ARLETE MARIA PEREIRA MOREIRA DOS SANTOS PINTO

O TAPETE DAS ANTERAS DE *CUCURBITA POLYMORPHA* DUCH.

Estudo ultraestrutural, citoquímico e autorradiográfico e aspectos das suas relações com a parede do grão de pólen

PORTO
1986

Publicação subsidiada pelo
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGAÇÃO CIENTIFICA

ARLETE MARIA PEREIRA MOREIRA DOS SANTOS PINTO

INSTITUTO DE BOTANICA "DR. GONÇALO SAMPAIO", FACULDADE DE CIENCIAS, U.P.
CENTRO DE CITOLOGIA EXPERIMENTAL, U.P.

O TAPETE DAS ANTERAS DE *CUCURBITA POLYMORPHA* DUCH.

Estudo ultraestrutural, citoquímico e autorradiográfico e aspectos das suas relações com a parede do grão de pólen

PORTO
1986

ARLETE MARIA PEREIRA MOREIRA DOS SANTOS PINTO

Licenciada am Biologia, Instituto de Botânica "Dr. Gonçalo Sampaio"
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

O TAPETE DAS ANTERAS DE *CUCURBITA POLYMORPHA* DUCH.

Estudo ultraestrutural, citoquímico e autorradiográfico e aspectos das suas relações com a parede do grão de pólen

DISSERTAÇAO DE CANDIDATURA AO GRAU DE DOUTOR APRESENTADA À FACULDADE DE CIENCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO.

Orientador - Professor Catedrático Doutor R. Salema
(Art. 4º - D.L. 388/70)

PORTO
1986

De acordo com o parágrafo 2 do Artº 8º do Decreto-Lei nº 338/70 foram utilizados, para a elaboração desta dissertação, dados apresentados nos seguintes trabalhos, publicados sob o nome de A. Santos:

- Santos, A., Abreu, I. & Salema, R. 1979 - Elaborate system of RER and degenerescence of tapetum during pollen development in some dicotyledons. **J.Submicr. Cytol., 11**:99-107.
- Abreu, I., Santos, A. & Salema, R. 1981 - Fine structure of protein crystals and bacilliform-type virus in anthers of *Lycopersicum esculentum* Mill.

e das seguintes comunicações:

- Santos, A. & Abreu, I. 1975 - Aspectos do retículo endoplasmático nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch. durante a formação do pólen. X Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Microscopia Electrónica (S.P.M.E.).
- Santos, A. & Abreu, I. 1975 - Cristais proteicos em células do tapete de *Lycopersicum esculentum* Mill. infectadas com vírus tipo baciliforme. X Reunião Anual S.P.M.E.
- Santos, A. & Abreu, I. 1976 - Um novo processo de degenerescência das células do tapete durante o desenvolvimento do pólen. XI Reunião Anual S.P.M.E.
- Santos, A., Abreu, I. & Salema, R. 1980 - Ultrastructural localization of acid phosphatase in tapetal cells of *Cucurbita polymorpha* Duch. **Cien. Biol., 5(1)**:3a (abst.).
- Santos, A., Abreu, I. & Salema, R. 1982 - Cytochemical localization of cytochrome oxidase in tapetal cells of *Cucurbita polymorpha* Duch. **Cien. Biol., 7(1,2)**:14a (abst.).
- Santos, A., Abreu, I. & Salema, R. 1982 - Cytochemical localization of adenylate cyclase in anthers of *Cucurbita polymorpha* Duch. **Cien. Biol., 7(3)**:48a (abst.)

- Santos, A. & Salema, R. 1982 - Cytochemical localization of glucose-6-phosphatase in tapetal cells of *Cucurbita polymorpha* Duch. anthers. **Cien. Biol., 7(4)**:74a (abst.).
- Santos, A. & Salema, R. 1984 - Effects of colchicine in anthers of *Cucurbita polymorpha* Duch. Preliminary results. **Cien. Biol., 9(1)**:54-55 (abst.).
- Santos, A. & Salema, R. 1984 - Ultrastructural alterations induced by gibberellic acid. 1- Effects on anthers of *Cucurbita polymorpha* Duch. **Cien. Biol., 9(1)**:56-57 (abst.)
- Santos, A. & Salema, R. 1984 - Ultrastructural alterations induced by gibberellic acid. 2 - Its effects on callus tissue derived from anthers of *Helianthus annuus* L. **Cien. Biol., 9(1)**:58-59 (abst.).
- Santos, A., Salema, R. & Sá, C. 1984 - Ultrastructural characteristics of the pollen grain wall of *Cucurbita polymorpha* Duch. - **Cien. Biol., 9(4)**:258 (abst.).
- Santos, A. & Salema, R. 1985 - Efeito do ácido mevalónico na ontogenia do tapete e do grão de pólen de *Cucurbita polymorpha* Duch. XX Reunião Anual da S.P.M.E. (2ª Reunião Anual de Morfologistas Portugueses)
- Santos, A. & Salema, R. 1986 - Incorporação de ^{3}H acetato nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch. XXI Reunião Anual da S.P.M.E.

tendo colaborado na programação e realização das experiências, na interpretação e discussão dos resultados e na elaboração dos respectivos textos.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Professor Doutor Roberto Salema expresso o meu profundo reconhecimento pelo estímulo e entusiasmo com que sempre apoiou a execução deste trabalho e pelos seus ensinamentos como Professor e Investigador. A minha gratidão pela confiança que em mim depositou aquando do seu convite para fazer parte do corpo técnico do Instituto de Botânica "Dr. Gonçalo Sampaio" e do grupo de Assistentes das aulas práticas de Biologia Celular.

