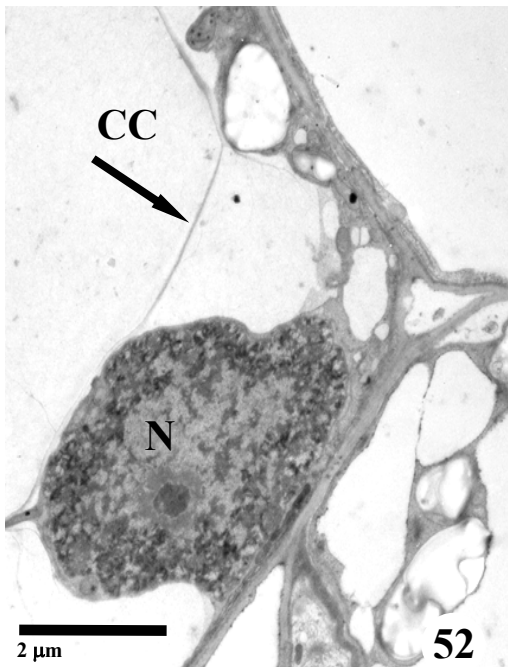
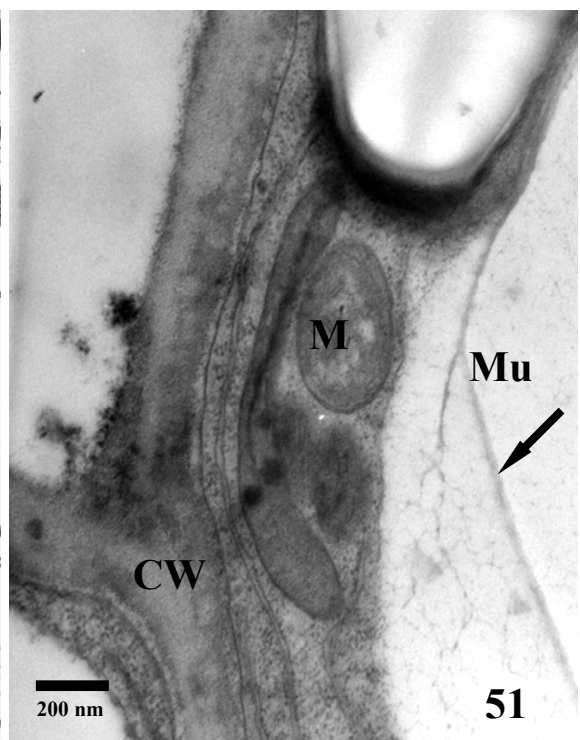
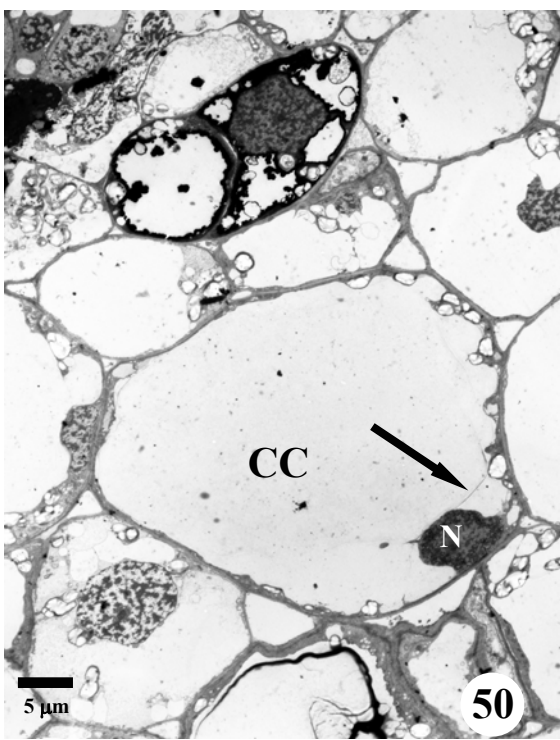


**Figuras 43-45. MET. Estádio 1B. Figura 43.** Os grupos vesiculares, oriundos dos dictiossomas, acrescidos de vesículas derivadas do SER eram direcionados ao vacúolo (seta). **Figura 44.** Detalhe da zona demarcada da figura 43. Os corpos vesiculares (seta) pressionavam o tonoplasto para o interior do vacúolo (V). **Figura 45.** O citoplasma era repleto de ribossomos (seta).

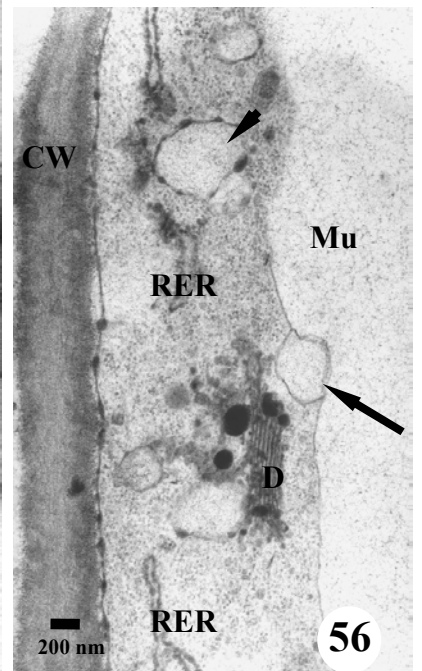
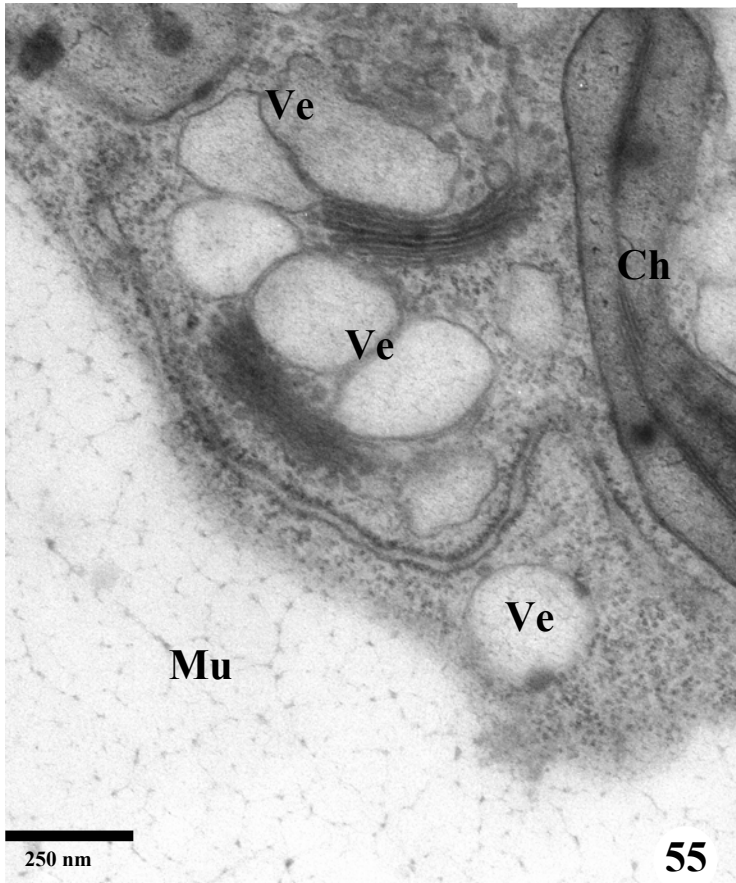
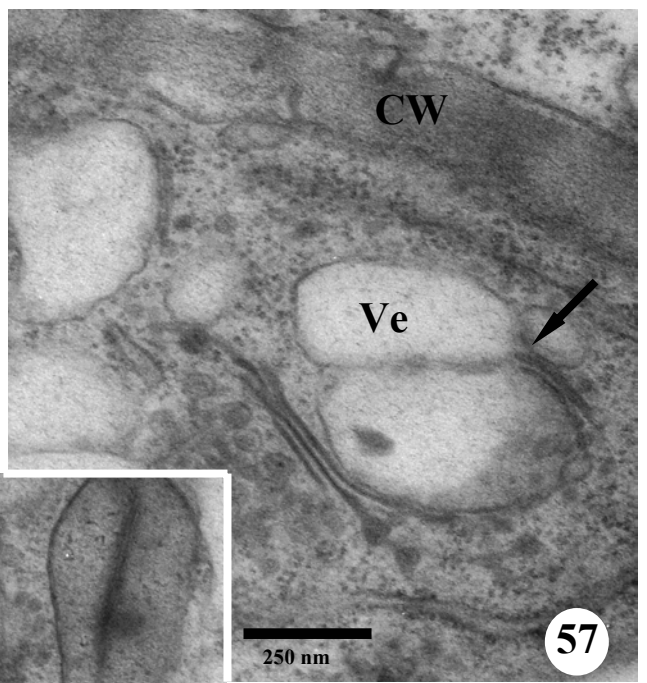
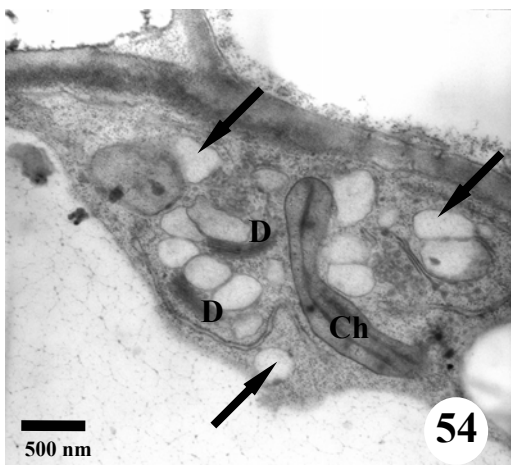


**Figuras 46-49.** MET. Estádio 1B. **Figura 46.** A produção das vesículas era contínua, retraindo o vacúolo. **Figura 47.** O detalhe mostra o tonoplasto retraindo-se para o interior celular, delimitando o espaço a ser preenchido (seta maior). Simultaneamente, ainda havia formação de vesículas do SER (setas menores). **Figura 48.** Vesículas aderiam-se ao tonoplasto (seta). **Figura 49.** O material secretado poderia contribuir com o processo de lise do protoplasto, observando-se a redução das organelas, como o SER (seta). A cisterna *trans* produziam grande quantidade de vesículas secretoras (asterisco).

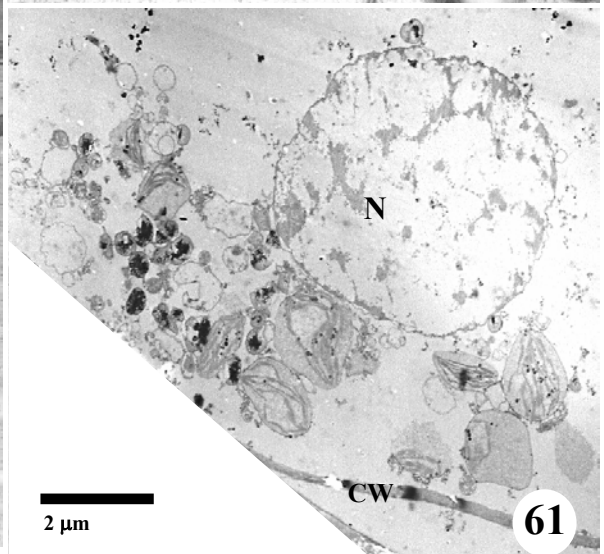
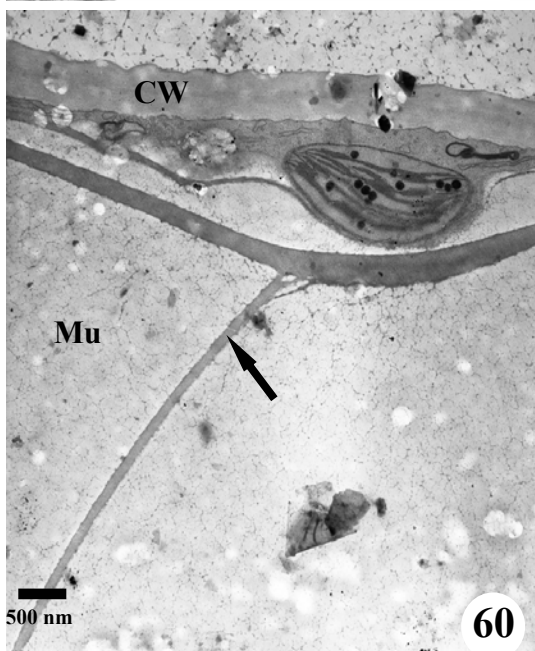
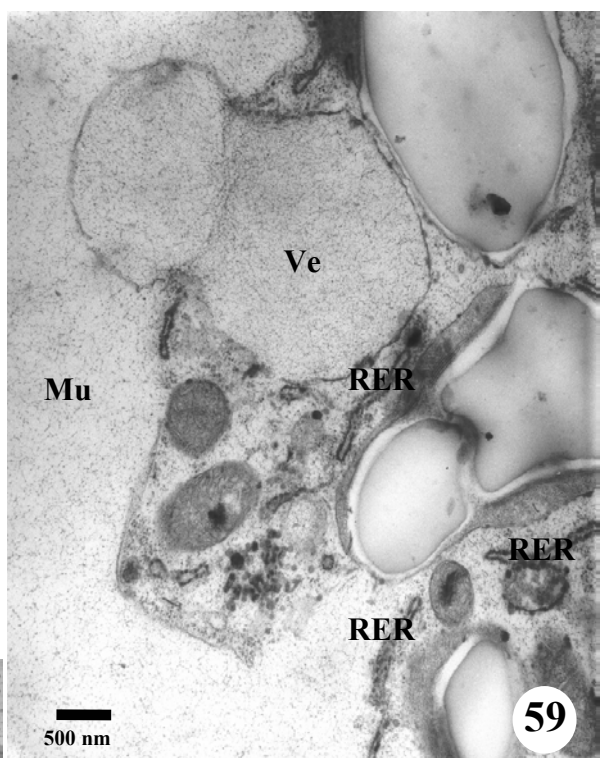
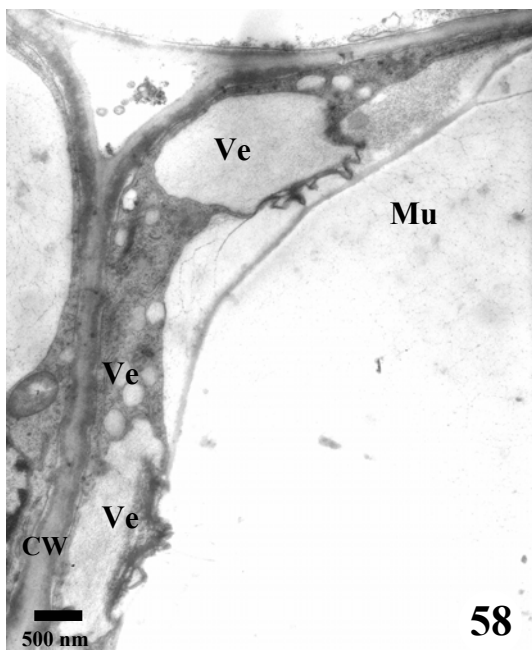




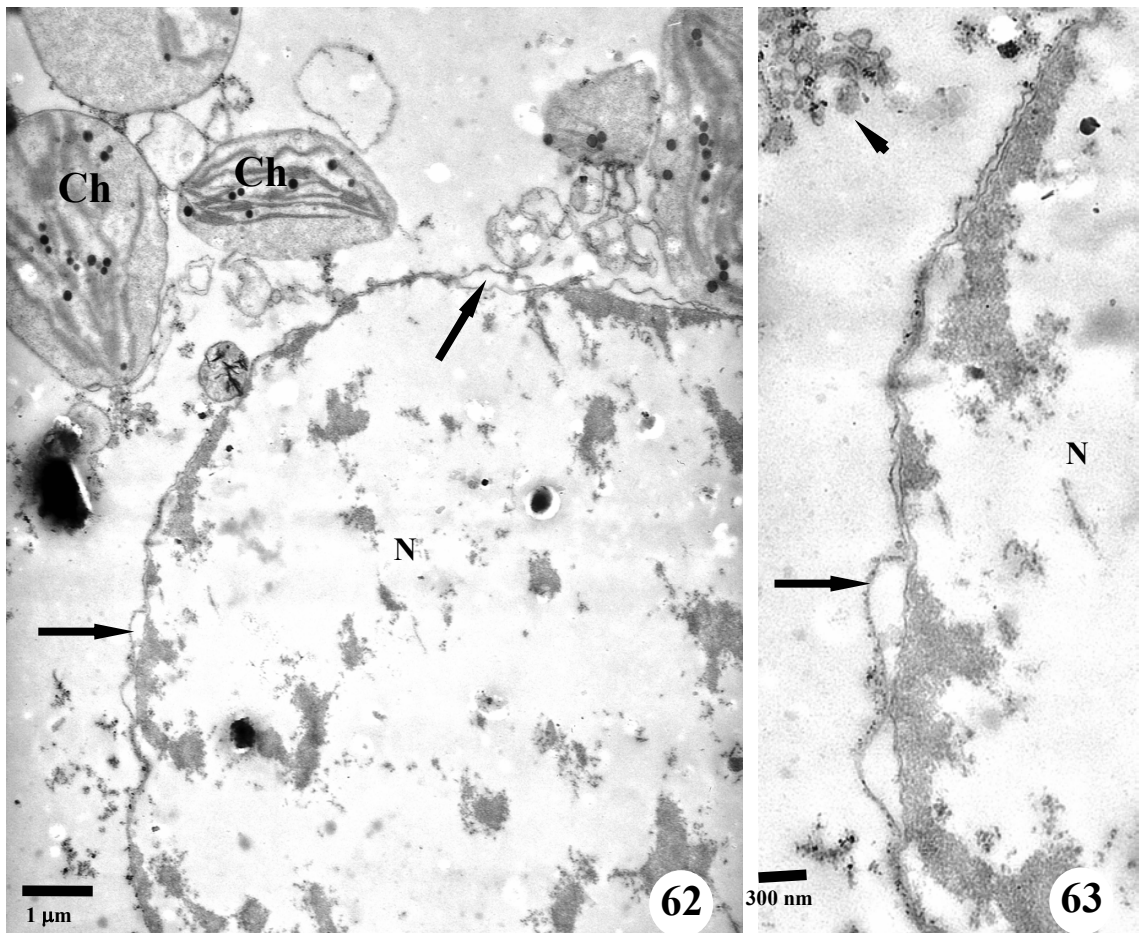
**Figuras 50-53.** MET. Estádio 2. **Figura 50.** Célula compartimentada (CC) com grande volume e núcleo muito denso (N). O vacúolo era praticamente inexistente, sendo substituído pela mucilagem (seta). **Figura 51.** Pôde-se observar que a mucilagem (Mu), além de apresentar um sistema de retículos delgados, formava um sistema de lamelas mais espesso situado paralelamente ao citoplasma (seta). CW = Parede celular. **Figura 52.** Detalhe do núcleo com cromatina densa (N). **Figura 53.** Comparação dos cloroplastídios (Ch) entre uma célula compartimentada e uma célula parenquimática (PC) no mesófilo. Observou-se que o cloroplastídio da célula compartimentada era caracterizado pela redução dos tilacóides e grana. Gotas de óleo eram mais abundantes.



