



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Desenvolvimento inicial em raízes de epífitas: o que as cores  
do ápice radicular podem nos dizer sobre o desenvolvimento  
do velame?**

Docente: Ana Silvia Franco Pinheiro Moreira  
Discente: Luísa Gouveia Lana

UBERLÂNDIA-MG, 2019



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal

**Desenvolvimento inicial em raízes de epífitas: o que as cores  
do ápice radicular podem nos dizer sobre o desenvolvimento  
do velame?**

Docente: Ana Silvia Franco Pinheiro Moreira  
Discente: Luísa Gouveia Lana

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Uberlândia, como parte dos  
requisitos para obtenção do título  
de Mestre no Programa de Pós-  
graduação em Biologia Vegetal.

UBERLÂNDIA - MG, 2019

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

---

L243d  
2019

Lana, Luísa Gouveia, 1994

Desenvolvimento inicial em raízes de epífitas [recurso eletrônico] : o que as cores do ápice radicular podem nos dizer sobre o desenvolvimento do velame? / Luísa Gouveia Lana. - 2019.

Orientadora: Ana Silvia Franco Pinheiro Moreira.

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

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1272>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Botânica. 2. Epífitas. 3. Orquídea - Raízes. 4. Raízes (Botânica). I. Moreira, Ana Silvia Franco Pinheiro, 1980, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. III. Título.

---

CDU: 581

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

BioVeg

**Desenvolvimento inicial em raízes de epífitas: o que as cores do ápice radicular podem nos dizer sobre o desenvolvimento do velame?**

Luísa Gouveia Lana

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Presidente: Ana Silvia P. Moreira  
Profa. Dra. Ana Silvia Franco Pinheiro Moreira - Orientadora  
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Examinadores:

Bruno Garcia Ferreira  
Prof. Dr. Bruno GarciaFerreira  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

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

Dissertação aprovada em: 22/02/2019.

UBERLÂNDIA - MG  
- 2019 -

*Dedico aos meus pais Luzia de Fátima Gouveia  
Lana e Antônio Carlos Lana e a todos meus familiares e  
amigos, que permitiram meu sonho, fizeram de tudo sempre  
para que eu o realizasse e chegasse até aqui.*

## **AGRADECIMENTOS**

Acredito que nesse momento o único sentimento que me vem na cabeça é gratidão e uma enorme felicidade em concluir essa etapa que é tão importante na minha vida. Mas claro que sozinha eu não conseguiria nem começar e nada seria possível. E para essas pessoas devo meu muito obrigada, de forma que a ajuda direta ou indireta de todos foi essencial, vocês que dividiram responsabilidades, me ajudaram quando eu estava em desespero e achando que nada daria certo.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Capes que me proporcionou o auxílio para que eu pudesse desenvolver o meu mestrado, a Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e ao programa de Pós – Graduação em Biologia Vegetal, aos laboratórios do instituto de Biologia que me deram todo o suporte necessário para que eu pudesse trabalhar (Laboratório de fisiologia vegetal - LAFIVE, laboratório de anatomia e desenvolvimento vegetal - LADEVI) e também gostaria de agradecer os parceiros nesse trabalho ao laboratório da Física onde desenvolvi a microscopia Raman, os Laboratórios multiusuários da Química e da Engenharia Química que me permitiram fazer a microscopia eletrônica de varredura e análise com o software detector EDS (espectrometria de energia dispersiva por Raio-X) e ao Colégio de Aplicação COLUNI da universidade Federal de Viçosa que disponibilizou as plantas para meu trabalho.

À Professora Dra. Ana Silvia Franco Pinheiro Moreira, orientadora não só para execução deste trabalho, mas para a vida. Foi incrível poder ser sua aluna, Deus não poderia me conduzir de uma forma melhor para que eu me sentisse realizada na minha vida acadêmica. Sempre acreditou em mim desde o primeiro dia que nos conhecemos e aceitou a minha loucura de mudar tudo e fazer um mestrado em menos que um ano e meio. Agradeço a oportunidade e por me aceitar como sua orientanda, também a paciência, os incentivos e os conselhos que me fizeram chegar até aqui, todos os

ensinamentos que pôde dividir comigo e as oportunidades que me proporcionou, preparando uma melhor profissional a cada dia.

Ao Professor Dr. Denis Coelho de Oliveira, sou extremamente agradecida pelo entusiasmo que a ciência traz em sua vida, e, faz com que todos a sua volta fiquem entusiasmados também e com o prazer em estar trabalhando com ciências. Seu ânimo em produzir, fazer, realizar, me mostraram que com amor ao que se faz sempre podemos ir mais longe e por isso estou onde estou. Obrigada por mesmo sem saber, ter me ajudado a fazer uma escolha muito difícil e me conduzir para uma pesquisa que não tinha como ser melhor, e para um laboratório com pessoas maravilhosas. Me espelho em você como pessoa e profissional.

As amigas do mestrado que dividiram essa caminhada comigo Renata Trevizan Telles, e principalmente a Ana Flávia Melo que esteve presente em tudo. Sorte para nós! Desejo muito sucesso a vocês também. A Marcella Macedo, minha amiga da graduação, obrigada por me acolher tão bem em Uberlândia e ter sempre muita paciência e carinho comigo. Aos meus amigos de Viçosa que também sempre se fizeram presentes.

Aos companheiros de LAFIVE e LADEVE, Uiara Rezende, João Custodio, Vinicius Coelho Kuster, Aldineia Buss e Wesley Silva por serem sempre uns ótimos companheiros e me ajudar em tudo sempre; obrigada principalmente por me ensinar muito e dividir o conhecimento de vocês comigo e principalmente pela paciência. Um agradecimento mais que especial a Ana Flávia Melo que se fez presente em toda minha caminhada, principalmente na minha decisão mais difícil. Também a Thais Joca que mesmo de longe sempre me ajudou em tudo, me inspirou e me ensinou muita coisa.

Aos meus pais Luzia de Fátima Gouveia Lana e Antônio Carlos Lana, e à minha irmã Gabriela Gouveia Lana que foi meu suporte em tudo, mesmo a quilômetros de distância. Eles se fizeram presente em tudo, não pouparam esforços para me apoiar e fazer

com que eu chegasse até aqui. Muito obrigada por toda a dedicação de uma vida, tudo isso devo a vocês e é tudo por vocês. Agradeço imensamente a Deus, por sempre me fazer ter certeza do caminho que deveria seguir - a Ele minha gratidão por me dar sabedoria e me abençoar em toda minha caminhada.

Agradeço aos meus avós, Lourdes e Antônio (em memoria), Maria de Lourdes e Tarcísio, que de onde estiverem, sempre me incentivaram e fizeram muitas orações. A minha tia Teia, meu tio Marco e minha prima Emília por me dar todo o apoio, por sempre fazer de tudo para me ajudar e compartilhar comigo o meu dia a dia. Um agradecimento especial a minha tia Caca e a meu tio Lulu, que foram minha inspiração para eu chegar onde eu cheguei e me incentivaram seguir em frente na minha vida acadêmica, fazendo de tudo para dar certo, me ajudando em todos os detalhes, a construir um currículo, me dando carinho e se fazendo sempre presente em todo meu dia a dia. Agradeço a todos meus familiares por sempre me esperarem de braços abertos quando voltava para casa.

Ao meu namorado Gustavo, que foi um companheiro e um amigo sempre. Foi o apoio do início ao fim, o primeiro a falar para eu seguir em frente e me incentivar desde o momento que tive dúvida se prestava o processo de seleção para o mestrado ou não. Sempre acreditando em mim mais do que eu mesma, inúmeras vezes. Obrigada pelo seu apoio, seu amor e carinho que me direcionaram nessa caminhada.

À minha segunda família 602, por sempre terem paciência comigo, me escutarem e também “puxar minha orelha” quando necessário. Vocês me deram mais que um teto, mas um lar, que nunca imaginei que pudesse ter estando longe de casa. Obrigada por tudo.

Aos professores Dra. Neuza Maria de Castro e Dr. Bruno Garcia Ferreira pelas importantes contribuições que sem dúvidas darão a este trabalho.

Obrigada a todos que fizeram parte dessa minha caminhada e que sempre estiveram ao meu lado.

*“Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende”.*  
*(João Guimarães Rosa)*

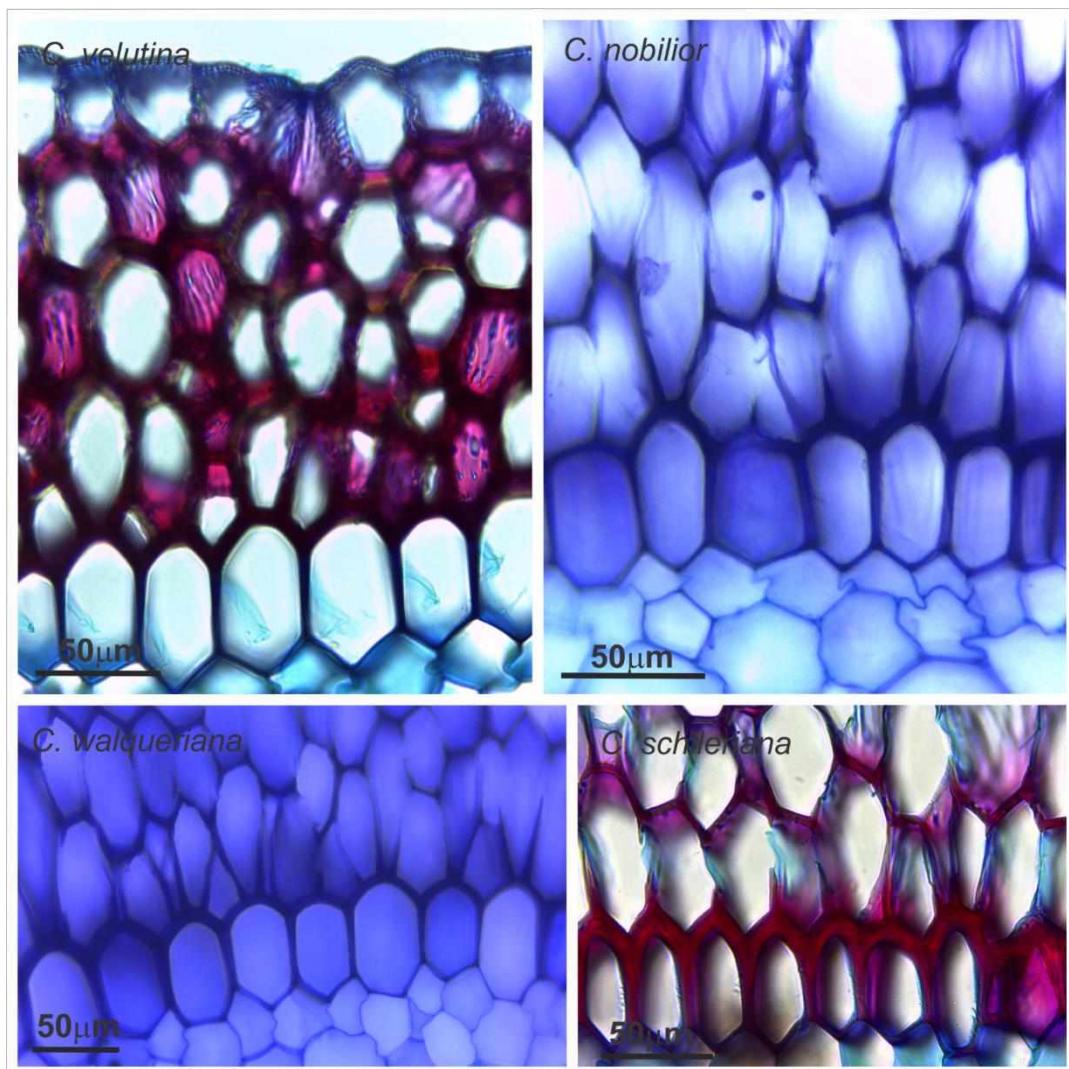
## SUMÁRIO

### Desenvolvimento inicial em raízes de epífitas: o que as cores do ápice radicular podem nos dizer sobre o desenvolvimento do velame?

