



**Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro de Ciências Biológicas  
Departamento de Botânica  
Programa de Pós-Graduação em Biologia  
de Fungos Algas e Plantas  
Laboratório de Anatomia Vegetal**

**Estudo ontogenético de *Eleocharis elongata* e *E. laeviglumis*  
(Cyperaceae), ocorrentes em ambientes contaminados e não  
contaminados por Drenagem Ácida de Mina (DAM)**

Roberta Mara Royer

Florianópolis, SC  
2016

Roberta Mara Royer

Estudo ontogenético de *Eleocharis elongata* e *E. laeviglumis*  
(Cyperaceae), ocorrentes em ambientes contaminados e não  
contaminados por Drenagem Ácida de Mina (DAM)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biologia de Fungos, Algas e  
Plantas da Universidade Federal de Santa  
Catarina como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Claudia Rodrigues

Florianópolis, SC  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Royer, Roberta Mara

Estudo ontogenético de *Eleocharis elongata* e *E. laeviglumis* (Cyperaceae), ocorrentes em ambientes contaminados e não contaminados por Drenagem Ácida de Mina (DAM) / Roberta Mara Royer ; orientador, Ana Claudia Rodrigues - Florianópolis, SC, 2016.

78 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

Inclui referências

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2. Cyperaceae . 3. *Eleocharis* . 4. Ontogênese. 5. Drenagem ácida de mina . I. Rodrigues, Ana Claudia . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas. III. Título.

**“Estudo ontogenético de *Eleocharis elongata* e *E. laeviglumis* (Cyperaceae), ocorrentes em ambientes contaminados e não contaminados por Drenagem Ácida de Mina (DAM)”**

por

**Roberta Mara Royer**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 07/PPGFAP/2016) do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:



Prof.ª. Dra. Ana Claudia Rodrigues (Presidente/UFSC)



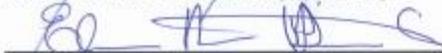
Prof.ª. Dra. Larissa Corrêa do Bomfim Costa (UESC/DCB)



Prof.ª. Dra. Carmen Simioni Zitta (UFSC/CCB/PPGBCD)



Prof. Dr. João de Deus Medeiros (CCB/UFSC)



Prof. Dr. Elisandro Ricardo Drechsler dos Santos  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos,  
Algas e Plantas

Florianópolis, 27 de abril de 2016.

*Dedico este trabalho ao meu  
companheiro, amigo e marido  
Jurandir.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu marido e companheiro Jurandir, obrigada por todo o incentivo, paciência, amor, dedicação, por se fazer sempre presente nesses dois anos mesmo à quilômetros de distância.

À minha mãe, irmã e irmão, por todo o carinho e amor, por acreditarem em minha capacidade sempre me incentivando a seguir em frente.

À Ana Cláudia Rodrigues, por abrir as portas do conhecimento do mundo da anatomia vegetal, muito obrigada pelas orientações, dedicação, paciência e confiança.

À todos os professores que contribuíram para minha formação, pela dedicação em ensinar.

Aos meus amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal, Ana Paula Lando, Andresa Hoffmann, Annielly Zini, Camilla Reis, Elisa F. Poltronieri, Isabel A. Brandalise, Graziela Blanco, Julia F. Thiesen, Márcia R. Wolfart, Maiby T. de Oliveira, Thaisy V. de Souza. Por toda a ajuda prestada, pelas conversas, conselhos. Carrego um carinho especial por todos vocês!!!!

Às minhas queridas amigas Guília Costa Burle e Rafaela H. Ludwinski, meninas obrigada por compartilharem essa caminhada comigo, por todo o carinho e amizade, vocês moram no meu coração!

Aos meus amigos do Oeste de Santa Catarina, por todo o incentivo e carinho!

Em especial à Chirle técnica do LAMEB II e Eliana do LCME, obrigada por toda a ajuda e amizade!

À todos os funcionários do PPGFAP, pela disposição em sempre ajudar da melhor maneira possível.

Ao PPGFAP e ao Cnpq pela bolsa de estudos.

Meus sinceros agradecimentos à todos que diretamente ou indiretamente participaram dessa minha jornada. Muito obrigada!!!!!!

*"É do buscar e não do achar que nasce o que eu não conhecia."*

(Clarice Lispector)

**SUMÁRIO**

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	188
2.1 LOCAIS DE COLETA.....	18
2.2 COLETA DO MATERIAL.....	21
2.3 MICROSCOPIA DE LUZ (ML).....	21
2.4 MICROSCOPIA DE VARREDURA CONFOCAL A LASER (MVCL).....	22
2.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA VARREDURA COM ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (EDS).....	22
2.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	23
3. RESULTADOS.....	24
3.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	24
3.2 MICROSCOPIA DE LUZ (ML).....	26
3.2.1 DESENVOLVIMENTO E HISTOQUÍMICA DO SISTEMA CAULINAR.....	26
3.2.2 DESENVOLVIMENTO E HISTOQUÍMICA DO SISTEMA RADICULAR.....	36
3.3. MICROSCOPIA DE VARREDURA CONFOCAL.....	44
3.4. MICROSCOPIAS ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) COM ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (EDS).....	45
3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	46
4. DISCUSSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	65

## RESUMO

A exploração do carvão mineral, gera impactos severos ao ambiente, devido a grande quantidade de rejeitos, conhecidos como drenagem ácida de mina (DAM), com elevada acidez, baixo pH e altas concentrações de metais pesados dissolvidos. A DAM pode ser lixiviada pela água da chuva, atingindo rios e lagos, e dispersando assim, os contaminantes em solução ou em forma particulada. *Eleocharis laevigulumis* e *Eleocharis elongata* ocorrem em lagoa contaminada por DAM no município de Siderópolis, SC, e em ambiente livre de contaminação, em Florianópolis, SC. Essas espécies são rizomatosas, áfilas e apresentam o escapo como órgão fotossintetizante perene. O presente trabalho teve como objetivo estudar o desenvolvimento do sistema caulinar e radicular, analisando espécimes dos dois ambientes a fim de verificar possíveis alterações anatômicas relacionadas à ação dos metais pesados. Para o desenvolvimento meristemas apicais caulinares (MAC) e radiculares (MAR) foram fixados em FAA70%, desidratados e incluídos em parafina. Após seccionamento, as secções foram coradas com azul de astra e safranina e montadas com bálsamo-do-canadá. Para os testes histoquímicos as mesmas regiões foram incluídas em hitoresina, seccionadas e submetidas à distintos reagentes. As análises ultraestruturais de transmissão, bem como as análises de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) seguiram protocolos padrão. Os resultados demonstram que o rizoma de *E. laevigulumis* e *E. elongata*, em ambos os ambientes, apresenta crescimento simpodial, desenvolvendo-se a partir de gemas laterais, localizadas nas axilas dos catafilos. Em secções longitudinais do meristema apical observam-se ápices meristemáticos vegetativos e reprodutivos, ambos protegidos por catafilos. No ápice vegetativo observa-se o promeristema com organização túnica-corpo, cordões procambiais, o meristema fundamental e o meristema de espessamento primário (MEP) formando raízes adventícias. Nos ápices reprodutivos observa-se a forma alongada destes, já evidenciando a formação da espiguetta e a ocorrência do meristema intercalar. Em secções transversais, a partir do meristema apical observam-se o desenvolvimento das unidades simpodiais do rizoma e do escapo floral. No rizoma, observa-se a atividade do MEP com atividade apenas para fora, formando parte do córtex, no escapo floral observa-se a ausência do MEP e a atividade do meristema intercalar, formando os tecidos que compõem o escapo floral. Em secções longitudinais do ápice radicular, em ambas as espécies, observa-se a coifa originada do caliptrogênio, o promeristema, a protoderme, o prôcambio e o meristema fundamental. Em secções transversais observa-se a atividade da endoderme

meristemática originando parte do córtex interno o qual na maturidade se desenvolve em aerênquima. Os testes histoquímicos evidenciaram polissacarídeos ácido e neutros, proteínas e amiloplastos nas células do MAC e MAR. As análises ultraestruturas mostraram alterações em ambas as espécies em DAM (-) como, corpos eletrodensos e fusão de vesículas. As análises de EDS não mostraram acúmulo de metais nas regiões apicais. Os resultados do presente estudo condizem com o desenvolvimento anatômico do sistema subterrâneo já descrito para outras espécies de Cyperaceae e não mostram alterações anatômicas estruturais e ultraestruturais no desenvolvimento dos referidos órgão nos indivíduos DAM (+) em relação aos indivíduos DAM(-).

**Palavras Chaves:** Histoquímica, ultraestrutura, caule, raiz, escapo, meristema apical.

**ABSTRACT**

The exploitation of coal, generates severe impacts on the environment, due to the large amount of waste, known as acid mine drainage (AMD), with high acidity, low pH and high concentrations of dissolved heavy metals. AMD can be leached by rainwater reaching rivers and lakes, dispersing and thus the contaminants in solution or in particulate form. *Eleocharis laevigulumis* and *Eleocharis elongata* occur in contaminated pond for AMD in the municipality of Siderópolis, SC, and pollution-free environment, in Florianópolis, SC. These species are rhizomatous, áfilas and present the escapement as perennial photosynthetic organ. This study aimed to study the development of stem and root system, analyzing specimens of both environments in order to verify possible anatomical changes related to the action of heavy metals. For apical meristem development stem (SAM) and root (RAM) were fixed in FAA70%, dehydrated and embedded in paraffin. After sectioning, the sections were stained with astra blue and safranin and mounted with balsam-canada. For histochemical tests the same regions were included in hitoresina, sectioned and subjected to different reagents. The ultrastructural analysis of transmission and analysis of spectroscopy Energy Dispersive (EDS) followed standard protocols. The results demonstrate that the rhizome *E.laevigulumis* and *E.elongata* in both environments presents sympodial, developing from lateral buds located in the axils of cataphylls. In longitudinal sections, apical meristem are observed vegetative and reproductive meristematic apices, both protected by cataphylls. In the growing apex observed the promeristem with tunic-body organization, procambiais cords, the meristem and primary thickening meristem (PTM) forming adventitious roots. In reproductive apices observed the elongated shape of these, already showing the formation of spikelets and the occurrence of interim meristem. In transverse sections from the apical meristem development are observed sympodial units rhizome and floral escapement. The rhizome, there is the activity of the PTM with activity just out, forming part of the cortex, floral escapement observed the absence of the PTM and the activity of the interim meristem, forming tissues that make up the floral scape. In longitudinal sections of the root apex, in both species, there is the originating hood of calyptragen the promeristem the protoderm the procambium and meristem. In cross-sections observed the activity of meristematic endoderm causing part of the inner cortex which at maturity develops in aerenchyma. The histochemical tests showed acid and neutral polysaccharides, proteins and cells amiloplasts SAM and RAM. The ultrastructures analysis showed changes in both

species in AMD (-) as electron-bodies and fusion of vesicles. EDS analyzes showed no accumulation of metals in the apical gerhões. The results of this study are consistent with the anatomical development of the underground system already described for other species of Cyperaceae and show no structural and ultrastructural changes in anatomical development of said body in AMD individuals (+) compared to individuals AMD (-).

**KeyWords:** Histochemistry, ultra structure, stem, root, scape, apical meristem.

## 1. INTRODUÇÃO

Os elementos tóxicos e poluidores do ambiente vêm crescendo desde a época da Revolução Industrial (Nriagu, 1979), sendo que as atividades como mineração, fundição, fábricas de papel, fábricas têxteis, indústrias petroquímicas, agricultura intensiva, são as atividades que causam grande poluição ao ambiente (Wong, 2003; Freitas *et al.*, 2004, Baghour & Chekroun, 2013).

A atividade da mineração, em todas as suas etapas, acarreta impactos severos ao ambiente, desde a alteração do solo, poluição do ar e contaminação da água (McAllister & Milioli, 2000; Pompêo *et al.*, 2004), podendo ainda associar à esses fatores o desmatamento, a alteração da superfície topográfica e da paisagem, a perda ou destruição de solos, a instabilidade de encostas, a alteração de corpos de água e de lençóis freáticos e ainda processos de erosão e assoreamento (Kopezinski, 2000; Pompêo *et al.*, 2004).

A mineração de carvão em Santa Catarina teve seu período inicial nos anos de 1895 a 1945 (Ravazzoli, 2013). Conforme Belolli (2002) a bacia carbonífera de Santa Catarina constitui uma faixa de aproximadamente 100 km de comprimento e largura média de 20 km, entre a Serra Geral, a Oeste, e o Maciço granito da Serra do Mar, a leste, seguindo orientação Norte-Sul. Ainda conforme o autor, a exploração do carvão Catarinense desenvolve-se na região sul do estado, nos municípios de Lauro Müller, Urussanga, Siderópolis, Treviso, Criciúma, Forquilha, Içara, Morro da Fumaça e Maracajá.

Um dos grandes impactos causados pela exploração do carvão mineral é a geração de grande quantidade de rejeitos, conhecidos como drenagem ácida de mina (DAM) (Oirtz & Teixeira, 2002 *apud* Laus *et al.*, 2005). Na DAM, o sulfeto, originário da pirita, é inicialmente oxidado, e posteriormente catalisado por bactérias, gerando um efluente com elevada acidez, baixo pH e altas concentrações em metais dissolvidos, tais como, ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn), além de sulfatos (Alexandre, 1999). Esses materiais são lixiviados pela água da chuva, atingindo os rios e dispersando assim os contaminantes em solução ou em forma particulada (Salomons, 1995). Uma vez no ambiente aquático, esses metais podem acumular-se nos sedimentos (Ali *et al.*, 2013), nos organismos vivos, animais e plantas, percorrendo as cadeias tróficas de todo ecossistema (Lacher, 2000).

A DAM vem causando um impacto severo em toda região carbonífera de Santa Catarina, pois atinge os mananciais das bacias hidrográficas do Rio Araranguá, Rio Tubarão e Rio Urussanga (Procuradoria da República em Santa Catarina, 2014). Pompêo *et al.*,

(2004), realizaram diversas análises para verificar variáveis ambientais como pH da água e metais dissolvidos, em diversos pontos do Rio Fiorita, pertencente a Bacia hidrográfica do Rio Araranguá, detectaram a presença de metais como alumínio, ferro, manganês e pH 3. Nas análises realizados por Moura, (2014) na região da Lagoa Língua do Dragão em Siderópolis, o pH registrado foi de 2,51, os metais como chumbo, cobre, ferro, mangânes, níquel e zinco foram detectados. O autor ainda ressalta que esses dados indicam a nitidez do impacto ambiental causado pela DAM. Verificando assim a grave situação ambiental da região, devido ao modo de exploração e descarte dos rejeitos da mineração (Pompêo *et al.*, 2004). Segundo Ashraf *et al.*, (2011), os ambientes que recebem a DAM, apresentam condições desfavoráveis para o desenvolvimento da cobertura vegetal natural, pois além de apresentar baixo pH e concentração elevada de metais tóxicos, a capacidade retenção de água é baixa, assim como o nível de nutriente para as plantas, e ainda como os metais não são degradáveis, eles podem permanecer por longos períodos em ambiente aquáticos e terrestres.

Em relação à toxicidade desses elementos em plantas, definem-se tóxicos aqueles elementos que causam danos às plantas (Macêdo & Morril, 2008), como Cádmiio (Cd), chumbo (Pb), mercúrio (Hg), cromo (Cr), cobre (Cu), zinco (Zn) e níquel (Ni). O Hg, Pb e Cd não tem função biológica, enquanto que o Zn, Cu, Cr e Ni são essenciais às plantas, animais e microorganismos em pequenas quantidades (Siqueira *et al.*, 1994), entretanto, em elevadas concentrações podem ser tóxicos, causando desnaturação de proteínas, inativação de grupos sulfídricos e bloqueios de sítios de ligação nas enzimas (Hall, 2002; Taiz & Zeiger, 2004; Macêdo & Morril, 2008).

Nas últimas décadas tem-se investigado alterações provocadas nos órgãos, tecidos e em nível subcelular de plantas expostas à metais (Barceló & Poschenrieder, 1999). Em concentrações elevadas os metais, podem diminuir a taxa de transpiração e da fotossíntese, aumentar a taxa respiratória, causar clorose foliar, dilatação dos cloroplastos, inibição do crescimento de raízes, intensificação da suberificação e lignificação da raiz, alteração na estrutura da hipoderme e endoderme, diminuição da parte aérea da planta (Doncheva, 1997, Barceló & Poschenrieder, 1999, Monii *et al.*, 2000).

Segundo, Delhaize & Ryan (1995), Mossor-Pietraszewska (2001), Maldaner *et al.*, (2015), o metal alumínio (Al) em excesso nas plantas pode causar diminuição do crescimento das raízes e caules, interferir na divisão celular e no alongamento das células.

Fusconi *et al.*, (2007) observaram a inibição do crescimento radicular, e a diminuição do comprimento do meristema apical radicular, em *Pisum sativum* L., quando submetida às diferentes concentrações de Cd. Normalmente o Cd, em plantas em geral, pode causar clorose nas folhas e diminuir o crescimento do caule e das raízes (Sanit´ a di Toppi & Gabbrielli, 1999). Nas raízes das plantas, dependendo da concentração, esse metal além de reduzir o crescimento, reduz ou inibe a atividade mitótica, podendo causar anomalias cromossômicas nos meristemas apicais, inibir o alongamento das células e das regiões em extensão (Zhang & Yang, 1994, Zhang & Xiao, 1998; Fusconi *et al.*, 2006).

Souza *et al.* (2009), verificou alterações anatômicas e fisiológicas em duas espécies de macrófitas, *Polygonum ferrugineum* Wedd. (Polygonaceae) e *Alternanthera philoxeroides* Mart. Griseb. (Amaranthaceae) as quais foram submetidas à diferentes concentrações de Cd, a primeira espécie demonstrou ser mais sensível às concentrações de Cd, apresentando acúmulo do metal nas folhas, caule e raiz, modificações nas lacunas do aerênquima, acréscimo de tricomas glandulares nas folhas, compactação do mesofilo e alteração na taxa fotossintética, já a segunda mostrou ser mais tolerante uma vez que apresentou alterações apenas em nível celular, acumulando quantidade significativa de Cd em suas raízes.

Pereira *et al.*, (2013) verificou que *Lactuca sativa* L. (Asteraceae), submetida à diferentes concentrações de Pb durante o crescimento inicial apresentou modificações significativas na anatomia radicular, aumentando proporcional e linearmente a espessura da exoderme e diminuindo a endoderme. Os mesmos autores observaram que anomalias cromossômicas podem estar relacionadas às deformações do sistema radicular, causando problemas durante o desenvolvimento desse órgão na planta.

Diversas plantas possuem habilidades de adaptação e sobrevivência à ambientes contaminados por metais (Lasat, 2002). Algumas espécies podem desenvolver mecanismos de tolerância quando não são capazes de evitar completamente a absorção de metais (Shaw, 1989). Segundo Schat *et al.*, (2000) em relação ao aspecto de tolerância, as plantas podem apresentar a *co-tolerância* ou a *tolerância múltipla*, a primeira é o resultado de um mecanismo específico, que confere tolerância a vários metais; e a tolerância é gerada por uma série de mecanismos distintos para cada metal ou metais, que atuam de maneira conjunta para evitar danos à planta. A tolerância múltipla levou às plantas o desenvolvimento de três estratégias as quais permitem sua

sobrevivência em ambientes com níveis tóxicos de metais. A primeira estratégia é definida como, *exclusão*: que se refere ao acúmulo limitado de metais nas partes aéreas da planta, havendo um maior acúmulo destes nas raízes; a segunda é a *indicadora*: no qual as plantas acumulam os metais nos seus tecidos geralmente refletindo os níveis de metais presentes no ambiente; e por fim, a terceira é chamada de *hiperacumulação*, sendo caracterizada pela bioacumulação de altas concentrações de metais nos tecidos das plantas, principalmente nas partes aéreas (Baker, 1981).