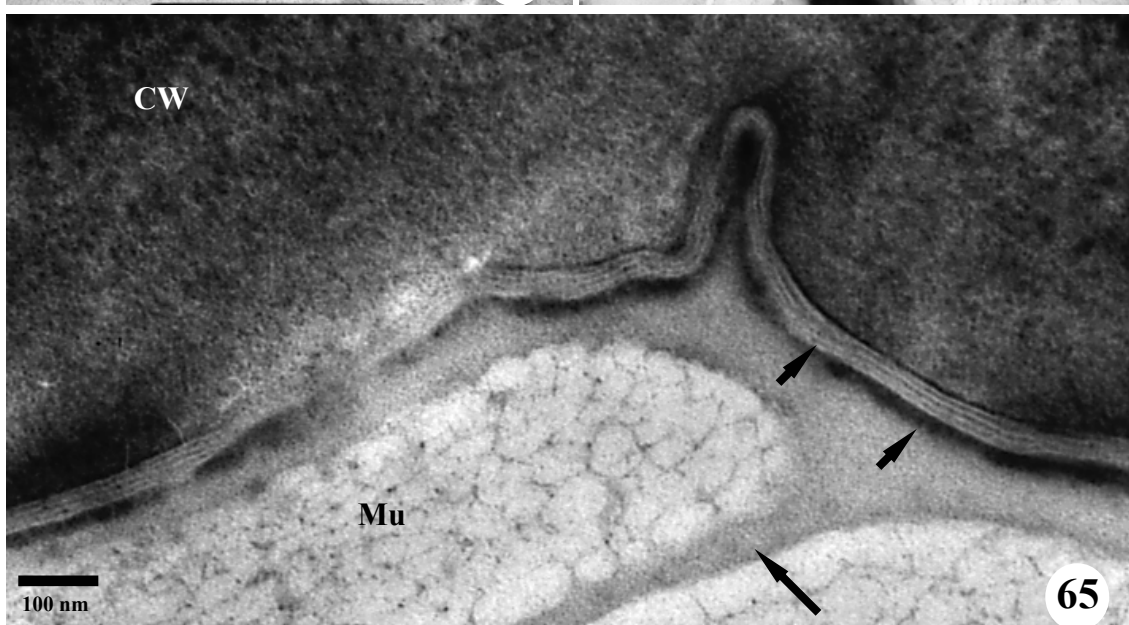
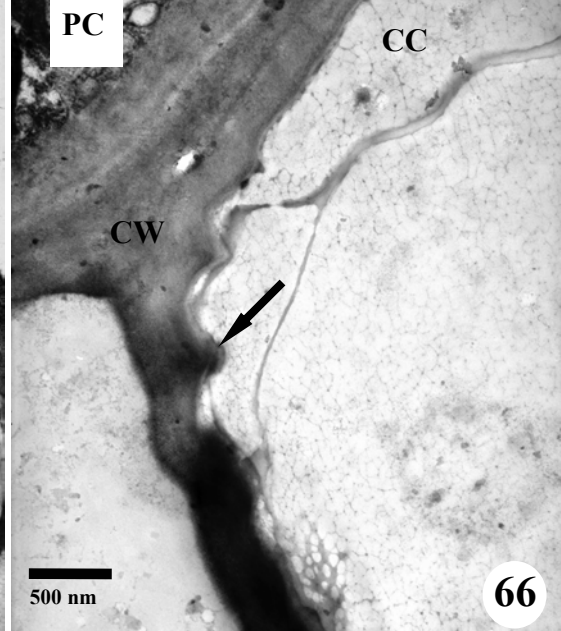
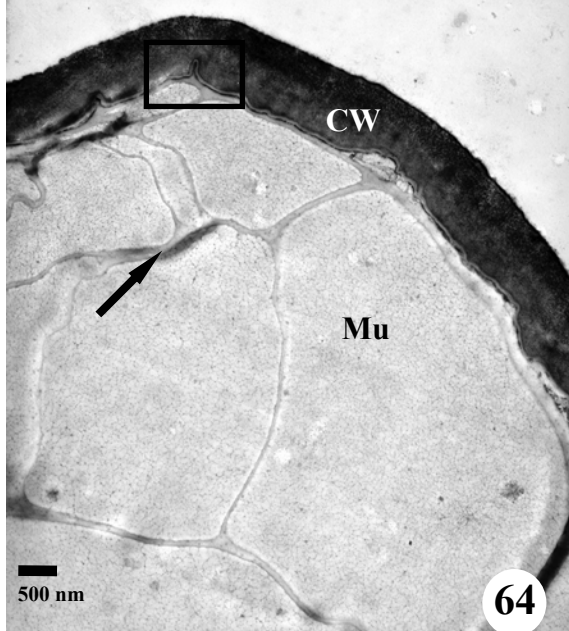
**Figuras 54-57. MET. Estádio 2. Figura 54.** Os dictiossomos (D) estavam em alta atividade liberando vesículas que aumentavam de volume e em quantidade (setas). Os cloroplastídios ainda estavam presentes (Ch). **Figura 55.** As vesículas (Ve) eram preenchidas com material polissacarídico semelhante a mucilagem (Mu) secretada. **Figura 56.** Vesículas originadas do RER mantêm os ribossomos marginais distanciados pela expansão de seu lume, contribuindo com a síntese protéica da mucilagem (seta menor). As vesículas originadas dos dictiossomos eram direcionadas ao interior da célula, onde a membrana vesicular se desintegrava, liberando seu conteúdo (seta maior). **Figura 57.** Algumas vesículas parecem ser originadas diretamente de uma dilatação das cisternas do dictiossomo, pela aparente redução do número de cisternas dessa organela (seta).



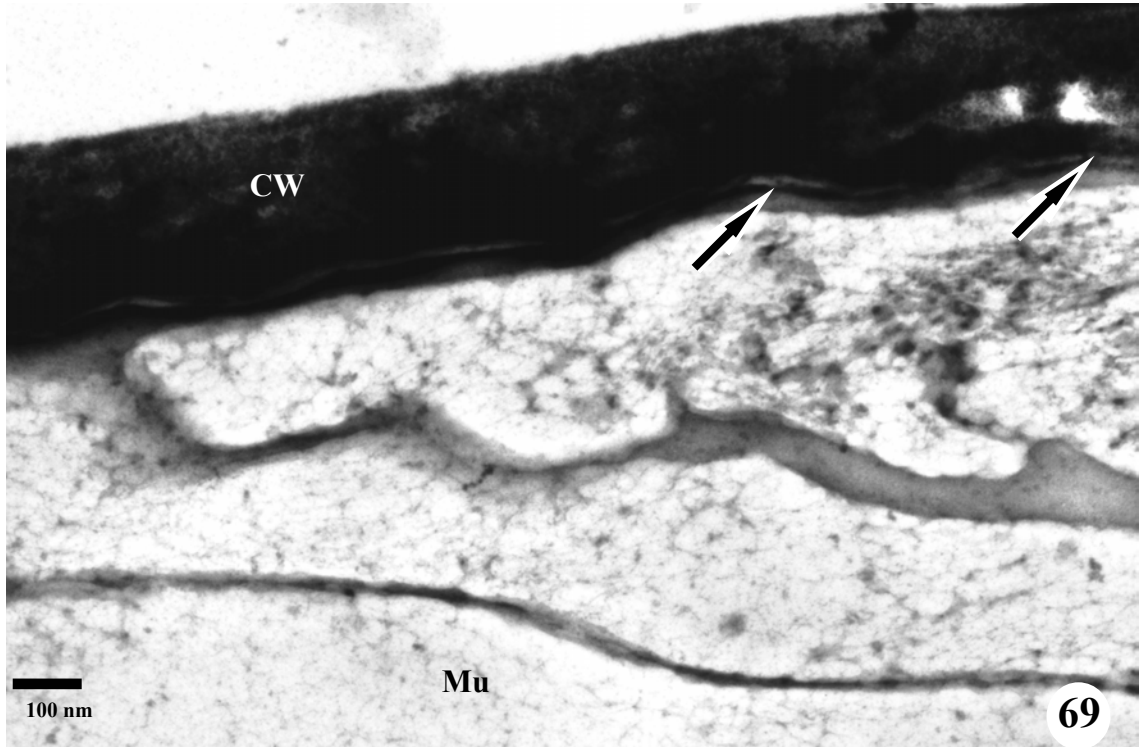
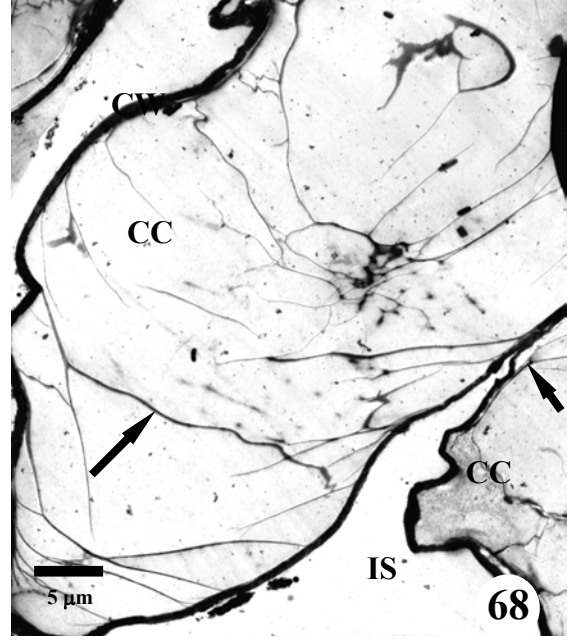
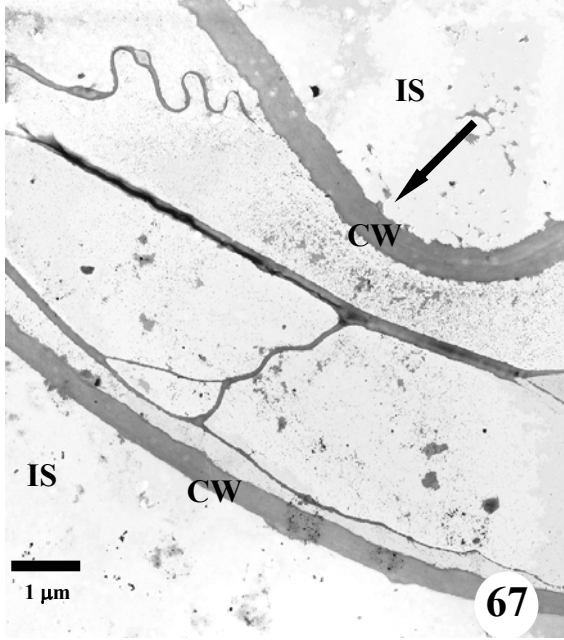
**Figuras 58-59.** MET. Estádio 2. **Figura 58.** Eram formadas vesículas gigantes (Ve), ocupando, significativamente, o volume do citoplasma. Mu= mucilagem. **Figura 59.** Detalhe de uma vesícula gigante, dissociando-se para liberação de seu conteúdo. Observou-se muitos RERs, distribuídos no citoplasma. **Figuras 60-61.** MET. Estádio 3. **Figura 60.** Engrossamento e ramificação das lamelas na mucilagem (seta). CW= parede celular. **Figura 61.** A matriz do citoplasma era desfeita e as organelas restantes foram dispersas.



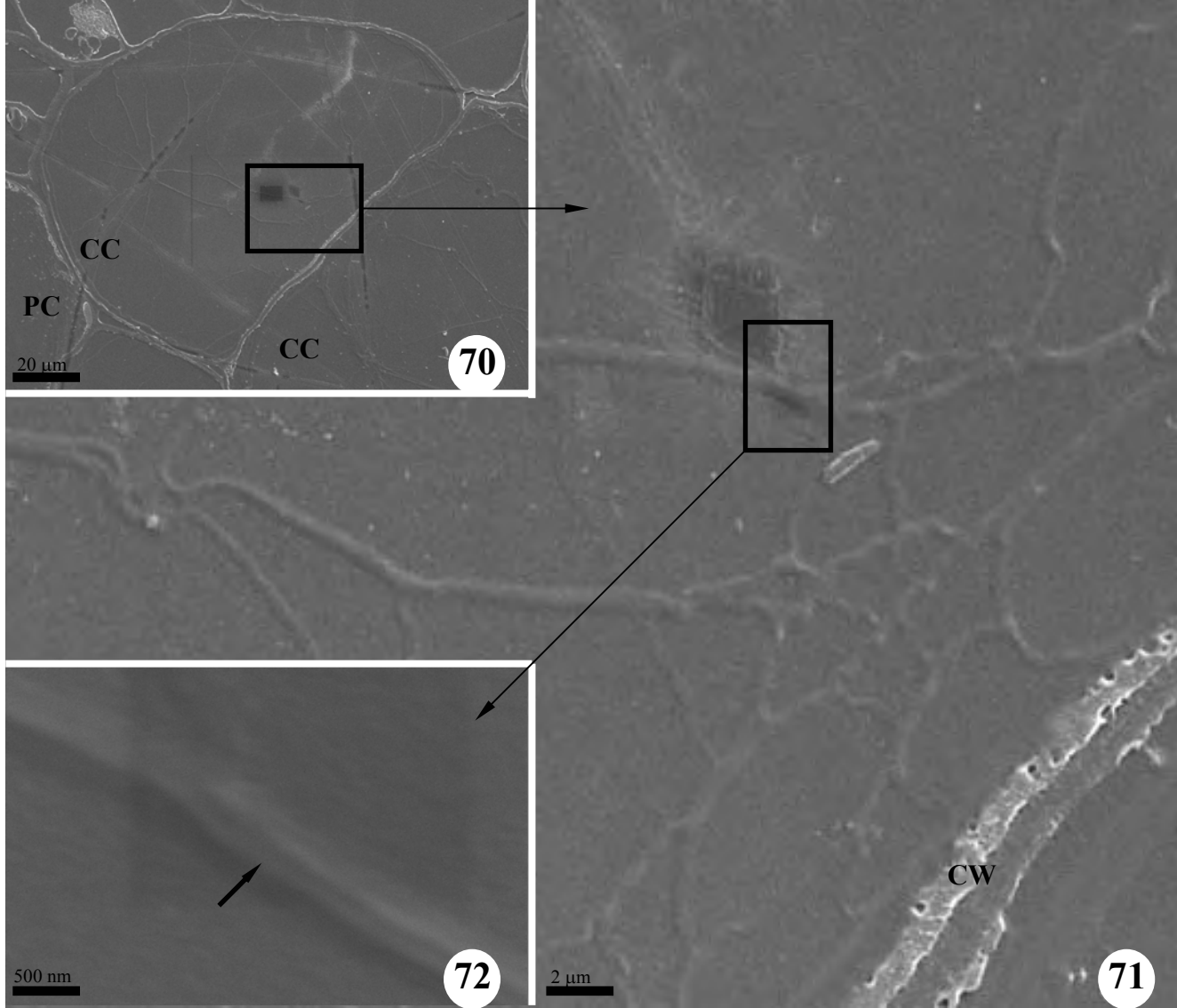
**Figuras 62-63.** MET. Estádio 3. Detalhe do núcleo (N). **Figura 62.** O núcleo apresentava uma cromatina rarefeita e decromatizada, além da dissociação da membrana nuclear (setas). Os cloroplastídios (Ch) ainda ocorriam, mas em processo de degeneração. **Figura 63.** Detalhe da dissociação da membrana nuclear (seta maior). Os dictiossomos (D) eram muito reduzidos, com cerca de três cisternas, ao mesmo tempo que ainda liberavam vesículas (seta menor).