Resumo.....	1
Abstract.....	2
Introdução.....	3
Material e Métodos.....	7
<i>Material vegetal e área de estudo.....</i>	7
<i>Análises estruturais.....</i>	7
<i>Análises histoquímicas.....</i>	9
<i>Análises imunocitoquímicas.....</i>	9
<i>Análise microscopia Raman.....</i>	10
<i>Espectrometria de energia dispersiva.....</i>	11
Resultados.....	11
<i>Análise estrutural das raízes de Cattleya.....</i>	11
<i>Desenvolvimento parede primária – mudanças nos padrões de pectinas e deposição de substâncias lipídicas.....</i>	16
<i>Desenvolvimento parede secundária – deposição de lignina.....</i>	21
<i>Nutrientes associados à parede.....</i>	23
Discussão.....	24
Referências Bibliográficas.....	30

# **DESENVOLVIMENTO INICIAL EM RAÍZES DE EPÍFITAS: O QUE AS CORES DO ÁPICE RADICULAR PODEM NOS DIZER SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO VELAME?**

Luísa Gouveia Lana, Ana Silvia Franco Pinheiro Moreira.



# **DESENVOLVIMENTO INICIAL EM RAÍZES DE EPÍFITAS: O QUE AS CORES DO ÁPICE RADICULAR PODEM NOS DIZER SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO VELAME?**

Luísa Gouveia Lana<sup>1\*</sup>, Ana Silvia Franco Pinheiro Moreira<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Biologia, Rua Ceará s/n, Bloco 2D, Campus Umuarama, CEP 38400-902, Uberlândia, MG, Brasil.

\*Autor para correspondência: luisa\_g\_lana@hotmail.com

## **RESUMO**

O velame, caráter adaptativo em espécies epífitas, é uma epiderme estratificada composta por células mortas na maturidade. Suas paredes celulares podem apresentar variações na espessura, na quantidade e no tipo de substâncias impregnadas, resultando em uma estrutura com propriedades físico-químicas diversas que pode atender a diferentes funções. O presente estudo teve como objetivo descrever o desenvolvimento do velame, traçando a composição da parede durante o desenvolvimento das raízes de quatro espécies de *Cattleya* cultivadas em casa de vegetação. Para isso, foram realizadas análises anatômicas, histoquímicas, imunocitoquímicas, de espectroscopia Raman e de espetrometria de energia dispersiva em amostras das regiões meristemática, em desenvolvimento e madura da raiz. A presença de pectinas, substâncias lipídicas e celulose na constituição da parede celular primária das células do velame, foi observada desde o ápice radicular até a região madura. Já a deposição de parede secundária foi iniciada na região de desenvolvimento da raiz, onde existe células vivas, porém o velame já começa a sofrer a morte celular programada. Nutrientes, principalmente cátions, foram detectados associados à parede celular madura do velame, evidenciando a retenção temporária de cátions pelos radicais carboxílicos da matriz péctica conservada e atribuindo a este tecido, também a função de auxiliar na absorção de nutrientes.

Palavras chaves: *Cattleya*, Orchidaceae, Parede Celular, Pectina e Meristema radicular

## ABSTRACT

The velamen, an adaptive character in epiphytic species, is a stratified epidermis composed by dead cells at maturity. In general, cell walls may exhibit variations in their thickness, amount and type of impregnated substances, resulting in a structure with diverse physical and chemical properties that can serve different functions. Knowing that this differentiation occurs during their development, the present study had as objective to describe the velamen development, drawing the composition of the wall during the development of the roots of four *Cattleya* species grown under greenhouse conditions. For this, anatomical, histochemical, immunocytochemical, Raman spectroscopy and dispersive energy spectrometry analyzes were performed in samples of meristematic, developing and mature root regions. The presence of pectins, lipid substances and cellulose in the constitution of the velamen primary cell wall was observed from the root apex to the mature region. Secondary wall deposition was initiated in the root development region. Nutrients, mainly cations, were detected associated with the mature cell wall of the velamen, evidencing the temporary retention of cations by the carboxylic radicals of the conserved pectic matrix and attributing to this tissue, also the auxiliary function in the absorption of nutrients.

Key words: *Cattleya*, Orchidaceae, Cell wall, Pectin and root meristem

## **Desenvolvimento inicial em raízes de epífitas: o que as cores do ápice radicular podem nos dizer sobre o desenvolvimento do velame?**

### **Introdução**

As raízes das orquídeas e de outras espécies adaptadas ao epifitismo assumem papel importante inerente à aquisição e fixação de recursos, uma vez que estas plantas crescem em ambiente sujeito à severas flutuações na disponibilidade de água e nutrientes (Krauss 1948; Proença & Sajo 2008; Macedo 2013). A presença do velame nestes grupos é considerada um caráter adaptativo, e vários trabalhos mostram sua importância para aquisição destes recursos (Engard 1944; Silva & Milaneze-Gutierrez 2004; Zotz & Winkler 2013).

O velame é o tecido mais externo da raiz, limitado pela exoderme. É uma epiderme estratificada, composta por células dispostas compactamente. Tais células resultam de divisões periclinais da protoderme, são mortas na maturidade (Engard 1944) e frequentemente apresentam paredes com espessamentos secundários (Joca *et al.* 2017). A parede primária é composta por microfibrilas de celulose relativamente rígidas embutidas em uma matriz hidratada de pectinas, hemicelulose e proteínas estruturais (Pridgeon 1987; Macedo 2013). Assim, a presença de uma parede celular rígida, baseia-se em polissacarídeos, na superfície das células vegetais e tem impactos sobre a natureza do crescimento e desenvolvimento das plantas (Knox 2014).

De modo geral, as paredes celulares apresentam variações na espessura, na quantidade e no tipo de substâncias impregnadas. O resultado é uma matriz dinâmica e complexa de componentes, com propriedades fisico-químicas diversas que fornece um contexto para muitos eventos de sinalização que governam as funções celulares, como padrões de desenvolvimento e crescimento (Lorenzo *et al.* 2019). Tais diferenças iniciam

durante o seu desenvolvimento (Burton *et.al.* 2010) e culminam com a formação da parede primária e/ou secundária (Kraus *et al.* 2012; Canteri *et al.* 2019; Kang *et al.* 2019). A parede primária é formada durante a expansão celular; é geralmente delgada e composta por celulose, polissacarídeos pécticos, xiloglucanos, arabinoxilanios e glicoproteínas estruturais. A parede secundária, por sua vez, é depositada entre a membrana plasmática e a parede primária da célula, após cessar a expansão celular; é composta frequentemente por celulose, xilanios e glucomananos, pectinas e lignina (Albersheim *et al.* 1996; Cosgrove & Jarvis 2012; Fahey *et al.* 2017).

Embora formado por células mortas na maturidade e apresentar expressiva parede secundária e/ou espessamentos secundários, as paredes do velame conservam sua matriz péctica (Joca *et al.* 2017). As pectinas são classificadas nos principais domínios; homogalacturonanos (HGA) e ramnogalacturonanos I (RG-I) presentes em grande proporção, e em quantidades relativamente menores, os ramnogalacturonanos II (RG-II) que dependendo do grau de metil-esterificação podem fazer ligações cruzadas com cátions (Ridley *et al.* 2001; Willats *et al.* 2001). Também podem ser classificadas em xilogalacturonanos (XGA), que sugere uma participação importante na estabilização da lamela media e no controle da porosidade e propriedades mecânicas das paredes celulares (Popper & Fry 2008) e os apiogalacturonanos (AP) encontrados principalmente em paredes celulares de plantas aquáticas (Caffall & Mohnen, 2009).

Os HGA podem assumir importante função na formação de géis que consequentemente aumentam a retenção de água, e quando na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , conferem enrijecimento à parede celular (Liu *et al.* 2013; Albersheim *et al.* 2010). São considerados polissacarídeos com estrutura complexa, ricos em ácido galacturônico (GalA) e importantes na composição primaria da parede celular. Desempenham um papel de auxiliar na absorção de água pelo fluxo apoplástico e podem estar envolvidos na proteção

mecânica e na redução da perda de água (Albersheim *et al.* 1996; Willats *et al.* 2000). A composição da parede celular e o grau de metil-esterificação das pectinas nas células dos tecidos das raízes de orquídeas têm subsidiado discussões quanto aos papéis que cada componente da parede assume frente à capacidade de absorção, retenção ou transporte de água, dentre outros aspectos relacionados à aquisição de recursos nos tecidos (Willats *et al.* 2001; Joca *et al.* 2017). Sugere-se que a matriz péctica possa agir como moderadora de trocas catiônicas, uma vez que os grupos carboxílicos ( $\text{COO}^-$ ) com carga naturalmente negativa podem atrair compostos de carga positiva (Zotz & Winkler 2013; Joca *et al.* 2017).

Nos estágios finais de desenvolvimento da parede primária, e na formação da parede secundária das células do velame, destaca-se também a deposição de suberina e ligninas, principalmente na lamela media da célula, ambas relacionadas com adaptações e funções fisiológicas especializadas do tecido. A lignina fornece uma estabilidade mecânica para a planta (Monties 1989; Campbell & Sederoff 1996; Zeier & Schreiber 1997), enquanto que a suberina impermeabiliza as paredes celulares por ser altamente hidrofóbica, podendo aumentar o fluxo apoplástico no velame e impedir na exoderme e na endoderme (North & Nobel 1994; Enstone & Peterson 2005; Franke & Schreiber 2007; Joca *et al.* 2017). Por outro lado, a compactação e composição química (incluindo suberina muitas vezes acrescida de lignina) das células básicas da exoderme e da endoderme, faz com que a água e os nutrientes sejam guiados pelo simplasto nestas camadas (células de passagem), o que permite uma pré-seleção dos solutos que devem ser absorvidos antes de atingirem o cilindro vascular. Outros autores atribuem também à suberina, a função de barreira à perda de água pelas raízes, reduzindo a desidratação (Zimmermann *et al.* 2000; Hose *et al.* 2001; Franke & Schreiber 2007). À lignina, sugere-se também um papel no fluxo apoplástico no córtex (ora como barreira, ora guiando em

direção ao estelo) (Joca *et al.* 2017) e, em conjunto com células lignificadas da exoderme, auxiliam na proteção mecânica e diminuem a perda de água do córtex para o ambiente externo quando presentes no velame (Sanford & Adanlawo 1973; Benzing *et al.* 1982; Ma & Peterson 2003).

Nas orquídeas, assim como em outras Monocotiledôneas, a raiz primária comumente tem vida curta e o sistema radicular se origina do caule (Krauss 1949; Smith & Downs 1974; Macedo 2013). Estas novas raízes, conhecidas como adventícias, apresentam meristema apical radicular (MAR) com a epiderme associada ao córtex e não ligada à coifa (Heimsch *et al.* 2008). Nas orquídeas e maioria das Iridaceae, os MAR são fechados, com as iniciais corticais e epidérmicas ou com as iniciais corticais separadas das epidérmicas. Nas Orchidaceae, os MAR apresentam ainda um abaulamento das iniciais corticais externas em direção às laterais próximo à coifa (Heimsch *et al.* 2008).

O desenvolvimento inicial das raízes, a partir do MAR, é decisivo na determinação das funções atribuídas a este órgão. Nas plantas epífitas com presença de velame, as divisões periclinais irão determinar o número de camadas do velame (Engard 1944) enquanto que o desenvolvimento celular culminará com a formação de uma parede celular secundária que maximiza a absorção de água e nutrientes (Winkler & Zotz 2013; Joca et al. 2017). Pressupomos então que quanto mais rápido ocorre a diferenciação da parede celular do velame, menos espesso será este tecido. Sabendo que a parede das células do velame é composta, entre outras substâncias, por lignina, suberina e pectinas, procuramos descrever o seu desenvolvimento traçando a composição da parede celular nos estágios de seu amadurecimento. Como modelo de estudo, foram utilizadas raízes de quatro espécies de *Cattleya* L.; avaliadas quanto à composição das paredes celulares (presença de lignina, pectina, celulose e hemicelulose).

## **Material e métodos**

### *Material vegetal e área de estudo*

*Cattleya* é um gênero de orquídea intensamente comercializado que agrupa inúmeras espécies e híbridos, com grandes flores vivamente coloridas (Paula & Silva 2004). Neste estudo foram utilizadas quatro espécies epífitas nativas do Brasil; *C. nobilior* Rchb.f., *C. schilleriana* Rchb.f., *C. velutina* Rchb.f. e *C. walkeriana* Gardner. As plantas foram cultivadas em vasos de barro ou plástico, utilizando-se casca de pinheiro como substrato. Foram mantidas em viveiros da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil, e da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brasil. Fragmentos de ápices radiculares e raízes já maduras foram coletados e fixados em FAA 50% (formaldeído: ácido acético: etanol 70%, 1:1:18, v:v:v) por 48 horas. Posteriormente, foram armazenados em etanol 70% (Kraus & Arduin 1997).

