



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL



Variações anatômicas, estruturais e plasticidade fenotípica em duas regiões foliares ao longo da roseta de *Aechmea distichantha* Lem. (Bromeliaceae)

Mestranda: Manoela Bordignon Hermes

Orientador: Prof. Dr. Denis Coelho de Oliveira

Co-orientadora : Profa. Dra. Neuza Maria de Castro

Uberlândia – MG

2017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL



Variações anatômicas, estruturais e plasticidade fenotípica em duas regiões foliares ao longo da roseta de *Aechmea distichantha* Lem. (Bromeliaceae)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Mestranda: Manoela Bordignon Hermes

Orientador: Prof. Dr. Denis Coelho de Oliveira

Co-orientadora: Profa. Dra. Neuza Maria de Castro

Uberlândia – MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

H553v
2017

Hermes, Manoela Bordignon, 1988

Variações anatômicas, estruturais e plasticidade fenotípica em duas regiões foliares ao longo da roseta de *Aechmea distichantha* Lem. (*Bromeliaceae*) / Manoela Bordignon Hermes. - 2017.
63 f. : il.

Orientador: Denis Coelho de Oliveira.

Coorientadora: Neuza Maria de Castro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.

Inclui bibliografia.

1. Biologia vegetal - Teses. 2. Bromélia - Teses. 3. Parede celular vegetal - Teses. 4. Plasticidade fenotípica - Teses. I. Oliveira, Denis Coelho de. II. Castro, Neuza Maria de. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. IV. Título.

CDU: 581



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL



Variações anatômicas, estruturais e plasticidade fenotípica em duas regiões foliares ao longo da roseta de *Aechmea distichantha* Lem. (Bromeliaceae)

Manoela Bordignon Hermes

COMISSÃO EXAMINADORA

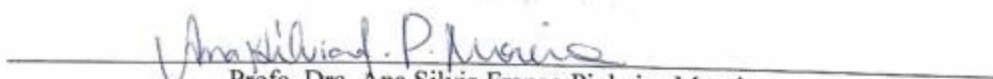
Presidente
(Orientador)


Prof. Dr. Denis Coelho de Oliveira
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

L 2 1 7

Examinadores: _____

Profa. Dra. Maria das Graças Sajo
Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" - Campus de Rio Claro


Profa. Dra. Ana Silvia Franco Pinheiro Moreira
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

Dissertação aprovada em 23/02/2017

Uberlândia – MG

2017

À minha família, minha fortaleza.

Agradecimentos

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia, por toda a infraestrutura, financiamento e apoio ao longo de toda a minha formação acadêmica.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa para financiar meus estudos e aperfeiçoamento profissional durante estes dois anos.

Agradeço ao professor Dr. Denis Coelho de Oliveira pela oportunidade de ser sua orientada, pelo aprendizado, experiência, conhecimento e desafios ao longo dos últimos três anos.

Agradeço à professora Dra. Neuza Maria de Castro, por ter me aceitado há seis anos para ser sua estagiária. Foram seis anos de aprendizado e admiração constante. Obrigada pela oportunidade de conviver com a senhora esse tempo, por todos os ensinamentos, experiência, carinho, amizade e respeito mútuo.

Agradeço à Deus, por todas as graças alcançadas ao longo da minha jornada nesta vida, por todas as conquistas, dificuldades, superações, aprendizados e evolução.

Agradeço à minha família, minha fortaleza e meu apoio incondicional, por acreditarem na minha capacidade e competência quando nem eu mesma acreditava. Obrigada pelo amor e carinho de vocês, amo vocês. Aos meus pais, por toda dedicação, esforço e abdicção que fizeram em prol da minha formação pessoal e profissional. Aos meus irmãos, pelo exemplo que me deram desde que nasci, por todos os ensinamentos ao longo de todos estes anos e por compreenderem a escolha do caminho que eu quis trilhar até aqui.

Agradeço ao meu namorado, Danilo, pelo amor, paciência, apoio, palavras de conforto, parceria e compreensão pela minha ausência em vários momentos ao longo destes anos.

Agradeço os meus amigos, Alessandra, Ana Luisa, Ana Luiza, Andressa, Caroline, Cíntia, Douglas, Fernanda, Gabriela, Ianna, Iara, Lílian, Márcia, Pamella, Paulo César e

Thais, obrigada pelo carinho, pela amizade, pela lealdade, pela compreensão e por todos os momentos compartilhados.

Agradeço às professoras Dra. Maria das Graças Sajo e Dra. Ana Silvia Franco Pinheiro Moreira em participarem da banca de mestrado.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento Vegetal e Interações e do Laboratório de Fisiologia Vegetal pela convivência, amizade, troca de experiências e parceria ao longo destes dois anos.

Agradeço à Nívia Mara Silva Rodrigues, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, por todo suporte, apoio, paciência e amizade.

E, por fim, agradeço à todos os professores que fizeram parte da minha formação profissional e pessoal. Com certeza guardarei com muito carinho todos os ensinamentos e experiências compartilhadas.

Sumário

Resumo Geral	1
Abstract	2
Introdução Geral	3
Referências Bibliográficas	6
Variações anatômicas, estruturais e plasticidade fenotípica em duas regiões foliares ao longo da roseta de <i>Aechmea distichantha</i> Lem. (Bromeliaceae)	9
Resumo	10
Abstract	11
Introdução	12
Material e Métodos	15
<i>Sistema de estudo</i>	15
<i>Análise Anatômica</i>	16
<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	16
<i>Análises Histométricas e Índice de Plasticidade (RDPI)</i>	17
<i>Imunocitoquímica</i>	18
<i>Análise estatística</i>	18
Resultados	18
<i>Características Gerais</i>	18
<i>Índice de Plasticidade (RDPI)</i>	20
<i>Análise de Imunocitoquímica</i>	22
Discussão	24
<i>Índices de Plasticidade Fenotípica dos tecidos foliares baseado em Distância Relativa (RDPI)</i>	26
<i>Imunocitoquímica da parede celular</i>	27
Conclusão	30
Referência Bibliográfica	30
Tabelas	37
Figuras	43
Normas da Revista: Acta Botanica Brasilica	51

Resumo Geral

Espécies de bromélia tanque-dependente geralmente apresentam sistema radicular reduzido e assim, além da atividade fotossintética, as folhas absorvem água e nutrientes que se acumulam no tanque. Espera-se que variações estruturais nos tecidos foliares, em decorrência de diferentes posições na roseta, estejam relacionadas à capacidade de absorver e armazenar água, e auxiliem na caracterização fisiológica de *Aechmea distichantha* Lem., espécie de estudo deste trabalho. Análises anatômicas foram realizadas em amostras do ápice e da base de folhas ocupando diferentes posições ao longo da roseta de *A. distichantha*. A análise de plasticidade fenotípica para avaliar a amplitude das variações estruturais foi feita usando dados de histometria. A estrutura da parede celular foi avaliada através de testes de imunocitoquímica usando anticorpos monoclonais. A partir das análises realizadas foi possível constatar que as folhas de *A. distichantha* apresentam variações estruturais da parede celular e plasticidade fenotípica de acordo com a região foliar analisada e com a posição da folha na roseta, sendo o parênquima aquífero o tecido mais plástico. A região basal das folhas, principalmente das internas, apresenta maior quantidade de parênquima aquífero e pectina com alta metil-esterificação da parede que facilita a absorção de água nos estágios iniciais de desenvolvimento. A região apical das folhas externas na roseta é mais especializada para a atividade fotossintética, e apresenta menor quantidade de parênquima aquífero e paredes celulares mais rígidas. Assim, a partir deste trabalho, nota-se que *A. distichantha* apresenta gradiente estrutural e funcional tanto nas diferentes regiões da folha, como em folhas ocupando diferentes posições na roseta.

Palavras-chave: bromélia tanque-dependente, parênquima aquífero, parede celular, plasticidade fenotípica.

Abstract

Species of tank-dependent bromeliad usually have a reduced root system and thus, in addition to the photosynthetic activity, the leaves absorb water and nutrients that accumulate in the tank. It is expected that structural variations in the foliar tissues, due to different positions in the rosette, are related to the capacity to absorb and store water, and help in the physiological characterization of *Aechmea distichantha* Lem. Anatomical analyzes were performed on apex and leaf base samples occupying different positions along the rosette of *A. distichantha*. The analysis of phenotypic plasticity to evaluate the amplitude of the structural variations was done using histometry data. The cell wall structure was evaluated by immunocytochemistry assays using monoclonal antibodies. From the analyzes carried out, it was possible to verify that the leaves of *A. distichantha* present structural variations of the cell wall and phenotypic plasticity according to the analyzed leaf region and the position of the leaf in the rosette, the aquifer parenchyma being the most plastic tissue. The basal region of the leaves, mainly of the internal ones, presents / displays greater amount of parenchyma aquifer and pectin with high methyl esterification of the wall that facilitates the absorption of water in the initial stages of development. The apical region of the outer leaves in the rosette is more specialized for the photosynthetic activity, and presents less amount of aquifer parenchyma and more rigid cellular walls. Thus, from this work, it is noted that *A. distichantha* presents a structural and functional gradient both in the different regions of the leaf, and in leaves occupying different positions in the rosette.

Key words: tank-dependent bromeliad, parenchyma aquifer, cell wall, phenotypic plasticity.

Introdução Geral ¹

Campo rupestre é uma fitofisionomia presente no Cerrado e na Caatinga, caracterizado por uma vegetação associada ao substrato de quartzito-arenito em locais de altitude elevada (RAPINI et al., 2008). A vegetação é composta principalmente por ervas e arbustos distribuídos em mosaico, geralmente incluindo as comunidades rupícolas dos afloramentos rochosos (ALVEZ; KOLBEK, 1994; CONCEIÇÃO; GIULIETTI, 2002; GIULIETTI et al., 1987; GIULIETTI; PIRANI; HARLEY, 1997; HARLEY, 1997). Os campos rupestres apresentam características ambientais muito peculiares como solos oligotróficos e ácidos, oscilações diárias de temperaturas, exposição ao vento e severas restrições hídricas. Desta forma, apresentam vegetação tipicamente xeromórfica, com adaptações estruturais típicas de ambientes xéricos, ou seja, ambientes com baixa disponibilidade hídrica (GIULIETTI; PIRANI; HARLEY, 1997; HARLEY, 1997).

Ambientes xéricos apresentam grupos marcantes de espécies vegetais, especialmente entre as monocotiledôneas: Poaceae, Eriocaulaceae, Xyridaceae e Bromeliaceae, entre outras (RAPINI et al., 2008). Dentre as adaptações morfológicas, podemos mencionar a elevada capacidade de fixação ao substrato, tolerância à dessecação ou resistência ao estresse hídrico e folhas geralmente coriáceas e/ou fibrosas (RAPINI et al., 2008). Ou ainda, alterações mais extremas, como a formação de espinhos nos cactos e a formação de tanques. Estes ocorrem em muitas espécies de bromélias rupícolas, formados pela sobreposição da base das folhas dispostas em roseta, que acumula água e detritos orgânicos (GIVNISH et al., 2014; RAPINI et al., 2008; TAKAHASHI; MERCIER, 2011).

Além de adaptações na morfologia externa, ocorrem adaptações anatômicas como: redução no tamanho das células epidérmicas e decréscimo no tamanho dos espaços celulares, aumento no espessamento das paredes celulares e da cutícula, a clorofila geralmente não está

¹ Introdução Geral segue as normas da ABNT

presente em células paliádicas típicas, que estão ausentes em um certo número de espécies, pode ou não ter parênquima esponjoso, presença de parênquima aquífero com grandes células de paredes delgadas e sistema vascular com grande quantidade de esclerênquima (BENZING, 2000; SMITH; DOWNS, 1979). Nas bromélias, além das características mencionadas acima, são observados tricomas tectores e escamas peltadas com função na absorção de água através das folhas (BENZING, 2000; MENEZES; SILVA; PINNA, 2006), visto que, geralmente, estas espécies apresentam redução estrutural e funcional do sistema radicular (BENZING, 2000; TOMLINSON, 1969).

As folhas de bromélias tanque-dependentes apresentam diferenças anatômicas e fisiológicas entre as regiões apical e basal, sendo a região apical especializada para a fotossíntese e a basal para a absorção de água (FRESCHI et al. 2010; SCHIMITD; ZOTZ, 2001). A bainha foliar, em contato direto com a água acumulada, permite que a planta sobreviva em ambientes xéricos (GIVNISH et al., 2014; PITTENDRIGH, 1948), como os campos rupestres. Entretanto, a água limita a capacidade dessa região de realizar as trocas gasosas com a atmosfera (BENZING, 2000). Porém, são poucos os trabalhos que discutem esse gradiente anatômico e fisiológico (FRESCHI et al., 2010) em bromélias tanque-dependentes.

A estrutura das células, tecidos e órgãos é dependente das alterações na composição da parede celular durante o desenvolvimento vegetal, especialmente dos componentes: pectinas, hemiceluloses, celulosas e proteínas estruturais (ALBERSHEIM et al., 2011; COSGROVE, 2005; DOLAN; LINSTED; ROBERTS, 1997; PALIN; GEITMANN, 2012; SOMERVILLE et al., 2004). Essas variações na composição e estrutura da parede celular dependem do estágio de desenvolvimento, tipo e função do tecido, e das condições ambientais (ALBERSHEIM et al., 2011; BECK, 2005; CAFFALL; MOHNEN, 2009; EVERT, 2006; POPPER, 2008; OVODOV, 2009;). Assim, espera-se que existam variações estruturais nas folhas em diferentes posições na roseta nas espécies de bromélias tanque-dependentes e que estas variações estejam relacionadas

às características funcionais adaptativas deste grupo. Ainda, pela primeira vez a variação na composição da parede celular de *A. distichantha* será avaliada e relacionada à funcionalidade dos tecidos e adaptação desta espécie tanque-dependente. Adaptações estruturais, morfológicas e anatômicas presentes nas espécies de campos rupestres geralmente têm como função aumentar a eficiência no uso da água e o metabolismo fotossintético (RAPINI et al., 2008; TAIZ; ZEIGER, 2006).

O gênero *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromelioideae) é caracterizado morfológicamente por ser acaulescente, frequentemente se propagando por rizomas, folhas simples claramente dividida em bainha e lâmina, geralmente formando tanque, de textura coriácea e com algumas nervuras proeminentes (SMITH; TILL, 1998). O escape é bem desenvolvido, inflorescência composta ou simples, flores dísticas ou polissítico, séssil, perfeita, sépalas livres ou conadas e fortemente assimétricas, pétalas livres, tendo aproximadamente 2 apêndices adnatos, estames menores do que as pétalas, livres ou a segunda séria adnata às pétalas e anteras dorsifixas (SMITH; TILL, 1998). A bainha é mais espessa que a lâmina, com formato oval e geralmente apresenta ápice agudo ou obtuso (SMITH; TILL, 1998). As folhas de *Aechmea* são hipostomáticas, revestidas por células epidérmicas de paredes sinuosas, portadoras de corpos silicosos e com escamas peltadas nas duas superfícies (PROENÇA; SAJO, 2004). O mesófilo é formado pela hipoderme mecânica, parênquima aquífero e parênquima clorofiliano que apresenta canais de aeração interrompidos por diafragmas formados por células braciiformes (PROENÇA; SAJO, 2004). A anatomia foliar de algumas espécies do gênero já foram estudadas, tanto para fins descritivos (ARRUDA; COSTA, 2003; PROENÇA; SAJO, 2004; SCATENA; SEGECIN, 2005) e taxonômicos (VERSIEUX et al., 2010), como ecológicos, com o objetivo de compreender a variabilidade adaptativa das espécies à diferentes ambientes (CAVALLERO; LÓPEZ; BARBERIS, 2009; PRADO et al., 2014; SCARANO et al., 2002; VOLTOLINI; SANTOS, 2011; ZOTZ; REICHLING; VALLADARES, 2002; ZOTZ et al.,

2004). Entretanto, este estudo busca explicar o gradiente estrutural e funcional dentro da roseta de uma espécie de bromélia tanque-dependente - *Aechmea distichantha* - e consequentemente compreender os mecanismos de adaptação ao ambiente xérico.

