

NATÁLIA PAGANOTTI ANTONUCCI

ESTUDOS ANATÔMICOS,
ULTRA-ESTRUTURAIS
E
BIOQUÍMICOS DA SÍNDROME
KRANZ EM FOLHAS DE
DUAS ESPÉCIES DE *GOMPHRENA* L.
(AMARANTHACEAE).

SÃO PAULO - 2010

NATÁLIA PAGANOTTI ANTONUCCI

ESTUDOS ANATÔMICOS, ULTRA-ESTRUTURAIS E BIOQUÍMICOS DA
SÍNDROME KRANZ EM FOLHAS DE DUAS ESPÉCIES DE *GOMPHRENA* L.
(AMARANTHACEAE).

SÃO PAULO
2010

NATÁLIA PAGANOTTI ANTONUCCI

ESTUDOS ANATÔMICOS, ULTRA-ESTRUTURAIS E BIOQUÍMICOS DA
SÍNDROME KRANZ EM FOLHAS DE DUAS ESPÉCIES DE *GOMPHRENA* L.
(AMARANTHACEAE).

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo para a obtenção de Título
de Mestre em Ciências na área de Botânica.

Orientadora: Gladys Flávia Albuquerque Melo de Pinna

Colaborador: Carlos Alberto Labate

SÃO PAULO
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Antonucci, Natália Paganotti

Estudos anatômicos, ultra-estruturais e bioquímicos da síndrome Kranz em folhas de duas espécies de *Gomphrena* L. (Amaranthaceae).

87 páginas

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. Anatomia Kranz 2. Bainha do feixe 3. Cloroplasto 4. Endoderme 5. Fotossíntese C₄.

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora

Prof.(a). Dr.(a).

Prof.(a). Dr.(a).

Prof.a. Gladys Flávia Albuquerque Melo de Pinna
Orientadora

Com muito amor,

à minha família.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
RESUMO	13
ABSTRACT	14
APRESENTAÇÃO	15
CAPÍTULO 1	16
Introdução geral	16
1.1. Fotossíntese C ₃ e Fotorrespiração	17
1.2. Fotossíntese C ₄	19
1.3. Anatomia Kranz	22
1.4. Anatomia Kranz e fotossíntese C ₄ : um breve histórico	24
1.5. Caryophyllineae	29
1.6. Amaranthaceae s.s.	31
1.7. Objetivo geral.....	32
1.8. Referências Bibliográficas	34
CAPÍTULO 2	38
Ontogênese da bainha Kranz de <i>Gomphrena arborescens</i> L. f. e <i>G. scapigera</i> Mart. (Amaranthaceae): uma discussão sobre bainha do feixe e endoderme na folha	38
2.1. Resumo.....	39
2.2. Abstract.....	40
2.3. Introdução.....	41
2.4. Material e Métodos	42
2.5. Resultados e Discussão	43
2.5.1. Desenvolvimento da lâmina foliar.....	43
2.5.2. Endoderme <i>versus</i> bainha do feixe em folhas	46
2.5.3. Definindo alguns termos relacionados com anatomia Kranz: “bainha do feixe”, “bainha Kranz” e “PCR”	52
2.6. Conclusões	57
2.7. Referências Bibliográficas	59

CAPÍTULO 3.....	64
Caracterização ultra-estrutural e bioquímica da síndrome Kranz em folhas de <i>Gomphrena arborescens</i> L. f. e <i>G. scapigera</i> Mart. (Amaranthaceae).	64
3.1. Resumo.....	65
3.2. Abstract.....	66
3.3. Introdução.....	67
3.4. Material e Métodos	70
3.4.1. Microscopia eletrônica de transmissão	70
3.4.2. Identificação da principal enzima de descarboxilação	71
3.5. Resultados.....	72
3.5.1. Microscopia eletrônica de transmissão	72
3.5.2. Identificação da principal enzima de descarboxilação	74
3.6. Discussão	75
3.7. Conclusões	81
3.8. Referências Bibliográficas	83
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Gladys Flávia A. Melo de Pinna, que muito tem me ensinado desde a iniciação. Agradeço principalmente pelas vezes em que me questionou e me tirou da “zona de conforto”, pois foram nesses momentos em que mais aprendi.

Ao meu colaborador, professor Dr. Carlos Alberto Labate, do Laboratório Max Pfeffer de Genética de Plantas da Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz” (ESALQ), por me receber tão prontamente para o mestrado e por ter me acolhido carinhosamente em todas as visitas feitas em seu laboratório. Também a Alexander, Felipe, Ivan, Matheus, Tiago, Simone e demais pessoas desse laboratório, que me ajudaram muito no aprendizado das técnicas e com os quais vivi momentos descontraídos.

À Tássia dos Santos e à Gisele Costa, técnicas do laboratório de Anatomia Vegetal da USP, pelos auxílios e orientações, que foram indispensáveis.

Ao Irvandro Pires, técnico de Microscopia do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da USP, pela preparação dos materiais para microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Aos colegas do Núcleo de Apoio à Pesquisa/Microscopias Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária da ESALQ e, principalmente, ao professor Dr. Eliot W. Kitajima, por contribuírem para as análises em microscopia eletrônica de transmissão presentes nesse trabalho.

Em especial, ao seu Edmar, uma pessoa muito especial com a qual convivi durante as coletas em Diamantina, e ao Waldir Caldeira, técnico do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Genética do IB-USP, pelo auxílio e pela atenção dispensada durante as análises em MET, sem os quais o estudo da ultra-estrutura seria impossível.

A todos os professores do Laboratório de Anatomia Vegetal da USP, Gregório C. T. Ceccantini, Verônica Angyalossy e Nanuza Luiza de Menezes, pelas sugestões sobre o projeto. À Maria Emília M. Estelita, pela discussão de algumas imagens em ultra-estrutura.

A todos aqueles que leram essa dissertação, André C. Lima, Carla A. Verna, Emília C. P. Arruda, Flávia Nascimento, José Hernandes L. Filho, Luiz Horta, Maria

Cristina T. Zampieri, Paula Elbl, Raphael Cruz, Renata C. C. Lemos, Roberta Magna, Vanessa R. Godofredo, agradeço pelas valiosas sugestões.

A todos os colegas do laboratório de Anatomia Vegetal da USP, em especial à Vanessa Godofredo, Paula Elbl, Emília Arruda, Renata Cassimiro, Luiz Horta e Cristiane da Silva, amigos e companheiros.

À Dra. Yatiyo Yassuda e a sua aluna, Renata, do Laboratório de Citogenética de Vertebrados (USP-SP), pelo empréstimo do galão de nitrogênio líquido, meu companheiro de coletas.

Ao Dr. Gerald Edwards e ao Sascha Offermann, da Escola de Ciências Biológicas da Universidade de Washington (EUA), por aceitarem tão solícitamente fazer a análise de Western Blot, pelas sugestões e acréscimos a essa pesquisa e pelas inúmeras vezes que auxiliaram na resolução das minhas dúvidas.

À Nívea e ao Del, meus pais, pelo amor e o incentivo, e por suportarem nossa distância pacientemente. À Luisa e ao Reynaldo, meus avós, pelo carinho e o amor. Aos meus irmãos, tios e primos, pela confiança e amizade. Ao Giuliano, pela força, compreensão e companheirismo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro prestado ao projeto, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de mestrado.

Enfim, agradeço muito a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desta dissertação.

Um sincero obrigado!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviatura/Sigla	Significado
[CO ₂]	Concentração de CO ₂
ATP	Adenosina trifosfato
Bk	Bainha Kranz
Cl	Cloroplasto
Co	Corpo
Com. pes.	Comunicação pessoal
Dr	Drusa
DTT	Ditiotreitol
e.g.	<i>exempli gratia</i> [lat.] = por exemplo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Em prep.	Em preparação
Ei	Espaço intercelular
En	Endoderme
Ep	Epiderme
Es	Estômato
Eudicots	Eudicotiledônea
FGA	3-fosfoglicerato
Fl	Floema
Fv	Feixe vascular
G3F	Gliceraldeído-3-fosfato

Ga	Grão de amido
IgG	Imunoglobulina G (anticorpo)
Loc. cit.	<i>loco citato</i> [lat.] = no local citado
MET	Microscópio eletrônico de transmissão
Mf	Meristema fundamental
Mm	Meristema marginal
Monocots	Monocotiledônea
Mr	Mesofilo radiado
Ms	Mesofilo
Mt	Mitocôndria
NADH	Dinucleotídeo nicotinamida adenina
NAD-ME	Enzima NAD-málica
NADP-ME	Enzima NADP-málica
Número + C (3C, 4C, 5C, etc.)	Número de átomos de carbono na molécula
P1	Parede celular primária
P2	Parede celular secundária
Pb	Procâmbio
Pc	Parede celular
PCR	“Photosynthetic carbon reduction”
Pd	Plasmodesmo
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPc	Fosfoenolpiruvato carboxilase
PEP-CK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
Pl	Parênquima lacunoso

PMSF	Fluoreto de fenilmetanosulfonil
Pp	Parênquima paliçádico
Pt	Protoderme
PVDF	Fluorido de polivinilideno
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
Rubisco	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase
RuBP	Ribulose-1,5-bisfosfato
<i>s.s.</i>	<i>sensu stricto</i> [lat.] = sentido estrito
TEMED	1,2-Bis(dimetilamino)etano
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
Tu	Túnica
Xi	Xilema

RESUMO

A síndrome Kranz é um conjunto de características anatômicas, ultra-estruturais e bioquímicas que culminam na realização da fotossíntese C_4 . Tal síndrome apresenta grande diversidade dentre as Angiospermas, tornando-se conveniente seu estudo em todos os níveis acima citados para a completa caracterização da mesma. No presente trabalho foi investigada a síndrome Kranz de *Gomphrena arborescens* e *G. scapigera* (Amaranthaceae) com ênfase na origem ontogenética da bainha Kranz, na descrição ultra-estrutural e na confirmação bioquímica sobre o tipo de fotossíntese C_4 . O desenvolvimento foliar dessas espécies indica que a bainha Kranz é originada da camada mais interna do mesofilo, a endoderme foliar. Uma discussão sobre os termos presentes na literatura para a descrição dessa bainha, todos eles focados em sua função na fotossíntese C_4 , demonstra a importância de se utilizar termos que informem a origem ontogenética dessa bainha, como “endoderme” e “periciclo”. Na análise ultra-estrutural, foram identificados possíveis fatores que interferem na fotossíntese de ambas as espécies, como o espessamento e a composição da parede da bainha Kranz, o posicionamento centrípeto dos cloroplastos e a presença de retículo periférico nos mesmos. Embora a análise bioquímica tenha resultado em informações ainda não conclusivas, o dimorfismo dos cloroplastos sugere a realização da fotossíntese C_4 do tipo NADP-ME. O presente trabalho, de uma forma geral, contribui ao conhecimento da síndrome Kranz dentre as Amaranthaceae s.s., um grupo em que a ultra-estrutura e a bioquímica ainda são pouco conhecidas, e ressalta a importância dos estudos anatômicos, principalmente com enfoque ontogenético, para o melhor conhecimento da diversidade da síndrome Kranz dentre as Angiospermas.

Palavras-chave: anatomia Kranz, bainha do feixe, cloroplasto, endoderme, fotossíntese C_4 .

ABSTRACT

The Kranz syndrome is a set of anatomical, ultrastructural and biochemical features that culminate in the C₄ photosynthesis. This syndrome has a huge diversity among Angiosperms, so it became suitable to survey all the levels above cited for its complete characterization. In the present work the Kranz syndrome of *Gomphrena arborescens* and *G. scapigera* (Amaranthaceae) is studied, with emphasis on the ontogenetic origin of the Kranz sheath, on the ultrastructural description, and on the biochemical confirmation about the C₄ photosynthesis kind. The foliar development of these species shows that the Kranz sheath is originated from the inner layer of the mesophyll, the foliar endodermis. A discussion about the literature terms used to describe the Kranz sheath, all of them referring to the function of this layer in C₄ photosynthesis, demonstrates the importance of using terms that inform the ontogenetic origin of this layer, such as “endodermis” and “pericycle”. The ultrastructural analysis identified possible factors that interfere on the C₄ photosynthesis of both species, such as wall thickening and composition of Kranz sheath cells, the centripetal position of chloroplasts and the peripheral reticulum in chloroplasts. Although biochemical analysis has resulted in no conclusive information, the chloroplast dimorphism suggests the NADP-ME C₄ photosynthesis. This work, in a general way, contributes to the knowledge of the Kranz syndrome among Amaranthaceae *s.s.*, a group that has the ultrastructure and the biochemistry of C₄ photosynthesis poorly known. It also draws attention to the importance of anatomical surveys concerning the ontogenetic origin of Kranz sheath for a better understanding on the diversity of Kranz syndrome among Angiosperms.

Keywords: bundle sheath, chloroplast, C₄ photosynthesis, endodermis, Kranz anatomy.

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação está estruturada em três capítulos. O primeiro deles, denominado “Introdução Geral”, aborda noções e conceitos necessários à compreensão dos capítulos posteriores, como fotossínteses C₃ e C₄, fotorrespiração e anatomia Kranz. Além disso, fornece ao leitor uma visão mais abrangente sobre o material de estudo, descrevendo as principais características do gênero, família e ordem a que pertence, e sintetizando as pesquisas que foram recentemente desenvolvidas dentro do assunto “síndrome Kranz”. Os capítulos subseqüentes referem-se à atividade de pesquisa propriamente dita. A estruturação dos mesmos segue uma forma sucinta e objetiva, assim como em um artigo científico, objetivando sua breve publicação. O capítulo 2 - “Ontogênese da bainha Kranz de *Gomphrena arborescens* L. f. e *G. scapigera* Mart. (Amaranthaceae): uma discussão sobre bainha do feixe e endoderme na folha” - descreve o desenvolvimento da lâmina foliar dos representantes de *Gomphrena* estudados e, com base nesses resultados, discute a terminologia adotada na literatura que trata sobre anatomia Kranz, ressaltando a importância de se realizar mais estudos sobre o desenvolvimento do órgão fotossintetizante, a fim de se estabelecer homologias entre as bainhas Kranz das espécies estudadas. O capítulo 3 - “Caracterização ultra-estrutural e bioquímica da síndrome Kranz em folhas de *Gomphrena arborescens* L. f. e *G. scapigera* Mart. (Amaranthaceae)” - trata da caracterização da síndrome Kranz e da classificação da fotossíntese C₄ desses representantes com base em evidências ultra-estruturais e bioquímicas. A seguir, nas “Considerações Finais”, são levantadas as principais contribuições do presente trabalho ao conhecimento científico.

CAPÍTULO 1

Introdução geral

1.1. Fotossíntese C₃ e Fotorrespiração

A fotossíntese C₃, ou ciclo Calvin-Benson, foi o primeiro processo fotossintético que evoluiu dentre as plantas terrestres (Tipple e Pagani 2007). Como esquematizado na figura 1.1, o CO₂ dissolvido no tecido vegetal se combina com ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP), uma molécula de cinco carbonos, por intermédio da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), originando uma molécula instável de seis carbonos. Essa molécula é imediatamente hidrolisada, formando duas moléculas de três carbonos (3-fosfoglicerato, FGA) que, em seguida, são fosforiladas e reduzidas, originando duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato (G3F), o carboidrato que dá nome à fotossíntese C₃ (Taiz e Zeiger 2004, Tipple e Pagani 2007). Parte das moléculas de G3F produzido é destinada à síntese de outros carboidratos, como sacarose e amido, enquanto a outra parte é utilizada para regenerar RuBP (Taiz e Zeiger 2004). Todas as células fotossintetizantes são capazes de desenvolver todo o ciclo C₃ no interior de seus cloroplastos.

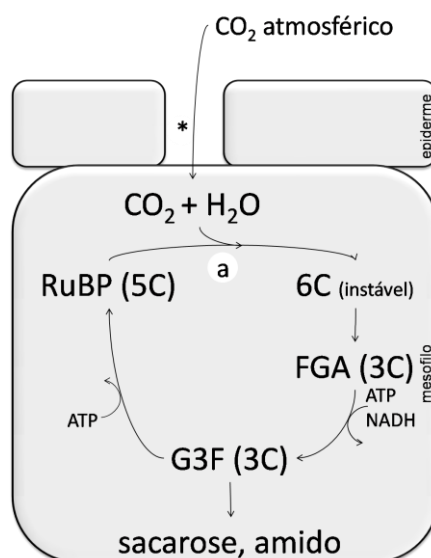


Figura 1.1. Esquema simplificado mostrando as principais etapas da fotossíntese C₃ ou ciclo de Calvin-Benson. Modificado de Taiz e Zeiger (2004). (* = abertura estomática; a = Rubisco).

No entanto, como seu próprio nome sugere, a Rubisco atua como carboxilase e oxigenase do RuBP (Taiz e Zeiger 2004, Edwards *et al.* 2004). O ciclo C_3 , acima descrito, refere-se à atividade carboxiladora dessa enzima. Diferentemente, ao atuar como oxigenase, a Rubisco inicia um processo que utiliza moléculas de O_2 e libera CO_2 em presença de luz, por isso denominado fotorrespiração (Raven *et al.* 2001) (figura 1.2). Nesse processo, RuBP (cinco carbonos) reage com O_2 , originando um composto instável de 5 carbonos, que é hidrolisado em duas moléculas, uma com 3 carbonos (FGA) e outra com 2 carbonos (2-fosfoglicolato). O FGA segue o ciclo de Calvin-Benson, enquanto duas moléculas de 2-fosfoglicolato são utilizadas (quatro carbonos no total) para regenerar um FGA, liberando assim uma molécula de CO_2 (Taiz e Zeiger 2004).

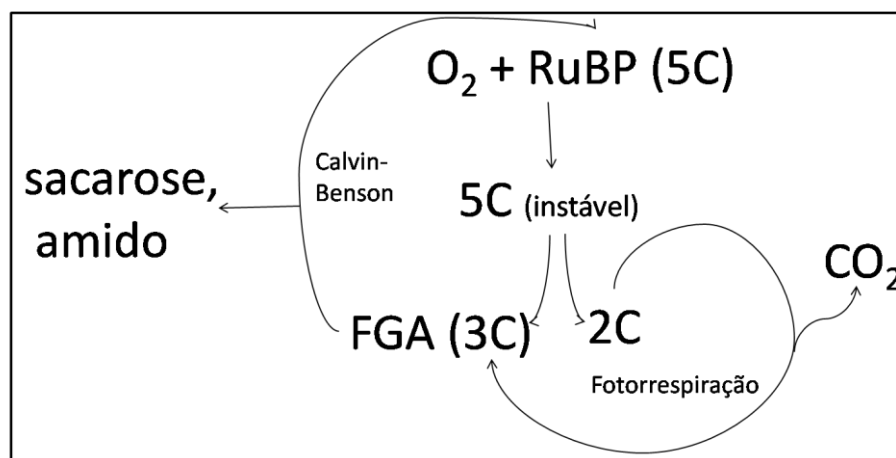


Figura 1.2. Esquema simplificado ilustrando a relação existente entre a fotorrespiração e o ciclo de Calvin-Benson. Modificado de Taiz e Zeiger (2004).

Dessa forma, a fotorrespiração leva à perda líquida de carbono (Taiz e Zeiger 2004). Em termos quantitativos, a eficiência da fixação fotossintética do carbono é reduzida de 30% a 40% devido à ação da fotorrespiração nas condições atmosféricas atuais (Ehleringer e Monson 1993). A proporção entre as atividades de carboxilação e oxigenação da Rubisco varia de acordo com tais condições, tendendo favoravelmente à

fotorrespiração em ambientes com baixa concentração de CO₂, temperatura elevada, alta salinidade, aridez e intensa luminosidade (Ehleringer e Monson 1993, Sage 2004).

1.2. Fotossíntese C₄

A fotossíntese C₄, ou ciclo Hatch-Slack, é um mecanismo de concentração de CO₂ que surgiu provavelmente entre 12-13 milhões de anos atrás, alcançando maior diversidade há 6-8 milhões de anos, quando as concentrações de CO₂ atmosférico sofreram drásticas reduções (Cerling 1999). Estima-se que existam aproximadamente 50 linhagens de representantes C₄ que evoluíram independentemente (Sage 2004, Sage *et al.* 2007), as quais se dividem entre as 19 famílias com representantes C₄ já registrados. Essas famílias, que ocorrem apenas em Angiospermas, estão distribuídas em duas ordens de monocotiledôneas (monocots) e seis de eudicotiledôneas (eudicots) (tabela 1.1) (Sage 2004, Sage *et al.* 2007).

Tabela 1.1 - Ocorrência da fotossíntese C₄. Modificado de Sage (2004).

	Ordem	Família
Monocots	Alismatales	Hydrocharitaceae
	Poales	Cyperaceae
		Poaceae
	Asterales	Asteraceae
Eudicots	Brassicales	Brassicaceae
		Aizoaceae
		Amaranthaceae
		Caryophyllaceae
		Chenopodiaceae
		Gisekiaceae
		Molluginaceae
		Nyctaginaceae
	Caryophyllales	Polygonaceae
		Portulacaceae
		Acanthaceae
		Boraginaceae
	Lamiales	Scrophulariaceae
Malpighiales	Euphorbiaceae	
Zygophyllales	Zygophyllaceae	

Na fotossíntese C₄, a fixação do carbono é feita pela enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPc) nas células do mesofilo (figura 1.3). O CO₂ dissolvido no tecido vegetal é transformado em íon bicarbonato (HCO₃⁻) e reage com o fosfoenolpiruvato (PEP), uma molécula de três carbonos, por intermédio da PEPc, para originar um ácido de quatro carbonos. A primeira molécula de quatro carbonos que ocorre em maior quantidade pode ser malato ou aspartato, dependendo do tipo de fotossíntese C₄. Essa molécula é, em seguida, transportada via plasmodesmos para células da bainha Kranz, onde será descarboxilada, liberando CO₂, o qual será reduzido a carboidrato no ciclo de Calvin-Benson, e piruvato, que será utilizado para regenerar PEP (Taiz e Zeiger 2004).