### *Análises estruturais*

Para descrição da estrutura geral das raízes (n=3 indivíduos por espécie), seções histológicas transversais foram obtidas por cortes à mão de fragmentos a 3 cm do ápice (considerado tecido maduro). O material foi clarificado em hipoclorito de sódio a 50% (Kraus & Arduin 1997) e corado com solução alcoólica de safranina 1% e azul de Astra 0,5% (1:9 v/v) (Bukatsch 1972). As lâminas foram montadas com gelatina glicerinada de Kaiser (Johansen 1940) e o material foi fotografado sob microscópio de luz Leica® DM500 equipado com câmera digital Leica® ICC50 HD. Foram mensurados a área transversal da raiz, o número de camadas do velame, a espessura do velame e a área da raiz ocupada pelo velame, sendo todas as medidas determinadas pela média de três pontos diferentes de cada corte, obtidos de dez raízes por espécie, selecionadas aleatoriamente.

dos três indivíduos de cada espécie. Para todas as medidas foi utilizado o software IMAGE J 1.x (National Institute of Health, EUA).

Para descrição do meristema apical radicular (MAR) e posteriores discussões quanto à formação e composição do velame, foram utilizados cortes longitudinais. Fragmentos de 4 cm de comprimento dos ápices foram retirados e separados em três regiões; (a) região meristemática (parte verde da raiz mais próxima ao MAR), (b) região em desenvolvimento (onde ainda existe parte verde mas nota-se o início de manchas brancas) e (c) região madura (parte completamente branca) (Fig. 1A). Todas as amostras foram desidratadas em serie etílica, posteriormente pré-infiltradas em etanol 95% e resina base na proporção de 1:1 (v/v) durante aproximadamente 36 horas. Para infiltração, o material foi transferido para resina base (Historesin® - Leica Biosystem) por um período de 24 horas até sua polimerização. Os cortes foram realizados em micrótomo (YD315, ANCAP, Brasil) ( $\sim 5 \mu\text{m}$ ) utilizando-se navalhas descartáveis de aço inox de alto perfil. As lâminas foram coradas com azul de toluidina 0,05% em 100 ml de tampão fosfato 0,1M, pH 4,0 (O'Brien *et al.* 1965). As lâminas foram levadas ao microscópio de luz para observação e obtenção de imagens.

Para análises no microscópio eletrônico de varredura (MEV), fragmentos de raízes das quatro espécies (a 0,5 e 3 cm do ápice) foram fixados em Karnovsky (paraformaldeído 4%, glutaraldeído 0,01 M e tampão fosfato 0,2 M, pH 7,2) (5:3:2, v/v) (Karnovsky 1965, modificado por Kraus & Ardiun 1997) e posteriormente lavados em álcool 70% e tampão fosfato. Foram imersos em tetróxido de ósmio por 1 minuto, e depois desidratados em serie etílica até ponto crítico de CO<sub>2</sub> (EMCPD 300, Leica, Vienna, Austria) no laboratório multiusuários da engenharia química. Os fragmentos foram metalizados em ouro (20 a 30 nm de espessura) utilizando-se Sputter Coater SCD O50, BalTec (Quorum, New York). As amostras foram analisadas em MEV (VEGA 3, TESCAN, República Tcheca)

calibrado em uma aceleração de voltagens de 10kv (conforme utilizado por Pridgeon *et al.* 1983; Porembski & Barthlott 1988).

#### *Análises histoquímicas*

Para determinar a natureza química da parede primária e dos espessamentos de parede secundária do velame, foram realizados testes para lipídeos e lignina. Para a presença de lipídeos, secções transversais foram incubadas em solução alcóolica de Sudan red 0,5% por 20 a 30 minutos (Sass 1951). Para histolocalização de ligninas, secções transversais foram incubadas em solução alcóolica de floroglucina 1%, adicionando em seguida solução de ácido clorídrico 25% por um período de 5 minutos (Johansen 1940). Também foi utilizado o filtro DAPI (espectro de excitação: 385-400 nm) (Chomicki *et al.* 2014; Joca *et al.* 2017). Para todas as análises foram utilizadas seções como branco e os respectivos testes para confirmação do falso positivo de acordo com as recomendações dos autores. Todas as seções foram montadas em água destilada e levadas ao microscópio de luz (lipídeos e lignina/floroglucina) ou de fluorescência (lignina/DAPI) (sistema de epifluorescência) com câmera digital acoplada ao BX-51 (Olympus, Japão).

#### *Análises imunocitoquímicas*

Parte das lâminas histológicas obtidas do material infiltrado em resina foram imersas em uma solução bloqueadora de proteína do leite (Molico®, Argentina) e solução salina (PBS) durante 30 minutos. Em seguida, o material foi incubado com anticorpos primários monoclonais em PBS/proteína do leite; JIM 5 - para epitopos de HGA com até 40% de metil-esterificação; e JIM7 – para epitopos de HGA com até 80% de metil-esterificação (Centre for Plant Sciences, University of Leeds, UK), por uma hora. Após a incubação primária, os cortes foram lavados em tampão fosfato salino (PBS), e

posteriormente incubados em um anticorpo secundário IgG anti-rato FITC (Sigma) (1:100 em 3% leite/PBS) por 2 horas no escuro. Para controle, o anticorpo primário foi suprimido. Após novas lavagens em PBS, as secções foram montadas em glicerina/água destilada (1:1) e levadas ao microscópio com sistema de epifluorescência utilizando-se filtro FITC (Blake *et al.* 2006; Hervé *et al.* 2011; Leroux *et al.* 2018 - modificado).

#### *Análises de espectroscopia Raman*

A espectroscopia Raman, uma ferramenta analítica, em materiais frescos, que permite a observação da parede celular e sua estrutura por meio de vibrações moleculares. (Gierlinger & Schwanninger 2007; Vítek *et al.* 2017). Fragmentos frescos de raízes contendo o ápice radicular (até 1 cm do MAR) e raízes já maduras (3 cm do ápice) foram infiltrados em solução aquosa de polietilenoglicol (PEG) 50% a 60°C. Após 24 a 48 horas de evaporação em placa aquecedora, os fragmentos foram montados em blocos utilizando-se PEG puro. As lâminas foram preparadas com auxílio de micrótomo (YD315, ANCAP, Brasil) (~18 µm) utilizando-se navalhas descartáveis de aço inox de alto perfil. O PEG foi removido após lavagem em água destilada para que não houvesse interferência na leitura dos dados. Os espectros foram obtidos em faixas de comprimento de ondas de 0 – 3000 cm<sup>-1</sup>. Vinte pontos foram distribuídos de forma aleatória na região do velame de cada espécie usando o espetrômetro LabRam HR Evol (Horiba scientific, New Jersey) equipado com um laser de 532nm, potência de 80 a 150mW, com a abertura do filtro de 5%. Foi utilizada como ampliação uma objetiva de 40x, tempo de aquisição de 40 segundos em cada ponto com 3 leituras, para cada fragmento do tecido analisado (Gierlinger *et al.* 2013; Mateu *et al.* 2014).

#### *Espectrometria de energia dispersiva*

Para detecção de outros elementos químicos (primariamente nutrientes minerais) presentes no velame, os fragmentos de raízes das quatro espécies utilizados no MEV foram analisados utilizando-se o software detector EDS (espectrometria de energia dispersiva por Raio-X) (modelo 51-ADD0048, Oxford Instruments X-act) operando com uma voltagem de 20kv (Dedavid *et al.* 2007).

## **Resultados**

### *Análise estrutural das raízes de Cattleya*

As raízes de *Cattleya* com crescimento livre apresentam forma cilíndrica, enquanto que as em contato com substrato são levemente achatadas. A região de desenvolvimento do velame (caracterizada pela coloração ainda verde ou, às vezes, voltada para o marrom) no ápice radicular das quatro espécies apresenta cerca de  $11,4 \pm 0,14$  mm de comprimento em todas as espécies, tornando-se branca à medida em que este tecido amadurece (Fig. 1A). Em todas as espécies, foi observada uma leve coloração arroxeadas/marrom (até 1 cm do RAM), decorrente da presença de antocianinas nos vacúolos (Fig. 1B e C).

*Cattleya nobilior* apresentou raízes com menor área em seção transversal ( $5,21 \pm 1,6$  mm<sup>2</sup>), enquanto que *C. velutina* apresentou as raízes mais calibrosas ( $11,80 \pm 2,4$  mm<sup>2</sup>), e *C. schilleriana* e *C. walqueriana* tiveram áreas semelhantes ( $\sim 7,8 \pm 1,9$  mm<sup>2</sup>) (Tabela 1).



**Figura 1** – Ápice radicular de raízes epífitas de *Cattleya*. **A.** Estrutura geral mostrando a região em desenvolvimento do velame (coloração de verde a marrom) e outra já madura (coloração branca) em raízes de *C. walqueriana*. **B.** Corte transversal da raiz de *C. nobilior* evidenciando a presença de antocianinas. **C.** Detalhe das células no MAR de *C. walqueriana* com vacúolo preenchido por antocianina.

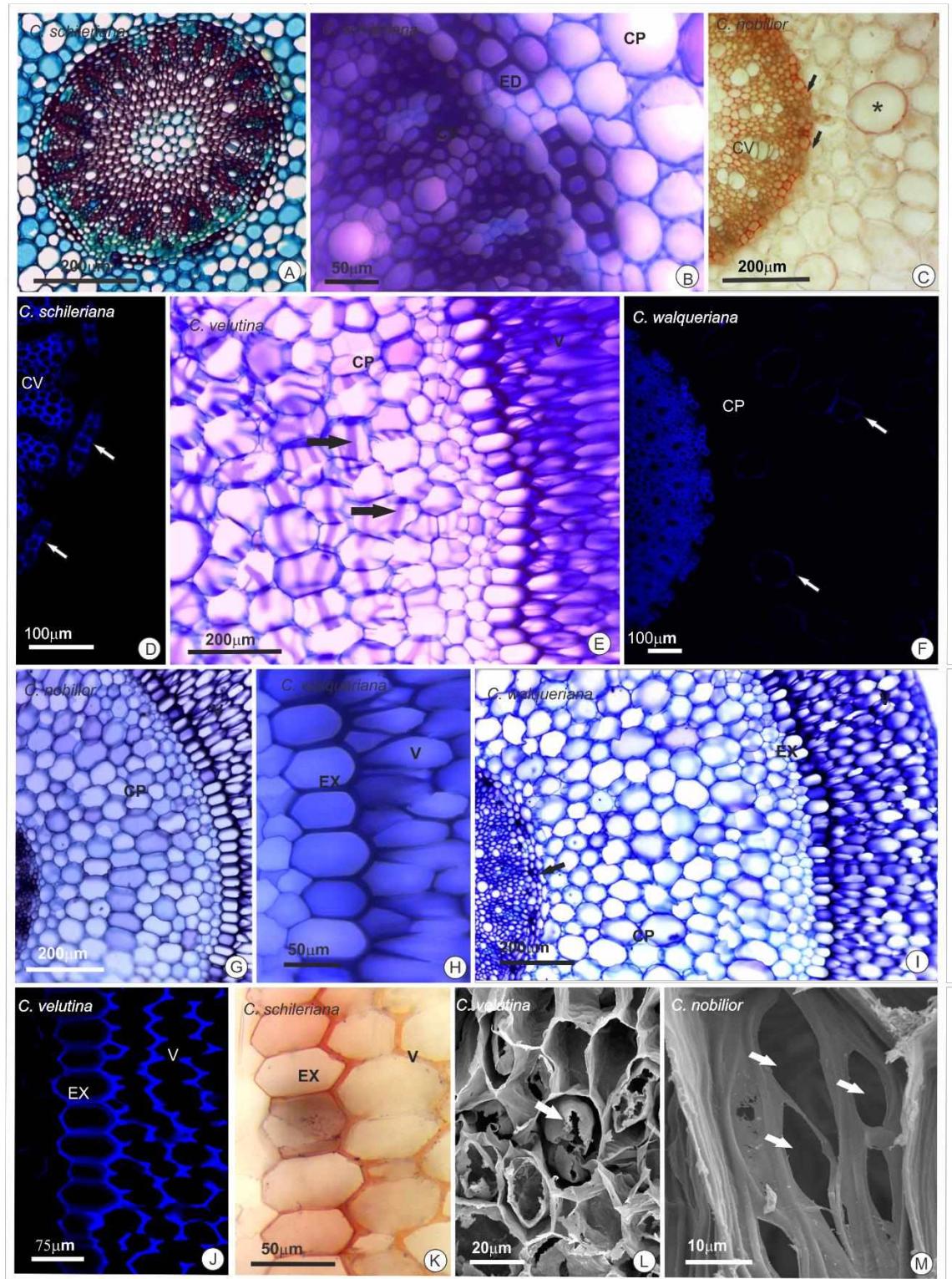
**Tabela 1** - Características estruturais das raízes de *Cattleya nobilior*, *C. schilleriana*, *C. velutina* e *C. walqueriana*. Todas as espécies foram mantidas em viveiros por aproximadamente 1 ano.