A absorção de elementos metálicos pelas plantas pode ocorrer através das células das raízes podendo ser facilitada por mecanismos próprios de transporte e acumulação (Larcher, 2000). As plantas geralmente absorvem os metais na forma iônica, quando a concentração do metal no ambiente é pequena, o principal mecanismo de transporte desse metal ocorre por difusão e quando existe em grande concentração, a planta utiliza o mecanismo de fluxo de massa (Pombo, 1992).

Segundo Rai (2009), entre as plantas que acumulam metais pesados encontram-se macrófitas, as quais são consideradas componentes importantes do ecossistema aquático, pois fornecem alimento e habitat para invertebrados aquáticos e peixes. Ainda segundo o autor, as macrófitas podem acumular até 100.000 vezes a quantidade de metais pesados em relação a sua biomassa por um processo denominado de rizofiltração, sendo assim, também consideradas eficientes no processo de fitoremediação de águas contaminadas por metais pesados. Segundo Dushenkov *et al.*, (1997) o processo de rizofiltração consiste na adsorção ou precipitação desses contaminantes nas raízes das plantas, ou ainda, a absorção dos contaminantes que estão em solução circundando a zona das raízes.

Entre as macrófitas encontramos representantes da família Cyperaceae, que apresenta cerca de 100 a 109 gêneros e 4500 a 5500 espécies (Govaerts *et al.*, 2007). Para o Brasil tem-se o registro de 678 espécies distribuídas em 42 gêneros, representando cerca de 15% do total das espécies e 40% do total de gêneros ocorrentes no mundo (Alves *et al.*, 2009). O gênero *Eleocharis* R. Br. um dos mais representativos da família, consta com aproximadamente 200 espécies, tendo maior concentração nas regiões tropicais e subtropicais das Américas (Goetghebeur, 1988), suas espécies geralmente estão associadas a ambientes úmidos, com lâmina de água ou solos hidromórficos, como brejos, canais de irrigação, turfeiras, dunas secundárias, campos úmidos, ao redor de açúdes, e margens de riachos (Goetghebeur, 1988; Judd *et al.*, 1999). São rizomatosas, áfilas e

apresentam o escapo floral como órgão fotossintetizante perene (Walters, 1950; Trevisan & Boldrini, 2008).

Algumas espécies desse gênero vêm recebendo atenção devido ao potencial para a remoção de metais pesados do solo ou de água contaminada. González-Elizondo *et al.*, (2005) registrou a ocorrência de uma espécie nova *Eleocharis arsenifera* S. González, Tena & T. Alarcon, nas margens de um lago com elevadas concentrações naturais de arsênio no estado de Chihuahua, México, tal espécie apresentava acúmulo desse metal em seus tecidos em elevadas concentrações, quando comparada a outras espécies ocorrentes no mesmo local, classificada como uma planta tolerante a arsênio. A espécie *E. equisetina* J. Presl & C. Presl a qual foi coletada em águas ácidas de minas abandonadas na Austrália, apresentou alto acúmulo de alumínio (Al) e outros metais como arsênio (As), cádmio (Cd), cério (Ce), cobalto (Co), cobre (Cu), ferro (Fe), latânio (La), níquel (Ni), chumbo (Pb), selênio (Se), tório (Th), zinco (Zn), em seus órgãos subterrâneos.

Sob o ponto de vista anatômico, dentre os trabalhos relacionados ao estudo do desenvolvimento de espécies de Cyperaceae, não existe nenhum relato na literatura sob o desenvolvimento anatômico de espécies de Cyperaceae submetidas à ação de metais. Um dos trabalhos mais abrangentes sobre anatomia de espécies de Cyperaceae é Metcalf (1971), que realizou uma vasta descrição das características anatômicas de várias espécies. Kadej, (1963), Wills & Briscoe, (1970), Wills *et al.* (1980), Gifford & Bayer (1995), descreveram a anatomia dos órgãos adultos de algumas espécies. Em relação ao estudo do desenvolvimento do sistema subterrâneo destacam-se os trabalhos de Rodrigues & Estelita, (2002, 2004, 2009) e Pereira & Rodrigues, (2012). Estudos anatômicos específicos sobre espécies do gênero *Eleocharis* são escassos. Ponderando citar Eiten (1969), no qual é descrito a anatomia do rizoma, raiz e escapo da espécie *E. interestincta* (Vahl) Roem & Schult. Os autores Baksh & Richards (2006) verificaram a arquitetura e morfologia do desenvolvimento de *E. cellulosa* Torr., Hinchliff & Roalson (2009) analisaram a arquitetura do escapo em *Eleocharis* do subgênero *Limnochloa* e Martin *et al.* (2014) realizou o estudo ontogenético das espiguetas prolíferas.

As espécies *E. elongata* Chapm e *E. laeviglumis* ocorrem em lagoas e na margem de riachos, respectivamente, situados em áreas contaminadas pela DAM no município de Siderópolis, SC e também ocorrem em ambientes livres de contaminação por DAM em Florianópolis, SC. São espécies rizomatosas, áfilas e apresentam o escapo floral como órgão fotossintetizante perene. O presente trabalho

tem por objetivo estudar o desenvolvimento anatômico das referidas espécies nos seus respectivos ambientes a fim de verificar possíveis alterações morfoanatômicas as quais possam estar relacionadas à ação dos metais pesados. Os resultados do presente serão importantes também para contribuir com informações anatômicas das principais fases de diferenciação dos tecidos que constituem os órgãos raiz, rizoma e escapo em espécies do gênero *Eleocharis*, informações essas escassas na literatura.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

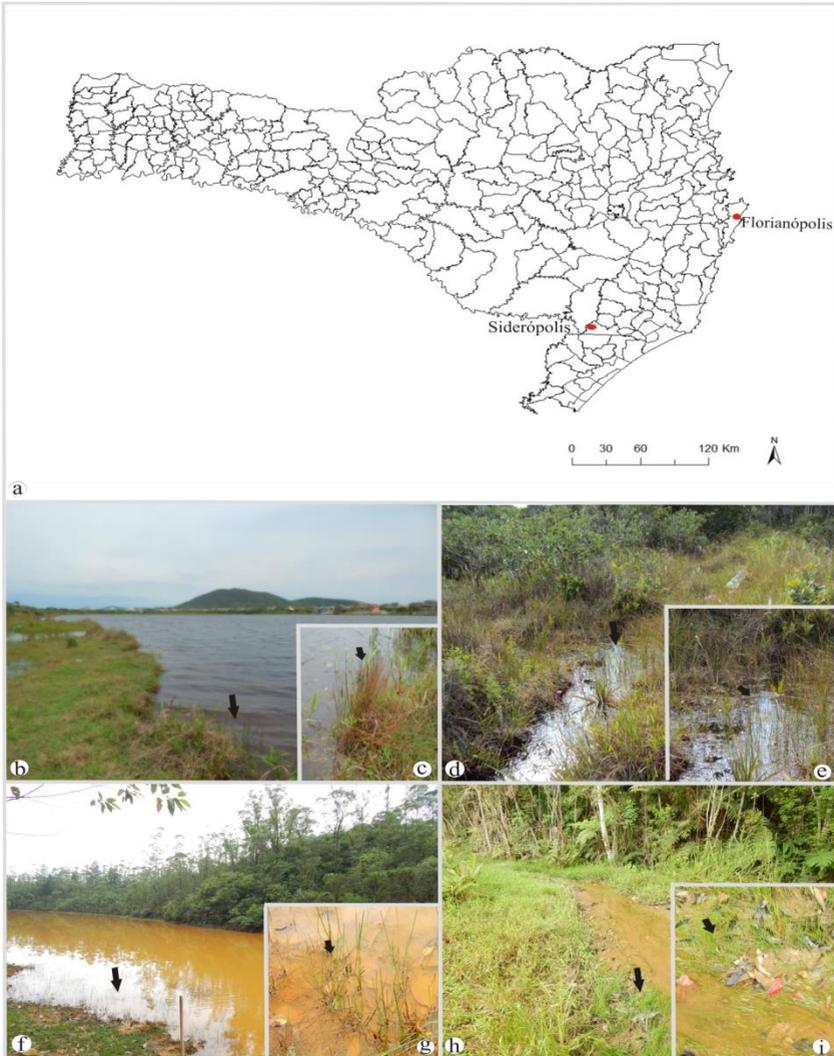
### 2.1 LOCAIS DE COLETA

O presente estudo foi realizado em quatro áreas, duas em Florianópolis, consideradas áreas controles, DAM (-), e duas em Siderópolis, áreas contaminadas por DAM, DAM (+), (Figs. 1 a-i). O clima é classificado, segundo Koppen, do tipo Cfa - mesotérmico úmido sem estação de seca definida (Santa Catarina, 1991), em todas as áreas. Para Florianópolis a temperatura média anual varia em torno de 20°C, o solo é classificado como Podzólico avermelhado e amarelado, areias quartzosas e solos de mangue (Santa Catarina, 1991) a vegetação é composta por Floresta Ombrófila Densa, manguesais, vegetação litorânea incluindo a restinga nessa classificação (IBGE, 2012). Em Siderópolis a temperatura média anual varia entre 16 a 18°C, o solo é classificado do tipo Podzólico vermelho-amarelado, Podzólico vermelho amarelado latossólico e o Cambisolo (Embrapa, 2004). A vegetação é classificada como Floresta Ombrófila Densa (Leite & Klein, 1990).

As áreas controles, em Florianópolis, foram a Lagoa Pequena e a restinga do Rio Vermelho. A primeira localiza-se no bairro Campeche (Figs. 1a, i) (S 27° 39' 28.20" e W 48° 28' 40.81") é lagoa de água doce situada a 600 metros do mar ao sul da Ilha, com formação de restinga entre a lagoa e o mar. É tombada como Patrimônio Natural e Paisagístico pelo Decreto nº 135/88 e como área de preservação Permanente pelo Código Florestal na Lei de nº 4.771/ 65 (Cereto, 2008). A segunda área localiza-se na costa leste do município de Florianópolis, (Fig 1e) ("S 27°30'11.99" e W 48°24'39.95"). O local apresenta alteração na vegetação original Litorânea de Restinga e Floresta Ombrófila Densa devido à presença de espécies exóticas como pinus e eucaliptos. Nessa área encontra-se o predomínio de turfas (grande presença de *Sphagnum sp.*) dificultando a drenagem e o acúmulo de matéria orgânica (Moura, 2014).

As áreas contaminadas com DAM, em Siderópolis, foram a lagoa Língua do Dragão (Figs. 1a-c) e um efluente da mina São Geraldo

(Figs. 1a, f-g). A Lagoa Língua do Dragão (Figs. 1b-c), fica localizada entre as seguintes coordenadas geográficas S 28°35'35.71" e W 49°27'30.27" fazendo parte de um conjunto de lagoas ácidas das antigas cavas de mineração a céu aberto, as quais são formadas pelas pilhas de rejeitos da mineração, que conseqüentemente formam a DAM (Pavei, 2007; Moura, 2014). O efluente proveniente da área de mineração da mina São Geraldo, está localizado entre as coordenadas (S 28°37'07.72" e W 49°23'44.04") este se encontra contaminado pela drenagem ácida da antiga mina São Geraldo (Moura,2014).



**Figura 1.** Áreas de estudo. **a.** Localização geográfica de Florianópolis e Siderópolis no estado de Santa Catarina. **b-e.** Áreas Controles em Florianópolis. **b-c.** Lagoa Pequena. **b.** Vista geral da lagoa. **c.** Detalhe dos indivíduos de *E. laeviglumis* (seta). **d-e.** Restinga do Rio Vermelho. **d.** Vista geral. **e.** Detalhe dos indivíduos de *E. elongata* (seta). **f-i.** Áreas contaminadas por DAM em Siderópolis. **f-g.** Lagoa Língua do Dragão. **f.** Vista geral da lagoa. **g.** Detalhe dos indivíduos de *E. laeviglumis* (seta). **h-**

i. Efluente da mina São Geraldo. h. Vista geral. i. Detalhe dos indivíduos de *E. elongata* (seta).

## 2.2 COLETA DO MATERIAL

Espécimes de *E. laeviaglumis* foram coletados nas lagoas Pequena e Língua do Dragão, e espécimes de *E. elongata* foram coletadas na restinga do Rio Vermelho e em efluente da Mina São Geraldo (Tabela 1, Figs. 1 a-i), durante os meses de outubro e novembro de 2014. Em cada área foram selecionados três pontos distintos, nos quais foram coletados 10 espécimes, totalizando 30 indivíduos por área de coleta. Nestes locais foram também mensurados os parâmetros de pH, temperatura e condutividade (Tabela 1).

Em laboratório, dois espécimes, de cada local de coleta, foram destinados à confecção de exsicatas, as quais foram depositadas no Herbário FLOR (UFSC).

Tabela 1. Média dos parâmetros de pH, temperatura e condutividades das áreas de estudo em Florianópolis e Siderópolis, SC.

Local	pH	Temperatura	Condutividade mS/cm
Lagoa Pequena Florianópolis, SC.	5.12	26.6	0,89
Rio Vermelho, Florianópolis, SC	4,45	25.7	0,92
Língua do Dragão, Siderópolis, SC	2.13	24,6	4,67
Efluente da Mina São Geraldo, Siderópolis, SC	1,89	25.8	8,29

## 2.3 MICROSCOPIA DE LUZ (ML)

Para análise do desenvolvimento de ambas as espécies em ambos os ambientes, amostras do meristema apical radicular (MAR) e do meristema apical caulinar (MAC), assim como, regiões adultas destes órgãos, foram separadas. Parte das amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,2 (Feder & O'Brien, 1968) por 12 horas e parte em FAA 70 (Johansen, 1940) por 24 horas. Posteriormente as amostras fixadas em glutaraldeído foram lavadas três vezes no mesmo tampão, desidratadas em serie etanólica e

conservadas em etanol 70° GL e as amostras fixadas em FAA 70, foram diretamente transferidas para álcool 70° GL, onde foram armazenadas.

Foram confeccionadas lâminas permanentes do MAR, MAC, previamente fixados em FAA 70, os quais foram infiltrados em parafina, utilizando-se desidratação em série butanólica terciária crescente, pré-infiltração em óleo de parafina e butanol terciário e infiltração em parafina em três etapas em estufa a 60° e inclusão em parafina pura (Johansen, 1940). Os blocos foram seccionados com espessura de 15 µm em micrótomo rotativo Leica RM 2125 do Laboratório de Anatomia Vegetal (Laveg), as seções foram coradas com azul de astra 1% e safranina 1% (Bukatsch, 1972) e montadas em bálsamo-do-canadá sintético. Para o estudo histoquímico foram confeccionadas lâminas permanentes do MAR, MAC previamente fixados em glutaraldeído, os quais foram infiltrados em historesina (Leica Historesina, Heidelberg, Germany) conforme metodologia do fabricante. Os blocos foram seccionados com espessura de 5 µm no mesmo micrótomo acima citado, as quais foram tratadas com diferentes técnicas histoquímicas. Ácido periódico de Schiff (PAS) para verificação de polissacarídeos neutros (Gahan, 1984), azul de toluidina (TBO) 0,5% pH 3,0 para identificar polissacarídeos ácidos (O'Brien *et al.* 1964) e azul brilhante de comassie (CBB) 0,4% em solução de Clarke, para identificar proteínas (Gahan, 1984).

#### **2.4 MICROSCOPIA DE VARREDURA CONFOCAL A LASER (MVCL)**

Para detecção do núcleo, amostras do MAR, MAC foram fixadas em Carnoy's e desidratadas em série etanólica até álcool 70% (Kraus, 1997). Posteriormente o material foi seccionado longitudinalmente e submetido ao DAPI (0,5 mgmL<sup>-1</sup> 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) (Ouriques & Bouzon, 2008) por 20 minutos e observados em microscópio confocal de varredura a laser (Leica TCS SP-5, Wetzlar, Germany) usando diodo emissor de luz UV (com pico de onda de comprimento de 405 nm de excitação e espectro emissor de 510–566 nm). Para o processamento final das imagens foi utilizado o programa LAS-AF Lite (Leica).

#### **2.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA COM ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (EDS)**

Para a caracterização de metais pesados nos tecidos amostras do MAR e MAC foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,2 (Feder & O'Brien, 1968) por 12 horas.

Posteriormente foram desidratadas em série etánolica até álcool 100°GL e submetidas à secagem em ponto crítico de CO<sub>2</sub>. Em seguida as amostras foram aderidas em suporte, com auxílio de fita dupla face de carbono e cobertas com carbono, e foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Jeol JSM-6390 LV com detector de raio-X (EDS). As análises foram feitas em triplicatas, sendo amostrados 6 pontos na parede celular e no interior da célula nas regiões do promeritema, no procâmbio, meristema fundamental e protoderme do MAR e no promeristema e protoderme do MAC, os dados foram analisados estatisticamente com o auxílio do programa Statistica 7.0 através do teste Tukey.

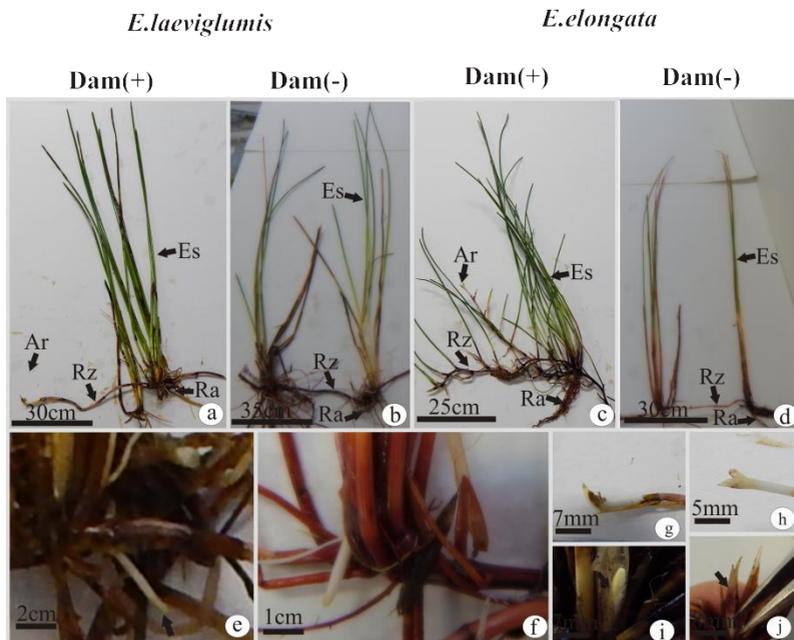
## **2.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)**

Para as análises ultraestruturais do MAR e MAC, amostras de ambos foram pré-fixadas, em solução de glutaraldeído 2,5 %, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, em pH 7,2 (Feder & O'Brien, 1968), em temperatura ambiente, por 4 a 10 horas. Posteriormente as amostras foram lavadas quatro vezes, a cada 30 minutos, no mesmo tampão e pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) a 1% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, por 4h à temperatura ambiente (Bozzola & Russel, 1991). Em seguida, o material foi lavado três vezes, no mesmo tampão. Após esse procedimento as amostras foram desidratadas em série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), em intervalos de 30 minutos para cada etapa; sendo a solução de acetona 100% trocada três vezes. Após a desidratação, o material foi infiltrado em resina Spurr (Spurr, 1969) e colocado em moldes horizontais em estufa a 70° C para polimerização por 24 h. As seções ultrafinas foram feitas com ultramicrotomo RMC com navalha de diamante. Os grides com as seções foram contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo (Reynolds 1963). As amostras foram observadas e fotografadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão JEM-1011 TEM, do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Ambas as espécies apresentam o sistema subterrâneo constituído por raízes adventícias e rizoma do qual surgem os escapos florais aéreos (Figs. 2 a-d). As raízes surgem dos entrenós do rizoma, são finas e tenras (Figs. 2e-f). O rizoma é plagiotrópico, rasteiro e tenro, tem crescimento simpodial, com ápices envolvidos por catafilos que formam uma extremidade afilada, a qual protege os meristemas apicais (Figs. 2g-h). Os escapos surgem a partir do rizoma e quando jovens são envolvidos por vários catafilos os quais, na maturidade, permanecem na sua base (Figs. 2a-d, i-j). Em alguns indivíduos, percebe-se um leve intumescimento no rizoma onde surgem vários escapos (Figs. 2 a-d). Em *E. elongata* DAM (+) essas regiões são menos frequentes, e normalmente se forma um escapo de cada vez (Fig. 2c), ao contrário de *E. laeviaglumis* (DAM + e DAM-) onde a formação dessas regiões é mais frequente (Figs. 2a-b). Os escapos podem ser reprodutivos ou não, quando reprodutivos, desenvolvem a espiguetta já no início da sua formação, ambos os tipos são perenes e fotossintetizantes já que essas espécies não desenvolvem folhas. Morfologicamente as espécies não mostraram diferenças entre os ambientes analisados.