À Comissão Directiva do Instituto de Botânica "Dr. Gonçalo Sampaio", na pessoa do seu Presidente, e à Direcção do Centro de Citologia Experimental da U.P., os meus agradecimentos pelas facilidades e apoios concedidos.

Aos Profs. Doutores Isabel Santos e Manuel Teixeira da Silva o meu agradecimento pela disponibilidade demonstrada e sugestões oportunas.

À Dra. M.C. Risueño do Instituto de Biologia Celular, Madrid, a minha gratidão pelo acolhimento amável que me dispensou no seu laboratório e pelos seus ensinamentos e orientações.

Ao Dr. Osvaldo Freire manifesto a minha gratidão por todos os ensinamentos que dele recebi e pela valiosa e imprescindível contribuição prestada na efectivação das experiências de medição de radioactividade com o espectrómetro de cintilação de líquidos.

A todos os colegas do Instituto de Botânica "Dr. Gonçalo Sampaio" a minha gratidão pela ajuda prestada e sobretudo pelas palavras de incitamento e pelas provas de simpatia e amizade.

O meu reconhecido agradecimento a todos os que trabalham no Centro de Citologia Experimental, U.P., pela colaboração prestada e, muito particularmente à Sra. D. Maria Andrea Costa pela elevada competência e dedicação com que realizou as provas fotográficas e à Sra. D. Maria Margarida Oliveira pela competência e qualidade com que executou o trabalho de dactilografia.

O meu profundo reconhecimento ao Instituto de Histologia e Embriologia da

Faculdade de Medicina do Porto pelas facilidades concedidas na realização das autorradiografias. De um modo singular, quero testemunhar a minha gratidão à Sra. D. Alice Guimarães pela invulgar competência e dedicação que dispensou à execução do trabalho autorradiográfico.

O meu agradecimento ao Eng. Carlos Sá do Centro de Metalurgia e Ciência dos Materiais da Faculdade de Engenharia do Porto pela disponibilidade manifestada na realização do trabalho de microscopia electrónica de varrimento.

Agradeço também ao Instituto Nacional de Investigação Científica (INIC) e à Fundação Calouste Gulbenkian pelo suporte financeiro concedido através do Centro de Citologia Experimental onde tenho vindo a desempenhar funções de investigação.