	Área da raiz (mm <sup>2</sup> ) em secção transversal	Área do velame (mm <sup>2</sup> )	Espessura do velame (μm)
<i>Cattleya nobilior</i>	5,21 ± 1,6	2,47 ± 1,0	380,2 ± 83,8
<i>Cattleya schilleriana</i>	7,87 ± 2,0	2,64 ± 0,9	333,5 ± 93,3
<i>Cattleya velutina</i>	11,80 ± 2,4	4,00 ± 1,0	407,2 ± 93,2
<i>Cattleya walkeriana</i>	7,88 ± 1,7	3,41 ± 0,9	436,9 ± 81,1

As quatro espécies apresentaram estrutura radicular típica de outras orquídeas epífitas, sendo a raiz composta por cilindro vascular, córtex parenquimático limitado pela endoderme e exoderme evidentes, e velame. O cilindro vascular em *C. nobilior* apresentou de 13 a 17 cordões de xilema e floema, em *C. schilleriana* de 12 a 18 (Fig. 2A

e B), em *C. velutina* de 16 a 20 e em *C. walqueriana* de 13 a 18. Em todas as espécies, o limite entre o cilindro vascular e o córtex foi evidenciado por uma endoderme com espessamento em O (Fig. 2B). A endoderme apresentou reação com Sudan III, indicando impregnação por suberina (Fig. 2C), sendo também observada a presença de lignina exceto nas células de passagem (Fig. 2D).

O córtex parenquimático apresentou células com diferentes tipos de espessamento, como os espessamentos em *phi* em *C. schilleriana*, *C. walqueriana* e *C. velutina* (Fig. 2E) e/ou uniformes, sempre impregnados por substância lipídica e/ou lignina (Fig. 2C e F). Na exoderme, que limita externamente o córtex parenquimático, observou-se para todas as espécies principalmente espessamento em O, na maioria das vezes mais evidente nas paredes periclinais externas e internas (Fig. 2G-I), sempre impregnado por substâncias lipídicas e/ou lignina (Fig. 2J e K).



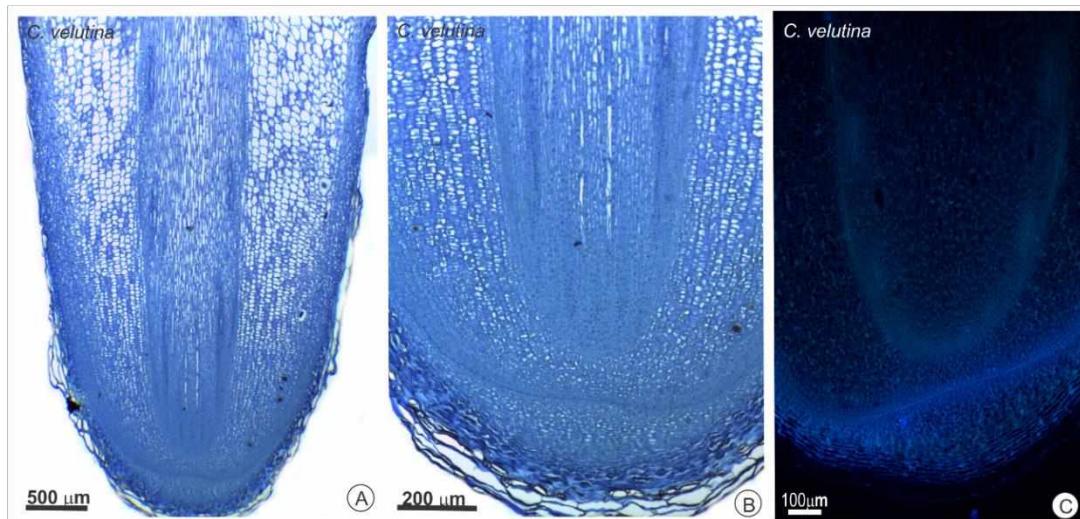
**Figura 2** – Estrutura interna das raízes de *Cattleya*. **A.** Vista geral do cilindro vascular em *C. schilleriana* mostrando 13 cordões de xilema e floema intercalados. **B.** Detalhe do cilindro vascular, com cordões de xilema e floema, endoderme com espessamentos em O e células de passagem. **C.** Cilindro vascular corado com Sudan III em *C. nobilior*. As setas representam espessamento em O impregnado por substâncias lipídicas (suberina).

No parênquima cortical é possível observar células com espessamento uniforme também com impregnação por substâncias lipídicas (\*). **D.** Cilindro vascular marcado com filtro fluorescente DAPI para lignina, setas representam espessamento em O impregnado com lignina. **E.** CórTEX parenquimático em *C. velutina* com espessamentos em *phi* mostrados pelas setas. **F.** CórTEX parenquimático com espessamentos em uniforme em *C. walqueriana*. **G.** Visão geral da raiz de *C. nobilior*. **H.** Detalhe da exoderme com espessamentos em U em *C. walqueriana*. **I.** Visão geral da raiz de *C. walqueriana*. **J.** Detalhe da exoderme com espessamentos em U impregnado com lignina (filtro DAPI) em *C. velutina*. **K.** Detalhe da exoderme com espessamentos em U impregnado com suberina em *C. schilleriana*. **L.** MEV da região meristemática do ápice radicular, destaque para o velame ainda com protoplasto vivo (indicado pela seta) e espessamentos parietais em *C. velutina*. **M.** MEV da região madura do ápice radicular, destaque para o velame com células mortas e espessamentos parietais em *C. nobilior*, mostrado pelas setas. (V – Velame, EX – exoderme, CP – CórTEX Parenquimático, ED – endoderme, CV – cilindro vascular).

O velame ocupou cerca de 33% da área total da raiz em secções transversal em *C. schilleriana* e *C. velutina* e quase 50% em *C. nobilior* e *C. walkeriana* (Tabela 1). Em *C. nobilior* foram observadas de 4 a 8 camadas de células dependendo da área de achatamento com o substrato (menor número de camadas) ou na área livre de crescimento (maior número de camadas), em *C. schilleriana* de 2 a 6, em *C. velutina* de 4 a 9 e em *C. walqueriana* de 4 a 7 camadas celulares. Os espessamentos parietais do velame foram encontrados em todas as quatro espécies, iniciando-se nos tecidos jovens (quando as células ainda apresentam conteúdo celular) (Fig. 2L) e aparecendo de forma expressiva nos tecidos maduros (Fig. 2M).

O MAR é do tipo fechado com um leve abaulamento das iniciais corticais externas nos lados internos das laterais da raiz, curvando-se ao longo da base da columela (Fig. 3A e B). As células protodérmicas se dividem periclinalmente ainda sob a coifa, podendo apresentar várias camadas celulares já em suas margens laterais. Não foi possível detectar lignina e suberina nas proximidades do MAR (Fig. 3C). Ainda na região verde do ápice

(região em desenvolvimento), a cerca de 1 cm do MAR, já se observam células mortas no velame. Em aproximadamente 11 mm do MAR, em todas as espécies, o velame está completamente maduro, com todas as células mortas, assumindo a coloração branca.



**Figura 3** – Cortes longitudinais do meristema apical radicular (MAR) de raízes de *Cattleya* epífitas. **A.** Vista geral do ápice da raiz de *C. velutina*. **B.** Detalhe do ápice da raiz de *C. velutina* mostrando MAR do tipo fechado. **C.** Detalhe do MAR em *C. velutina* mostrando apenas autofluorescência (ausência de lignina) quando analisados com filtro DAPI.

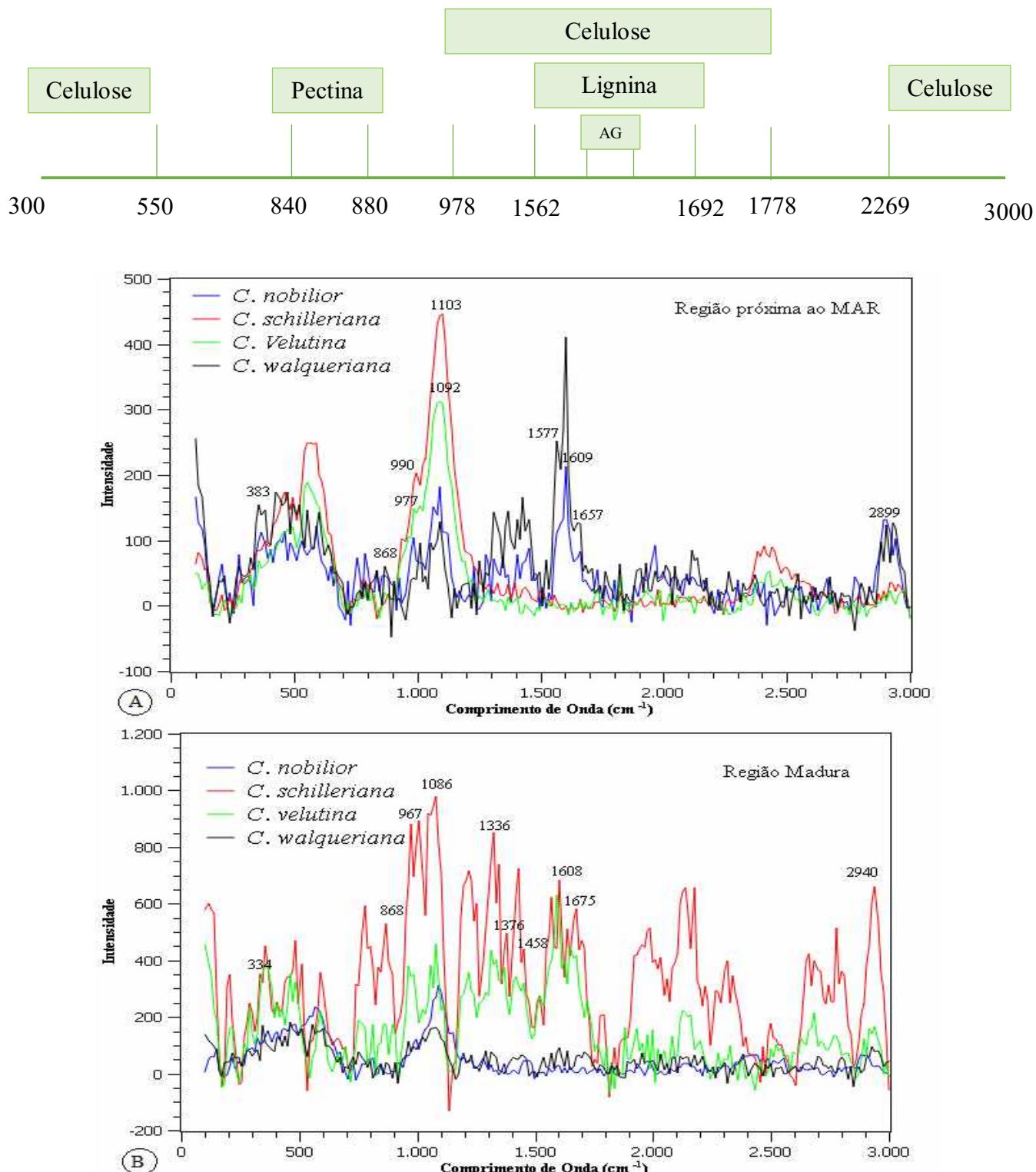
#### *Desenvolvimento da parede primária – mudanças nos padrões de pectinas e deposição de substâncias lipídicas*

Nas raízes das espécies estudadas, a divisão das células protodérmicas iniciou-se ainda no MAR (Fig. 3A e B), sendo observada durante o desenvolvimento primário do velame a presença de pectinas, substâncias lipídicas e celulose na constituição da parede celular. A complexidade da parede celular aumenta com sua diferenciação, com um aumento significativo do número de substâncias presentes (evidenciadas pelo aumento do número de picos nos gráficos de espectroscopia Raman da Fig. 4).

