

Histoquímica da Parede Celular dos Filídios de *Frullania brasiliensis* Raddi (Marchantiophyta)

Evelise Bach¹ e Rinaldo Pires dos Santos²

Introdução

Os gametófitos do gênero *Frullania* Raddi são plantas folhosas, medianas a robustas, geralmente marrom avermelhadas ou bem escuras, prostradas ou em tufo, com caulídeo ramificado, onde se inserem duas fileiras laterais de filídios e uma fileira ventral de filídios modificados, os anfigastros. A sobreposição dos filídios laterais é do tipo íncuba. Algumas plantas do gênero podem ser consideradas xerófitas entre as hepáticas, por sua grande resistência à dessecação e a sua capacidade de se desenvolver em ambientes quentes e secos, sem abrigo contra o sol ou vento [1].

Em *Frullania brasiliensis* Raddi, percebe-se mudanças na cor dos filídios jovens e adultos. Os filídios imaturos, jovens, têm coloração esverdeada, enquanto os filídios maduros apresentam coloração marrom avermelhada quando expostos constantemente à luz solar. Contudo, porções dos filídios maduros encobertos pelos filídios adjacentes também podem apresentar coloração esverdeada assim como nos filídios jovens, sugerindo o sombreamento como sua causa, além de indicar a luz solar como sendo um possível fator de influência nas variações de coloração dos filídios.

A parede celular primária é conhecida por ter muitas funções biológicas essenciais, como coesão de tecido, defesa (contra microorganismos), troca iônica, produção de oligossacarídeos e regulação da expansão celular [2, 3, 4, 5 e 6 apud 7]. As briófitas, primeiras plantas a colonizarem o ambiente terrestre [8], provavelmente muito dependem da constituição de sua parede celular para enfrentar as pressões ambientais sofridas com esta mudança de habitat. Porém, há poucos estudos sobre a composição da parede celular de embriófitas avasculares.

O objetivo deste trabalho é caracterizar, estrutural e quimicamente, a parede celular dos filídios de *Frullania brasiliensis*, na tentativa de explicar suas variações de coloração.

Material e métodos

Gametófitos de *Frullania brasiliensis* (Fig. 1) foram coletados sobre os troncos de *Araucaria angustifolia* localizadas na Floresta Nacional (FLONA), no município de São Francisco de Paula, Estado do Rio Grande do Sul. Em laboratório, sob microscópio estereoscópico, foram selecionados e removidos filídios imaturos, próximos aos

ápices dos ramos, esverdeados, e filídios maduros, distantes dos ápices, amarronzados. Os filídios foram fixados em uma solução de glutaraldeído 2,5% e formaldeído 2,0% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 [9].

Para a confecção de seções semifinas, o material foi desidratado em série etílica (30, 50, 70, 90, 100, 100%; 15 minutos cada) e incluído em resina acrílica a base de hidroxietilmetacrilado. Seções de 1 ou 2 µm de espessura foram obtidas em micrótomo Zeiss HM 340 E e coradas com azul de toluidina O (C.I. 52040) [10].

Adicionalmente, foram utilizados os seguintes corantes/testes histoquímicos: para componentes lipídicos utilizou-se o azul do Nilo (C.I. 51180) [11] e o sudan black B (C.I. 26150) [12]; para polissacarídeos de parede utilizou-se o alcian blue 8GX (C.I. 74240) [13]; para testar os grupos ionizados utilizou-se fucsina básica (C.I. 42500) [14]; para lignina e compostos fenólicos foram utilizados o azul de toluidina O, cloreto de ferro III [15] e o floroglucinol [15]; e para proteínas da parede celular o coomassie blue brilhante R-250 (C.I. 42660) [16]. O Color Index (C.I.) foi baseado em Lillie [17].

Todo o material foi observado em microscópio óptico Leica DM2, equipado com microscopia de campo claro.