INDICE

INTRODUÇÃO 1

MATERIAL E MÉTODOS 21

1. **MATERIAL** 22

2. **MÉTODOS** 22

2.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISSÃO 22

2.1.1. Fixação 22

2.1.2. Desidratação e inclusão 23

2.1.3.Cortes ultrafinos e contrastação 23

2.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO 23

2.3. MICROSCOPIA ÓPTICA 24

2.4. MÉTODOS CITOQUÍMICOS 24

2.4.1. Localização de polissacarídeos 24

2.4.2. Extracção pela pronase 25

2.4.3. Localização citoquímica 25

2.4.3.1. Fosfatase ácida 25

2.4.3.2. Adenosina trifosfatase 26

2.4.3.3. Glucose-6-fosfatase 26

2.4.3.4. Ciclase adenílica 26

2.4.3.5. Citocromo c oxidase 26

2.5. SOLUÇÕES UTILIZADAS NOS TRATAMENTOS DAS ANTERAS 26

2.5.1. Acido giberélico 27

2.5.2. Acido mevalónico 27

2.5.3. Colquicina 27

2.5.4. Glucose e sacarose 27

2.6. EXTRACÇÃO DE PIGMENTOS E DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE CAROTENÓIDES E CLOROFILAS 28

2.7. INCORPORAÇÃO DE UM ISÓTOPO RADIOACTIVO [^{3}H] 28

2.7.1. Medição da radioactividade 28

2.7.2. Autorradiografia ultraestrutural 30

RESULTADOS 31

1. ULTRAESTRUTURA E EVOLUÇÃO DO TAPETE DAS ANTERAS DE *CUCURBITA POLYMORPHA* DUCH 32

2. FORMAÇÃO DA PAREDE DO GRÃO DE PÓLEN DE *CUCURBITA POLYMORPHA* DUCH 54

2.1. FASE PRELIMINAR DA FORMAÇÃO DA PAREDE 54

2.2. FASE INICIAL DA FORMAÇÃO DA PAREDE 63

2.3. FASE FINAL DA FORMAÇÃO DA PAREDE 67

3. ACÇÃO DE AGENTES QUÍMICOS NAS ANTERAS DE *CUCURBITA POLYMORPHA* DUCH 80

3.1. ACIDO GIBERÉLICO 80

3.2. ACIDO MEVALONICO 84

3.3. COLQUICINA 88

3.4. GLUCOSE E SACAROSE 92

4. LOCALIZAÇÃO CITOQUÍMICA DE ALGUMAS ENZIMAS A NÍVEL ULTRAESTRUTURAL NAS ANTERAS DE *CUCURBITA POLYMORPHA* DUCH .. 96

4.1. HIDROLASES 97

4.1.1. Fosfatase ácida 97

4.1.2. Adenosina trifosfatase 99

4.1.3. Glucose-6-fosfatase 100

4.2. LIASES 102

4.2.1. Ciclase adenílica 102

4.3. OXIDOREDUTASES 107

4.3.1. Citocromo c oxidase 107

5. TAPETE COM SISTEMA ELABORADO DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EM ANTERAS DE OUTRAS ESPÉCIES 108

6. INCORPORAÇÃO DE ^{3}H ACETATO NAS ANTERAS DE *CUCURBITA POLYMORPHA* DUCH. RESULTADOS PRELIMINARES 112

DISCUSSÃO 119

1. ULTRAESTRUTURA E EVOLUÇÃO DO TAPETE DAS ANTERAS DE *CUCURBITA POLYMORPHA* DUCH 120

2. FORMAÇÃO DA PAREDE DO GRÃO DE PÓLEN DE *CUCURBITA POLYMORPHA* DUCH. 136

2.1. FASE PRELIMINAR DA FORMAÇÃO DA PAREDE 136

2.2. FASE INICIAL DA FORMAÇÃO DA PAREDE 145

2.3. FASE FINAL DA FORMAÇÃO DA PAREDE 151

3. ACÇÃO DE AGENTES QUÍMICOS NAS ANTERAS DE *CUCURBITA POLYMORPHA* DUCH 160

3.1. ACIDO GIBERÉLICO 160

3.2. ACIDO MEVALONICO 163

3.3. COLQUICINA 165

3.4. GLUCOSE E SACAROSE 169

4. LOCALIZAÇÃO CITOQUÍMICA DE ALGUMAS ENZIMAS A NÍVEL ULTRAESTRUTURAL NAS ANTERAS DE *CUCURBITA POLYMORPHA* DUCH 173

4.1. HIDROLASES 173

4.1.1. Fosfatase ácida 173

4.1.2. Adenosina trifosfatase 176

4.1.3. Glucose-6-fosfatase 178

4.2. LIASES 179

4.2.1. Ciclase adenílica 179

4.3. OXIDOREDUTASES 182

4.3.1. Citocromo c oxidase 182

5. TAPETE COM SISTEMA ELABORADO DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EM ANTERAS DE OUTRAS ESPÉCIES 184

6. INCORPORAÇÃO DE ^{3}H ACETATO NAS ANTERAS DE *CUCURBITA POLYMORPHA* DUCH. RESULTADOS PRELIMINARES 186

RESUMO E CONCLUSÕES 188

SUMMARY AND CONCLUSIONS 200

BIBLIOGRAFIA 205

INTRODUÇÃO

Este trabalho descreve o estudo da ultraestrutura e evolução do tapete das anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch. e as possíveis inter-relações entre estas células esporofíticas e o gametófito em desenvolvimento.

As células do tapete constituem a camada mais interna da parede das anteras, são altamente especializadas e desempenham papel de primordial importância na formação do grão de pólen, durante a microsporogénese. As células mães do pólen sofrem uma série de transformações evolutivas até originarem o gâmeta masculino e, durante todo este processo estão rodeadas e em contacto íntimo com o tapete, de tal modo que todas as substâncias que atingem o pólen em desenvolvimento, têm que atravessar as células do tapete e/ou aí serem metabolizadas (Echlin, 1971 a,b).

Desde há longo tempo que o estudo do aparelho reprodutor da flor, nomeadamente os estames, têm merecido a atenção dos botânicos e, após a generalização das técnicas de microscopia electrónica, foi possível acompanhar o desenvolvimento ultraestrutural e fisiológico das anteras das plantas, em cujos microsporângios têm lugar todos os fenómenos que, desde a célula mãe do pólen, conduzem à formação do gametófito masculino.

Após a formação do primórdio estaminal, cada antera é constituída por um agregado de células nas quais se diferenciam, normalmente em quatro regiões distintas, algumas células hipodérmicas. Estas células sofrem divisões periclinais originando um tecido denominado arquespório a partir do qual se diferenciam para o exterior as células parietais primárias, que irão evoluir e formar a parede da antera, e para o interior o tecido esporogénico. As células esporogénicas são do tipo meristemático, possuindo uma parede celulósica com numerosos plasmodésmios entre si. Normalmente, após uma divisão mitótica, as células esporogénicas originam as células mães do pólen, também designadas microsporócitos ou meiócitos, as quais, por uma meiose, vão formar quatro células haplóides.