No velame das raízes de todas as espécies foi detectada celulose pela metodologia Raman, tanto no ápice quanto na região madura, podendo atribuir os comprimentos de

onda das bandas de 300 a 550 cm<sup>-1</sup>, de 978 a 1778 cm<sup>-1</sup> e de 2769 a 3043 cm<sup>-1</sup> (Fig. 4).

Ápices das quatro espécies apresentaram intensidade (indicativo de deposição de determinada substância) semelhantes para celulose, podendo destacar as células maduras do velame em *C. velutina* e *C. schilleriana* (Fig. 4).



**Figura 4** - Análise da espectroscopia Raman. Gráficos representam análise na região jovem do MAR (**A**) e na região madura da raiz (**B**). Comprimentos de onda das bandas de 300 a 550 cm<sup>-1</sup>, de 978 a 1778 cm<sup>-1</sup> e de 2769 a 3043 cm<sup>-1</sup> para celulose, de 840 a 880 cm<sup>-1</sup> indicam a presença de pectina, de 1600 a 1650 cm<sup>-1</sup> indicam ácidos graxos (AG) e de 1562 cm<sup>-1</sup> até aproximadamente 1692 cm<sup>-1</sup> e na banda de 2940 cm<sup>-1</sup> indicam lignina.

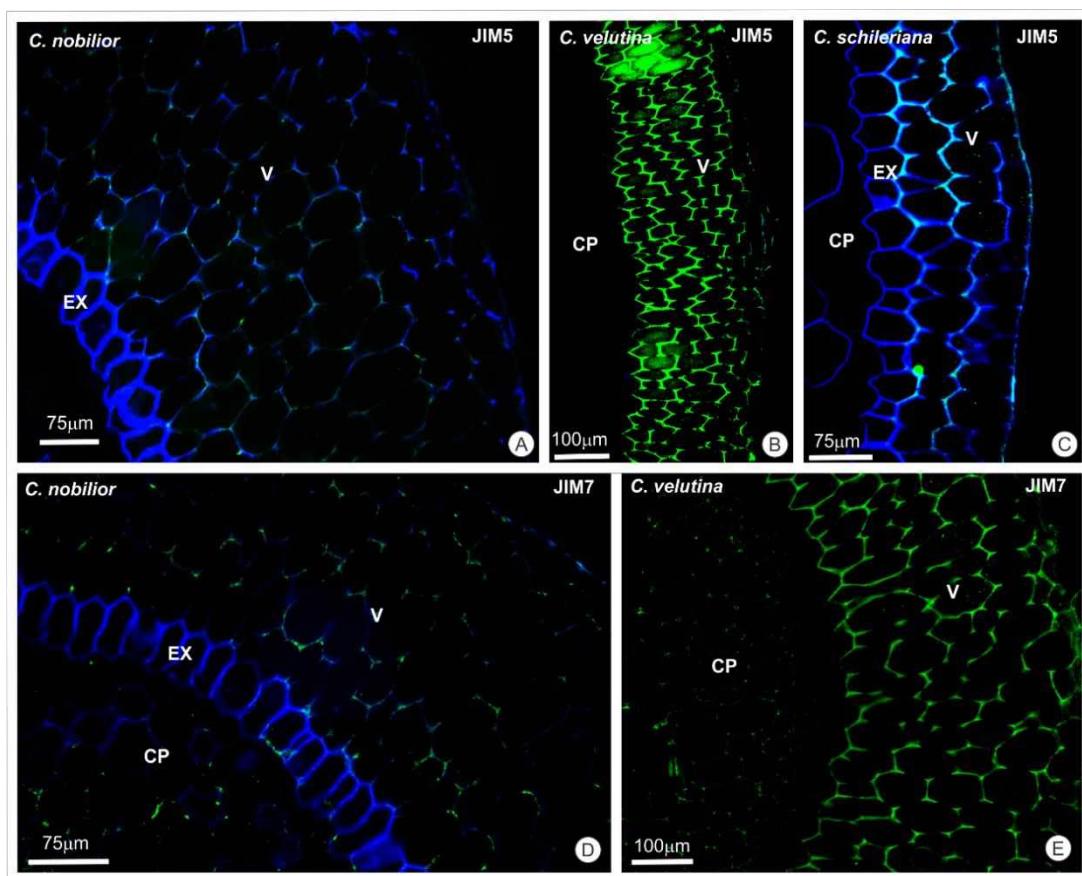
Comprimentos de onda de 840 a 880 cm<sup>-1</sup> indicam a presença de pectinas. De forma geral, raízes jovens demonstraram picos de comprimentos de onda menos intensos do que os observados nas regiões maduras, principalmente em *C. schilleriana* (Fig.4). Células do velame maduro de *C. schilleriana* e *C. velutina* apresentaram picos de pectinas mais intensos quando comparados com *C. nobilior* e *C. walqueriana* (Fig. 4).

Entretanto, considerando as HGAs (independente do grau de metil-esterificação) avaliadas neste estudo, todas as quatro espécies de *Cattleya* apresentaram poucas respostas positivas próximo ao MAR. Há cerca de 1 cm do ápice, quando as células do velame começam a morrer, foram observadas marcações com o anticorpo JIM5 (para epítopos de HGAs com até 40% de metil-esterificação) nas junções celulares em *C. nobilior* (Fig. 5A). Nas raízes maduras, esse anticorpo marcou intensamente as células do velame em *C. walqueriana* e *C. velutina* (Fig. 5B), e em *C. schilleriana* e *C. nobilior* as marcações apareceram em menor intensidade (Fig. 5C).

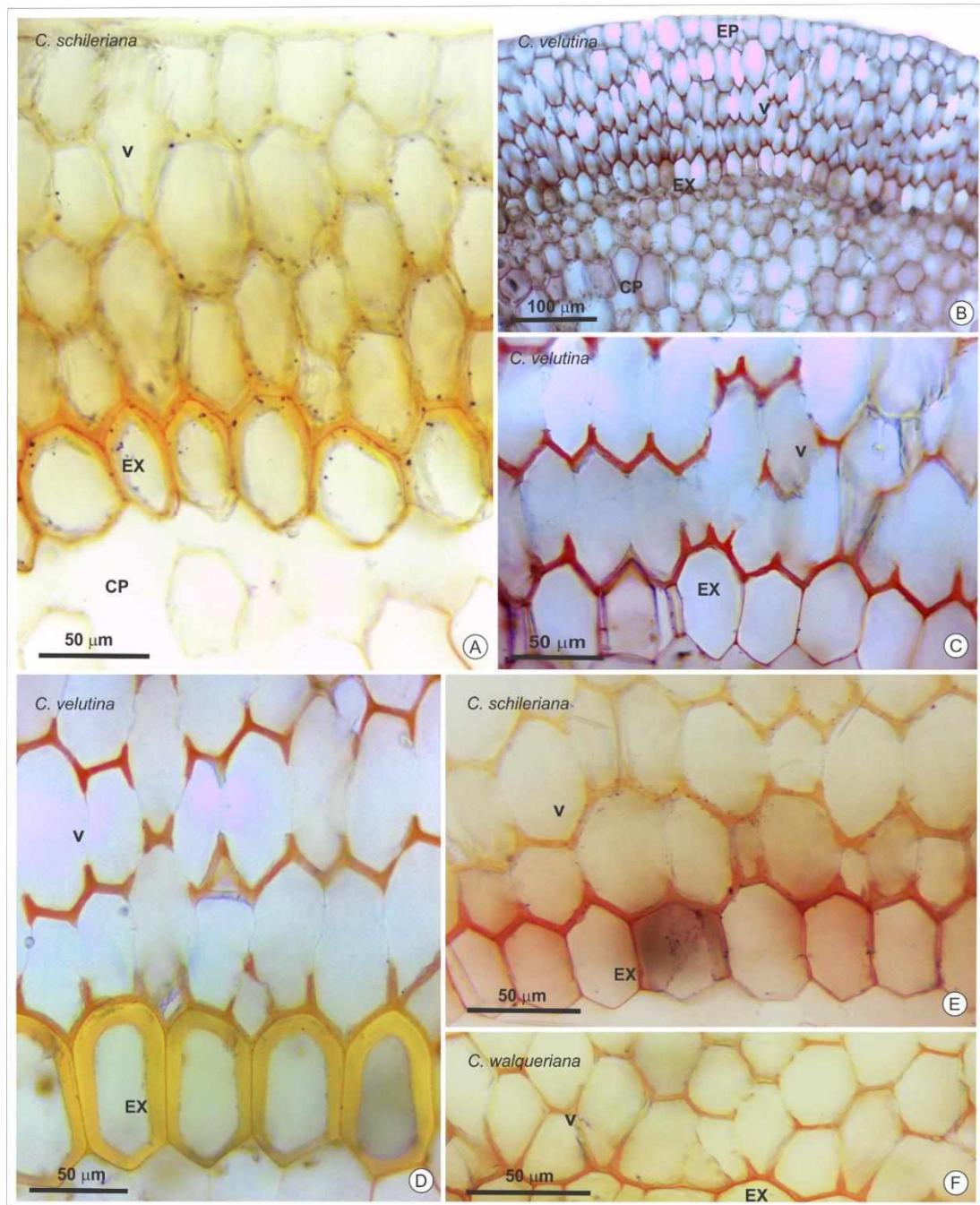
Do mesmo modo, o anticorpo JIM7, que se liga ao epítopos de HGA de alta metil-esterificação, marcou apenas as junções celulares no MAR de *C. nobilior* (Fig. 5D). Nas demais espécies, não houve marcação por JIM7 nesta região. Nas raízes maduras, foram observadas fortes marcações no velame de *C. velutina* (Fig. 5E) e *C. walqueriana*. Em *C. nobilior* ocorreram poucas marcações, apenas nas junções celulares. *Cattleya schilleriana* por sua vez, mostrou resposta negativa no velame.

Com o amadurecimento da parede celular do velame, inicia-se a deposição de substâncias lipídicas. *Cattleya schilleriana* foi a espécie em que a deposição de suberina

apareceu mais tarde, com marcações quase inexistentes no ápice, prevalecendo apenas nos espessamentos junto à exoderme (Fig. 6A). Na região intermediária, onde, além de células com núcleo, células maduras já são observadas, a coloração para suberina em todas as espécies foi observada por todo o velame. Em *C. velutina* esta coloração foi mais intensa do que nas demais espécies, exceto no epivelame (Fig. 6B e C). Na região madura da raiz, poucas marcações foram observadas em *C. schilleriana* e *C. nobilior*. Já em *C. velutina* e em *C. walqueriana*, ainda era possível observar a deposição de substâncias lipídicas principalmente na região próxima à exoderme (Fig. 6D - F).



**Figura 5** - Imunocitoquímica usando os anticorpos JIM5 e JIM7. **A.** Velame com pouco resultado positivo para JIM5 na região próxima ao MAR de *C. nobilior*. **B.** Velame com resultado positivo para JIM5 na região madura de *C. velutina*. **C.** Velame com resultado negativo para JIM5 na região madura de *C. schilleriana*. **E.** Velame com resultado positivo para JIM7 nas junções celulares em *C. nobilior* próxima ao MAR. **F.** Velame com resultado positivo para JIM7 na região madura de *C. velutina*. (V- Velame, EX – exoderme, CP – Córtex Parenquimático).



**Figura 6** – Teste histoquímico com Sudan III para detecção de deposição de substâncias lipídicas (suberina). **A.** Corte transversal do velame na região próxima ao MAR de *C. schilleriana*. **B.** Visão geral do velame, exoderme e córtex da raiz de *C. velutina* na região intermediária. **C.** Detalhe das células do velame com resultado positivo na região intermediária das raízes de *C. velutina*. **D.** Detalhe do velame com resultado positivo para região madura da raiz de *C. velutina*. **E.** Resultados positivos nas células do velame da região madura das raízes de *C. schilleriana*. **F.** Resultados positivos nas células do velame na região madura das raízes de *C. walqueriana*. (V- Velame, EX – Exoderme, CP – Corte Parenquimático).