Referências Bibliográficas²

ALBERSHEIM, P. et al.. **Plant cell walls: from chemistry to biology**. New York, Garland Science, 2011.

ALVEZ, R. J. V.; KOLBEK, J. Plant species endemism in savanna vegetation on table mountains (Campo Rupestre) in Brasil. **Vegetation**, v. 113, p. 125-139, 1994.

ARRUDA, R. C. O.; COSTA, A. F. Foliar anatomy of five *Vriesea* Sect. *Xiphion* (Bromeliaceae) species. **Selbyana**, v. 24, n. 2, p. 180-189, 2003.

BECK, C. B. **An Introduction to Plant Structure and Development**. Cambridge, Cambridge University Press., 2005.

BENZING, D. H. **Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation**. Cambridge, Cambridge University Press, 2000.

CAFFALL, K.H. & MOHNEN, D., The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, Si, v. 344, p. 879–1900, 2009.

CAVALLERO, L.; LÓPEZ, D.; BARBERIS, I. M. Morphological variation of *Aechmea distichantha* (Bromeliaceae) in a Chaco forest: habitat and size-related effects. **Plant Biology**, v. 11, p. 379-391, 2009.

CONCEIÇÃO, A.; GIULIETTI, A. M. Composição florística e aspectos estruturais de campo rupestre em dois platôs do Morro do Pai Inácio, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Hoehnea**, v. 29, p. 34-48, 2002.

COSGROVE, D.J., Growth of the plant cell wall. **Natural Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, p. 850–861, 2005.

DOLAN, L.; LINSTED, P.; ROBERTS, K. Developmental regulation of pectic polysaccharides in the root meristem of *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 713–720, 1997.

EVERT, R. F. **Esau's Plant Anatomy. Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development**. 3 ed. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2006.

² Referência Bibliográfica segue as normas da ABNT

FRESCHI, L. et al. Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 526-533, 2010.

GIULIETTI, A. M. et al. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Caracterização e lista de espécies. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 9, p. 1-152, 1987.

GIULIETTI, A. M.; PIRANI, J. R.; HARLEY, R.M. Espinhaço range region eastern Brazil. In: DAVIS, S. D. et al. **Centres of plant diversity: A guide and strategies for the conservation. Cambridge: The Americas**, 1997. p. 397-404.

GIVNISH, T. J. et al. Adaptative radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 71, p. 55-78, 2014.

HARLEY, R. M. Introduction. In: STANNARD, B.L. **Flora of the Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1995. p. 1-40.

MENEZES, N. L.; SILVA, D. C.; PINNA, G. F. A. M. Folha. In: APPEZZATO-DAGLORIA, B; CARMELLO-GUERREIRO, S. **Anatomia Vegetal**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, p. 309. 2006.

OVODOV, Y. S. Current views on pectin substances. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 35, p. 269–284, 2009.

PALIN, R.; GEITMANN, A. The role of pectin in plant morphogenesis. **BioSystems**, v. 109, p. 397-402, 2012.

PITTENDRIGH, C. S. The bromeliad-Anophelesmalaria complex in Trinidad. I -The bromeliad flora. **Evolution**, v. 2, p. 58-89, 1948.

POPPER, Z. A., 2008. Evolution and diversity of green plant cell walls. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 286–292.

PRADO, J. P. C. et al. Physiological characteristics of the Atlantic Forest native bromeliads: *Nidularium campo-alegrense* Leme and *Aechmea ornata* Baker. **Acta Scientiarum**, v. 36, n. 1, p. 101-108, 2014.

PROENÇA, S. L.; SAJO, M. G. Estrutura foliar de espécies de *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) do Estado de São Paulo, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 2, p.319-331, 2004.

RAPINI, A. et al. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, v. 4, n. 1-2, p. 15-23, 2008.

SCARANO, F. R. et al. Acclimation or stress symptom? An integrated study of intraspecific variation in the clonal plant *Aechmea bromeliifolia*, a widespread CAM tank bromeliad. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 140, p. 391-401, 2002.

SCATENA, V. L.; SEGECIN, S. Anatomia foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 3, p. 635- 649, 2005.

SCHMIDT, G.; ZOTZ, G. Ecophysiological consequences of differences in plant size: in situ carbon gain and water relation of the epiphytic bromeliad, *Vriesea sanguinolenta*. **Plant Cell Environment**, v. 24, p.101-111, 2001.

SMITH, L. B.; TILL, W. Bromeliaceae. In: KUBITZKI, K. **The Families and Genera of Vascular Plants V. IV. Flowering Plants Monocotyledons: Alismatanae and Commelinanae (except Graminae)**. p.74-99, 1998.

SOMERVILLE, C. et al. Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls. **Science**, v. 306, p. 2206-2211, 2004.

TAIZ, T.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. Ed. Si: Editora Artmed, 2006.

TAKAHASHI, C. A.; MERCIER, H. Nitrogen metabolism in leaves of a tank epiphytic bromeliad: Characterization of a spatial and functional division. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 1208-1216, 2011.

TOMLINSON, P. B. Anatomy of the monocotyledons. III. In: TOMLINSON, P. B. **Commelinales-Zingiberales**. Oxford: Clarendon Press, 1969.

VERSIEUX, L. M. et al. *Alcantarea* (Bromeliaceae) leaf anatomical characterization and its systematic implications. **Nordic Journal of Botany**, v. 28, p. 385-397, 2010.

VOLTOLINI, C. H.; SANTOS, M. Variações na morfoanatomia foliar de *Aechmea lindenii* (E. Morren) Baker var. *lindenii* (Bromeliaceae) sob distintas condições ambientais. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 1, p. 2-10, 2011.

ZOTZ, G. et al. Physiological and anatomical changes during the early ontogeny of the heteroblastic bromeliad, *Vriesea sanguinolenta*, do not concur with the morphological change from atmospheric to tank form. **Plant, Cell and Environment**, v. 27, p. 1341- 1350, 2004.

ZOTZ, G.; REICHLING, P.; VALLADARES, F. A Simulation Study on the Importance of Size-related Changes in Leaf Morphology and Physiology for Carbon Gain in an Epiphytic Bromeliad. **Annals of Botany**, v. 90, p. 437-443, 2002.

Variações anatômicas, estruturais e plasticidade fenotípica em duas regiões foliares ao longo da roseta de *Aechmea distichantha* Lem. (Bromeliaceae)³

Manoela Bordignon Hermes^{1*}, Neuza Maria de Castro¹, Denis Coelho de Oliveira¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Biologia, 38402-020, Uberlândia, MG, Brasil.

* Autora para correspondências:

e-mail: manu_hermes@hotmail.com

³ Segue as normas da Revista Acta Botanica Brasilica

Resumo

Espécies de bromélia tem ampla capacidade de adaptação a diversos ambientes com variação da disponibilidade hídrica e luminosa. Estas características ambientais determinam a morfologia de diferentes populações de bromélias, especialmente aquelas que formam tanque. Entretanto, a despeito da variação entre populações, podem ocorrer variações em um mesmo indivíduo, com base na posição da folha na roseta. Assim, folhas em diferentes posições na roseta de *Aechmea distichantha* Lem. (bromélia tanque) foram avaliadas com o intuito de detectar e quantificar quais seriam essas variações estruturais. O material foi coletado na Serra da Canastra (Minas Gerais - Brasil), seguindo os protocolos convencionais tanto para as análises anatômicas, histométrica e de plasticidade fenotípica (RDPI), quanto para a caracterização estrutural da parede celular. O parênquima aquífero foi o tecido que apresentou maior plasticidade fenotípica entre as folhas da roseta, enquanto que o mesófilo, parênquima clorofiliano e regiões dos feixes vasculares apresentaram os menores valores de plasticidade. A análise da parede celular demonstrou maior quantidade de epitopos de alta metil-esterificação em praticamente todos os tecidos no ápice e na base da folha interna, na base das folhas intermediária e externa. Os epitopos com baixa metil-esterificação foram marcados na maioria dos tecidos, exceto no parênquima aquífero, no ápice das folhas intermediária e externa. As proteínas estruturais apresentaram maiores marcações nos epitopos das folhas internas e menores marcações nas folhas externas. Não houve marcações no parênquima aquífero para epitopos de proteínas estruturais arabinogalactanos (AGPs). De fato, as variações estruturais presentes ao longo da roseta de *A. distichantha* representam adaptações funcionais, com a região apical especializada para a fotossíntese e a região basal para a absorção de água.

Palavras-chave: bromélia tanque-dependente, parênquima aquífero, plasticidade fenotípica, parede celular e pectinas.

Abstract:

Bromeliad species have ample adaptability to various environments with varying water and light availability. These environmental characteristics determine the morphology of different populations of bromeliads, especially those that form a tank. However, in spite of the variation between populations, variations can occur in the same individual, based on the position of the leaf in the rosette. Thus, leaves in different positions in the rosette of *Aechmea distichantha* Lem. (bromeliad tank) were evaluated in order to detect and quantify what these structural variations would be. The material was collected in Serra da Canastra (Minas Gerais - Brazil), following the conventional protocols for anatomical, histometric and phenotypic plasticity analysis (IPDL), as well as for the structural characterization of the cell wall. The aquifer parenchyma was the tissue that presented greater phenotypic plasticity between the rosette leaves, while the mesophyll, chlorophyllous parenchyma and vascular bundle regions had the lowest values of plasticity. Cell wall analysis demonstrated higher amounts of high methyl esterification epitopes in virtually all tissues at the apex and at the base of the inner leaf at the base of the intermediate and outer leaves. The epitopes with low methyl esterification were marked in most tissues, except in the aquifer parenchyma, at the apex of the intermediate and external leaves. The structural proteins showed greater markings on the epitopes of the inner leaf and smaller markings on the outer leaf. There were no markings on the aquifer parenchyma for structural proteins arabinogalactans epitopes (AGP). In fact, the structural variations present along the rosette of *A. distichantha* represent functional adaptations, with the apical region specialized for photosynthesis and the basal region for water absorption.

Key words: tank-dependent bromeliad, parenchyma aquifer, phenotypic plasticity, cell wall, pectin.

Introdução

Dentre as formações vegetais brasileiras os campos rupestres se destacam pela grande diversidade de espécies e notável heterogeneidade de habitats (Conceição & Giuliatti 2002; Conceição *et al.* 2007, Jacobi *et al.* 2007). Nos campos rupestres os afloramentos rochosos são comuns e podem ser definidos como *inselbergs*, que detém grande diversidade de espécies xeromórficas (Porembski 2007). Dentre estas espécies destacam-se as Bromeliaceae que formam tanque pela sobreposição da base das folhas dispostas em roseta (Rapini *et al.* 2008, Givnish *et al.* 2014; Takahashi & Mercier 2011). Nestas espécies, a água proveniente da chuva e os detritos orgânicos são armazenados e posteriormente absorvidos pelas escamas da superfície foliar (Pittendrigh 1948; Benzing 1976; 1990; 2000; Schmidt & Zotz 2001; Givnish *et al.* 2014). Essas escamas constituem a característica mais notável das Bromeliaceae e substituem a função estrutural e funcional do sistema radicular (Tomlinson 1969; Braga 1977). A absorção de água e o seu armazenamento no parênquima aquífero, permitem a sobrevivência das bromélias que crescem em ambientes rochosos, com baixa disponibilidade de nutrientes e déficit hídrico (Benzing 1976; 2000; Schmidt & Zotz 2001; Takahashi & Mercier 2011). Resta saber se existem variações anatômicas desse parênquima aquífero, nas folhas em diferentes posições na roseta.

Com a redução do sistema radicular, as folhas das bromélias tanque-dependente tornaram-se o principal órgão responsável pela manutenção da sobrevivência destas plantas (Benzing 1990; 2000; Popp *et al.* 2003), e podem apresentar diferenças anatômicas e funcionais ao longo das regiões apical e basal (Freschi *et al.* 2010). Em geral, a região apical investe em tecidos fotossintetizantes, enquanto a região basal, em estruturas para a absorção de água e nutrientes (Schmidt & Zotz 2001; Freschi *et al.* 2010). Porém, são poucos os trabalhos que quantificam estas variações ou mesmo discutem o gradiente anatômico do ápice e da base de folhas em diferentes posições na roseta, como visto por Freschi *et al.* (2010) em *Guzmania*

monostachia (L.) Rusby ex Mez var. *monostachia*. A análise desse gradiente anatômico nos permitiria, também, avaliar a estrutura e a variação dos componentes da parede celular, uma vez que esta é constantemente montada, desmontada e deformada (Palin & Geitmann, 2012) durante os estágios de desenvolvimento dos órgãos vegetais e das diferentes condições ambientais (Caffall & Mohnen 2009).

Dentre os componentes da parede celular, destacam-se pela abundância: a celulose, as hemiceluloses e as pectinas, além das proteínas associadas, água e íons (Dolan *et al.* 1997; Somerville *et al.* 2004; Cosgrove 2005; Albersheim *et al.* 2011; Palin & Geitmann 2012). As propriedades, funções e proporções relativas entre esses componentes, variam de acordo com o tipo e função da célula e do grupo vegetal (Beck 2005; Evert 2006; Popper 2008; Ovodov 2009; Albersheim *et al.* 2011), determinando o desenvolvimento das células e órgãos, bem como, o comportamento mecânico dos tecidos (Cosgrove 2005). Desta forma, espera-se que os tecidos de revestimento, de sustentação, clorofiliano e especialmente o parênquima aquífero, das bromélias tanque-dependentes, apresentem uma variação dos componentes da parede celular, em folhas que ocupam diferentes posições na roseta.

A pectina é um dos componentes mais abundante da matriz da parede celular, constituindo até 35% de paredes primárias de monocotiledôneas não gramíneas (Jones *et al.* 1997; Mohnen 2008). É o polissacarídeo estrutural e funcionalmente mais complexo (Palin & Geitmann 2012), com impacto significativo sobre as características físico-químicas da matriz celular (Mohnen 2008). As pectinas formam um grupo heterogêneo de polissacarídeos (Cosgrove 1997), ricos em ácido galacturônico que pode estar presente nas três classes: ramnogalacturonanos I (RG-I), ramnogalacturonanos II (RG-II) e homogalacturonanos (HGA) (Ridley *et al.* 2001; Willats *et al.* 2001; Pérez *et al.* 2003; Albersheim *et al.* 2011). A última classe, HGA, é a mais abundante na composição da matriz da parede celular primária das plantas terrestres (Ridley *et al.* 2001; Willats *et al.* 2001), representando 60% do valor total das

pectinas (O'Neill *et al.* 1990; Mohnen *et al.* 2008). As pectinas são sintetizadas na forma metil-esterificada (Palin & Geitmann 2012) e estão sujeitas a modificações que alteram a sua conformação e ligação na parede através do processo de de-metil-esterificação (Xiao & Anderson 2013). O processo de de-metil-esterificação altera a funcionalidade das pectinas e consequentemente a função das células e tecidos (Albersheim *et al.* 2011). As diferenças no grau de metil-esterificação dos epitopos das pectinas em folhas com diferentes posições ao longo da roseta de *Aechmea distichantha* podem representar adaptações que maximizam o armazenamento de água nos tecidos.

Poucos estudos abordam a variação na composição da parede celular durante o desenvolvimento foliar em espécies de monocotiledôneas (Carpita 1984; Hermes *et al.* 2014), e a maioria trata da quantificação ou da síntese dos seus componentes (Burke *et al.* 1974; Jarvis *et al.* 1988; Carpita 1989; Yapo 2010). De fato, este é o primeiro estudo que busca entender a variação imunocitoquímica da parede celular e a capacidade plástica dos tecidos do ápice e da base de folhas, em diferentes posições na roseta, para *Aechmea distichantha* Lem (Bromeliaceae). Geralmente, o gênero *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) tem sido foco de estudos anatômicos puramente descritivos (Arruda & Costa 2003; Proença & Sajo 2004; Scatena & Segecin 2005), taxonômicos (Versieux *et al.* 2010) ou ecológicos, visando compreender a variabilidade adaptativa à diferentes condições ambientais, principalmente em ambientes de sol e sombra em populações distintas (Scarano *et al.* 2002; Zotz *et al.* 2002; Freitas *et al.* 2003; Zotz *et al.* 2004; Skillman *et al.* 2005; Cavallero *et al.* 2009; Cavallero *et al.* 2011; Voltolini & Santos 2011; Prado *et al.* 2014).