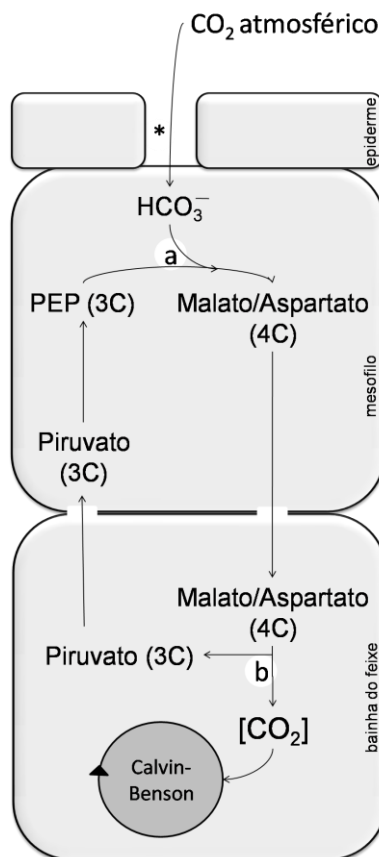


Figura 1.3. Esquema simplificado mostrando as principais etapas da fotossíntese C₄ ou ciclo de Hatch-Slack. Modificado de Taiz e Zeiger (2004). (* = abertura estomática;

a = PEPc; b = enzima de descarboxilação).

Os processos bioquímicos da fotossíntese C_4 já estudados diferem, principalmente, quanto à forma de descarboxilação do ácido de quatro carbonos (Edwards *et al.* 2001). As formas de descarboxilação em eudicotiledôneas podem ser de dois tipos. Um deles utiliza enzimas NADP-málicas (NADP-ME) e apresenta cloroplastos do mesofilo com maior número de grana do que os da bainha Kranz (figura 1.4). O outro tipo de descarboxilação utiliza enzimas NAD-málicas (NAD-ME) e apresenta cloroplastos do mesofilo com semelhante ou menor quantidade de grana do que os da bainha Kranz (Pfündel e Neubohn 1999, Voznesenskaya *et al.* 1999, Edwards *et al.* 2004). Tal dimorfismo pode ser utilizado para inferir o tipo de fotossíntese C_4 realizado pela espécie (Voznesenskaya *et al.* 1999).

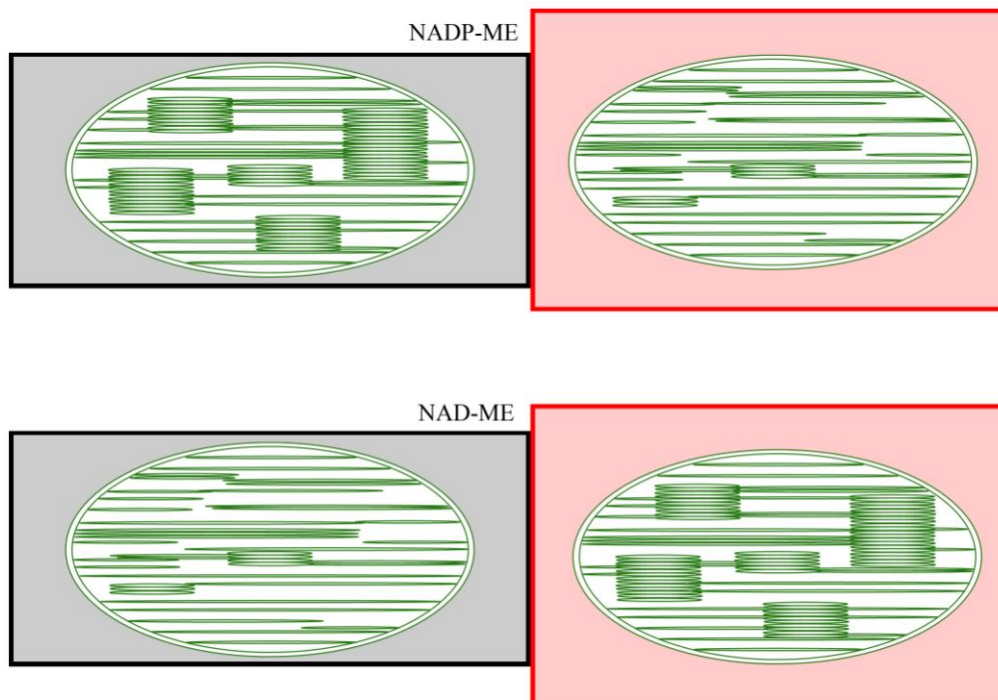


Figura 1.4. Esquema representando o dimorfismo entre os cloroplastos do mesofilo radiado (em preto) e da bainha Kranz (em vermelho). Nesse esquema estão representados apenas os tipos de fotossíntese C_4 descritos até o momento em eudicotiledôneas: NADP-ME e NAD-ME (Voznesenskaya *et al.* 1999).

1.3. Anatomia Kranz

Haberlandt (1882) foi quem primeiro descreveu as células que envolviam os feixes vasculares em folhas de algumas monocotiledôneas (McKown e Dengler 2007, mais detalhes em “Anatomia Kranz e fotossíntese C₄: um breve histórico”). Como essas células formavam duas bainhas dispostas concentricamente e se assemelhavam a uma coroa em torno dos feixes vasculares, denominou-as “estrutura Kranz” (*Kranz* [alem.] = coroa). Quando novas espécies de monocotiledôneas, e também de eudicotiledôneas, foram descritas com estruturas semelhantes àquela observada por Haberlandt, notaram-se variações consideráveis, por exemplo, na disposição das bainhas, no espessamento e na composição das paredes das células, no número de bainhas que envolviam o feixe vascular e no tamanho e estrutura dos cloroplastos das bainhas. Apesar dessas variações, algumas características chamaram a atenção dos pesquisadores por estarem sempre presentes e foram consideradas essenciais à anatomia Kranz e à fotossíntese C₄. São elas: a presença de dois tipos de células altamente especializadas, nas quais ocorrem as diferentes fases da fotossíntese C₄ (células do mesofilo radiado – fixação de CO₂ - e células da bainha Kranz – concentração e redução do CO₂, figura 1.5), uma configuração de tecidos que minimiza a distância para o transporte de metabólitos entre esses dois tipos celulares (células dispostas em camadas concêntricas, formando uma estrutura em coroa, e alta densidade de feixes vasculares, figura 1.5) e, por final, a disposição das células do mesofilo mais proximamente à epiderme e aos espaços intercelulares, enquanto as células da bainha Kranz ficam no interior da folha, próximas aos feixes vasculares, e justapostas entre si, limitando a difusão de CO₂ de volta para as células do mesofilo (Dengler e Nelson 1999) (figura 1.5).

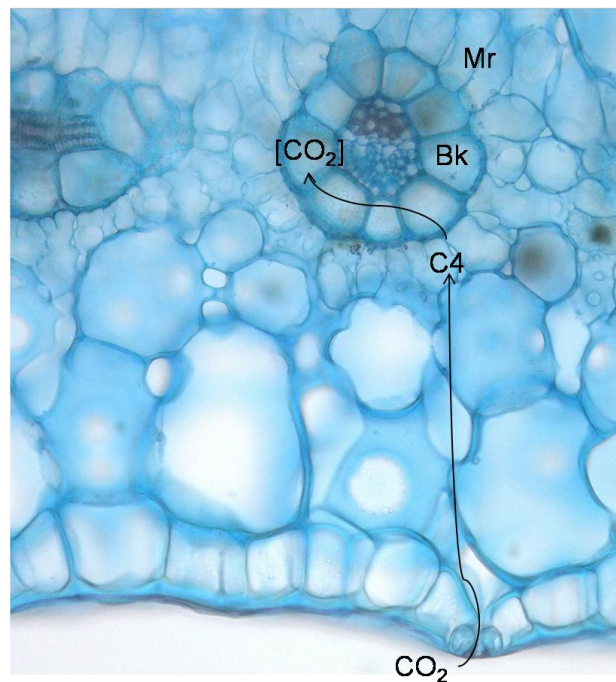


Figura 1.5. Esquema mostrando as diferentes etapas da fotossíntese C_4 que ocorrem em distintas células na anatomia Kranz em secção transversal da folha de *Gomphrena scapigera* Mart. (Bk = bainha Kranz; Mr = mesofilo radiado).

De acordo com diversos autores, a bainha Kranz é caracterizada por possuir células de maior tamanho que as células adjacentes e apresentar grande quantidade de organelas (cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos) e grãos de amido (Brown 1975, Nelson e Langdale 1992, Dengler e Nelson 1999, McKown e Dengler 2007). As organelas podem estar dispostas centrifugamente, centripetamente ou aleatoriamente nas células dessa bainha (Nelson e Langdale 1992).

A bainha Kranz exerce um papel fundamental na fotossíntese C_4 , pois é ali que o ácido de quatro carbonos chega, vindo das células do mesofilo, e é descarboxilado, liberando CO_2 . É ali também que esse gás é concentrado, reduzindo a atividade oxigenadora da Rubisco. Para que essas atividades funcionem plenamente, as células da bainha Kranz apresentam modificações estruturais, como um grande número de plasmodesmos e lamela de suberina (Dengler e Nelson 1999). A presença de um grande

número de plasmodesmos, que conectam as células da bainha Kranz com as células do mesofilo, permite a intensa troca de metabólitos entre essas células, possibilitando que o ciclo C_4 se complete (Brown 1975, Estelita-Teixeira e Handro 1984). A lamela de suberina, por sua vez, presente na parede celular da bainha Kranz de algumas plantas C_4 , provavelmente reduz o transporte apoplástico, minimizando o efluxo de CO_2 da mesma (O'Brien e Carr 1970, Soliday *et al.* 1979, Dengler e Nelson 1999).

É possível perceber que as características estruturais atualmente aceitas como requisitos para a fotossíntese C_4 são mais numerosas do que aquelas descritas por Haberlandt. A elas também se inserem requisitos ultra-estruturais (como o dimorfismo dos cloroplastos das células do mesofilo da bainha Kranz) e bioquímicos (como a compartimentação das enzimas da fotossíntese C_4 entre esses dois tipos de células) (Edwards *et al.* 2001, Sage 2004). Por esse motivo, chamamos esse conjunto de características anatômicas, ultra-estruturais e bioquímicas como síndrome Kranz (Tregunna *et al.* 1970).

1.4. Anatomia Kranz e fotossíntese C_4 : um breve histórico

A anatomia Kranz é comumente sugerida como um típico exemplo em que a forma dos seres vivos está relacionada com sua função, nesse caso, com a fisiologia da fotossíntese C_4 (Dengler e Nelson 1999). Esse assunto está normalmente presente em livros didáticos e é ensinado a alunos de graduação de uma forma pronta, estanque e imutável. Fala-se que a anatomia Kranz está relacionada com a fotossíntese C_4 devido à realização das diferentes fases desse processo nos dois tecidos especializados dessa estrutura, o mesofilo e a bainha Kranz. Entretanto, a anatomia Kranz esteve sempre relacionada com a fotossíntese C_4 ? Como essa relação foi estabelecida? Esse paradigma de que a fotossíntese C_4 ocorre em plantas com anatomia Kranz persiste atualmente?

A relação entre fotossíntese C_4 e anatomia Kranz na verdade não foi estabelecida tão prontamente como é mostrado em livros didáticos e ensinado aos alunos de graduação. Ao contrário, ela se estabeleceu paulatinamente, ao longo de muitos anos e graças ao trabalho de vários pesquisadores que elucidaram pontos específicos sobre o assunto. Dessa forma, o histórico sobre o estudo da anatomia Kranz e da fotossíntese C_4 deveria ser abordado com mais frequência em cursos de graduação, pois ele exemplifica de uma forma muito rica como a ciência normalmente funciona, ou seja, como o conhecimento científico é construído aos poucos, a partir de informações pontuais fornecidas por diversos pesquisadores e que, em determinado momento, convergem e se encaixam, resultando em uma compreensão mais ampla sobre determinado assunto.

A anatomia Kranz foi descrita em 1882, por Gottlieb Haberlandt, em monocotiledôneas (McKown e Dengler 2007) (figura 1.6). Haberlandt foi um pesquisador importante, pioneiro em áreas da botânica, como a cultura de tecidos e a anatomia fisiológica (Noé 1934, Härtel 1999). Sua pesquisa em anatomia vegetal era, portanto, focada na compreensão das relações entre a estrutura e sua função. Em representantes de *Cyperus*, Haberlandt observou uma disposição de tecidos que foi descrita como “girdle structure” (girdle = Kranz [alem.]) (Haberlandt 1928), ou seja, estrutura em coroa, hoje denominada anatomia Kranz. Segundo a descrição de Haberlandt (loc. cit.), a anatomia Kranz corresponde a duas bainhas de células fotossintetizantes que circundam cada feixe vascular da folha. Uma delas apresenta células com forma alongada e disposição radial e a segunda é “parenquimatosa” e possui inúmeros cloroplastos. Logo nessa observação, Haberlandt propôs duas hipóteses quanto à função dessa estrutura. Em uma delas, essa bainha “parenquimatosa” representaria uma “adição sem importância ao aparato fotossintético”, ou seja, não teria diferença nenhuma em relação às outras células fotossintetizantes. Na outra hipótese,

sugeriu que houvesse uma divisão de tarefas ainda “desconhecida” entre cloroplastos da bainha e do mesofilo radial.

Depois de 82 anos, Marshall Hatch e Charles Slack, fisiologistas de plantas australianos, observaram diferenças no tipo de fotossíntese realizado pela cana-de-açúcar quando comparada com a fotossíntese das outras plantas (Hatch e Slack 1966, Raven *et al.* 2001) (figura 1.6). Eles colocaram folhas fotossinteticamente ativas de cana-de-açúcar em uma atmosfera rica em isótopos radioativos de CO_2 ($^{14}\text{CO}_2$) e identificaram os produtos da fotossíntese formados ao longo do tempo. Os primeiros produtos estáveis produzidos continham quatro carbonos (malato e aspartato), ao contrário do primeiro produto estável do ciclo de Calvin-Benson, que possuía três. Por esse motivo, quando esse novo tipo de fotossíntese foi aceito pela comunidade científica em 1970, foi denominado fotossíntese C_4 (Hatch 1999). Hatch e Slack (1966) chegaram a propor uma rota metabólica para esse novo tipo de fotossíntese e sugeriram que esse processo de fixação do CO_2 não fosse exclusivo da cana-de-açúcar.

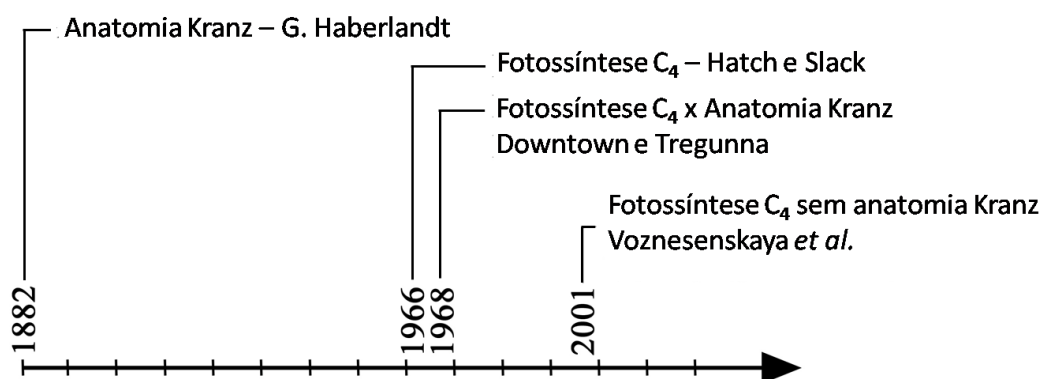


Figura 1.6. Linha do tempo que indica as importantes descobertas relacionadas à anatomia Kranz e à fotossíntese C_4 .

Neste momento, as pesquisas científicas mostravam resultados pontuais de que gramíneas tinham baixo ponto de compensação de CO_2 (Moss 1962), apresentavam anatomia Kranz (Haberlandt 1928), cloroplastos bifuncionais (Rhoades e Carvalho

1944) e dimórficos (Rhoades e Carvalho 1944, Hodge *et al.* 1955) e, também, a recém-descrita fotossíntese C₄ (Hatch *et al.* 1967). Esses resultados pontuais depois se estenderam para outros grupos vegetais, como Cyperaceae e eudicotiledôneas (Hatch *et al.* 1967).

Dois anos depois, Downton e Tregunna (1968) testaram a ocorrência de algumas dessas características em determinadas espécies de monocotiledôneas e eudicotiledôneas. Mais precisamente, testaram o ponto de compensação de CO₂, a taxa da fotossíntese, a presença de fotossíntese C₄, a fotorrespiração, a anatomia Kranz e a distribuição de amido no tecido fotossintetizante em seis eudicotiledôneas e nove monocotiledôneas. Observaram que, na maioria das espécies, folhas que exibiam baixo ponto de compensação fotossintético apresentavam também alta taxa de fotossíntese, baixa fotorrespiração, anatomia Kranz (bainha do feixe definida e mesófilo radiado) e grãos de amido concentrados nas células da bainha do feixe. Downton e Tregunna (*loc. cit.*), portanto, relacionaram algumas características que estavam sendo descritas pontualmente e sugeriram que deveriam estar vinculadas com a fotossíntese C₄ (figura 1.6). Chegaram, ainda, a propor um mecanismo para explicar a correlação entre as características observadas. Este mecanismo não se baseava na descarboxilação do ácido de quatro carbonos para reduzir a taxa de fotorrespiração, mas sim na alta taxa de transporte de produtos da fotossíntese na anatomia Kranz, com o armazenamento de excessos na forma de amido dentro das células da bainha Kranz. Essa explicação se mostrou inadequada conforme o mecanismo C₄ foi sendo elucidado (Hatch 1999).

O entendimento da fotossíntese C₄ e sua função só foram compreendidos depois da descoberta da função oxidativa da Rubisco e da fotorrespiração (Edwards *et al.* 2001, Edwards *et al.* 2004). Ao longo do tempo, informações obtidas por diversos pesquisadores foram reunidas, a rota metabólica proposta inicialmente por Hatch e

Slack (1966) foi modificada, o ciclo C_4 foi reconhecido pela comunidade científica como um tipo diferente de fotossíntese e três diferentes tipos de fotossíntese C_4 foram descritos (para detalhes, ver Hatch 1999, Hatch 2002). Os registros de plantas C_4 foram, por muitos anos, feitos em plantas com anatomia Kranz, o que mais tarde chegou a ser chamado de “paradigma Kranz”. Dessa forma, por muito tempo a anatomia Kranz foi considerada a única estrutura que possibilitava a ocorrência da fotossíntese C_4 , devido à compartimentação entre as células da bainha Kranz e do mesofilo radiado, o que permitia a separação espacial das funções de fixação do CO_2 e de sua disponibilização para a Rubisco. Por este motivo, por muito tempo considerou-se a presença da anatomia Kranz como diagnóstico da fotossíntese C_4 (Edwards *et al.* 2004).

Em 2001, o “paradigma Kranz” foi quebrado por Voznesenskaya *et al.*, pesquisadores que relataram a realização de todas as etapas da fotossíntese C_4 em uma única célula fotossintetizante em uma espécie de “Chenopodiaceae”, *Borsczowia aralocaspica* Bunge (figura 1.6). Depois dessa espécie, outras duas foram descobertas com a mesma característica, *Bienertia cycloptera* Bunge ex Boiss (Freitag e Stichler 2002, Voznesenskaya *et al.* 2002) e *Bienertia sinuspersici* Akhani (Akhani *et al.* 2005). A partir destes estudos, novas perguntas foram elaboradas para entender o mecanismo C_4 nessas espécies. Assim, estudos mais aprofundados sobre citologia e a fotossíntese nessas plantas mostraram que a compartimentação típica da anatomia Kranz é mantida intracelularmente, por meio da organização estrutural do citoesqueleto e do vacúolo (Voznesenskaya *et al.* 2005, Chuong *et al.* 2006, Park *et al.* 2009).

Essa recente quebra de paradigma nos estudos sobre anatomia Kranz e fotossíntese C_4 nos mostra que as estratégias morfológicas para atingir o metabolismo C_4 são muito variadas (Edwards *et al.* 2004). Algumas dessas já foram descritas, demonstrando uma diversidade surpreendente em um grupo particular de

eudicotiledônea, as Caryophyllineae, antigas Caryophyllales (Sage 2001, Judd *et al.* 2008). Dessa forma, outras “soluções” anatômicas, ultra-estruturais e bioquímicas ainda podem ser encontradas para concentrar CO₂ e “driblar” a atividade oxidativa da Rubisco.