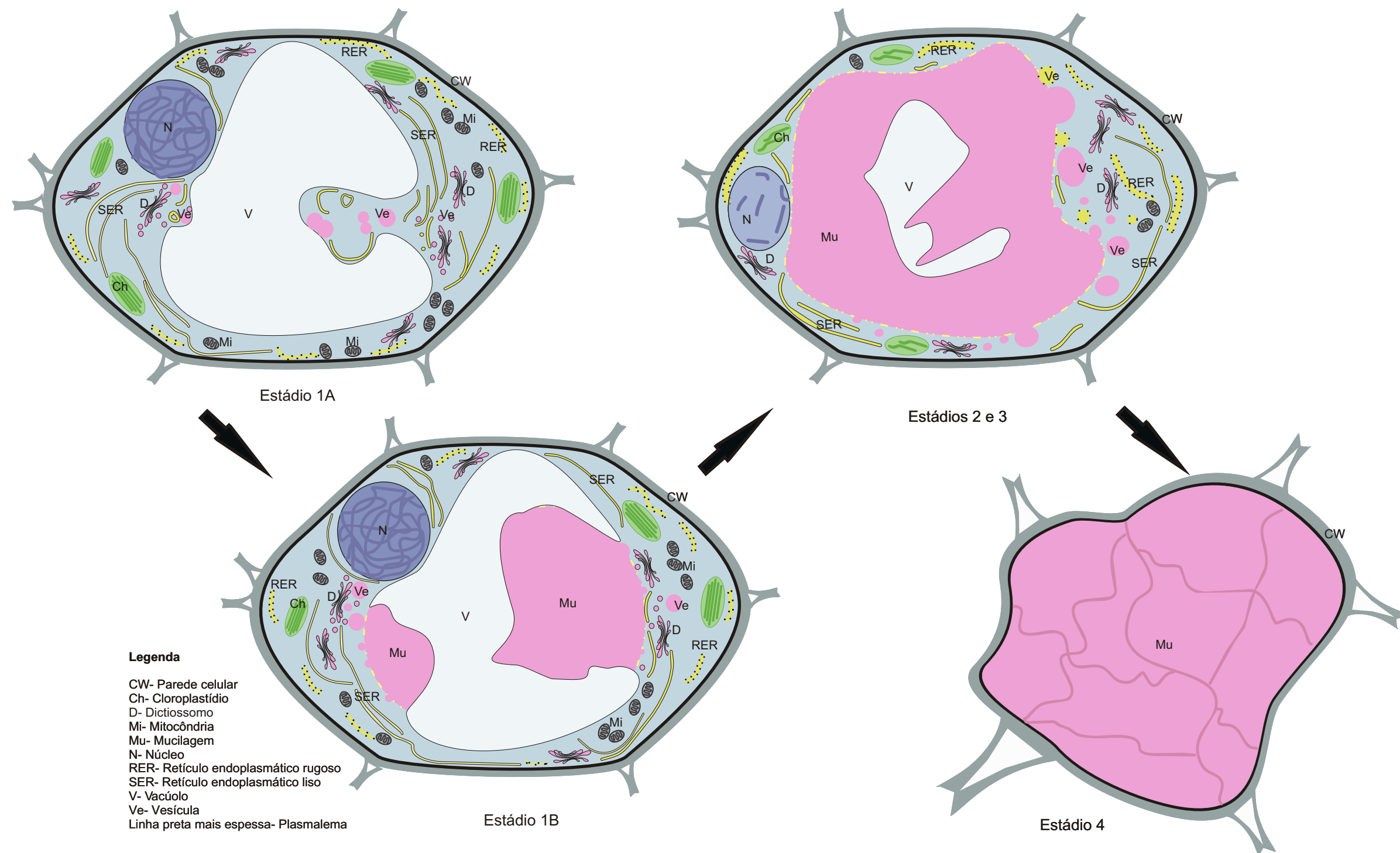
**Figuras 64-66.** MET. Estádio 4. Célula compartimentada da folha madura de uma planta jovem. **Figura 64.** A célula compartimentada foi preenchida com mucilagem (Mu) constituídas por lamelas (seta). A parede celular (CW) tornou-se mais eletrodensa. **Figura 65.** Detalhe da figura 64 (região demarcada). A mucilagem se apresentava com lamelação que circunscrevia grandes áreas reticuladas (seta maior). Adjacentes à plasmalema, estavam presentes camadas mais ou menos eletrodensas. Essas camadas foram atribuídas a resquícios protoplasmáticos ou enovelados de membranas agregados à plasmalema (setas menores). **Figura 66.** Detalhe da parede celular (CW) de uma célula compartimentada (CC) apresentando ondulações na face interna (seta). Foi observada a diferença de eletrodensidade entre a célula compartimentada e uma célula parenquimática vizinha (PC).



**Figuras 67-69.** MET. Estádio 4. Células compartimentadas da folha madura do indivíduo adulto. **Figura 67.** A célula compartimentada perdeu sua forma poligonal, apresentando-se retorcida ou achatada (seta). Há um aumento nos espaços intercelulares (IS). CW= parede celular. **Figura 68 e 69.** Contrastação com permanganato de potássio ( $\text{KMnPO}_4$ ). **Figura 68.** Essa contrastação possibilitou visualizar uma maior eletrodensidade nos compostos polissacarídicos, como as lamelas da mucilagem (seta maior). As células compartimentadas, normalmente, eram unidas com outra célula vizinha apenas em algumas zonas da parede celular (seta menor). **Figura 69.** Detalhe de uma célula compartimentada, onde observou-se a permanência de uma camada mais eletrodensa junto à parede (setas). A parede celular (CW) reagiu intensamente com  $\text{KMnPO}_4$ . Mu= mucilagem.

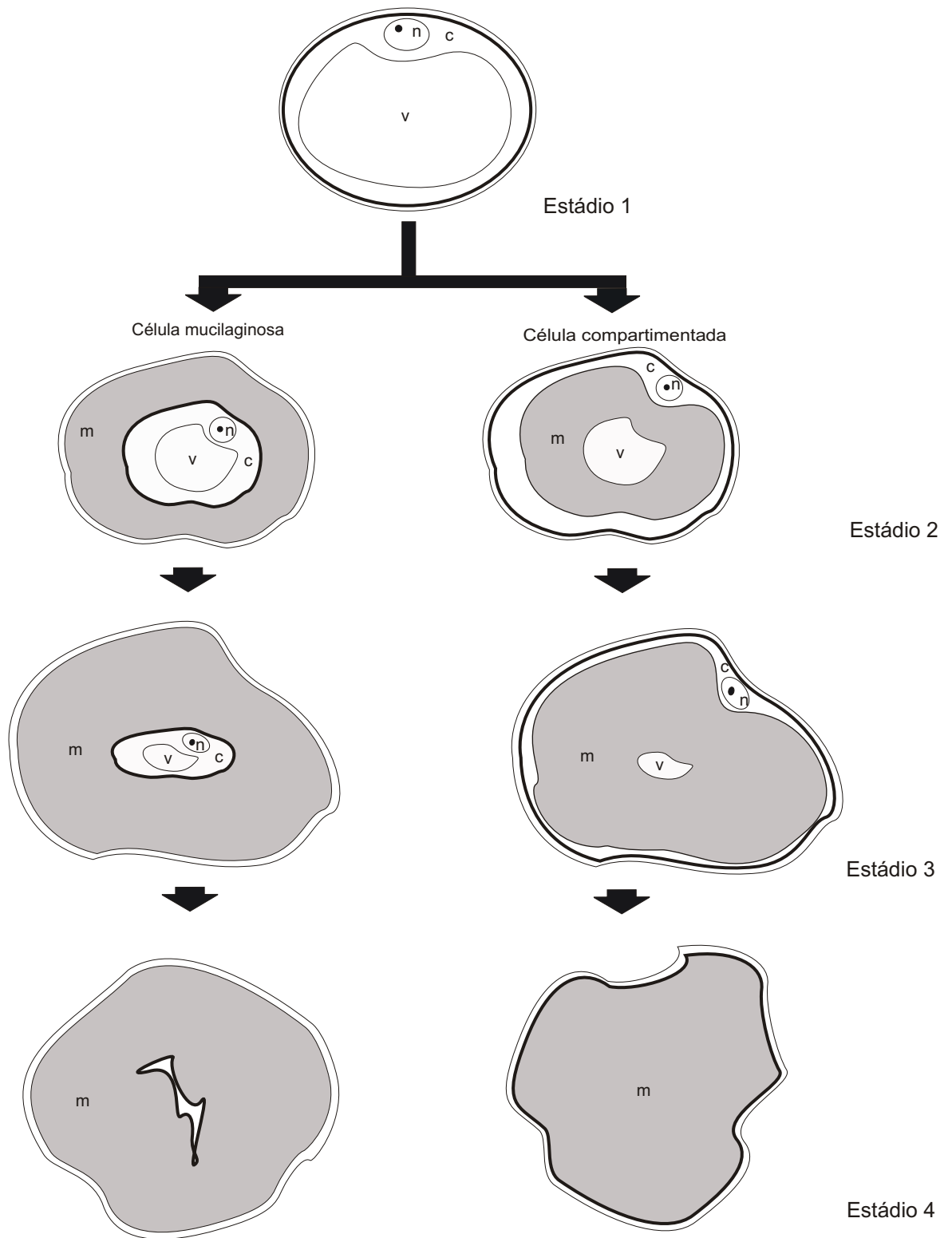


**Figuras 70-72.** Microscopia eletrônica de varredura. Estádio 4. Imagem obtida após retirada da resina Spurr com uma solução saturada de hidróxido de sódio com etanol absoluto. **Figura 70.** Aspecto geral das células compartimentadas (CC) no estágio 4. **Figura 71.** Detalhe de uma região da célula compartimentada, demonstrando as lamelas formadas pela mucilagem. Pôde-se observar também os retículos mais delgados da secreção. A parede celular (CW) demonstrou perda na uniformidade. **Figura 72.** Maior magnificação da região das lamelas de mucilagem, onde pôde-se observar mais de uma deposição lamelar (seta).



**Figura 73.** Representação não-proporcional dos estádios de desenvolvimento das células compartimentadas. Estádio 1A: Início da secreção polissacarídica através de vesículas dos dictiossomos, as quais pressionavam o vacúolo para o interior da célula, assim como o SER. Estádio 1B: O vacúolo começava a ser delimitado pela mucilagem, que, por sua vez, preenchia continuamente o citoplasma. Os dictiossomos tornaram-se mais ativos, liberando muitas vesículas. O vacúolo se reduzia gradativamente. Estádios 2 e 3: As vesículas do Golgi aumentavam de volume e o RER originava vesículas que contribuíam com a constituição protéica da mucilagem. A quantidade protoplasmática diminuía, começando a apresentar sinais de degeneração nos sistemas de membranas. Estádio 4. A secreção de mucilagem preenchia completamente a célula, apresentando uma rede de lamelas pécticas mais espessas as quais envolviam um sistema reticulado mais delgado. Em algumas regiões, foram observados resquícios protoplasmáticos.





**Figura 74.** Representação demonstrando os estádios de desenvolvimento de uma célula compartimentada em comparação com uma célula mucilaginosa hipotética. No estágio 1, estas células são originadas de células parenquimáticas, as quais aumentavam de volume. No estágio 2, a secreção nas células mucilagosas se dá entre a plasmalema e a parede celular, enquanto que nas células compartimentadas, a secreção era liberada entre o vacúolo e protoplasto. No estágio 3, observou-se que as células compartimentadas aumentavam ainda mais o seu volume, caracterizadas por um protoplasto muito reduzido e com a mucilagem preenchendo quase toda a célula. Nas células mucilagosas de diversas famílias ocorre o mesmo. No estágio 4, a perda do contorno poligonal era mais evidente nas células compartimentadas do que em células mucilagosas, observando-se resquícios protoplasmáticos em algumas regiões adjacentes à plasmalema tanto nas células compartimentadas, como nas células mucilagosas. n= núcleo; c=citoplasma; v=vacúolo; m=mucilagem; linha mais espessa=plasmalema.

A watercolor illustration of a forest scene. In the foreground, several tall, slender tree trunks with textured bark stand vertically. The background is filled with a dense canopy of green foliage, interspersed with clusters of small, vibrant pink flowers. The overall style is soft and painterly, with visible brushstrokes and a gentle color palette.

## **CAPÍTULO 3**

Imunocitoquímica das células mucilaginosas em folhas imaturas e maduras de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae)

## ***Introdução***

Vários autores descreveram algumas células incomuns no mesofilo do gênero *Araucaria* Juss. como células de grande volume e rara presença de cloroplastídios, sugerindo uma função de armazenamento de água (Baker e Smith 1910, Griffith 1950, Vasiliyeva 1969, Monteiro *et al.* 1977). Entretanto, Bamber *et al.* (1978), observaram que essas células apresentavam partições de natureza péctica, que subdividiam o lume celular, formando numerosos compartimentos. Por causa dessas partições reticuladas, os autores as denominaram de "células compartimentadas". Os autores sugeriram que essas células estariam relacionadas ao armazenamento de carboidratos.

Entretanto, as características citológicas observadas durante os estádios de desenvolvimento, descritas no capítulo anterior, levaram a crer que as células compartimentadas seriam um tipo de célula de mucilagem. Sabe-se que as células de mucilagem foram amplamente descritas e estão presentes em diversas famílias, como Lauraceae (Bakker e Gerritsen 1989, Bakker *et al.* 1991), Cactaceae (Trachtenberg e Fahn 1981, Trachtenberg e Mayer 1981, 1982), Malvaceae (Bakker e Gerritsen 1992), assim como muitas suculentas (Fahn 1979).

Além disso, os resultados observados através do uso do traçador apoplástico HPTS e demais testes histoquímicos, descritos no Capítulo 2, indicaram a função de armazenamento e translocação de água, confirmando as descrições propostas por Baker e Smith (1910), Vasiliyeva (1969) e Mastroberti e Mariath (2003).

As funções descritas para as células mucilaginosas são, basicamente, além do armazenamento de água, adesivo para dispersão de sementes, regulação da germinação, captura de insetos pelas plantas carnívoras, lubrificante do ápice radicular em crescimento, reflexão dos raios solares e captação da umidade do ar quando secretadas pelos tricomas ou células epidérmicas (Fahn 1987, Bredenkamp e Van Wyk 1999). Trachtenberg e Mayer (1981a, 1982b) sugeriram que em *Opuntia ficus-indica* a principal função da mucilagem seria o controle do cálcio, através de uma ação quelante ou tamponante desses sais, e que, o controle hídrico se apresentaria como uma função secundária.

As mucilagens se unem facilmente a sais de cálcio ou magnésio, além de serem muito solúveis em água (Guignard *et al.* 1985). O gel pode ser bem estruturado, onde as cadeias, durante o processo de geleificação, formam zonas de junção pontuais (Bruneton 1993).

De acordo com Esau (1965) e Fahn (1979), os polissacarídeos contribuem para a resistência à seca. É notório que as pectinas possuem uma natureza hidrofílica e, essas substâncias são a base da composição de mucilagem.

Os polissacarídeos pécticos incluem três classes: os ácidos poligalacturônicos (PGA), ramnogalacturanos I (RG-I) e ramnogalacturanos II (RG-II). Os PGAs algumas vezes são referidos como ácidos homogalacturônicos (HGA), no qual são polímeros não-ramificados de ácidos galacturônicos (Krishnamurthy 1999, Scheller *et al.* 1999, Pérez *et al.* 2000).

Os HGAs são intercalados pelas ramnosos (cadeias laterais que formam os RGs), formando uma estrutura em ziguezague. As ramnosos (cerca de 50%) ancoram cadeias laterais de outros açúcares neutros compostos por arabinanos e galactanos (Krishnamurthy 1999). A concentração destas cadeias apresenta reduzido grau de ramificação e diminui a habilidade das pectinas formarem géis tipo rede, ou seja, géis mais resistentes. Entretanto, aumenta a capacidade de ligarem-se a água (Jones *et al.* 1997).