Após o início da meiose, as células mães do pólen ficam progressivamente

rodeadas por uma parede especial de calose (Waterkeyn, 1962) que se deposita entre a parede celulósica e o plasmalema. A calose é um polímero de unidades de glucose com ligações ß-1,3, e pela sua formação é responsabilizado o aparelho de Golgi dos meiócitos. Esta parede vai aumentando de espessura de tal modo que, no fim da meiose, as células mães do pólen ficam completamente rodeadas pela parede de calose, totalmente independentes umas das outras. As divisões celulares que se operam durante a meiose seguem dois tipos distintos de comportamento: a citocinese simultânea é característica de grande parte das Dicotyledoneæ, não se formando parede celular no final da meiose I, ainda que se observe a existência de fragmoplasto e só no final da meiose II se originam as células haplóides; a citocinese sucessiva, durante a qual se formam paredes celulares no fim da meiose I e da meiose II, típica das Monocotyledoneæ (Esau, 1977).

No fim da meiose, as quatro células haplóides ou micrósporos ficam agregadas dentro da parede calósica constituíndo uma tétrada. A libertação dos micrósporos tem lugar após a dissolução da calose, que se efectua por acção duma enzima, a calase, sintetizada nas células do tapete (Mepham & Lane, 1969 b). Ainda no estádio de tétrada inicia-se a formação da parede do grão de pólen ou esporoderme. Nesta altura, deposita-se entre o plasmalema e a calose, uma camada fibrilar de celulose designada primexina (Heslop-Harrison, 1963 a,b) que funciona como molde e precursor da parede. Esta parede especial que recobre o citoplasma das células do pólen é estratificada e ornamentada e constituída, basicamente, por duas camadas - a exina e a intina.

A exina, a camada mais externa da parede do pólen, é constituída essencialmente por esporopolenina (Zetzshe, 1932; Zetzshe et al.,1928, 1931, 1937) - um polímero de carotenóides e ésteres de carotenóides (Books & Shaw, 1968 a, 1971). A esporopolenina é uma substância altamente resistente a vários produtos químicos, a temperaturas elevadas e a agentes degradativos do material biológico,

sendo a principal responsável pela preservação do pólen nos depósitos fósseis dos vegetais. A presença de sílica na exina do pólen de certas Dicotyledoneæ, aumenta a resistência ao desgaste geológico e biológico (Crang & May, 1974). A formação dos precursores da esporopolenina tem sido, na maioria das espécies, atribuída, pelo menos em parte, às células do tapete. A exina é uma camada estratificada e são variadas as terminologias apresentadas para os vários estratos, nomeadamente, as de Erdtman (1952, 1966, 1969), Faegri (1956), Faegri & Iversen (1950, 1975), Rowley (1959), Christensen & Horner (1974) e Heslop-Harrison (1979). No entanto, a terminologia mais utilizada é a de Erdtman, que considera a exina dividida em dois estratos - um exterior e ornamentado, a sexina, e outro interior, não ornamentado, a nexina. A sexina compreende elementos alongados dispostos radialmente (as báculas) que podem estar livres ou ligadas pelo tecto. A nexina pode ser ultraestruturalmente dividida em 1-3 camadas distintas, sendo à mais externa (nexina 1) que se liga a zona basal das báculas. A intina é a camada contínua, depositada na zona mais interna da esporoderme, sendo essencialmente constituída por celulose, hemicelulose e substâncias pécticas (Sitte, 1953). A deposição da intina inicia-se após a libertação dos esporos da tétrada, sendo o material que a constitui transportado para a parede em formação através de vesículas resultantes da actividade dos dictiossomas dos micrósporos (Heslop-Harrison, 1971 b). Algumas vezes, as imagens de microscopia electrónica mostram a intina lamelizada, devido à presença de inclusões de proteínas entre as microfibrilas de celulose. Na verdade, na intina de elevado número de Angiospermæ e de algumas Gymnospermæ, foram localizadas enzimas hidrolíticas (Knox & Heslop-Harrison, 1969, 1970).

Na maior parte dos grãos de pólen, a esporoderme apresenta regiões diferenciadas que constituem os poros (aberturas circulares) ou fendas (aberturas alongadas), através das quais emerge o tubo polínico, durante a germinação. Das várias camadas que constituem a parede do pólen, apenas a intina é contínua ao

nível dos poros embora, em alguns casos, possam também coexistir alguns elementos da exina.

Após a formação da parede celular, o núcleo do micrósporo sofre uma divisão mitótica originando o gametófito com dois núcleos e depois duas células - a célula vegetativa e a célula germinativa. A célula vegetativa originará o tubo polínico e o núcleo da célula germinativa divide-se uma vez mais para formar dois núcleos espermáticos ou gâmetas masculinos. Aquando da fecundação, após a polinização, um destes núcleos funde-se com o núcleo do óvulo originando assim a nova geração esporófita; o outro núcleo funde-se com o núcleo polar do megagametófito originando o núcleo primário do endosperma e eventualmente o endosperma da semente.