1.5. Caryophyllineae

De acordo com Judd *et al.* (2008), Caryophyllales passou a compreender as duas antigas ordens Caryophyllales e Polygonales. Portanto, atualmente encontra-se dividida em duas subordens, Caryophyllineae e Polygonineae. A primeira delas possui 8600 espécies distribuídas em 21 famílias, sendo as maiores, em número de espécies, Aizoaceae, Caryophyllaceae, Phytolaccaceae, Nyctaginaceae, Amaranthaceae, Cactaceae e Portulacaceae. A segunda, Polygonineae, possui cerca de 2050 espécies em nove famílias, incluindo Polygonaceae, Plumbaginaceae, Nepentheaceae e Droseraceae (Judd *et al.* 2008). Caryophyllineae, antiga Caryophyllales, representa o principal grupo de ocorrência da fotossíntese C₄ dentro das eudicotiledôneas (Sage 2001), sendo que nove das 16 famílias de eudicotiledôneas que possuem representantes C₄ estão localizadas nessa subordem (tabela 1.1 e figura 1.7).

Carolin *et al.* (1978) e Voznesenskaya *et al.* (2002) mencionam que os tipos de descarboxilação C₄ em Caryophyllineae (antiga Caryophyllales) aparecem como resultado de variadas combinações entre aspectos estruturais, ultra-estruturais e bioquímicos. Essa variação, segundo Carolin *et al.* (1978), pode ser facilmente observada em nível de família e tribo, sendo ainda registrada heterogeneidade em alguns gêneros como *Boerharia* (Nyctaginaceae), *Gisekia*, *Mollugo* (Aizoaceae), *Atriplex*, *Suaeda*, *Bassia*, *Kochia*, *Salsola* (Chenopodiaceae), *Amaranthus* e *Alternanthera* (Amaranthaceae).

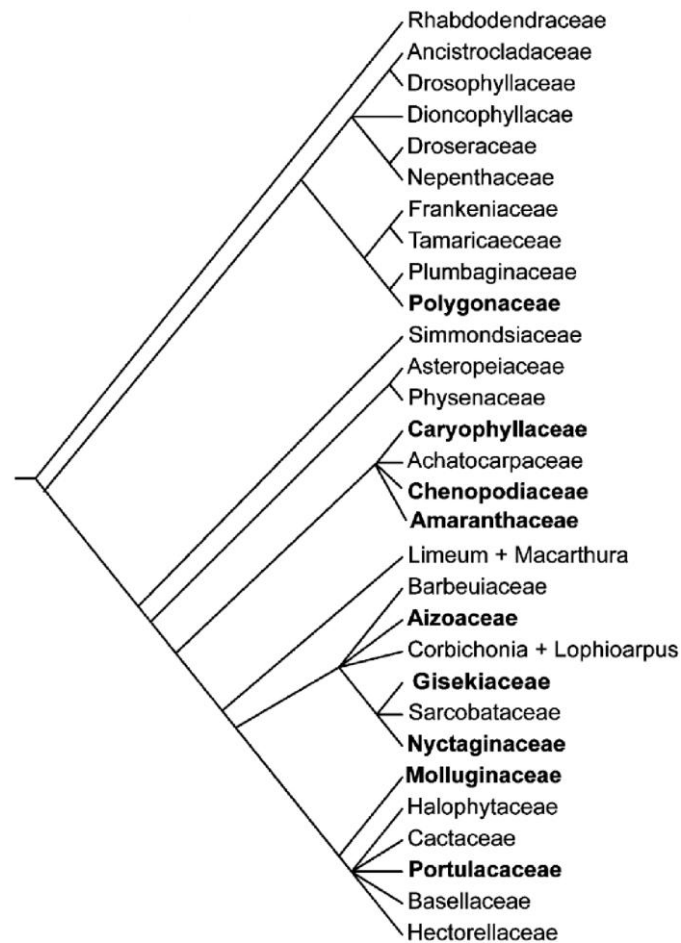


Figura 1.7. Distribuição da fotossíntese C₄ em Caryophyllineae, antiga Caryophyllales. Famílias que possuem plantas C₄ aparecem em negrito. Modificado de Sage (2004).

Amaranthaceae e Chenopodiaceae têm sido unidas na grande família Amaranthaceae (Borsch *et al.* 2001, Judd *et al.* 2008), uma vez que Chenopodiaceae, considerada separadamente, é um grupo parafilético (Downie *et al.* 1997). Dessa forma, tem-se utilizado “Amaranthaceae *sensu stricto* (s.s.)” e “Chenopodiaceae” para se referir à circunscrição das duas antigas famílias separadamente (Borsch *et al.* 2001, Sage *et al.* 2007).

Amaranthaceae representa um importante grupo de estudo sobre variabilidade, filogenia e ocorrência da fotossíntese C₄ em eudicotiledôneas (Sage *et al.* 2007).

“Chenopodiaceae” possui maior número de representantes C_4 , seguida por *Amaranthaceae s.s.* (Sage 2001). A anatomia das espécies de “Chenopodiaceae” já foi bem estudada, assim como os aspectos ultra-estruturais e bioquímicos (Sage *et al.* 2007). Por outro lado, aspectos anatômicos (Kadereit *et al.* 2003), ultra-estruturais e bioquímicos da fotossíntese de espécies C_4 de *Amaranthaceae s.s.* têm sido pouco estudados. Sage *et al.* (2007) ressaltam que poucos estudos sobre a distribuição da fotossíntese C_4 em *Amaranthaceae s.s.* foram feitos desde os trabalhos iniciais que datam de três décadas atrás. Notando a escassez de registros sobre a natureza da fotossíntese C_4 , Sage *et al.* (2007) publicaram um trabalho no qual utilizaram métodos simples e rápidos para classificar plantas quanto ao tipo de fotossíntese e, assim, fazer uma varredura pelos representantes de *Amaranthaceae s.s.* Para isso, utilizaram-se da análise de discriminação de isótopos de carbono e da observação das folhas de exsicatas em herbários para estudar 66% dos representantes de *Amaranthaceae* reconhecidos por Townsend (1993).

1.6. *Amaranthaceae s.s.*

Amaranthaceae s.s. possui plantas herbáceas ou arbustivas, em alguns casos suculentas (Judd *et al.* 2008). Apresenta distribuição cosmopolita, ocorrendo em regiões tropical, subtropical e temperada (Heywood 1993). Possui 2360 espécies distribuídas em 169 gêneros, sendo *Gomphrena* L. o segundo maior. Este apresenta cerca de 120 espécies no continente americano, na Austrália e em regiões da Indonésia e Malásia (Siqueira 1992, Judd *et al.* 2008). No Brasil, são registradas 46 espécies de *Gomphrena* distribuídas nas regiões sudeste, centro-oeste e nordeste, e encontradas predominantemente em cerrados, campos rupestres e caatingas (Siqueira 1992).

Sage *et al.* (2007) encontraram cinco diferentes linhagens de plantas C₄ em Amaranthaceae s.s.: *Amaranthus*, *Aerva*, o clado que agrupa *Gomphrena*, *Blutaparon*, *Guilleminea* e *Froelichia*, *Tidestromia* e *Alternanthera* (figura 1.8). *Gomphrena* possui evidências de ser grupo polifilético, separando plantas C₄ e C₃ (*G. aphylla* Pohl ex Moq. e *G. angustiflora* Mart.) em diferentes cladogramas (Sage loc. cit.). Anatomicamente as espécies do gênero em questão apresentam uma anatomia Kranz típica com peculiaridades específicas (Estelita-Teixeira e Handro 1984). Apesar de relativamente bem explorado em termos anatômicos, o gênero *Gomphrena* possui escassos registros sobre ultra-estrutura e bioquímica da fotossíntese. Além disso, esses estudos geralmente restringem-se a apenas um ou dois enfoques (anatomia e/ou ultra-estrutura), sendo a bioquímica do processo o assunto menos pesquisado.

1.7. Objetivo geral

Diante disso, o objetivo do presente trabalho é estudar a histogênese foliar de representantes de Amaranthaceae que possuem anatomia Kranz e identificar caracteres ultra-estruturais e bioquímicos que definam o tipo de fotossíntese C₄ de duas espécies de *Gomphrena* L., *Gomphrena arborescens* L. f. e *G. sapigera* Mart.



Figura 1.8. Árvore filogenética de Amaranthaceae s.s. com linhagens de plantas C₄ indicadas em preto. Retirada de Sage *et al.* (2007).

1.8. Referências Bibliográficas

- AKHANI, H.; BARROCA, J.O.; KOTEEVA, N.; VOZNESENSKAYA, E.; FRANCESCHI, V.; EDWARDS, G.; GHAFARI, S.M. & ZIEGLER H. 2005. *Bienertia sinuspersici* (Chenopodiaceae): a new species from Southwest Asia and discovery of a third terrestrial C₄ plant without Kranz anatomy. *Systematic Botany* 30(2): 290–301.
- BORSCH, T.; CLEMANTS, S. & MOSYAKIN, S. 2001. Symposium: biology of the Amaranthaceae-Chenopodiaceae alliance. *Journal of the Torrey Botanical Society* 128(3): 234-235.
- BROWN, W.V. 1975. Variations in anatomy, associations, and origins of Kranz tissue. *American Journal of Botany* 63(4): 395-402.
- CAROLIN, R.C.; JACOBS, S.W.L. & VESK, M. 1978. Kranz cells and mesophyll in the Chenopodiales. *Australian Journal of Botany* 26: 683-698.
- CERLING, T.E. 1999. C₄ paleorecords of C₄ plants and ecosystems. In: *C₄ Plant Biology*. Eds. R.F. Sage & R.K. Monson. Academic Press, Colorado: 445-469.
- CHUONG, S.D.X.; FRANCESCHI, V.R. & EDWARDS, G.E. 2006. The cytoskeleton maintains organelle partitioning required for single-cell C₄ photosynthesis in Chenopodiaceae species. *The Plant Cell* 18: 2207-2223.
- DENGLER, N.G. & NELSON, T. 1999. Leaf structure and development in C₄ plants. In: *C₄ Plant Biology*. Eds. R.F. Sage & R.K. Monson. Academic Press, Colorado: 133-172.
- DOWNIE, S.R.; KATZ-DOWNIE, D.S. & CHO, K.J. 1997. Relationships in the Caryophyllales as suggested by phylogenetic analyses of partial chloroplast DNA ORF2280 homolog sequences. *American Journal of Botany* 84(2): 253-273.
- DOWNTON, W.J.S. & TREGUNNA, E.B. 1968. Carbon dioxide compensation - its relation to photosynthetic carboxylation reactions, systematics of the Gramineae, and leaf anatomy. *Canadian Journal of Botany* 46: 207-215.
- EDWARDS, G.E.; FRANCESCHI, V.R. & VOZNESENSKAYA, E.V. 2004. Single-cell C₄ photosynthesis versus the dual-cell (Kranz) paradigm. *Annual Reviews of Plant Biology* 55: 173-196.
- EDWARDS, G.E.; FURBANK, R.T.; HATCH, M.D. & OSMOND, C.B. 2001. What does it take to be a C₄? Lessons from the evolution of C₄ photosynthesis. *Plant Physiology* 125: 46-49.

- EHLERINGER, J.R. & MONSON, R.K. 1993. Evolutionary and ecological aspects of photosynthetic pathway variation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 411-439.
- ESTELITA-TEIXEIRA, M.E. & HANDRO, W. 1984. Leaf ultrastructure in species of *Gomphrena* and *Pfaffia* (Amaranthaceae). *Canadian Journal of Botany* 62: 812-817.
- FREITAG, H. & STICHLER, W. 2002. *Bienertia cycloptera* Bunge ex Boiss., Chenopodiaceae, another C₄ plant without Kranz tissues. *Plant Biology* 4: 121-132.
- HABERLANDT, G. 1928. *Physiological Plant Anatomy*. Trad. M. Drummond. Maximilian and Co. Ltda., London. 777 pp.
- HÄRTEL, O. 1999. Gottlieb Haberlandt: a portrait. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant* 35: 157-158.
- HATCH, M.D. & SLACK, C.R. 1966. Photosynthesis by sugar-cane leaves. A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. *Biochemical Journal* 101: 103-111.
- HATCH, M.D. 1999. C₄ photosynthesis: a historical overview. *In: C₄ Plant Biology*. Eds. R.F. Sage & R.K. Monson. Academic Press, Colorado: 17-46.
- HATCH, M.D. 2002. C₄ photosynthesis: discovery and resolution. *Photosynthesis Research* 73: 251-256.
- HATCH, M.D.; SLACK, C.R. & JOHNSON, H.S. 1967. Further studies on a new pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation in sugar-cane and its occurrence in other plant species. *Biochemical Journal* 102: 417-422.
- HEYWOOD, V.H. 1993. *Flowering plants of the world*. Batsford, London. 335 pp.
- HODGE, A.J.; MCLEAN, J.D. & MERCER, F.V. 1955. Ultrastructure of the lamellae and grana in the chloroplasts of *Zea mays* L. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 1(6): 605-614.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. & DONOGUE, M.J. 2008. *Plant systematics - A phylogenetic approach*. 3^a ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland. 611 pp.
- KADEREIT, G.; BORSCH, T.; WEISING, K. & FREITAG, H. 2003. Phylogeny of Amaranthaceae and Chenopodiaceae and the evolution of C₄ photosynthesis. *International Journal of Plant Sciences* 164: 959-986.

- MCKOWN, A.D. & DENGLER, N.G. 2007. Key innovations in the evolution of Kranz anatomy and C₄ vein pattern in *Flaveria* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 94(3): 382-399.
- MOSS, D.N. 1962. The limiting carbon dioxide concentration for photosynthesis. *Nature* 10: 587.
- NELSON, T. & LANGDALE, J.A. 1992. Developmental genetics of C₄ photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 25-47.
- NOÉ, A.C. 1934. Gottlieb Haberlandt. *Plant Physiology* 9(4): 850-855.
- O'BRIEN, T.P. & CARR, D.J. 1970. A suberized layer in the cell walls of the bundle sheath of grasses. *Australian Journal of Biological Sciences* 23: 275-287.
- PARK, J.; KNOBLAUCH, M.; OKITA, T.W. & EDWARDS, G.E. 2009. Structural changes in the vacuole and cytoskeleton are key to development of the two cytoplasmic domains supporting single-cell C₄ photosynthesis in *Bienertia sinuspersici*. *Planta* 229:369-382.
- PFÜNDEL, E. & NEUBOHN, B. 1999. Assessing photosystem I and II distribution in leaves from C₄ plants using confocal laser scanning microscopy. *Plant, Cell and Environment* 22: 1569-1577.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F. & EICHHORN, S.E. 2001. *Biologia Vegetal*. 6^a ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro. 906 pp.
- RHOADES, M.M. & CARVALHO, A. 1944. The function and structure of the parenchyma sheath plastids of the maize leaf. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 71(4): 335-346.
- SAGE, R.F. 2001. Environmental and evolutionary preconditions for the origin and diversification of the C₄ photosynthetic syndrome. *Plant Biology* 3: 202-213.
- SAGE, R.F. 2004. The evolution of C₄ photosynthesis. *New Phytologist* 161: 341-370.
- SAGE, R.F.; SAGE, T.L.; PEARCY, R.W. & BORSCH, T. 2007. The taxonomic distribution of C₄ photosynthesis in Amaranthaceae *sensu stricto*. *American Journal of Botany* 94(12): 1992-2003.
- SIQUEIRA, J.C. DE. 1992. O gênero *Gomphrena* L. (Amaranthaceae) no Brasil. *Pesquisas, São Leopoldo* 1: 5-197.
- SOLIDAY, C.L.; KOLATTUKUDY, P.E. & DAVIS, R.W. 1979. Chemical and ultrastructural evidence that waxes associated with suberin polymer constitute the

- major diffusion barrier to water vapor in potato tuber (*Solanum tuberosum* L.).
Planta 146: 607-614.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2004. *Fisiologia Vegetal*. 3° ed. Artmed, Porto Alegre. 719 pp.
- TIPPLE, B.J. & PAGANI, M. 2007. The early origins of terrestrial C₄ photosynthesis.
Annual Review of Earth and Planetary Science 35: 435-461.
- TOWNSEND, C.C. 1993. Amaranthaceae. In: *The families and genera of vascular plants*. Vol. II: Flowering plants: dicotyledons. Eds. K. Kubitzki, J.G. Rohwer, V. Bittrich, Springer-Verlag, Berlin: 70–91.
- TREGUNNA, E.B.; SMITH, B.N.; BERRY, J.A. & DOWNTOWN, W.J.S. 1970. Some methods for studying the photosynthetic taxonomy of the angiosperms. *Canadian Journal of Botany* 48: 1209-1214.
- VOZNESENSKAYA, E.V.; FRANCESCHI, V.R.; KIIRATS, O.; ARTYUSHEVA, E.G.; FREITAG, H. & EDWARDS, G.E. 2002. Proof of C₄ photosynthesis without Kranz anatomy in *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae). *The Plant Journal* 31: 649-662.
- VOZNESENSKAYA, E.V.; FRANCESCHI, V.R.; KIIRATS, O.; FREITAG, H. & EDWARDS, G.E. 2001. Kranz anatomy is not essential for terrestrial C₄ plant photosynthesis. *Nature* 414: 543-546.
- VOZNESENSKAYA, E.V.; FRANCESCHI, V.R.; PYANKOV, V.I. & EDWARDS, G.E. 1999. Anatomy, chloroplast structure and compartmentation of enzymes relative to photosynthetic mechanisms in leaves and cotyledons of species in the tribe Salsoleae (Chenopodiaceae). *Journal of Experimental Botany* 50: 1779-1795.
- VOZNESENSKAYA, E.V.; KOTEYEVA, N.K.; CHUONG, S.D.X.; AKHANI, H.; EDWARDS, G.E. & FRANCESCHI, V.R. 2005. Differentiation of cellular and biochemical features of the single-cell C₄ syndrome during leaf development in *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae). *American Journal of Botany* 92(11): 1784–1795.

CAPÍTULO 2

Ontogênese da bainha Kranz de *Gomphrena arborescens* L. f. e *G. scapigera* Mart. (Amaranthaceae): uma discussão sobre bainha do feixe e endoderme na folha.

Kranz sheath ontogenesis of *Gomphrena arborescens* L. f. and *G. scapigera* Mart. (Amaranthaceae): a discussion about bundle sheath and endodermis in the leaf.

Natália Paganotti Antonucci e Gladys Flávia Albuquerque Melo de Pinna

2.1. Resumo

Desde a descrição de Haberlandt, a bainha “clorenquimatosa” mais interna que envolve os feixes vasculares de plantas com anatomia Kranz tem sido chamada de “bainha do feixe”, “bainha Kranz/células Kranz” e “PCR” (“photosynthetic carbon reduction”). As definições presentes na literatura para estes termos se referem ao papel dessa camada de concentrar CO₂ na fotossíntese C₄, independente de sua origem ontogenética. Estudos em monocotiledôneas têm demonstrado que a bainha de concentração de CO₂ pode se originar do meristema fundamental ou do procâmbio, enquanto poucos estudos nesse sentido foram desenvolvidos em eudicotiledôneas. O presente trabalho tem como objetivo discutir a terminologia adotada para descrever a anatomia Kranz, focando na importância de se utilizar termos que informem a origem ontogenética da bainha Kranz, e na necessidade de se realizar mais estudos abordando o desenvolvimento desta bainha em eudicotiledôneas. As espécies utilizadas nessa discussão foram *Gomphrena arborescens* e *G. scapigera* (Amaranthaceae). A metodologia empregada no estudo do desenvolvimento foliar foi infiltração de ápices caulinares em parafina, confecção e observação de secções seriadas. Nestas espécies, a bainha Kranz se origina da camada mais interna do meristema fundamental, a endoderme. O presente trabalho sugere que a discriminação da origem ontogenética da camada de concentração de CO₂ seja feita pelos termos “endoderme” e “periciclo”. O uso desses termos em folhas é sustentado por evidências anatômicas, histoquímicas e moleculares de que existe uma continuidade entre os tecidos de todos os órgãos da planta e, portanto, a endoderme e o periciclo estão presentes em todos os órgãos vegetativos (raiz, caule e folha).

Palavras-chave: anatomia Kranz, bainha do feixe, bainha Kranz, endoderme, desenvolvimento foliar.

2.2. Abstract

Since Haberlandt's description of the inner "chlorenchymatous" sheath that surrounds vascular bundles of plants with Kranz anatomy, this sheath has been referred as "bundle sheath", "Kranz sheath"/"Kranz cells" and "PCR" (photosynthetic carbon reduction). The definitions of these terms presented by the literature refer to the role of this layer as the place of CO₂-concentration, regardless of its ontogenetic origin. Some surveys in monocotyledons have shown that this layer can be originated from ground meristem or procambium, while just a few studies focusing on this subject were made in eudicotyledons. This work aims to discuss the terminology used for Kranz anatomy descriptions, focusing on the importance of using terms that inform the ontogenetic origin of the Kranz sheath, and on the necessity of studying the Kranz sheath development in eudicotyledons. The species used in this discussion were *Gomphrena arborescens* and *G. scapigera* (Amaranthaceae). The methodology applied to study the foliar development was the paraffin embedding of shoot apices, the confection and the observation of seriated sections. The Kranz sheath is originated from the inner layer of the ground meristem, the endodermis. The present work suggests that the ontogenetic origin of the CO₂-concentrating layer be made by terms such as "endodermis" and "pericycle". The use of these terms in leaves is supported by anatomical, histochemical and molecular evidences that there is a continuity of tissues among the plant organs and, so, endodermis and pericycle are present in all vegetative organs (root, stem and leaf).

Keywords: bundle sheath, endodermis, Kranz anatomy, Kranz sheath, leaf development.