Considerando que as folhas internas das bromélias tanque-dependentes apresentam características para facilitar a absorção e o transporte de água, enquanto as folhas externas investem em estruturas para armazenamento e retenção dessa água. Considerando ainda que o ápice das folhas está mais adaptado para fotossíntese, enquanto a base para a absorção e

armazenamento de água, o objetivo deste estudo foi avaliar a plasticidade estrutural das folhas de *A. distichantha*, dentro de um gradiente espacial, analisando diferentes indivíduos no período chuvoso. A análise da plasticidade dos tecidos foliares, principalmente do parênquima aquífero, e as variações na estrutura da parede celular dos tecidos do ápice e da base de folhas ocupando diferentes posições na roseta responderiam as principais questões a serem avaliadas neste trabalho: (a) existem diferenças estruturais (citológicas e histológicas) entre folhas proximais e distais do tanque? (b) Qual (ais) estrutura (s) foliar (es) que apresenta (m) maior plasticidade, considerando diferentes posições no tanque em *A. distichantha*? (c) Qual é a magnitude desta diferença?

Material e Métodos

Sistema de estudo

Aechmea distichantha Lem. é uma Bromeliaceae que ocorre como rupícola nos campos rupestres (Fig. 1A) e a disposição das folhas formam um reservatório hídrico (tanque). As folhas são coriáceas, verdes à levemente avermelhadas, tanto na superfície adaxial, como na abaxial, bainha alva, espinhos negrescentes no ápice foliar, inflorescência com escapo rosáceo; brácteas escapais rosáceas; flores roxas e raque rosa (Fig. 1A-B).

O material de estudo foi coletado no Parque Nacional da Serra da Canastra - PNSC (S 20° 08' 16,1'' W 46° 47' 18,2''), Sacramento, Minas Gerais, Brasil. A área do PNSC e seu entorno situam-se no domínio fitogeográfico do Cerrado e a maior parte do PNSC é coberta por formações campestres e afloramentos rochosos (MMA/IBAMA, 2005). O espécime foi identificado por especialistas da família, Rafaela Forzza e Leonardo Melo Versieux, e depositado no *Herbarium Uberlandense* (HUFU), da Universidade Federal de Uberlândia, sob a seguinte especificação: *Aechmea distichantha* Lem., Hermes, M. B. 01, Castro, N. M., Oliveira, D. C (HUFU 72189).

Análise Anatômica

Para análise anatômica, a amostragem foi realizada em cinco indivíduos de *A. distichantha*. De cada indivíduo foram coletadas três folhas retiradas no sentido centro-periferia da roseta: primeira folha (F1) - a interna, completamente inserida no tanque; quarta folha (F4) - posição intermediária; e a oitava folha (F8) – a mais externa que não estivesse senescente e nem apresentasse injúrias (Fig. 1C). De cada folha foi separado um trecho da região apical e um trecho da região basal, da porção central entre os bordos, como mostra a figura 1D. Parte das amostras foi fixada em FAA 50 (Johansen 1940), preservada em etanol 50% e seccionada à mão com auxílio de lâminas descartáveis. Parte das secções foram clarificadas com solução comercial de hipoclorito de sódio (20%), coradas com azul de astra e safranina (Bukatsch 1972, modificado, *apud* Kraus & Arduin 1997) e montadas em lâminas histológicas com gelatina glicerizada (Kaiser 1880 *apud* Kraus & Arduin 1997). As secções foram analisadas em microscópio Leica® DM500 acoplado a câmera digital ICC50 HD e software de análise LAS EZ (Leica Application Suite) versão 2.1.0.

Microscopia Eletrônica de Varredura

Parte das amostras foi fixada em Karnovsky (1965) foi desidratado em série etílica (30%, 50%, 70%, 80, 90% e 100%). Posteriormente, as amostras foram levadas ao dessecador utilizando ponto crítico de CO₂ líquido e em seguida procedeu-se a deposição de filmes de ouro no Denton Vacuum. A análise foi realizada no Microscópio Eletrônico de Varredura (Jeol, JSM – 610, equipado com EDS e Thermo scientific NSS Spectral Imaging), operado a 4 Kv, instalado no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LABMIC) no Instituto de Física – Universidade Federal de Goiás.

Análises Histométricas e Índice de Plasticidade (RDPI)

Foram realizadas medidas dos seguintes caracteres: (1) espessura total do mesófilo, (2) espessura do parênquima aquífero, (3) espessura do parênquima clorofiliano, (4) área das células da camada externa do parênquima aquífero – sob a epiderme, (5) área das células da camada interna do parênquima aquífero - adjacente ao parênquima clorofiliano, (6) área ocupada pelos tecidos vasculares, (7) área dos feixes vasculares, (8) comprimento da célula da camada externa do parênquima aquífero e (9) comprimento da célula da camada interna do parênquima aquífero. Em média, foram selecionados 22 cortes de cada região foliar (ápice e base) e de cada uma das três folhas (F1, F4 e F8). As medidas foram feitas através do software ImageJ®.

A plasticidade fenotípica dos diferentes caracteres foliares de *A. distichantha*, em relação à posição no tanque, foi avaliada a partir dos dados histométricos, com o uso o Índice de Plasticidade baseado em Distâncias Relativas (RDPI) descrito por Valladares et al. (2006). Foram calculadas as distâncias relativas (RD) entre os valores das características, em relação à posição do tanque e à região foliar (ápice ou base). As RDPI foram calculadas pela fórmula:

$$RDPI = \sum (d_{ij \rightarrow i'j'} / (x_{i'j'} + x_{ij})) / n$$

$$RD_{ij \rightarrow i'j'} = d_{ij \rightarrow i'j'} / (x_{i'j'} + x_{ij})$$

onde **j** e **j'** são indivíduos da mesma espécie escolhidos aleatoriamente, **i** e **i'** são regiões foliares (ápice e base) e posições foliares ao longo da roseta, **n** é o número total de distância e **x** é uma determinada característica a ser analisada. O RDPI varia de 0 (nenhuma plasticidade) a 1 (plasticidade máxima).

Imunocitoquímica

O material previamente fixado foi seccionado à mão com auxílio de lâminas descartáveis e montado em lâminas histológicas para análises de imunocitoquímica (Tabela 1, CENTER FOR PLANT SCIENCE, UNIVERSITY OF LEEDS, UK). As lâminas foram incubadas em solução de proteína de leite/PBS para evitar ligações cruzadas, seguida de incubação com anticorpo primário (diluição de 1:10 com proteína de leite/PBS), por duas horas. Em seguida, foram lavadas em PBS e incubadas em anticorpo secundário FITC Goat anti-rat (Sigma) (diluição 1:100 em proteína de leite/PBS por duas horas) e posterior lavagem em PBS. As lâminas foram montadas em glicerina (50%) e mantidas no escuro. Para controle negativo, o anticorpo primário foi suprimido. Os testes foram realizados em triplicatas para confirmação dos resultados. As secções foram analisadas em microscópio Leica® DM4000 B LED e software de análise LAS X (Leica Application Suite).

Análise estatística

Todos os dados são apresentados como médias. Após a transformação dos valores para raiz quadrada, para homogeneidade dos valores, utilizou-se ANOVA (Analysis of Variance) para analisar os resultados, e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade ($p=0,05$). Para as análises estatísticas utilizou-se o software JMP5® (Statistical Analysis System Institute).

Resultados

Características Gerais

A superfície foliar é revestida por escamas de escudo assimétrico (Fig. 2A-G). Na F1 (folha interna) as escamas em escudo aparecem levemente elevadas na superfície foliar (Fig. 2A-D). Na base de F1, as duas superfícies foliares tem, aparentemente, a mesma quantidade de escamas. No ápice da F4 (folha intermediária) inicia-se o processo de senescência das escamas,

com a queda do escudo de várias delas (Fig. 2E e 2E1), enquanto que na base ainda há muitas escamas (Fig. 2F e 2F1). Em F8 (folha externa), a quantidade de escamas é aparentemente menor e o escudo, quando presente, está completamente apoiado sobre a lâmina foliar (Fig. 2G). A folha é hipoestomática, com os estômatos localizados em pequenas depressões e protegidos pelo escudo das escamas (Fig. 2H e 2H1).

A epiderme é uniestratificada (Fig. 3A e 3B), formada por células pequenas, retangulares, de paredes espessas, exceto a periclinal externa (espessamento em U), e lúmen reduzido (Fig. 3C e 3D). As escamas são inseridas pelo pedículo, de três a quatro células, em depressões (Fig. 3C). O mesofilo é dorsiventral (Fig. 3A e 3B) e a hipoderme pode ser reconhecida como um tecido mecânico ou armazenador de água adjacente à epiderme, dependendo da forma das células e do grau de espessamento parietal. A hipoderme mecânica, na face adaxial, é constituída por duas a três células esclerenquimáticas de parede espessas e lúmen reduzido (Fig. 3C) e na face abaxial, por duas camadas de células, interrompida pelas câmaras subestomáticas (Fig. 3D). Adjacente à hipoderme da face adaxial, ocorre o parênquima aquífero formado por células grandes, aclorofiladas, de paredes delgadas (também chamada de hipoderme aquífera) que ocupa aproximadamente um terço da espessura do mesofilo (Fig. 3A e 3B). O formato das células e o número de camadas de parênquima aquífero variam de acordo com a região foliar (ápice ou base) e a posição da folha na roseta (Tabela 2). O parênquima clorofiliano, localizado internamente à hipoderme aquífera, é formado por células isodiamétricas e é interrompido por canais de aeração, contínuos às câmaras subestomáticas (Fig. 3A e 3B). Esses canais são formados por células braciiformes (Fig. 3F). A espessura do parênquima clorofiliano não apresentou variação entre as folhas nas diferentes posições e nem entre o ápice e a base de cada folha.

Feixes vasculares colaterais, maiores e menores, dispostos em série única, intercalam-se com os canais de aerênquima (Fig. 3A e 3B). Os feixes maiores são circundados

completamente por bainha fibrosa, fortemente lignificada, e pela bainha parenquimática – endoderme –, enquanto que nos feixes menores as fibras os circundam apenas parcialmente (Fig. 3A, 3B e 3G). Externamente à endoderme são observadas células parenquimáticas clorofiladas dispostas de forma radiada (Fig. 3G).

Índice de Plasticidade (RDPI)

Os caracteres analisados apresentaram diferentes valores para o Índice de Plasticidade Fenotípica baseado em Distâncias Relativas (RDPI), dependendo da posição da folha na roseta (folha interna - F1; folha intermediária - F4; folha externa - F8) e da região foliar (ápice ou base), ou seja, algumas características anatômicas variam mais em forma e tamanho dentro da roseta (Fig. 4A-H).

Quando se compara o ápice e a base da F1, a área da célula da camada interna do parênquima aquífero e a espessura do parênquima aquífero apresentam maior plasticidade em relação às outras características avaliadas (Fig. 4A). Entre o ápice e a base da F4, os maiores valores de plasticidade foram para a área e para o comprimento da célula da camada interna do parênquima aquífero e para a área dos tecidos vasculares (Fig. 4B). Na F4, a espessura do mesofilo e do parênquima clorofiliano varia muito pouco em plasticidade (Fig. 4B). O único caso em que o maior valor da plasticidade não foi para a área da célula da camada interna do parênquima aquífero, e sim no comprimento desta célula, ocorreu na comparação entre o ápice e a base da F8. Valor semelhante foi observado para a área da célula da camada interna do parênquima aquífero e da camada externa do parênquima aquífero (Fig. 4C). Na F8 a área dos feixes vasculares, espessura do mesofilo, espessura do parênquima aquífero e espessura do clorofiliano tem valores de plasticidade mais baixos (Fig. 4C).

Na comparação entre o ápice e base da F1, com ápice e base da F8, os caracteres que apresentaram maior plasticidade são os relacionados com o parênquima aquífero – área e

comprimento da célula da camada interna do parênquima aquífero e área da célula da camada externa do parênquima aquífero (Fig. 4D). Ao comparar o ápice da F1 com o ápice da F4, os maiores valores de plasticidade são observados na área da célula interna do parênquima aquífero, área dos tecidos vasculares e área da célula externa do parênquima aquífero (Fig. 4E). O parênquima aquífero e o parênquima clorofiliano tem índices de plasticidade significativamente menores (Fig. 4E). Quando comparamos o ápice da F4, com o ápice da F8, os maiores valores de plasticidade foram para a área da célula da camada interna do parênquima aquífero, para o comprimento da célula da camada externa e para o comprimento da célula da camada interna do parênquima aquífero (Fig. 4F). Na comparação entre o ápice da F1 e o ápice da F8, os caracteres com maiores valores de plasticidade foram a área das células da camada interna e da camada externa do parênquima aquífero e comprimento da célula da camada interna e externa do parênquima aquífero (Fig. 4G). Ao comparar a base da F1 com a base da F8, os caracteres com os maiores valores de plasticidade foram os mesmos observados na comparação entre o ápice e base da F1 com o ápice e a base da F8: área e comprimento da célula da camada interna do parênquima aquífero e área da célula da camada externa do parênquima aquífero (Fig. 4D e 4H).

Na comparação entre todos os caracteres avaliados, nas folhas em diferentes posições na roseta e nas duas regiões de cada folha, a maior plasticidade foi observada na área da célula da camada interna do parênquima aquífero (Fig. 4B e 4D-4H), na espessura do parênquima aquífero (Fig. 4A) e no comprimento da célula da camada interna do parênquima aquífero (Fig. 4C). A menor plasticidade foi encontrada para a espessura do parênquima clorofiliano (Fig. 4A, 4D, 4F e 4G) do mesófilo (Fig. 4C e 4H) e do parênquima aquífero (Fig. 4E), e para a área dos feixes vasculares (Fig. 4B).

Análise de Imunocitoquímica

As análises de imunocitoquímica mostraram clara variação no grau de metil-esterificação das HGAs e na distribuição das proteínas de parede (AGPs e extensinas) nos tecidos das folhas em diferentes posições na roseta e no ápice e na base foliar (Tabelas 3-8).

No ápice da F1 houve intensa marcação de epitopos de HGA de alta metil-esterificação, reconhecidos pelo JIM7, no parênquima aquífero (Fig. 5A), nas junções intercelulares do parênquima clorofiliano, nos tecidos vasculares e nos canais de aeração (Fig. 5B). Na base da F1 houve intensa marcação nas células do parênquima clorofiliano, no parênquima aquífero, nos feixes vasculares e nos canais de aerênquima. Para epitopos de HGA de baixa metil-esterificação, conhecidos pelo JIM5, ocorreu moderada marcação nas junções intercelulares das células do parênquima clorofiliano, fraca marcação nas células braciformes dos canais de aeração (Fig. 5C) e intensa marcação nos tecidos vasculares (Fig. 5D). Na base, houve intensa marcação com JIM5 nos tecidos vasculares, moderada marcação nas células braciformes dos canais de aeração e fraca marcação nas células do parênquima clorofiliano adjacentes ao parênquima aquífero e próximas aos canais de aeração (Fig. 5E). Não houve marcação com JIM5 no parênquima aquífero nem no ápice e nem na base da F1. No ápice da F1, houve intensa marcação para epitopos de proteínas arabinogalactanas (AGPs), reconhecidos pelo LM2, nos tecidos vasculares, no parênquima clorofiliano e nos estômatos, moderada marcação nas células epidérmicas da face adaxial e abaxial e nas escamas (Fig. 5F). Não houve marcação para epitopos de AGPs nas células do parênquima aquífero próximas à face adaxial, porém houve fraca marcação nas células do parênquima aquífero próximos ao parênquima clorofiliano (Fig. 5F). Na base houve intensa marcação nas células esclerenquimáticas da face adaxial, moderada marcação para epitopos de AGPs no parênquima clorofiliano e fraca marcação no parênquima aquífero. Não houve marcação para epitopos de extensinas marcados pelo LM1, nem no ápice, nem na base da F1.