É geralmente aceito que as pectinas sejam sintetizadas e polimerizadas na zona *cis* do Golgi, onde são altamente metil-esterificadas na zona média e substituídas por cadeias laterais nas cisternas *trans* do Golgi (Micheli 2001). A metil-esterificação de grupos carboxílicos evita que as pectinas, recentemente secretadas, formem ligações com cálcio. A redução ou perda da esterificação induz a capacitação destas ligações. Os ácidos pécticos associados com o cálcio formam junções em determinados pontos da molécula, formando os “egg-box”, ou géis mais rígidos (Jarvis 1984, Bruneton 1993).

O grau de esterificação das pectinas varia muito e, na mesma parede celular de uma célula, há vários domínios onde esse grau é modificado. Morris *et al.* (2000), teoricamente, colocaram que o grau de esterificação (DE, “degree esterification”) poderia atingir de 0-100%. Pectinas com grau de esterificação  $DE > 50\%$  foram conhecidas como altamente metil-esterificadas (HM) e as de  $DE < 50\%$ , pectinas pouco metil-esterificadas. Esse grau de metil-esterificação e a mudança na molécula péctica eram importantes às propriedades funcionais da parede celular vegetal. Os autores concluíram que o DE influenciaria nas propriedades hidrodinâmicas da célula vegetal.

Assim, as pectinas, em geral, possuem um importante papel fisiológico, contribuindo para a hidratação, força e flexibilidade das paredes celulares de órgãos não-lignificados, amadurecimento dos frutos, sinalização em resposta a ferimentos e à interação hospedeiro-patógeno, efeitos morfogenéticos (efeito regulatório na ação

hormonal e síntese) e adesão intercelular. Logo, poderiam ser consideradas não somente como um polímero estrutural, mas como o principal polímero informativo da parede celular vegetal, devido a sua influência na regulação de entrada de cálcio e, por sua vez, regulando a permeabilidade da plasmalema (Cutsem e Messiaen 1994).

Os estudos baseados na extração química das pectinas dão resultados incompletos, acrescentando pouca ou nenhuma informação a respeito do grau de metil-esterificação e, tampouco, a causa de suas alterações químicas durante o crescimento celular. Por isso, estudos imunocitoquímicos vêm contribuindo para o estudo de identificação e definição da regulação espacial das pectinas entre as células e no apoplasto.

Inúmeros estudos imunocitoquímicos foram realizados em diversas plantas, demonstrando que durante a expansão celular, observou-se alterações na esterificação de pectinas (Fujino e Itoh 1998, Sutherland *et al.* 1999, Bush *et al.* 2001), na concentração e presença de galactanos e arabinanos (Jones *et al.* 1997 Bush *et al.* 2001, Willats *et al.* 2001) e nas ligações com cálcio (Liners *et al.* 1994, His *et al.* 1997).

Anticorpos monoclonais (MAbs) são importantes ferramentas para demonstrar a localização espacial de diferentes componentes pécnicos da parede celular (Knox 1997). Entretanto, pouco se sabe a respeito da constituição destes componentes nas mucilagens, além daquelas secretadas em sementes, como em *Arabidopsis thaliana* (Willats *et al.* 2001).

Neste estudo, foram utilizados seis MAbs para se examinar a distribuição de diferentes epitopos pécnicos e proteínas arabinogalactanos, tanto nas paredes celulares, como na mucilagem secretada das células mucilaginosas em folhas imaturas e maduras de *Araucaria angustifolia*, sob microscopia óptica de fluorescência. Os MAbs utilizados foram JIM 5, JIM 7 e JIM 13 que reconhecem, respectivamente, homogalacturanos (HGA) com reduzida metil-esterificação, HGA de alta metil-esterificação e proteínas arabinogalactanos (AGPs), 2F4 que reconhece ligações de cálcio com HGA, e os anticorpos LM5 e LM6 que reconhecem, respectivamente, galactanos e arabinanos.

## ***Material e métodos***

### ***Coleta dos pinhões, plantio e coleta das folhas***

Essas etapas foram realizadas, conforme descrito no Capítulo 2.

### ***Processamento do material para Imunofluorescência***

Os ápices caulinares e a porção mediana das folhas maduras de plantas jovens foram seccionadas em pequenas porções de, aproximadamente, 1 mm<sup>3</sup>. Utilizaram-se aquelas folhas que apresentavam células mucilaginosas nos estádios 1, 2 e 4, conforme a **Tabela 1** do Capítulo 2. Como essas células se desenvolvem rapidamente, achou-se relevante observar os estádios 1 e 2, os quais representam as folhas imaturas. O estágio 3 foi suprimido, uma vez que o estágio 4 caracteriza melhor a fase madura das folhas. Posteriormente, fixou-se o material em glutaraldeído 0,2%, formaldeído 2%, Triton X100 0,02% em tampão fosfato de sódio pH 7,2 25 mM (Freshour *et al.* 1996), num período máximo de 2 horas. Em seguida realizou-se a lavagem em tampão fosfato de sódio pH 7,2 25mM e, posteriormente, em água destilada. O material foi desidratado em uma série etílica ascendente (20, 30, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%), colocando-o em pré-infiltração numa solução de proporção 1:1 de etanol absoluto e LR White “Hard Grade” (London Resin Company) por 8 horas. Para a infiltração realizaram-se três trocas de LR White pura por um período de, aproximadamente, 8 horas cada etapa, deixando polimerizar em cápsulas de gelatina por 24 horas, no máximo, em estufa a 50°C.

Para a obtenção de seções semifinas (350-500 nm), seccionou-se o material em Ultramicrótomo Leica Ultracut UCT, utilizando-se navalha de vidro (confeccionadas em Knifemaker Leica EM KMR2), em seguida, aderindo-as em lâminas de vidro recobertas com poli-L-lisina (Sigma). As seções observadas em campo claro foram coradas com Azul de Toluidina O (C.I. 52040) 1% pH 8-9 (Souza 1998).

### ***Anticorpos monoclonais (MAbs) utilizados***

As seções foram marcadas com os anticorpos monoclonais JIM 5, JIM 7, JIM 13, LM5 e LM6 (cedidos pelo Dr. Keith Roberts, John Innes Centre e Dr. Paul Knox, Centre for Plant Sciences, University of Leeds, UK) e 2F4 (cedido pelo Dr. Françoise Liners, Unité de Recherche en Biologie Cellulaire Végétale, BE), os quais reconhecem os seguintes epitopos (**Tabela 1**):

**Tabela 1. Reconhecimento dos anticorpos monoclonais aos diferentes epítopos**

Denominação	Epítipo	Referência
<b>JIM 5</b>	Homogalacturano (HGA) com metil-esterificação acima de 40%, com padrão indefinido.	VandenBosh <i>et al.</i> (1989); Knox <i>et al.</i> (1990); Willats <i>et al.</i> (2000).
<b>JIM 7</b>	HGA com metil-esterificação entre 15-80%.	Knox <i>et al.</i> (1990); Willats <i>et al.</i> (2000).
<b>JIM 13</b>	Proteínas arabinogalactanos.	Knox <i>et al.</i> 1991
<b>2F4</b>	Conformação cálcio-dependente, de pelo menos nove resíduos de ácidos galacturônicos.	Liners <i>et al.</i> (1989); Liners e Van Cutsem (1992).
<b>LM 5</b>	(1→4)-β-D-galactano.	Jones <i>et al.</i> (1997).
<b>LM 6</b>	(1→5)-α-L-arabinano.	Willats <i>et al.</i> (1998).

***Incubação das seções para a Imunofluorescência***

1. Hidratação das seções com PBS (tampão fosfato salino pH 7,1; Harris 1994) por 10 min.
2. Bloqueio com uma solução centrifugada de leite em pó desnatado 3% em PBS por 45 min.
3. Incubação com o anticorpo primário, diluído em uma solução 1:1 com PBS por 1-2 horas. Esta etapa não foi efetuada para o controle.
4. Três lavagens de 5 min/etapa com PBS.
5. Incubação com o anticorpo secundário diluído em uma solução 1:100 com PBS por 1-2 horas em câmara escura. Utilizou-se Goat antimouse FITC (Sigma), para o material incubado com o anticorpo monoclonal 2F4 e Goat anti-rat FITC (Sigma), para o material incubado com os anticorpos JIM 5, JIM 7, JIM 13, LM 5 e LM 6.
6. Duas lavagens de 5 min/etapa em PBS.
7. Uma lavagem de 5 min em água destilada.
8. Montagem com lamínula em um meio constituído por 0,1% de para-fenilediamina (PPD) (Sigma), 10% de tampão fosfato de sódio 10 mM com 0,15M NaCl e 90% de glicerol.

As seções foram analisadas em epifluorescência no microscópio Leica DM R (filtro de excitação 340-380 nm) e Zeiss Axiophot (filtro de excitação 450-490 nm).

## ***Resultados***

### ***Morfologia das células mucilaginosas de Araucaria angustifolia***

Ainda no ápice caulinar, observou-se um aumento de volume em algumas células do mesofilo, indicando ser a célula mucilaginosa muito jovem (estádio 1). Enquanto as demais células do mesofilo possuíam citoplasma mais denso e ocupavam quase todo o lume, as células mucilaginosas jovens já possuíam um vacúolo central. Estas células atingiam grande volume e eram abundantes. A mucilagem era continuamente secretada, entre o citoplasma e o vacúolo. Em seções paradérmicas as células mucilaginosas formavam uma distribuição seriada, principalmente, na face abaxial (estádio 2). No estágio 3, as células mucilaginosas continuavam abundantes, entretanto, raramente observando-se núcleos. A quantidade citoplasmática diminuiu consideravelmente, reduzindo-se praticamente em torno do núcleo. A delimitação do vacúolo era raramente observada em algumas células, e a secreção tornou-se mais reticulada com a presença de adensamentos que formavam lamelas. Em algumas células, o núcleo já estava ausente. No estágio 4, núcleo e citoplasma degeneravam. A célula era totalmente preenchida de mucilagem péctica constituída de um sistema reticulado envolvido por uma rede mais espessa ou lamelas bem definidas. A forma poligonal das células mucilaginosas dava lugar a um contorno amorfo, com paredes onduladas. Esta morfologia estava presente nas folhas basais das plantas jovens de *Araucaria angustifolia* e nas folhas maduras de indivíduos adultos.

### ***Reconhecimento dos epitopos pécticos entre folhas imaturas e maduras***

A **Tabela 2** demonstra uma síntese das diferentes marcações obtidas nos estádios foliares analisados, conforme as descrições abaixo.

#### ***Folhas imaturas***

No estágio 1, as folhas imaturas apresentavam um mesofilo indiferenciado, cujas células mucilaginosas ainda não eram observadas (**Figura 1**). No estágio 2, a folha imatura já apresentava células mucilaginosas (**Figura 2**).

A incubação do material com JIM 5 (HGAs com reduzida metil-esterificação) resultava na marcação fraca ou ausente do mesofilo, onde não era possível fazer-se uma distinção das diferenças na marcação nas futuras células mucilaginosas no estágio 1. A



epiderme e hipoderme não eram marcadas com JIM 5. Observou-se que estas cadeias eram mais abundantes nos vértices das células (**Figura 3, setas**). No estágio 2, as paredes celulares do mesofilo e epiderme marcavam moderadamente, embora essa marcação parecia ser mais intensa no floema (**Figura 4**). As observações com JIM 7 (HGAs com alta metil-esterificação), ao contrário de JIM 5, demonstravam que as paredes celulares eram intensas e uniformemente marcadas em todos os tecidos, tanto nas folhas imaturas do estágio 1 (**Figura 5**) como do estágio 2 (**Figura 6**). Os resultados obtidos com LM 5 (galactanos) demonstravam a ausência dessas cadeias nas paredes da epiderme e, por outro lado, uma marcação muito intensa em determinadas regiões da hipoderme. Os demais tecidos marcavam intensamente, aumentando a concentração do estágio 1 para o estágio 2 (**Figura 7**). A marcação com LM 6 (arabinanos) era muito semelhante, entretanto, constatou-se a presença de arabinanos nas paredes das células epidérmicas. Todas as paredes eram marcadas tênue e uniformemente, com exceção do floema que demonstrava intensa marcação (**Figura 8**).

As células mucilaginosas apresentavam uma mesma intensidade de marcação com relação às células parenquimáticas vizinhas quando utilizados os anticorpos JIM 5 (**Figura 9**), JIM 7, LM 5 e LM6. Com JIM 7, a mucilagem das células mucilaginosas marcava tenuamente apenas em algumas regiões no lume celular (**Figura 10, seta**). Geralmente, as proteínas arabinogalactanos, reconhecidas por JIM 13, estavam presentes na plasmalema. Havia uma fraca detecção nas paredes das células do mesofilo e muito intensa nas paredes das células mucilaginosas (**Figura 11, seta**). Outros sistemas de membranas também eram marcados, como o dos cloroplastídios, membrana nuclear e tonoplasto (**Figura 12, seta menor**). Além disso, com esse anticorpo, observou-se uma intensa marcação na mucilagem das células mucilaginosas, demonstrando grande concentração de proteínas arabinogalactanos, inclusive na formação lamelar da mucilagem (**Figura 12, seta maior**). Nessas células, a marcação na plasmalema não era uniforme, sendo mais intensa em algumas regiões, comparada com as células parenquimáticas.

Não se observou qualquer marcação com o anticorpo 2F4 (ligações com cálcio aos HGAs).

#### *Folhas maduras*

As folhas maduras observadas foram aquelas cujas células mucilaginosas pertenciam ao estágio 4, ou seja, quando a célula perdia seu contorno poligonal, e o

protoplasto degenerava. A mucilagem secretada preenchia completamente a célula, constituída por um sistema de lamelas que circunscrevia retículos mais delgados, ambos de natureza pécica (**Figura 13**). O controle para os testes imunocitoquímicos pode ser observado na **Figura 14**. A marcação com JIM 5 demonstrava fraca concentração de pectinas com cadeias de HGAs com reduzida metil-esterificação nas paredes dos tecidos da folha, com exceção da epiderme, cuja presença era intensa (**Figura 15**). Entretanto, as paredes celulares de todos os tecidos marcavam intensamente com JIM 7, observando-se que a mucilagem das células mucilaginosas era também marcada com este anticorpo, indicando a presença evidente de cadeias altamente metil-esterificadas na mucilagem pécica (**Figura 16**). Os resultados com LM 5 demonstraram que as células mucilaginosas apresentavam uma moderada marcação, comparadas com as células vizinhas, onde se detectou uma fraca marcação de cadeias galactanos nas paredes das células do parênquima esponjoso e ausência no parênquima paliçádico (**Figura 17**). Havia uma distribuição homogênea e moderada presença das cadeias arabinanos nas paredes das células dos diferentes tecidos foliares; entretanto, muito fraca nas paredes das células mucilaginosas, quando utilizado LM 6 (**Figura 18**).

Com relação às células mucilaginosas, observou-se a presença de pectinas de reduzida metil-esterificação, demonstrada por JIM 5 (**Figura 19**). Entretanto, havia maior concentração em pectinas altamente metil-esterificadas (**Figura 20**) e uma distribuição uniforme de proteínas arabinogalactanos na plasmalema (**Figura 21**). Os galactanos estavam presentes em maior concentração nas células mucilaginosas que nas demais células do mesofilo (**Figura 22**). A mucilagem nas células maduras era apenas marcada para os epitopos de pectinas com alto grau de metil-esterificação, conforme observado com JIM 7 (**Figura 20**).

A distribuição de galactanos e de pectinas com reduzida metil-esterificação não era uniforme, sendo ausente em determinadas regiões quando utilizado LM 5 e, ainda, em concentração variável em algumas áreas das paredes dessas células com JIM 5 (**Figuras 23 e 24**).

As ligações de cálcio com as pectinas (“egg box”) eram evidentes nas regiões de pontoação das células mucilaginosas e demais células do mesofilo, quando utilizado o anticorpo 2F4. Entretanto, essas ligações eram apenas observadas entre uma célula mucilaginosa e uma célula parenquimática vizinha, sendo ausente entre duas células mucilaginosas (**Figura 25**). Apenas nas células parenquimáticas, observava-se uma

marcação intensa nas zonas dos vértices da parede celular e regiões dos espaços intercelulares, onde era, praticamente, ausente nas células mucilaginosas. (**Figura 26**).

## ***Discussão***

Como já descrito, as pectinas são estruturalmente complexas e têm variabilidade molecular no interior da parede celular. Essa diversidade poderia refletir diferenças funcionais da parede que são importantes durante o crescimento e desenvolvimento da planta (Bush e McCann 1999). Os resultados obtidos permitiram estabelecer diferenças na distribuição de epitopos pécticos entre folhas imaturas e maduras.