Resultados e Discussão

Sob o microscópio óptico, a parede celular primária dos filídios imaturos apresenta-se delgada, exceto “nos ângulos”, onde é espessada e, no contato de três células adjacentes, constitui a estrutura conhecida como “trigônio” (Fig. 3), já descritas e característica desse gênero [1]. Nos filídios maduros, mais velhos, além de apresentarem características similares da parede celular, observou-se a deposição de materiais que, ao microscópio óptico, dão à parede celular uma coloração amarronzada (Figs. 2 e 4). Característica similar aos filídios imaturos, na parede celular, é encontrada nas células dos filídios encobertas pela superfície de outro filídio (Fig. 2, estrela).

Os testes histoquímicos (Tabela 1), realizados com a parede celular de ambos os filídios, não mostraram nenhuma especificidade significativa. Os resultados dos testes para lipídios e polissacarídeos da parede celular foram positivos em ambos os filídios, havendo uma reação mais intensa nos depósitos na parede celular dos

¹ Bolsista de Iniciação Científica (BIC) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43433, sala 207, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970. E-mail: evelisebach@hotmail.com

² Professor Adjunto do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43433, sala 207, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970. E-mail: rinaldo.santos@ufrgs.br

Apoio financeiro: PROPESQ - UFRGS.

filídios maduros, amarronzados. O mesmo ocorreu na coloração com o azul de toluidina O e com a fucsina básica, apresentando reação mais intensa nos filídios maduros.

Com a coloração realizada com o azul de toluidina O, pode-se inferir a presença de compostos fenólicos na parede celular (Fig. 6). Porém, o teste para compostos fenólicos foi negativo. Compostos fenólicos são conhecidos pela função de suporte mecânico, atrativo de polinizadores ou dispersores de frutos, proteção contra a radiação ultravioleta e efeito alopatóico, sendo que a luz solar é um dos indutores de sua síntese [18]. Estes metabólitos secundários possuem uma grande variedade química. Portanto, mais testes histoquímicos, com reagentes de menor espectro, se fazem necessários para esclarecer a natureza química desta pigmentação.

Os testes para lignina e proteínas também foram negativos.

Von Konrat e Braggins [19] descreveram a existência de uma pigmentação amarronzada na parede e lume celular de células de *Frullania hattorii*, sem fazer uma análise estrutural ou funcional dela. Observou-se a presença desta pigmentação amarronzada (Figs. 2 e 4), que parece condizer com as observações feitas por Von Konrat. Porém, pode-se verificar, em detalhe, que esta pigmentação mostra-se como uma impregnação na parede celular (Fig. 5). Além disso, os testes histoquímicos não mostraram nenhum tipo de pigmentação no lume celular.

Pode-se verificar, também, um gradiente de pigmentos de dentro pra fora da parede celular (Fig. 5), sugerindo que esta substância foi produzida em ciclos de atividade de síntese de componentes que impregnaram a parede celular, talvez como resposta a um estímulo, que deve ser a luz solar.

Agradecimentos

Aos colegas e amigos do laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pelo apoio e auxílio em muitas etapas do desenvolvimento desta pesquisa. À Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPESQ) da UFRGS, pela bolsa concedida.