2.3. Introdução

A anatomia Kranz, de acordo com sua primeira descrição, feita por Haberlandt, consiste em duas camadas de células que envolvem os feixes vasculares do tecido fotossintetizante (Haberlandt 1928, McKown e Dengler 2007). A disposição dessas camadas lembra a estrutura de uma coroa, por esse motivo foi utilizada a palavra Kranz para descrevê-la (*Kranz* [alem.] = coroa). Haberlandt (1928) se referiu a mais externa como uma camada de células fotossintetizantes radialmente orientadas (“layer of radially elongated photosynthetic cells”), e à interna, como bainha parenquimática (“parenchymatous sheath”). Mais de um século depois, essa camada interna passou a ser denominada de várias formas, como “bainha do feixe” (“bundle sheath”), “bainha Kranz” (“Kranz sheath”) ou “células Kranz” (“Kranz cells”) e “bainha PCR” (“Photosynthetic Carbon Reduction sheath”) (Dengler *et al.* 1985). A definição desses termos está relacionada com as funções que essa camada assume na fotossíntese C₄, como descarboxilação do ácido de quarto carbonos (malato ou aspartato), concentração de CO₂ e redução do carbono no ciclo de Calvin-Benson (Hatch *et al.* 1995, Dengler *et al.* 1985).

Estudos sobre a diferenciação da estrutura Kranz têm demonstrado que a camada de concentração de CO₂ pode apresentar distintas origens ontogenéticas, diferenciando-se a partir do meristema fundamental ou do procâmbio (Dengler *et al.* 1985). Portanto, tais camadas correspondem a diferentes tecidos que evoluíram semelhantes características morfológicas e fisiológicas, as quais permitem a concentração de CO₂ (Sage 2004). Diante do exposto, como poderíamos agregar informações ontogenéticas às descrições da estrutura Kranz, uma vez que os termos utilizados atualmente se referem apenas ao papel fisiológico dessa bainha? O presente trabalho teve como objetivo estudar o desenvolvimento da bainha Kranz em duas espécies de *Gomphrena*

L. (Amaranthaceae) e, a partir dos resultados, discutir os termos que têm sido utilizados para descrever a anatomia Kranz, focando no potencial de agregar, a essas descrições, informações ontogenéticas. Para isso, em um primeiro momento será discutida a presença da endoderme na folha. Em seguida, termos frequentemente utilizados na descrição da anatomia Kranz serão conceituados e discutidos. Por final, é proposto que as descrições de estruturas com anatomia Kranz objetivem averiguar não apenas a função dos tecidos na fotossíntese C₄, como também sua procedência ontogenética, buscando uma compreensão geral sobre a homologia dos tecidos em todos os grupos nos quais a anatomia Kranz foi descrita.

2.4. Material e Métodos

Representantes de *Gomphrena arborescens* L. f. e *Gomphrena scapigera* Mart. foram coletados em Diamantina, Minas Gerais (Brasil). Quatro ápices caulinares de cada espécie, dos quais folhas expandidas foram retiradas, foram fixados em formalina neutra tamponada (Lillie 1948 *apud* Clark 1981). Em seguida, os ápices foram desidratados em série etanólica até 50%, seguindo pela série de etanol-butanol e pela infiltração em parafina (Johansen 1940). Secções transversais e longitudinais seriadas (6-15µm) foram feitas em micrótomo rotativo Leica (RM 2145), coradas com azul de astra 1% em etanol 50% e fucsina básica 0,5% em etanol 50% (Kraus *et al.* 1998) e montadas entre lâmina e lamínula em bálsamo do Canadá. Além disso, a região mediana de folhas maduras (terceiro ou quarto nó) foi fixada em FAA (formaldeído, ácido acético e etanol 50% 1:1:18 v/v) e mantida em etanol 70% (Johansen 1940). Secções transversais, feitas à mão, foram coradas com azul de astra 1% e safranina 1% (9:1 v/v) em etanol 50% (Bukatsch 1972). Por final, os estágios representativos do desenvolvimento foliar e da diferenciação da anatomia Kranz na lâmina foliar foram

registrados por um sistema de digitalização de imagens (IM50) acoplado ao fotomicroscópio DMLB Leica.

2.5. Resultados e Discussão

2.5.1. Desenvolvimento da lâmina foliar

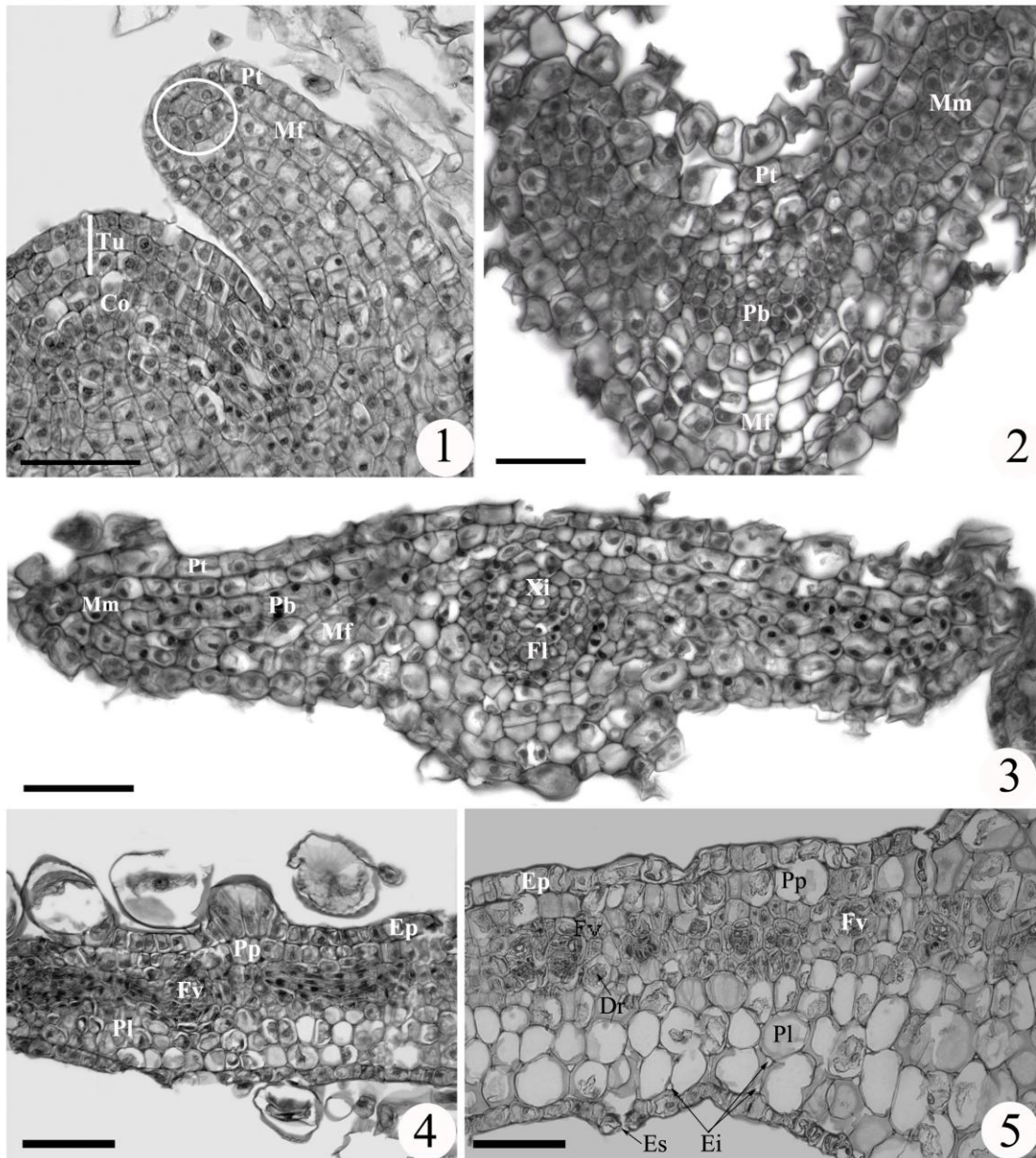
Ao estudar o início do desenvolvimento de uma folha, costuma-se também incluir a estrutura do promeristema, que é o responsável pela iniciação do primórdio foliar (Steeves e Sussex 1989). Além disso, o primórdio foliar e o promeristema são estruturas contínuas. Em *Gomphrena arborescens*, essa região meristemática pode ser dividida em duas zonas principais de acordo com a teoria de Schmidt (1924 *apud* Steeves e Sussex 1989): a túnica, com três camadas, onde divisões anticlinais são mais freqüentes do que periclinais, e o corpo, onde vários planos de divisões celulares são visualizados (figura 2.1). Ressalta-se que divisões periclinais foram observadas além das anticlinais na túnica. No presente trabalho, portanto, é assumida uma interpretação mais flexível da teoria de Schmidt, uma vez que o autor considera como túnica a camada que apresenta apenas divisões anticlinais (Steeves e Sussex 1989).

O primórdio foliar cresce nos flancos do domo apical por meio de sucessivas divisões que resultam em uma protuberância, o eixo do primórdio foliar (“leaf primordium buttress”). Apesar do estágio correspondente a estas divisões não ter sido observado nas espécies em estudo, segundo Clowes (1961) e Esau (1965), em algumas plantas, apenas a túnica é responsável pela iniciação do primórdio foliar e, em outras, tanto a túnica quanto o corpo podem assumir tal função. Enquanto a camada mais externa da túnica se diferencia em protoderme, as mais internas originam os outros meristemas apicais, o que pode ser visto na figura 2.1.

Nos primeiros estágios de crescimento do primórdio foliar, a célula subapical e suas derivadas imediatas podem ser visualizadas em secção longitudinal (figura 2.1). Estas células são pequenas, praticamente isodiamétricas, possuem núcleos grandes e vacúolos pequenos. Tais características são típicas de células meristemáticas, como apontado por Steeves e Sussex (1989). Este estágio corresponde ao crescimento apical, o qual resulta na formação do eixo foliar, onde mais tardiamente se desenvolverão a nervura central e o pecíolo (Esau 1965). Em secções transversais do primórdio foliar, é possível observar a protoderme, o meristema fundamental, o procâmbio e os meristemas marginais (figura 2.2). Em um estágio mais avançado, a diferenciação de xilema e floema ocorre primeiramente no feixe central, como descrito por Esau (1965), e os meristemas marginais produzem células em ambos os lados do eixo foliar, onde posteriormente se diferenciará a lâmina foliar (figura 2.3).

Durante o desenvolvimento da lâmina foliar, feixes laterais se diferenciam e células do parênquima paliçádico assumem seu formato característico, aparecendo como uma única camada de células retangulares, justapostas e com citoplasma denso (figura 2.4). A região abaxial do mesofilo, onde se desenvolverá o parênquima lacunoso, consiste em 2-3 camadas de células isodiamétricas, algumas com vacúolos visíveis em microscopia óptica (figura 2.4). Neste estágio, portanto, o caráter bifacial do mesofilo é determinado.

As fases descritas acima são caracterizadas pela grande diferenciação de tecidos. Segue-se, então, uma fase de pronunciada expansão tecidual, resultante de divisão e expansão celulares – crescimento intercalar (figura 2.5). Nesta fase, estômatos e drusas estão presentes e a separação das células do parênquima lacunoso se inicia, uma vez que pequenos espaços intercelulares começam a ser observados (figura 2.5). O mesofilo



Figuras 2.1-5. Desenvolvimento foliar de *Gomphrena arborescens* L. f. e *Gomphrena scapigera* Mart. 1. Secção longitudinal do ápice caulinar de *G. arborescens*, mostrando as regiões do promeristema (túnica e corpo) e as células meristemáticas responsáveis pelo crescimento apical do eixo do primórdio foliar (círculo). 2-3. Secções transversais da folha jovem de *G. scapigera*. 2. Meristemas apicais e marginais. 3. Primeiros estágios de diferenciação do feixe central e diferenciação dos meristemas apicais a partir dos meristemas marginais. 4-5. Secções transversais da lâmina foliar de *G. arborescens*. 4. Mesofilo bifacial. 5. Pronunciada expansão da lâmina foliar por crescimento intercalar; estômatos e drusas estão presentes. (Co = Corpo; Dr = Drusa; Ei = Espaços intercelulares; Ep = Epiderme; Es = Estômato; Fl = Floema; Fv = Feixe vascular; Mf = Meristema fundamental; Mm = Meristema marginal; Pb = Procâmbio; Pl = Parênquima lacunoso; Pp = Parênquima paliádico; Pt = Protoderme; Tu = Túnica; Xi = Xilema). Barras = 100µm (1); 50µm (2,3); 170µm (4,5).

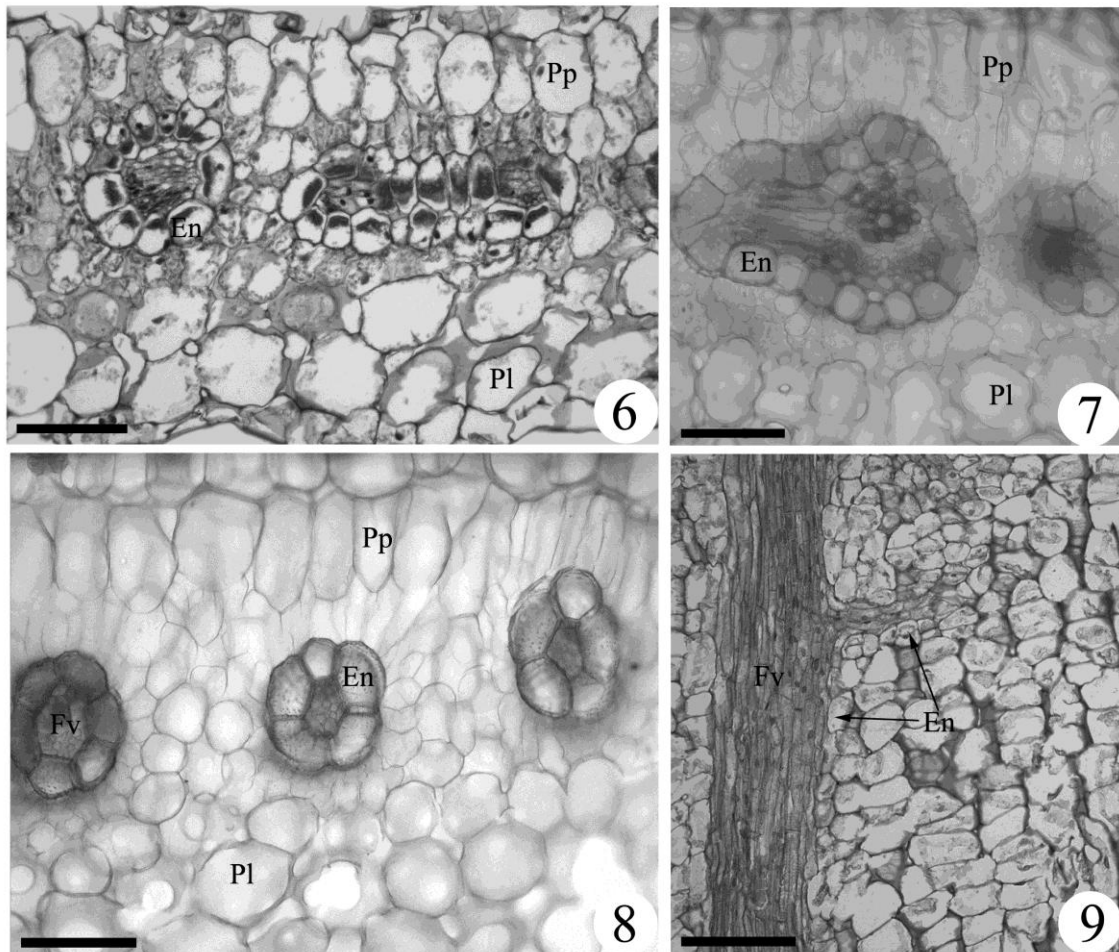
radialmente orientado que envolve os feixes vasculares ainda apresenta características meristemáticas (figura 2.5).

Depois da diferenciação dos tecidos vasculares, a camada mais interna originada pelo meristema fundamental, a endoderme, se diferencia na bainha Kranz, adquirindo formato característico, paredes espessadas e cloroplastos centripetamente concentrados (figuras 2.6-8). Além disso, a diferenciação do mesofilo radial ocorre (figuras 2.6-8). É possível observar a continuidade entre tecidos do feixe central para os laterais, incluindo a continuidade das células endodérmicas antes de apresentarem características de bainha Kranz (figura 2.9).

A folha madura de *Gomphrena arborescens* e *G. scapigera* apresenta um mesofilo radialmente orientado, um pequeno espaço intervenal e a endoderme diferenciada em bainha Kranz. A parede desta bainha é lignificada apenas em *G. arborescens* (figuras 2.7-8).

2.5.2. Endoderme versus bainha do feixe em folhas

A endoderme é a camada limítrofe entre córtex e sistema vascular. No entanto, esta camada pode assumir uma grande quantidade de caracteres anatômicos (Van Fleet 1950). Em órgãos aéreos, como folhas e caules, ela ocorre como “bainha do feixe”, “border parenchyma”, “bainha amilífera” ou “bainha de mestoma” (Van Fleet 1950). Em órgãos subterrâneos, principalmente raízes, a endoderme é caracterizada pela presença de estrias de Caspary, suberização das paredes e espessamento em U (Van Fleet 1961). Essas três últimas formas citadas correspondem aos diferentes estágios de desenvolvimento da endoderme em raízes (Van Fleet 1961, Lersten 1997, Lux e Luxová 2003), mas foram adotadas pelos anatomistas como características diagnósticas da



Figuras 2.6-9. 6-7. Estágios de diferenciação da síndrome Kranz em folhas de *Gomphrena scapigera* Mart. 6. Secção transversal de uma folha jovem, mostrando a diferenciação das células do mesofilo radial e das células endodérmicas em bainha Kranz. 7. Secção transversal da folha madura. 8. Secção transversal da folha madura de *Gomphrena arborescens* L. f., mostrando mesofilo bifacial e endoderme diferenciada em bainha Kranz. 9. Secção longitudinal da folha de *G. arborescens*, mostrando a continuidade da endoderme do feixe central ao lateral. (En = Endoderme; Fv = Feixe vascular; Pl = Parênquima lacunoso; Pp = Parênquima paliçádico). Barras = 100 μ m (6-9).

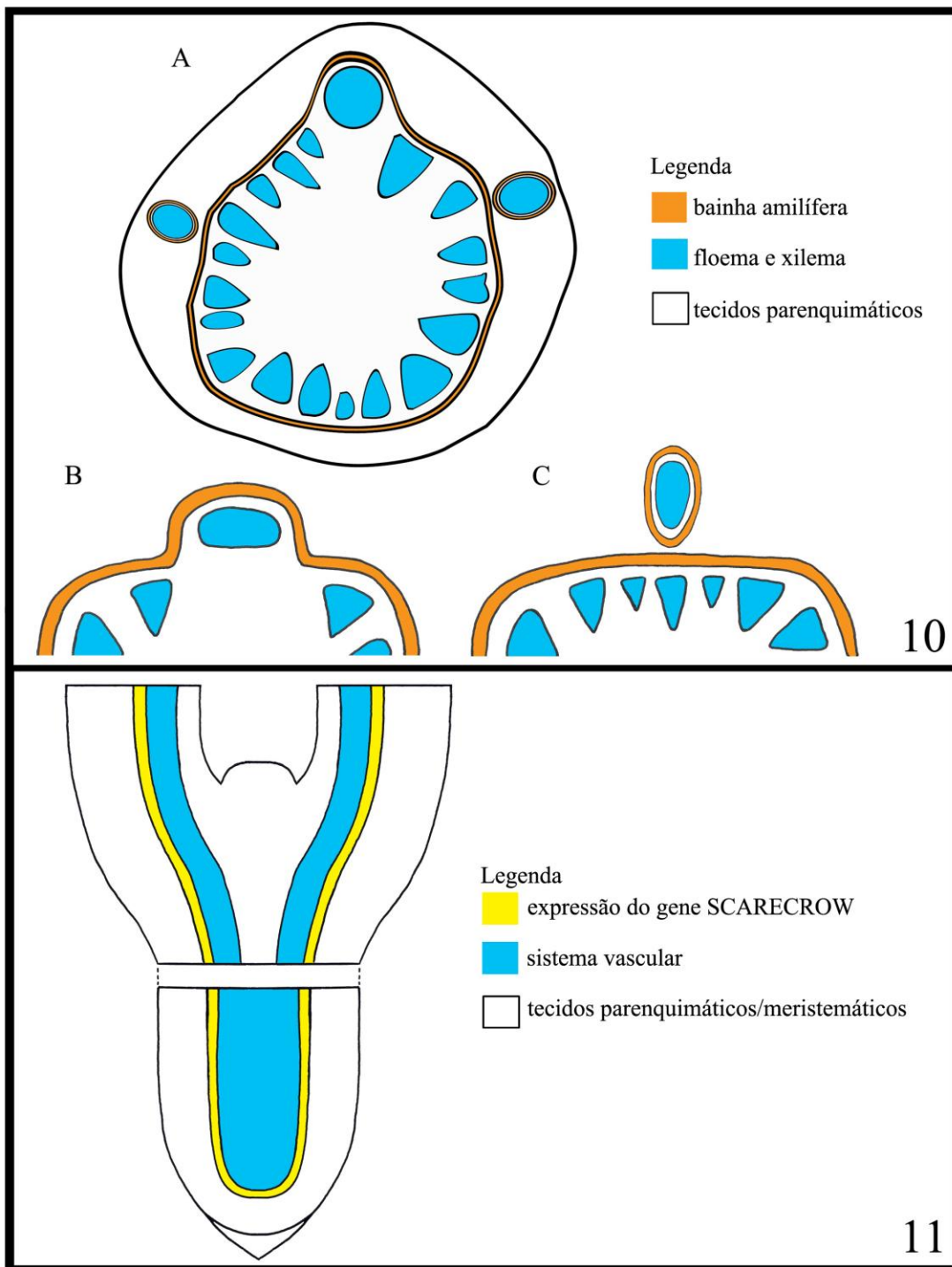
presença da mesma em plantas. Por esse motivo, a endoderme é amplamente aceita em raízes, mas não em caules e folhas.