No ápice da F4, houve moderada marcação pelo JIM7 nas células do parênquima clorofiliano próximos à epiderme da face abaxial e intensa marcação nas demais células do parênquima clorofiliano (Fig. 6A). Tanto no ápice quanto na base houve fraca marcação com JIM7 no parênquima aquífero (Fig. 6A) e intensa marcação nos tecidos vasculares e células braciformes dos canais de aeração (Fig. 6A e 6B). Na base houve moderada marcação com JIM7 apenas nas junções intercelulares das células do parênquima clorofiliano (Fig. 6C). No ápice da F4, houve intensa marcação para epitopos de HGA de baixa metil-esterificação, reconhecidos pelo JIM5, no tecido vascular e nas células braciformes dos canais de aeração (Fig. 6D). Houve moderada marcação nas junções intercelulares das células do parênquima clorofiliano (Fig. 6D). Na base houve intensa marcação com JIM5 nos tecidos vasculares e nas células braciformes dos canais de aeração (Fig. 6E). E fraca marcação com JIM5 nas junções intercelulares das células do parênquima clorofiliano próximas dos tecidos vasculares (Fig. 6E). Não houve marcação com JIM5 no parênquima aquífero em nenhuma das três folhas no ápice e na base. No ápice da F4, houve intensa marcação com LM2 nos tecidos vasculares, nas células epidérmicas da face adaxial e nas células subsidiárias dos estômatos. Na base houve intensa marcação para epitopos de AGPs nos tecidos vasculares, no escudo das escamas, nas células epidérmicas da face adaxial e abaxial. Fraca marcação para epitopos de AGPs foi observado nas células da endoderme e junções intercelulares do parênquima clorofiliano. No ápice da F4, intensa marcação para epitopos de extensinas foi observada nas células epidérmicas tanto da face adaxial como abaxial, nas escamas e nos estômatos, e moderada marcação para epitopos de extensinas nas células do parênquima aquífero (Fig. 6F). Na base da F4 observou-se as mesmas marcações que no seu ápice.

No ápice da F8, houve intensa marcação com JIM7 nas células do parênquima clorofiliano adjacentes ao parênquima aquífero, nos canais de aeração, nas câmaras subestomáticas e nos estômatos (Fig. 7A e 7B). Na base da F8 houve intensa marcação com

JIM7 nas células braciiformes dos canais de aeração e nas células do escudo das escamas e, fraca marcação com JIM7 no parênquima aquífero e tecidos vasculares (Fig. 7C). No ápice da F8, houve intensa marcação com JIM5 nos tecidos vasculares, nas células braciiformes dos canais de aeração, na epiderme da face abaxial, nos estômatos e nas junções intercelulares do parênquima clorofiliano (Fig. 7D e 7E). Na base, houve intensa marcação no floema e nas células braciiformes dos canais de aeração. Moderada marcação foi observada nas junções intercelulares do parênquima clorofiliano e no xilema (Fig. 7F e 7G). No ápice da F8, houve intensa marcação com LM2 nas células epidérmicas da face adaxial e abaxial, no pedículo das escamas e nos estômatos. Na base, houve intensa marcação no xilema, nas células epidérmicas da face adaxial, no pedículo das escamas e nas células subsidiárias dos estômatos. No ápice da F8, houve intensa marcação para epitopos de extensinas nas células epidérmicas, no pedículo das escamas e nos estômatos. Houve moderada marcação para epitopos de extensinas no parênquima aquífero (Fig. 7H). Não houve marcação para LM1 na base.

Discussão

Várias espécies de bromélias são adaptadas a ambientes xéricos e assim investem em estruturas que captam, absorvem e armazenam água em seus tecidos, como a formação de tanque, presença de escamas e de parênquima aquífero, respectivamente (Benzing 2000). A compartimentalização de função nas regiões ápice-base das folhas, e dependendo da posição na roseta de bromélias já foi avaliada em outros trabalhos (Souza & Neves 1996; Proença & Sajo 2004), porém, pela primeira vez, o tamanho desta variação foi avaliado através do índice de plasticidade fenotípica e composição da parede celular. Nas folhas de *Aechmea distichantha* o tecido que apresenta maior plasticidade é o parênquima aquífero e, de fato, as células deste tecido mostram intensa marcação para epitopos de alta metil-esterificação. A presença de

pectinas com alta metil-esterificação no parênquima aquífero confere maior elasticidade a parede celular, uma importante adaptação ao armazenamento de água.

As amostras de *A. distichantha*, coletadas em ambiente xerofítico dos campos rupestres, apresentam as mesmas características anatômicas observadas por Proença & Sajo (2004), que analisaram amostras provenientes de ambientes mesofíticos do Estado de São Paulo (Brasil), ou seja: epiderme unisseriada, hipoderme mecânica e parênquima aquífero, parênquima clorofiliano paliádico, canais de aeração e feixes vasculares em série única. Na população coletada no campo rupestre nota-se variação na quantidade de escamas de acordo com a posição da folha na roseta, fato comum já observado em outras espécies de bromélias (Benzing 2000). De acordo com Proença & Sajo (2004), *A. distichantha* apresenta maior densidade de escamas na face adaxial e na região basal, devido ao contato direto desta região com a água contida no tanque. Estes dados corroboram com os de Freschi et al. (2010), que também verificam nas espécies por eles estudadas, que a densidade de escamas na região basal é duas vezes maior, do que nas regiões mediana e apical. A presença de escamas no ápice foliar de *A. distichantha* está relacionada com outras funções dessa estrutura, como a reflexão do excesso de luz e diminuição da transpiração, funções discutidas por Benzing (2000) para outras bromélias. O escudo das escamas de *A. distichantha* também protege os estômatos contra a perda de água, criando um microclima que conserva a umidade, como já mencionado por Tomlinson (1969), Fahn & Cutler (1992), Benzing (2000) e Dickison (2000) entre outros, sendo mais um dos mecanismos adaptativos ao ambiente xérico, assim como o espessamento em U pronunciado observado nas células da epiderme. Este espessamento reduz a evaporação da água, evitando o colapso celular em decorrência do murchamento, permitindo a sobrevivência destas bromélias num ambiente com déficit hídrico, assim como o espessamento das células da hipoderme mecânica (Krauss 1949; Pyykkö 1966; Tomlinson 1969, Esau 1977; Brighigna et al. 1984).

Índices de Plasticidade Fenotípica dos tecidos foliares baseado em Distância Relativa (RDPI)

Como já mencionado, o parênquima aquífero foi o tecido que apresentou maior plasticidade. Proença & Sajo (2004), para *A. distichantha*, e Freschi et al. (2010), para *Guzmania monostachia* (L) Rusby ex Mez var. *monostachia*, também relataram variação na espessura do parênquima aquífero em diferentes regiões da folha. Nossas análises histométricas seguidas pelo cálculo do índice de plasticidade confirmam esta variação no tecido. A diferença na espessura do parênquima aquífero no ápice e na base de folhas ocupando diferentes posições na roseta ocorre devido ao armazenamento da água absorvida pelas escamas (Benzing 2000). A água contida no tanque fica disponível para a absorção apenas por um curto período de tempo, devido ao processo natural de evaporação (Zotz & Thomas 1999; Benzing 2000; Freschi et al. 2010). Assim, para plantas como *A. distichantha*, o parênquima aquífero é um tecido essencial para a sobrevivência no ambiente xérico, armazenando água a médio e longo prazo e disponibilizando-a para os tecidos adjacentes, como mencionado por Schulte & Nobel (1989). Como avaliado neste estudo, o fluxo de água que entra e sai do parênquima depende, entre outros fatores, da composição e capacidade elástica da parede celular.

A espessura do mesófilo de *A. distichantha* é mais influenciada pela quantidade de parênquima aquífero, do que de parênquima clorofiliano, diferentemente do esperado para plantas de sol e sombra, que como usualmente referido na literatura, folhas de sol são mais espessas, principalmente pela maior quantidade de parênquima paliádico e aquífero (Lee et al. 1989; Dickison 2000; Mantuano et al. 2006; Terashima et al. 2006). Scarano et al. (2002), observaram que em *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker, indivíduos crescendo em ambiente seco e sob alta irradiação solar, as folhas apresentavam menor espessura do parênquima clorofiliano, mas nos indivíduos crescendo em ambientes alagados e com alta irradiação solar, o parênquima clorofiliano era mais espesso. Assim, não é apenas a exposição à alta irradiação

solar ou a disponibilidade hídrica do ambiente que interferem na espessura do mesofilo, mas essas duas características ambientais podem atuar em conjunto.

O parênquima clorofiliano apresentou, na maioria dos tratamentos, pequena plasticidade fenotípica entre as folhas em diferentes posições na roseta. Geralmente espécies expostas à alta irradiação solar apresentam folhas mais espessas, devido ao maior número de camadas de parênquima clorofiliano (Lee et al. 1989), porém em *A. distichantha* não se observou um maior número de camadas de parênquima clorofiliano na região apical e, nem nas folhas mais externas, expostas à maior irradiação solar.

Os canais de aerênquima são mais desenvolvidos na região basal das folhas, o que facilitaria a aeração foliar (Tomlinson 1969; Souza & Neves 1996), uma vez que em *A. distichantha*, esta região pode permanecer submersa na água do tanque.

A área total dos feixes vasculares (tecidos vasculares mais fibras) e dos tecidos vasculares (xilema mais floema) não apresentaram muita plasticidade, na maioria dos tratamentos. Isto porque os feixes e os tecidos vasculares, após diferenciados não mudam mais a conformação das suas células.

Imunocitoquímica da parede celular

Assim como foram observadas variações anatômicas entre ápice e a base das folhas em diferentes posições na roseta, a composição da parede celular também varia, especialmente das pectinas e das proteínas estruturais (AGPs), nos diferentes tecidos.

Epitopos de pectinas (HGAs) com alta metil-esterificação foram reconhecidas pelo JIM7 nas células do parênquima aquífero. Neste tecido não foram detectadas pectinas com baixa metil-esterificação reconhecidas pelo JIM5 e assim, podemos dizer que o processo de de-metil-esterificação é reduzido. Em geral as pectinas são sintetizadas no complexo de Golgi na forma altamente metil-esterificada (Mohonen 2008), e durante o desenvolvimento dos órgãos

pode ocorrer o processo de de-metil-esterificação (Micheli 2001). O grau de metil-esterificação das pectinas determina as propriedades e funções da parede celular durante o desenvolvimento de órgãos (Knox 1997). HGAs com alta metil-esterificação promovem maior flexibilidade à célula como observado em outras espécies (Mastroberti *et al.* 2008). Caso o processo de de-metil-esterificação ocorresse nas células do parênquima aquífero, as paredes ficariam rígidas e assim, comprometeria o armazenamento de água.

Na F1, na maioria dos tecidos, ainda estão em processo de diferenciação, assim apresentam maior quantidade de epitopos com alta metil-esterificação na parede celular, como também mencionado por Micheli (2001) & Mohonen (2008). A quantidade de células com marcação nos epitopos de alta metil-esterificação diminui gradativamente nos tecidos da F4 e na F8, porque as paredes celulares estão no processo final da de-metil-esterificação e consequentemente, mais rígidas, como reportado em outros trabalhos (Knox 1997; Micheli 2001). À medida que ocorre a diferenciação celular, os grupos metil das pectinas se ligam com Ca^{+2} , enrijecendo a parede celular, tornando-se de-metil-esterificadas (Palin & Geitmann 2012). Entretanto, neste estudo, mostra-se que embora haja completa diferenciação e maturação do parênquima aquífero, não ocorre marcação de epitopos com baixa metil-esterificação. Uma evidência de que o processo de de-metil-esterificação é reduzido nas células deste tecido e garante sua plasticidade.

A folha interna da roseta não apresenta diferença no grau de metil-esterificação das HGAs nos tecidos em relação base-ápice. À medida que as folhas crescem e se diferenciam ocorre o processo de de-metil-esterificação, corroborado pela diferença na presença de epitopos reconhecidos por JIM7 e JIM5 nas folhas intermediárias e externas.

Nota-se que a quantidade de AGPs diminuiu significativamente da F1 para a F8, pois a F1 está com a maioria dos seus tecidos em diferenciação, enquanto as F4 e F8 já cessaram ou estão cessando a sua diferenciação celular. Isto ocorre porque as AGPs estão envolvidas na

proliferação celular (Majewska-Sawka & Nothnagel 2000), que já cessou na F4 e F8, e na formação da parede celular (Mogami *et al.* 1999; Mastroberti & Mariath 2008), que também já está concluída ou em conclusão nestas folhas. O decréscimo na marcação de AGPs na maturidade também foi observado por Herman & Lamb (1992), Schindler *et al.* (1995) e Mastroberti & Mariath (2008) em folhas de tabaco, coleóptilo de milho e células de mucilagem, respectivamente. Além disso, as AGPs são expressas de maneira específica de acordo com o tecido (Van Holst & Clark 1986) e isto também pode ser uma das causas da variação de AGPs nos diferentes tecidos.

A presença de extensinas foram marcadas moderadamente apenas em alguns tecidos da região apical e basal da F4 e na região basal da F8 não houve marcações na F1, contrapondo os resultados esperados. A F1 está em um estágio mais inicial de diferenciação do que as demais folhas, por isso esperava-se que houvessem marcações de extensinas nesta folha e poucas marcações nas folhas F4 e F8. Além disso, a maioria dos tecidos que tiveram marcações de extensinas estão relacionados com absorção e armazenamento de água (escamas, estômatos e parênquima aquífero) e, conseqüentemente, com mudanças na conformação celular, principalmente na flexibilização. Mesmo sabendo que estes tecidos são mais desenvolvidos e abundantes na região basal das folhas (Freschi *et al.* 2010), somente na base da folha intermediária é que as extensinas foram detectadas. Estudos complementares devem ser feitos para uma melhor compreensão da relação entre o processo de diferenciação celular e as extensinas, no ápice e na base de folhas ocupando diferentes posições na roseta de uma bromélia tanque-dependente.

Assim, através da análise da parede celular, comprovou-se que as folhas de *A. distichantha* se desenvolvem a partir da região basal da folha, como já foi visto em outras monocotiledôneas por Popp *et al.* (2003). Além disto, embora o parênquima aquífero seja um tecido totalmente diferenciado no ápice e na base das folhas em diferentes posições ao longo

da roseta, este tecido não apresenta pectinas de-metil-esterificadas, devido à necessidade de flexibilização da sua parede celular para o armazenamento de água.

Conclusão

A partir deste trabalho pode-se concluir que: (a) existem variações da estrutura da parede celular e estas variações estão relacionadas com as funções exercidas pelos tecidos e as regiões que eles estão localizados; (b) nas folhas de *A. distichantha*, o parênquima aquífero é o tecido com maior plasticidade fenotípica, principalmente devido à necessidade que esta planta tem de armazenar água para sua sobrevivência e (c) a magnitude da plasticidade na espessura do parênquima aquífero, é entre 0,07 e 0,31.

Agradecimentos

Agradeço à CAPES pelo financiamento da bolsa para o desenvolvimento deste trabalho. E, agradeço à Dra. Rafaela Forzza e a Dr. Leonardo Melo Versieux, pela identificação da espécie.

Referência Bibliográfica⁴

Albersheim P, Darvill A, Roberts K, Sederoff R, Staehelin A. 2011. Plant cell walls: from chemistry to biology. New York, Garland Science.

Arruda RCO, Costa AF. 2003. Foliar Anatomy of Five Vriesea Sect. Xiphion (Bromeliaceae) Species. Selbyana 24 (2): 180-189.