Durante todo este processo da microsporogénese, tem sido atribuído ao tapete um contributo significativo. Ainda que o tapete tenha sido reconhecido como tecido característico das plantas vasculares, as opiniões divergem quanto à sua origem. Alguns autores (Vasil, 1967; Echlin, 1971 a,b; Abadie & Hideux, 1979 a) referem que as células parietais primárias do microsporângio sofrem repetidas divisões periclinais e anticlinais, originando as várias camadas da parede da antera e as células do tapete. No entanto, algumas dúvidas subsistem, tendo sido sugerida, em algumas espécies, uma origem esporogénica para o tapete (*Antirrhium majus* L. - Mechelke, 1952; *Pulsatilla grandis* Wenderoth - Büstow, 1955; *Gentiana acaulis* L. e *Impatiens glandulifera* Royle - Steffen & Landmann, 1958 a; *Capsicum annuum* L. - Novák & Betlach, 1970; *Sorghum bicolor* (L.) Moench - Christensen et al., 1972; *Taxus baccata* L. - Pennell & Bell, 1985). Em algumas Dicotyledoneæ, nomeadamente em *Alectra thomsoni* Hook (Vijayaraghavan & Ratnaparkhi, 1973), *Pyrostegia* Presl. (Gupta & Nanda, 1978 a), *Tecoma* Juss (Nanda & Gupta, 1978) e na maioria das espécies das Gentianaceæ (Sankara Rao & Chinnappa, 1983) observou-se, que as células do tapete junto do lóculo externo das anteras derivavam da camada parietal,

enquanto que as situadas junto do lóculo interno tinham origem no tecido conectivo.

O estudo ontogénico do tapete em *Tecoma stans* (Linn.) H.B.& K. (Gupta & Nanda, 1978 b) mostrou haver não só uma dupla origem como também um dimorfismo para estas células. Em outra Dicotyledoneæ, *Annona squamosa* L. (Periasamy & Kandasamy, 1981) foi mesmo demonstrado, morfologicamente, que as células do tapete tinham uma tripla origem; algumas células derivavam das iniciais parietais, outras das células do conectivo e outras ainda das iniciais septais.

As células do tapete podem apresentar um só núcleo mas, na maioria das Angiospermæ, são bi- ou multinucleadas (Franceschi & Horner, 1979) o que resulta frequentemente da ocorrência de mitoses sem citocinese (Iijima, 1962; Hoefert, 1971). Por vezes, as células do tapete atingem um grau elevado de poliploidia. Esta elevada guarnição cromossómica pode resultar de mitose sem citocinese, mitoses abortivas ou endomitoses. Este último caso foi observado, nomeadamente, no tapete de *Eremurus* Bieb. (Oksala & Therman, 1977) e no de algumas Cucurbitaceæ (Turala, 1958, 1963).

De acordo com o seu comportamento durante a microsporogénese, foram descritos dois tipos principais de tapete (Goebel, 1905):

1 - Tapete secretor, glandular ou parietal - cujas células mantêm, durante a microsporogénese, a sua posição na periferia do lóculo da antera. Após um importante período de secreção activa, o citoplasma tapetal desorganiza-se progressivamente e sofre uma autólise completa. Durante este processo ontogénico, as paredes celulares vão sendo destruídas, tendo sido sugerido (Steer, 1977 a; Pacini & Juniper, 1979 b) que a forma e posição das células dependia de microtúbulos situados na periferia dos protoplastos.

2 - Tapete plasmodial, periplasmodial ou amebóide - caracterizado por uma degenerescência precoce das paredes celulares, invadindo os seus protoplastos a cavidade da antera e entrando em contacto directo com o pólen em desenvolvimento.

Estes protoplastos tapetais fundem-se originando um periplasmódio, tendo sido os microtúbulos responsabilizados tanto pela fusão como pela forma das células (Tiwari & Gunning, 1986 b).

Embora os dois tipos de tapete ocorram quer nas Angiospermæ quer nas Gymnospermæ, o tapete secretor é característico da maioria das Dicotyledoneæ (Quadros 1,2). Em algumas espécies foi referida a presença simultânea dos dois tipos de tapete (Santos & Abreu, 1977; Periasamy & Kandasamy, 1981; Abreu, 1984) enquanto que em *Lens esculenta* Moench (Shukla, 1954) foi descrito um tipo intermédio de tapete, cujas células perdiam as paredes, formavam um periplasmódio, mas não se introduziam entre os micrósporos em desenvolvimento. Um outro tipo de tapete intermediário, denominado tapete invasivo, foi descrito durante a microsporogénese em *Canna* L. (Tiwari & Gunning, 1986a), caracterizado pela libertação de protoplastos individuais, sem se formar o periplasmódio.