Não obstante, alguns autores reconhecem sua presença nas folhas, mesmo quando nenhuma das características diagnósticas está presente (e.g. Haberlandt 1928, Avery 1933, Melo-de-Pinna e Menezes 2002, Arruda e Costa 2003, Menezes *et al.* 2003, Melo-de-Pinna 2004, Menezes *et al.* 2005). A maioria deles, entretanto, utiliza-se

de um termo amplamente utilizado em descrições anatômicas, “bainha do feixe”, quando a endoderme não apresenta tais características.

De acordo com Van Fleet (1961), o termo “endodermóide” foi primeiramente usado por von Guttenberg para descrever a camada interna do córtex que não apresenta estrias de Caspary ou lamela de suberina. Entretanto, este autor argumentou que o termo “endodermóide” significa “como a endoderme” e se restringe a aspectos morfológicos. Ele, então, sugere que a endoderme seja entendida como uma unidade metabólica ao invés de uma entidade morfológica na planta.

Algumas evidências anatômicas, histoquímicas e moleculares que sustentam essa idéia podem ser levantadas. A primeira delas diz respeito à teoria da continuidade dos tecidos entre os órgãos da planta. De acordo com ela, os tecidos de todos os órgãos estão conectados e, conseqüentemente, a endoderme e o periciclo estão presentes nos três órgãos vegetativos (raiz, caule e folha). Esta teoria tem sido demonstrada por Melo-de-Pinna e Menezes (2002), em Asteraceae, e Menezes *et al.* (2005), em monocotiledôneas. Pode-se demonstrar a conexão entre caule e folha em secções transversais da região nodal de, por exemplo, *Richterao polyphylla* (Baker) Roque, onde a endoderme aparece como uma bainha amilífera na camada mais interna do córtex do caule e no traço foliar (figura 2.10). A conexão entre caule e raiz, por sua vez, pode ser observada entre caules subterrâneos e raízes adventícias, como descrito por Menezes *et al.* (2005) no rizoma de algumas monocotiledôneas. A segunda evidência, de caráter histoquímico, baseia-se nas observações de Van Fleet (1950) que a composição química das células da bainha do feixe se assemelha à de uma endoderme típica, quando revelada por determinados reagentes, como o Sudan. Por último, a evidência molecular, que consiste na expressão do gene SCARECROW de uma forma contínua em todo o corpo da planta. Este gene promove a divisão assimétrica que



Figuras 2.10-11. Esquemas que demonstram a continuidade dos tecidos entre os órgãos da planta nos níveis anatômico e molecular. 10. Esquemas da região nodal de *Richtigo polyphylla* (Baker) Roque., mostrando a bainha amilífera (endoderme) no caule e no traço foliar (A). Detalhes da endoderme acompanhando o traço foliar na saída para vascularizar uma folha (B-C). Modificado de Melo-de-Pinna (2000). 11. Expressão do gene SCARECROW na camada mais interna do córtex/mesofilo de uma forma contínua entre raiz, caule e folha. A expressão deste gene ocorre em estágios de desenvolvimento diferentes na raiz e no caule da planta de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Modificado de Wysocka-Diller *et al.* (2000).

culmina na diferenciação da endoderme na raiz e no caule, na bainha amilífera na inflorescência e, também, na “bainha do feixe” em folhas maduras de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (figura 2.11) (Scheres e Benfey 1999, Wysocka-Diller *et al.* 2000).

Com relação às diferentes morfologias que a endoderme pode expressar, existem experimentos que indicam que o desenvolvimento (ou não) dos caracteres diagnósticos está mais relacionado com fatores ambientais do que com o fato da camada mais interna do córtex ser (ou não) a endoderme. Em um desses experimentos, células da bainha parenquimática de pecíolos desenvolveram estrias de Caspary e/ou lamela de suberina após serem submetidas ao escuro, uma condição semelhante ao desenvolvimento de um órgão subterrâneo (Van Fleet 1950). Em outro caso, estrias de Caspary foram observadas em caules de plantas estioladas, mas não em caules de plantas da mesma espécie crescidas em presença de luz (Bond 1935). Apesar da camada mais interna do córtex assumir diferentes atributos morfológicos em raízes, caules e folhas, é a endoderme e, por isso, apresenta o potencial de diferenciar os caracteres diagnósticos da raiz em caules e folhas dependendo do ambiente (Van Fleet 1950, 1961).

De acordo com o exposto, entendemos a endoderme como uma camada única e contínua localizada internamente no córtex e no mesofilo, ocorrendo, portanto, em raiz, caule e folha. Como o desenvolvimento da endoderme é muito influenciado pelas condições ambientais, ela pode expressar diferentes morfologias e fisiologias nos três diferentes órgãos (Van Fleet 1961). A endoderme da raiz exhibe os clássicos estágios de desenvolvimento (estrias de Caspary, lamela de suberina e espessamento de parede em U) (Van Fleet 1961); em caules e folhas ela normalmente aparece como bainha amilífera, bainha parenquimática, bainha do feixe “clorenquimatosa”, possuindo estrias de Caspary ou lamela de suberina (Van Fleet 1950, Lersten 1997, Menezes *et al.* 2003).

Poder-se-ia, então, especular sobre possíveis funções que a endoderme desempenha na folha e, para isso, será traçado um paralelo com a endoderme da raiz. Neste órgão, responsável pela absorção de água e nutrientes do solo, a endoderme seleciona as substâncias que vêm do córtex para o sistema vascular (Van Fleet 1961). Na folha, o principal órgão fotossintetizante na maioria dos vegetais, a endoderme foi muitas vezes descrita como uma “bainha clorenquimatosa” (“chlorenchymatous bundle sheath”), que possui cloroplastos e é capaz de realizar fotossíntese (Leegood 2008). A endoderme na folha (“bundle sheath”) também é responsável pela síntese e armazenamento de amido, formando a bainha amilífera (Van Fleet 1950, 1961, Leegood 2008).

Além disso, a folha é um órgão que apresenta variações na anatomia e na morfologia, devido ao seu desenvolvimento estar diretamente relacionado com condições ambientais (Fahn 1990, Raven *et al.* 2001). Dessa forma, a endoderme foliar pode assumir outras funções, dependendo do ambiente em que a planta está inserida. Como exemplo, temos algumas plantas C₄ que apresentam anatomia Kranz, o caso do milho (*Zea mays L.*). Nessa espécie, a bainha do feixe é originada pelo meristema fundamental (Bosabalidis *et al.* 1994) e se diferencia na bainha Kranz (Raven *et al.* 2001). Estrias de Caspary e lamela de suberina foram observadas na “bainha do feixe” do mesmo, sugerindo que esta camada corresponda à endoderme foliar (O’Brien e Carr 1970, Menezes *et al.* 2003). No presente estudo, a bainha do feixe de *Gomphrena arborescens* e *G. scapigera* é a endoderme, a qual provavelmente assume papel na concentração de CO₂ na fotossíntese C₄.

Considerando a presença de endoderme na folha, como poderíamos identificá-la na ausência dos caracteres diagnósticos? Para isso, existem outros critérios, como a bainha de amido (bainha amilífera, “starch sheath”), a topologia e a continuidade dos

tecidos entre os órgãos vegetais (figura 2.10). Em seguida, cada critério será detalhado, com exceção deste último, que já foi previamente explorado.

Como visto anteriormente, a endoderme foliar é capaz de sintetizar e armazenar amido, formando a bainha amilífera (Van Fleet 1950, 1961, Leegood 2008). Van Fleet (1950) reconheceu a bainha amilífera como um estágio das progressivas mudanças pelas quais a endoderme da folha e do pecíolo passa das condições de escuro para claro. Além disso, a bainha amilífera da inflorescência de *Arabidopsis thaliana* apresenta em comum com a endoderme da raiz a expressão do gene SCARECROW (Wysocka-Diller *et al.* 2000). Assim, a bainha amilífera pode ser entendida como um caráter diagnóstico da endoderme em órgãos aéreos, como caules e folhas (Van Fleet 1950) e já foi utilizada por alguns autores (e.g. Avery 1933, Van Fleet 1950, Melo-de-Pinna e Menezes 2002).

Apesar dos esforços para identificar a endoderme foliar por meio de caracteres morfológicos diagnósticos, existem plantas nas quais essa camada pode não desenvolver tais características, mantendo sua condição parenquimática. Isso é observado em *Lagenocarpus bracteosus* C.B. Clarke (Menezes *et al.* 2003). Neste caso, a endoderme deve ser reconhecida pela sua topologia, ou seja, como sendo a camada mais interna do córtex ou do mesofilo, podendo ser necessário o estudo do desenvolvimento dos tecidos na folha a fim de se confirmar a origem da bainha do feixe pela camada mais interna do meristema fundamental.

2.5.3. Definindo alguns termos relacionados com anatomia Kranz: “bainha do feixe”, “bainha Kranz” e “PCR”.

É importante definir termos de uma forma precisa, principalmente para se transmitir idéias claramente, evitando falsas interpretações. A definição de termos é

notavelmente importante na literatura sobre anatomia Kranz e fotossíntese C_4 , uma vez que esses assuntos dialogam duas disciplinas da botânica, a anatomia e a fisiologia. A clara definição de termos deve permitir um diálogo construtivo entre essas áreas, sem que haja termos vagos ou redundantes.

“Bainha do feixe” é um termo amplamente utilizado na literatura, podendo assumir diferentes significados. Nas descrições anatômicas em geral, é usado para descrever qualquer camada de células que envolvem os tecidos vasculares (Esau 1965). Em plantas que apresentam anatomia Kranz, é freqüente o uso desse termo para se referir à camada de células que circunda o feixe vascular e é especializada na concentração de CO_2 próximo ao sítio ativo da Rubisco (Tabela 2.1) (Hatch *et al.* 1995, Leegood 2008). No primeiro caso, a definição de “bainha do feixe” assume um caráter morfológico, enquanto no segundo, fisiológico. Por ser um termo que pode ser utilizado em descrições de plantas Kranz e não Kranz, para evitar ambigüidades, no presente trabalho será adotada a definição morfológica de Esau (1965).

Diferentemente do termo “bainha do feixe”, “bainha Kranz” e “PCR” são utilizados para descrever exclusivamente a anatomia Kranz. Eles também se referem à função de concentrar CO_2 na fotossíntese C_4 , ou seja, possuem um significado fisiológico (Tabela 2.1) (Brown 1975, Dengler *et al.* 1985). Dessa forma, “bainha Kranz” e “PCR” são termos adequados para se referir à camada de concentração de CO_2 num sentido fisiológico. Nesse trabalho, “bainha Kranz” foi o termo adotado, pois ele faz referência à estrutura foliar onde essa bainha é observada (a anatomia Kranz) e é utilizado por um maior número de autores (Tabela 2.1).

Algumas monocotiledôneas apresentam de uma a três bainhas do feixe, sendo que apenas uma delas desempenha o papel de bainha Kranz (Dengler *et al.* 1985, Leegood 2008, Martins *et al.* 2008). Em eudicotiledôneas cujas folhas são suculentas, a

bainha Kranz pode rodear mais de um feixe vascular, podendo ou não estar em direto contato com eles (Shomer-Ilan *et al.* 1975, Fisher *et al.* 1997, Muhaidat *et al.* 2007).

Todas as bainhas Kranz acima citadas correspondem anatomicamente ao mesmo tecido?

São todas elas ontogeneticamente homólogas?

Tabela 2.1. Termos mais utilizados, e suas definições, para descrever a camada que concentra CO₂ na fotossíntese C₄. Autores que aparecem em negrito adotaram mais de um termo em seu trabalho.

Termo	Definição	Autores
“Bainha PCR” (“Photosynthetic Carbon Reduction sheath”)	“[...] those specialized chlorenchymatous cells of C ₄ plants in which C ₄ acid decarboxylation and Calvin Cycle occur, irrespective of position within the leaf.” (Dengler <i>et al.</i> 1985).	Dengler <i>et al.</i> 1985, Muhaidat <i>et al.</i> 2007 , Soros & Dengler 2001, Sage 2004 , Sowiński <i>et al.</i> 2007
“Bainha do feixe” (“bundle sheath”)	“The function of the unique reactions of C ₄ photosynthesis is to concentrate CO ₂ in bundle sheath cells for assimilation via Rubisco” (Hatch <i>et al.</i> 1995)	Hatch <i>et al.</i> 1995, Ueno 1998, Sage <i>et al.</i> 2007, Sage 2004 , Muhaidat <i>et al.</i> 2007 , Voznesenskaya <i>et al.</i> 2002 , Gutierrez <i>et al.</i> 1974, Dai <i>et al.</i> 1993, Edwards <i>et al.</i> 2004, Akhani <i>et al.</i> 2008 , Ku <i>et al.</i> 1983, Leegood 2008, Sowiński <i>et al.</i> 2007 , McKown & Dengler 2007, Freitag & Stichler 2000 , Brown & Hattersley 1989, Kennedy <i>et al.</i> 1980, Nelson & Langdale 1992.
“Bainha Kranz”, “células Kranz” (“Kranz sheath”, “Kranz cells”)	“those cells of leaves that are specialized to carry out a specific part of the overall C ₄ photosynthesis” (Brown 1975).	Brown 1975, Voznesenskaya <i>et al.</i> 2002 , Akhani <i>et al.</i> 2008 , Kadereit <i>et al.</i> 2003, Freitag & Stichler 2000 , Rodrigues & Estelita 2003, Martins <i>et al.</i> 2008

Em Poaceae, sabe-se que a bainha Kranz pode ser diferenciada do meristema fundamental ou do procâmbio (Dengler *et al.* 1985, Soros e Dengler 2001). Em Cyperaceae, estudos têm demonstrado que a bainha Kranz tem origem apenas do

procâmbio (Soros e Dengler 2001, Rodrigues e Estelita 2003). No entanto, mais pesquisas são necessárias para comprovar que não existe uma variação nesse caráter, como ocorre em Poaceae. Em eudicotiledôneas, Esau (1965) afirmou que a bainha do feixe é única e corresponde à endoderme e, portanto, diferencia-se do meristema fundamental. Entretanto, podemos afirmar que a bainha Kranz de eudicotiledôneas é sempre originada pelo meristema fundamental pelo fato de apresentarem uma única bainha? Existem estudos suficientes sobre desenvolvimento foliar que foquem nesse problema?

Na verdade, essa é uma hipótese que ainda precisa ser testada, uma vez que existem poucos estudos sobre o desenvolvimento da bainha Kranz em eudicotiledôneas (e.g. *Atriplex L.*, Chenopodiaceae - Dengler *et al.* 1995) (Tabela 2.2). Apesar de Dengler *et al.* (1995) e o presente estudo indicarem que a bainha Kranz é originada da camada mais interna do meristema fundamental (a endoderme), uma variação pode ser esperada, pois ela já existe em Poaceae (Dengler *et al.* 1985, Bosabalidis *et al.* 1994).

Para que correspondências ontogenéticas sejam feitas entre bainhas Kranz de representantes de diferentes famílias, são necessários mais estudos de desenvolvimento do órgão fotossintetizante e, assim, da bainha Kranz. Para que esses estudos sejam feitos e que as descrições resultantes contenham informações fisiológicas e ontogenéticas, é necessário que os termos estejam bem definidos. O presente trabalho propõe que o termo “bainha de feixe” seja usado em um sentido morfológico e “bainha Kranz” ou “bainha PCR”, em fisiológico. Torna-se também importante utilizar nomes que expressem a origem ontogenética dessa bainha. Para isso, com base no que foi discutido acima, propomos o uso dos termos “endoderme” e “periciclo” para bainhas originadas do meristema fundamental e do procâmbio, respectivamente, tendo como

base os seguintes conceitos: 1. “bainha do feixe”, uma camada de parênquima compactamente arranjada, cujas células são alongadas no sentido radial do feixe; não

Tabela 2.2. Descrição de algumas espécies com base na terminologia proposta no presente trabalho.

Espécie	Família	Denominação	Origem ontogenética	Descrição proposta
<i>Panicum effusum</i> R. Br.	Poaceae	PCR	Meristema fundamental ^[1]	Endoderme/ bainha Kranz*
<i>Eleusine coracana</i> (L.) Gaertn.	Poaceae	PCR	Meristema fundamental ^[1]	Endoderme/ bainha Kranz*
<i>Panicum bulbosum</i> Kunth	Poaceae	PCR	Procâmbio ^[1]	Periciclo/ bainha Kranz*
<i>Cymbopogon procerus</i> (R.Br.) Domin.	Poaceae	PCR	Procâmbio ^[1]	Periciclo/ bainha Kranz*
<i>Digitaria brownii</i> (Roem. e Schult.) Hughes	Poaceae	PCR	Procâmbio ^[1]	Periciclo/ bainha Kranz*
<i>Aristida biglandulosa</i> J.M. Black	Poaceae	PCR/Inner sheath/bainha do feixe “clorenquimatosa”	Procâmbio ^[1]	Periciclo/ bainha Kranz*
<i>Zea mays</i> L.	Poaceae	Bainha do feixe	Meristema fundamental ^[2]	Endoderme/ bainha Kranz*
<i>Rhynchospora rubra</i> (Lour.) Makino	Cyperaceae	PCR/“mestome”	Procâmbio ^[3]	Periciclo/ bainha Kranz*
<i>Pycneus polystachyos</i> (Rottb.) P. Beauv.	Cyperaceae	PCR/“Inner border parenchyma of vascular tissue”	Procâmbio ^[3]	Periciclo/ bainha Kranz*
<i>Eleocharis vivípara</i> Link	Cyperaceae	PCR/“Inner border parenchyma of vascular tissue”	Procâmbio ^[3]	Periciclo/ bainha Kranz*
<i>Eleocharis retroflexa</i> (Poir.) Urb.	Cyperaceae	PCR/“Inner border parenchyma of vascular tissue”	Procâmbio ^[3]	Periciclo/ bainha Kranz*
<i>Atriplex rosea</i> L.	Chenopodiaceae	Bainha do feixe	Meristema fundamental ^[4]	Endoderme/ bainha Kranz*
<i>Gomphrena arborescens</i> L. f.	Amaranthaceae	Endoderme	Meristema fundamental	Endoderme/ bainha Kranz*
<i>Gomphrena scapigera</i> Mart.	Amaranthaceae	Endoderme	Meristema fundamental	Endoderme/ bainha Kranz*

^[1] Dengler *et al.* 1985, ^[2] Bosabalidis *et al.* 1994, ^[3] Soros e Dengler 2001, ^[4] Dengler *et al.* 1995.

*Ambos os termos que se referem ao papel dessa bainha na fotossíntese C₄ são válidos, bainha Kranz ou PCR. No presente trabalho, optou-se pelo primeiro.

fornece informação ontogenética ou fisiológica; 2. “bainha Kranz” ou “PCR”, uma bainha rica em cloroplastos, cujas células são especializadas na descarboxilação do ácido de quatro carbonos e na concentração de CO₂, etapas essenciais à fotossíntese C₄; tem caráter apenas fisiológico, não fornecendo informações ontogenéticas, pois pode se originar do meristema fundamental ou do procâmbio; 3. “endoderme”, células diferenciadas da camada mais interna do meristema fundamental que podem manifestar diversos padrões anatômicos: grãos de amido (bainha amilífera), espessamento de parede em U ou homogêneo (mestoma), estrias de Caspary, ou mesmo, permanecer parenquimática. O uso desse termo agrega significado ontogenético em descrições anatômicas, assim como ocorre com o uso de “periciclo” (4), que é formado por tecidos não condutores originados do procâmbio.

2.6. Conclusões

O presente trabalho apresenta um estudo sobre o desenvolvimento da lâmina foliar de *Gomphrena arborescens* e *G. scapigera*, de onde se conclui que a bainha Kranz dessas espécies se diferencia da camada mais interna produzida pelo meristema fundamental, a endoderme. Apesar da presença de endoderme na folha não ser amplamente aceita na comunidade científica, um crescente número de evidências anatômicas, histoquímicas e, recentemente, moleculares, têm argumentado a favor de uma teoria que diz que os tecidos são contínuos ao longo de todo o corpo da planta. A endoderme pode ser identificada em qualquer um dos órgãos vegetais por meio dos caracteres diagnósticos clássicos, como estrias de Caspary, lamela de suberina e espessamento de parede em U, mas também como bainha amilífera, por sua topografia (camada mais interna do córtex/mesofilo) ou pela continuidade dos tecidos entre dois

órgãos vegetais. Com base nesses argumentos, é proposta uma terminologia para as descrições de plantas que apresentam anatomia Kranz, a fim de se evitar termos ambíguos, melhorar o diálogo entre as diferentes áreas da botânica que trabalham com este assunto e utilizar informações sobre a origem da bainha Kranz.