Referências

- [1] MICHEL, Eunice de Lemos. 2001. *Hepáticas Epifíticas sobre o Pinheiro-Brasileiro no Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS.
- [2] GOLDBERG, R.; PRAT, R. & MORVAN, C. 1994. Structural features of water-soluble pectins from mung bean hypocotyls. *Carbohydrate Polymers*, 23: 203–210.
- [3] BRETT, C.T. & WALDRON, K.W. 1996. *Physiology and biochemistry of plant cell walls*. London: Chapman and Hall.
- [4] CASSAB, G.I. 1998. Plant cell wall proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 281–309.
- [5] DUMVILLE, J.C. & FRY S.C. 1999. Uronic acid-containing oligosaccharins: their biosynthesis, degradation and signalling roles in non-diseased plant tissues. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 125–140.
- [6] FRY, S.C. 1999. Plant cell walls. In: *Encyclopedia of life sciences*. London: Nature Publishing Group.
- [7] POPPER, Zoe A. & FRY, Stephen C. 2003. Primary cell wall composition of Bryophytes and Charophytes. *Annals of Botany*, 91: 1–12. www.aob.oupjournals.org
- [8] RENZAGLIA, K.S., DUFF, R.J., NICKRENT, D.L. & GARBARY, D.J. 2000. *Vegetative and reproductive innovations of early land plants: implications for a unified phylogeny*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 355: 769–793.
- [9] ROLAND, J. C. & VIAN, B. 1991. *General Preparation and Staining of Thin Sections*. In: Hall, J.L. & Hawes, C. (eds.) *Electron Microscopy of Plant Cells*. London, Academic Press, p.1-66.
- [10] O' BRIEN, T. P.; FEDER, N. & MCCULLY, M. E. 1965. *Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O*. *Protoplasma* vol. 59, n°2, p.368-373.
- [11] CAIN, A.J. 1947. *The use of Nile Blue in the examination of lipids*. *QJ Microsc Sci*, 88:383–392.
- [12] JENSEN, W.A. 1962. *Botanical Histochemistry- Principles and Practice*. San Francisco, W. H. Freeman and Company. p.408.
- [13] LILLIE, R.D. 1965. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*. 3rd edition, McGraw-Hill Book Company.
- [14] O' BRIEN, T. P. & MCCULLY, M. E. 1981. *The study of structure principles and selected methods*. Melbourne, Termarcaphi Pty. LTD, p.280.
- [15] JOHANSEN, D. A. 1940. *Plant microtechnique*. New York, McGraw-Hill Book Co. Inc., p.523.
- [16] SOUTHWORTH, D. S. 1973. *Cytochemical Reactivity of Pollen Walls*. *J. Histochem Cytochem*, 21: 73-80.
- [17] LILLIE R. D. 1991. *H.J. CONN'S Biological Stains*, 9th Edition, Sigma Chemical Company.
- [18] TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2004. *Fisiologia Vegetal*. 3ª ed. Artmed. Porto Alegre.
- [19] VON KONRAT, M. J. & BRAGGINS, J. E. 2003. A new and unusual species of *Frullania* (Jubulaceae) from Tasmania, Australia. *New Zealand Journal of Botany*, 41: 55-62.

Tabela 1. Testes histoquímicos da parede celular dos filídios de *Frullania brasiliensis* imaturos e maduros com vários tipos de corantes. Utilizamos “+” para reação positiva, “-” para reação negativa e “*” para uma reação mais intensa no depósito na parede dos filídios de sol.

Técnica Histoquímica	Especificidade	Filídios imaturos	Filídios maduros
azul do Nilo	Grupos lipídicos; gordura/ óleos: vermelho; ácidos graxos livres e fosfolipídios: azul	+ azul	+ azul*
sudan black B	Lipídios, cutina e suberina: preto	+ marrom	+ marrom*
alcian blue 8GX	Muco polissacarídeos: azul	+ azul	+ azul
fucsina básica	Ânions: magenta	+ magenta	+ magenta*
azul de toluidina O	Metacromático; Ácidos poliônicos: azul; ácidos péciticos: púrpura; grupos fenólicos: verde	+ púrpura	+ azul esverdeado
cloreto de ferro III	Compostos fenólicos gerais: verde intenso ou negro	-	-
floroglucinol	Lignina: vermelho	-	-
coomassie blue brilhante R-250	Proteínas: azul	-	-