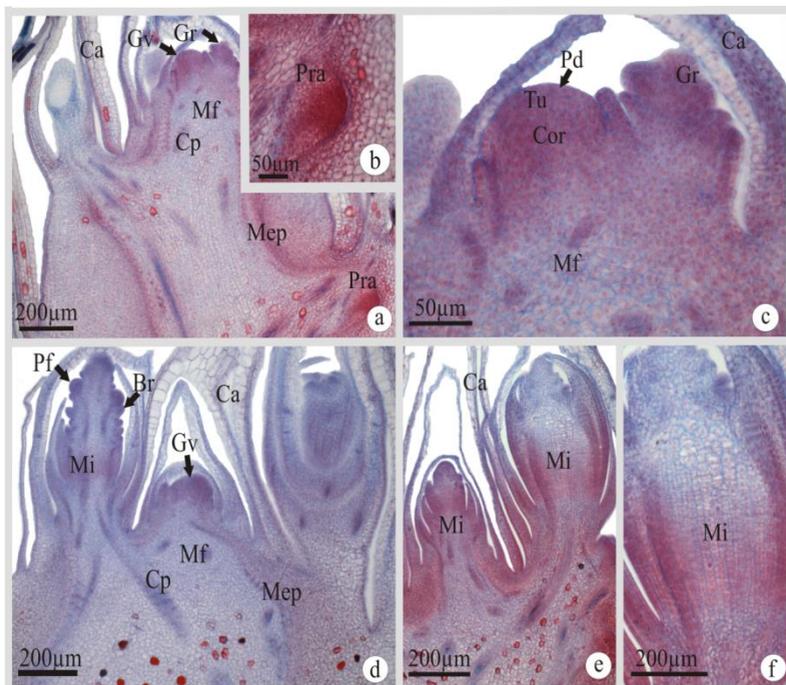
**Figura 2.** Espécies de *Eleocharis*. **a, e, i, g.** *E. laevigulumis* DAM (+). **b.** *E. laevigulumis* DAM (-). **c, f, h, j.** *E. elongata* DAM (+). **d.** *E. elongata* DAM (-). **a-d.** Hábito geral. **e-f.** Base dos escapos onde se observam ápices de raízes (setas). **g-h.** Detalhe mostrando ápice do rizoma simpodial. **i-j.** Detalhe do ápice do escapo. Es - Escapo; Ra - Raiz adventícia; RZ - Rizoma; Ar - Ápice do rizoma jovem.

## 3.2 MICROSCOPIA DE LUZ (ML)

### 3.2.1 DESENVOLVIMENTO ANATÔMICO E HISTOQUÍMICA DO SISTEMA CAULINAR

Em secções longitudinais do MAC de *E. elongata* e *E. laeviglumis*, em ambos os ambientes, observam-se gemas vegetativas e reprodutivas circundadas por primórdios de catafilos (Figs. 3a-e ). Nas gemas vegetativas, observa-se o promeristema, com organização túnica-corpo (Fig. 3c), onde a túnica pode conter 2 a 3 camadas de células as quais sofrem divisões anticlinais e o corpo que apresenta várias camadas de células que sofrem divisões em todos os planos (Fig. 3c). A partir do promeristema diferenciam-se a protoderme, o meristema fundamental e o procâmbio, observa-se também o meristema de espessamento primário (MEP) formando primórdios radiculares, em região mais basal do ápice caulinar (Figs. 3a-b).

Nas gemas reprodutivas observa-se que o ápice floral é alongado em relação ao ápice vegetativo, no qual vão se desenvolvendo os primórdios florais, os quais irão constituir a espigueta, cada primórdio floral se desenvolve na axila de uma bráctea (Fig. 3d). Observa-se também, logo abaixo desses primórdios, a ocorrência do meristema intercalar (MI) (Figs. 3d-e), o qual é constituído por, aproximadamente, 15 camadas de células com paredes finas e dispostas de forma estratificada (Fig. 3f).

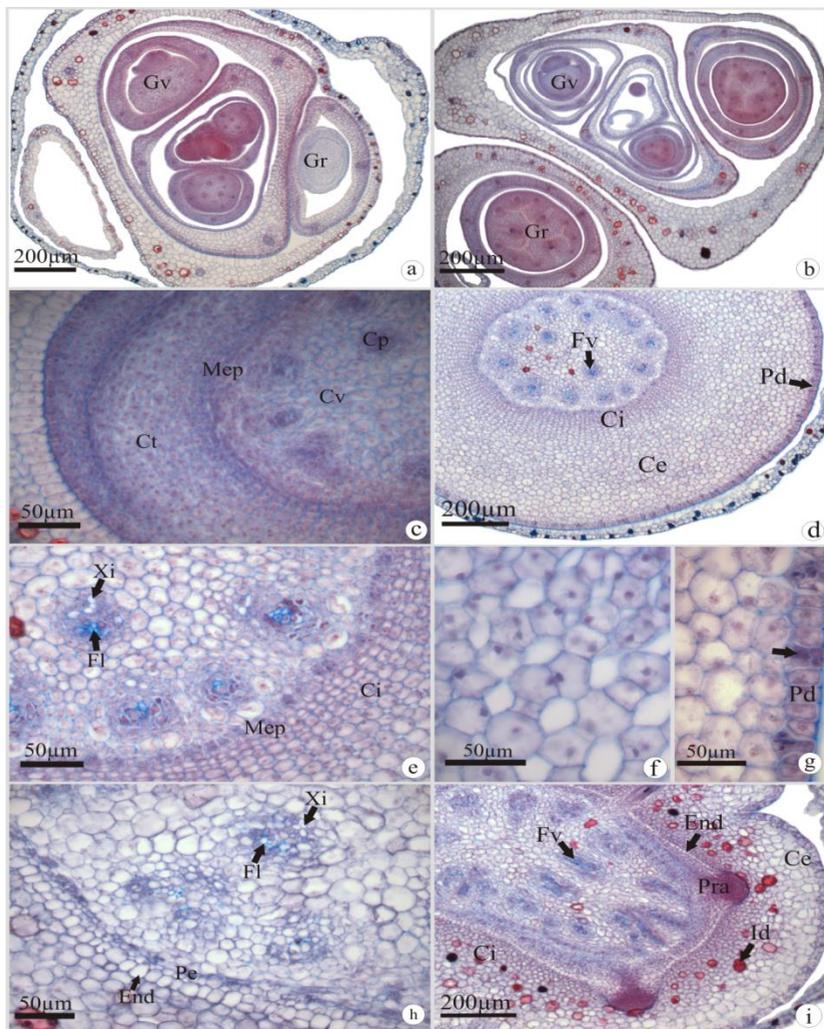


**Figura 3.** Seções longitudinais do ápice caulinar de espécies de *Eleocharis*. **a-c.** *E. laevigulum* DAM (-). **d.** *E. elongata* DAM (-). **e-f.** *E. laevigulum* DAM (+). **a-d.** Observa-se a organização geral com gemas vegetativas e reprodutivas protegidas pelos catafilos. **b.** Detalhe do ápice radicular originado do MEP. **c.** Detalhe da gema vegetativa com a organização túnica-corpo. **e.** Ocorrência do Mi nas gemas reprodutivas. **f.** Detalhe do Mi. Br-Bráctea; Ca-catafilo; Cp-cordão procambial; Cor-corpo; Gv-gema vegetativa; Gr-gema reprodutiva; Mf-meristema fundamental; Mi-meristema intercalar; Mep-meristema de espessamento primário; Pf-primórdio floral; Pra-primórdio radicular; Tu-túnica. Pd-protoderme.

Em secções transversais do MAC observam-se gemas vegetativas e reprodutivas envolvidas por catafilos, em diferentes níveis de diferenciação (Figs. 4a-b). Nos estágios iniciais do desenvolvimento anatômico das gemas vegetativas observa-se formação dos cordões procambiais, envolvidos pelo MEP, o qual delimita o cilindro vascular do córtex (Fig. 4c). Posteriormente o MEP tem atividade para fora produzindo através de divisões periclinais células parenquimáticas, as quais contribuem para a formação do córtex interno (Figs. 4c-d), contribuindo assim para o espessamento primário do rizoma. Observa-se também nos feixes vasculares a diferenciação das células do xilema e floema (Figs. 4 d-e).

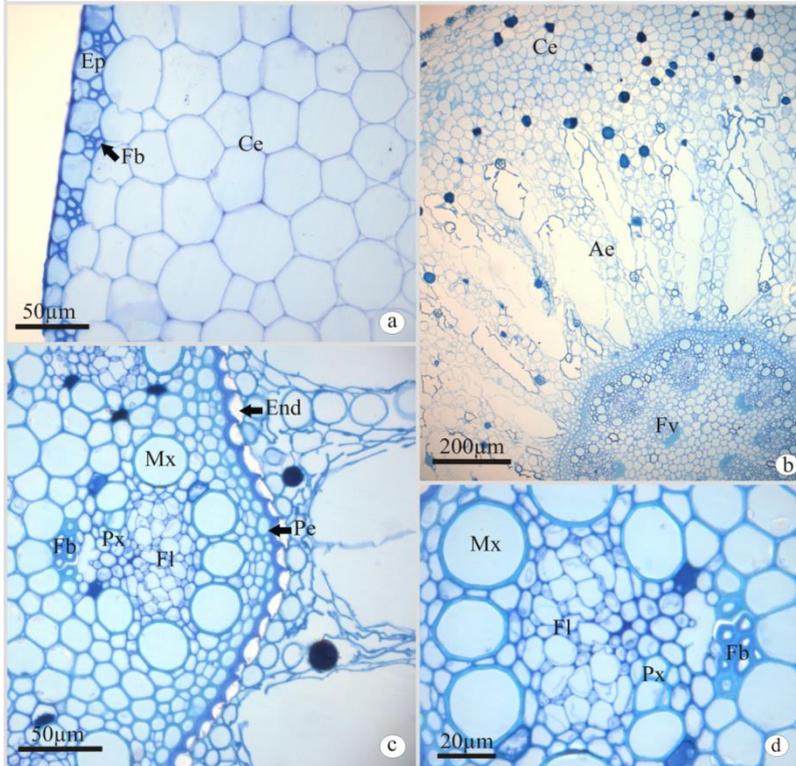
Na região mais desenvolvida do córtex interno observa-se o início da formação de espaços intercelulares esquizógenos (Fig. 4f), observa-se também a diferenciação da epiderme unisseriada, originada da protoderme, constituídas de células de formato quadrado, e algumas células da protoderme em divisão (seta) (Fig. 4g). Em estágio posterior do desenvolvimento (Figs. 4h-i), verifica-se que a atividade externa do MEP diminui gradativamente até que ocorre a diferenciação da endoderme e do periciclo, os feixes vasculares ainda sofrem diferenciação, observam-se também a formação de primórdios radiculares.

Na maturidade, observa-se a epiderme formada por células retangulares comuns intercaladas por cordões de fibras, originados da protoderme (Fig. 5a). O córtex externo ou hipoderme é formado por células parenquimáticas justapostas e no córtex interno observa-se a diferenciação em aerênquima (Fig. 5b). A endoderme apresenta espessamento em U, periciclo unisseriado com paredes espessadas (Fig. 5c). Os feixes vasculares se diferenciam com cordões de fibras próximo ao polo de protoxilema (Figs. 5c-d).



**Figura 4.** Secções transversais do rizoma em desenvolvimento de espécies de *Eleocharis*. **a, d, e, f.** *E. laevigulumis* DAM(+). **c** *E. laevigulumis* DAM(-). **b.** *E. elongata* DAM(-). **g- i.** *E. elongata* DAM(+). **a-b** Gemas vegetativas e reprodutivas em desenvolvimento. **c.** Observa-se o Meristema de espessamento primário, cordões procambiais e células do parênquima. **d.** Formação do córtex interno e externo. **e.** Detalhe mostrando diferenciação do axilema e floema. **f.** Formação do aerênquima. **g.** Diferenciação da epiderme com células quadradas e

outras em divisão (seta). **h.** Detalhe da endoderme e periciclo diferenciados. **i.** Córtex diferenciado em externo e interno e a formação de raízes adventícias. Ce-córtex exteno; Ci-córtex interno; Ct-córtex; Cv-cilindro vascular; End-endoderme; Fb-fibras; Fl-floema; Fv-feixe vascular; Gr-gema reprodutiva; Gv-gema vegetativa; Id-idioblasto; Mep-meristema de espessamento primário; Pd-protoderme; Pe-periciclo; Pra-prímórdio radicular; Xi-xilema.



**Figura 5.** Seções transversais do rizoma adulto de espécies de *Eleocharis*. **a-b.** *E. laevigulum* DAM (+). **c-d.** *E. elongata* DAM (-). **a.** Verifica-se a epiderme e fibras subepidérmicas. **b.** Observa-se o córtex externo, o aerênquima, endoderme e feixes vasculares. **c.** Detalhe da imagem anterior evidenciando a endoderme com espessamento em U, periciclo unisseriado com células e paredes espessadas, no feixe vascular verifica-se os elementos de metaxilema, floema, protoxilema e fibras. **d.** Detalhe do feixe vascular anivascular. Ae-aerênquima; Ce-Córtex externo; End-endoderme; Ep-epiderme; Fb-Fibra; Fl-floema; Fv-

feixe vascular; Mx-metaxilema; Pe-periciclo; Px-Protoxilema

No desenvolvimento das gemas reprodutivas, a partir de secções transversais do MAC (Figs. 3a-b), observamos, abaixo da espiguetta, a disposição circular dos cordões procambiais, o meristema fundamental e a protoderme (Figs. 6a-b). Em estágio seguinte de desenvolvimento, os cordões procambiais originam os elementos vasculares do xilema e floema que se diferenciam em polos opostos (Figs. 6c-f). O meristema fundamental se diferencia em regiões com células distintas: regiões com células maiores sem espaços intercelulares e regiões com células menores e com espaços intercelulares esquizógenos (Figs. 6c-d). Na protoderme observa-se a diferenciação de células comuns radialmente alongadas intercaladas por células que sofrem várias divisões (seta) (Fig. 6e), as quais vão originar cordões de fibras.

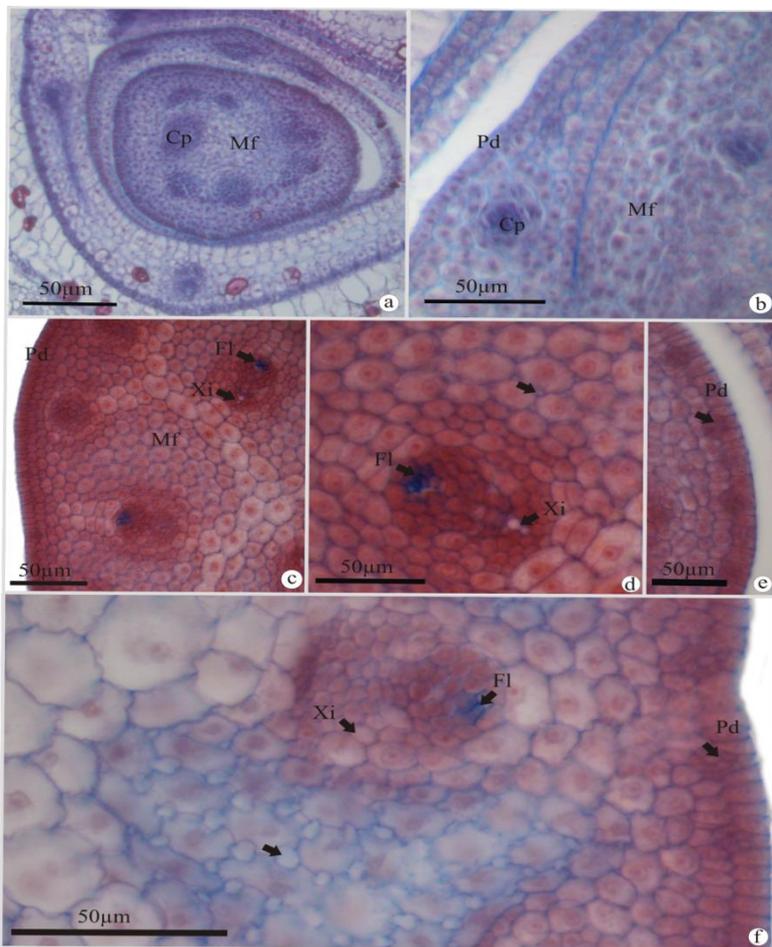
Posteriormente, observam-se os feixes vasculares colaterais ainda em diferenciação, aumento dos espaços intercelulares em regiões específicas do parênquima, constituindo células braciiformes, em outras regiões, as células se mantem sem a formação dos espaços intercelulares (seta) e a epiderme também em diferenciação (Fig. 6f).

Em seguida, observam-se o aumento dos espaços intercelulares entre as células braciiformes, nos feixes vasculares, os elementos do metaxilema se tornam evidentes e as células do parênquima paliçádico, na periferia do órgão, começam a se diferenciar (Figs. 7a-b). Na maturidade (Figs. 7c-f), observam-se a epiderme com células arredondadas com parede periclinal externa pouco espessadas, e estômatos, seguida por fibras epidérmicas de paredes fortemente espessadas. O parênquima paliçádico constituído de duas a três camadas de células contendo idioblastos com compostos fenólicos. Na região medular, observam-se os feixes vasculares colaterais distribuídos no aerênquima. Cada feixe vascular é circundado por duas bainhas, a externa formada por células parenquimáticas, e a interna formada por células de paredes espessadas em “U” principalmente na região do floema, observam-se ainda calotas de fibras em ambos os polos de xilema e floema entre as duas bainhas (Figs. 7e-f).