Beck CB. 2005. An Introduction to Plant Structure and Development. In: Beck CB. (ed). Cambridge, Cambridge University Press.

Benzing DH. 1976. Bromeliad trichomes: structure, function and ecological significance. Selbyana 1(4): 330-348.

Benzing DH. 1990. Vascular Epiphytes: General Biology and Associated Biota. New York, Cambridge University Press.

Benzing DH. 2000. Bromeliaceae: profile of na adaptative radiation. Cambridge, Cambridge University Press.

⁴ Segue as normas da Revista Acta Botanica Brasilica

- Braga MMN. 1977. Anatomia foliar de Bromeliaceae da campina. *Acta Amazonica* 7: 1-74.
- Brighigna L, Fiordi AC, Palandri MR. 1984. Structural characteristics of mesophyll in some *Tillandsia* species. *Phytomorphology* 34: 191-200.
- Bukatsch F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61: 255.
- Burke D, Kaufman P, McNeil M, Albersheim P. 1974. *Plant Physiology* 54 (1): 109-115.
- Caffall KH, Mohnen D. 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research* 344: 1879–1900.
- Carpita NC. 1989. Pectic polysaccharides of maize coleoptiles and proso millet cells in liquid culture. *Phytochemistry* 28: 121-125.
- Carpita NC. 1984. Cell Wall Development in Maize Coleoptiles. *Plant Physiology* 76: 205-212.
- Cassab GI. 1998. Plant cell wall proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 281–309.
- Cavallero L, López D, Barberis IM. 2009. Morphological variation of *Aechmea distichantha* (Bromeliaceae) in a Chaco forest: habitat and size-related effects. *Plant Biology* 11: 379-391.
- Cavallero L, Galetti L, López D, McCargo J, Barberis IM. 2011. Morphological variation of the leaves of *Aechmea distichantha* Lem. plants from contrasting habitats of a Chaco forest: a trade-off between leaf area and mechanical support. *Brazilian Journal of Botany* 9 (4): 455-464.
- Clausen MH, Willats WGT, Know JP. 2003. Synthetic methyl hexagalacturonate hapten inhibitors of antihomogalacturonan monoclonal antibodies LM5, JIM5 and JIM7. *Carbohydrate Research* 338: 1797-1800.
- Conceição AA, Giulietti AM. 2002. Composição florística e aspectos estruturais de campo rupestre em dois platôs no Morro do Pai Inácio, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Hoehnea* 29: 37-48.
- Conceição AA, Pirani JR, Meirelles ST. 2007. Floristics, structure and soil of insular vegetation in four quartzite-sandstone outcrops of "Chapada Diamantina", Northeast Brazil. *Brazilian Journal of Botany* 30: 641-656.
- Consgrrove D. 1997. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13: 171-201.
- Cosgrove DJ. 2005. Growth of the plant cell wall. *Natural Reviews Molecular Cell Biology* 6: 850–861.
- Dickison WC. 2000. *Integrative Plant Anatomy*. Massachusetts, Harcourt/Academic Press.

- Dolan L, Linstead P, Roberts K. 1997. Developmental regulation of pectic polysaccharides in the root meristem of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 48: 713–720.
- Esau K. 1977. *Anatomy of seed plants*. London, John Wiley & Sons.
- Evert RF. 2006. *Esau's Plant Anatomy. Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development*. 3 ed. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.
- Fahn A, Cutler DF. 1992. Xerophytes. *Encyclopedia of plant taxonomy*. Berlin, Gebrüder Borntraeger.
- Freitas C, Scarano FR, Blesboer DD. 2003. Morphological Variation in Two Facultative Epiphytic Bromeliads Growing on the Floor of a Swamp Forest. *Biotropica*, 35: 546–550.
- Freschi L, Takahashi CA, Cambui CA, Semprebom TR, Cruz AB, Miotto PT, Versieux LD, Calvente A, Latansio-Aldar SR, Aldar MPM, Mercier H. 2010. Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. *Journal Plant Physiology* 167: 526–533.
- Givnish TJ, Barfuss MHJ, Van Ee B, Riina R, Schulte K, Horrores R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith AC, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Berry PE, Sytsma KJ. 2014. Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 71: 55–78.
- Herman EM, Lamb CJ. 1992. Arabinogalactan-rich glycoproteins are localized on the cell surface and in intravacuolar multivesicular bodies. *Plant Physiology* 98: 264–272.
- Hermes MB, Oliveira DC, Castro NM. 2014. Aspectos do desenvolvimento foliar e imunocitoquímicos da parede celular em *Vellozia jolyi* L. B. Sm. (Velloziaceae). Monografia (Universidade Federal de Uberlândia) Uberlândia, 2014.
- Jacobi CM, Carmo FF, Vincent RC, Stehmann JR. 2007. Plant communities on ironstone outcrops: a diverse and endangered Brazilian ecosystem. *Biodiversity and Conservation* 16: 2185–2200.
- Jarvis MC, Forsyth W, Duncan HJ. 1988. A survey of the Pectic Content of Nonlignified Monocot Cell Walls. *Plant Physiology* 88: 309–314.
- Johansen DA. 1940. *Plant microtechnique*. New York, McGraw-Hill Book.
- Jones L, Seymour GB, Knox JP. 1997. Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1→4)- β -galactan. *Plant Physiology* 113: 1405–1412.
- Knox JP. 1997. The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. *International Review Cytology* 171: 79–120.
- Kraus JE, Arduin M. 1997. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Rio de Janeiro, Editora Universidade Rural do Rio de Janeiro.
- Krauss BH. 1949. Anatomy of the vegetative organs of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. II - The leaf. *Botanical Gazette* 110 (3): 333–404.

Kraus JE, Arduin M. 1997. Manual Básico de Métodos em Morfologia Vegetal. Rio de Janeiro: Saropédica.

Karnovsky MJ. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27: 137-138.

Lee HSJ, Lüttge U, Medina E, Smith JAC, Cram WJ, Diaz M, Griffiths H, Popp M, Schäfer C, Stimmel KH, Thonke B. 1989. Ecophysiology of xerophytic and halophytic vegetation of a coastal alluvial plain in northern Venezuela III – *Bromelia humilis* Jacq. a terrestrial CAM bromeliad. *New Phytologist* 111: 253–271.

Leroux O, Leroux F, Bagniewska-Zadworna, A, Knox JP, Claeys M, Bals S, Viane RLL. 2011. Ultrastructure and composition of cell wall appositions in the roots of *Asplenium* (Polypodiales). *Micron* 42: 863-870.

Majewska-Sawka, A, Nothnagel EA. 2000. The Multiple Roles of Arabinogalactan Proteins in Plant Development *Plant Physiology* 122: 3–9.

Mantuano DG, Barros CF, Scarano FR. 2006. Leaf anatomy variation within and between three “restinga” populations of *Erythroxylum ovalifolium* Peyr. (Erythroxylaceae) in Southeast Brazil. *Brazilian Journal of Botany* 29 (2): 209-215.

Mastroberti AA, Mariath JEA. 2008. Development of the mucilage cells of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). *Protoplasma* 232 (3–4): 233-245.

MMA/IBAMA. 2005. Plano de Manejo: Resumo Executivo. Parque Nacional da Serra da Canastra. Ministério do Meio Ambiente/ Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília.

Micheli F. 2001. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science* 6: 414–419.

Mogami H, Gardner J, Gerasimenko OV, Camello P, Petersen OH, Tepikin AV. 1999. Rapid Report Calcium binding capacity of the cytosol and endoplasmic reticulum of mouse pancreatic acinar cells. *Journal of Physiology*, 518 (2): 463—467.

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

O'Neill M, Albersheim P, Darvill A. 1990: The pectic polysaccharides of primary cell walls. Pp. 415–441. In: Dey, P.M. (Ed.) *Methods in Plant Biochemistry*. London, Academic Press.

Ovodov YS. 2009. Current views on pectin substances. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 35: 269–284.

Palin R, Geitmann A. 2012. The role of pectin in plant morphogenesis. *BioSystems* 109: 397-402.

Pérez S, Rodriguez-Carvajal MA, Doco T. 2003. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie* 85: 109-121.

- Pittendrigh CS. 1948. The bromeliad-anopheles-malaria complex in Trinidad. I. The bromeliad flora. *Evolution* 2: 58-89.
- Popp M, Janett HP, Lüttge U, Medina E. 2003. Metabolite gradients and carbohydrate translocation in rosette leaves of CAM and C3 bromeliads. *New Phytologist* 157: 649-56.
- Popper ZA. 2008. Evolution and diversity of green plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 286-292.
- Porembski S. 2007. Tropical inselbergs: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. *Brazilian Journal of Botany* 30 (4): 579-586.
- Prado JPC, Londoño DMM, Almeida V, Brunetto G, Pescador R. 2014. Physiological characteristics of the Atlantic Forest native bromeliads: *Nidularium campo-alegrense* Leme and *Aechmea ornata* Baker. *Acta Scientiarum*, 36 (1): 101-108.
- Proença SL, Sajo MG. 2004. Estrutura foliar de espécies de *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 18 (2): 319-331.
- Pyykkö, M. 1966. The leaf anatomy of east Patagonian xeromorphic plants. *American Journal of Botany* 68: 64-71.
- Rapini A, Ribeiro PL, Lambert S, Pirani JR. 2008. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* 4 (1-2): 15-23.
- Ridley B, O'Neill MA, Mohnen D. 2001. Pectin: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57: 929-67.
- Sabba RP, Lulai EC. 2005. Immunocytological analysis of potato tuber periderm and changes in pectin and extension epitopes associated with periderm maturation. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130 (6): 936-942.
- Scarano FR, Duarte HM, Rôças G, Barreto SMB, Amado EF, Reinert F, Wendt T, Mantovani A, Lima HRP, Barros CF. 2002. Acclimation or stress symptom? An integrated study of intraspecific variation in the clonal plant *Aechmea bromeliifolia*, a widespread CAM tank-bromeliad. *Botanical Journal of Linnean Society* 140: 391-40.
- Scatena VL, Segecin S. 2005. Anatomia foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. *Brazilian Journal of Botany* 28 (3): 635-649.
- Schindler TM, Bergfeld IR, Van Cutsem P, Sengbusch DV, Schopfer E. 1995. Distribution of pectins in cell walls of maize coleoptiles and evidence against their involvement in auxin-induced extension growth. *Protoplasma* 188: 213-224.
- Schmidt G, Zotz G. 2001. Ecophysiological consequences of differences in plant size: in situ carbon gain and water relations of the epiphytic bromeliad, *Vriesea sanguinolenta*. *Plant, Cell and Environment* 24: 101-111.

Schulte PJ, Nobel PS. 1989. Responses of a CAM Plant to Drought and Rainfall: Capacitance and Osmotic Pressure Influences on Water Movement. *Journal of Experimental Botany* 40 (210): 61-70.

Skillman JB, Garcia M, Virgo A, Winter K. 2005. Growth irradiance effects on photosynthesis and growth in two co-occurring shade tolerant neotropical perennials of contrasting photosynthetic pathways. *American Journal of Botany* 92: 1811-1819.

Smallwood M, Martin H, Knox JP. 1995. An epitope of rice threonine and hydroxyproline-rich glycoprotein is common to cell wall and hydrophobic plasma membrane glycoproteins. *Planta* 196: 510-22.

Smallwood M, Yates EA, Willats WGT, Martin H, Knox JP. 1996. Immunochemical comparison of membrane-associated and secreted arabinogalactan-proteins in rice and carrot. *Planta* 198: 452-459.

Somerville C, Bauer S, Brininstool G, Facette M, Hamann T, Milne J, Osborne E, Paredez A, Persson S, Raab T, Vorwerk S, Youngs H. 2004. Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls. *Science* 306: 2206-2211.

Souza RCOS, Neves LJ. 1996. Leaf anatomy of four *Tillandsia* species. *Bromélia* 3 (2): 28-39.

Takahashi CA, Mercier H. 2011. Nitrogen metabolism in leaves of a tank epiphytic bromeliad: Characterization of a spatial and functional division. *Journal of Plant Physiology* 168: 1208–1216.

Terashima I, Hanba YT, Tazoe Y, Vyas P, Yano S. 2006. Phenotypic Plasticity and the Changing Environment Special Issue Irradiance and phenotype: comparative eco-development of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO₂ diffusion. *Journal of Experimental Botany* 57 (2): 343-354.

Tomlinson PB. 1969. Comelinales – Zingiberales. Pp. 193-294. In: Metcalfe, C. R. (Ed). *Anatomy of the Monocotyledons*. v. 3. London, Oxford University Press.

Valladares F, Sánchez-Gómez D, Zavala MA. 2006. Quantitative estimation of phenotypic plasticity: bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. *Journal of Ecology* 94: 1103-1116.

Van Holst G, Clarke AE. 1986. Organ-Specific Arabinogalactan-Proteins of *Lycopersicon peruvianum* (Mill) Demonstrated by Crossed Electrophoresis. *Plant Physiology* 80: 786-789.

Versieux L, Elbl PM, Wanderley MGL, Menezes NL. 2010. Alcantarea (Bromeliaceae) leaf anatomical characterization and its systematic implications. *Nordic Journal of Botany* 28: 385-397.

Voltolini CH, Santos M. 2011. Variações na morfoanatomia foliar de *Aechmea lindenii* (E. Morren) Baker var. *lindenii* (Bromeliaceae) sob distintas condições ambientais. *Acta Botanica Brasilica* 25 (1): 2-10.

Willats WGT, McCartney L, Mackie W, Knox JP. 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology* 47: 9-27.

Xiao C, Anderson CT. 2013. Roles of pectin in biomass yield and processing for biofuels. *Frontiers in Plant Science* 4: 1-7.

Yapo BM. 2010. Improvement of the compositional quality of monocot pectin extracts contaminated with glucuronic acid-containing components using a step-wise purification procedure. *Food and bioproducts processing* 88: 283-290.

Yates PJ, Afzal MA, Minor PD. 1996. Antigenic and genetic variation of the HN protein of mumps virus strains. *Journal of General Virology* 77: 2491–2499.

Zotz G, Thomas V. 1999. How Much Water is in the Tank? Model Calculations for Two Epiphytic Bromeliads. *Annals of Botany* 83: 183–192.

Zotz G, Reichling P, Valladares F. 2002. A simulation study on the importance of size-related changes in leaf morphology and physiology for carbon gain in an epiphytic bromeliad. *Annals of Botany* 90: 437-443.

Zotz G, Enslin A, Hartung W, Ziegler H. 2004. Physiological and anatomical changes during the early ontogeny of the heteroblastic bromeliad, *Vriesea sanguinolenta*, do not concur with the morphological change from atmospheric to tank form. *Plant, Cell and Environment* 27: 1341-1350.

Tabelas

Tabela 1. Descrição e reconhecimento dos anticorpos monoclonais.

Anticorpos monoclonais	Epítipo	Referência
JIM5	HGA (metil-esterificação até 40%)	Clausen et al. (2003)
JIM7	HGA (metil-esterificação entre 15-80%)	Clausen et al. (2003)
LM1	Extensina	Smallwood et al. (1995); Cassab (1998); Sabba & Lulai (2005); Leroux et al. (2011)
LM2	AGP	Smallwood et al. (1996); Yates et al. (1996)

Tabela 2. Medidas dos Índices de Plasticidade Fenotípica baseado em Distância Relativa (RDPI) dos caracteres nos diferentes tratamentos. A: ápice. B: base. Comp.: Cél.: Célula. Comprimento. Esp.: Espessura. Ext.: Externa. F1: Folha Interna. F4: Folha Intermediária. F8: Folha Externa. Int.: Interna. PA: Parênquima Aquífero. PC: Parênquima Clorofiliano.