Nas paredes das células mucilaginosas notou-se um gradiente ao longo do desenvolvimento com relação às pectinas de reduzida metil-esterificação, às pectinas ligadas aos sais de cálcio, aos galactanos, aos arabinanos e às proteínas arabinogalactanos. Por sua vez, as células parenquimáticas do esponjoso (células vizinhas) também demonstraram um gradiente com relação às pectinas de reduzida metil-esterificação, aos galactanos e às pectinas ligadas ao cálcio. Não foi constatado um gradiente de distribuição dos arabinanos ao longo do desenvolvimento destas células, diferente do observado para as células mucilaginosas.

Observando-se novamente a **Tabela 2**, podemos estabelecer comparações entre as diferentes marcações obtidas nos estádios foliares analisados.

### ***A metil-esterificação dos HGAs é espacialmente regulada nas paredes celulares***

Tanto para as células mucilaginosas, como para as demais células do parênquima esponjoso, observadas nos estádios 1 e 2 (ainda no ápice caulinar), havia um aumento na concentração de pectinas de reduzida metil-esterificação (JIM 5), enquanto que se observava uma maior concentração de pectinas com alto grau de metil-esterificação (JIM 7), sendo que esta última não variava durante a maturação foliar ou celular. Esses dados estão de acordo com a literatura, onde é geralmente aceito que as pectinas são sintetizadas numa forma altamente metil-esterificada no Golgi. Entretanto, Vian e Roland (1991), observaram, em células de cultura do melão (*Cucumis melo* L.), marcações com o anticorpo monoclonal JIM 5, indicando que essa de-esterificação ocorria ainda nas vesículas do Golgi. Apesar disso, Willats *et al.* (2000), analisando a degeneração de epitopos pécticos, através também da análise de anticorpos

monoclonais, concluíram que os resultados observados com o anticorpo JIM 5 deveriam ser interpretados com cautela, pois os testes demonstraram uma ligação com antígenos de mais de 40% de cadeias metil-esterificadas e, por isso, esse anticorpo não estaria nitidamente caracterizado.

Micheli (2001) explicou que as pectinas metil-esterificadas eram modificadas pelas pectinases, como, por exemplo, as pectinas metil-esterases (PME), as quais catalizavam a demetil-esterificação dos homogalacturanos, liberando ácidos pécticos e metanol. A PME seria constituída intramolecularmente por uma pró-região, a qual inibiria a demetil-esterificação prematura, antes da sua inserção na parede celular. Entretanto, logo após ter sido secretada pelo Golgi, a pró-região sofreria uma clivagem na qual o inibidor se separaria da parte madura da PME, possibilitando, então, o processo de demetil-esterificação. Essa clivagem também poderia ocorrer no interior da parede celular. A demetil-esterificação da parede celular seria linear, aumentando as ligações com cálcio, formando géis de pectato, alcalinização do meio, acidificação das pectinas, e conferindo maior rigidez da parede (Jarvis 1984). Pôde-se concluir que, durante o desenvolvimento foliar de *Araucaria angustifolia*, esse processo ocorreu rapidamente, pois a de-esterificação aconteceu ainda no ápice caulinar.

A presença de pectinas altamente metil-esterificadas nas paredes primárias já foram descritas por Knox *et al.* (1990) utilizando o anticorpo monoclonal JIM 7 (DE 35-90%). Vandenbosh *et al.* (1989) e Knox *et al.* (1990) também demonstraram que com JIM 5 (epitopos de pectinas não-esterificadas e com esterificação de até 50%) havia forte marcação nos vértices celulares e espaços intercelulares. Isso foi observado nas folhas imaturas do estágio 1 em *Araucaria angustifolia*, cuja marcação nas zonas dos vértices eram bem evidentes.

Morris *et al.* (2000) observaram que a rigidez da parede celular era menor quanto maior o grau de metil-esterificação das pectinas, facilitando a expansão da parede celular durante o crescimento. As mudanças na rigidez das pectinas só poderiam ser explicadas pelas mudanças do DE, não se observando qualquer relação com o peso molecular, que era constante para os diferentes tipos de pectinas. Os autores concluíram também, que o DE influenciaria nas propriedades hidrodinâmicas da célula vegetal. Conforme Cutsem e Messiaen (1994), o período de maturidade da parede celular estaria relacionado com o aumento da concentração de pectinas de cadeias não- ou pouco metil-esterificadas. As folhas do estágio 1 em *Araucaria angustifolia* apresentavam uma fraca marcação nas regiões de expansão com JIM 5, sendo mais intensa nos pontos mais

rígidos da célula (vértices celulares). Entretanto, a folha continuava seu crescimento, explicando a ausência ou rara ocorrência das pectinas de reduzida metil-esterificação nas células da epiderme e hipoderme dessas folhas muito jovens. Por sua vez, o aumento da marcação com JIM 5, nas folhas imaturas do estágio 2, demonstrou que ocorria um rápido crescimento dos tecidos e células das folhas imaturas, com uma distribuição mais uniforme, não se observando diferenças entre as células mucilaginosas e as demais células do esponjoso.

Nas folhas maduras de *Araucaria angustifolia* (estádio 4), a distribuição das pectinas com reduzido grau de metil-esterificação (JIM 5) não era uniforme, parecendo que havia certas regiões, ao longo da parede, de marcação mais intensa. Sutherland *et al.* (1999), analisando as mudanças dos polissacarídeos pécticos durante o amadurecimento dos frutos de *Actinidia deliciosa* A. Chev.(kiwi), não observaram diferenças entre as marcações de JIM 5 e JIM 7 ao longo do desenvolvimento. JIM 5 marcava apenas as regiões de pontoações e JIM 7 marcava todas as paredes. Esses autores não encontraram o esperado, baseado nos resultados de trabalhos anteriores sobre amadurecimento dos frutos e a perda da esterificação de pectinas em *Actinidia deliciosa* (kiwi). Bush e McCann (1999) demonstraram que as pectinas marcadas com JIM 5 e JIM 7 eram distribuídas igualmente em todo o parênquima e nas células vasculares nos tubérculos maduros de *Solanum tuberosum* L. (batata). Por sua vez, Casero e Knox (1995), assim como Sutherland *et al.* (1999), também demonstraram que JIM 5 possuía relevante marcação nas regiões de pontoação observadas em forma de raios na camada mais interna das paredes. Talvez essas regiões observadas por estes autores sejam as mesmas verificadas nas paredes das células mucilaginosas e células vizinhas marcadas mais intensamente com JIM 5 em *Araucaria angustifolia*. As pectinas metil-esterificadas (JIM 7) continuavam abundantes nas paredes dos tecidos foliares das folhas maduras, distribuídas uniformemente. Esses resultados estão de acordo também com o que Fujino e Itoh (1998) observaram nas células epidérmicas do epicótilo de *Pisum sativum* L., utilizando os mesmos anticorpos monoclonais JIM 5 e JIM 7, onde JIM 5 marcava abundantemente as regiões sem expansão das paredes celulares, comparadas àquelas regiões de expansão. Posteriormente, Bush *et al.* (2001) também observaram que as células mais jovens dos estolões dos tubérculos da batata (*Solanum tuberosum*) eram ricas em pectinas altamente metil-esterificadas (JIM7), mas as paredes celulares de células próximas à maturidade (em processo de expansão) apresentaram maior quantidade de pectinas de reduzido grau de metil-esterificação (JIM

5). Entretanto, nas folhas maduras de *Araucaria angustifolia*, a marcação com JIM 5 permanecia semelhante ao das folhas imaturas do estágio 2, pois o gradiente de de-esterificação era observado ainda no ápice caulinar (entre o estágio 1 e 2).

#### ***Localização de sais de cálcio ligados às cadeias pécticas***

Liners *et al.* (1989) produziram um anticorpo monoclonal denominado de 2F4, capaz de reconhecer epitopos de cadeias pécticas associadas ao cálcio, cujo padrão de ligação segue o do modelo “egg-box” e não o de cadeias isoladas. De acordo com His *et al.* (1997) e Micheli (2001), o cálcio induziria a acidificação das pectinas e teria importante papel no crescimento e desenvolvimento das plantas superiores. Uma das funções seria seu envolvimento nas ligações cruzadas (“cross-linking”) de polissacarídeos pécticos até formar as estruturas de “egg-box”, que confeririam a rigidez da parede celular (de-esterificação). O tratamento com indução de cálcio em cultura de tecidos indicou um aumento na síntese destas pectinas (Jarvis 1984).

Além disso, Liners e Van Cutsem (1992), estudando as pectinas nas paredes celulares de cenoura (*Daucus carota* L.) em cultura *in vitro*, comprovaram que 2F4 reconhecia apenas polissacarídeos pécticos de reduzido conteúdo de metil-éster (DE<30%) induzidos com íons de cálcio, demonstrando maior especificidade que JIM 5 (DE<50%). Como descrito anteriormente, os testes efetuados com JIM 5 por Willats *et al.* (2000) demonstraram uma ligação com antígenos de mais de 40% de cadeias metil-esterificadas, e, por isso, não estaria nitidamente caracterizado.

Os resultados obtidos com o anticorpo 2F4 demonstraram as regiões prováveis das pontoações, onde os sítios de cálcio estariam localizados em maior quantidade, observados nas células mucilaginosas e nas células vizinhas. Liners e Van Cutsem (1992) e His *et al.* (1997) descreveram que o cálcio era o responsável pelo aumento da atividade da PME, para que ocorresse a de-esterificação das pectinas, além de aumentar a friabilidade das paredes celulares. Entretanto, Liners *et al.* (1994), estudando a adesão celular através da acetil e metil-esterificação das pectinas, em calos compactos e friáveis de *Beta vulgaris* var. *altissima* L. (beterraba), concluíram que as pectinas associadas ao cálcio não manteriam a adesão intercelular, encontrando-se maiores proporções de pectinas altamente metil-esterificadas, tanto nos calos friáveis, quanto nos compactos. Assim, segundo os autores, o grau de acetilação teria associação com a friabilidade, e não as ligações com o cálcio como antes se acreditava.

A localização de pectinas não-esterificadas para as zonas dos vértices celulares ou zonas de adesão em *Araucaria angustifolia*, observadas também em *Arabidopsis thaliana*, poderiam servir para fortalecer essas regiões (Dolan *et al.* 1997). Nas células mucilaginosas, essas ligações com cálcio, atuando na rigidez dessas zonas, eram evidentes apenas na zona de contato com uma célula vizinha parenquimática e nunca com outra célula mucilaginosa. Esse resultado poderia sugerir que as células mucilaginosas teriam maior eficiência em translocar solutos e água armazenadas na mucilagem para o tecido esponjoso. Assim, a água absorvida pelos canais epidérmicos (ver Capítulo 2), percorrendo via apoplasto, seria armazenada rapidamente nas células mucilaginosas, sem desvio para outros tecidos. O aumento da concentração do cálcio estimula a deposição de componentes não-celulósicos, aumentando a biossíntese e secreção de polissacarídeos pécticos, permitindo maior capacitação hidrodinâmica da célula (His *et al.* 1997). A ausência de marcações nas folhas imaturas com 2F4 poderia ser explicada pela fraca ocorrência das cadeias de reduzida metil-esterificação nas pectinas, as quais aumentariam as ligações com o cálcio, ou por estarem mascaradas com as pectinas de alta metil-esterificação, cuja concentração era muito elevada.

Segundo Bush *et al.* (2001), JIM 7, JIM 5 e 2F4 poderiam se ligar ao cálcio, mas em quantidade, força de ligação e grau diferentes, no qual implicaria na rigidez das cadeias pécticas, aumentando na ordem  $JIM\ 7 < JIM\ 5 < 2F4$ . Sendo assim, apenas na maturidade foliar de *Araucaria angustifolia*, essa rigidez foi significativa, mas muito fraca na adesão entre células mucilaginosas.

#### ***Galactanos e arabinanos: cadeias laterais dos RGs com diferentes distribuições numa mesma célula.***

A rigidez das paredes das células está também relacionada ao grau de cadeias laterais ocorrentes nas cadeias dos ramnogalacturanos, como os galactanos e arabinanos (Jones *et al.* 1997).

Jones *et al.* (1997) desenvolveram um anticorpo monoclonal reconhecendo epitopos de galactanos pécticos (cadeia de açúcares neutros ligados às ramnosos ou RG-I), denominado de LM5. As marcações realizadas nos frutos do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) indicavam grande quantidade desse composto na maior parte das paredes celulares dos tecidos. Entretanto, estavam ausentes nas células epidérmicas e subepidérmicas. Nas folhas imaturas de *Araucaria angustifolia* também não foi observada qualquer marcação nas células epidérmicas. Segundo os mesmos autores, as

paredes celulares do colênquima de *Lycopersicon esculentum*, onde as regiões eram mais rígidas (mais espessadas), apresentavam rara ocorrência de galactanos. As cadeias laterais diminuam a habilidade das pectinas formarem géis mais resistentes. Sendo assim, acredita-se que a ausência dos galactanos na epiderme das folhas imaturas de *Araucaria angustifolia* (estádio 2) poderia estar relacionada com a permanência da integridade da parede durante o processo de expansão foliar. Já na hipoderme, observou-se que na parede celular de algumas células, haveria ocorrência de galactanos, permitindo perceber as zonas que diminuam a atividade de expansão. Segundo Willats *et al.* (1999b) e Bush *et al.* (2001), é comum que galactanos não sejam detectados nas paredes celulares das regiões meristemáticas de raízes ou ápices caulinares, aparecendo apenas em um certo estágio de desenvolvimento nos tecidos. Em *Araucaria angustifolia*, os demais tecidos possuíam uma distribuição homogênea nas folhas imaturas (estádio 2). Nas folhas maduras observou-se, nitidamente, que a concentração de galactanos era maior nas paredes das células mucilaginosas e que, nas células parenquimáticas vizinhas, a detecção dessas cadeias era muito fraca. Além disso, a distribuição não era uniforme, observando-se que em pequenas regiões das paredes não houve marcação com LM 5. Orfila e Knox (2000) e Bush *et al.* (2001) descreveram que os galactanos estavam ausentes nas regiões de pontoação. Seria possível que as pequenas regiões não marcadas nas folhas maduras de *Araucaria angustifolia* fossem também regiões de pontoações.

Segundo McCartney *et al.* (2000) e McCartney e Knox (2002), a função da ocorrência de galactanos nas paredes celulares ainda não estaria esclarecida. Os autores sugeriram que essas cadeias poderiam estar associadas a propriedades mecânicas requeridas para a expansão celular. Como as células mucilaginosas de *Araucaria angustifolia* apresentavam uma expansão celular mais rápida que as demais células, sugere-se que os galactanos, responsáveis pela diminuição da rigidez da parede, contribuiriam para o maior aumento de volume dessas células na maturidade e, posteriormente, nas ondulações da parede celular descritas no Capítulo 2, contribuindo também para sua elasticidade ao armazenar água.

Nas folhas imaturas (estádios 1 e 2) de *Araucaria angustifolia*, observou-se que a presença de arabinanos (LM6) era distribuída uniformemente e em reduzida concentração, nas paredes celulares dos diferentes tecidos, se comparada com a distribuição de galactanos. Porém, na maturidade, a concentração de arabinanos mostrava-se levemente maior nas células parenquimáticas vizinhas com baixa detecção



na parede celular das células mucilaginosas, ao contrário do observado com LM5 (galactanos).

Embora LM6 ligue-se também a um epitopo das cadeias laterais dos RGs-I, ou seja, aos arabinanos, os dois epitopos descritos através de LM5 e LM6 poderiam ocorrer em diferentes regiões da parede celular de uma mesma célula (Orfila e Knox 2000). Além disso, já foram observados separadamente em diferentes células de órgãos em crescimento (Willats *et al.* 1999b, Willats *et al.* 2000). Estes autores, sugeriram que galactanos e arabinanos desempenhariam funções diferentes.

Bush *et al.* (2001) observaram que as células mais jovens dos estolões de *Solanum tuberosum* eram ricas em arabinanos (LM 6) e em pectinas altamente metil-esterificadas (JIM 7). Nas paredes celulares de células próximas à maturidade, observou-se maior quantidade de pectinas de reduzido grau de metil-esterificação e galactanos (LM 5). Na região onde as células começaram a se expandir, epitopos de arabinanos eram dramaticamente reduzidos. Os autores sugeriram que tais gradientes pécticos eram gerados pela diferença temporal em que ocorria a ligação das cadeias laterais de galactanos e arabinanos no RG-I. Ou seja, dependendo do tempo e necessidade, apenas uma cadeia lateral poderia se ligar ao RG-I, talvez em resposta ao desenvolvimento celular. Dessa maneira, poderíamos explicar as diferentes distribuições dessas cadeias laterais entre as células mucilaginosas e demais células vizinhas em *Araucaria angustifolia*, as quais demonstravam diferenças na dinâmica de desenvolvimento, como o aumento de volume das células mucilaginosas, bem como a elasticidade da parede celular na maturidade e senescência.