Os testes histoquímicos realizados nas células do MAC (Figs. 8a-h) indicam reação mais intensa ao PAS, na região túnica-corpo, nos espécimes coletados em ambiente DAM (+) (Figs. 8a-c) em ambas as espécies, quando comparados com os espécimes coletados em DAM (-) (Figs. 8b-d). No meristema fundamental, observou-se a formação de

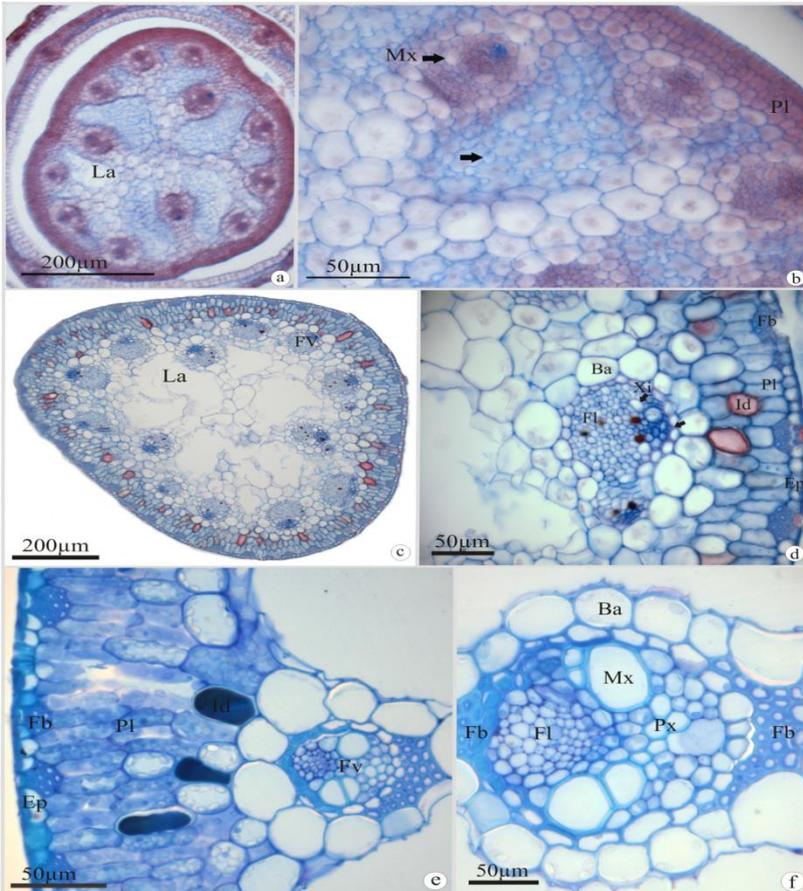
grãos de amido com exceção dos indivíduos de *E. elongata* DAM (+) (Fig. 8h), em relação aos demais (Figs. 8e-f-h)

Para o teste feito com (CBB), verificou-se a reação positiva nas células do MAC da região túnica-corpo, nas duas espécies em todos os ambientes (Figs.8 i-j). Nas células da túnica e corpo, foi possível verificar a centralização do núcleo e nucléolo e o citoplasma denso, (Figs. 8 i-j). Em e relação ao ATO, verificou-se no meristema fundamental do MAC células com compostos fenólicos que adquiriram coloração azul esverdeado (Figs. 8 k-l).



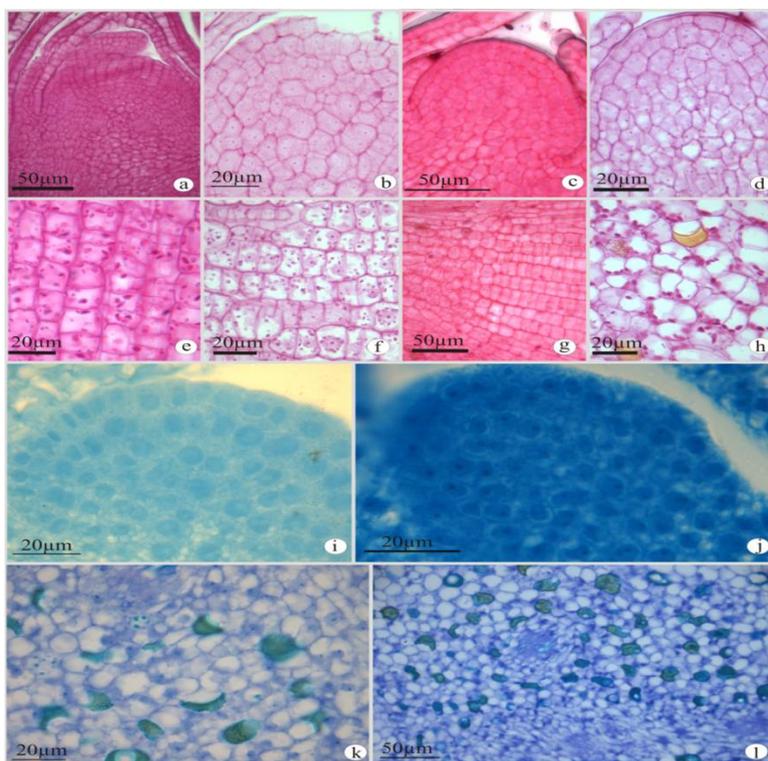
**Figura 6.** Secções transversais do escapo floral em desenvolvimento de espécies de *Eleocharis*. **a.** *E. elongata* DAM (+). **b.** *E. laevigulumis* DAM (-). **c-f.** *E. elongata* DAM (-). **a.** Região apical onde observam-se os cordões procambiais e meristema fundamental. **b.** Detalhe da figura anterior evidenciando o cordão procambial, meristema fundamental e a protoderme. **c-e.** Estágio posterior do desenvolvimento. **c.** Observam-se a diferenciação dos dos feixes vasculares, do meristema fundamental em dois tipos de células e da protoderme. **d.** Detalhe evidenciando a origem de xilema e floema constituindo feixe colateral e da formação de espaços intercelulares no parênquima (seta). **e.** Detalhe da protoderme em diferenciação, formando células comuns e fibras. **f.** Fase seguinte de

diferenciação mostrando a formação de células braciiformes com espaços intercelulares esquizógenos (seta). Cp-cordão procambial; Fl-floema; Mf-meristema fundamental; Pd-protoderme; Xi-xilema



**Figura 7.** Secções transversais do escapo floral em desenvolvimento de espécies de *Eleocharis*. **a-d.** *E.elongata* DAM(-). **e-f.** *E.laeviglutis* DAM (+). **a-b.** Escapo jovem em diferenciação. **a.** Visão geral, onde se observam a região periférica e a medular com feixes vasculares e parênquima. **b.** Detalhe da figura anterior mostrando diferenciação da epiderme, parênquima paliçádico, feixes vasculares colateriais com metaxilema, células braciiformes do aerênquima (seta). **c-f.** Fase adulta do escapo. **c.** Vista geral. Com epiderme, parênquima paliçádico, feixes vasculares e aerênquima **d.** Detalhe da figura anterior mostrando

epiderme com fibras subepidérmicas, parênquima paliçádico e feixes vasculares colaterais células espessadas abaixo da bainha parenquimática (seta). **e.** Detalhe mostrando células epidérmicas com parede periclinal externa espessada, estômatos, fibras epidérmicas, parênquima paliçádico com idioblastos e feixe vascular. **f.** Detalhe evidenciando o feixe vascular colateral envolvido por duas bainhas uma parenquimática externa e uma espessada interna, com fibras nos polos. Ae-aerênquima; Ba-bainha; Ep-epiderme; Fb-fibras; Fl-floema; Fv-feixe vascular; Id-idioblasto; La-lacuna do aerênquima; Mx-metaxilema; Pl-parênquima paliçádico; Px-protóxilema



**Figura 8.** Secções longitudinais do MAC de espécies de *Eleocharis* sob ação de testes histoquímicos. **a-g.** Reação com ácido periódico de Schiff (PAS). Observam-se reações mais intensas em espécies de ambiente DAM (+) (**a, e** *E. laeviglumis* **c, g.** *E. elongata*) em comparação com o ambiente DAM (-) (**b, f** *E. laeviglumis* e **d, h** *E.*

*elongata*). Observa-se ainda presença de grãos de amido nas células do meristema fundamental em todas espécies (**e, f, h**) com excessão de *E. elongata* DAM (+). **i, j.** Reação com Azul Brillhante de comassi (CBB) onde percebe-se centralização de núcleo e nucléolo e citoplasma denso em ambas as espécies.( **i.** *E. laeviglumis* DAM (-) e **j.** *E. elongata* DAM (-) ). **k-l.** Reação com Azul de Toluidina (ATO) onde verifica-se a presença de células com compostos fenólicos no meristema fundamental. (**k.** *E. laeviglumis* DAM (+), **l.** *E. elongata* DAM (-).

### 3.2.2 DESENVOLVIMENTO ANATÔMICO E HISTOQUÍMICA DO MAR

As raízes adventícias das duas espécies se originam do rizoma a partir do MEP (Fig. 4i). Em secções longitudinais do ápice radicular, em ambas as espécies analisadas e de todos os ambientes estudados, observa-se a coifa originada do caliptrogênio, o promeristema, a protoderme, o procâmbio e o meristema fundamental (Figs. 9a-b). O caliptrogênio (Fig. 9b) origina a coifa através de divisões periclinais, constituída por tecido com células compactas (Fig. 9b). No promeristema observa-se a célula inicial, comum da protoderme e do meristema fundamental (Fig. 9c seta). O procâmbio é central e se diferencia muito próximo da região do promeristema. As células da protoderme alongam-se à medida que se afastam da célula inicial, secretam mucilagem a qual fica depositada entre a epiderme e as células da coifa (Fig. 9d).

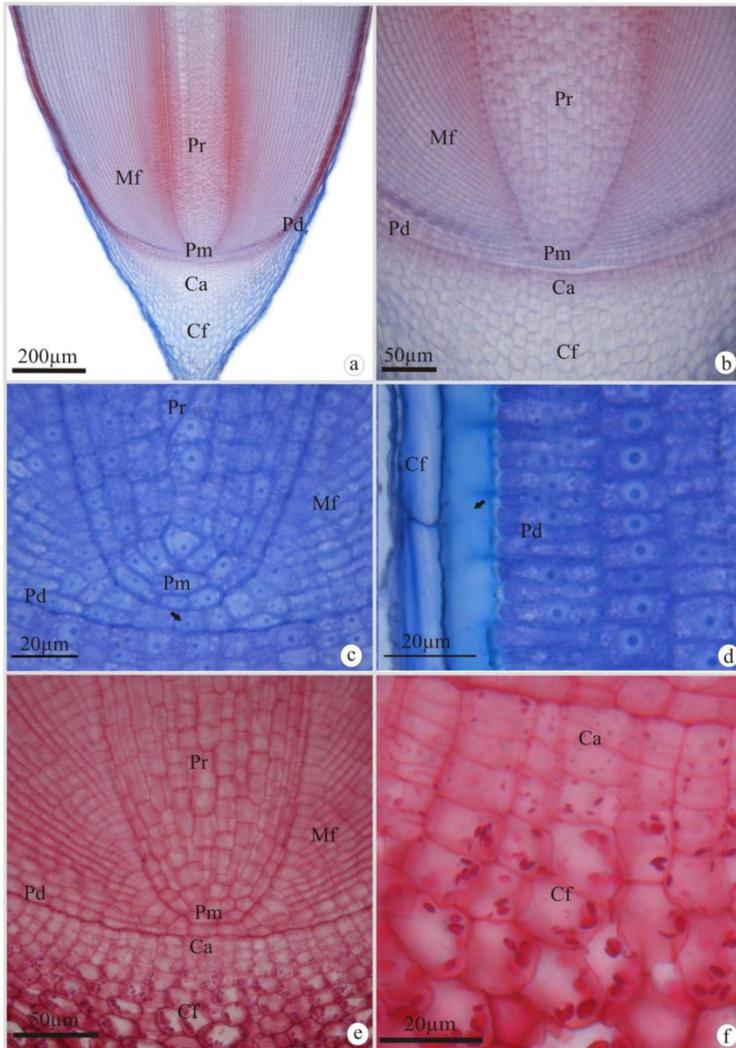
Nos testes histoquímicos de PAS em ambas as espécies e ambientes, as células da protoderme, promeristema, meristema fundamental, as paredes celulares tiveram reação positiva, assim como todo o citoplasma da célula (Fig. 9 e). Nas células da coifa verificou-se, presença de muitos amiloplastos (Figs. 9 e-f). Os testes histoquímicos em ATO evidenciaram a reação metacromática no denso conteúdo citoplasmático e destacaram a centralização do núcleo e nucléolo, no promeristema, procâmbio, meristema fundamental e da protoderme (Figs. 9 c-d).

Em secções transversais a partir do ápice radicular, observa-se a diferenciação do cilindro do procâmbio, observa-se ainda o meristema fundamental e a protoderme (Fig. 10a.). Posteriormente, verifica-se a diferenciação dos elementos do metaxilema (Fig. 10b), no cilindro vascular, observa-se a atividade da endoderme meristemática, formando parte do córtex interno. Em estágio mais avançado do desenvolvimento,

observa-se ainda a atividade da endoderme meristemática e a diferenciação dos elementos do protoxilema e floema (Fig. 10c), a protoderme se diferenciando e ainda se observa algumas camadas de células da coifa (Fig. 10d).

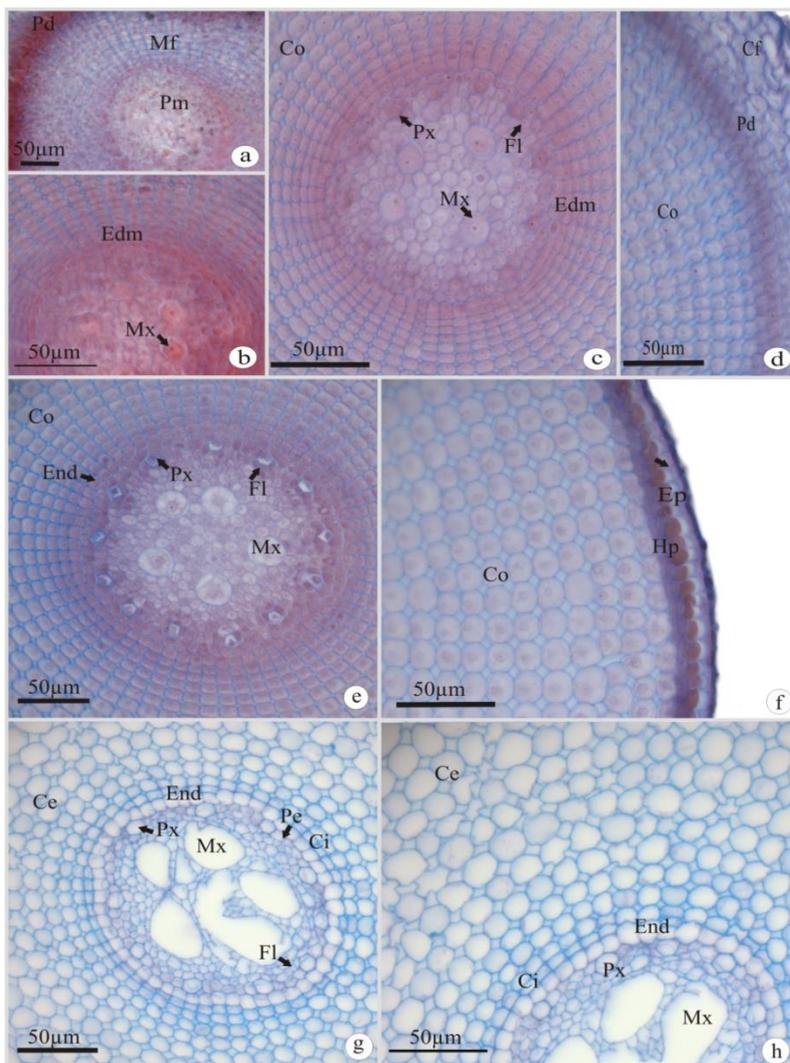
Em estágios mais avançados do desenvolvimento observa-se no cilindro vascular, o floema, protoxilema e metaxilema (Fig. 10e), verifica-se a formação de pequenos espaços intercelulares esquizógenos, nas células do córtex, e as células da epiderme ainda com a presença de mucilagem (Fig. 10f, seta).

Posteriormente no cilindro vascular o periciclo é unisseriado e interrompido por polos de protoxilema e os demais elementos vasculares completam a diferenciação. No córtex a endoderme meristemática cessa suas divisões celulares e diferencia-se em endoderme (Fig. 10g) e no restante do córtex observa-se o arranjo radial de suas células e a formação de espaços intercelulares conspícuos (Fig. 10h). Em estágio mais avançado do desenvolvimento é possível observar a endoderme, o córtex interno e externo (Figs. 10g-h).



**Figura 9.** Seções longitudinais do meristema apical radicular de espécies de *Eleocharis*. **a-b.** *E. laevigulum* DAM (-). **c-e.** *E. elongata* DAM(-). **f.** *E. elongata* DAM (+) **a.** Organização geral do ápice radicular. **b.** Detalhe evidenciando o promeristema, caliptrôgenio e coifa. Teste histoquímico **c-d** ATO **c.** Detalhe mostrando célula inicial (seta) comum do meristema fundamental e da protoderme. **d.** Células da protoderme em diferenciação, alongadas e secreção de mucilagem (seta). **e-f.** Teste histoquímico

PAS. e. Visão geral do MAR mostrando reação positiva nas paredes celulares e no citoplasma. f. Detalhe das células da coifa com amiloplastos. g. Detalhe das células da coifa com amiloplastos.

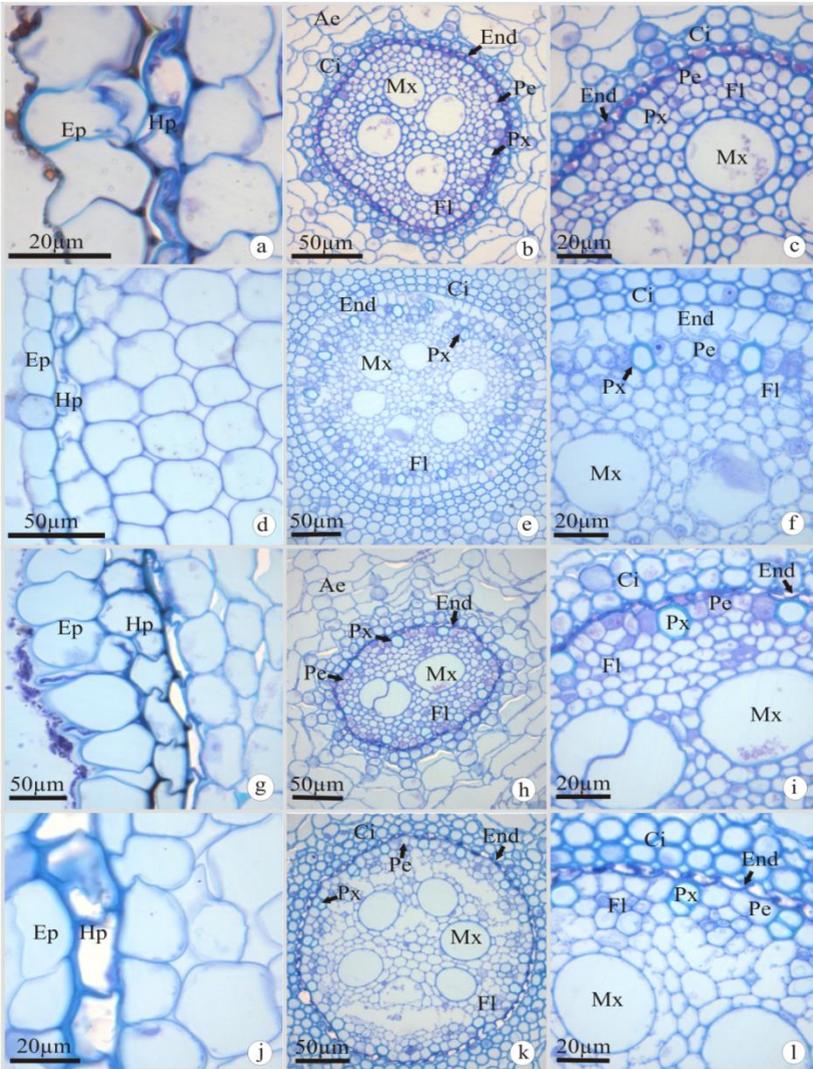


**Figura 10.** Secções transversais do meristema apical radicular de espécies de *Eleocharis*. **a-b, g, h.** *E. laevigulum* DAM(+). **e-f.** *E. laevigulum* DAM(-). **c-d.** *E. elongata* DAM(-). **a.** Verifica-se a diferenciação do promeristema, meristema fundamental e protoderme.