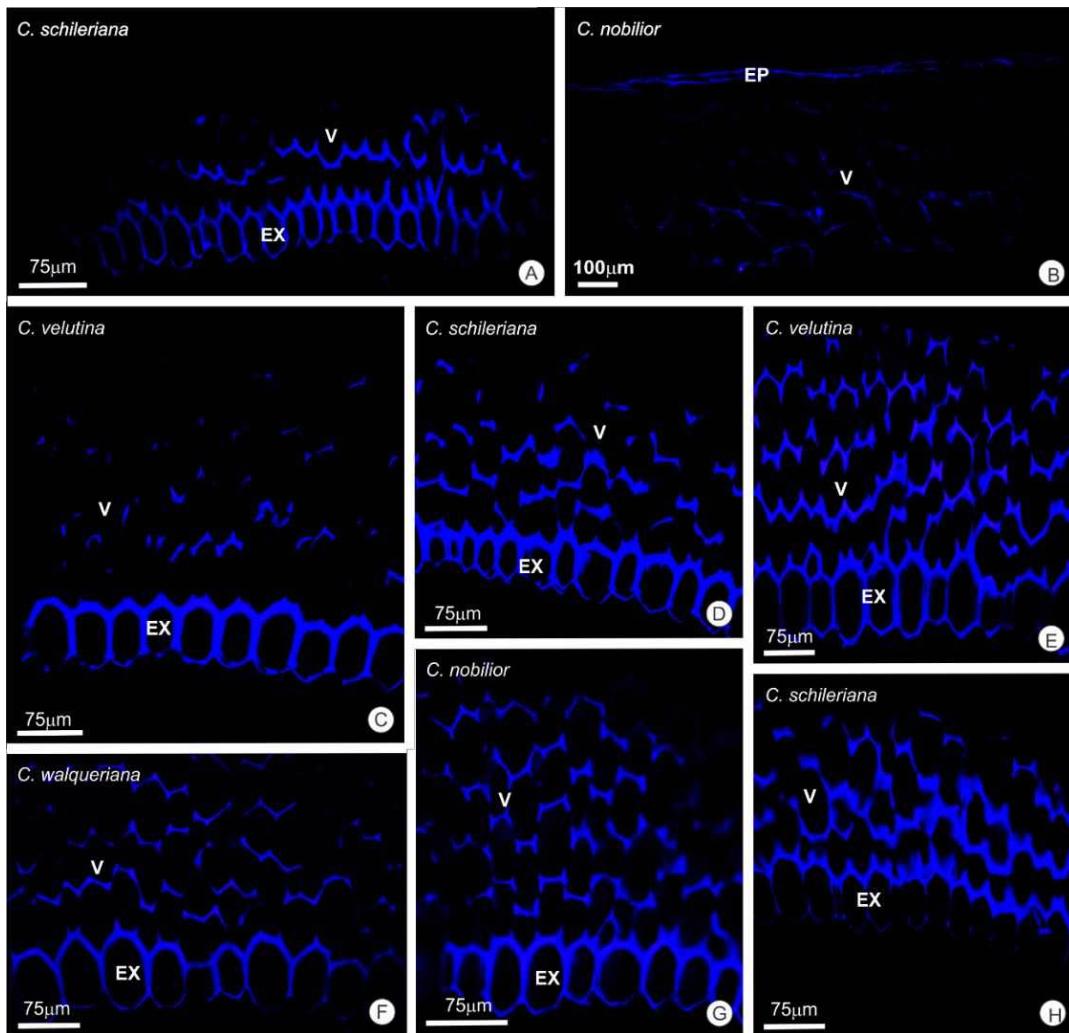
### *Desenvolvimento da parede secundária – deposição de lignina*

A lignina na espectroscopia Raman, pode ser expressada nos comprimentos de ondas variando nas bandas de 1562 cm<sup>-1</sup> até aproximadamente 1692 cm<sup>-1</sup> e na banda de 2940 cm<sup>-1</sup>. Picos para comprimentos de onda semelhantes foram encontrados no MAR das raízes de *C. nobilior* (1609 cm<sup>-1</sup>) e *C. walkeriana* (1604 cm<sup>-1</sup>) (Fig. 4). No entanto, bandas de lignina nesse comprimento de onda não foram detectadas para *C. velutina* e *C. schilleriana* na região do ápice radicular. Já na região madura da raiz, picos representativos de lignina foram encontrados no velame das quatro espécies estudadas, porém *C. schilleriana* apresentou uma intensidade maior do que as outras espécies (Fig. 4).

A presença de lignina não foi observada nas regiões próximas ao MAR em nenhuma das quatro espécies estudadas quando observadas com o filtro DAPI. Ocorreu primeiramente um amadurecimento das células da exoderme e, posteriormente do velame. A deposição da parede celular secundária no velame iniciou-se com o desenvolvimento da raiz, e em *C. schilleriana*, foi possível observar alta fluorescência com filtro DAPI primeiramente nas camadas próximas à exoderme (Fig. 7A.).

A deposição de lignina é gradativa e, diferentemente do que ocorre nas células da exoderme que se restringe à parede secundária, no velame a lignina parece ocorrer por toda a parede celular. Sabe-se que a formação da parede secundária não é uniforme, e diferentemente do observado nas células jovens do velame (Fig. 2L), no velame maduro é observada a presença de vários poros (Fig. 2M). Na região em desenvolvimento, no início do amadurecimento da raiz, foram observados resultados negativos em *C. nobilior* (Fig. 7B), e em *C. velutina* (Fig. 7C) e *C. walkeriana* as marcações encontradas para lignina foram poucas e bem fracas, prevalecendo nas junções celulares nas regiões mais próximas da exoderme. Já em *C. schilleriana* as marcações na região em desenvolvimento

ocorreram de forma mais proeminente (Fig. 7D). Na região madura da raiz com o desenvolvimento da parede celular completo, as marcações foram fortes e praticamente em todo velame (Fig. 5E - H). Porém no epivelame, não foram observadas marcações para lignina em nenhuma fase do desenvolvimento.

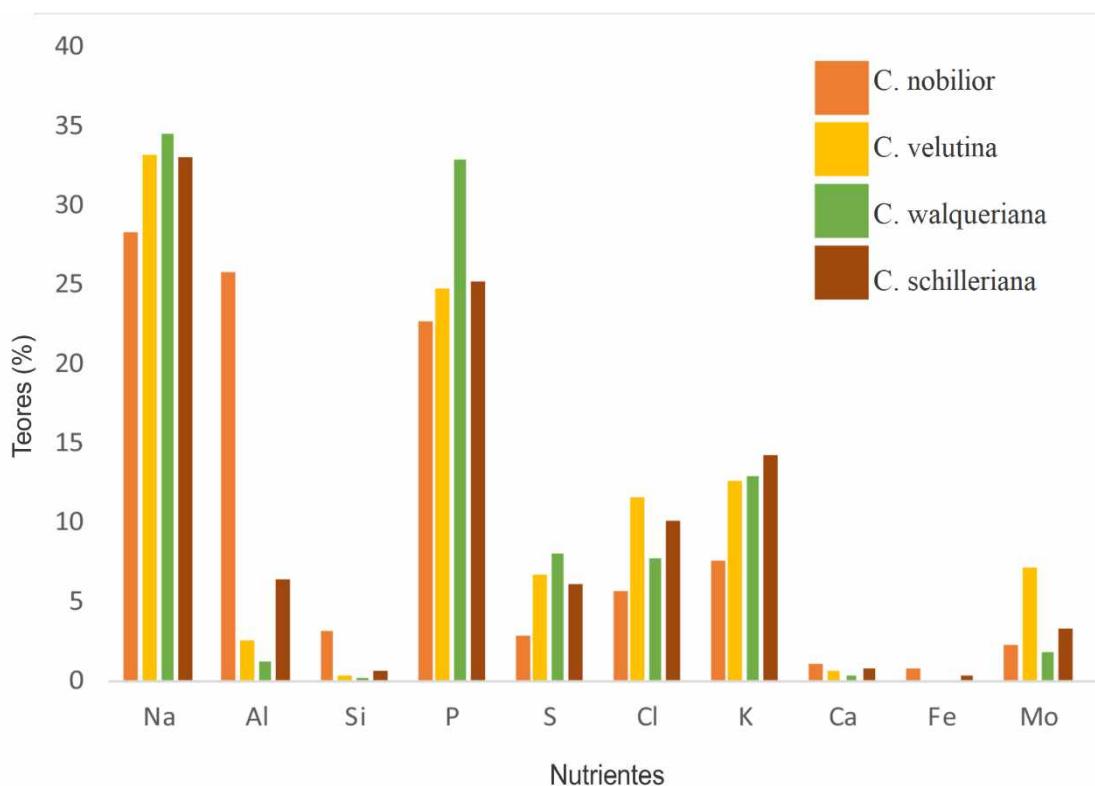


**Figura 7-** Fluorescência da lignina usando filtro DAPI. **A.** Resultados positivos nas células do velame e da exoderme da região próxima ao MAR das raízes de *C. schilleriana*. **B.** Corte longitudinal na região em desenvolvimento no início do amadurecimento da raiz de *C. nobilior*. **C.** Resultados positivos nas células do velame e da exoderme da região em desenvolvimento das raízes de *C. velutina*. **D.** Resultados positivos nas células do velame e da exoderme da região em desenvolvimento das raízes de *C. schilleriana*. **E.** Resultados positivos nas células do velame e da exoderme da região madura das raízes de *C. velutina*. **F.** Resultados positivos nas células do velame e da exoderme da região madura das raízes de *C. walqueriana*. **G.** Resultados positivos nas células do velame e da

exoderme da região madura das raízes de *C. nobilior*. **H.** Resultados positivos nas células do velame e da exoderme da região madura das raízes de *C. schilleriana*. (V – Velame, EX – exoderme).

#### *Nutrientes associados à parede celular*

Nas análises usando a espectrometria de energia dispersiva, foi constatada a presença de nutrientes de diferentes cargas associados à parede celular do velame nas quatro espécies estudadas. Os nutrientes com maior concentração nas quatro espécies foram sódio e fósforo (Fig. 8). Foram também significativos os teores de enxofre, cloro e potássio, com menores teores de molibdênio, cálcio, ferro e silício. Apesar dos baixos teores de alumínio em quase todas as espécies, em *C. nobilior* o teor deste nutriente foi bastante expressivo.



**Figura 8** – Teores de nutrientes presentes na parede celular do velame avaliados por espectrometria de energia dispersiva.

## Discussão

Considerando a estrutura das raízes estudadas, as quatro espécies de *Cattleya* apresentaram uma composição tecidual tipicamente descrita para outras espécies de orquídeas epífitas (Krauss 1948; Moreira & Isaias 2008; Moreira *et al.* 2013; Joca *et al.* 2017). Porém, foi observada uma alta variação de seu calibre, com *C. velutina* apresentando raízes mais calibrosas e as demais espécies com raízes mais finas. Entretanto, o calibre das raízes parece não estar relacionado com uma melhor eficiência na absorção de água e nutrientes, mas sim com sua estrutura interna. Plantas epífitas podem apresentar diferentes estratégias para garantir a efetividade na absorção destes recursos, com maior investimento em velame ou maior número de cordões de xilema alinhados com um grande número de células de passagem da endoderme e associados à espessamentos corticais que maximizam o fluxo apoplástico em direção ao cilindro vascular (Joca *et al.* 2017). O calibre das raízes não é indicativo do maior ou menor investimento em velame, mas sabe-se que quanto maior o investimento neste tecido, maior é a eficiência na absorção de água e nutrientes (Joca *et al.* 2017). Raízes delgadas como *C. nobilior* e *C. walkeriana* apresentaram cerca de 50% de sua área ocupada pelo velame, demonstrando a importância deste tecido para a absorção destes recursos.