### ***Proteínas arabinogalactanos (AGPs): relacionadas à morte celular programada?***

As proteínas arabinogalactanos são uma classe de proteoglicanos, caracterizadas por alto conteúdo de arabinose e galactose, cuja porção protéica contribui somente com 2-10% do peso molecular, enquanto que a porção polissacarídica, normalmente péctica, contribui com 80-90%. São ricas em hidroxiprolina, serina e alanina (Krishnamurthy 1999). Knox *et al.* (1991) descreveram um anticorpo para a detecção de AGPs na plasmalema que apresentaram diferentes distribuições durante o desenvolvimento celular.

Nas folhas imaturas de *Araucaria angustifolia* (estádio 2), observou-se a detecção de maior concentração dessas AGPs nas paredes celulares das células mucilaginosas, distribuídas de maneira uniforme, em contraste com as células maduras,

onde havia uma redução na detecção das AGPs, igualando-se às células parenquimáticas vizinhas.

Uma das funções mais difundidas das AGPs, principalmente na plasmalema, seria a formação da parede celular, assim como Mogami *et al* (1999) observaram na parede do tubo polínico de *Pinus densiflora* Sieb. *et* Zucc., baseando-se na marcação em vesículas do Golgi e no corpo paramural (plasmalemosomo).

Entretanto, mais dois tipos de funções foram inferidas por Knox *et al.* (1991) e Knox (1992): **1.** As AGPs poderiam atuar como marcadores da superfície celular, indicando a diferenciação celular como nos estudos do desenvolvimento das raízes da cenoura (*Daucus carota*); **2.** Poderiam estar envolvidas na elasticidade da parede celular associadas ao crescimento em expansão da célula. Segundo esses autores, as AGPs atuariam com as auxinas, controlando o crescimento da parede.

Entretanto, no estudo de Schindler *et al* (1995), JIM 13 ligava-se às AGPs da plasmalema de futuras células esclerenquimáticas e dos espessamentos secundários dos traqueídes de feixes vasculares do coleóptilo de plântulas de milho (*Zea mays* L.). Os epitopos de AGP demonstravam diferentes padrões de expressões temporais, nos quais não correlacionavam com crescimento em extensão. A auxina não obtinha efeito sobre o AGP dos coleóptilos, controlando apenas crescimento da epiderme, mas não o dos feixes vasculares, ou seja, a arabinose, galactose ou prolina, dentro dessa fração, não era estimulada pela auxina, contradizendo o que Knox *et al.* (1991) sugeriram. Entretanto, Knox *et al.* (1989) utilizaram as AGPs como marcadores moleculares para a determinação de futuras células que iriam morrer na população celular do meristema. Assim, a associação do JIM 13 com esses tipos de células sugeriria que as AGPs identificariam aquelas células submetidas à morte celular programada. Tais resultados também estariam de acordo com Knox *et al.* (1991) que sugeriram as AGPs como marcadores de desenvolvimento, definindo caracteres particulares de uma célula em diferenciação. No coleóptilo do milho, altos níveis de AGP associadas à plasmalema eram encontrados em células jovens, enquanto que as células mais maduras exibiam baixos níveis de AGP (Schindler *et al.* 1995).

Esse conceito também poderia ser aplicado para as células mucilaginosas de *Araucaria angustifolia*. A grande concentração de AGPs através do JIM 13 nas paredes celulares e plasmalema nas células mucilaginosas durante sua fase de secreção, e a drástica redução nas células maduras, permitiriam inferir que esses epitopos identificariam aquelas células sujeitas à morte celular programada. Essa idéia seria

sustentada pelo que os autores Herman e Lamb (1992) encontraram na plasmalema na folha do tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), na qual corpos multivesiculares eram marcados com um anti-AGP, semelhante ao JIM 13, como parte de um processo degenerativo. Foi demonstrada a autofagia dessas células e comprovada a degeneração das AGPs na maturidade, assim como Schindler *et al.* (1995) haviam observado, posteriormente, com os coleóptilos de milho. O termo morte celular programada, segundo estes autores, descreve um processo de desenvolvimento degenerativo, gene-controlado, geralmente encontrado em regiões particulares de organismos multicelulares. Nos órgãos em desenvolvimento, algumas células são destruídas, ou, pelo menos, perdem seu conteúdo protoplasmático de um modo controlado durante o desenvolvimento. Em células animais sabe-se que a interação entre plasmalema e a matriz extracelular mantém a célula viva. O rompimento dessa interação a torna uma célula pronta para morrer. Entretanto, a possibilidade que as AGPs estejam envolvidas no enfraquecimento das interações da plasmalema e matriz extracelular, direcionando-as à apoptose, mereceria uma consideração mais detalhada, devido aos poucos trabalhos existentes.

***A secreção das células mucilaginosas possui um gradiente na distribuição dos epítomos pécticos.***

O conteúdo mucilaginoso das células em estudo demonstrava um gradiente de distribuição de HGAs de cadeias altamente metil-esterificadas (JIM 7), marcando tenuamente nas folhas imaturas do estágio 2 e intensamente nos retículos ou lamelas pécticas da mucilagem na folha madura (estádio 4). Willats *et al.* (2001) observaram os polissacarídeos pécticos na mucilagem secretada pelas sementes de *Arabidopsis thaliana*. Os anticorpos monoclonais JIM 5 e JIM 7 também foram utilizados e demonstraram a presença de HGAs. Os autores não verificaram qualquer marcação com PAM 1, um anticorpo monoclonal para pectinas com reduzido grau de esterificação, constatando a presença de pectinas altamente metil-esterificadas nessa mucilagem. Esses resultados também foram observados para a secreção das células mucilaginosas de *Araucaria angustifolia*, embora se utilizando apenas JIM 5 (pectinas de reduzido grau de metil-esterificação). Como descrito anteriormente, Willats *et al.* (2000) observaram que JIM 5 não marcava seguramente pectinas com reduzido grau de metil-esterificação, mas sua marcação era menos intensa com relação a JIM 7. Sabe-se que as ligações com sais de cálcio, comum às pectinas com reduzido grau de metil-esterificação, possuem maior capacidade de envolver as moléculas de água, ao mesmo

tempo em que regula a permeabilidade da plasmalema (Micheli 2001), conferindo maior rigidez nos géis formados (Jarvis 1984). No caso da mucilagem das sementes de *Arabidopsis thaliana* (Willats *et al.* 2001), tais ligações estavam presentes apenas nas regiões mais internas da mucilagem, portanto, havia limitações em gerar grandes massas extracelulares de HGAs de-esterificadas em mucilagens. Além disso, Trachtenberg e Mayer (1981b, 1982a b) observaram a presença de cálcio livre na mucilagem dos idioblastos de *Opuntia ficus-indica*. As observações desses autores explicariam a marcação negativa ao anticorpo 2F4 da secreção das células mucilaginosas de *Araucaria angustifolia*, cujo epitopo é restrito àquelas ligações de cálcio nas cadeias de HGAs.

As marcações com LM 5 e LM 6 também não demonstravam a presença de galactanos e arabinanos na mucilagem das sementes de *Arabidopsis thaliana* e das células mucilaginosas de *Araucaria angustifolia*. Portanto, seria possível a ausência dessas cadeias laterais na ramnose, ou haver novos açúcares presentes, segundo Willats *et al.* (2001).

Os resultados com JIM 13 demonstravam o contrário ao observado com JIM 7 em *Araucaria angustifolia*. A detecção das AGPs mostrava-se muito mais intensa na mucilagem das células imaturas, reduzindo drasticamente nas células maduras. Além disso, a intensidade de marcação mostrava-se maior do que aquela observada com JIM 7, ou seja, a quantidade de proteínas arabinogalactanos era superior comparada às cadeias metil-esterificadas das pectinas. Trachtenberg e Mayer (1981b) descreveram a composição química da mucilagem dos idioblastos de *Opuntia ficus-indica*, os quais detectaram grandes quantidades de arabinoses, galactoses, ácidos urônicos e arabinogalactanos. As funções para as AGPs ainda não estariam esclarecidas (Fincher *et al.* 1983, Knox 1992), e embora os autores não tenham observado a porção protéica para os arabinogalactanos, associaram este composto como comum às mucilagens, o qual poderia contribuir contra danos causados pelas baixas temperaturas ou congelamento, semelhante ao que Clarke *et al.* (1979) sugeriram para as proteínas arabinogalactanos ocorrentes em gomas. Segundo esses autores, as AGPs também estariam associadas à função de armazenamento de água e resistência à seca quando encontradas nas gomas e mucilagens. A presença das AGPs na plasmalema e na superfície do protoplasto, onde JIM 13 as detecta, poderiam servir como proteção à dessecação em períodos desfavoráveis. Se isso for verdadeiro, explicaria a grande concentração observada nas células mucilaginosas comparadas às células vizinhas em *Araucaria angustifolia*. Além

disso, poderíamos dizer que a grande concentração de proteínas arabinogalactanos na secreção das células mucilaginosas em folhas imaturas (estádio 1 e 2), reduzidas na maturidade (estádio 4), sinalizariam a morte celular programada.

### ***Bibliografia citada***

- BAKER RT, SMITH HG (1910) **A research on the Pines of Australia**. (Government Printer: Sydney)
- BAKKER ME, GERRITSEN AF (1989) A suberized layer in the cell wall of the mucilage cells of *Cinnamomum*. **Annals of Botany** **63**, 441-448.
- BAKKER ME, GERRITSEN AF (1992) The development of mucilage cells in *Hibiscus schizopetalus*. **Acta Botanica Neerlandica** **41**, 31-42.
- BAKKER ME, GERRITSEN AF, VAN DER SCHAAF PJ (1991) Development of oil and mucilage cells in *Cinnamomum burmanni*. An ultrastructural study. **Acta Botanica Neerlandica** **40**, 339-356.
- BAMBER RK, SUMMERVILLE R, GREGORY J (1978) Unusual cells in the mesophyll zone of leaves of *Araucaria*. **Australian Journal of Botany** **26**, 177-187.
- BREDENKAMP CL, VAN WYK AE (1999) Structure of mucilaginous epidermal cell walls in *Passerina* (Thymelaeaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **129**, 223-238.
- BRUNETON J (1993) **Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales**. 2<sup>a</sup> ed. (Lavoisier: Paris)
- BUSH MS, MARRY M, HUXHAM IM, JARVIS MC, McCANN MC (2001) Developmental regulation of pectic epitopes during potato tuberisation. **Planta** **213**, 869-880.
- BUSH MS, McCANN MC (1999) Pectic epitopes are differentially distributed in the cell walls of potato (*Solanum tuberosum*) tubers. **Physiologia Plantarum** **107**, 201-213.
- CASERO PJ, KNOX JP (1995) The monoclonal antibody JIM5 indicates patterns of pectin deposition in relation to pit fields at the plasma-membrane-face of tomato pericarp cell walls. **Protoplasma** **188**, 133-137.
- CLARKE AE, ANDERSON RL, STONE BA (1979) Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. **Phytochemistry** **18**, 521-540.
- DOLAN L, LINSTED P, ROBERTS K (1997) Developmental regulation of pectic polysaccharides in root meristem of *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany** **48**, 713-720.
- ESAU K (1965) **Plant anatomy**. 2<sup>a</sup> ed. (John Wiley & Sons Inc.: New York).
- FAHN A (1979) **Secretory tissues in plants**. (Academic Press: London).
- FAHN A (1987) Secretory tissues in vascular plants. **Taney Review** **14**, 16-257.
- FINCHER GB, STONE BA, CLARKE AE (1983) Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis and function. **Annals Review of Plant Physiology** **34**, 47-70.
- FRESHOUR G, CLAY RP, FULLER MS, ALBERSHEIM P, DARVILL AG, HAHN MG (1996) Developmental and tissue-specific structural alterations of the cell wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* roots. **Plant Physiology** **110**, 1413-1429.
- FUJINO T, ITOH T (1998) Changes in pectin structure during epidermal cell elongation in Pea (*Pisum*

- sativum*) and its implications for cell wall architecture. **Plant Cell Physiology** **39**, 1315-1323.
- GUIGNARD J-L, COSSON L, HENRY M (1985) **Abrégé de Phytochimie**. (Masson Publishing: USA)
- HARRIS N (1994) Immunocytochemistry for light and electron microscopy. *In*: HARRIS N, OPARKA KJ (eds.). **Plant Cell Biology. A practical approach**. (Oxford University Press: London)
- HERMAN EM, LAMB CJ (1992) Arabinogalactan-rich glycoproteins are localized on the cell surface and in intravacuolar multivesicular bodies. **Plant Physiology** **98**, 264-272.
- HIS I, DRIOUICH A, JAUNEAU A (1997) Distribution of cell wall matrix polysaccharides in the epidermis of flax hypocotyl seedlings: calcium induced-acidification of pectins. **Plant Physiology and Biochemistry** **35**, 631-644.
- JARVIS MC (1984) Structure and properties of pectic gels in plant cell walls. **Plant Cell and Environment** **7**, 153-164.
- JONES L, SEYMOUR GB, KNOX JP (1997) Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1→4) β-D-Galactan. **Plant Physiology** **113**, 1405-1412.
- KNOX JP (1992) Molecular probes for the plant cell surface. **Protoplasma** **167**, 1-9.
- KNOX JP (1997) The use of antibodies to study the architecture and the developmental regulation of plant cell walls. **International Review of Cytology** **171**, 79-120.
- KNOX JP, DAY S, ROBERTS K (1989) A set of surface glycoproteins forms an early marker of cell position, but not cell type, in the root apical meristem of *Daucus carota* L. **Development** **106**, 47-56.
- KNOX JP, LINSTEAD PJ, KING J, COOPER C, ROBERTS K (1990) Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. **Planta** **181**, 512-521.
- KNOX JP, LINSTEAD PJ, PEART J, COOPER C, ROBERTS K (1991) Developmentally regulated epitopes of cell surface arabinogalactan proteins and their relation to root tissue pattern formation. **The Plant Journal** **1**, 317-326.
- KRISHNAMURTHY KV (1999) **Methods in cell wall cytochemistry**. (CRC Press Boca raton: Florida)
- LINERS F, GASPAR T, VAN CUTSEM P (1994) Acetyl- and methyl-esterification of pectins of friable and compact sugar-beet calli: consequences for intercellular adhesion. **Planta** **192**, 545-556.
- LINERS F, LETESSON J-J, DIDEMBOURG C, VAN CUTSEM P (1989) Monoclonal antibodies against pectin. Recognition of a conformation induced by calcium. **Plant Physiology** **91**, 1419-1424.
- LINERS F, VAN CUTSEM (1992) Distribution of pectic polysaccharides throughout walls of suspension-cultured carrot cells. An immunocytochemical study. **Protoplasma** **170**, 10-21.
- MASTROBERTI AA, MARIATH JEA (2003) Compartmented cells in the mesophyll of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Australian Journal of Botany** **51** (no prelo).
- McCARTNEY L, KNOX JP (2002) Regulation of pectic polysaccharide domains in relation to cell development and cell properties in the pea testa. **Journal of Experimental Botany** **53**, 707-713.
- McCARTNEY L, ORMEROD AP, GIDLEY MJ, KNOX JP (2000) Temporal and spatial regulation of pectic (1-4) β-D-galactan in cell walls of developing pea cotyledons implications for mechanical properties. **The Plant Journal** **22**, 105-113.
- MICHELI F (2001) Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. **Trends in Plant Science** **6**, 414-419.
- MOGAMI N, NAKAMURA S, NAKAMURA N (1999) Immunolocalization of the cell wall components

- in *Pinus densiflora* pollen. **Protoplasma** **206**, 1-10.
- MONTEIRO SM, FERREIRA AG, FLORES FEV (1977) Anatomia da plântula de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. (Nota prévia). In **XXI Congresso Nacional de Botânica**. (Curitiba: Brazil).
- MORRIS GA, FOSTER TJ, HARDING SE (2000) The effect of the degree of esterification on the hydrodynamic properties of citrus pectin. **Food Hydrocolloids** **14**, 227-235.
- ORFILA C, KNOX JP (2000) Spatial regulation of pectic polysaccharides in relation to pit fields in cell walls of tomato fruit pericarp. **Plant Physiology** **122**, 775-781.
- PÉREZ S, MAZEAU K, HERVÉ C, DU PENHOAT CH (2000) The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. **Plant Physiology and Biochemistry** **38**, 37-55.
- SHELLER HV, DOONG RL, RIDLEY BL, MOHNEN D (1999) Pectin biosynthesis: a solubilized  $\alpha$ -1,4-galacturonosyltransferase from tobacco catalyzes the transfer of galacturonic acid from UDP-galacturonic acid onto the non-reducing end of homogalacturonan. **Planta** **207**, 512-517.
- SCHINDLER T, BERGFELD R, SCHOPFER P (1995) Arabinogalactan proteins in maize coleoptiles: developmental relationship to cell death during xylem differentiation but not to extension growth. **The Plant Journal** **7**, 25-36.
- SOUZA W (1998) Introdução à imunocitoquímica. In: SOUZA W (ed.). **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. (UENF: Rio de Janeiro)
- SUTHERLAND P, HALLET I, REDGWELL R, BENHAMOU N, MACRAE E (1999) Localization of cell wall polysaccharides during kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) ripening. **International Journal of Plant Science** **160**, 1099-1109.
- TRACHTENBERG S, FAHN A (1981) The mucilage cells of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.- development ultrastructure, and mucilage secretion. **Botanical Gazette** **142**, 206-213.
- TRACHTENBERG S, MAYER AM (1981a) Calcium oxalate crystals in *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Development and relation to mucilage cells- a stereological analysis. **Protoplasma** **109**, 271-283
- TRACHTENBERG S, MAYER AM (1981b) Composition and properties of *Opuntia ficus-indica* mucilage. **Phytochemistry** **20**, 2665-2668.
- TRACHTENBERG S, MAYER AM (1982a) Biophysical properties of *Opuntia ficus-indica* mucilage. **Phytochemistry** **21**, 2835-2843.
- TRACHTENBERG S, MAYER AM (1982b) Mucilage cells, calcium oxalate crystals and soluble calcium in *Opuntia ficus-indica*. **Annals of Botany** **50**, 549-557.
- VAN CUTSEM P, MESSIAEN J (1994) Biological effects of pectic fragments in plant cells. **Acta Botanica Neerlandica** **43**, 231-245.
- VANDENBOSCH KA, BRADLEY DJ, KNOX JP, PEROTTO S, BUTCHER GW, BREWIN N (1989) Common components of the infection thread matrix and the intercellular space identified by immunocytochemical analysis of pea nodules and uninfected roots. **EMBO Journal** **8**, 335-342.
- VASILYIEVA GV (1969) A contribution to the comparative anatomy of leaves of the species of *Araucaria* Juss. **Botanicheskii Zhurnal** **54**, 448-459.
- VIAN B, ROLAND JC (1991) Affinodetection of the sites of formation and of the further distribution of polygalacturonans and native cellulose in growing plant cells. **Biology of the Cell** **71**, 43-55.