**b.** Observa-se a atividade do procâmbio formando os elementos do metaxilema. **c.** Formação dos elementos do protoxilema e floema, a camada precursora da endoderme meristemática formando o córtex. **d.** Formação do córtex e diferenciação da protoderme, observa-se ainda células da coifa. **e.** Cilindro vascular apresentando células do floema, protoxilema e metaxilema. **f.** Células do córtex com pequenos espaços intercelulares e formação da hipoderme abaixo da epiderme e a presença de mucilagem. **g.** Verifica-se as células do córtex externo e interno, endoderme bem diferenciada, elementos do meta xilema, protoxilema e floema. **h.** Verifica-se pequenos espaços intercelulares no córtex interno e no córtex externo espaços maiores. Ce-córtex externo; Ci-córtex interno; Cf-coifa; Co-córtex; Edm-endoderme meristemática; End-endoderme; Ep-epiderme; Fl-floema; Hp-hipoderme; Mx-metaxilema; Px-protoxilema.

Na maturidade (Figs. 11a-l), a raiz apresenta epiderme unisseriada (Figs. 11a, d, g, j), na região cortical, ocorre a diferenciação da exoderme unisseriada ou hipoderme (Figs. 11a, d, g, j) com paredes finas e o córtex interno diferenciado em aerênquima do tipo lisígeno tangencial, formado inicialmente por pequenos espaços celulares devido a expansão e divisão celular e posteriormente ocorrendo a lise dessas células em sentido tangencial, a endoderme pode apresentar leve espessamento de parede (Figs. 11c, i, l) ou nenhum espessamento (Figs. 11f). No cilindro vascular o número de polos de protoxilema pode variar sendo sempre poliarca.

A anatomia da raiz adulta de *E. elongata* e *E. laeviglumis* nos ambientes DAM (+) e DAM (-) analisados, podem ser comparadas nas (Figs. 11 a-l). Em DAM (+) verificam-se que as células da epiderme são delgadas e alongadas (Figs. 11a, g), em comparação com o ambiente DAM (-) cujas células apresentam formato retangular (Figs. 11d, j), nas duas espécies. A hipoderme em *E. laeviglumis* em DAM (+) apresenta paredes levemente mais espessadas (Fig. 11a), em comparação com os indivíduos DAM (-) (Fig. 11d). Em *E. elongata* em ambos os ambientes observou-se o espessamento da hipoderme (Figs. 11g, j). No córtex interno, as espécies apresentam o aerênquima lisígeno tangencial (Figs. 11b, h), com células corticais internas levemente espessadas em todos os ambientes (Figs. 11b, e, h, k). A endoderme em *E. laeviglumis* em DAM (+) apresenta espessamento em U (Fig. 11c), em comparação com DAM (-), onde verifica-se células retangulares e delgadas (Figs. 11e-f). Para *E. elongata* as células da endoderme apresentam-se espessadas porém achatadas nos dois ambientes (Figs. 11h, i, k, l). Em ambas as espécies e ambientes, no cilindro vascular observa-se o periciclo unisseriado e interrompido pelas células de protoxilema (Figs. 11c, f, i, l). Os elementos de metaxilema ocupando a posição central, os elementos do floema ocupam a posição periférica e intercalam-se com os elementos do protoxilema (Figs. 11 b, e, h, k).

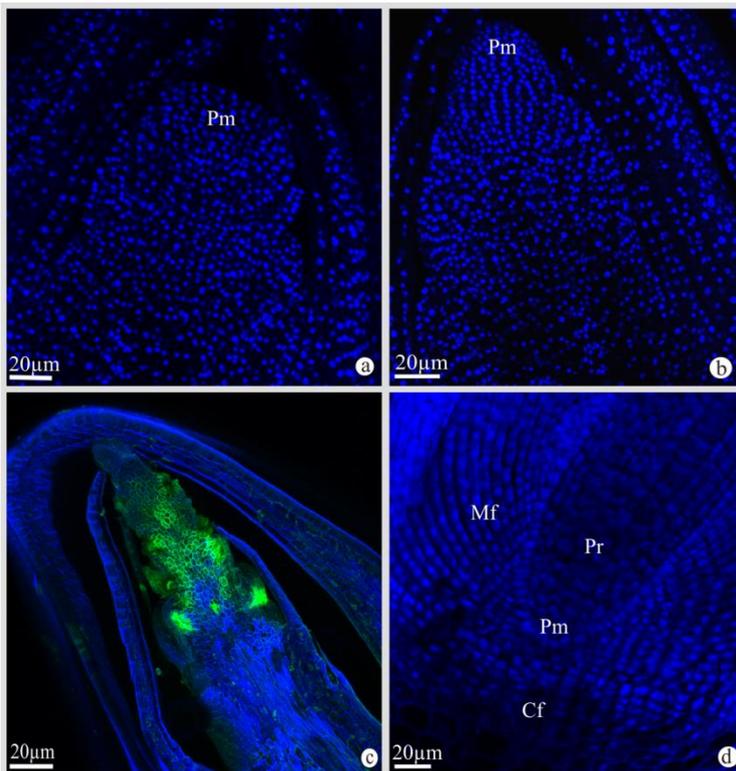


**Figura 11.** Secções transversais de raízes adultas de espécies de *Eleocharis*. **a-c.** *E. laeviglumis* DAM(+). **d-f.** *E. laeviglumis* DAM(-). **g-i.** *E. elongata* DAM(+). **j-l.** *E. elongata* DAM(-). **a, d, g, j.** Observa-se a epiderme com células delgada e hipoderme com células espessadas. **b, e, h, k.** Contempla-se as células do aerênquima, células do córtex interno, endoderme, periciclo unisseriando, elementos do protoxilema, metaxilema e floema. **c, f, i, l.** Detalhe das células corticais internas

espassadas, endoderme, periciclo unisseriado, células do protoxilema, metaxilema e floema. Ae-aerênquima; Ci-córtex interno; Ep-epiderme; End-endoderme; Hp-hipoderme; Fl-floema; Mx-metaxilema; Pe-periciclo; Px-protoxilema.

### 3.3. MICROSCOPIA DE VARREDURA CONFOCAL

As análises de microscopia de varredura confocal realizadas nos MAC e MAR das espécies estudadas em todos os ambientes, não mostraram variação qualitativa (Figs. 12a-d). Sendo possível observar a centralização e tamanho regular dos núcleos em todos os tecidos meristemáticos (Fig. 12a-b), com exceção dos núcleos do procâmbio do MAR em ambas as espécies e ambientes (Fig. 12 d) que se mostraram menos evidentes. Nas gemas reprodutivas de ambas as espécies e ambientes verificou-se autoflorêscência na região dos primórdios florais (Fig. 12 c).



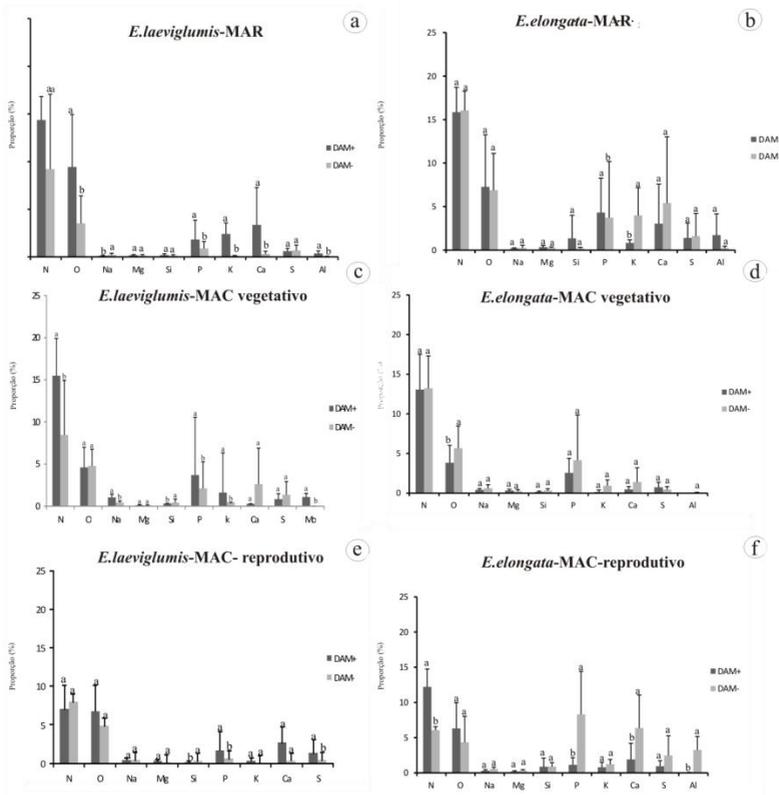
**Figura 12.** Secções longitudias observadas por microscopia eletônica confocal de espécies de *Eleocharis*. **a-c.** MAC. **d.** MAR. **a, d.** *E. laeviglumis* DAM (+). **b.** *E. elongata* DAM (-). **c.** *E. elongata* DAM (+). **a-b.** Gema vegetativa evidenciando os núcleos de tamanho uniformes nas células meristemáticas. **c.** Gema reprodutiva com auto fluorescência na espiguetta. **d.**

Observam-se núcleos de tamanho regular e bem evidentes, com exceção do na região do procâmbio. Cf-coifa; Mf-meristema fundamental; Pm-promeristema; Pr-procâmbio.

### **3.4. MICROSCOPIAS ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) COM ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (EDS)**

As análises de EDS nos MAC vegetativo, reprodutivo e MAR podem ser observadas nas figuras 13 a-f. No MAR o único metal detectado foi o alumínio (Al) em maiores proporções nos indivíduos dos ambientes DAM (+) para ambas as espécies (Figs. 13 a-b).

No MAC das gemas vegetativas foram detectados os metais Molibdênio (Mo) em *E. laevigumis* em maior quantidade nos indivíduos DAM (+) (Fig. 13c) em relação aos indivíduos DAM (-) e Al em indivíduos de *E. elongata* DAM (-) (Fig. 13d) em comparação com DAM (+). No MAC das gemas reprodutivas dos indivíduos de *E. laevigumis* não foram detectados metais (Fig. 13e), apenas Al foi detectado nos indivíduos DAM (-) de *E. elongata* (Fig. 13f). Os demais elementos químicos detectados são essenciais às plantas.



**Figura 13.** Proporções percentuais (%) dos elementos químicos presentes nos tecidos de *E. laevigulumis* e *E. elongata*. As letras minúsculas diferentes significam diferenças significativas nos diferentes ambientes. MAC: meristema apical caulinar; MAR: Meristema apical radicular.

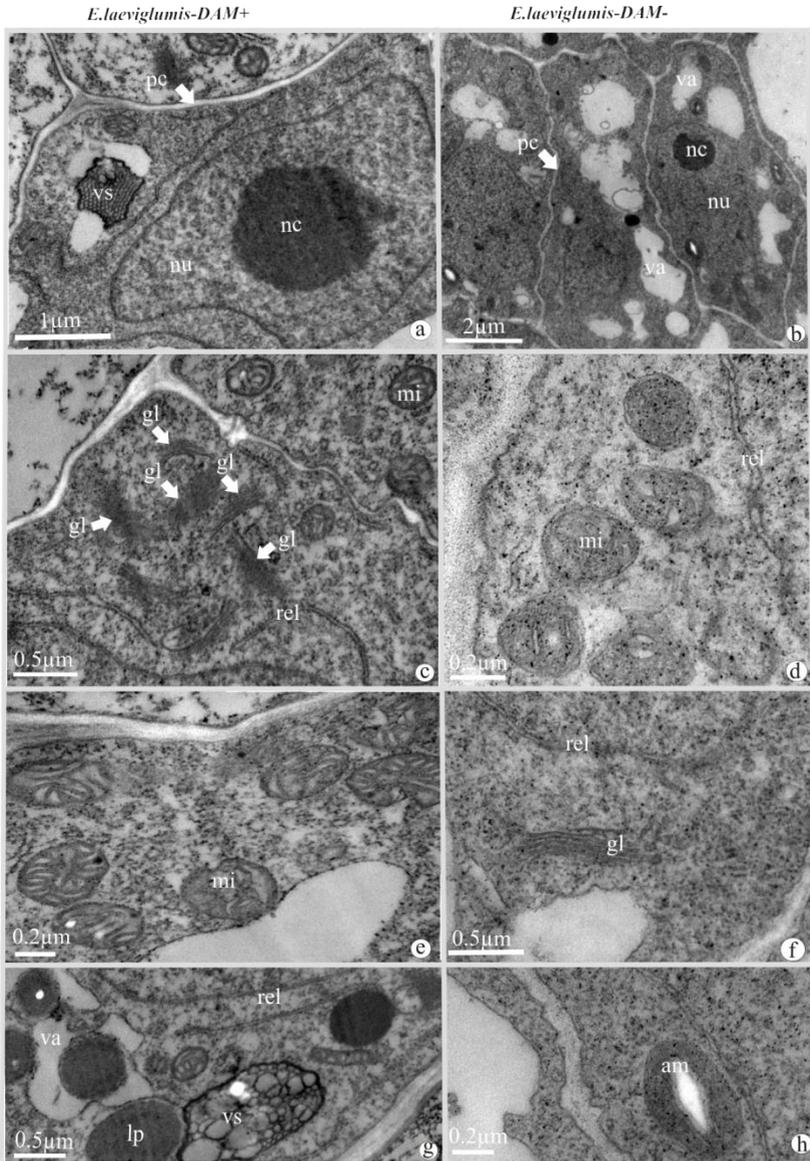
### 3.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO – MET

As análises ultraestruturais do MAC em ambas as espécies e ambientes (Figs. 14 a-h; 15 a-j) revelam células com paredes celulares finas (Figs. 14a-b; 15a-c). Núcleo e nucléolo evidentes (Figs. 14a-b; 15a-c). Foram observados também numerosos vacúolos grandes e pequenos com corpos eletrodensos em ambas as espécies e ambientes (Figs. 14 a-b; 15 a, b, c, d).

A presença de mitocôndrias também foi verificada (Figs. 14c,d,e; 15c,d,f,g) em variação qualitativa entre os espécimes. Muitos

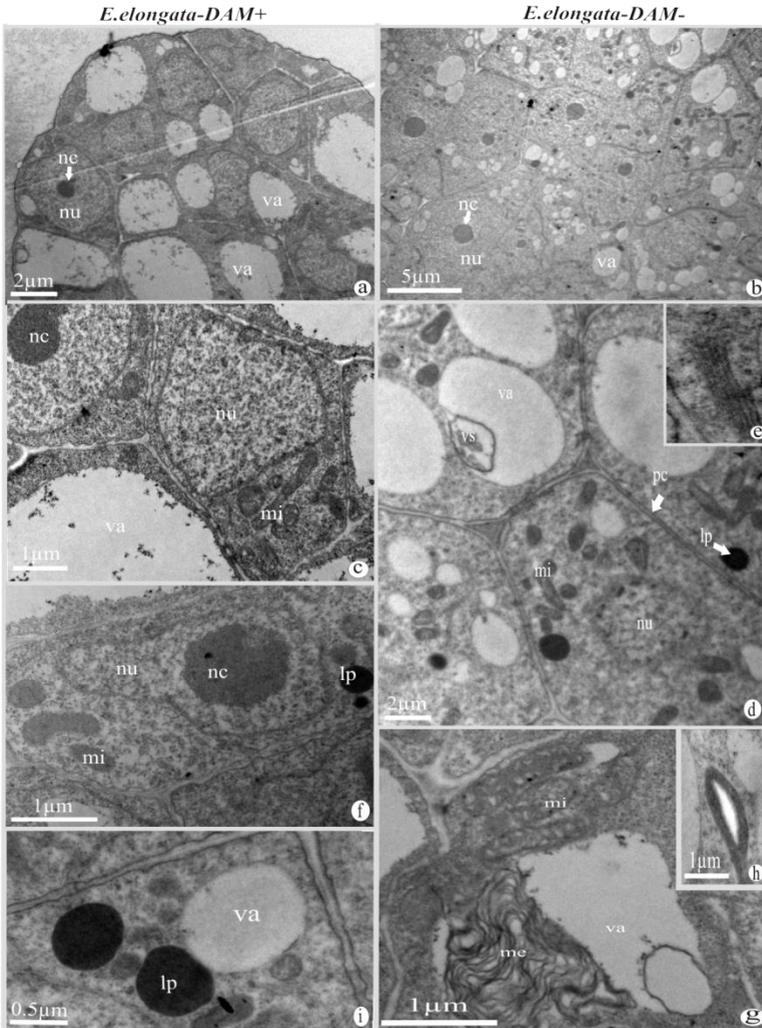
corpos de Golgi foram verificados em *E. laeviglumis* em DAM (+) (Fig. 14c) e poucos em DAM (-) (Fig. 14f). Para *E. elongata* os corpos de Golgi somente foram observados em DAM (-) (Fig. 15e). O retículo endoplasmático liso foi observado em *E. laeviglumis* nos dois ambientes (Figs. 14c,d, f, g). Não sendo possível verificar essa organela em *E. elongata* tanto em DAM (+) e DAM (-). Gotas lipídicas foram observadas em *E. laeviglumis* somente em DAM (+) (Fig. 14g) e em ambos os ambientes em *E. elongata* com mais frequência em DAM (-) (Figs. 15 d, f, i). Amiloplastos foram evidenciados em ambas as espécies no ambiente DAM (-) (Figs. 14 h; 15 h). Em *E. laeviglumis* em DAM(+) verificou-se a presença de vesículas no interior dos vacúolos (Fig. 14 a, g) e *E. elongata* em DAM (-) (Fig. 15d), e ainda observou-se membranas convolutas nos vacúolos (Fig. 15g).

No MAR de ambas as espécies nos dois ambientes, observam-se células com paredes celulares finas, núcleo e núcleo proeminentes, muitas mitocôndrias, corpos de Golgi (Figs. 16 a, b, c, d, e,f; 17a, b, c, d, e, f). O retículo endoplasmático liso, foi evidente em *E. laeviglumis* em DAM (-) (Fig. 16g), assim como as gotas lipídicas as quais foram observadas em ambos os ambientes (Figs. 16 h-i). Raros amiloplastos foram observados nas duas espécies e em seus ambientes (Figs. 16 h-j; 17 f-g). Os vacúolos foram mais evidentes em *E. laeviglumis* nos dois ambientes (Figs. 16 a-b), a presença de vesículas no seu interior foram observadas em *E. laeviglumis* em DAM (+) e *E. elongata* em DAM (-) (Figs.16g; 17h).



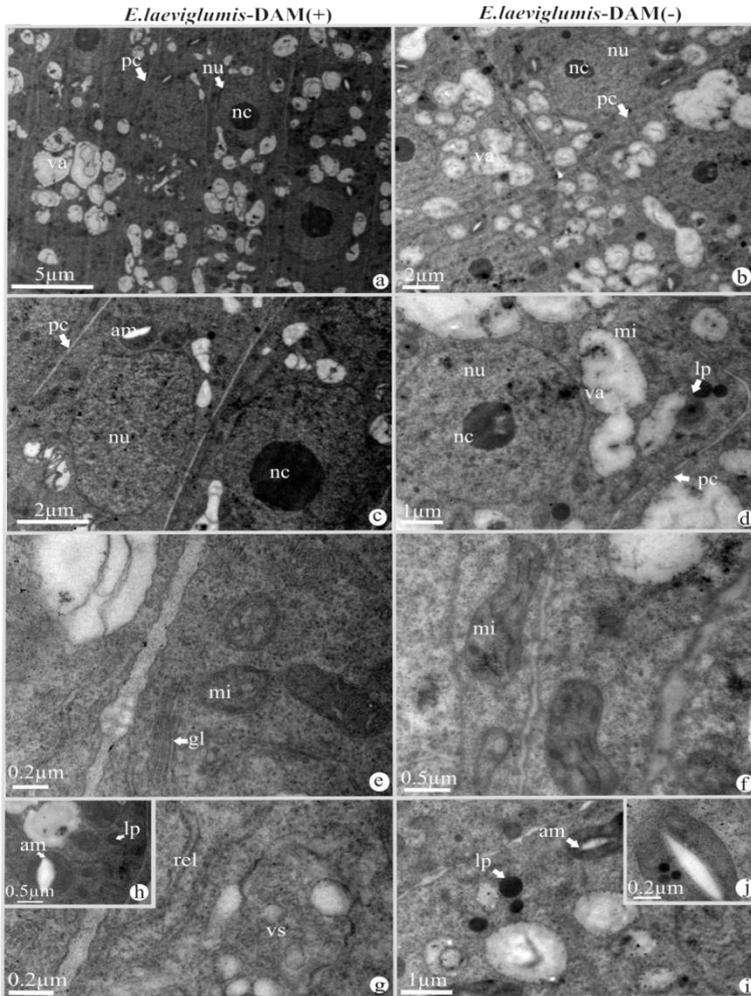
**Figura 14.** Ultraestrutura celular da gema vegetativa do MAC de *E. laevigatum* em ambiente DAM (+) e DAM (-). **a.** Detalhe da parede celular, núcleo, nucléolo e vesículas se fusionado no vacúolo. **b.** Células com parede celular fina, núcleo e nucléolo

evidentes, vacúolos grandes e pequenos. **c.** Parede celular com plasmodesmos, corpos de Golgi, mitocôndrias e retículo endoplasmático liso. **d.** Mitocôndrias e retículo endoplasmático liso. **e.** Várias mitocôndrias. **f.** Corpos de Golgi e retículo endoplasmático liso. **g.** Presença de retículo endoplasmático liso, gotas lipídicas e fusão de vesículas no vacúolo. **h.** Verifica-se amiloplasto. am- amiloplasto ; lp-gotas lipídicas; gl-corpos de Golgi; mi-mitocôndria; nc-nucleolo; nu-núcleo; rel-retículo endoplasmático liso; pc-parede celular; va-vacúolo; vs-vesículas.