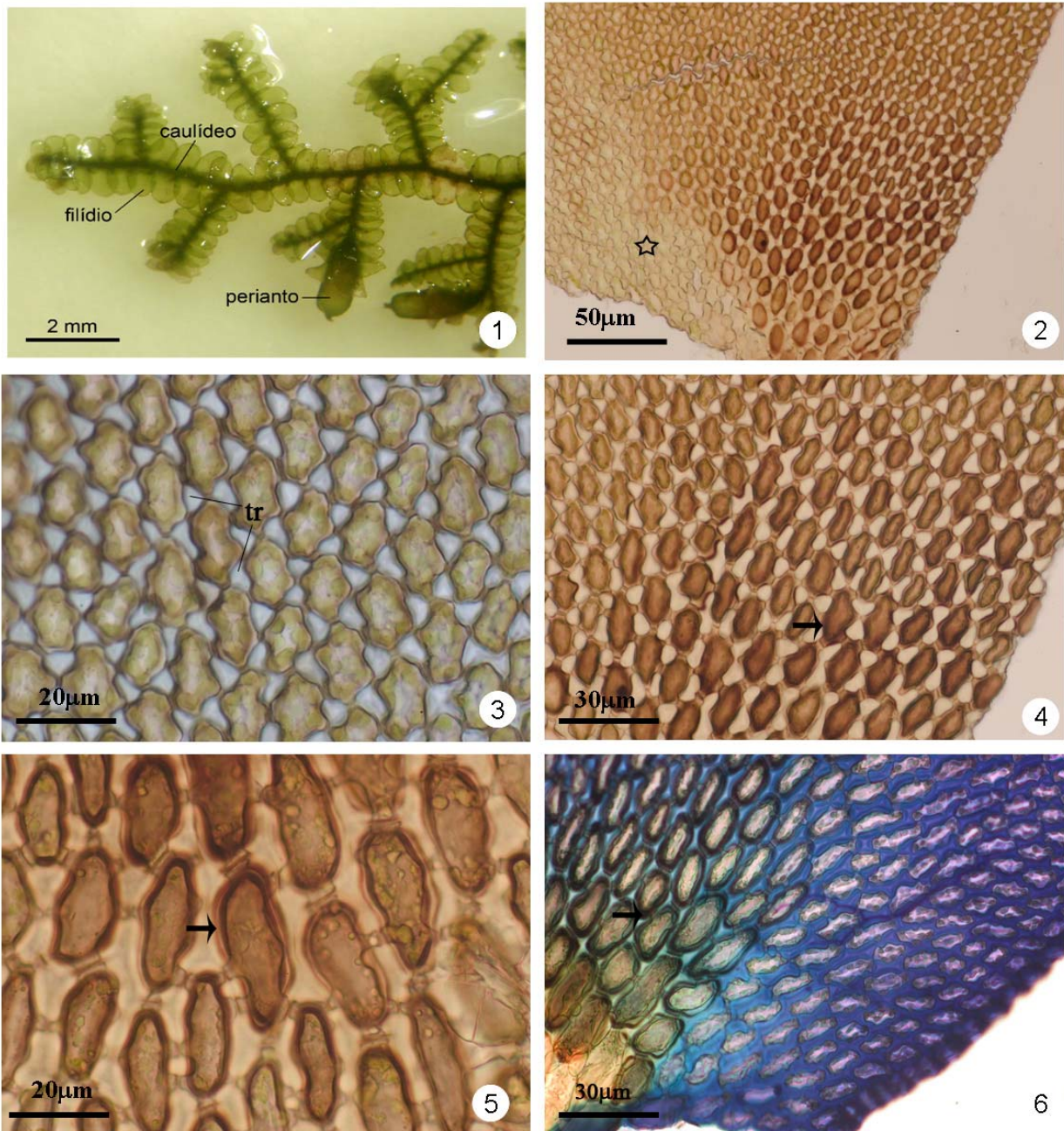


Figura 1. Gametófito feminino de *Frullania brasiliensis*. **Figuras 2-6.** Microscopia Óptica. **Figura 2.** Porção do filídio mostrando células encobertas pelo filídio anterior e células maduras. **Figura 3.** Células do filídio imaturo. **Figuras 4 e 5.** Células do filídio maduro mostrando impregnação da parede celular (setas). **Figura 6.** Células do filídio maduro coradas com azul de toluidina O mostrando, num tom esverdeado, o depósito na parede celular (seta). tr, trigônios.