- WILLATS WGT, LIMBERG G, BUCHHOLT HC, VAN ALEBEECK G-J, BENEN J, CHRISTENSEN TMIE, VISSER J, VORAGEN A, MIKKELSEN JD, KNOX JP (2000) Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. **Carbohydrate Research** **327**, 309-320.
- WILLATS WGT, MARCUS SE, KNOX JP (1998) Generation of a monoclonal antibody specific to (1-5)- $\alpha$ -L-arabinan. **Carbohydrate Research** **308**, 149-152.
- WILLATS WGT, McCARTNEY L, KNOX JP (2001) In-situ analysis of pectic polysaccharides in seed mucilage and at the root surface of *Arabidopsis thaliana*. **Planta** **213**, 37-44.
- WILLATS WGT, STEELE-KING CG, MARCUS SE, KNOX JP (1999b) Side chains of pectic polysaccharides are regulated in relation to cell proliferation and cell differentiation. **The Plant Journal** **20**, 619-628.



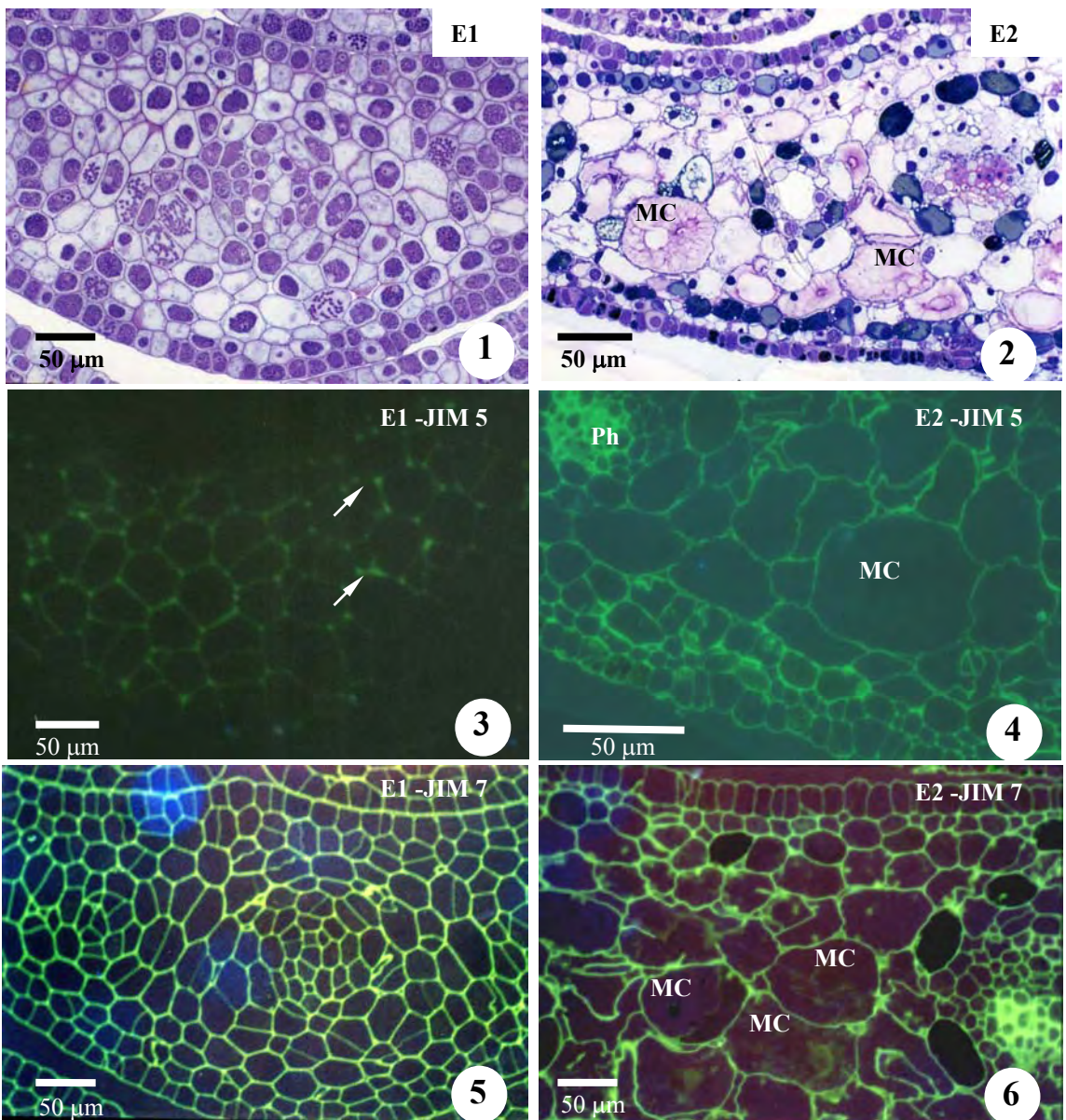
**Tabela 2. Reconhecimento dos epitopos pécticos entre folhas imaturas e maduras de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae)**

Anticorpos monoclonais/epitopos	Folhas imaturas (estádios 1 e 2)			Folhas maduras (estádio 4)			
	Parede celular das CC	Parede celular das CP	Mucilagem	Parede celular das CC	Parede celular das CP	Mucilagem	
<b>JIM 5</b> (HGA com reduzida metil-esterificação)	estádio 1	+	+	0	++	++	-
	estádio 2	++	++	-			
<b>JIM 7</b> (HGA com alta metil- esterificação)	estádio 1	+++	+++	0	+++	+++	+++
	estádio 2	+++	+++	++			
<b>JIM 13</b> (AGP's: proteínas arabinogalactanos)	estádio 1	++	+	0	++	++	-
	estádio 2	+++	+	+++			
<b>2F4</b> (HGA- Ca <sup>+2</sup> : ligações de cálcio com pectinas)	estádio 1	-	-	0	+++ (pontoações)	+++ (pontoações)	-
	estádio 2	-	-	-			
<b>LM 5</b> (galactanos)	estádio 1	+	+	0	++	+	-
	estádio 2	+++	+++	-			
<b>LM6</b> (arabinanos)	estádio 1	++	++	0	+	++	-
	estádio 2	++	++	-			

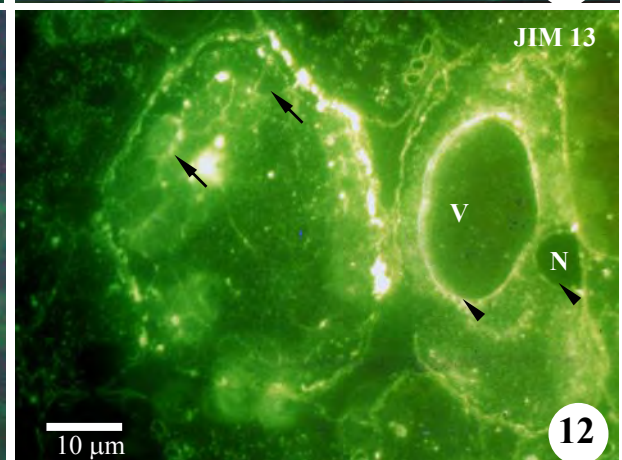
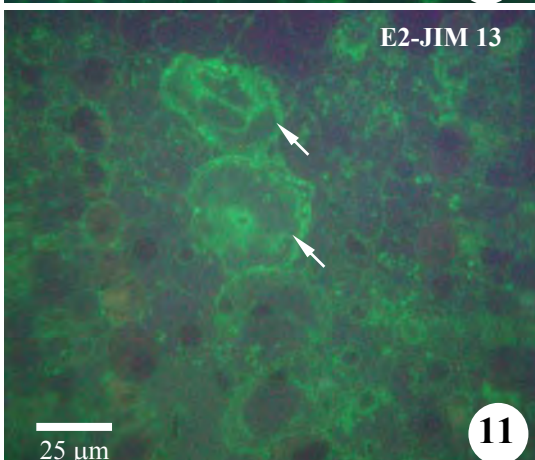
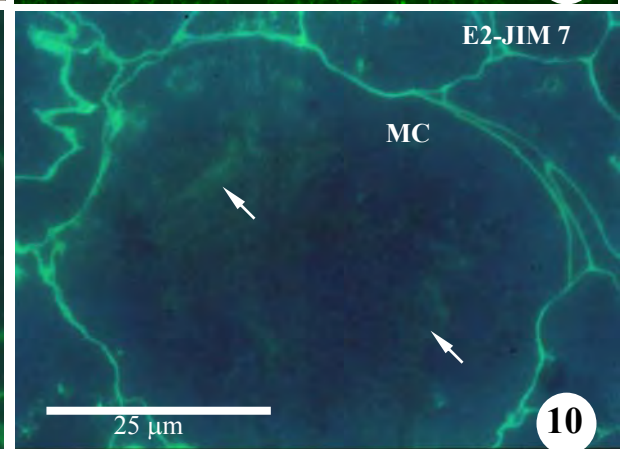
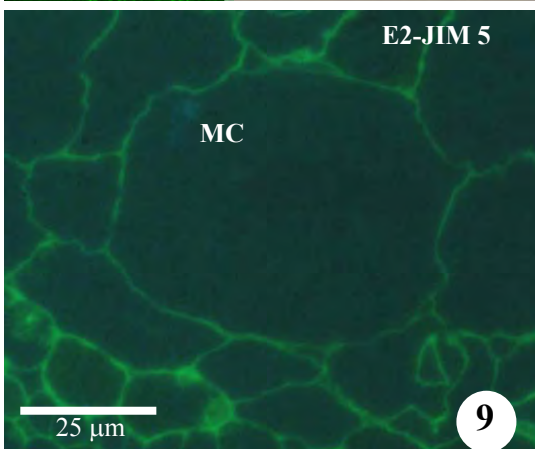
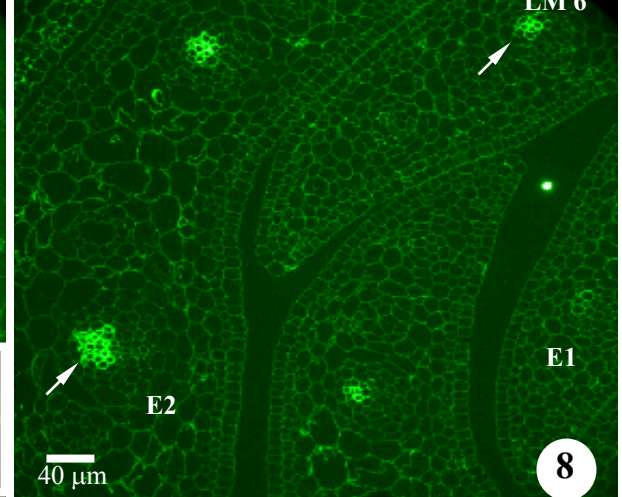
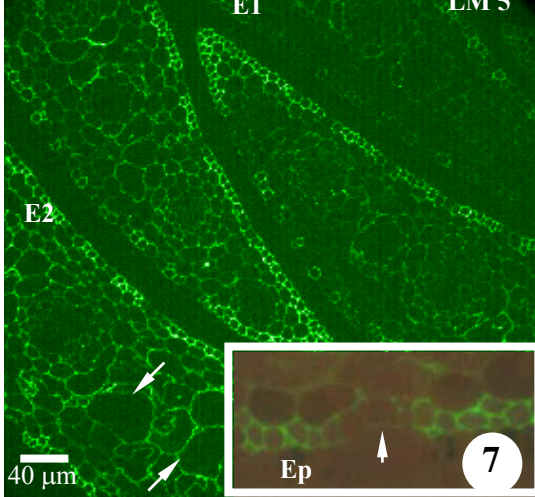
CC: células compartimentadas  
CP: células parenquimáticas vizinhas  
+++ : detecção intensa

++: detecção moderada  
+: detecção fraca ou tênue  
\_: sem detecção

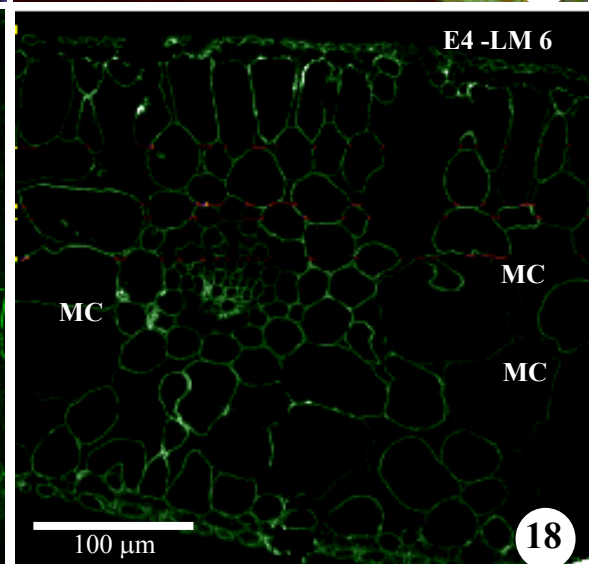
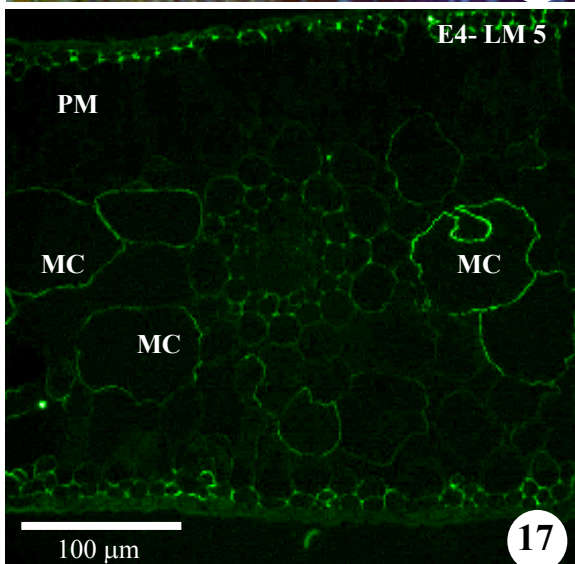
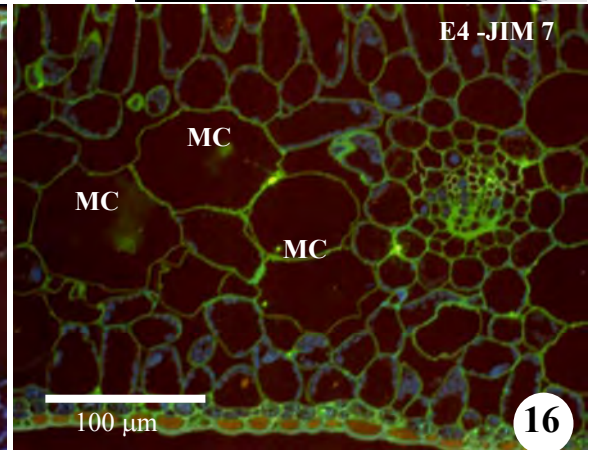
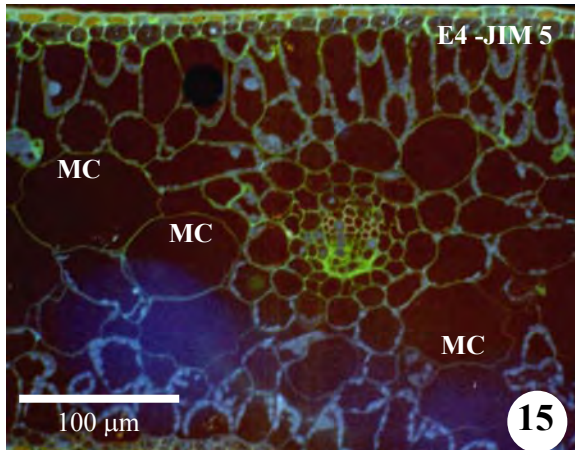
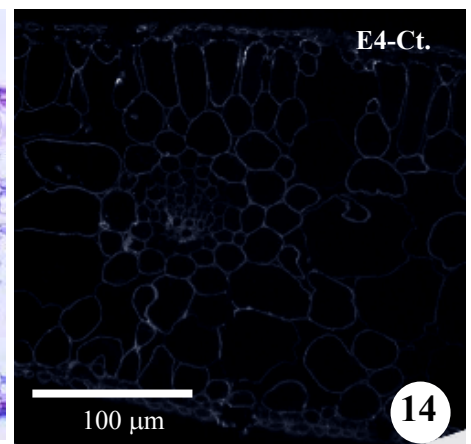
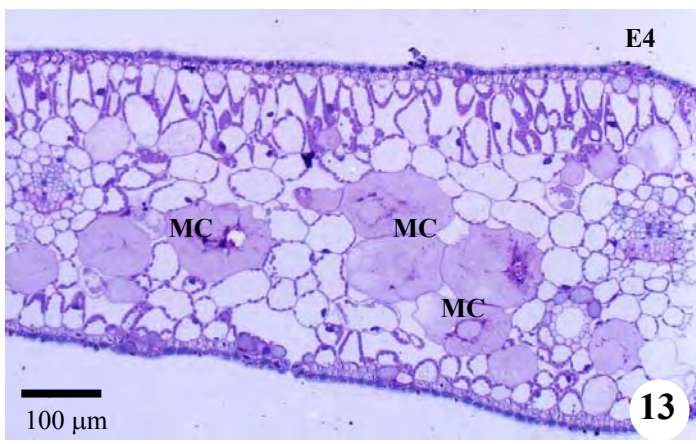
0: não observado