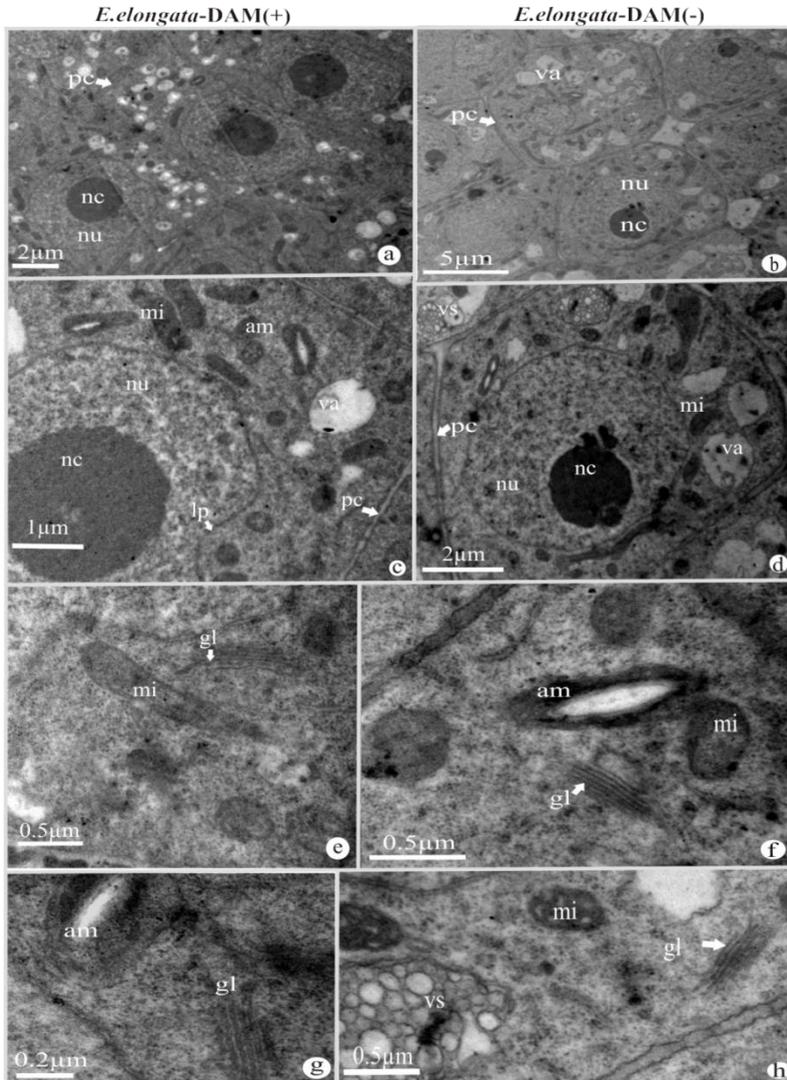
**Figura 15.** Ultraestrutura celular da gema vegetativa do MAC de *E. elongata* em ambiente DAM (+) e DAM (-). **a.** Verifica-se células com parede celular fina, núcleo e nucléolo evidentes, vacúolos grandes e pequeno.

**b.** Observa-se células com parede celular fina, núcleo e nucléolo evidentes, vacúolos grandes e pequenos. **c.** Detalhe da parede celular fina, núcleo e nucléolo evidentes, mitocôndrias e vacúolo. **d.** Detalhe da parede celular núcleo e núcleos evidentes, presença de mitocôndrias e gotas lipídicas e no vacúolo verifica-se a fusão de vesículas. **e.** Detalhe do copo de Golgi. **f.** Observa-se núcleo, nucléolo, mitocôndrias e gotas lipídicas. **g.** Presença de mitocôndrias e vacúolo com membranas no interior. **g-h.** Observa-se o detalhe do amiloplasto. **i.** Detalhe das gotas lipídicas e vacúolo. am-amiloplasto; lp-gotas lipídicas; gl-corpos de Golgi; me-membranas; mi-mitocôndria; nc-nucleolo; nu-núcleo; rel-retículo endoplasmático liso; pc-parede celular; va-vacúolo; vs-vesículas.



**Figura 16.** Ultraestrutura celular do MAR de *E. laevigulumis* em ambiente DAM (+) e DAM (-). **a.** Observa-se a estrutura celular geral com parede celular fina, núcleo e núcleo evidentes e muitos vacúolos. **b.** Verificam-se as células com parede celular fina, núcleo e núcleo evidentes e vários vacúolos. **c.** Detalhe da parede celular, núcleo, nucléolo e amiloplasto. **d.** Verifica-se o detalhe da parede celular, núcleo, nucléolo, grãos lipídicos, mitocôndrias e vacúolo. **e.** Observam-se mitocôndrias e corpos de Golgi, **f.** Detalhe de mitocôndrias. **g.** Observam-se o retículo endoplasmático e no vacúolo vesículas. **h.** Observam-se grão de

amido e gotas lipídicas. **i.** Detalhe de gotas lipídicas e amiloplasto. **j.** Detalhe do amiloplasto. am- amiloplasto ; lp-gotas lipídicas; gl-corpos de Golgi; mi-mitocôndria; nc-nucleolo; nu-núcleo; rel-retículo endoplasmático liso; pc-parede celular; va-vacúolo; vs-vesículas.



**Figura 17.** Ultraestrutura celular do MAR de *E. elongata* em ambiente DAM(+) e DAM(-). **a.** Observam-se a estrutura celular geral com parede celular fina, núcleo e núcleo evidentes e poucos vacúolos. **b.** Verificam-se as células com parede celular fina, núcleo e núcleo evidentes e vacúolos. **c.** Detalhe da parede celular, núcleo, nucléolo, mitocôndrias, vacúolo. **d.** Observam-se a parede celular, núcleo, nucléolo, mitocôndria e vacúolo; **e.** Verificam-se organelas como o

corpo de Golgi e mitocôndrias. **f.** Detalhe do corpo de Golgi, mitocôndrias e amiloplasto. **g.** Observa-se corpo de Golgi e amiloplasto; **h.** Detalhe de vesículas no vacúolo, corpo de Golgi e mitocôndria. am-amiloplasto; lp-gotas lipídicas; gl-corpos de Golgi; mi-mitocôndria; nc-nucleolo; nu-núcleo; rel-retículo endoplasmático liso; pc-parede celular; va-vacúolo; vs-vesículas.

#### 4. DISCUSSÃO

A morfologia das espécies de *Eleocharis* analisadas no presente estudo corroboram às descrições de outras espécies do gênero, como *Eleocharis paliistris* (L.) R. Br (Walters, 1950) e *E. cellulose* Toor (Baksh & Richards, 2006) cujo sistema caulinar apresenta escapos verticais fotossintetizantes originados de um sistema simpodial e caules horizontais os quais podem ter desenvolvimento simpodial ou monopodial (Baksh & Richards, 2006). No presente estudo, definimos o caule horizontal como rizoma. O termo rizoma apesar de ter ampla definição (Bell & Tomlinson, 1980; Bell, 1991), pode ser caracterizado por ser subterrâneo, perene, horizontal ou vertical, monopodial ou simpodial, com nós delimitados por catafilos com função de armazenamento além de propagação vegetativa, conforme também definido por Rodrigues (2004) para outras espécies de Cyperaceae. Segundo Estelita & Rodrigues (2007), o conjunto rizoma e escapo forma o sistema caulinar, podendo o escapo também ser referido como caule reprodutivo. Portanto é de reconhecimento que o escapo tem estrutura caulinar, entretanto sempre com diferenças entre a estrutura morfológica, anatômica e fisiológica de ambos.

As análises anatômicas do desenvolvimento do MAC e MAR, nas espécies de *Eleocharis* estudadas não mostraram variações qualitativas entre si, nem entre os ambientes estudados. Verificou-se a diferenciação da protoderme, do procâmbio e do meristema fundamental a partir do promeristema em ambos os meristemas apicais, além da presença e atividade do meristema de espessamento primário (MEP) e do meristema intercalar (MI) no ápice caulinar e o ápice radicular é do tipo fechado, corroborando com outras descrições anatômicas de espécies de Cyperaceae como descrito por Rodrigues & Estelita (2004, 2007, 2009) e Pereira & Rodrigues (2012).

Os núcleos grandes e centrais, verificados em microscopia de varredura confocal das células do MAC são semelhantes aos observados em *Arabidopsis thaliana* (Sharma *et al.*, 2003), e *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze por Rogge-Renner *et al.*, (2013), assim como os observados nas células do MAR são similares a *A.thaliana*, nos estudos de Müller *et al.* (2015). Portanto, verificou-se tanto na microscopia de luz e de varredura confocal que os núcleos das células não apresentaram alterações mesmo em ambiente contaminado por DAM, diferentemente de Souza *et al.*, (2009), que relataram fragmentações e deformações dos núcleos da raiz e caule em *Alternanthera philoxeroides* quando exposta à metais.

Como verificado na análise de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) os únicos metais presentes no MAC e MAR de ambas as espécies foram o Alumínio (Al) e Molibdênio (Mo), os demais elementos como nitrogênio (N), oxigênio (O), sódio (Na), cálcio (Ca), Magnésio (Mg), Fosforo (P), potássio (K), enxofre (S) e Silício (Si) referidos nas análises, são citados como essenciais as plantas, como também desempenham inúmeras funções biológicas (Taiz & Zeiger, 2006).

As análises ultraestruturais do MAC e do MAR evidenciaram células com características meristemáticas típicas como, parede celular fina, núcleos conspícuos, amiloplastos, citoplasma denso, presença de organelas (mitocôndrias, corpos de Golgi, retículo endoplasmático) no citosol, corpos lipídicos, semelhante ao que é descrito para algumas angiospermas como *Zea mays* (Marín-Méndez *et al.*, 2009), *Allium cepa* (Bennice & Tani, 2009), *Vicia faba* L. (Polit & Nazarski, 2013) *Arabidopsis thaliana* Müller *et al.* (2015) e gimnospermas como *Aracucaria angustifolia* (Rogge-Renner *et al.*, 2012) e *Encephalartos natalensis* Dyer & Verdoorn (Woodenberg *et al.*, 2014). Embora Verteil *et al.*, (2007), afirmem que as células meristemáticas não possuam amiloplastos, tais organelas foram observadas nas células meristemáticas de *Aracucaria angustifolia* (Rogge-Renner *et al.* (2012), de *Encephalartos natalensis* (Woodenberg *et al.*, 2014) e de *Vicia faba* (Polit & Nazarski, 2013) como também neste estudo.

Sendo que, Jin *et al.* (2008), verificaram em *Sedum alfredii* Hance, submetida a concentrações de metais, ocasionaram severas alterações ultraestruturais nas células do meristema apical da raiz, danificando o sistema de membranas, mitocôndrias dilatadas, membrana do retículo endoplasmático rugoso e parede celular, os autores ainda verificaram depósitos de metal na parede celular. Islam *et al.* (2007) verificaram em *Elsholtzia argyi* H. Lévl. núcleos irregulares, e distúrbios no processo de divisão celular devido a ação de metais.

A toxicidade dos metais depende da absorção do metal pela planta, do transporte e da localização celular no tecido da planta (Jin *et al.* 2008). Apesar do desenvolvimento e a formação dos órgãos jovens de *E. elongata* e *E. laevigulumis* não terem sido afetados pelo metais nos ambientes DAM (+), nas análises ultraestruturas observou-se indícios da presença de metais, pois no MAC de ambas as espécies observou-se granulações eletrodensas nos vacúolos, podendo ser um indicativos do acúmulo de metal. Essas granulações eletrodensas também tem sido observadas nos vacúolos celulares de algas, como *Gelidium floridanum* W.R. Taylor e *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V (Santos *et al.*, 2014,

2015), quando submetidas à concentrações de metais. Segundo Santos *et al.*, (2014 e 2015) granulações eletrodensas em vacúolos indicam acúmulo de metal. Segundo Clemens *et al.* (1999) em células eucarióticas, íons tóxicos podem ser removidos do citosol por quelação. As plantas podem sintetizar proteínas como fitoquelatinas, para proteger seu organismo dos metais em excesso (Hall 2002; Melendez, 2012). Essas proteínas tem a capacidade de quelar os metais podendo transferir os mesmos através de cascatas de ATP para o vacúolo (Ortiz *et al.* 1992; Clemens *et al.*, 1999).

Como verificado nos parâmetros físico-químicos dos ambientes estudados todos apresentam pH baixo, caracterizando o ambiente como ácido. Apesar das causas dessa acidificação serem diferentes, ou seja, naturais nos ambientes DAM (-) e antrópicas em DAM (+). Conforme Esteves (2011), o pH do ambiente atua no controle da biodisponibilidade, mobilidade e precipitação dos íons metálicos. Em ambientes impactados pela atividade de mineração do carvão, os resíduos de pirita quando entram em contato com o oxigênio e a umidade, resultam na oxidação de sulferetos, com queda acentuada do pH e solubilização de metais (Martín-Peinado *et al.*, 2015), entre os metais liberados por essa reação encontram-se o Al e Mn (Filho *et al.*, 2015), sendo esses os metais detectados nos órgãos jovens das espécies desse estudo nos ambientes DAM (+), justificando assim a presença de corpos eletrodensos verificados na ultraestrutura. Apesar do registro de Al ocorrer no MAC vegetativo e reprodutivo de *E.elongata* em ambiente DAM (-). O mesmo pode ser ocorrente de fontes naturais, pois a mineralização da matéria orgânica por microorganismos do solo, libera nitrato e hidrogênio e ocasiona a diminuição do pH, com o pH baixo o hidrogênio atua sobre os minerais do solo liberando íons de Al (Echart & Cavalli-Molina, 2001). Esclarecendo assim a acidez dos ambientes DAM (-) e a presença do Al nas análises de espectroscopia dispersiva.

O tráfego intercelular de vesículas para o transporte de substâncias, proteínas, lipídeos, íons, é regulado pelo sistema de endomembranas das células, o qual envolve os processos de endocitose e exocitose (Alberts *et al.*, 2010). A fusão de vesículas foi observada nas células do MAC e MAR de ambas as espécies nos diferentes ambientes, podendo este ser um indicativo do processo de exocitose atuando na secreção de substâncias ou até mesmo de metais.

As pesquisas preliminares de Schmidt (1924) foram as primeiras a estabelecer a subdivisão do meristema apical caulinar em túnica e corpo, no qual, a túnica corresponde ao grupo de células dispostas superficialmente no MAC, dividindo-se no plano anticlinal (ou

longitudinalmente), já a região do corpo corresponde às células dispostas mais internamente com divisões em todos os sentidos (Schmidt 1924; Steeves, 2006). Esse padrão de organização do MAC foi observado em *E. elongata* e *E. laeviglumis* e em ambos os ambientes.

O MEP é um meristema lateral característico das monocotiledôneas, responsável pelo espessamento primário do caule e formação de raízes adventícias (Rudall, 1991). Em espécies de Cyperaceae o MEP foi observado nos gêneros *Scirpus*, *Frimbristylis* (Rudall, 1991), em *Cyperus esculentus* L. (Gifford & Bayer, 1995), em *Cyperus giganteus* Vahl (Estelita & Rodrigues, 2007), em *Cyperus rotundus* L., *C. esculentus* L., *C. odoratus* L., *Fuirena umbellata* Rottb., *Hypolytrum schraderianum* Ness. e *Bulbostylis paradoxa* Ness (Rodrigues & Estelita, 2009). Tal meristema é formado por várias camadas de células dispostas radialmente, localizada na região apical do caule. Durante o desenvolvimento do rizoma, no presente estudo, o MEP se dispõe de forma circular logo abaixo do meristema apical, envolvendo os cordões procambiais e definindo assim o cilindro vascular da região cortical.

A variação da intensidade da atividade do MEP já foi citada por Rodrigues & Estelita (2009) ao analisarem espécies com diferentes tipos caulinares, onde caules mais espessados têm maior atividade e caules menos espessados, como rizomas e estolões delgados, como é o caso das espécies de *Eleocharis* analisadas, percebe-se baixa atividade do MEP, sendo assim, aqui nessas espécies o MEP tem baixa atividade contribuindo com a formação de células parenquimáticas para o córtex interno, e para a formação de raízes adventícias, não tendo participação na formação dos feixes vasculares.

O córtex do rizoma em espécies de Cyperaceae, geralmente é dividido em externo ou hipoderme e córtex interno, tendo origem no meristema fundamental, e no interno também a participação do MEP, em maior ou menor intensidade (Rodrigues & Estelita, 2002, 2009). Na maturidade, as espécies analisadas apresentam aerênquima na região do córtex interno, como também observado em *E. interstincta* (Eiten, 1969). De acordo com Eiten (1969) as células brachiformes do córtex interno se dividem em plano radial formando lacunas de ar. O aerênquima é um tecido comum em plantas aquáticas, tendo seu desenvolvimento estudado principalmente em raízes (Seago & Marsh 1989, Seago *et al.*, 2000, 2005), em rizomas até o presente momento não foram verificados outros trabalhos além desse estudo, que enfatizem o desenvolvimento do aerênquima nesse órgão, dessa forma nas espécies analisadas o aerênquima do rizoma pode ser considerado do tipo

lisígeno radial, pois observou-se que inicialmente as células do córtex interno dividem-se radialmente e posteriormente em fase mais adulta ocorre a lise celular em sentido radial, aumentando assim as lacunas do aerênquima.

Em *E. elongata* e *E. laeviglumis* a partir do MEP ocorre a diferenciação da endoderme e do periciclo como também mencionado por Rodrigues & Estelita (2009) para outras espécies de Cyperaceae. Já Menezes *et al.* (2005), consideram que o MEP é o periciclo em sua fase meristemática juntamente com a endoderme e as suas células derivadas, parecendo assim um único meristema. A ocorrência de endoderme em rizomas nem sempre é clara, muitas vezes pela ausência das estrias de Caspary, no presente estudo, a endoderme pode ser reconhecida pela ocorrência de espessamento em “U” das paredes celulares, conforme também observado por outros autores (Eiten, 1969; Rodrigues & Estelita, 2002; 2009 e Pereira & Rodrigues, 2012).