2.7. Referências Bibliográficas

- AKHANI, H.; GHASEMKHANI, M.; CHUONG, S.D.X. & EDWARDS, G.E. 2008. Occurrence and forms of Kranz anatomy in photosynthetic organs and characterization of NAD-ME subtype C₄ photosynthesis in *Blepharis ciliaris* (L.) B. L. Burtt (Acanthaceae). *Journal of Experimental Botany* 59(7): 1755-1765.
- ARRUDA, R.C.O. & COSTA, A.F. 2003. Foliar anatomy of five *Vriesea* Sect. *Xiphion* (Bromeliaceae) species. *Selbyana* 24(2): 180-189.
- EVERY, G.S. 1933. Structure and development of the tobacco leaf. *American Journal of Botany* 20(9): 565-592.
- BOND, G. 1935. The endodermis in light-grown and etiolated shoots of the Leguminosae: a contribution to the causal study of differentiation in the plant. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh* 58: 409-425.
- BOSABALIDIS, A.M.; EVERT, R.F. & RUSSIN, W.A. 1994. Ontogeny of the vascular bundles and contiguous tissues in the maize leaf blade. *American Journal of Botany* 81(6): 745-752.
- BROWN, R.H. & HATTERSLEY, P.W. 1989. Leaf anatomy of C₃-C₄ species as related to evolution of C₄ photosynthesis. *Plant Physiology* 91: 1543-1550.
- BROWN, W.V. 1975. Variations in anatomy, associations, and origins of Kranz tissue. *American Journal of Botany* 63(4): 395-402.
- BUKATSCH, F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Microkosmos* 61(8): 255.
- CLARK, G. 1981. *Staining procedures*. Williams & Wilkins, London. 512 pp.
- CLOWES, F.A.L. 1961. *Apical meristems*. Vol. 2. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 217 pp.
- DAI, Z.; KU, M.S.B. & EDWARDS, G.E. 1993. C₄ photosynthesis: the CO₂-concentrating mechanism and photorespiration. *Plant Physiology* 103: 83-90.
- DENGLER, N.G.; DENGLER, R.E. & HATTERSLEY, P.W. 1985. Differing ontogenetic origins of PCR ("Kranz") sheaths in leaf blades of C₄ grasses (Poaceae). *American Journal of Botany* 72(2): 284-302.
- DENGLER, N.G.; DENGLER, R.E.; DONNELLY, P.M. & FILOSA, M.F. 1995. Expression of the C₄ pattern of photosynthetic enzyme accumulation during leaf development in *Atriplex rosea* (Chenopodiaceae). *American Journal of Botany* 82(3): 318-327.

- EDWARDS, G.E.; FRANCESCHI, V.R. & VOZNESENSKAYA, E.V. 2004. Single-cell C₄ photosynthesis versus the dual-cell (Kranz) paradigm. *Annual Reviews of Plant Biology* 55: 173-196.
- ESAU, K. 1965. *Plant anatomy*. 2^a ed. John Wiley & Sons, Inc., New York. 767 pp.
- FAHN, A. 1990. *Plant anatomy*. 4^a ed. Pergamon Press, Oxford. 588 pp.
- FISHER, D.D.; SCHENK, H.J.; THORSCH, J.A. & FERREN, W.A. 1997. Leaf anatomy and subgeneric affiliations of C₃ and C₄ species of *Suaeda* (Chenopodiaceae) in North America. *American Journal of Botany* 84(9): 1198–1210.
- FREITAG, H. & STICHLER, W. 2000. A remarkable new leaf type with unusual photosynthetic tissue in a central Asiatic genus of Chenopodiaceae. *Plant Biology* 2: 154-160.
- GUTIERREZ, M.; GRACEN, V.E. & EDWARDS, G.E. 1974. Biochemical and cytological relationships in C₄ plants. *Planta (Berl.)* 119: 279-300.
- HABERLANDT, G. 1928. *Physiological Plant Anatomy*. Trad. M. Drummond. Maximilian and Co. Ltda, London. 777 pp.
- HATCH, M.D.; AGOSTINO, A. & JENKINS, C.D.L. 1995. Measurement of the leakage of CO₂ from bundle-sheath cells of leaves during C₄ photosynthesis. *Plant Physiology* 108: 173-181.
- JOHANSEN, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. Mc Graw-Hill Book Co., New York. 523 pp.
- KADEREIT, G.; BORSCH, T.; WEISING, K. & FREITAG, H. 2003. Phylogeny of Amaranthaceae and Chenopodiaceae and the evolution of C₄ photosynthesis. *International Journal of Plant Sciences* 164: 959-986.
- KENNEDY, R.A.; EASTBURN, J.L. & JENSEN, K.G. 1980. C₃-C₄ photosynthesis in the genus *Mollugo*: structure, physiology and evolution of intermediate characteristics. *American Journal of Botany* 67(8): 1207-1217.
- KRAUS, J.E.; DE SOUZA, H.C.; REZENDE, M.H.; CASTRO, N.M.; VECHHI, C. & LUQUE, R. 1998. Astra blue and basic fuchsin double staining of plant materials. *Biotechnic & Histochemistry* 73:235-243.
- KU, M.S.B.; MONSON, R.K.; LITTLEJOHN, R.O.; NAKAMOTO, H.; FISHER, D.B. & EDWARDS, G.E. 1983. Photosynthetic characteristics of C₃-C₄ intermediate *Flaveria* species. I. Leaf anatomy, photosynthetic responses to O₂ and CO₂, and

- activities of key enzymes in the C₃ and C₄ pathways. *Plant Physiology* 71: 944-948.
- LEEGOOD, R.C. 2008. Roles of the bundle sheath cells in leaves of C₃ plants. *Journal of Experimental Botany* 59(7): 1663-1673.
- LERSTEN, N. R. 1997. Occurrence of endodermis with a Casparian strip in stem and leaf. *The Botanical Review* 63(3): 265-272.
- LUX, A. & LUXOVÁ, M. 2003. Growth and differentiation of root endodermis in *Primula acaulis* Jacq. *Biologia Plantarum* 47(1): 91-97.
- MARTINS, S.; MACHADO, S.R. & ALVES, M. 2008. Anatomia e ultra-estrutura foliar de *Cyperus maritimus* Poir. (Cyperaceae): estratégias adaptativas ao ambiente de dunas litorâneas. *Acta Botanica Brasilica* 22(2): 493-503.
- MCKOWN, A.D. & DENGLER, N.G. 2007. Key innovations in the evolution of Kranz anatomy and C₄ vein pattern in *Flaveria* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 94(3): 382-399.
- MELO-DE-PINNA, G.F.A. & MENEZES, N.L. 2002. Vegetative organ anatomy of *Ianthopappus corymbosus* Roque & Hind (Asteraceae-Mutisieae). *Revista Brasileira de Botânica* 25(4): 505-514.
- MELO-DE-PINNA, G.F.A. 2004. Anatomia foliar de *Richterago* Kuntze (Mutisieae, Asteraceae). *Acta Botanica Basilica* 18(3): 591-600.
- MENEZES, N.L.; SILVA, D.C. & MELO-DE-PINNA, G.F.A. 2003. Folha. In: *Anatomia Vegetal*. Eds. B. Appezzato-da-Glória & S.M. Carmello-Guerreiro. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa: 303-325.
- MENEZES, N.L.; SILVA, D.C.; ARRUDA, R.C.O.; MELO-DE-PINNA, G.F.; CARDOSO, V.A.; CASTRO, N.M.; SCATENA, V.L. & SCREMIN-DIAS, E. 2005. Meristematic activity of the endodermis and the pericycle in the primary thickening in monocotyledons. Considerations on the "PTM". *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 77(2): 259-274.
- MUHAI DAT, R.; SAGE, R.F. & DENGLER, N.G. 2007. Diversity of Kranz anatomy and biochemistry in C₄ eudicots. *American Journal of Botany* 94(3): 362-381.
- NELSON, T. & LANGDALE, J.A. 1992. Developmental genetics of C₄ photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 25-47.
- O'BRIEN, T.P. & CARR, D.J. 1970. A suberized layer in the cell walls of the bundle sheath of grasses. *Australian Journal of Biological Sciences* 23: 275-287.

- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F. & EICHHORN, S.E. 2001. *Biologia Vegetal*. 6^a ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro. 906 pp.
- RODRIGUES, A.C. & ESTELITA, M.E.M. 2003. Origin and structure of the Kranz tissue in bracts of *Cyperus giganteus* Vahl (Cyperaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 26(4): 445-452.
- SAGE, R. F. 2004. The evolution of C₄ photosynthesis. *New Phytologist* 161: 341–370.
- SAGE, R.F.; SAGE, T.L.; PEARCY, R.W. & BORSCH, T. 2007. The taxonomic distribution of C₄ photosynthesis in Amaranthaceae *sensu stricto*. *American Journal of Botany* 94(12): 1992-2003.
- SCHERES, B. & BENFEY, P.N. 1999. Asymmetric cell division in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 505–37.
- SHOMER-ILAN, A.; BEER, S. & WAISEL, Y. 1975. *Suaeda monoica*, a C₄ plant without typical bundle sheaths. *Plant Physiology* 56: 676-679.
- SOROS, C.L. & DENGLER, N.G. 2001. Ontogenetic derivation and cell differentiation in photosynthetic tissues of C₃ and C₄ Cyperaceae. *American Journal of Botany* 88(6): 992-1005.
- SOWIŃSKI, P.; BILSKA, A.; BARANSKA, K.; FRONK, J. & KOBUS, P. 2007. Plasmodesmata density in vascular bundles in leaves of C₄ grasses grown at different light conditions in respect to photosynthesis and photosynthate export efficiency. *Environmental and Experimental Botany* 61: 74-84.
- STEEVES, T.A. & SUSSEX, I.M. 1989. *Patterns in plant development*. 2^a ed. Cambridge University Press, New York. 388 pp.
- UENO, O. 1998. Immunogold localization of photosynthetic enzymes in leaves of various C₄ plants, with particular reference to pyruvate orthophosphate dikinase. *Journal of Experimental Botany* 49(327): 1637-1646.
- VAN FLEET, D.S. 1950. The cell forms, and their common substance reactions, in the parenchyma-vascular boundary. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 77(5): 340-353.
- VAN FLEET, D.S. 1961. Histochemistry and function of the endodermis. *The Botanical Review* 27(2): 165-220.
- VOZNESENSKAYA, E.V.; FRANCESCHI, V.R.; KIIRATS, O.; ARTYUSHEVA, E.G.; FREITAG, H. & EDWARDS, G.E. 2002. Proof of C₄ photosynthesis

without Kranz anatomy in *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae). *The Plant Journal* 31: 649-662.

WYSOCKA-DILLER, J.W.; HELARIUTTA, Y.; FUKAKI, H.; MALAMY, J.E. & BENFEY, P.N. 2000. Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development* 127: 595-603.

CAPÍTULO 3

Caracterização ultra-estrutural e bioquímica da síndrome Kranz em folhas de *Gomphrena arborescens* L. f. e *G. scapigera* Mart. (Amaranthaceae).

Ultrastructural and biochemical characterization of the Kranz syndrome in *Gomphrena arborescens* L. f. and *G. scapigera* Mart. leaves (Amaranthaceae).

Natália Paganotti Antonucci, Carlos Alberto Labate e Gladys Flávia Albuquerque Melo de Pinna.

3.1. Resumo

A síndrome Kranz é um conjunto de características, nos níveis anatômico, ultra-estrutural e bioquímico, que resultam na fotossíntese C_4 . Tal síndrome está presente de forma tão diversificada dentre as Angiospermas, que se fez necessária a avaliação de todos os níveis acima indicados para se obter uma completa caracterização da mesma. Portanto, o objetivo desse trabalho foi descrever, ultra-estrutural e bioquimicamente, a síndrome Kranz de *Gomphrena aborescens* e *G. scapigera*. Essas espécies pertencem à Amaranthaceae s.s., um grupo cuja diversidade de síndromes Kranz continua pouco explorada. Para ultra-estrutura e bioquímica, amostras foliares foram coletadas de plantas crescidas em campo. A análise ultra-estrutural se deu pela infiltração destas amostras em resina Spurr, seguida pela confecção e observação de secções semi e ultrafinas. A análise bioquímica foi conduzida testando-se anticorpos específicos contra as enzimas de descarboxilação (NAD-ME, NADP-ME e PEP-CK) em Western Blot. Foram observados caracteres ultra-estruturais que possivelmente interferem na fotossíntese C_4 , seja diminuindo o efluxo de CO_2 da bainha Kranz (espessamento e composição da parede da bainha Kranz e posicionamento centrípeto dos cloroplastos) ou melhorando o transporte de metabólitos entre os tecidos da anatomia Kranz (retículo periférico nos cloroplastos). Embora a análise bioquímica tenha resultado em informações ainda não conclusivas, o dimorfismo dos cloroplastos sugere a realização do tipo NADP-ME de fotossíntese C_4 , já descrito na literatura para outras duas espécies de *Gomphrena*.

Palavras-chave: anatomia Kranz, bainha Kranz, cloroplasto, fotossíntese C_4 , ultra-estrutura.

3.2. Abstract

The Kranz syndrome is a set of features at the levels of the anatomy, of the ultrastructure and of the biochemistry, which results in the C₄ photosynthesis. This syndrome is so diversified among Angiosperms that it has become necessary the survey of all the levels cited above for its complete characterization. Therefore, the aim of this work was to describe, ultrastructural and biochemically, the Kranz syndrome of *Gomphrena aborescens* e *G. scapigera*. These species belong to Amaranthaceae s.s., a group which has the Kranz syndrome diversity still poorly studied. Leaf samples were collected from field-grown plants for ultrastructural and biochemical analyses. The methods for ultrastructural survey were the Spurr resin embedding of leaf samples, followed by the confection and the observation of semi and ultra-thin sections. The biochemical analysis was conducted by the use of specific antibodies against the decarboxylation enzymes (NADP-ME, NAD-ME and PEP-CK) in Western Blot. Some ultrastructural features that possibly interfere in C₄ photosynthesis by reducing the CO₂ efflux from Kranz sheath (wall thickening and composition of Kranz sheath cells and the centripetal position of chloroplasts) or by improving the metabolite transport between the Kranz anatomy tissues (peripheral reticulum in chloroplasts) were observed. Although the biochemical analysis resulted in no conclusive information, the chloroplast dimorphism suggests the NADP-ME C₄ photosynthesis, as has already been showed for two *Gomphrena*.

Keywords: chloroplast, C₄ photosynthesis, Kranz anatomy, Kranz sheath, ultrastructure.

3.3. Introdução

A síndrome Kranz consiste em uma série de características anatômicas, ultra-estruturais e bioquímicas que resultam em um conjunto de manifestações fisiológicas e ecológicas (Tregunna *et al.* 1970) verificadas em representantes de 19 famílias dentre monocotiledôneas e eudicotiledôneas (Sage 2004). As manifestações fisiológicas decorrem da realização da fotossíntese C_4 e, dentre elas, podem-se citar a alta temperatura-ótima para o crescimento, o baixo ponto de compensação de CO_2 , a pequena inibição da fotossíntese pela concentração de O_2 e a pouca fotorrespiração (Tregunna *et al.* 1970, Dai *et al.* 1993). A manifestação ecológica se resume na ocorrência dessas plantas predominantemente em ambientes com temperatura elevada, alta salinidade, aridez e intensa luminosidade (Ehleringer e Monson 1993, Sage 2004).

Até o final do século XX, apenas plantas C_4 com anatomia Kranz haviam sido descritas. Nesse período, a relação entre forma (anatomia Kranz) e função (fotossíntese C_4) era muito forte, sendo a presença da primeira utilizada para diagnosticar a segunda (Edwards *et al.* 2004). No entanto, a descrição de variadas combinações entre anatomia, ultra-estrutura e bioquímica (Carolín *et al.* 1978), bem como a descoberta de formas intermediárias entre fotossíntese C_3 e C_4 (Ku *et al.* 1983) e de plantas que fazem fotossíntese C_4 em apenas uma célula (Voznesenskaya *et al.* 2001), fez necessário que todos os aspectos, anatômicos, ultra-estruturais e bioquímicos, fossem avaliados a fim de se obter uma completa caracterização da síndrome Kranz de uma espécie. Provavelmente, essa variedade de formas de se alcançar o metabolismo C_4 seja resultado das inúmeras origens independentes deste processo dentre as Angiospermas (Edwards *et al.* 2004, Sage 2004).

Caracterizar uma síndrome Kranz quanto à anatomia consiste em diagnosticar a existência da anatomia Kranz. Na presença desta, descrever o arranjo dos tecidos, a

distância entre os feixes vasculares, a composição e o espessamento das paredes da bainha Kranz, entre outras características (e.g. Menezes *et al.* 1969, Fank-de-Carvalho e Graciano-Ribeiro 2005, McKown e Dengler 2007, Muhaidat *et al.* 2007). A caracterização ultra-estrutural consiste, basicamente, na descrição do dimorfismo dos cloroplastos da bainha Kranz e do mesofilo e de outras variações estruturais que podem interferir na fotossíntese C_4 , como a presença de retículo periférico no cloroplasto e da lamela de suberina na parede da bainha Kranz (e.g. O'Brien e Carr 1970, Carolin *et al.* 1978, Fisher e Evert 1982, Estelita-Teixeira e Handro 1984, Kim e Fisher 1990). Além disso, o dimorfismo dos cloroplastos sugere o tipo de fotossíntese C_4 que a planta realiza (Gutierrez *et al.* 1974, Edwards *et al.* 2004). No entanto, análises bioquímicas devem ser feitas para confirmação (Carolin *et al.* 1978).

A corroboração bioquímica pode ser realizada por várias metodologias. A discriminação dos isótopos de carbono indica se a planta é C_3 ou C_4 (e.g. Tregunna *et al.* 1970, Sage *et al.* 2007, Akhani *et al.* 2008), assim como a análise dos primeiros produtos produzidos pela fotossíntese (e.g. Hatch e Slack 1966, Hatch *et al.* 1967, Tregunna *et al.* 1970, Repo e Hatch 1976, Glagoleva *et al.* 1992), a análise do ponto de compensação de CO_2 (e.g. Tregunna *et al.* 1970) e de outros aspectos fisiológicos presentes na síndrome (e.g. Voznesenskaya *et al.* 2002). Entretanto, para caracterizar o tipo de fotossíntese C_4 , devem-se utilizar técnicas que identifiquem as enzimas de descarboxilação mais ativas ou a quantidade relativa entre seus substratos (malato x aspartato). Como exemplo dessas técnicas, podem-se citar o uso de anticorpos em Western Blot ou em imunolocalização *in situ* (e.g. Ueno 1998, Voznesenskaya *et al.* 2002, Akhani *et al.* 2008), o ensaio enzimático (e.g. Gutierrez *et al.* 1974, Repo e Hatch 1976, P'yankov *et al.* 1997, Voznesenskaya *et al.* 2002) e a quantificação de malato e aspartato (Leegood 2002).

Normalmente, tais análises bioquímicas para determinação do tipo de fotossíntese C₄ utilizam plantas crescidas e mantidas em casa de vegetação com condições abióticas controladas, como temperatura e luminosidade (e.g. Gutierrez *et al.* 1974, Ueno 2001, Voznesenskaya *et al.* 2002). Se, por um lado, análises desse tipo permitem que o metabolismo de diferentes plantas seja comparado, pois as condições de crescimento foram as mesmas; por outro, tornam algumas análises lentas devido ao período de crescimento e, em alguns casos, à aclimação das plantas trazidas do campo para a casa de vegetação. No entanto, pode ser que exista um desvio no metabolismo de plantas crescidas em condições controladas quando comparado ao metabolismo de plantas em condições naturais, como já foi sugerido para outros eventos fisiológicos, como a senescência foliar (Munné-Bosch e Alegre 2004).

Em Amaranthaceae *s.s.* estima-se a existência de cinco linhagens independentes de fotossíntese C₄ (Sage *et al.* 2007), o que sugere uma variedade de arranjos anatômicos, ultra-estruturais e bioquímicos. Embora Carolin *et al.* (1978) tivessem salientado que a maioria dos estudos anatômicos de ampla abrangência dentre a ordem Caryophyllales se concentravam em Chenopodiaceae, Kadereit *et al.* afirmaram, em 2003, que anatomia de Amaranthaceae *s.s.* continuava inexplorada. Sage *et al.* (2007) também chamaram a atenção para o pouco que se conhece sobre a distribuição da fotossíntese C₄ nesse grupo.

Carolin *et al.* (1978) registraram que a maioria dos grupos de Amaranthaceae *s.s.* compreende representantes com anatomia Kranz. Por outro lado, estes autores ressaltaram que essas espécies foram estudadas apenas em nível anatômico e, por isso, não seria possível tirar conclusões acerca do tipo de fotossíntese que realizam sem evidências ultra-estruturais e bioquímicas. Sobre *Gomphrena*, existem trabalhos que abordam aspectos ultra-estruturais, como o de Estelita-Teixeira e Handro (1984) e

Carolin *et al.* (1978), que notaram paredes mais espessadas na bainha Kranz e um dimorfismo entre cloroplastos que sugere fotossíntese C₄ do tipo NADP-ME. No entanto, apenas duas espécies foram estudadas bioquimicamente para a classificação do tipo de fotossíntese C₄, *Gomphrena celosioides* Mart. e *G. globosa* L., espécies NADP-ME (Hart e Tregunna 1971, Gutierrez *et al.* 1974).

O presente trabalho caracteriza a síndrome Kranz de duas espécies de *Gomphrena* L. (Amaranthaceae), focando nos aspectos ultra-estruturais e bioquímicos, uma vez que a anatomia já foi descrita em outros trabalhos (Handro 1964, Fank-de-Carvalho e Graciano-Ribeiro 2005, Antonucci e Melo-de-Pinna, em prep.). A análise bioquímica para confirmação do tipo de fotossíntese C₄ foi feita em plantas coletadas diretamente do campo, como será detalhado mais a frente.