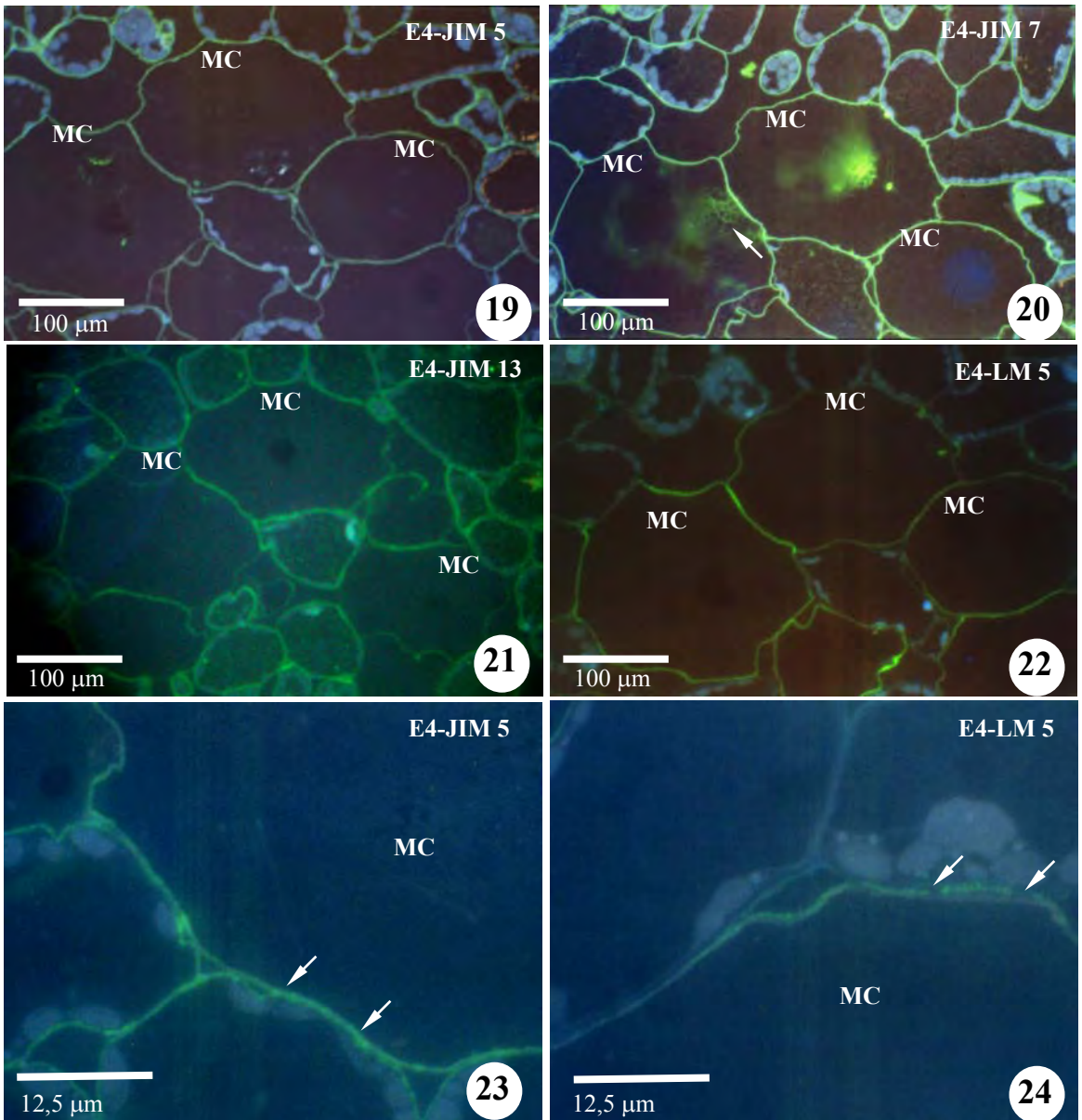
**Figuras 1-6.** Seção transversal da folha imatura de *Araucaria angustifolia*. **Figura 1.** MO em campo claro. Estádio 1. A folha apresentava um mesofilo indiferenciado, cujas células mucilaginosas ainda não eram observadas. **Figura 2.** MO em campo claro. Estádio 2. Células mucilaginosas (MC) em fase de secreção. **Figuras 3-6.** MO em epifluorescência com filtro de excitação 340-380 nm. **Figura 3.** Estádio 1. Com JIM 5 (HGA de reduzida metil-esterificação) a marcação era mais intensa nos vértices das células do mesofilo (setas). Ausência na epiderme e hipoderme. **Figura 4.** Com JIM 5 a marcação era moderada em todas as paredes. O floema (Ph) apresentava marcação mais intensa. **Figura 5.** Com JIM 7 (HGA de alta metil-esterificação) a marcação era intensa nas paredes celulares de todos os tecidos. **Figura 6.** Marcação intensa com JIM 7 em todas as paredes, moderada na epiderme.



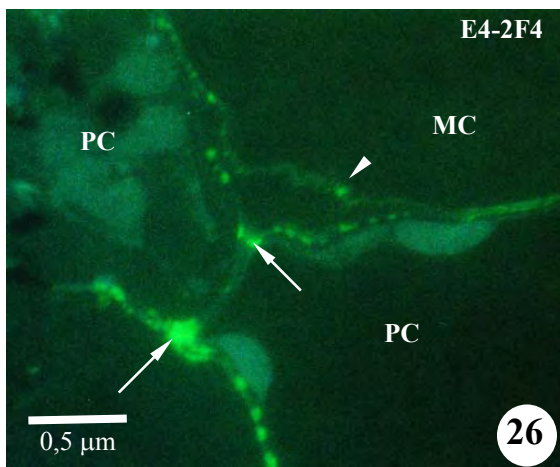
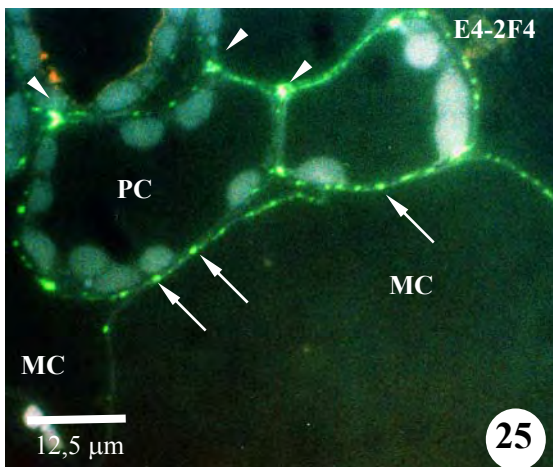
**Figuras 7-8 e 12.** MO em epifluorescência com filtro de excitação 450-490 nm. **Figuras 9-11.** MO em epifluorescência com filtro de excitação 340-380 nm. **Figuras 7-8.** Seção transversal das folhas no ápice caulinar. Estádio 1 (E1) e estágio 2 (E2), marcados com LM 5 e LM 6. **Figura 7.** Marcação com LM 5 (galactanos). Ausência nas paredes da epiderme e marcação intensa em algumas células da hipoderme (detalhe, abaixo e à direita). As células mucilaginosas (setas) marcavam intensamente. **Figura 8.** Marcação moderada com LM 6 (arabinanos), sem mostrar diferenças entre E1 e E2. Floema possuía marcação mais intensa (setas). **Figuras 9-12.** Estádio 2. Detalhe das células mucilaginosas em folhas imaturas. **Figura 9.** Com JIM 5 a marcação era moderada na parede celular, sem marcação na mucilagem. **Figura 10.** Com JIM 7 a marcação era intensa na parede celular e moderada na mucilagem em algumas regiões do lume (seta). **Figuras 11-12.** Marcação com JIM 13 (proteínas arabinogalactanos). **Figura 11.** Fraca marcação nas células do mesofilo e uma intensa marcação nas paredes e secreção das células mucilaginosas (setas). **Figura 12.** Detalhe de duas células mucilaginosas, que demonstravam intensa marcação nas lamelas da mucilagem (setas). Observar a área ocupada pelo vacúolo (V), com marcação do tonoplasto (seta menor) e a marcação da membrana nuclear (seta menor) do núcleo (N).



**Figuras 13-18.** Seção transversal da folha madura da planta jovem de *Araucaria angustifolia*. Estádio 4 (E4). **Figuras 14, 17 e 18.** MO em epifluorescência com filtro de excitação 450-490 nm. **Figuras 15-16.** MO em epifluorescência com filtro de excitação 340-380 nm. **Figura 13.** MO em campo claro. Presença das células mucilaginosas (MC), após degeneração do protoplasto. **Figura 14.** Controle (Ct) efetuado para os testes imunocitoquímicos (ausência de marcação). **Figura 15.** Com JIM 5 a marcação era fraca nas paredes de todos os tecidos, com exceção da epiderme. **Figura 16.** Com JIM 7 a marcação era intensa nas paredes de todos os tecidos. **Figura 17.** Com LM 5 a marcação era mais intensa nas paredes das células mucilaginosas (MC), comparadas com as células vizinhas. Nenhuma marcação no parênquima paliádico (PM). **Figura 18.** Marcação com LM 6. Todos os tecidos marcavam semelhantemente, com exceção das células mucilaginosas (MC), onde os arabinanos eram fracamente marcados.



**Figuras 19-24.** Detalhe das células mucilaginosas nas folhas maduras marcadas com diferentes anticorpos. Estádio 4 (E4). MO em epifluorescência com filtro de excitação 340-380 nm. **Figura 19.** Com JIM 5 a marcação era moderada nas paredes das células mucilaginosas (MC). **Figura 20.** Com JIM 7 a marcação era intensa nas paredes das células mucilaginosas e em algumas porções da mucilagem. Observe a marcação de alguns retículos pécticos (seta). **Figura 21.** Com JIM 13 a marcação era uniforme e semelhante para todas as paredes das células, inclusive nas células mucilaginosas. Observou-se a ausência de marcação para as AGPs na mucilagem, diferente das células imaturas. **Figura 22.** Com LM 5 a marcação era intensa nas paredes das células mucilaginosas, em contraste com a fraca marcação das células vizinhas. **Figuras 23 e 24.** As marcações com JIM 5 e LM 5 demonstravam que a distribuição de HGAs de reduzida metil-esterificação e galactanos, respectivamente, nas paredes das células mucilaginosas, não era uniforme (setas).



**Figuras 25 e 26.** Detalhe das células mucilaginosas e vizinhas nas folhas maduras, marcadas com 2F4 (ligações de cálcio com os HGAs). Estádio 4 (E4). MO em epifluorescência com filtro de excitação 340-380 nm. **Figura 25.** As regiões de pontoação (setas maiores) marcavam intensamente, entre uma célula parenquimática (PC) e uma célula mucilaginosa (MC). Os vértices e regiões dos espaços intercelulares era abundantemente marcados com este anticorpo nas células parenquimáticas (setas menores). **Figura 26.** Detalhe da região de um espaço intercelular, demonstrando os vértices das células parenquimáticas intensamente marcados (setas maiores), em contraste com as células mucilaginosas (MC), onde era, praticamente, ausente (seta menor).

A watercolor illustration of a forest scene. In the foreground, several tall, slender tree trunks with textured bark stand vertically. The background is filled with a dense canopy of green foliage and numerous small, vibrant pink flowers scattered throughout. The overall style is soft and painterly, with visible brushstrokes and a gentle color palette.

**CONCLUSÕES**

## ***Conclusões***

- **As células compartimentadas são, na realidade, células mucilaginosas** (idioblastos solitários), por apresentarem uma grande afinidade nas características morfo-citológicas, no desenvolvimento e nas funções que desempenham, comparadas às células mucilaginosas de outras famílias, estudadas por diversos autores.
- Sendo assim, **o termo “células compartimentadas” é incorreto** e devem ser denominadas de células de mucilagem, pois, além do desenvolvimento, a secreção é lamelar formando retículos pécticos após a maturidade celular, assim como muitas células mucilaginosas de dicotiledôneas. Portanto, não formam compartimentos ou áreas fechadas conforme as descrições de Bamber *et al.* (1978).
- A secreção de mucilagem se dá através do Golgi, com participação do RER. Portanto, a composição péctica é acrescida de conteúdos protéicos.
- A **função de controle hídrico** é comprovada após a verificação dos testes histoquímicos da mucilagem, sendo denominada de **“mucilagem péctica”**, baseado na capacidade hidrofílica desses compostos e, principalmente, pela resposta ao traçador apoplástico HPTS. A distribuição em séries, também indica a função de translocação e regulação hídrica na folha.
- **É evidente a ocorrência da morte celular programada ou apoptose**, baseado em um modelo apoptótico já descrito. Ocorre primeiramente a degradação do vacúolo central, antecedendo a condensação e decromatização da cromatina, deslocamento dessa para a periferia do núcleo, deformações na membrana nuclear e degradação geral do sistema de membranas.
- A parede celular das células mucilaginosas demonstra ter um **gradiente na distribuição de determinados epitopos pécticos**, com relação a rápida de-esterificação, ao aumento da concentração de galactanos e ligações de cálcio com as pectinas e diminuição nas concentrações de arabinanos e de proteínas arabinogalactanos.
- Constata-se que **essas variações diferem das células parenquimáticas dos demais tecidos**, justificando o aumento de volume e as diferenças na elasticidade da parede celular nas células mucilaginosas ao longo do desenvolvimento, além de



demonstrar, também, que essas células podem desempenhar funções diferentes com relação às células vizinhas.

- As **rotas de translocação ou armazenamento de água** das células mucilaginosas se dão, principalmente, através das células parenquimáticas do mesofilo, pela maior concentração de ligações de cálcio com pectinas, na região de pontoações entre uma célula mucilaginosa e uma célula vizinha.
- A secreção das células mucilaginosas também apresenta um gradiente na distribuição de alguns epitopos pécticos, observando-se uma **grande concentração de AGPs na mucilagem** durante a fase de secreção, o que indica maior capacidade de resistência à seca. A verificação de **um aumento na metil-esterificação das pectinas na maturidade**, também indica que essas células ainda mantêm a função de armazenamento hídrico.
- A **degradação das AGPs** na maturidade das células mucilaginosas, tanto na parede celular, como na mucilagem, **pressupõem o seu envolvimento no processo de morte celular programada.**