Para Estelita & Rodrigues (2007), a ocorrência do meristema intercalar (MI), na região apical do rizoma de espécies de Cyperaceae está relacionada com a formação do escapo floral, sendo este meristema o responsável pelo alongamento do entrenó (Fisher 1970) isto é, o MI é responsável pela formação do escapo floral nessas espécies, fato também confirmado em *E. elongata* e *E. laeviglumis*. Anatomicamente os escapos florais não apresentam MEP (DeMason, 1979; Stevenson & Ficher, 1980; Estelita & Rodrigues, 2007) e dessa forma não apresentam regiões distintas entre córtex e cilindro vascular, conforme observado nas espécies de *Eleocharis* do presente estudo.

Neste presente estudo, verificou-se que os cordões de fibras referidos como subepidérmicos em órgão adultos como escapos e rizomas de espécies de Cyperaceae (Eiten, 1969; Prata *et al.*, 2007; Leite *et al.*, 2009; Heizen *et al.*, 2010) são originados da protoderme, sendo portanto referidos como cordões de fibras epidérmicos.

A organização do MAR nas espécies *E. elongata* e *E. laeviglumis* estudadas é do tipo fechado, assim como observado em outras Cyperaceae (Rodrigues & Estelita, 2004; Pereira & Rodrigues, 2012). O padrão fechado é caracterizado pela presença de três faixas ou camadas iniciais independentes, as iniciais do cilindro central, do córtex e a terceira da coifa, podendo a epiderme ter origem das iniciais do córtex ou da coifa (Esau, 1977), sendo que, para as espécies desse estudo observou-se que a epiderme tem origem nas iniciais do córtex.

Em ambas as espécies analisadas, a formação do córtex interno das raízes se deve a presença da endoderme meristemática, a qual já pode ser identificada em região próxima ao promeristema. A ocorrência

da endoderme meristemática é relatada por muitos autores como Melo-de-Pinna & Menezes (2002) em *Ianthopappus corymbosus* Roque & Hind, Rodrigues & Estelita (2004) em *Cyperus giganteus* Vahl, Lima & Menezes (2008) em espécies do gênero *Scleria* Berg e Pereira & Rodrigues (2012) em *Androtrichum trigynum* (Spr) Pfeiffer. Sendo a camada precursora da endoderme, que origina todos os tecidos desde a endoderme até a hipoderme em arranjo radial (Williams, 1947; Seago & Marsh, 1989; Seago *et al.*, 2000 e Rodrigues & Estelita, 2004).

A endoderme nas raízes das espécies analisadas, na maturidade, não mostram espessamento acentuado, com exceção de *E. laeviglumis* em DAM (+). Conforme Deag *et al.* (2009), depósitos de lignina e suberina nas paredes celulares das raízes na células da endoderme e do córtex contribuem para uma menor permeabilidade de metais. Assim, possivelmente os espessamentos observados nas espécies em ambiente DAM (+), podem criar uma barreira de proteção, evitando com que os metais sejam transportados para os tecidos vasculares, evitando que esses elementos cheguem para outras regiões do corpo da planta.

Na maturidade, o córtex interno das raízes de *E. elongata* e *E. laeviglumis* diferencia-se em aerênquima, como também observado por Rodrigues & Estelita (2004) em *Cyperus giganteus* Vahl e Seago *et al.*, (2005) em algumas espécies de monocotiledôneas. Para Seago *et al.*, (2005) são descritos diferentes tipos de aerênquima em raízes e o desenvolvimento de cada tipo de aerênquima está relacionado com a organização do meristema apical radicular aberto ou fechado, a divisão celular, a formação de espaços intercelulares. Rodrigues & Estelita (2004) verificaram a formação de aerênquima esquisolísigeno para *C. giganteus* e o mesmo foi referido por Pereira & Rodrigues (2012) para *A. trigynum*. nas raízes. Já Eiten (1969) observou em *E. interstincta* o aerênquima do tipo lisígeno tangencial, no qual fileiras de células radiais permanecem inteiras e espaços retangulares são formados devido ao rompimento das paredes celulares em sentido tangencial.

De acordo com Seago *et al.*, (2005) nas raízes de Cyperaceae, o aerênquima é do tipo lisígeno tangencial, pois, as separações e colapsos celulares ocorrem tangencialmente entre as fileiras das células radiais do córtex, formando assim as lacunas do aerênquima. Para *E. elongata* e *E. laeviglumis* primeiramente verificou-se a formação de pequenos espaços intercelulares esquisógenos, posteriormente verificou-se a lise celular ocorrendo tangencialmente entre as células do córtex, corroborando assim com as descrições feitas por Rodrigues & Estelita (2004), Pereira & Rodrigues (2012) e Seago *et al.*, (2005).

Alguns autores como Williams (1947), Van Fleet (1961), Seago *et al.*, (1999), Melo de Pina & Menezes (2002) referem-se à hipoderme como as camadas do córtex externo de caules e raízes, outros denominam tais camadas de exoderme em raízes e hipoderme em caules (Esau, 1960; Fanh, 1974). Segundo Seago & Marsh (1989), o número de camadas, o espessamento e a composição das células da hipoderme nas raízes de *Typha glauca* pode variar. No presente estudo utilizou-se o termo hipoderme para ambos os órgãos, a fim de uniformizar os termos, assim como referido para outras espécies de Cyperaceae (Rodrigues & Estelita, 2002; Pereira & Rodrigues, 2012). A hipoderme observada nos rizomas de *E.longata* e *E.laeviglumis* condizem com as características descritas para outras espécies de Cyperaceae (Rodrigues & Estelita, 2002; Heizen *et al.*, 2010; Pereira & Rodrigues, 2012) e para as raízes verificou-se semelhanças com *E. interstincta* (Eiten, 1969), e para espécies de *Scleria* (Lima & Menezes, 2008).

Os testes hitoquímicos, no MAC e MAR de ambas as espécies desse estudo, indicou presença de polissacarídeos neutros e ácidos e proteínas no MAC, assim como também observado no meristema apical caulinar e radicular de *A.angustifloia* por Rogge-Renner *et al.*, (2013). Como citado por Ellis *et al.*, (2010), os polissacarídeos do grupo Arabinogalactanas-proteínas (AGPs) tem ampla distribuição nas plantas, sendo geralmente encontradas na membrana plasmática, na parede celular, no espaço extracelular, em secreções na superfície de estigmas florais e em exsudados, esses polissacarídeos pertencem a uma classe de macromoléculas biológicas que participam de inúmeras resposta biológicas em um organismo (Zhang *et al.* 2015), sendo assim, associadas ao crescimento e desenvolvimento vegetal e até na morte celular programada (Göllner *et al.*, 2011). A reação mais intensa ao PAS observada nas células do MAC, em ambas as espécies em ambiente DAM (+), pode estar relacionada aos diferentes pH das áreas de estudo, sendo que os ambientes DAM (+) apresentaram pH em níveis mais ácidos em relação aos ambientes DAM (-), podendo assim as células do MAC apresentarem concentrações diferentes de pH ocasionando reações distintas entre os ambientes. Em relação às proteínas, as mesmas também podem contribuir para o desenvolvimento dessas espécies em ambientes tão inóspitos, uma vez que atuam em inúmeras funções biológicas (Zaha *et al.*, 2014).

A presença de idioblastos com compostos fenólicos foi observada no meristema fundamental do rizoma e no córtex interno quando jovem e córtex externo quando adulto de *E. elongata* e *E. laeviglumis* e tanto em DAM (+) como em DAM (-). Nos trabalhos de

Rodrigues & Estelita (2002), Heizen *et al.*, (2010), Pereira & Rodrigues (2012), Santos (2012), essas substâncias também foram verificadas em outras espécies da família Cyperaceae em regiões mais jovens e adulta do rizoma, portanto a ocorrência de compostos fenólicos pode ser característico em espécies da família Cyperaceae.

O amido é a maior reserva de carboidratos para as plantas (Sandhu *et al.*, 2004; Evert, 2013). Em células vegetais, o amido é armazenado em forma de grânulos insolúveis em água que são localizados em organelas específicas, como cloroplastos ou amiloplastos (Amaral *et al.*, 2007). Segundo Melo *et al.*, (2007) o amido é consumido pela planta para a conversão em outros carboidratos utilizados no metabolismo. Das espécies analisadas, somente *E. elongata* DAM (+) não apresentou amiloplastos no meristema fundamental caulinar, podendo talvez indicar o alto consumo deste carboidrato para subrir alguma necessidade do metabolismo da planta.

Segundo Esau (1977) as raízes podem produzir mucilagem, fornecendo aderência da raiz no solo, proteção contra elementos nocivos do solo, proteção contra a dessecação e ainda pode servir como uma superfície de absorção de nutrientes. A mucilagem verificada no MAR de *E. elongata* e *E. laeviglumis* é produzida pelas células da protoderme as quais são alongadas, forma característica de tecido secretor como também observado em raízes de *A. trigynum* por Pereira & Rodrigues (2012).

De acordo com Lasat (2002), plantas que habitam ambientes contaminados por metais apresentam respostas diferentes à contaminação por esses elementos. Podendo ser sensíveis, exibindo sintomas de toxicidade ou tolerantes, criando mecanismos que evitem a alta toxicidade desses elementos permitindo o desenvolvimento da planta. A planta é considerada tolerante, quando esta consegue sobreviver em ambiente com elevadas concentrações de metais (Hall, 2002), podendo desenvolver diferentes mecanismos de tolerância, os quais podem variar de acordo com a espécie, os elementos tóxicos e as condições ambientais da área contaminada (Souza *et al.*, 2011). Essas estratégias de proteção podem ocorrer de maneira intra ou extracelular: a primeira está relacionada com a quelatação de metais por proteínas específicas, com posterior compartimentação e transferência para vacúolos; a segunda referece aos exudados das raízes que alteram o pH da rizosfera, favorecendo a especiação dos metais e a ligação de íons às paredes celulares (Mirza *et al.*, 2014).

É possível reconhecer que *E. elongata* e *E. laeviglumis* são plantas tolerantes a metais, pois as mesmas apresentaram corpos

eletrodensos no MAC e não apresentaram sinais de toxicidade no desenvolvimento dos órgãos jovens, podendo assim apresentar diferentes mecanismos de tolerâncias, porém tem se a necessidade de mais estudos para elucidação dessas estratégias.

Os resultados do presente estudo revelaram que o MAC e MAR de *E. elongata* e *E. laeviaglumis* apresentam características anatômicas comuns para espécies de Cyperaceae, como meristema de espessamento primário no rizoma e ausência no escapo, endoderme meristemática, formação de aerênquima e hipoderme nas raízes. Sendo que, apesar das espécies habitarem ambientes contaminados por DAM, as mesmas não apresentaram modificações no desenvolvimento anatômico dos órgãos analisados. Portanto, são necessários mais estudos para verificar as habilidades fisiológicas e bioquímicas de ambas as espécies que habitam esses ambientes poluídos.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. 2010. **Biologia molecular da célula**. 5 ed. Porto Alegre. Arned: 1396 p.
- ALEXANDRE, N. Z. 1999. Diagnóstico Ambiental da Região Carbonífera de Santa Catarina: Degradação dos Recursos Naturais. **Revista de Tecnologia e Ambiente** 5: 35-50.
- ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. 2013. Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. **Chemosphere** 91: 869-881.
- ALVES, M. V.; ARAÚJO, A. C.; PRATA, A. N.; VITTA, F.; HEFLER, S.; TREVISAN, R.; GIL, A. S. B.; MARTINS, S.; THOMAS, W. 2009. Diversity of Cyperaceae in Brazil. **Rodriguésia** 60: 771-782.
- AMARAL, L. I. V.; GASPAR, M.; COSTA, P. M. F.; AIDAR, M. P. M.; BUCKERIDGE, M. S. 2007. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea** 34: 425-431.
- ASHRAF, M. A.; MAAH, M. J.; YUSOFF, I. 2011. Heavy metals accumulation in plants growing in ex tin mining catchment. **International Journal of Everioment Science and Technology** 8: 401-416.
- BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, Ch. 1999. Structural and ultrastrustural changes in heavy metal exposed plants. In **Heavy Metal Stress in Plants, From molecules to ecosystems**. Prasad, M.N.V.; Hagemeyer, J. (EDS) Berlin Springer Verlag, p.183-203.
- BAGHOUR, M.; CHEKROUN K, B. 2013. The role of algae in phytoremediation of heavy metals: A review. **Journal of Materials Environmental Science** 4: 873-880.
- BAKSH, S; RICHARDS, A. 2006. An architectural model for *Eleocharis*: morphology and development of *Eleocharis cellulosa* (Cyperaceae). **American Journal of Botany** 93: 707-715.
- BELL, A. D. 1991. **Plant form. A ilustration guide to flowering plant morphology**. New York, Oxford Universty Press.

- BELL, A. D. & TOMLINSON, P. B. 1980. Adaptive architecture in rhizomatous plants. **Botanical Journal of the Linnean Society** 80: 125-160.
- KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. 1997. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Editora Universidade Rural. São Paulo 1: 1-192.
- BAKER, A. J. M. 1981. Accumulators and excluders strategies in the response of plants to heavy metals. **Journal Plant Nutrition**.3: 643-654.
- BELOLLI, M.; QUADROS, J.; GUIDI, A. 2002 **História do carvão de Santa Catarina. Imprensa oficial do estado de Santa Catarina** 1: 1-300.
- BENNICI, A.; TANI, C. 2009. Ultrastructural effects of salinity in *Nicotiana bigelovii* var. *bigelovii* callus cells and *Allium cepa* roots. **Caryologia** 62: 124-133.
- BOZZOLA, J. J.; RUSSEL, L. D. 1991. **Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologists**. Boston, Jones and Barlett Publishers p.542.
- BUKATSCH, F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos** 6: 255.
- CERETO, C. E. 2008. Formigas em restinga na região da Lagoa Pequena, Florianópolis, SC: levantamento taxonômico e aspectos ecológicos. **Monografia** (Trabalho de conclusão de Bacharelado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. p.106.
- CLEMENS, S.; KIM, E. J.; NEUMANN, D.; SCHROEDER, J. I. 1999. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. **The EMBO Journal** 18: 3325-3333.
- DELHAIZE, E.; RYAN P. R. 1995. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**. 107: 315-321.
- DEMASON D. A. 1979. Function and desenvolvimento f the primary thickening meristema in the monocotyledon, *Allium Cepa* L. **The Botanical Gazette** 140: 51-66.

- DONCHEVA, S. 1997. Copper-Induced Alterations in Structure and Proliferation of Maize Root Meristem Cells. **Jounal Plant Physiology**.153: 482-487.
- DUSHENKOV, S.; KAPULNIK, Y.; BLAYOCK, M.; SOROCHISKY, B.; RANSKIN, I.; ENSLEY, B. 1997. Phytoremediação: a novel approach to an old problem. **Global Environmental Biothecnology** 563-572.
- ECHART, C. L.; CAVALLI-MOLINA, S. 2001. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. **Ciência Rural**. 31: 531-541.
- EITEN, E. 1969. The vegetative anatomy of *Eleocharis interestincta* (Vahl) Rhoem & Schult. **Arquivos Botânicos do Estado de São Paulo** 4: 187-228.
- ELLIS, M.; EGELUND, J.; SCHULTZ, C. J.; BACIC, A. 2010. Arabinogalactan-Proteins: Key Regulators at the Cell Surface? **Plant Physiology** 153: 403-419.
- EMBRAPA. 2004. **Solos do Estado de Santa Catarina**. Rio de Janeiro 46: 1-745.
- ESAU, K. 1943. Ontogeny of the vascular bundle in *Zea mays*. **Hilgardia** 15: 327-368.
- ESAU, K. 1960. **Anatomia vegetal**. Barcelona: Ediciones Omega S.A.
- ESAU, K. 1977. **Anatomy of seed plants**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons.
- ESTELITA, M. E. M.; RODIGUES, A. C. 2007. Subsídios estruturais à caracterização do sistema caulinar em Cyperaceae. **Revista Brasileira de Botânica** 30: 401-409.
- ESTEVES, F. A. 2011. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2 ed., 602 p.
- EVERT, R. F. 2013. **Anatomia das plantas de ESAU**. São Paulo: Blucher.

- EVANS, D. E. 2003. Aerenchyma formation. **New Phytologist** 161: 35-49.
- FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany** .55: 123-142.
- FISHER, J. B. 1970. Development of the intercalary meristem of *Cyperus alternifolius*. **American Journal of Botany** 51: 691-703.
- FILHO, L. C. I. O.; BARETTA, D.; ZORTÉA, T. CASAROTTO, K.; DORS, P., CAMPOS M. L.; SANTOS, J. C. P. 2015. Avaliação ecotoxicológica do resíduo de mineração de carvão. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**. 39: 1806-1813.
- FREITAS, H.; PRASAD, M. N. V.; PRATAS, J. 2004. Plant community tolerant to trace elements growing on the degraded soils of São Domingos mine in the south east of Portugal: environmental implications. **Environment International** 30: 65-72.
- FUSCONI, A.; REPETTO, O.; BONA, E.; MASSA, N.; GALLO, C. DUMASGAUDOT, E.; BERTA, G. 2006. Effect of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. **Environmental & Experimental Botany** 58: 253-260.
- FUSCONI, A.; GALLO, C.; CAMUSSO, W. 2007. Effects of cadmium on root apical meristems of *Pisum sativum* L.: Cell viability, cell proliferation and microtubule pattern as suitable markers for assessment of stress pollution. **Mutation Research** 632: 9-19.
- GAHAN, P. B. 1984. **Plant histochemistry and cytochemistry**: An introduction. London Academic.
- GIFFORD, E. M.; BAYER, D. E. 1995. Development anatomy of *Cyperus esculentus* (yellow nutsedge). **International Journal of Plant Sciences** 156: 622-629.
- GIL, A. S. B.; BOVE, C. P. 2004. O gênero *Eleocharis* R. Br (Cyperaceae) nos ecossistemas aquáticos temporários da planície costeira do Estado do Rio de Janeiro. **Arquivo do Museu Nacional**. Rio de Janeiro. 62: 131-150.