3.4. Material e Métodos

3.4.1. Microscopia eletrônica de transmissão

Observações anatômicas e ultra-estruturais foram feitas em amostras de 1-2 mm² da região mediana de folhas do terceiro ou quarto nó de *Gomphrena arborescens* L. f. e *G. scapigera* Mart. coletadas em Diamantina - MG. Três amostras por espécie foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% (v/v) e glutaraldeído 1% (v/v) em tampão fosfato 0,2 M (Karnovsky 1965), pós-fixadas em OsO₄ (tetróxido de ósmio) 1%, desidratadas em série de acetona e embebidas em resina Spurr. Secções foram feitas em ultra-micrótomo Leica Ultracut UCT. As semi-finas foram coradas com Azul de Toluidina (O'Brien *et al.* 1964 *apud* Kraus e Arduin 1997) e as ultra-finas, contrastadas com acetato de uranila aquosa e citrato de chumbo. Utilizou-se o microscópio eletrônico

de transmissão (MET) ZEISS EM900 do Laboratório de Microscopia do IB (USP), operando em 80 KV.

3.4.2. Identificação da principal enzima de descarboxilação

Folhas completamente expandidas de *Gomphrena arborescens* e *G. scapigera* foram coletadas em Diamantina-MG, imediatamente fixadas em nitrogênio líquido e conservadas em temperatura de -80°C. *Amaranthus viridis* L. e *Zea mays* L., como controles de plantas C₄ do tipo NAD-ME (Ueno 2001) e NADP-ME (Gutierrez *et al.* 1974), respectivamente, crescidas em condições não controladas na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Piracicaba-SP), tiveram suas folhas coletadas e imediatamente fixadas em nitrogênio líquido.

As proteínas totais foram extraídas das folhas maduras de *Amaranthus viridis*, *Gomphrena scapigera*, *Gomphrena arborescens* e *Zea mays* de acordo com o protocolo de extração de Hurkman e Tanaka (1986). Folhas (1,5 g) foram maceradas em nitrogênio líquido, homogeneizadas em 15 mL de tampão de extração (0,7 M sacarose; 0,5 M Tris-HCl pH 7,5; 50 mM EDTA; 0,1 M KCl; 1% w/v PVPP; 2% v/v 2-mercaptoetanol e 2 mM PMSF) em agitador por 15 min a 4°C. Acrescentou-se 15 ml de fenol saturado com Tris-HCl (pH 8,5) à suspensão de proteínas e seguiu-se à agitação por 15 min a 4°C. Centrifugou-se por 30 min, 10000g a 4°C. A fase fenólica foi recuperada e misturada em 1,5 g de folha macerada homogeneizada em 15 ml de tampão de extração para repetição dos passos anteriores. Após centrifugação, a fase fenólica foi novamente recuperada, misturada a 5 volumes de acetato de amônio 0,1 M em metanol para precipitação das proteínas e mantida *overnight* a -20°C. As amostras foram centrifugadas (30 min, 16000g a 4°C) e o pellet lavado três vezes com acetato de amônio 0,1 M em metanol e uma vez com acetona 100%. O pellet foi seco sob vácuo a

4°C e re-suspendido em 1 ml de tampão de solubilização (7 M uréia; 2 M tiouréia; 0,4% v/v Triton X-100; 4% w/v CHAPS; 10 mM DTT; 1% v/v IPGBuffer pH 3–10) (Hurkman e Tanaka 1986).

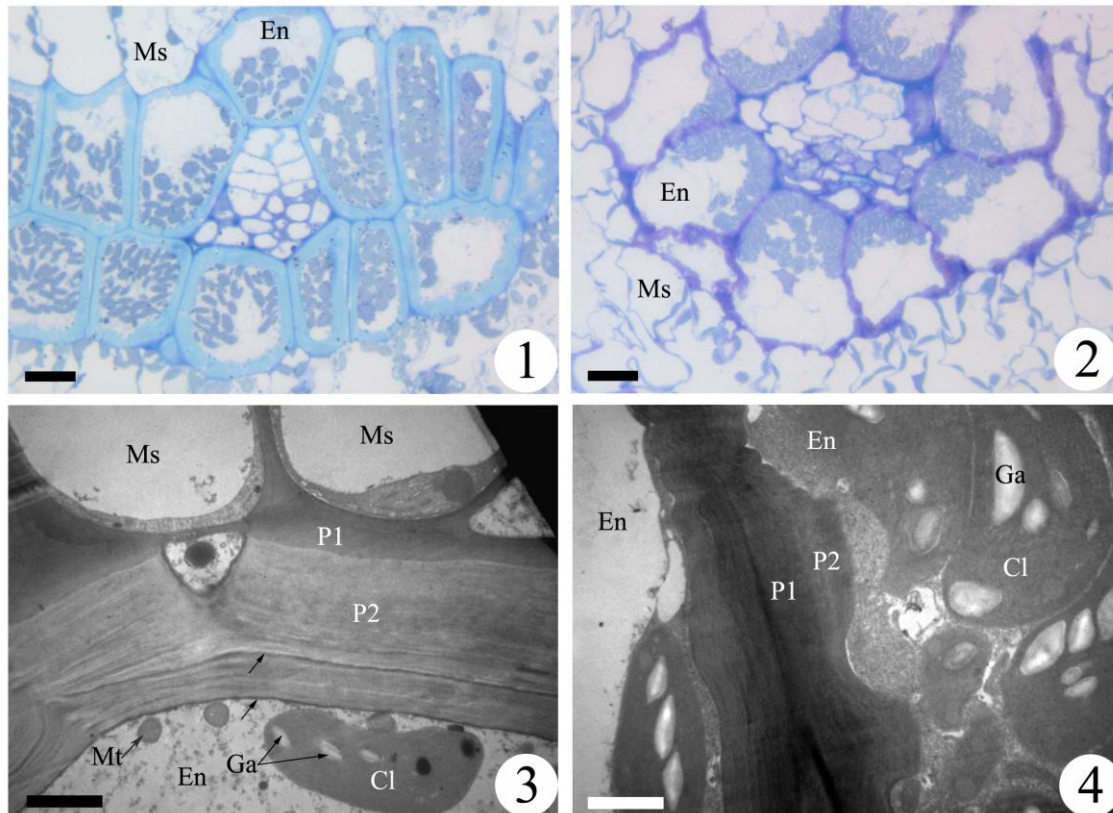
Eletroforese (SDS-PAGE) foi realizada em um gel vertical homogêneo de 12,5% de acrilamida (12,5% Acrilamida/Bis; 1,5 M Tris/HCl pH 8,8; 5,5% Persulfato de Amônio e 0,075% TEMED) conforme Laemmli (1970). A separação das proteínas por eletroforese foi realizada a 10°C, em uma cuba modelo PROTEIN II XI 2-D Cell (BioRad).

A identificação da enzima de descarboxilação (NAD-ME, NADP-ME ou PEP-CK) presente em maior quantidade nas espécies em estudo foi feita por meio da técnica de Western Blot na Escola de Ciências Biológicas da Universidade de Washington (EUA). Para isso, as proteínas foram transferidas dos géis de acrilamida para membranas de PVDF (“polyvinylidene fluoride”) por eletroblotting. As membranas foram incubadas em solução bloqueadora (leite desnatado 3% em TBST) e depois com os anticorpos específicos nas seguintes concentrações: anti-NAD-ME (de *Amaranthus hypochondriacus*, 1:5000), anti-NADP-ME (de *Zea mays*, doação de Carlos S. Andreo, 1:10000) e anti-PEP-CK (de *Panicum maximum*, doação de Richard C. Leegood, 1:10000). Por final, foram incubadas com o anticorpo para revelação (IgG conjugado à fosfatase-alcalina) segundo Lara *et al.* (2008).

3.5. Resultados

3.5.1. Microscopia eletrônica de transmissão

Em cortes semi-finos de *Gomphrena arborescens* e *G. scapigera*, visualizados em microscopia de luz, observou-se a bipolaridade das células da bainha Kranz,

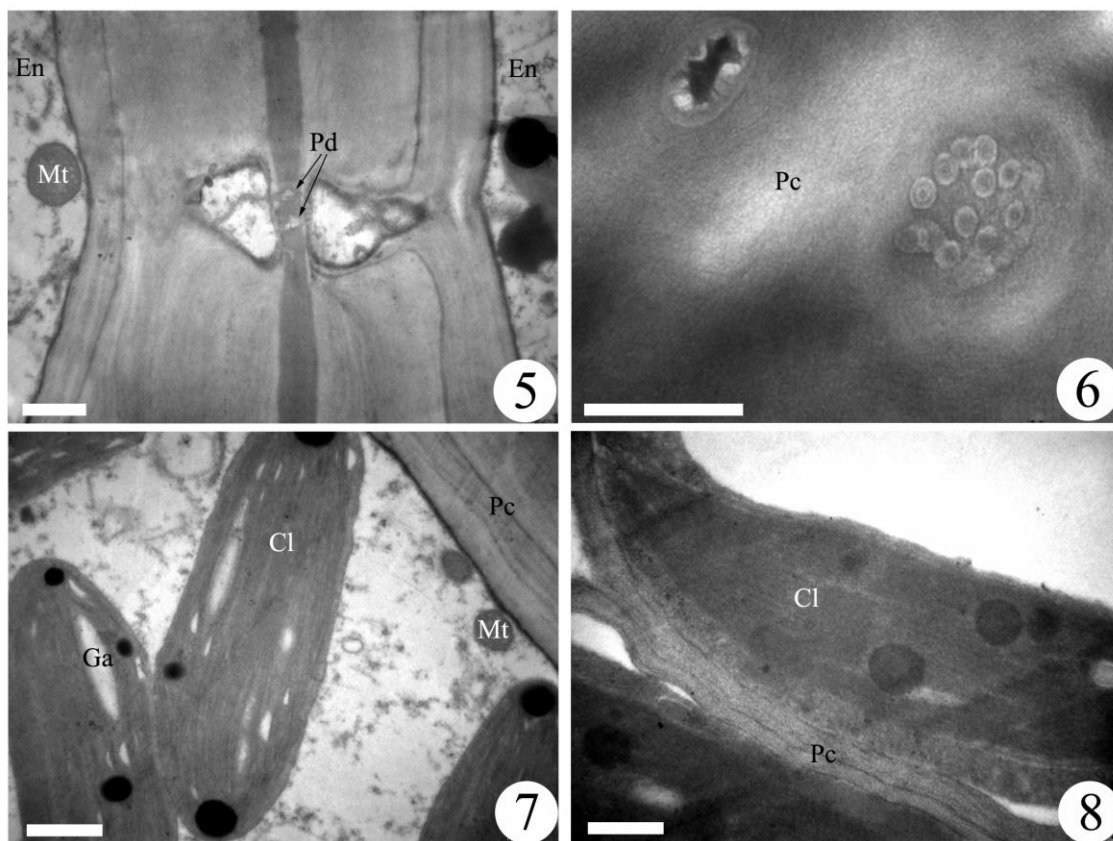


Figuras 3.1-4. 1-2. Secções transversais da folha, obtidas em microscopia óptica, evidenciando a bipolaridade das células da bainha Kranz (endoderme). 1. *Gomphrena arborescens* L. f. 2. *Gomphrena scapigera* Mart. 3-4. Eletromicrografias de transmissão evidenciando a parede celular da bainha Kranz com espessamentos primário e secundário. 3. *G. arborescens*. Notar possível deposição de suberina (setas) na porção mais interna da parede. 4. *G. scapigera*. (Cl = Cloroplasto; En = Endoderme; Ga = Grão de amido; Ms = Mesofilo; Mt = Mitocôndria; P1 = Parede celular primária; P2 = Parede celular secundária). Barras = 10 μ m (1,2); 2 μ m (3,4).

evidenciada pela concentração de organelas centripetamente localizadas (figuras 3.1-2).

Na parede das células da endoderme, em ultra-estrutura, a região elétron-densa corresponde à parede primária, enquanto a região menos elétron-densa corresponde à parede secundária (figuras 3.3-4). O espessamento de parede secundária observado em *Gomphrena arborescens* é mais pronunciado do que em *G. scapigera*. (figuras 3.3-4). Essa diferença pode inclusive ser notada em microscopia de luz (figuras 3.1-2). Na parede secundária da endoderme de *Gomphrena arborescens* se observa, em algumas regiões, linhas elétron-densas posicionadas na região mais próxima ao lúmen celular (figura 3.3). Essas linhas provavelmente correspondem à deposição de suberina

(Estelita-Teixeira M.E., com. pes.). Na figura 3.5 é possível observar a presença de um par de pontoações entre duas células da endoderme e, na figura 3.6, os plasmodesmos em vista frontal. Os cloroplastos da bainha Kranz (endoderme) e do mesofilo de ambas as espécies apresentam retículo periférico. Além disso, na bainha Kranz eles contêm poucos grana e muitos grãos de amido (figura 3.3-4, 3.7), enquanto que no mesofilo apresentam grande quantidade de grana e poucos grãos de amido (figura 3.8).



Figuras 3.5-8. Eletromicrografias de transmissão. 5. Secção longitudinal de um par de pontoações em *Gomphrena arborescens* L. f. 6. Visão frontal de uma pontoação com cerca de 11 plasmodesmos em *Gomphrena scapigera* Mart. 7. Cloroplasto com poucos grana e rico em grãos de amido na bainha Kranz de *G. arborescens*. 8. Cloroplasto rico em grana nas células do mesofilo de *G. scapigera*. (Cl = Cloroplasto; En = Endoderme; Ga = Grão de amido; Mt = Mitocôndria; Pc = Parede celular; Pd = Plasmodesmo). Barras = 1µm (5,7); 0,5 µm (6,8).

3.5.2. Identificação da principal enzima de descarboxilação

Houve forte ligação dos anticorpos anti-NAD-ME com as proteínas de *Amaranthus viridis*, o que pode ser visualizado pela banda visível no primeiro quadro

da figura 3.9. No segundo e no terceiro quadros da mesma figura, pode-se observar a forte reação dos anticorpos anti-NADP-ME e anti-PEP-CK com as proteínas de *Zea mays*. No entanto, nenhuma banda foi visualizada nas colunas respectivas às espécies em estudo, *Gomphrena arborescens* e *G. scapigera*.

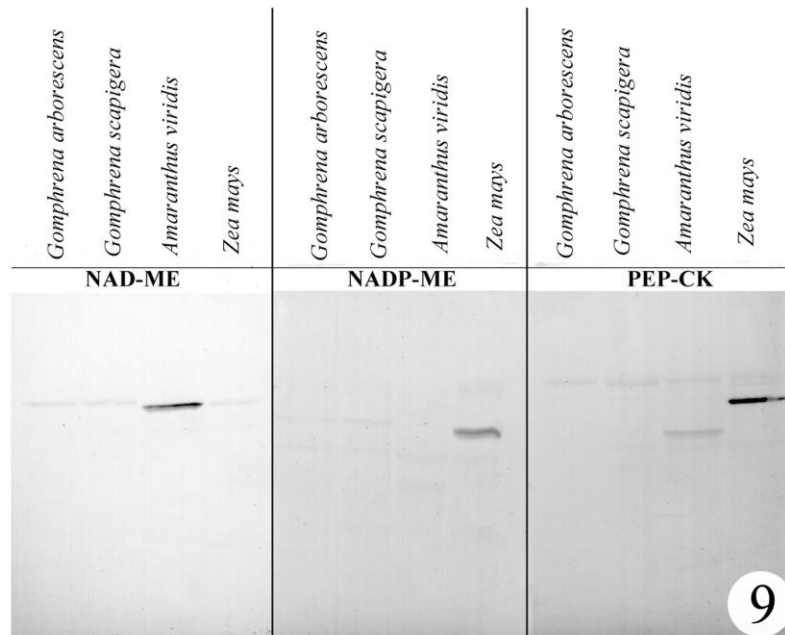


Figura 3.9. Western Blot para a identificação do tipo de fotossíntese C_4 , realizado em *Gomphrena arborescens* L. f. e *G. scapigera* Mart. *Amaranthus viridis* L. e *Zea mays* L. foram utilizadas como plantas-controle dos tipos NAD-ME e NADP-ME, respectivamente (Gutierrez *et al.* 1974, Ueno 2001). Os anticorpos usados foram anti-NADP-ME, anti-NAD-ME e anti-PEP-CK. A banda observada na coluna de *A. viridis* foi formada pela ligação dos anticorpos anti-NAD-ME com as respectivas proteínas dessa espécie, corroborando o tipo NAD-ME do fotossíntese C_4 . As bandas observada em *Z. mays* confirmam o tipo NADP-ME. Notar a ausência de bandas evidentes nas duas espécies em estudo. Novas tentativas serão conduzidas para a identificação do tipo de fotossíntese C_4 das *Gomphrena* em questão.

3.6. Discussão

A anatomia foliar de *Gomphrena arborescens* (sin. *G. officinalis*) já foi previamente descrita em Handro (1964) e em Fank-de-Carvalho e Graciano-Ribeiro (2005). Fank-de-Carvalho e Graciano-Ribeiro (2005) discutem que o padrão radial do mesofilo, a presença da bainha parenquimática lignificada em torno dos feixes vasculares e a distribuição de amido, principalmente nas células da bainha, predispõem

a espécie para realização de fotossíntese C₄. Antonucci e Melo-de-Pinna (em prep.) observaram em *Gomphrena scapigera* características semelhantes às descritas para *G. arborescens*, evidenciando uma estrutura Kranz nas unidades vasculares da lâmina foliar.

As paredes da bainha Kranz de ambas as espécies se apresentam espessadas. O grau de espessamento destas paredes pode ter implicações fisiológicas, uma vez que se acredita que esse seja um dos fatores que exerça papel como barreira à difusão de CO₂ de volta para o mesófilo (Nelson e Langdale 1992, von Caemmerer e Furbank 2003, Edwards *et al.* 2004). Em recente trabalho com *Flaveria* Juss. (Asteraceae), McKown e Dengler (2007) classificaram as espécies estudadas em C₃, C₃-C₄ ou C₄ de acordo com uma análise qualitativa da anatomia foliar. Os autores observaram que as espécies classificadas como C₄ pareciam possuir paredes mais espessadas do que aquelas classificadas como C₃ ou C₃-C₄. von Caemmerer e Furbank (2003) explicaram que a difusão do CO₂ por entre a parede celular é mais “tortuosa” do que através de um líquido puro. Portanto, paredes mais espessas tornariam a difusão desse gás mais lenta. No entanto, os autores (loc. cit.) ressaltaram que, apesar de se acreditar que as paredes da bainha Kranz de espécies C₄ são normalmente mais espessas que a de plantas C₃, tal fato nem sempre se aplica.

Sobre a composição das paredes da bainha Kranz, Press (1999) afirmou que as diferentes paredes que constituem os variados tipos de bainha Kranz se distinguem pela capacidade de reter o CO₂ em seu interior. Cita-se como exemplo a bainha Kranz de espécies NAD-ME, que são menos resistentes ao escape de CO₂, provavelmente devido à ausência de lamela de suberina em sua composição. Linhas elétron-densas, observadas na parede de *Gomphrena arborescens*, provavelmente correspondem à deposição de suberina (Estelita-Teixeira M.E., com. pes.). Os testes histoquímicos realizados por

Fank-de-Carvalho e Graciano-Ribeiro (2005) não evidenciaram tal deposição nas paredes da bainha Kranz. No entanto, os reagentes utilizados em histoquímica possuem a desvantagem de não apresentarem especificidade por uma determinada substância (Kraus e Arduin 1997), impossibilitando a detecção isoladamente de suberina. Além disso, esses reagentes também não possuem sensibilidade suficiente para evidenciar um composto presente em pequena quantidade (Brundrett *et al.* 1988).

Para melhor caracterizar essas linhas elétron-densas presentes na parede da bainha Kranz de *Gomphrena arborescens*, secções ultrafinas serão submetidas à análise de microscopia eletrônica de transmissão com microsonda, a fim de se identificar a composição dessa substância. Ressalta-se que a presença de lamela de suberina ainda não foi registrada em eudicotiledôneas (Dengler e Nelson 1999, Leegood 2002, von Caemmerer e Furbank 2003). No entanto, “fibrilas escurecidas” ou “estruturas estriadas”, descritas na parede celular da bainha Kranz de algumas dessas espécies (e.g. Carolin *et al.* 1978, von Caemmerer e Furbank 2003), poderiam também atuar como uma barreira à difusão de CO₂ (von Caemmerer e Furbank 2003).

Em todas as espécies de *Gomphrena* analisadas ultra-estruturalmente (Carolin *et al.* 1978, Estelita-Teixeira e Handro 1984), incluindo *Gomphrena arborescens* e *G. scapigera*, um retículo periférico foi observado nos cloroplastos da bainha Kranz e do mesofilo. O retículo periférico consiste em uma série de túbulos anastomosados, localizados periféricamente no estroma do cloroplasto (Rosado-Alberio *et al.* 1968). Eles são contínuos com a membrana interna do envelope e são visualizados com maior frequência em plantas C₄, apesar de estarem também presentes em C₃ (Rosado-Alberio *et al.* 1968, Leegood 2007). Acredita-se que o retículo periférico tenha papel na otimização do transporte de metabólitos entre citoplasma e cloroplasto e, conseqüentemente, entre as células do mesofilo e da bainha Kranz (Rosado-Alberio *et*

al. 1968, Gracen *et al.* 1972). Essa função é essencial à realização fotossíntese C₄, uma vez que a divisão de tarefas entre os dois tecidos requer uma transferência eficiente de produtos entre os mesmos.