Do ponto de vista evolutivo, o carácter mais ou menos primitivo dos dois tipos de tapete é motivo de controvérsia. Eames (1961) sugere que o tapete amebóide tem um carácter primitivo, lembrando a sua semelhança com o periplasmódio amebóide que se encontra nos esporângios das plantas vasculares inferiores. Este autor afirma mesmo que o tapete amebóide caracteriza as Monocotyledoneæ e algumas Dicotyledoneæ inferiores. Por outro lado, Sporne (1973), baseando-se em dados estatísticos, salienta que o tapete glandular é uma característica primitiva nas Angiospermæ sendo o tapete amebóide um carácter mais avançado. Esta opinião foi também adiantada para algumas espécies da família das Leguminosæ (Buss & Lersten, 1975).

Do ponto de vista funcional, as células do tapete têm sido responsabilizadas por variados processos:

1 - Dissolução da parede de calose

Após a divisão meiótica das células mães do pólen, os quatro micrósporos da

QUADRO 1

TAPETE PLASMODIAL

MONOCOTYLEDONEÆ

ALISMACEAE - *Alisma* L. (Bhojwani & Bhatnagar, 1977); *Sagittaria* L. (Eames, 1961)

BERBERIDACEAE - *Mahonia aquifolium* Nutt. (Roland-Heydacker, 1979)

BUTOMACEAE - *Butomus* L. (Eames, 1961; Bhojwani & Bhatnagar, 1977)

CANNACEAE - *Canna* L. (Davis, 1966)

COMMELINACEAE - *Gibasis karwinskyana* (Schultz. f.) Rohw. , *G. venustula* (Kunth) D.R. Hunt (Owens & Dickinson, 1983), *Rhoeo discolor* Hance (Albertini, 1971; Souvre & Albertini, 1982), *R. spatacea* (Swartz) Stearn (Nanda & Gupta, 1977), *Tradescantia bracteata* Small (Mepham & Lane, 1968)

CYMODOCEACEAE - *Thalassodendron ciliatum* (Forsk.) Den Hartog (Ducker et al., 1978; Pettitt, 1981), *Amphibolis antarctica* Aschers (Ducker et al., 1978).

HELICONEACEAE - *Heliconia* L. (Stone et al., 1979)

HYDROCHARITACEAE - *Thalassia hemprichii* Aschers, *Halophila stipulacea* Aschers (Pettitt, 1981)

SCHEUCHZERIACEAE - *Triglochin* L. (Eames, 1961)

SPARGANIACEAE - *Sparganium* L. (Eames, 1961)

ZINGIBERACEAE - *Amomum* L., *Nicolaia* L. (Davis, 1966)

DICOTYLEDONEAÆ

ARACEAE - *Arum italicum* Mill. (Pacini & Juniper, 1983)

ASTERACEAE - *Ambrosia artemisiifolia* L., *Cosmos bipinnatus* Cav., *Tagetes patula* L. (Heslop-Harrison, 1969), *Helianthus annuus* L. (Horner, 1977; Horner & Pearson, 1978), *Parthenium hysterophorus* L. (Rudramuniyappa, 1985)

GENTIANACEAE - *Canscora decurrens* Dalz (Maheswari Devi & Laksminarayana, 1977; Sankara Rao & Chinnappa, 1983), *C. decussata* Schult, *C. diffusa* Wall (Maheswari Devi, 1962), *Gentiana acaulis* L. (Carraro & Lombardo, 1976), *G. pedicellata* Wall, *G. quadrifaria* Blume (Sankara Rao & Chinnappa, 1983), *Swertia perennis* L. (Guerin, 1926)

HIPPURIDACEAE - *Hippuris* L. (Rowley & Dunbar, 1967)

LEGUMINOSAE - *Parkinsonia aculeata* L. (Larson & Lewis, 1962)

MALVACEAE - *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. (Nabeesa & Neelakandan, 1985)

OLEACEAE - *Osmanthus heterophyllus* Aort. ex C. Koch. (Cerceau-Larrival et al., 1980-1981)

RANUNCULACEAE - *Paeonia albiflora* Pall. (Iijima, 1962)

GYMNOSPERMÆ

PINACEAE - *Larix decidua* Miller (Mikulska et al., 1969), *Pinus thunbergii* Parl. (Iijima, 1962)