Caracteres	AF1 x BF1	AF4 x BF4	AF8 x BF8	ABF1 x ABF8	AF1 x AF4	AF4 x AF8	AF1 x AF8	BF1 x BF8	p < 0,05
Área Tecidos Vasculares	0,25 ^{c,d} ±0,19	0,35 ^a ±0,28	0,23 ^{b,c,d} ±0,18	0,25 ^{b,c} ±0,19	0,28 ^d ±0,22	0,24 ^{c,d} ±0,20	0,22 ^d ±0,19	0,27 ^{a,b} ±0,19	<0,0001
Área Feixes Vasculares	0,19 ^{b,c,d} ±0,22	0,22 ^a ±0,17	0,17 ^d ±0,16	0,19 ^{b,c,d} ±0,20	0,16 ^b ±0,18	0,17 ^{c,d} ±0,17	0,18 ^d ±0,22	0,21 ^{b,c} ±0,18	<0,0001
Comp. Cél. Int. do PA	0,31 ^{b,c} ±0,23	0,34 ^{a,b} ±0,20	0,39 ^a ±0,24	0,33 ^b ±0,23	0,24 ^d ±0,17	0,27 ^{c,d} ±0,18	0,26 ^{c,d} ±0,17	0,35 ^b ±0,27	<0,0001
Comp. Cél. Ext. do PA	0,20 ^{c,d} ±0,12	0,23 ^{b,c} ±0,15	0,22 ^{b,c} ±0,14	0,19 ^{d,e} ±0,14	0,16 ^f ±0,12	0,27 ^a ±0,15	0,25 ^{a,b} ±0,15	0,17 ^{e,f} ±0,12	<0,0001
Área Cél. Int. do PA	0,35 ^{b,c} ±0,25	0,40 ^a ±0,24	0,38 ^{a,b} ±0,28	0,36 ^b ±0,24	0,29 ^c ±0,20	0,38 ^{a,b} ±0,24	0,35 ^b ±0,22	0,37 ^{a,b} ±0,28	<0,0001
Área Cél. Ext. do PA	0,29 ^{a,b,c} ±0,20	0,29 ^{a,b,c} ±0,20	0,30 ^{a,b} ±0,20	0,29 ^{a,b} ±0,19	0,26 ^c ±0,19	0,27 ^{b,c} ±0,19	0,26 ^{b,c} ±0,18	0,31 ^a ±0,21	<0,0001
Esp. do PC	0,16 ^b ±0,15	0,25 ^a ±0,12	0,22 ^a ±0,11	0,16 ^b ±0,14	0,10 ^c ±0,16	0,08 ^c ±0,05	0,10 ^c ±0,16	0,15 ^b ±0,10	<0,0001
Esp. do PA	0,31 ^a ±0,12	0,21 ^b ±0,10	0,24 ^b ±0,16	0,23 ^b ±0,16	0,07 ^d ±0,05	0,23 ^b ±0,16	0,24 ^b ±0,16	0,19 ^c ±0,13	<0,0001
Esp. do Mesofilo	0,20 ^b ±0,09	0,25 ^a ±0,15	0,19 ^b ±0,12	0,16 ^c ±0,11	0,12 ^f ±0,42	0,14 ^{d,e} ±0,16	0,12 ^e ±0,07	0,14 ^{c,d} ±0,08	<0,0001

Dados são expressos como média (± SD) de 22 amostras de repetição. A estatística foi feita para um caracter analisado em todos os tratamentos. As diferenças foram significativas entre as médias. Letras diferentes indicam médias estatisticamente significativas entre os caracteres (teste Tukey-Kramer, p < 0,05 e α = 0,05).

Tabela 3. Intensidade de marcação dos anticorpos JIM7, JIM5, LM2 e LM1 na região apical da folha interna (F1). (-) ausente; (+) fraca marcação; (++) moderada marcação; (+++) intensa marcação.

Tecidos foliares	Anticorpos			
	JIM7	JIM5	LM2	LM1
Parênquima aquífero	+++	-	+	-
Parênquima clorofiliano próximo à epiderme	-	-	-	-
Parênquima clorofiliano próximo ao parênquima aquífero	-	-	-	-
Junções intercelulares do parênquima clorofiliano	+++	++	-	-
Xilema	+++	+++	+++	-
Floema	+++	+++	+++	-
Endoderme	-	-	-	-
Células braciiformes dos canais de aeração	+++	+	-	-
Câmaras subestomáticas	-	-	-	-
Estômatos	-	-	+++	-
Escamas	-	-	++	-
Células esclerenquimáticas	-	-	-	-
Epiderme	-	-	++	-

Tabela 4. Intensidade de marcação dos anticorpos JIM7, JIM5, LM2 e LM1 na região basal da folha interna (F1). (-) ausente; (+) fraca marcação; (++) moderada marcação; (+++) intensa marcação.

Tecidos foliares	Anticorpos			
	JIM7	JIM5	LM1	LM2
Parênquima aquífero	+++	-	+	-
Parênquima clorofiliano próximo à epiderme	-	-	-	-
Parênquima clorofiliano próximo ao parênquima aquífero	+++	+	-	-
Junções intercelulares do parênquima clorofiliano	+++	-	-	-
Xilema	+++	+++	+++	-
Floema	+++	+++	+++	-
Endoderme	-	-	-	-
Células braciiformes dos canais de aeração	+++	++	-	-
Câmaras subestomáticas	-	-	-	-
Estômatos	-	-	-	-
Escamas	-	-	-	-
Células esclerenquimáticas	-	-	+++	-
Epiderme	-	-	-	-

Tabela 5. Intensidade de marcação dos anticorpos JIM7, JIM5, LM2 e LM1 na região apical da folha intermediária (F4). (-) ausente; (+) fraca marcação; (++) moderada marcação; (+++) intensa marcação.

Tecidos foliares	Anticorpos			
	JIM7	JIM5	LM1	LM2
Parênquima aquífero	+	-	-	++
Parênquima clorofiliano próximo à epiderme	++	-	-	-
Parênquima clorofiliano próximo ao parênquima aquífero	+++	-	-	-
Junções intercelulares do parênquima clorofiliano	-	++	-	-
Xilema	+++	+++	+++	-
Floema	+++	+++	+++	-
Endoderme	-	-	-	-
Células braciiformes dos canais de aeração	+++	+++	-	-
Câmaras subestomáticas	-	-	-	-
Estômatos	-	-	++	+++
Escamas	-	-	-	+++
Células esclerenquimáticas	-	-	-	-
Epiderme	-	-	+++	+++

Tabela 6. Intensidade de marcação dos anticorpos JIM7, JIM5, LM2 e LM1 na região basal da folha intermediária (F4). (-) ausente; (+) fraca marcação; (++) moderada marcação; (+++) intensa marcação.

Tecidos foliares	Anticorpos			
	JIM7	JIM5	LM1	LM2
Parênquima aquífero	+	-	-	++
Parênquima clorofiliano próximo à epiderme	-	-	-	-
Parênquima clorofiliano próximo ao parênquima aquífero	-	-	-	-
Junções intercelulares do parênquima clorofiliano	++	+	+	-
Xilema	+++	+++	+++	-
Floema	+++	+++	+++	-
Endoderme			+	-
Células braciiformes dos canais de aeração	+++	+++	-	-
Câmaras subestomáticas	-	-	-	-
Estômatos	-	-	-	+++
Escamas	-	-	+++	+++
Células esclerenquimáticas	-	-	-	-
Epiderme	-	-	+++	+++

Tabela 7. Intensidade de marcação dos anticorpos JIM7, JIM5, LM2 e LM1 na região apical da folha externa (F8). (-) ausente; (+) fraca marcação; (++) moderada marcação; (+++) intensa marcação.

Tecidos foliares	Anticorpos			
	JIM7	JIM5	LM1	LM2
Parênquima aquífero	+	-	-	++
Parênquima clorofiliano próximo à epiderme	++	-	-	-
Parênquima clorofiliano próximo ao parênquima aquífero	+++	-	-	-
Junções intercelulares do parênquima clorofiliano	-	+++	-	-
Xilema	++	+++	-	-
Floema	++	+++	-	-
Endoderme	-	-	-	-
Células bractiformes dos canais de aeração	+++	+++	-	-
Câmaras subestomáticas	+++	-	-	-
Estômatos	+++	+++	+++	+++
Escamas	-	-	+++	+++
Células esclerenquimáticas	-	-	-	-
Epiderme	-	+++	+++	+++

Tabela 8. Intensidade de marcação dos anticorpos JIM7, JIM5, LM2 e LM1 na região basal da folha externa (F8). (-) ausente; (+) fraca marcação; (++) moderada marcação; (+++) intensa marcação.

Tecidos foliares	Anticorpos			
	JIM7	JIM5	LM1	LM2
Parênquima aquífero	+	-	-	-
Parênquima clorofiliano próximo à epiderme	-	-	-	-
Parênquima clorofiliano próximo ao parênquima aquífero	-	-	-	-
Junções intercelulares do parênquima clorofiliano	-	++	-	-
Xilema	+	++	+++	-
Floema	+	+++	-	-
Endoderme	-	-	-	-
Células bractiformes dos canais de aeração	+++	+++	-	-
Câmaras subestomáticas	-	-	-	-
Estômatos	-	-	+++	-
Escamas	+++	-	+++	-
Células esclerenquimáticas	-	-	-	-
Epiderme	-	-	+++	-

Figuras



Figura 1. *Aechmea distichantha* Lem. - Habitat, inflorescência e esquemas foliares de *Aechmea distichantha* Lem.. A: Habitat da espécie. B: Inflorescência. C: Esquema da filotaxia das folhas, desde a folha mais interna (1) até a folha mais externa (8). D: Esquema de uma folha mostrando a região do ápice, da base e a bainha.

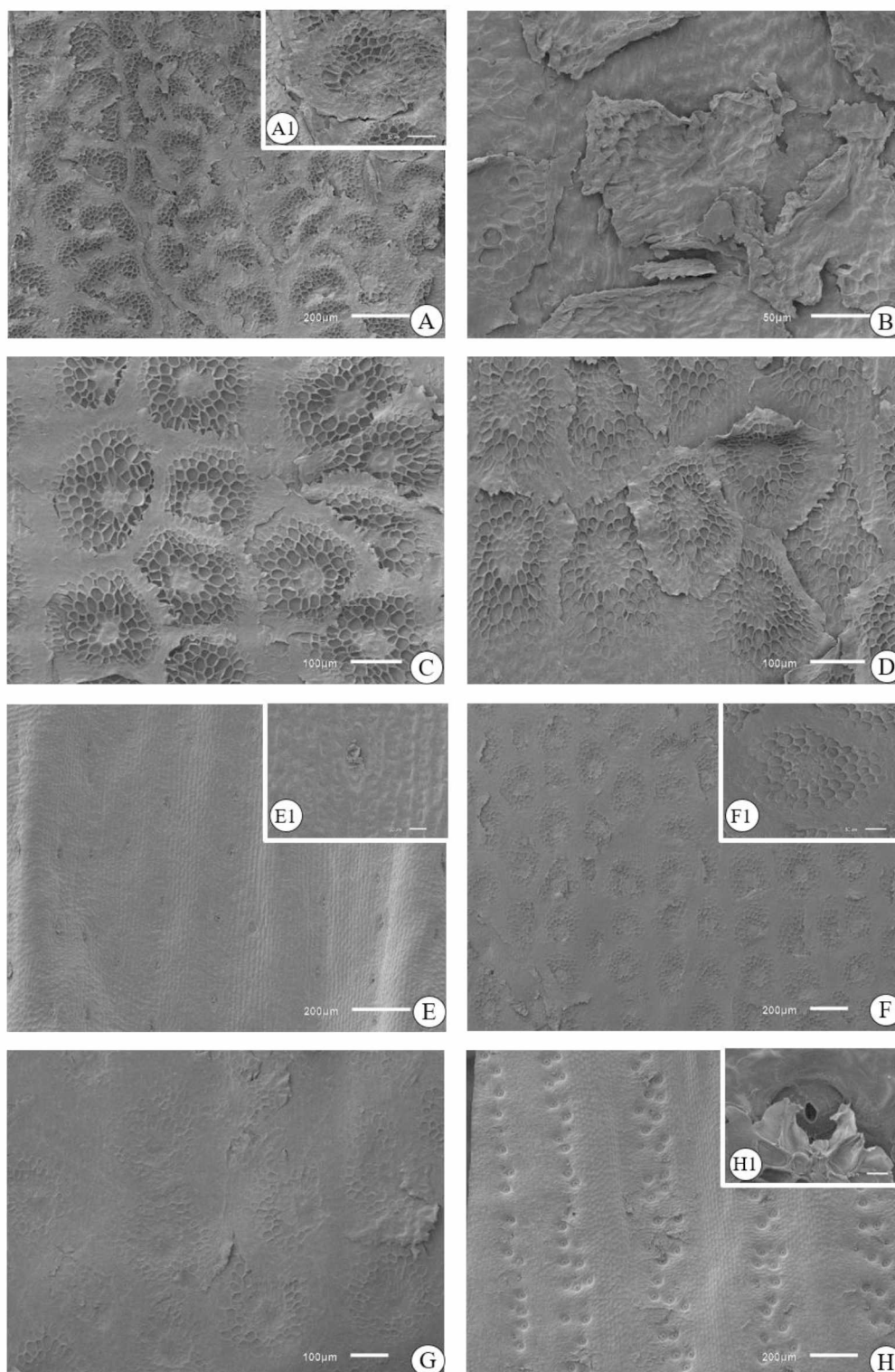


Figura 2. *Aechmea distichantha* Lem. - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) - Distribuição e formato das escamas e dos estômatos do ápice e da base das folhas em diferentes posições na roseta. A: Superfície abaxial do ápice da F1. A1: Detalhe da escama. B: Superfície adaxial do ápice da F1. C: Superfície abaxial da base da F1. D: Superfície adaxial da base da F1. E: Superfície adaxial do ápice da F4, mostrando apenas os pedículos das escamas, devido à queda do escudo da escama. E1: Detalhe do pedículo da escama. F: Distribuição das escamas da superfície abaxial da base da F4. F1: Detalhe da escama. G: Distribuição das escamas na superfície adaxial da base da F8. H: Estômatos distribuídos longitudinalmente em depressões na face abaxial da base da F1. H1: Detalhe do estômato protegido pela escama. F1: Folha Interna. F4: Folha Intermediária. F8: Folha Externa.