O velame é um tecido que sofre morte celular programada (Pridgeon 1987), sendo considerado maduro quando todas as suas células estão mortas. Nas quatro espécies estudadas, a formação do velame inicia-se com a divisão das células protodérmicas ainda sob a coifa no ápice da raiz. Como observado para outras espécies de orquídeas, o meristema apical das espécies analisadas tem uma arquitetura do tipo fechado, onde as iniciais da coifa, do córtex e do cilindro vascular são separadas, porém as iniciais epidérmicas são associadas ao córtex e não ligada à coifa (Heimsch *et al.* 2008). Durante seu desenvolvimento, a parede celular do velame sofre transformações químicas e

estruturais até atingir uma estabilidade na raiz madura. Neste estudo, considerando o papel essencial da parede celular na absorção de água e nutrientes pelo velame, foram mostradas as diferentes etapas de sua formação. A parede celular confere resistência mecânica aos tecidos vegetais, e sua composição química interfere na permeabilidade e no armazenamento de água nas raízes, contribuindo para o fluxo apoplástico e simplástico (Albersheim *et al.* 1996; Albersheim *et al.* 2010; Joca *et al.* 2017).

Em todas as plantas, a formação da parede celular é baseada em nanocompostos de microfibrilas de celulose, incorporadas a diferentes polímeros matriciais (Gierlinger *et al.* 2013; Mateu *et al.* 2014), por isso foi observada a presença de celuloses, detectadas por microscopia Raman, tanto no ápice quanto na região madura de todas as raízes analisadas. As bandas para microfibrilas de celulose vão variar de acordo com a conformação molecular das fibras e alteração na orientação de cada molécula (Gierlinger *et al.* 2013), são rígidas e estão embutidas numa matriz rica em água e hemicelulose, pectinas e proteínas, para constituição da parede celular primária, que permite a expansão celular (Mateu *et al.* 2014). Bandas de pectina, também estão presentes em todas as espécies, tanto no ápice quanto na região madura. Porém, a variação do comprimento de onda dos picos diferencia o grau de metilação destas substâncias, sendo que na faixa de 840 até 880  $\text{cm}^{-1}$  (para banda de pectina) o número de ondas diminui à medida que aumenta a metilação das pectinas (Synytsya *et al.* 2003). A variação na qualidade das pectinas entre os tecidos detectada por espectroscopia Raman já foi anteriormente relatada, mostrando que a banda do marcador de pectina 856  $\text{cm}^{-1}$  pode apresentar maior intensidade na epiderme, diminuindo progressivamente ao longo do córtex, onde se torna restrita as junções celulares (Mateu *et al.* 2014).

De forma geral, as pectinas estão envolvidas em diversos processos fisiológicos e são de extrema importância para as plantas incluindo a formação de géis, aumento da

porosidade celular, aderência e flexibilidade (Jarvis 1984; Albersheim *et al.* 2010). O papel das HGAs tem sido altamente relacionado ao desenvolvimento celular, conferindo rigidez e propiciando a formação de géis (Wolf *et al.* 2009). As HGAs são produzidas no complexo de Golgi em uma condição altamente metil-esterificada (apresentando até 80% de metil-esterificação) (Wolf *et al.* 2009). Entretanto, em nosso estudo não foram encontradas HGAs próximo ao MAR das quatro espécies de *Cattleya*, sugerindo que outros domínios de pectinas devem ser procurados nesta região e são inicialmente depositadas. As HGAs aparecem com o amadurecimento do velame, e sua forma altamente metil-esterificada foi observada para todas as espécies analisadas tanto nos tecidos jovens quanto na região madura.

Em alguns casos, a perda do conteúdo de HGAs pela parede celular leva à perda de adesão celular, aumentando a flexibilidade das pectinas em geral (Ralet *et al.* 2008). Desta forma, sua manutenção nas células do velame, independente do grau de metil-esterificação, confirma seu importante papel na rigidez celular deste tecido. A perda do grau de metil-esterificação deixando resíduos de ácido galacturônico não metil-esterificados podem levar à ligação com  $\text{Ca}^{2+}$  e formação de géis que conferem ainda maior rigidez à parede (Wolf *et al.* 2009). Além de modificações biofísicas na parede celular, mudanças no grau de metil-esterificação podem levar à formação de oligogalacturonideos pécticos (pequenos produtos da quebra das HGAs). Estas moléculas agem como sinalizadoras análogas a hormônios que neutralizam a ação das auxinas, regulando o desenvolvimento celular (Ridley *et al.* 2001). Neste contexto, a regulação da atividade enzimática para alterações no grau de metil-esterificação das HGAs teria papel fundamental no controle do crescimento celular (Wolf *et al.* 2009). No velame, há cerca de 1 cm do ápice, quando as células começam a morrer, foram observadas leves marcações com o anticorpo JIM5 (para epítopos de HGAs com até 40% de metil-

esterificação), o que seria então, um indicativo do papel das HGAs como sinalizadoras das etapas finais do amadurecimento de suas células.

Na região madura ocorre a manutenção das HGAs de alta metil-esterificação e sua predominância sobre as HGAs de baixa metil-esterificação. As HGAs nesta região ocorrem concomitantemente com a presença de lignificação, marcando a formação da parede celular secundaria, de fundamental importância para a resistência mecânica e no fluxo de água. Os espectros Raman derivado da parede celular secundária são mais espessos e densos, com maior intensidade nas bandas para celulose e lignina que as tornam mais estáveis e resistentes (Gierlinger *et al.* 2013; Mateu *et al.* 2014). A grande quantidade de espessamentos parietais, formando uma superfície sólida com vários poros, facilita o transporte de água e nutrientes pelas células do velame, uma vez que o transporte ocorre por fluxo de massa e de forma passiva, permitindo que a raiz mobilize reservas de água e sais minerais (Benzing *et al.* 1982; Pita & Menezes 2002).

Análises de espectroscopia Raman demostraram a presença de lignina no ápice de raiz de *C. nobilior*, *C. schilleriana* e *C. walkeri*. Estudos anteriores em caules (Heredia-Guerrero *et al.* 2014; Mateu *et al.* 2014) demonstraram que os picos similares aos de lignina podem ser detectados pela metodologia Raman devido a presença de ácidos graxos, como  $\omega$ -hidroxi, glicerol e altos níveis de ácidos  $\alpha,\omega$ -dicarboxílicos, além de ácidos hidroxicinâmicos (predominantemente ferulatos) e álcoois graxos (Pollard *et al.* 2008). Assim, esta análise espectral esclarece que os picos nas bandas de lignina da parede nas células do velame próximo ao MAR provavelmente não são derivados de bandas de lignina, mas decorrentes da faixa de 1600 a 1650 cm<sup>-1</sup> atribuída a ácidos graxos insaturados (Heredia-Guerrero *et al.* 2014; Mateu *et al.* 2014). Por outro lado, grande quantidade de ácidos graxos (como ácidos graxos  $\omega$ -hidroxi e c) são encontrados na

composição de suberina (Vishwanath *et al.* 2014), indicando a rota biossintética deste composto em regiões próximo ao MAR das raízes de orquídeas epífitas analisadas.

De fato, compostos lipídicos foram observados inicialmente nas células da exoderme e depositados gradativamente ao longo de todo o velame de forma centrífuga. A suberina depositada ao redor da parede celular é altamente hidrofóbica, impedindo o fluxo livre de água, íons e patógenos pelo apoplasto (Schreiber 2010; Mateu *et al.* 2014). Tal função é evidente na exoderme, onde a água e os nutrientes entram nas raízes guiadas pela suberina (e posteriormente a lignina) para o simplasto das células de passagem (Joca *et al.* 2017). Por outro lado, no velame propriamente dito, as células encontram-se mortas, sem simplasto, e nestas células uma parede celular rígida, com espessamentos e grandes poros e altamente hidrofóbica promoveria uma superfície de contato altamente propícia ao fluxo apoplástico da água e nutrientes direcionada ao córtex radicular. Forte coloração para lipídeos também foi observada no endovelame de *C. velutina*, *C. walqueriana* e *C. nobilior*. Porém, em *C. schilleriana*, as marcações foram fracas, provavelmente devido a um desenvolvimento rápido da parede celular com acelerada deposição de lignina.

A composição da parede celular do velame maduro, conservando uma matriz péctica composta de grupos carboxílicos (COO-) com carga naturalmente negativa, permite que a parede celular neste tecido aja como moderadora de troca catiônica (Zotz & Winkler 2013; Joca *et al.* 2017). A partir das análises por EDS foi observado que a maior quantidade dos nutrientes associados à parede celular apresenta carga positiva, como sódio, alumínio, fosforo, silício, enxofre, cálcio, ferro e molibdênio. De acordo com Blamey *et al.* 1990, substâncias pécticas selecionam íons por atração eletrostática e são capazes, portanto, de reter cátions como alumínio solúvel. Desta forma, espécies com alta capacidade de troca catiônica são mais sensíveis ao alumínio, enquanto espécies tolerantes teriam menor capacidade de retenção deste nutriente na parede celular (Foy *et*

al. 1967). Os nutrientes encontrados em maior quantidade (sódio, fósforo e potássio) são provavelmente consequência da adubação por NPK usada na casa de vegetação e também devido ao fixador usado que é a base de tampão fosfato, uma vez que todas as espécies estudadas foram mantidas em ambiente controlado e adubadas periodicamente. Sugere-se, então, que estudos conduzidos em ambiente natural mostrarão uma maior variedade de nutrientes associados à parede celular.

No ápice radicular de orquídeas epífitas, é possível observar uma ponta verde ainda em desenvolvimento que assume coloração branca com o amadurecimento do velame e seu preenchimento por ar. Bem próximo ao MAR, o leve arroxeamento é derivado da presença de antocianinas no vacúolo das células corticais, e a coloração verde na região subsequente se dá pela diferenciação de cloroplastos nesta região. Na região ainda verde, a composição química da parede celular mostra que as células do velame inicialmente tem sua composição básica por celulose, hemicelulose e pectinas. O desenvolvimento da parede primária leva à deposição de pectinas como HGAs altamente metil-esterificadas, que com o amadurecimento da raiz podem sofrer de-metil-esterificação. A deposição de suberina marca um estágio de transição para início da formação da parede secundária, direcionando água e nutrientes para as células de passagem da exoderme. Antes do amadurecimento, células mortas e vivas encontram-se intercaladas, e as células vivas, ainda com protoplasto, dão um aspecto translúcido ao velame permitindo visualizar o córtex parenquimático (clorofílico). Nesta fase, os espessamentos de parede já são visíveis e ocorre deposição de lignina que atua conferindo rigidez ao tecido e favorecendo a absorção de água e nutrientes. A manutenção da matriz pectíca nas células do velame e a presença de vários nutrientes, principalmente os de carga positiva, mostra importante papel deste tecido também na absorção de nutrientes. Comparando-se as quatro espécies de *Cattleya*, foi possível observar que quanto mais

rápido ocorre o processo de diferenciação das células do velame, que incluem fortemente alterações da parede celular, menos espesso o velame se apresenta.

## Referências

- Albersheim P, Darvill AG, O'Neill MA, Schols HA, Voragen AGJ. 1996. An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. In: J. Visser and A.G.J. Voragen (Eds) Pectins and Pectinases, Elsevier Science. 14: 47-55. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(96\)80245-0](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(96)80245-0)
- Albersheim P, Darvill A, Roberts K, Sederoff R, Staehelin A. 2010. Plant cell walls: from chemistry to biology. New York: Garland Science. p. 18-19. DOI: <https://doi.org/10.1086/662480>.
- Benzing DH, Friedman WE, Peterson G, Renfrow A. 1982. Shootlessness, velamentous roots and the preeminence of Orchidaceae in the epiphytic biotype. American Journal of Botany. 70: 121-133. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1983.tb12440.x>.
- Blake AW, McCartney L, Flint JE. 2006. Understanding the biological rationale for the diversity of cellulose-directed carbohydrate-binding modules in prokaryotic enzymes. Journal of Biological Chemistry. 281: 29321-29329. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.m605903200>.
- Blamey FPC, Edmeades DC, Wheeler DM. 1990. Role of cation exchange capacity in differential aluminum tolerance of *lotus* species. Journal of Plant Nutrition. 13: 729-744. DOI: <https://doi.org/10.1080/01904169009364112>.
- Bukatsch F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung: Astrablau-Safranin. Mikrokosmos. 61: 255. DOI: <https://doi.org/10.1002/food.19720160109>.