GERANIACEAE - *Pelargonium zonale* L'Herite (Lombardo & Carraro, 1976 b)
GROSSULARIACEAE - *Ribes rubrum* L. (Geneves, 1964)
HIMANTANDRACEAE - *Galbulimima belgraveana* (F.Muell.) Sprague (Prakash et al., 1984)
LEGUMINOSAE - *Desmodium glutinosum* Schindl., *D. illinoense* A.Gray (Buss et al., 1969), *Lupinus* sp. (Santos et al., 1979), *Soja hispida* Moench)Madjd & Roland-Heydacker, 1978), *Lens esculenta* Moench., *Pisum sativum* L. (Biddle, 1979), *Vicia faba* L. (Iijima, 1962)
LORANTHACEAE - *Viscum album* L. (Iijima, 1962)
MORACEAE - *Cannabis sativa* L. (Heslop-Harrison, 1964)
OLEACEAE - *Olea europaea* L. (Pacini & Juniper, 1979 b)
ONAGRACEAE - *Oenothera lamarckiana* Ser. (Iijima, 1962)
PAEONIACEAE - *Paeonia tenuifolia* L. (Marquardt et al., 1968)
POLEMONIACEAE - *Collomia grandiflora* Douglas ex Lindley (Minter & Lord, 1983)
POLYGONACEAE - *Rumex acetocera* L. (Iijima, 1962)
PRIMULACEAE - *Cyclamen persicum* Miller (Bhandari et al., 1981), *Primula obconica* Hance (Stevens & Murray, 1981)
RANUNCULACEAE - *Ficaria ranunculoides* Moench. (Roland, 1967), *Helleborus foetidus* L. (Echlin & Godwin, 1968 a)
RUBIACEAE - *Ophiorrhiza* ssp. (Chennaveeraiah & Shivakumar, 1983)
RUTACEAE - *Citrus limon* L. (Horner & Lersten, 1971)
SALICACEAE - *Salix* Tour., *Populus* Tour. (Rowley & Erdtman, 1967)
SAXIFRAGACEAE - *Saxifraga cymbalaria* L. ssp. *huetiana* (Boiss.) Engler & Irmsch. (Abadie & Hideux, 1979 a,b; Hideux & Abadie, 1980-1981), *S. sempervivum* C.Koch., *S. clusii* Gouan. (Abadie & Hideux, 1983)
SCROPHULARIACEAE - *Anthirrinum maius* L. (Lombardo & Carraro, 1976 a)
SOLANACEAE - *Capsicum annuum* L. (Horner & Rogers, 1974), *Lycopersicum peruvianum* Mill. (Pacini & Cresti, 1978), *Petunia* Juss. (Izhar & Frankel, 1971), *Solanum tuberosum* L. (Santos et al., 1979)
UMBELLIFERAE - *Artedia squamata* L., *Daucus carota* L., *D. littoralis* Sibter & Sm., *Eryngium palmatum* Pancic & Vis. (Cerceau-Larrival & Roland-Heydacker, 1976), *Trachymene pilosa* SM. (Cerceau-Larrival et al., 1980-1981), *Turgenia latifolia* Hoffm. (Abadie et al., 1980-1981)

GYMNOSPERMÆ

CYCADACEAE - *Ceratozamia mexicana* Brongn. (Audran, 1978)
PINACEAE - *Pinus banksiana* Lamb. (Dickinson, 1970 b; Dickinson & Bell, 1972), *P. sylvestris* L. (Willemse, 1971 b), *Pseudotsuga menziesii* (Mirbel) Franco (Singh et al., 1983)
PODOCARPACEAE - *Podocarpus macrophyllus* D.Don. (Vasil & Aldrich, 1970)

tétrada libertam-se por dissolução da calose que os rodeia, pela acção da calase (ß-1,3-glucanase). Em algumas anteras, nomeadamente em extractos de anteras de *Cucurbita* L. (Eschrich, 1961) foi detectada actividade da calase durante o período de dissolução da calose, embora não fosse possível localizar a origem desta enzima. No entanto, Mepham & Lane (1969 b), ao estudarem o desenvolvimento do tapete durante a microsporogénese em *Tradescantia bracteata* Small, demonstraram a presença de calase nas células do tapete, enzima que era transportada para a periferia das células através de vesículas resultantes dos dictiossomas, sendo depois libertada para o lóculo da antera. Opinião semelhante foi, mais tarde, corroborada por Vasil (1973).

Durante o estudo da microsporogénese em *Petunia* Juss. (Izhar & Frankel, 1971) e utilizando processos de determinação *in vivo* dos valores de pH no lóculo da antera, foi possível verificar que durante a meiose, o pH variava de 6,8-7,0 e para o fim do estádio de tétrada, concomitantemente com um decréscimo de pH (5,9-6,2) se iniciava a síntese da calase. Mais tarde (Stieglitz, 1973, 1977), em anteras de *Lilium* L., foi detectada a actividade da endo- e da exo- ß-1,3-glucanase, verificando-se um aumento da actividade enzimática desde o período meiótico até à dissolução das tétradas. Os resultados mostraram também que estas enzimas não são sintetizadas nas células meióticas mas nos tecidos somáticos adjacentes e que a dissolução da calose se deve apenas à actividade da endo-ß-1,3-glucanase.

2 - Esterilidadade masculina

Em algumas plantas, foram detectados casos de esterilidade que se traduziam pela ausência de grãos de pólen viáveis. A degenerescência do pólen, pode ocorrer em qualquer estádio de desenvolvimento, desde a fase de meiócito até após a mitose dos micrósporos. Em alguns casos, os factores de esterilidade não dependem dos genes nucleares, mas são transmitidos pelo citoplasma do ovo, o que conduziu à

designação de esterilidade citoplasmática masculina (Rhoades, 1931, 1933).