A posição das organelas, principalmente cloroplastos, nas células da bainha Kranz das espécies em estudo se mostrou centrípeta. Tal posicionamento provavelmente é mantido pelo sistema actina-miosina do citoesqueleto celular (Kobayashi *et al.* 2009) e não varia de acordo com condições ambientais, como luminosidade, salinidade e estresse hídrico (Yamada *et al.* 2009). Importância tem sido dada ao posicionamento dessas organelas dentro das células da bainha Kranz como forma de diagnosticar o tipo de fotossíntese C₄ (Gutierrez *et al.* 1974). No entanto, esse caráter se aplica com maior funcionalidade em monocotiledôneas, pois a maioria das eudicotiledôneas apresenta cloroplastos localizados centripetamente na bainha Kranz, independentemente do tipo de fotossíntese C₄ (Gutierrez *et al.* 1974, Nelson e Langdale 1989, Edwards e Walker, 1983). Dessa forma, o posicionamento dos cloroplastos da bainha Kranz não pode ser considerado para a determinação do tipo de fotossíntese C₄ em eudicotiledôneas (Carolin *et al.* 1978) e, portanto, nas espécies em estudo. Não obstante, esse posicionamento pode ser entendido como mais uma forma de obstáculo à difusão do CO₂ para o mesófilo. Isso acontece devido à localização centrípeta dos cloroplastos e ao grande vacúolo das células da bainha Kranz, o que faz com que as moléculas de CO₂ liberadas por descarboxilação nos cloroplastos, assim como aquelas liberadas na fotorrespiração, percorram um caminho longo e restrito às pontes citoplasmáticas até alcançar o mesófilo foliar (Voznesenskaya *et al.* 2002, von Caemmerer e Furbank 2003, Sage 2004).

Ao contrário do posicionamento dos cloroplastos na bainha Kranz de eudicotiledôneas, o dimorfismo em nível ultra-estrutural entre os tecidos que compõem

a anatomia Kranz é uma boa evidência para a caracterização do tipo de fotossíntese C_4 , pois ele tem uma relação direta com o requerimento energético dos diferentes sistemas bioquímicos (NADP-ME, PEP-CK e NAD-ME) (Voznesenskaya *et al.* 1999, 2002, Edwards *et al.* 2004). Os cloroplastos da bainha Kranz (endoderme) de ambas as espécies contêm poucos grana, enquanto os cloroplastos das células do mesofilo apresentam grande quantidade de grana, o que sugere que essas espécies utilizam principalmente as enzimas NADP-málicas na descarboxilação. O mesmo foi observado por Estelita-Teixeira e Handro (1984) em *Gomphrena decipiens* Mart., *G. macrocephala* St. Hil. e *G. prostrata* Mart. No entanto, é importante que uma confirmação bioquímica seja feita.

O desenvolvimento de pesquisas com plantas coletadas diretamente do campo permite a análise do metabolismo realizado em condições naturais de ocorrência das mesmas e torna as análises mais rápidas, pois independe do período de crescimento e aclimatação da plantas. Com base nessa proposta, e com objetivo de confirmar a informação prévia sobre o tipo de fotossíntese C_4 fornecida pelo dimorfismo dos cloroplastos, a corroboração bioquímica em Western Blot está sendo feita em plantas coletadas diretamente do campo. Como controles, utilizaram-se plantas também coletadas em campo, cujo tipo de fotossíntese C_4 já havia sido identificado em plantas crescidas em casa de vegetação. Os resultados até o momento não foram satisfatórios, pois os anticorpos não revelaram bandas bem definidas nas duas espécies de interesse. Prováveis causas para o observado são pequena quantidade relativa de proteínas de descarboxilação no extrato de proteínas totais, problemas durante a extração ou de diferença na estrutura da proteína.

Novas análises serão conduzidas com uma maior quantidade de proteínas totais na membrana para Western Blot e a extração das proteínas totais refeita. Caso os

anticorpos continuem a não reconhecer as proteínas das plantas em estudo, uma alternativa seria isolar as proteínas de descarboxilação de um gel de duas dimensões, seqüenciar seus aminoácidos e comparar com as mesmas proteínas de *Zea mays* e *Amaranthus viridis*, a fim de se verificar se as estruturas são diferentes.

Apesar dos resultados bioquímicos ainda não corroborarem aqueles obtidos em ultra-estrutura sobre o tipo de fotossíntese C₄ de *Gomphrena arborescens* e *G. scapigera*, é interessante ressaltar que a determinação do tipo de fotossíntese C₄ de plantas de *Zea mays* e *Amaranthus viridis* coletadas em campo corroboraram as análises feitas com plantas das mesmas espécies crescidas em condições controladas por Gutierrez *et al.* (1974) e Ueno (2001), respectivamente. Em *Amaranthus viridis*, observou-se uma forte banda apenas na membrana em que foram utilizados anticorpos anti-NAD-ME, o que nos permite inferir que a principal enzima de descarboxilação atuante nessa espécie é a NAD-ME (Ueno 2001). Em *Zea mays*, Gutierrez *et al.* (1974) observaram alta atividade da enzima PEP-CK, além da NADP-ME, assim como no presente estudo, em que uma forte banda de anticorpos anti-PEP-CK também foi observada. Em plantas NADP-ME, a enzima PEP-CK pode muitas vezes atuar como uma descarboxilase secundária (Edwards e Walker, 1983), o que explica os resultados acima descritos e nos permite classificá-la como uma planta NADP-ME.

Tais resultados sugerem que o tipo de fotossíntese C₄ não deve alterar de acordo com as condições ambientais, uma vez que a determinação em plantas crescidas em condições não controladas corroborou aquelas feitas em plantas crescidas em condições controladas. Apesar de poucos estudos terem sido feitos a esse respeito, ressalta-se o de P'yankov *et al.* (1997), que verificaram que o tipo de fotossíntese C₄ realizado por *Salsola australis* R. Br. é o NADP-ME, independente da altitude em que essa planta se encontra. Segundo os autores, tal variação nas condições ambientais, apesar de não

alterar o tipo de fotossíntese C₄, modifica a atividade das enzimas envolvidas na fotossíntese, como PEPc, Rubisco e NADP-ME, resultando, portanto, numa alteração da taxa fotossintética.

3.7. Conclusões

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a síndrome Kranz de duas espécies de *Gomphrena*, *G. arborescens* e *G. scapigera*, focando nos aspectos ultra-estruturais e bioquímicos, uma vez que os anatômicos foram previamente descritos em outros trabalhos (Handro 1964, Fank-de-Carvalho e Graciano-Ribeiro 2005, Antonucci e Melo-de-Pinna em prep.). A caracterização ultra-estrutural se deu, basicamente, pelo levantamento dos prováveis fatores que interferem na fotossíntese C₄ nessas espécies, com base no que está presente na literatura sobre o assunto, assim como pela sugestão do tipo de fotossíntese C₄ com base no dimorfismo dos cloroplastos da bainha Kranz e do mesofilo.

As possíveis barreiras à difusão de CO₂ atuantes nessas espécies são o espessamento e a composição da parede da bainha Kranz e a posição dos cloroplastos centripetamente localizados, resultando num longo caminho de difusão do CO₂ até o mesofilo. Em *G. arborescens*, especificamente, ocorrem estriações na parede da bainha Kranz, um fator que pode exercer obstáculo à difusão do CO₂. A presença de retículo periférico nos cloroplastos da bainha Kranz e do mesofilo representa uma estratégia que resulta no aperfeiçoamento do transporte de metabólitos entre os dois tecidos da anatomia Kranz. O dimorfismo entre os cloroplastos, por sua vez, sugere a realização do tipo NADP-ME de fotossíntese C₄ nas duas espécies, uma vez que cloroplastos com menor quantidade de grana estão presentes na bainha Kranz (Gutierrez *et al.* 1974). No entanto, como confirmações bioquímicas sobre o tipo de fotossíntese C₄ são necessárias

(Carolin *et al.* 1978), optou-se por fazê-la por meio do uso de anticorpos específicos para as enzimas de descarboxilação em Western Blot a partir de plantas coletadas diretamente do campo. Apesar da confirmação bioquímica sobre o tipo de fotossíntese C₄ para as espécies em estudo não ter ocorrido, pois não houve clara ligação dos anticorpos com as proteínas das mesmas, o tipo de fotossíntese das espécies utilizadas como controle para os tipos NAD-ME e NADP-ME, *Amaranthus viridis* e *Zea mays*, respectivamente, corroboraram os estudos prévios, feitos em casa de vegetação (Gutierrez *et al.* 1974, Ueno 2001), sugerindo que o tipo de fotossíntese C₄ não varia de acordo com as condições do ambiente (P'yankov *et al.* 1997).

3.8. Referências Bibliográficas

- AKHANI, H.; GHASEMKHANI, M.; CHUONG, S.D.X. & EDWARDS, G.E. 2008. Occurrence and forms of Kranz anatomy in photosynthetic organs and characterization of NAD-ME subtype C₄ photosynthesis in *Blepharis ciliaris* (L.) B. L. Burt (Acanthaceae). *Journal of Experimental Botany* 59(7): 1755-1765.
- BRUNDRETT, M.C.; ENSTONE, D.E. & PETERSON, C.A. 1988. A berberine-aniline blue fluorescent staining procedure for suberin, lignin, and callose in plant tissue. *Protoplasma* 146: 133-142.
- CAROLIN, R.C.; JACOBS, S.W.L. & VESK, M. 1978. Kranz cells and mesophyll in the Chenopodiales. *Australian Journal of Botany* 26: 683-698.
- DAI, Z.; KU, M.S.B. & EDWARDS, G.E. 1993. C₄ photosynthesis: the CO₂-concentrating mechanism and photorespiration. *Plant Physiology* 103: 83-90.
- DENGLER, N.G. & NELSON, T. 1999. Leaf structure and development in C₄ plants. *In: C₄ Plant Biology*. Eds. R.F. Sage & R.K. Monson. Academic Press, Colorado: 133-172.
- EDWARDS, G.E. & WALKER, D. 1983. *C₃, C₄: mechanisms, and cellular and environmental regulation, of photosynthesis*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 542 pp.
- EDWARDS, G.E.; FRANCESCHI, V.R. & VOZNESENSKAYA, E.V. 2004. Single-cell C₄ photosynthesis versus the dual-cell (Kranz) paradigm. *Annual Reviews of Plant Biology* 55: 173-196.
- EHLERINGER, J.R. & MONSON, R.K. 1993. Evolutionary and ecological aspects of photosynthetic pathway variation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 411-439.
- ESTELITA-TEIXEIRA, M.E. & HANDRO, W. 1984. Leaf ultrastructure in species of *Gomphrena* and *Pfaffia* (Amaranthaceae). *Canadian Journal of Botany* 62: 812-817.
- FANK-DE-CARVALHO, S. & GRACIANO-RIBEIRO, D. 2005. Arquitetura, anatomia e histoquímica das folhas de *Gomphrena arborescens* Lf. (Amaranthaceae). *Acta Botanica Brasilica* 19: 377-390.
- FISHER, D.G. & EVERT, R.F. 1982. Studies on the leaf of *Amaranthus retroflexus* (Amaranthaceae): chloroplast polymorphism. *Botanical Gazette* 143(2): 146-155.

- GLAGOLEVA, T.A.; CHULANOVSKAYA, M.V.; PAKHOMOVA, M.V.; VOZNESENSKAYA, E.V. & GAMALEI, Y.V. 1992. Effect of salinity on the structure of assimilating organs and ^{14}C labeling patterns in C_3 and C_4 plants of Ararat plain. *Photosynthetica* 26(3): 363-369.
- GRACEN, V.E.J.; HILLIARD, J.H.; BROWN, R.H. & WEST, S.H. 1972. Peripheral reticulum in chloroplasts of plants differing in CO_2 fixation pathways and photorespiration. *Planta* 107(3): 189-204.
- GUTIERREZ, M.; GRACEN, V.E. & EDWARDS, G.E. 1974. Biochemical and cytological relationships in C_4 plants. *Planta (Berl.)* 119: 279-300.
- HANDRO, W. 1964. Contribuição ao estudo da venação e anatomia foliar das Amaranáceas dos Cerrados. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 36: 479-499.
- HART, A.L. & TREGUNNA, E.B. 1971. Some aspects of environmental control of the photosynthetic apparatus in *Gomphrena globosa*. In: *Photosynthesis and photorespiration*. Eds. M.D. Hatch; C.B. Osmond & R.O. Slatyer. Wiley Interscience, New York: 413-418.
- HATCH, M.D. & SLACK, C.R. 1966. Photosynthesis by sugar-cane leaves. A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. *Biochemical Journal* 101: 103-111.
- HATCH, M.D.; SLACK, C.R. & JOHNSON, H.S. 1967. Further studies on a new pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation in sugar-cane and its occurrence in other plant species. *Biochemical Journal* 102: 417-422.
- HURKMAN, W.J. & TANAKA, C.K. 1986. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiology* 81: 802-806.
- KADEREIT, G.; BORSCH, T.; WEISING, K. & FREITAG, H. 2003. Phylogeny of Amaranthaceae and Chenopodiaceae and the evolution of C_4 photosynthesis. *International Journal of Plant Sciences* 164: 959-986.
- KARNOVSKY, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cellular Biology* 27: 137-138.
- KIM, I. & FISHER, D.G. 1990. Structural aspects of the leaves of seven species of *Portulaca* growing in Hawaii. *Canadian Journal of Botany* 68: 1803-1811.

- KOBAYASHI, H.; YAMADA, M.; TANIGUCHI, M.; KAWASAKI, M.; SUGIYAMA, T. & MIYAKE, H. 2009. Differential positioning of C₄ mesophyll and bundle sheath chloroplasts: recovery of chloroplast positioning requires the actomyosin system. *Plant Cell Physiology* 50(1): 129-140.
- KRAUS, J.E. & ARDUIN, M. 1997. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Editora Universidade Rural, Seropedica. 198pp.
- KU, M.S.B.; MONSON, R.K.; LITTLEJOHN, R.O.; NAKAMOTO, H.; FISHER, D.B. & EDWARDS, G.E. 1983. Photosynthetic characteristics of C₃-C₄ intermediate *Flaveria* species. I. Leaf anatomy, photosynthetic responses to O₂ and CO₂, and activities of key enzymes in the C₃ and C₄ pathways. *Plant Physiology* 71: 944-948.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680-685.
- LARA, M.V.; OFFERMANN, S.; SMITH, M.; OKITA, T.W.; ANDREO, C.S. & EDWARDS, G.E. 2008. Leaf development in the single-cell C₄ system in *Bienertia sinuspersici*: expression of genes and peptide levels for C₄ metabolism in relation to chlorenchyma structure under different light conditions. *Plant Physiology* 148: 593-610.
- LEEGOOD, R.C. 2002. C₄ photosynthesis: principles of CO₂ concentration and prospects for its introduction into C₃ plants. *Journal of Experimental Botany* 53(369): 581-590.
- LEEGOOD, R.C. 2007. C₄ photosynthesis: minor or major adjustments to a C₃ theme? *In: Charting new pathways to C₄ rice*. Eds. J.E. Sheehy, P.L. Mitchell & B. Hardy. World Scientific, Cingapura: 81-94.
- MCKOWN, A.D. & DENGLER, N.G. 2007. Key innovations in the evolution of Kranz anatomy and C₄ vein pattern in *Flaveria* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 94(3): 382-399.
- MENEZES, N.L.; HANDRO, W. & CAMPOS, J.F.B.M. 1969. Estudos anatômicos em *Pfaffia jubata* Mart. *Boletim da Faculdade de Filosofia da Universidade de São Paulo, Botânica* 24: 197-237.
- MUHAI DAT, R.; SAGE, R.F. & DENGLER, N.G. 2007. Diversity of Kranz anatomy and biochemistry in C₄ eudicots. *American Journal of Botany* 94(3): 362-381.

- MUNNÉ-BOSCH, S. & ALEGRE, L. 2004. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology* 31: 203-216.
- NELSON, T. & LANGDALE, J.A. 1989. Patterns of leaf development in C₄ plants. *The Plant Cell* 1: 3-13.
- NELSON, T. & LANGDALE, J.A. 1992. Developmental genetics of C₄ photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 25-47.
- O'BRIEN, T.P. & CARR, D.J. 1970. A suberized layer in the cell walls of the bundle sheath of grasses. *Australian Journal of Biological Sciences* 23: 275-287.
- PRESS, M. 1999. The functional significance of leaf structure: a search for generalizations. *New Phytologist* 143: 213-219.
- P'YANKOV, V.I.; VOZNESENSKAYA, E.V.; KONDRATSCHUK, A.V. & BLACK, C.C. 1997. A comparative anatomical and biochemical analysis in *Salsola* (Chenopodiaceae) species with and without a Kranz type leaf anatomy: a possible reversion of C₄ to C₃ photosynthesis. *American Journal of Botany* 84(5): 597-606.
- REPO, E. & HATCH, M.D. 1976. Photosynthesis in *Gomphrena celosioides* and its classification amongst C₄-pathway plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 3(6): 863-876.
- ROSADO-ALBERIO, J.; WEIER, T.E. & STOCKING, C.R. 1968. Continuity of the chloroplast membrane systems in *Zea mays* L. *Plant Physiology* 43(9): 1325-1331.
- SAGE, R.F. 2004. The evolution of C₄ photosynthesis. *New Phytologist* 161: 341-370.
- SAGE, R.F.; SAGE, T.L.; PEARCY, R.W. & BORSCH, T. 2007. The taxonomic distribution of C₄ photosynthesis in Amaranthaceae *sensu stricto*. *American Journal of Botany* 94(12): 1992-2003.
- TREGUNNA, E.B.; SMITH, B.N.; BERRY, J.A. & DOWNTOWN, W.J.S. 1970. Some methods for studying the photosynthetic taxonomy of the angiosperms. *Canadian Journal of Botany* 48: 1209-1214.
- UENO, O. 1998. Immunogold localization of photosynthetic enzymes in leaves of various C₄ plants, with particular reference to pyruvate orthophosphate dikinase. *Journal of Experimental Botany* 49(327): 1637-1646.
- UENO, O. 2001. Ultrastructural localization of photosynthetic and photorespiratory enzymes in epidermal, mesophyll, bundle sheath, and vascular bundle cells of the

- C₄ dicot *Amaranthus viridis*. *Journal of Experimental Botany* 52(358): 1003-1013.
- VON CAEMMERER, S. & FURBANK, R.T. 2003. The C₄ pathway: an efficient CO₂ pump. *Photosynthesis Research* 77: 191-207.
- VOZNESENSKAYA, E.V.; FRANCESCHI, V.R.; KIIRATS, O.; ARTYUSHEVA, E.G.; FREITAG, H. & EDWARDS, G.E. 2002. Proof of C₄ photosynthesis without Kranz anatomy in *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae). *The Plant Journal* 31: 649-662.
- VOZNESENSKAYA, E.V.; FRANCESCHI, V.R.; KIIRATS, O.; FREITAG, H. & EDWARDS, G.E. 2001. Kranz anatomy is not essential for terrestrial C₄ plant photosynthesis. *Nature* 414: 543-546.
- VOZNESENSKAYA, E.V.; FRANCESCHI, V.R.; PYANKOV, V.I. & EDWARDS, G.E. 1999. Anatomy, chloroplast structure and compartmentation of enzymes relative to photosynthetic mechanisms in leaves and cotyledons of species in the tribe Salsoleae (Chenopodiaceae). *Journal of Experimental Botany* 50: 1779-1795.
- YAMADA, M.; KAWASAKI, M.; SUGIYAMA, T.; MIYAKE, H. & TANIGUCHI, M. 2009. Differential positioning of C₄ mesophyll and bundle sheath chloroplasts: aggregative movement of C₄ mesophyll chloroplasts in response to environmental stresses. *Plant Cell Physiology* 50(10): 1736-1749.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do que foi exposto ao longo dos dois últimos capítulos, podemos ressaltar as principais contribuições do presente trabalho:

- ↳ Reconhecer a origem da bainha Kranz na camada mais interna diferenciada do meristema fundamental nas folhas de *Gomphrena arborescens* e *G. scapigera*. Tal bainha trata-se, portanto, da endoderme;
- ↳ Discutir e conceituar os principais termos presentes na literatura para descrever a bainha de concentração de CO₂ na fotossíntese C₄: “bainha do feixe”, “bainha Kranz/células Kranz” e “PCR”. Com isso, propor que não haja apenas aprofundamento fisiológico em estudos de espécies com anatomia Kranz, mas também anatômico. Dessa forma, a bainha de concentração de CO₂ deve ser descrita por um termo que se refira à sua função na fotossíntese C₄ (“bainha Kranz” ou “PCR”) e outro que informe sua origem ontogenética (“endoderme” ou “periciclo”);
- ↳ Levantar prováveis fatores que interferem na fotossíntese C₄ em *Gomphrena arborescens* e *G. scapigera* com base no que está presente na literatura sobre o assunto: espessamento e composição da parede da bainha Kranz, posição dos cloroplastos centripetamente localizados e retículo periférico nos cloroplastos;
- ↳ Reconhecer, com base no dimorfismo dos cloroplastos, que a descarboxilação do ácido de quatro carbonos se dá, principalmente, pela enzima NADP-málica em *Gomphrena arborescens* e *G. scapigera*.