- GOETGHEBEUR, P. 1998. Cyperaceae. In: Kubitzki, K.; Huber, H.; Rudall, P.; Stevens, P.; Stutzel, T. (eds.). **The families and genera of vascular plant**. Flowering plants – monocotyledons. Berlin Springer-Verlag 4: 141-190.
- GÖLLNER, E. M.; ICHINOSE, H.; KANEKO, S.; BLASCHEK W.; CLASSEN B. 2011. An arabinogalactan-protein from whole grain of *Avena sativa* L. Belongs to the wattle-blossom type of arabinogalactan-proteins. **Journal of Cereal Science** 53: 244-249.
- GONZÁLEZ-ELIZONDO, M. S.; TENA-FLORES, J. A.; ALARCÓN-HERRERA, M. A.T.; FLORES-TAVIZÓN, E.; BARAJAS-ACOSTA, N. 2005. An arsenic-tolerant new species of *Eleocharis* (Cyperaceae) from Chihuahua, Mexico; **Brittonia** 57: 150-154.
- GOVAERTS, R.; SIMPSON, D.; BRUHL, J.; EGOROVA, T.; GOETGHEBEUR, P.; WILSON, K. 2007. **World Checklist of Cyperaceae – Sedges**. Kew, Richmond Surrey, Royal Botanic Gardens.
- HALL, J. L. 2002. Cellular Mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany** 53: 1-11.
- HEIZEN, F. J.; TIVANO, C. R., J; VEGETTI, A. 2010. Anatomía del sistema caulinar subterráneo de *Cyperus corymbosus* Var. *subnodosus* (Cyperaceae). **Gayana Botánica**. 67: 223-233.
- HINCHLIFF, C. E.; ROALSON, E. H. 2009. Stem architecture in *Eleocharis* subgenus *Limnochloa* (Cyperaceae): evidence of dynamic morphological evolution in a group of pantropical sedges. **American Journal of Botany** 96: 1487-1499.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. 2012. **Manuais técnicos em geociências**. ISSN 0103-9598. Disponível em: geoftp. IBGE. gov. br. Acesso em : 21/12/2015.
- ISLAM, E.; YANG, X.; LI, T. LIU, D. JIN, X. MENG, F. 2007. Effect of Pb toxicity on root morphology, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi* **Journal of Hazardous Materials** 147: 806-816

- JIN, X.; YANG, X.; ISLAM, E. LIU, D. MAHMOOD Q. 2008. Effects of cadmium on ultrastructure and antioxidative defense system in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator ecotypes of *Sedum alfredii* Hance. **Journal of Hazardous Materials** 156: 387-397.
- JOHANSEN, D. A. 1940. **Plant microtechnique**. New York, McGraw-Will.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. A. 1999. **Systematic: a phylogenetic approach** Sinauer Associates, Inc: Massachusettes. USA.
- KADEJ, F. 1963. Interpretation of the pattern of the cell arrangement in the root apical meristema of *Cyperus gracilis* L.var. *alternifolius*. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae** 32: 295-301.
- KOPEZINSKI, I. 2000. **Mineração X meio ambiente: considerações legais, principais impactos ambientais e seus processos modificadores** Porto Alegre: Editora da Universidade.
- LARCHER, W. 2000. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos, Rima p.531
- LASAT, M. M. 2002. Phytoextraction of Toxic Metals: A review of biological mechanisms. **Journal Environmental Quality** 31: 109-120.
- LAUS, R.; LARANJEIRA, M. C. L.; MARTINS, A. O.; FAVERE, A.; PEDROSA, R. C.; BENASSI, J. C.; GEREMIAS, R. 2005. Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para a remoção da acides ferro (III), manganês (II) de água contaminadas pela mineração de carvão. **Química Nova** 29: 34-39.
- LEITE, P. F.; KLEIN, R. M. 1990 Vegetação. In: IBGE. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Geografia do Brasil: Região Sul** Rio de Janeiro: v.2, p.113-150.
- LEITE, K. R. B.; FRANÇA, F.; SCATENA, V. L. 2009. Anatomia de espécies anfíbias de Cyperaceae de lagoas do semi-árido, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 23: 786-796.

- LIMA, V. F. G. A. P.; MENEZES, N. L. 2008. Endodermis with meristematic activity in roots of species of *Scleria* Berg. (Cyperaceae). **Boletim da Botanica Universidade de São Paulo** 26: 1-6.
- MA, Y. RAJKUMAR M. LUO Y. M. FREITAS H. 2011. Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants. Effects on plant growth and Ni uptake. **Journal of Hazardous Materials** 195: 230-237.
- MACÊDO, L. S.; MORRIL, W. B. B. 2008. Origem e comportamentos dos metais fitotóxicos: Revisão da Literatura. **Tecnologia e Ciência Agropecuária** 2: 28-38.
- McALLISTER, M. L.; MILIOLI, G. 2000. Mining sustainably: opportunities for Canada and Brazil. **Mineral & Energy** 15: 3-14.
- MALDANER, J.; NICOSOLO, F. T.; TABALDI, L. A.; CARGNELUTTI, D.; SKREBSKY, E. C.; RAUBER, R.; GONÇALVES, J. F. ROSSATO, L. V. 2015. Aluminum accumulation in two *Pfaffia glomerata* genotypes and its growth effects. **Ciência Rural**. 45: 1013-1020.
- MARTIN, J. A. B. S. FAGUNDES, N. F.; MARIATH J. E. A. 2014. Ontogeny of the proliferous spikelet in *Eleocharis viridans* (Cyperaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 1: 1-16.
- MARTÍN-PEINADO, F.J.; ROMERO-FREIRE, A.; FERNÁNDEZ, I. G.; SIERRA, A. M.; ORTIZ-BERNAD, I. SIMÓN, T. M. 2015. Long-term contamination in a recovered area affected by a mining spill. **Science of the Total Environment** 514: 219–223.
- MARÍN-MÉNDEZ, W. CHACÓN-SANCHÉZ, E. ARIAS-GATICA, A. M. FONSECA, P.R. BUSTAMANTE-FREER, E. ;MELARA-VALDEZ, M. Ultrastructure and histology of organogenesis induced from shoot tips of maize (*Zea mays*, Poaceae) 2009. **Revista de Biología Tropical** 57: 129-139.
- MELLENDEZ, L. B.; KÜTTER, V. T.; MONTES-BAYÓN, M.; SELLA S. M.; SILVA-FILHO, E. V. 2012. Determinação de Metalotioneínas e Fitoquelatinas utilizando a técnica de HPLC-ICP-MS. **Revista virtual de química** 4: 612-622.

- MELO, H. C.; CASTRO, E. M. SOARES, A. M.; MELO, L. A.; ALVEZ, J. D. 2007. Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. **Hoehnea** 34: 145-153.
- MELO-DE-PINNA, G. F. A.; MENEZES, N. L. 2002. Vegetative organ anatomy of *Ianthopappus* Roque & D.J.N. Hind (Asteraceae-Mutisieae). **Revista Brasileira de Botânica** 25: 505-514.
- MELO-DE-PINNA, G. F. A.; MENEZES, N. L. 2003. Meristematic endodermis and secretory structures in adventitious roots of *RichteraoKuntze* (Mutisieae-Asteraceae). **Revista Brasileira de Botânica** 26: 1-10
- 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: 259-274.
- METCALFE, C.R. 1971. **Anatomy of the monocotyledons**. Cyperaceae. London: Oxford, University Press.
- MIRZA, N.; MAHMOOD Q.; SHAH, M. M.; MAROOF, M.; PERVEZ, A. SULTAN, S. 2014. Plants as useful vectors to reduce environmental toxic arsenic content. *The Scientific World Journal*. 1:1-11.
- MONII, S.; UHLIG, C.; HANSES, E.; MAGEL, E. 2000. Ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to heavy metal pollution. **Environmental pollution** 112: 121-129.
- MOURA, A. J. 2014. Microrganismos endofíticos associados à planta de ambientes impactados e não impactados pela drenagem Ácida de mina de carvão (DAM). **Dissertação** (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências) Universidade Federal de Santa Catarina. p 121.
- MÜLLER, J.; TOEV, T. ;HEISTERS, M. TELLER, J.; MOORE, K. L.; HAUSE, G.; DINESH, D. C.; BÜRSTENBINDER, K. ABEL, S.

2015. Iron-dependent callose deposition adjusts root meristem maintenance to phosphate availability. **Developmental Cell** 33: 216-230.
- MOSSOR-PIETRASZEWSKA T. 2001. Effect of aluminium on plant growth and metabolism. **Acta Bioquímica Polonica**. 48: 673-686.
- NRIAGU, J. O. 1979. Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace metals to the atmosphere. **Nature** 11: 279-409.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O. **Protoplasma** 2: 367-373.
- ORTIZ, D. F., KREPPPEL, L.; SPEISER, D. M.,; SCHEEL G.; MCDONALD, G.; OW, D.W. 1992. Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. **The EMBO Journal** 11: 3491-3499.
- OURIQUES, L. C.; BOUZON, Z. L. 2008. Organização estrutural e ultraestrutural das células vegetativas e da estrutura plurilocular de *Hincksia mitchelliae* (Harvey) P. C. Silva (Ectocarpales, Phaeophyceae). **Rodriguésia** 54: 673-685.
- PAVEI, P. T. 2007 Caracterização e estudo do comportamento de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em ecossistemas aquáticos contaminados pelas atividades mineração de carvão. **Dissertação** (Pós-graduação em Ciências Ambientais). Universidade do Extremo Sul Catarinense.
- PEREIRA, M. P.; PEREIRA, F. J.; RODRIGUES, A. L. C.; BARBOSA, S.; CASTRO, E. M. 2013. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. **Revista Agro@mbiente OnLine** 7: 36-43.
- PEREIRA, R. A.; RODRIGUES, A. C. 2012. Morphoanatomy of the underground system of *Androtrichum trigynum* (Cyperaceae). **Rodriguésia** 63: 305-319.

- POLIT, J. T. NAZARSKI, R. B. 2013. Sucrose transport is inhibited by okadaic acid during regeneration of sugar-starved *Vicia faba* root meristem cells. **Journal of Plant Physiology** 170: 397-405.
- POMBO, L. A. C. 1992. Absorção de metais pesados por plantas e métodos de avaliação da disponibilidade de cádmio no solo. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p.84.
- POMPÊO, M. L. M. MOSCHINI-CARLOS, V.; ALEXANDRE, N. Z.; SANTO, E. 2004. Qualidade da água em região alterada pela mineração de carvão na microbacia do rio Fiorita (Siderópolis, Estado de Santa Catarina, Brasil) **Acta Scientiarum Biological Sciences** 26: 125-136.
- PRATA, A. P.; MENEZES, N. L.; MAZZONI-VIVEIROS, S. C.; WANDERLEY M. L.; THOMAS, W. W. 2007. Anatomia do escapo e rizoma de espécies brasileiras de *Bulbostylis* Kunth (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 30: 245-256.
- PROCURADORIA DA REPÚBLICA EM SANTA CATARINA. **Portal da Ação Cível Pública do Carvão**. Disponível em <[www.jfsc.jus.br/acpdocarvao/index.php](http://www.jfsc.jus.br/acpdocarvao/index.php)>. Acesso em 20 de julho de 2014.
- RAI, P. K. 2009. Heavy Metal Phytoremediation from Aquatic Ecosystems with Special Reference to Macrophytes. Critical. Revision. **Environmental Science Technology** 39: 697-753.
- RAJKUMAR, M.; A. E, N.; PRASAD, M. N. V.; FREITAS, H. 2009. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. **Trends in Biotechnology** 28: 142-149.
- RAJKUMARA, M.; SANDHYA, S.; PRASAD, M. N. V.; FREITAS, H. 2012. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. **Biotechnology Advances** 30: 1562-1574.
- RAVEN, H. P.; EVERT R. F.; 2001. **Biologia vegetal**. ed 6ª .Rio de Janeiro-RJ. Guanabara Koogan.
- RAVAZZOLI, C. 2013. A problemática ambiental do carvão em Santa Catarina: sua evolução até os termos de ajustamento de conduta

- vigente entre os anos de 2005 e 2010. **Geografia em questão**. 6:179-201.
- REYNOLDS, E. S. 1963. The use of the lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** 17: 208.
- RODRIGUES, A. C.; ESTELITA, M. E. M. 2002. Primary and secondary desenvolvimento of *Cyperus giganteus* Vahl rhizome (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 25: 251-258.
- RODRIGUES, A. C.; ESTELITA, M. E. M. 2004. Anatomia da raiz de *Cyperus giganteus* Vahl (Cyperaceae) em desenvolvimento. **Revista Brasileira de Botânica** 27: 629-638.
- RODRIGUES, A. C. 2004. Propagação vegetativa e anatomia do sistema subterrâneo em desenvolvimento de algumas Cyperaceae. **Tese**. (Doutorado em anatomia vegetal) Instituto de biociências da Universidade de São Paulo. p102.
- RODRIGUES, A. C.; ESTELITA, M. E. M. 2009. Morphoanatomy of the stem in some Cyperaceae. **Acta Botanica Brasilica** 23: 889-901.
- ROGGE-RENNER, G. D.; STEINER, N.; SCHMIDT, E. C.; BOUZON, Z. FARIAS F.L.; GUERRA M.P.2012. Structural and component characterization of meristem cells in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze zygotic embryo. **Protoplasma** 250: 731-739.
- RUDALL, P. Lateral meristems and stem thickening growth in monocotyledons.1991. **The Botanical Review** 57: 150-163.
- SALOMONS, W. 1995. Enviromental impact of metal derived from mining activities: Processes,predictions,prevention. **Jounal of Geochemical Exploration** 52: 5-23.
- SANDHU, K. S.; SINGH, N.; KAUR, M. 2004 Characteristics of the different corn types and their grain fractions: physicochemical, thermal, morphological, and rheological properties of starches. **Journal of Food Engineering** 64: 119-127.

- SANIT´a, di TOPPI, L.; GABBRIELLI, R. 1999. Response to cadmium in higher plants. **Environmental & Experimental Botany** 41: 105-130.
- SANTOS, P. P. POTIGUARA, R. C. V.; LINS, A. L. F. A.; MACEDO, E. G. 2012. Caracterizao morfoanatmica dos caules de *Cyperus articulatus* L. e *C. prolixus* H.B.K. (Cyperaceae). **Boletim do Museu Paraense Emlio Goeldi. Cincias Naturais** 7: 47-55.
- SANTOS, R. W.; SCHMIDT, E. C.; FELIX, M. R. L.; POLO, L. K.; KREUSCH, M.; PEREIRA, D. T.; COSTA, G. B.; SIMIONI, C.; CHOW, F.; RAMLOV, F. MARASCHIN M.; BOUZON, Z. L. Bioabsorption of cadmium, copper and lead by the red macroalga *Gelidium floridanum*: Physiological responses and ultrastructure features. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 105: 80-89.
- SANTOS, R. W.; SCHMID, E.C.; VIEIRA I. C. COSTA, G. B.; ROVER T.; SIMIONI C.; BARUFI, J. B.; SOARES C. H. L.; BOUZON, Z. L. 2015. The effect of different concentrations of copper and lead on the morphology and physiology of *Hypnea musciformis* cultivated in vitro: a comparative analysis. **Protoplasma**. 252: 1203-1215.
- SAWIDIS, T.; KALYFA, S.; DELIVOPOULOS, S. 2005. The root-tuber anatomy of *Asphodelus aestivus*. **Flora** 200:332-338.
- SCHMIDT, A. 1924. Histologische Studien na phanerogamen Vegetations punkten. **Bot. Arch.** 8: 345-404.
- SEAGO, J. L. MARSH, L. C. 1989 Adventitious root desenvolviment in typha glauca with emphasis on the cortex. **American journal of Botany** 76: 909-923.
- SEAGO, J. L.; PETERSON, C. A.; ENSTONE, D. E.; SCHOLEY, C. A. 1999. Development of the endodermis and hypodermis of *Typha glauca* Godr. and *Typha angustiflia* L. roots. **Canadian Journal of Botany** 77: 122-134.
- SEAGO, J. L. JR. PETERSON, C. A., KINSLEY, L. J. BRODERICK, J. 2000 Development and Structure of the Root Cortex in *Caltha palustres* L. and *Nymphaea odorata* Ait. **Annals of Botany** 86: 631-640.

- SEAGO, J. L. JR; MARSH, L. C.; STEVENS, K. J.; SOUKUP, A.; VOTRUBOVA, O.; ENSTONE, D.E. 2005. A Re-examination of the Root Cortex in Wetland Flowering Plants With Respect to Aerenchyma. **Annals of Botany** 96: 565-579.
- SCHAT, H.; LLUGANY, M. Y.; BERNHARD, R. 2000. Metal-specific patterns of tolerance, uptake and transport of heavy metals in hyperaccumulating and non hyperaccumulating metallophytes. In: Terry N. y Banuelos G. Eds. **Phytoremediation of Contaminated Soil and Water**. Boca Raton CRC Press p.171-188.
- SILVA, J. P. 2007. Impactos ambientais causados por mineração. **Revista espaço da sophia** 8:1-13.
- SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; GRISS, B.M.; HUNGRIA, M.; ARAÚJO. R.S. Microrganismos e processos biológicos do solo; perspectiva ambiental. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 142p.
- SHAW, A. J. 1989. Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects. New York, **Crc. Press** p.355
- SHARMA, V. K., CARLES, C. FLETCHER, J. C. 2003. Maintenance of stem cell populations in plants. **PNAS** 100: 11823-11829.
- STEEVES, T. A. 2006 The Shoot apical meristem: an historical perspective. **Canadian Journal of Botany** 84:1629-1633.
- STEVENSON, D. W.; FISHER, J. B. 1980. The developmental relationship between primary and secondary thickening growth in Cordyline (Agavaceae). **The Botanical Gazette** 141: 264-268
- SOUKUP, A.; VOTRUBOVÁ, O.; CÍKOVÁ, H. Development of anatomical structure of roots of *Phragmites australis* 2002. **New Phytologist** 153: 277-287.
- SOUZA, V.; L.; SILVA, D. C.; SANTANA, K. B.; MIELKE, M. S.; ALMEIDA, A. F.; MANGABEIRA, P. A. O.; ROCHA, E. A. 2009. Efeitos do cádmio na anatomia e na fotossíntese de duas macrófitas aquáticas, **Acta botânica Brasília** 23: 343-354.

- SOUZA, E. P.; SILVA, I. F.; FERREIRA, L. E. 2011. Mecanismos de tolerância a estresses por metais pesados em plantas. **Revista Brasileira de agrociência**. 17: 167-173.
- SCHUSSLER, E. E, BORKHSENIUS, O .N, LONGSTRETH, D. J. 1997. Formation of root aerenchyma involves programmed cell death in *Sagittaria lancifolia*. **Plant Physiology** 114: 456-456.
- SCHUSSLER, E. E.; LONGSTRETH, D. 1996. Aerenchyma develops by cell lysis in roots and cell separation in leaf petioles in *Sagittaria lancifolia* (Alismataceae). **American Journal of Botany** 83: 1266 - 1273.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2006. **Fisiologia Vegetal**. 3ed. Arned. Porto Alegre.
- TREVISAN, R.; BOLDRINI, I. I. 2008. O Eleochar R. Br (Cyperaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociência** 6:7-67.
- VAN FLEET, D .S. 1961. Histochemistry and function of the endodermis. **Bot Rev** 27: 165-221.
- VERTEIL, J. L.; ALEMANNI, L.; NIEMENAK, N. TRANBARGER, T. J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? 2007. **Trends in Plant Science** 16: 245-252.
- WALTERS, S. M. 1950 On the vegetative morphology of *Eleocharis*.R.Br. **New Phytol**. 49: 1-7.
- WILLS, G. D.; BRISCOE, G. A. 1970. Anatomy of purple nutsedge. **Weed Science** 18: 631-635.
- WILLS, G. D.; HOAGLAND, R. E.; PAUL, R. N. 1980. Anatomy of yellow nutsedge (*Cyperus esculentus*). **Weed Science** 28: 432-437.
- WILLS, G. D. Description of purple and yellow nutsedge (*Cyperus rotundus* an *C. esculentus*) 1985. **Plant Physiology** 1: 2-9.

- WILLIAMS, B. C. 1947. The structure of the meristematic root tip and origin of the primary tissues in the roots of vascular plants. **American Journal of Botany** 34: 455-462.
- WOODENBERG, W. R.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W.; FARRANT, J. M. 2014. Development of cycad ovules and seeds.. Histological and ultrastructural aspects of ontogeny of the embryo in *Encephalartos natalensis* (Zamiaceae). **Protoplasma**. 251: 797-816.
- WONG, M. H. 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. **Chemosphere** 50: 775-780.
- YANG, B.; LAN, C. Y.; YANG, C. S.; LIAO, W. B. CHANG, H. SHU, W. S. 2006. Long-term efficiency and stability of wetlands for treating wastewater of a lead/zinc mine and the concurrent ecosystem development. **Environmental Pollution** 143: 499-512.
- ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. 2014. **Biologia Molecular Básica**. ed 5ª , Porto Alegre: Armed. p.1-141.
- ZHANG, Y.; YANG, X. 1994. The toxic effects of cadmium on cell division and chromosomal morphology of *Hordeum vulgare*, **Mutation Research** 312:121-126.
- ZHANG, Y.; XIAO, Y. M. 1998. Antagonistic effect of calcium, zinc and selenium against Cd induced chromosomal aberration and micronuclei in root cells of *Hordeum vulgare*, **Mutation Research** 420:1-6.
- ZHANG, Z.; WANGC, F.; WANGA, M.; MAA, L.; YE, H. ZENG, X. 2015. A comparative study of the neutral and acidic polysaccharides from *Allium macrostemon* Bunge. **Carbohydrate Polymers** 117: 980-987