- Burton RA, Gidley MJ, Geoffrey BF. 2010. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nature Chemical Biology.* 10: 724-732. DOI: <https://doi.org/10.1038/nchembio.439>
- Caffall KH, Mohnen D. 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr Research.* 28: 1879-900. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.05.021>.
- Campbell MM, Sederoff RR. 1996. Variations in lignin content and composition. Mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. *Plant Physiology.* 110: 3-13. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.110.1.3>.
- Canteria MHG, Renardb CMGC, Bourvilleb CL, Bureau S. 2019. ATR-FTIR spectroscopy to determine cell wall composition: application on a large diversity of fruits and vegetables. *Carbohydrate Polymers.* 212: 186-196. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.021>.
- Chomicki G, Bidel LPR, Jay-Allemand C. 2014. Exodermis structure controls fungal invasion in the leafless epiphytic orchid *Dendrophylax lindenii* (Lindl.) Benth. ex Rolfe. *Flora.* 209: 88-94. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.flora.2014.01.001>.
- Cosgrove DJ, Jarvis MC. 2012. Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. *Frontiers in Plant Science.* 3: 204. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00204>.
- Dedavid BA, Gomes CI, Machado G. 2007. Microscopia eletrônica de varredura aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: Edipucrs.
- Engard CJ. 1944. Morphological identity of the velamen and exodermis in orchids. *Botanical Gazette.* 105: 457-462. DOI: <https://doi.org/10.1086/335255>.

- Enstone DE Peterson CA. 2005. Suberin lamella development in maize seedling roots grown in aerated and stagnant conditions. *Plant Cell & Environment*. 28:444-455. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01286.x>.
- Fahey LM, Nieuwoudt MK, Harris PJ. 2017. Predicting the cell-wall compositions of *Pinus radiata* (radiata pine) wood using ATR and transmission FTIR spectroscopies. *Cellulose*, 24: 5275-5293. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1506-4>.
- Franke R, Schreiber L. 2007. Suberin - a biopolyester forming apoplastic plant interfaces. *Current Opinion in Plant Biology*. 10: 252-259. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.004>.
- Foy CD, Fleming AL, Burns GR, Armiger WH. 1967. Characterization of differential aluminum tolerance among varieties of wheat and barley. *Soil Science Society of America Journal*. 31: 513-521. DOI: <https://doi.org/10.2136/sssaj1967.03615995003100040027x>.
- Gierlinger N, Schwanninger M. 2007. The potential of Raman microscopy and Raman imaging in plant research. *Spectroscopy*. 21: 69-89. DOI: <https://doi.org/10.1155/2007/498206>.
- Gierlinger N, Keplinger T, Harrington M, Schwanninger M. 2013. Cellulose – biomass conversion. In: *Raman Imaging of Lignocellulosic Feedstock*. (Eds.) Intech open Science/open minds. p. 159-192. DOI: <https://doi.org/10.5772/50878>.
- Heimsch C, James L, Seago JR. 2008. Organization of the root apical meristem in Angiosperms. *American Journal of Botany*. 95: 1-21. DOI: <https://doi.org/10.3732/ajb.95.1.1>.
- Heredia-Guerrero JA, Benítez JJ, Domínguez E, et al. 2014. Infrared and Raman spectroscopic features of plant cuticles: a review. *Frontiers in Plant Science*. 5: 305-310. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00305>

- Hervé C, Marcus SE, Knox JP. 2011. Monoclonal antibodies, carbohydrate binding modules, and the detection of polysaccharides in plant cell walls. *Methods in Molecular Biology.* 715: 103-113. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-008-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-008-9_7).
- Hose E, Clarkson DT, Steudle E, Schreiber L, Hartung W. 2001. The exodermis: a variable apoplastic barrier. *Journal of Experimental Botany.* 52: 2245-2264. DOI: <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.365.2245>.
- Jarvis MC. 1984. Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *Plant Cell and Environment.* 7: 153-164. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1984.tb01662.x>.
- Joca TAC, de Oliveira DCO, Zott G, Winkler U, Moreira ASFP. 2017. The velamen of epiphytic orchids: variation in structure and correlations with nutrient absorption. *Flora.* 230: 66-74. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.flora.2017.03.009>.
- Johansen DA. 1940. *Plant Microtechnique.* McGraw Hill Book Co, New York.
- Kang X, Kirui A, Widanage MCD, Mentink-Vigier F, Cosgrove DJ, Wang T. 2019. Lignin-polysaccharide interactions in plant secondary cell walls revealed by solid-state NMR. *Nature communications.* 10:347. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08252-0>.
- Knox P. 2014. Plant cell walls. [https://www.plants.leeds.ac.uk/people/groups\\_kno.php.01/01/2018](https://www.plants.leeds.ac.uk/people/groups_kno.php.01/01/2018).
- Kraus JE, Arduin M. 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, EDUR.
- Kraus JE, Louro RP, Estelita MEM, Arduin M, Braga MR. 2012. A célula vegetal. In: Appezato-da-Glória B, Carmello-Guerreiro SM. (eds). *Anatomia vegetal.* Viçosa – MG, Universidade federal de viçosa. p. 32-36.

- Krauss BH. 1948. Anatomy of the vegetative organs of the pineapple *Ananas comosus* (L) Merr. I. Introduction, organography, the stem, and the lateral branch or axillary buds. *Botanical Gazette* 110: 159-217. DOI: <https://doi.org/10.1086/335529>.
- Krauss BH. 1949. Anatomy of the vegetative organs of the pineapple *Ananas comosus* (L) Merr. II. The root and the cork. *Botanical Gazette*. 110: 555-587. DOI: <https://doi.org/10.1086/335557>.
- Leroux O, Eder M, Saxe F, et al. 2018. Comparative *in situ* analysis reveals the dynamic nature of sclerenchyma cell walls of the fern *Asplenium rutifolium*. *Annals of botany*. 00: 1-14. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcx167>.
- Liu Q, Talbot M, Llevellyn DJ. 2013. Pectin methylesterase and pectin remodeling differ in fiber walls of two *Gossypium* species with very different fibre properties. *Plos One*. 8: 165-131. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065131>.
- Lorenzo G, Ferrari S, Giovannoni M, Mattei B, Cervone F. 2019. Cell wall traits that influence plant development, immunity, and bioconversion. *The Plant Journal*. 97: 134–147. DOI: <https://doi.org/10.1111/tpj.14196>.
- Ma F, Peterson CA. 2003. Current insights into the development, structure and chemistry of the endodermis and exodermis of roots. *Canadian Journal of Botany*. 81: 405-421. DOI: <https://doi.org/10.1139/b03-042>.
- Macedo AM. 2013. Efeito da luminosidade em *Dendrobium*. UNINGÁ Review. 14: 85-98.
- Mateu BP, Tefke B, Hauser MT, Gierlinger N. 2014. Elucidating structural and compositional changes in plant tissues and single cells by Raman spectroscopic imaging. *Research Gate*. 26: 11-14.
- Monties B. 1989. Lignins. In: Harborne, J.B. *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. II. London: Academic Press. DOI: <https://doi.org/10.1002/pca.2800020110>.

- Moreira ASFP, Isaias RMS. 2008. Comparative anatomy of the absorption roots of terrestrial and epiphytic orchids. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 51: 83-93. DOI: <https://doi.org/10.1590/s1516-89132008000100011>.
- Moreira ASFP, Filho JPL, Isaias RMS. 2013. Structural adaptations of two sympatric epiphytic orchids (Orchidaceae) to a cloudy forest environment in rocky outcrops of Southeast Brazil. *Revista de Biologia Tropical*. 61: 1053-1065. DOI: <https://doi.org/10.15517/rbt.v61i3.11780>.
- North GB, Nobel PS. 1994 Changes in root hydraulic conductivity for two tropical epiphytic cacti as soil moisture varies. *American Journal of Botany*. 81: 46-53. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1994.tb15407.x>.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*. 59: 368-373. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf01248568>.
- Paula CC, Silva HMP. 2004. *Cultivo prático de orquídeas*. 3a ed. Viçosa, UFV.
- Pita PB, Menezes NL. 2002. Anatomia da raiz de espécies de *Dyckia Schult. f. e Encholirium Mart. ex Schult. & Schult. f.* (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) da Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil), com especial referência ao velame. *Revista Brasileira de Botânica*. 25: 25-34. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0100-84042002000100005>.
- Pridgeon AM, Stern WL, Benzing HD. 1983. Tilosomes in roots of Orchidaceae: morphology and systematic occurrence. *American Journal of Botany*. 70: 1365-1377. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1983.tb07926.x>.
- Pridgeon AM. 1987. The velamen and exodermis of orchid roots. In: Arditti J. *Orchid biology: reviews and perspectives IV*. Ithaca, Cornell University Press, p. 139-192.

- Pollard M, Beisson FLY, Ohlrogge JB. 2008. Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in Plant Science.* 13: 236-246.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.03.003>.
- Porembski S, Barthlott W. 1988. Velamen radicum micromorphology and classification of Orchidaceae. *Nordic Journal of Botany.* 8: 117-137.  
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1988.tb00491.x>.
- Proença SL, Sajo MG. 2008. Rhizome and root anatomy of 14 species of Bromeliaceae. *Rodrigu sia.* 59: 113-128. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-7860200859106>.
- Popper ZA, Fry SC. 2008. Xyloglucan– pectin linkages are formed intraprotoplasmically, contribute to wall-assembly, and remain stable in the cell wall. *Planta.* 227: 781-794. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0656-2>.
- Ralet MC, Cr peau MJ, Lefèvre J, Mouille G, Hofte H, Thibault JF. 2008. Reduce number of homogalacturonan domains in pectins of an *Anabidopsis* mutant enhances the flexibility of the polymer. *Biomacromolecules.* 9: 1454-1469. DOI: <https://doi.org/10.1021/bm701321g>.
- Ridley B, O’neil MA, Mohnen D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry.* 57: 929-967. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(01\)00113-3](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(01)00113-3).
- Sanford WW, Adanlawo FLS. 1973. Velamen and exodermis characters of West African epiphytic orchids in relation to taxonomic grouping and habitat tolerance. *Botanical Journal of the Linnean Society.* 66: 307-321. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1973.tb02178.x>.
- Schreiber L. 2010. Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. *Trends in Plant Science.* 15: 546-553. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.004>.

- Silva CI, Milaneze-Gutierrez MA. 2004. Caracterização morfo-anatômica dos órgãos vegetativos de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). *Acta Scientiarum*. 26: 91-100. DOI: <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v26i1.1664>.
- Sass JE. 1951. *Botanical Microtechnique*. 2 Ed. Iowa State College Press, Ames. DOI: <https://doi.org/10.5962/bhl.title.5706>.
- Synytsya A, Copikova J, Matejka P, Machovic V. 2003. Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. *Carbohydrate Polymers*. 54: 97-106. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0144-8617\(03\)00158-9](https://doi.org/10.1016/s0144-8617(03)00158-9).
- Vishwanath JS, Delude C, Domergue F, Rowland O. 2014. Suberin: biosynthesis, regulation, and polymer assembly of a protective extracellular barrier. *Plant Cell Reports*. 34: 573-586. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1727-z>.
- Vítek P, Klem K, Urban O. 2017. Application of Raman spectroscopy to analyse lignin/cellulose ratio in Norway spruce tree rings. *Beskydy*. 10: 41-48. DOI: <https://doi.org/10.11118/beskyd201710010041>.
- Willats WGT, Limberg G, Buchholt HC, et al. 2000. Analysis of pectic epitopes recognized by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. *Carbohydrate Research*. 327: 309–320. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(00\)00039-2](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(00)00039-2).
- Willats WGT, McCartney L, Mackie W, Knox JP. 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*. 47: 9-27. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-94-010-0668-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-010-0668-2_2).
- Wolf S, Mouille G, Polloux J. 2009. Homogalacturonan methyl - esterification and plant development. Molecular Plant. 2: 851-860. DOI: <https://doi.org/10.1093/mp/ssp066>.

Zeier J, Schreiber L. 1997. Chemical composition of hypodermal and endodermal cell walls and xylem vessels isolated from *Clivia miniata* (identification of the biopolymers lignin and suberin). *Plant Physiology.* 113:1223-1231.

DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.113.4.1223>.

Zimmermann HM, Hartmann K, Schreiber L, Steudle E. 2000. Chemical composition of apoplastic transport barriers in relation to radial hydraulic conductivity of corn roots (*Zeamays L.*). *Planta.* 210: 302-311. DOI: <https://doi.org/10.1007/pl00008138>.

Zotz G, Winkler U. 2013. Aerial roots of epiphytic orchids: the velamen radicum and its role in water and nutrient uptake. *Oecologia.* 171: 733-741.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s00442-012-2575-6>.