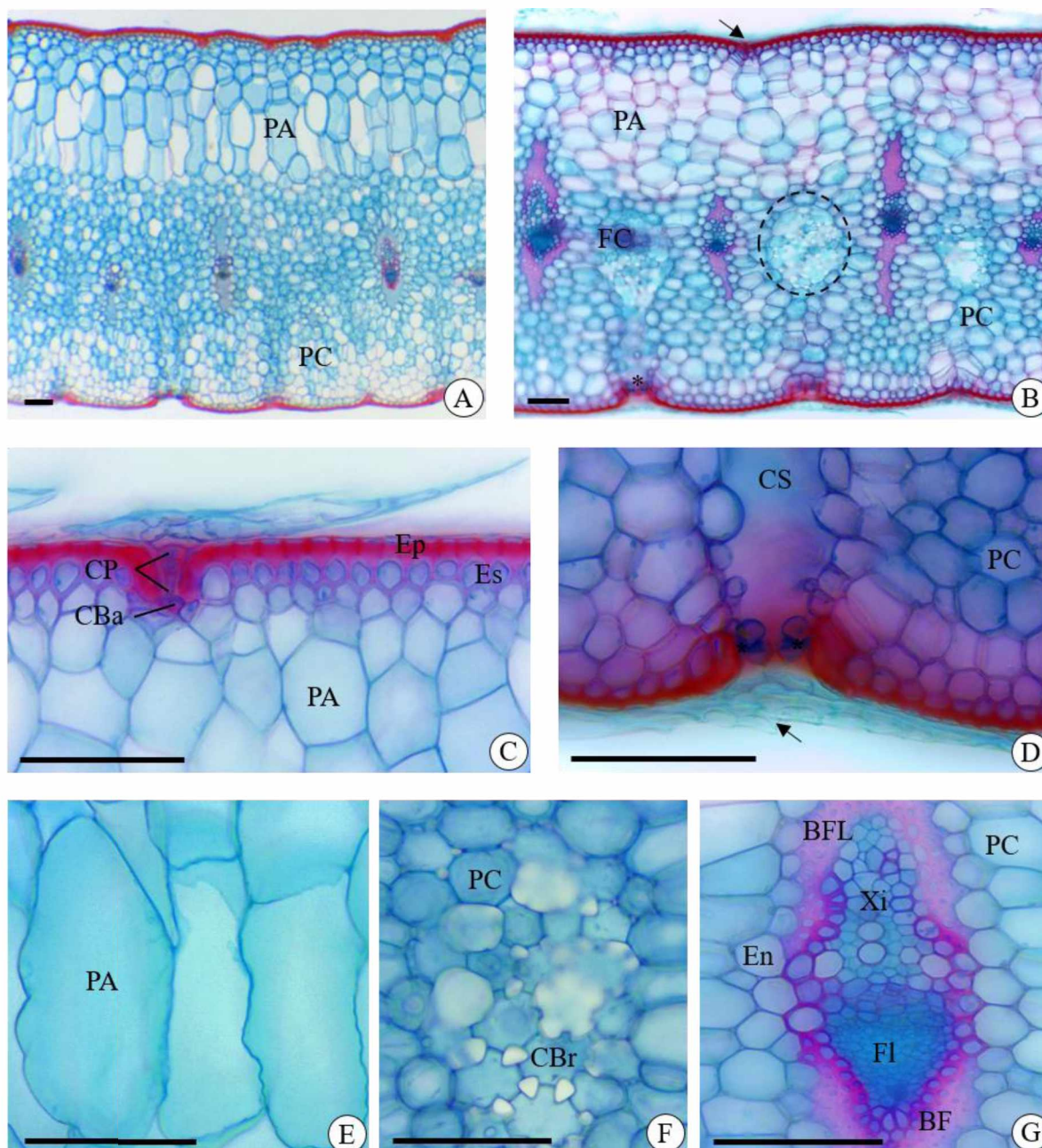


Figura 3. *Aechmea distichantha* Lem. – Secções transversais da folha. A e B. Vista geral da folha intermediária (F4). A: Ápice. B: Base. C-G. Detalhes do ápice e da base das três folhas. C: Escama da face adaxial da base da F1. D: Estômato e câmara subestomática na face abaxial da base da F4. E: Células alongadas anticlinalmente do parênquima aquífero do ápice da F8. F: Canal de aeração formado por células braciformes da base da F1. G: Feixe vascular colateral de maior calibre circundado por fibras pericíclicas da base da F4. Barras: 100µm. BFL: Bainha Fibrosa. CBr: Célula Braciforme. CBa: Célula Basal. CP: Células do Pedículo. CS: Câmara Subestomática. En: Endoderme. Ep: Epiderme. Es: Esclerênquima. FC: Feixes comensurais. Fl: Floema. PA: Parênquima Aquífero. PC: Parênquima Clorofiliano. Xi: Xilema. Asterisco (*): Estômato. Tracejado: Canal de Aeração. Seta: Escama. F1: Folha Interna. F4: Folha Intermediária. F8: Folha Externa.

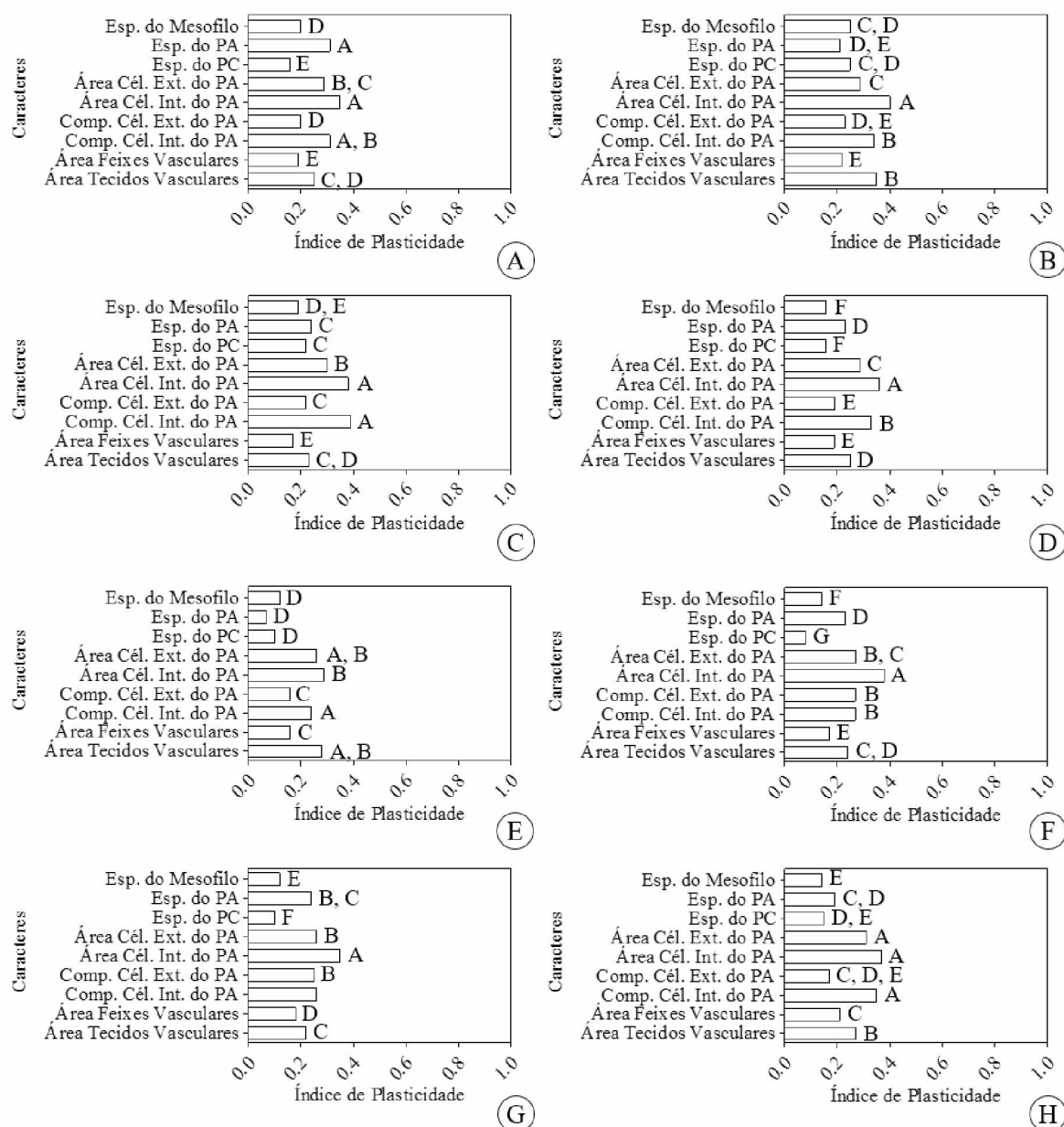


Figura 4. *Aechmea distichantha* Lem. - Gráficos do Índice de Plasticidade de caracteres no ápice, na base de folhas com diferentes posições na roseta. A: Ápice da F1 x Base da F1. B: Ápice da F4 x Base da F4. C: Ápice da F8 x Base da F8. D: Ápice e Base da F1 x Ápice e Base da F8. E: Ápice da F1 x Ápice da F4. F: Ápice da F4 x Ápice da F8. G: Ápice da F1 x Ápice da F8. H: Base da F1 x Base da F8. As diferenças foram significativas entre as médias referentes a todos os caracteres analisados no ápice e na base da F1, F4 e F8 em todos os tratamentos. Letras diferentes indicam médias estatisticamente significativas entre os caracteres (teste Tukey-Kramer, $p < 0,05$ e $\alpha = 0,05$). Cél.: Célula. Comp: Comprimento. Esp: Espessura. PA: Parênquima Aquífero. PC: Parênquima Clorofiliano. Ext.: Externa. Int.: Interna. F1: Folha Interna. F4: Folha Intermediária. F8: Folha Externa.

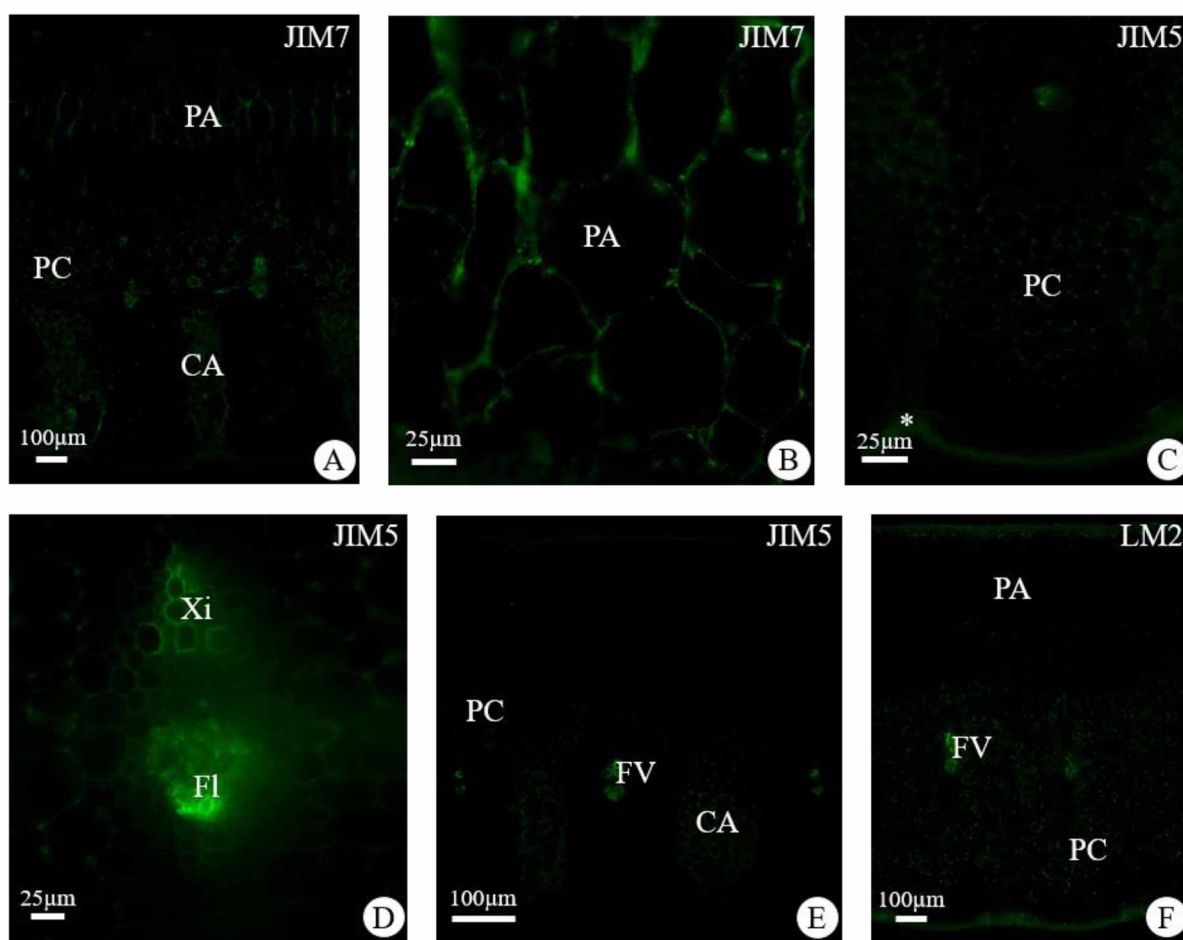


Figura 5. *Aechmea distichantha* Lem. Cortes transversais do ápice e base da Folha 1, marcados com anticorpos monoclonais JIM7, JIM5 e LM2. Fig. A e B. JIM7. A: Ápice. Alta marcação no parênquima aquífero. B: Base. Alta marcação no parênquima aquífero, nos canais de aeração, nas junções intercelulares do parênquima clorofiliano e nos feixes vasculares. Fig. C-E. JIM5. C: Ápice. Moderada marcação para as junções intercelulares do parênquima clorofiliano, autofluorescência nos estômatos e na cutina. D: Ápice. Alta marcação feixes vasculares. E: Base. Moderada marcação nos canais de aeração e alta marcação nos feixes vasculares. F. LM2 F: Ápice. Moderada marcação no parênquima clorofiliano e alta marcação nos feixes vasculares. CA: Canal de Aerênquima. Fl: Floema. FV: Feixe vascular. PA: Parênquima Aquífero. PC: Parênquima Clorofiliano. Xi: Xilema. Asterisco (*): Estômato.

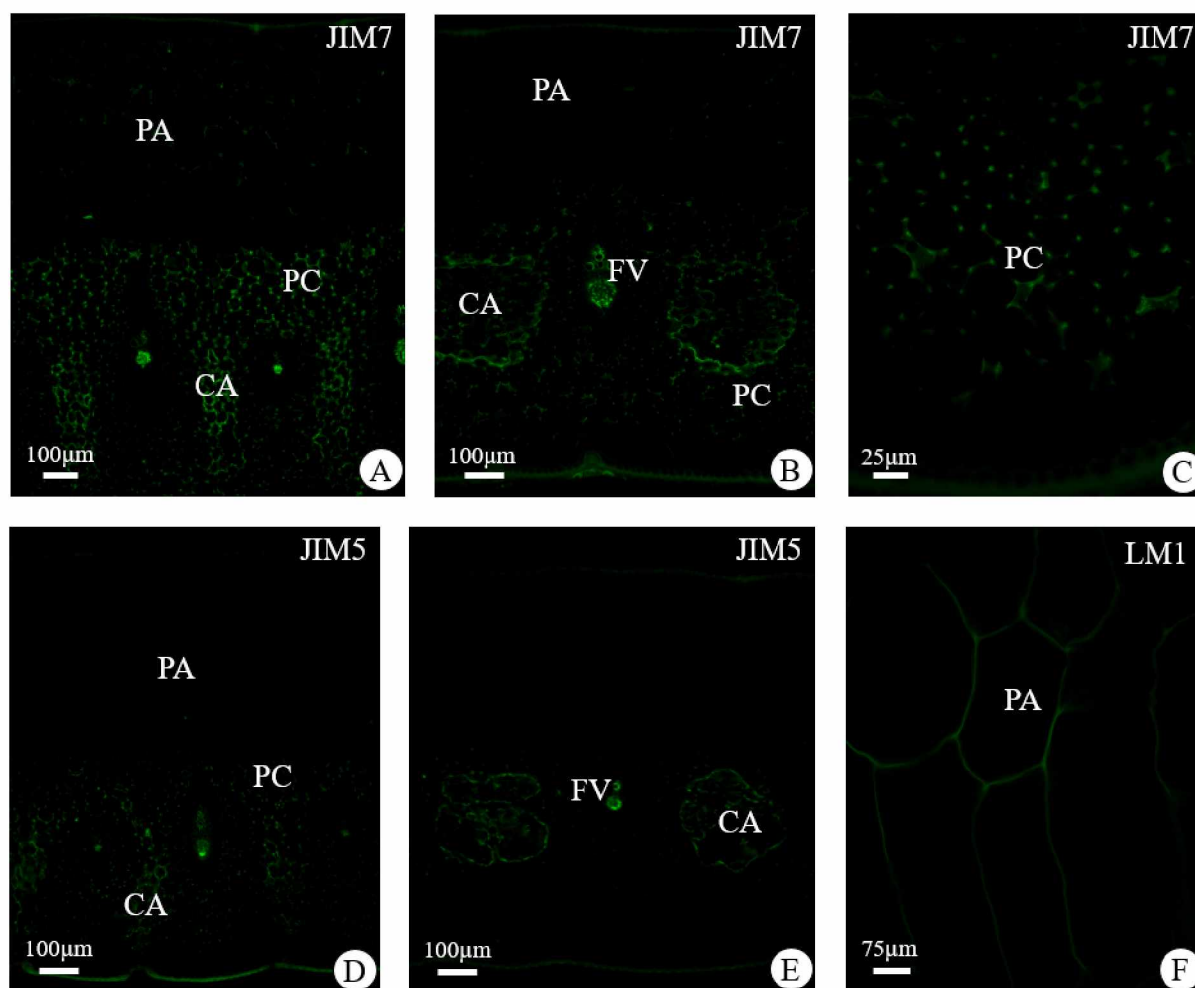


Figura 6. *Aechmea distichantha* Lem. Cortes transversais do ápice e da base da Folha 4, marcados com anticorpos monoclonais JIM7, JIM5, LM2 e LM1. Fig. A-C. JIM7. A: Ápice. Fraca marcação no parênquima aquífero, moderada marcação no parênquima clorofiliano e nos canais de aeração. Nos feixes vasculares há moderada marcação e baixa autofluorescência. B: Base. Autofluorescência na cutina, nas escamas e nos feixes vasculares. Fraca marcação no parênquima clorofiliano. Moderada marcação nos feixes vasculares e nos canais de aeração. C: Base. Moderada marcação nas junções intercelulares do parênquima clorofiliano e autofluorescência na cutina. Fig. D e E. JIM5. D: Ápice. Moderada marcação nas junções intercelulares do parênquima clorofiliano e nos feixes vasculares. Alta marcação nos canais de aeração. Autofluorescência nos feixes vasculares e na cutina. E: Base. Moderada marcação nos feixes vasculares e alta marcação nos canais de aeração. Autofluorescência nos feixes vasculares e na cutina. (F) LM1. F: Ápice. Moderada marcação no parênquima aquífero e autofluorescência neste mesmo tecido. CA: Canal de Aerênquima. FV: Feixe Vascular. PA: Parênquima Aquífero. PC: Parênquima Clorofiliano.

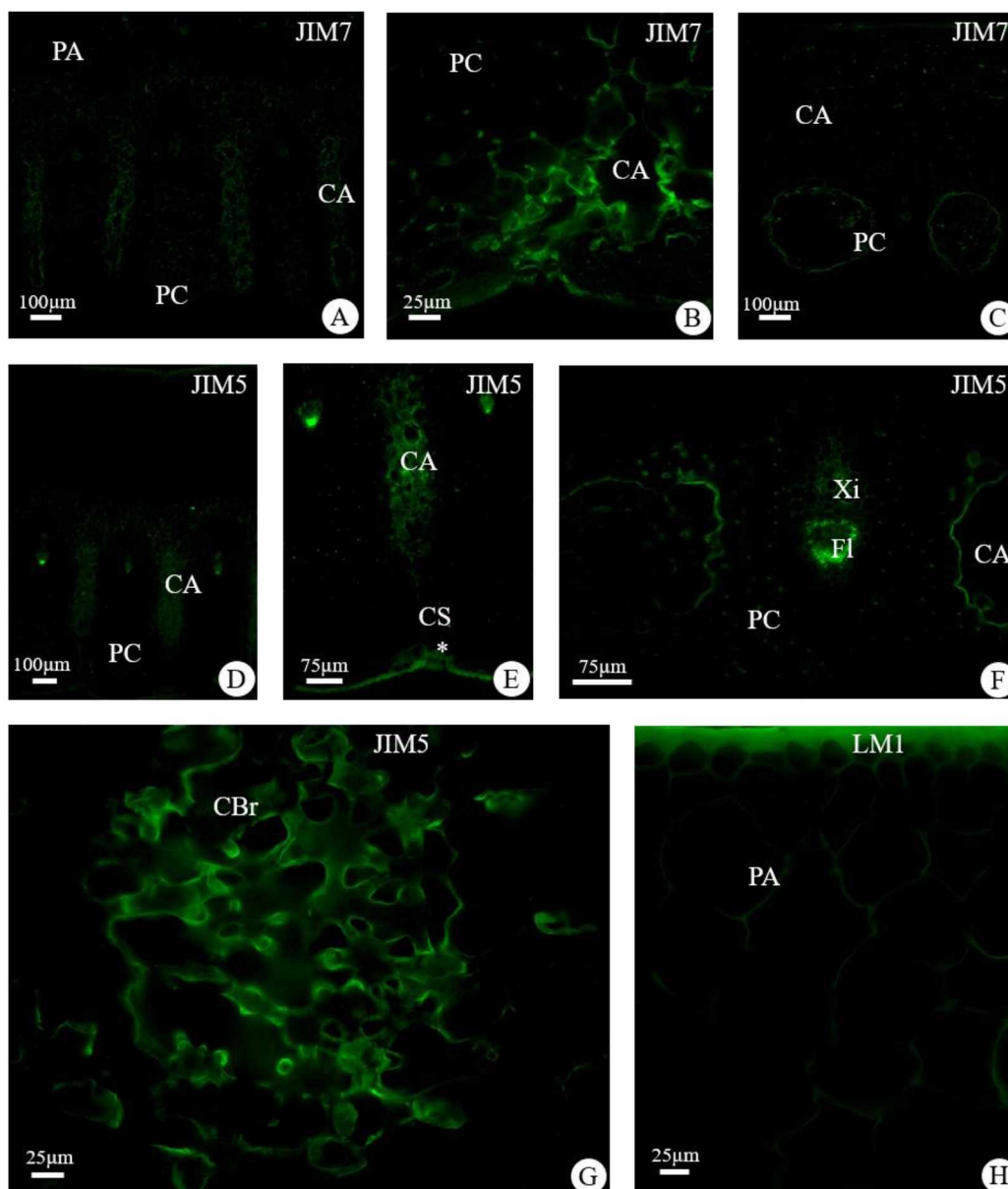


Figura 7. *Aechmea distichantha* Lem. Cortes transversais do ápice e base da Folha 8, marcados com anticorpos monoclonais JIM7, JIM5, LM2 e LM1. Fig. A-C. JIM7. A: Ápice. Fraca marcação no parênquima aquífero. Moderada marcação no parênquima clorofiliano. Alta marcação nos canais de aeração. Autofluorescência nos feixes vasculares e no parênquima aquífero. B: Ápice. Alta marcação nos canais de aeração e nas câmaras subestomáticas. Autofluorescência nos estômatos e na cutina. C: Base. Fraca marcação no parênquima clorofiliano e moderada marcação nos canais de aeração. Autofluorescência nos feixes vasculares e na cutina. Fig. D-G. JIM5. D: Ápice. Fraca marcação no parênquima clorofiliano, moderada nos feixes vasculares e alta marcação nos canais de aeração. Autofluorescência nos feixes vasculares. E: Ápice. Moderada marcação nos feixes vasculares e alta marcação nos canais de aeração. Autofluorescência na cutina, nos estômatos e nos feixes vasculares. F: Base. Fraca marcação no parênquima clorofiliano, moderada marcação nos feixes vasculares e alta marcação nos canais de aeração. Autofluorescência nos feixes vasculares. G: Base. Alta marcação nas células braciformes presentes nos canais de aeração. Fig. H. LM1. Fig. H: Ápice. Moderada marcação no parênquima aquífero. Autofluorescência na cutina e no parênquima aquífero. CA: Canal de Aerênquima. CBr: Células Braciformes. CS: Câmara Subestomática. FI: Floema. PA: Parênquima Aquífero. PC: Parênquima Clorofiliano. Xi: Xilema. Asterisco (*): Estômato

Normas da Revista: Acta Botanica Brasilica

All manuscripts must follow these guidelines: the text should be in Times New Roman font, size 12, double-spaced throughout and with 25 mm margins; the paper size should be set to A4 (210 x 297 mm). All pages should be numbered sequentially. Each line of the text should also be numbered, with the top line of each page being line 1. For text files .doc, .docx and .rtf are the only acceptable formats. Files in Adobe® PDF format (.pdf files) will not be accepted. When appropriate, the article file should include a list of figure legends and table heads at the end. This article file should not include any illustrations or tables, all of which should be submitted in separate files.

The **first page** should state the type of article (Original Article, Review, Viewpoint, Method or Short communication) and provide a concise and informative full title followed by the names of all authors. Where necessary, each name should be followed by an identifying superscript number (1, 2, 3 etc.) associated with the appropriate institutional address to be entered further down the page. Only one corresponding author should be indicated with an asterisk and should always be the submitting author. The institutional address(es) of each author should be listed next, each address being preceded by the superscript number where appropriate. The address must be synthetic, just enough to send a letter. Titles and positions should not be mentioned. This information is followed by the e-mail address of the corresponding author.

The **second page** should contain a structured **Abstract** not exceeding 200 words in a single paragraph without references. The Abstract should outline the essential content of the manuscript, especially the results and discussion, highlighting the relevance of main findings. The Abstract should be followed by between five and ten **Key words**. Note that essential words in the title should be repeated in the key words.

Original articles should be divided into sections presented in the following order:

Title page

Abstract

Introduction

Materials and Methods

Results

Discussion

Acknowledgements

References

Tables and Figure legends

Supplementary Data (if applicable)

Material and Methods and **Results** should be clear and concise. The **Discussion** section should avoid extensive repetition of the results and must finish with some conclusions. This section can be combined with results (**Results and Discussion**), however, we recommend authors consult the Editorial Board for a previous evaluation.

Plant names must be written out in full in the abstract and again in the main text for every organism at first mention but the genus is only needed for the first species in a list within the same genus (e.g. *Hymenaea stigonocarpa* e *H. stilbocarpa*). The authority (e.g., L., Mill., Benth.) is required only in Material and Methods section. Use The International Plant Names Index (www.ipni.org) for correct plants names. Cultivars or varieties should be added to the scientific name (e.g. *Solanum lycopersicum* ‘Jumbo’). Authors must include in Material and Methods a reference to voucher specimen(s) and voucher number(s) of the plants or other material examined.

Abbreviations must be avoid except for usual cases (see recent issues) and all terms must be written out in full when used to start a sentence. Non-conventional abbreviations should be spelled out at first mention.

Units of Measurement. *Acta bot. bras.* adopts the *Système International d'Unités* (SI). For volume, use the cubic metre (e.g. $1 \times 10^{-5} \text{ m}^3$) or the litre (e.g. 5 μL , 5 mL, 5 L). For concentrations, use μM , $\mu\text{mol L}^{-1}$ or mg L^{-1} . For size and distance use meters (cm, mm, μm , etc) and be consistent in the manuscript.

Numbers up to nine should be written out unless they are measurements. All numbers above ten should be in numerals unless they are starting sentences.

Citations in the text should take the form of Silva (2012) or Ribeiro & Furr (1975) or (Mayer & Wu 1987a; b; Gonzalez 2014; Sirano 2014) and be ordered chronologically. Papers by three or more authors, even on first mention, should be abbreviated to the name of the first author followed by et al. (e.g. Simmons et al. 2014). If two different authors have the same last name, and the article have the same year of publication, give their initials (e.g. JS Santos 2003). Only refer to papers as 'in press' if they have been accepted for publication in a named journal, otherwise use the terms 'unpubl. res.', giving the initials and last name of the person concerned (e.g., RA Santos unpubl. res.).

References should be arranged alphabetically based on the surname of the author(s). Where the same author(s) has two or more papers listed, these papers should be grouped in year order. Letters 'a', 'b', 'c', etc., should be added to the date of papers with the same citation in the text. Please provide DOI of 'in press' papers whenever possible.

For papers with **six** authors or fewer, please give the names of all the authors. For papers with **seven** authors or more, please give the names of the first three authors only, followed by et al.

Please follow the styles:

Books

Smith GM. 1938. Cryptogamic botany. Vol. II Bryophytes and Pteridophytes. 2nd. edn. New York, McGraw-Hill Book Company.

Chapters in books

Schupp EW, Feener DH. 1991. Phylogeny, lifeform, and habitat dependence of ant-defended plants in a Panamanian forest. In: Huxley CR, Cutler DC. (eds.) *Ant-plant interactions*. Oxford, Oxford University Press. p. 175-197.

Research papers

Alves MF, Duarte MO, Oliveira PEAM, Sampaio DS. 2013. Self-sterility in the hexaploid *Handroanthus serratifolius* (Bignoniaceae), the national flower of Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 27: 714-722.

Papers in press (ahead of print)

Alves JJ, Sampaio MTY. 2015. Structure and evolution of flowers. *Acta Botanica Brasilica* (in press). doi: 10.1590/0102-33062015abb3339.

Online-only journals

Wolkovich EM, Cleland EE. 2014. Phenological niches and the future of invaded ecosystems with climate change. *AoB Plants* 6: plu013 doi:10.1093/aobpla/plu013

Thesis (citation should be avoided)

Souza D. 2014. Plant growth regulators. PhD Thesis, University of Brazil, Brazil.

Websites and other sources (citation should be avoided)

Anonymous. 2011. Title of booklet, leaflet, report, etc. City, Publisher or other source, Country.

References to websites should be structured as: author(s) name author(s) initial(s). year. Full title of article. Full URL. 21 Oct. 2014 (Date of last successful access).

Acknowledgements should be preferably in fewer than 80 words. Be concise: “we thank...” is preferable to “The present authors would like to express their thanks to...”. Funding information should be included in this section.

The following example should be followed:

We acknowledge the Center of Microscopy (UFMG) for providing the equipment and technical support for experiments involving electron microscopy. We also thank J.S. Santos for assistance with the statistical analyses. This work was supported through a research grant from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (ID number).

Preparing Figures, Tables and Supplementary material

All figures (photographs, maps, drawings, graphs, diagrams, etc.) and tables must be cited in the text, in ascending order. Citations of figures in the text should appear in an abbreviated, capitalized form (e.g., Fig. 1, Fig. 2A-D, Fig. 3A, Figs. 3A, 4C, Tab.1).

The maximum dimensions of individual figures should be 170 × 240 mm. The width of an individual component can be 170 mm or 85 mm, without exception, whereas the height can be ≤ 240 mm. For continuous tone images (e.g., photographs), please supply TIFF files at 300 dpi. More complex drawings, such as detailed botanical illustrations will not be redrawn and should be supplied as 600 dpi TIFF files.

Grouping of related graphics or images into a **single figure** (a plate) is strongly encouraged. When a block of illustrative material consists of several parts, each part should be labelled with sequential capital letters, in the order of their citation in the text (A, B, C, etc.). The letters that identify individual images should be inserted within white circles in the lower right-hand corner. For separate the grouped images, authors should insert white bars (1mm thickness).

Individual images (not grouped as a plate) should be identified with sequential Arabic numerals, in the order of their citation in the text (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, etc.), presented in the same manner as the letters identifying individual images (described above).

The number that identifies a grouped figure (e.g., Fig. 2) should not be inserted into the plate but should rather be referenced only in the figure caption and the text (e.g., Fig. 2A-C).

Scale bars, when required, should be positioned in the lower right-hand corner of the figure. The scale bar units should be given either at the end of the figure caption or, when a figure contains multiple scale bars with different units, above each bar. Details within a figure can be indicated with arrows, letters or symbols, as appropriate.

Tables should be preceded by titles, indicated with sequential Arabic numerals (Table 1, 2, 3, etc.; do not abbreviate). Tables should be created using the Table function of Microsoft Word™. Columns and rows should be visible, although no dark lines should be used to separate them. Horizontal rules should be used only at the top (below the title) and bottom (below the final row) of the table. Do not use fills, shading or colors in the tables.

When appropriate, excess (but important) data can be submitted as Supplementary Files, which will be published online and will be made available as links. This might include additional figures, tables, or other materials that are necessary to fully document the research contained in the paper or to facilitate the readers' ability to understand the work.

Supplementary Materials are generally not peer refereed. When a paper is published, the Supplementary Materials are linked from the main article webpage. They can be cited using the same DOI as the paper.

Supplementary Materials should be presented in appropriate .doc or .pdf file format. These archives should contain inside all supplementary tables and files and any additional text. The full title of the paper and author names should be included in the header. All supplementary figures and tables should be referred in the manuscript body as "Table S1" and/or "Figure S1". *Acta bot. bras.* intends to maintain archives of Supplementary Materials but does not guarantee their permanent availability. *Acta bot. bras.* reserves the right to remove Supplementary Materials from a published article in the future.