O importante papel nutritivo do tapete durante a microsporogénese, levou muitos autores a atribuir, em grande parte dos casos, a degenerescência dos micrósporos a um mau funcionamento das células tapetais, o que causaria efeitos adversos na meiose e no desenvolvimento do pólen (trabalhos de revisão de Vasil, 1967; Edwardson, 1970; Laser & Lersten, 1972).

Posteriormente, foram descritos outros casos de esterilidade dependente do tapete. Em *Phaseolus atropurpureus* (Moc & Sesse) ex DC. (Pritchard & Hutton, 1972) foi verificado um atraso na desorganização normal do tapete e em *Sorghum bicolor* L. (Overman & Warmke, 1972) as paredes das células do tapete também não sofreram a desintegração natural e a degenerescência do pólen ocorreu antes da formação da exina. A persistência da parede das células tapetais, provavelmente relacionada com a ausência de enzimas necessárias à digestão da celulose, teria impedido a transferência de nutrientes para o pólen em formação. Em *Capsicum annuum* L. (Horner & Rogers, 1974), as tétradas acabaram por degenerar ainda envolvidas por calose, enquanto que o tapete apresentava comportamento anormal. Nestas duas últimas espécies foi referido também que a deficiente secreção da calase pelas células do tapete teria impedido a libertação perfeita dos micrósporos. Na verdade já anteriormente (1971), Izhar & Frankel estudando mecanismos de esterilidade em *Petunia* Juss. verificaram que o decrésmio do valor de pH no lóculo da antera, relacionado com a produção de calase nas anteras férteis, não ocorria em algumas das plantas estéreis, em cujas anteras o pH mantinha valores de 6,8-7,0 e não se sintetizava a enzima. Noutro tipo de esterilidade, após um decréscimo do valor de pH, a síntese da calase processava-se ainda no estádio de célula mãe, seguindo-se a dissolução precoce da calose, pelo que os meiócitos degeneravam. Estes resultados levaram os autores a considerar como crítico o momento de síntese da calase para o desenvolvimento dos meiócitos, o que provocaria, em caso contrário, a sua

degenerescência. Situação idêntica foi referida em *Hordeum vulgare* L., em que a não formação das células do tapete, motivou a ausência da secreção de calase (Herd & Steer, 1984).

Em outras formas de esterilidade, as alterações do tapete traduziram-se na desorganização dos organelos e das paredes celulares (Horner, 1977), na intensa vacuolização do citoplasma (Cheng et al., 1979; Scoles & Evans, 1979; Colhoun & Steer, 1981; Bino, 1985 a,b; Graybosch & Palmer, 1985), na degenerescência das mitocôndrias, pouco antes da meiose (Warmke & Lee, 1977; Lee & Warmke, 1979), no aparecimento de corpos densamente corados e identificados como vacúolos autofágicos ou citolisossomas (Greyson et al., 1980) e pela invulgar escassez de elementos do retículo endoplasmático (Colhoun & Steer, 1981).

Embora com diferenças específicas e particulares, para cada um dos casos mencionados, parece haver consenso geral de que as alterações anormais das estruturas ou dos organelos citoplasmáticos das células do tapete seriam a causa da esterilidade, em determinado estádio da microsporogénese.

3 - Metabolismo dos fenilpropanóides

A pigmentação característica de muitos pólenes é devida à acumulação de produtos metabólicos secundários, nomeadamente carotenóides e/ou flavonóides (Wiermann, 1970, 1981; Quast & Wiermann, 1973; Stanley & Linskens, 1974; Wollenweber & Wiermann, 1979).

É durante a diferenciação e maturação do pólen que, na antera, têm lugar os variados processos biossintéticos que originam estes metabolitos secundários, posteriormente acumulados, principalmente, na parede estruturada que rodeia os grãos de pólen (Wiermann, 1979; Wiermann & Vitch, 1983). O grupo de Wiermann tem vindo a ocupar-se deste estudo em anteras de um cultivar de *Tulipa* L., referindo-se em particular à síntese e acumulação dos fenilpropanóides. Estes

processos realizam-se após a meiose das células mães do pólen e da dissolução da calose, iniciando-se pela deposição sequencial de fenilpropanos simples, de calconas e finalmente de flavonóides e antocianinas. As enzimas responsáveis pela síntese dos vários compostos intermediários do metabolismo dos fenilpropanóides são sintetizados nas anteras e, mais especificamente nas células do tapete (Herdt et al., 1978; Herdt & Wiermann, 1978; Wiermann, 1979; Kleinehollenhorst et al., 1982). Com a utilização de vários métodos de determinação enzimática foram detectadas na fracção do pólen as seguintes enzimas: desidrogenase do shiquimato, fenilalanina amónia liase, 4-hidroxilase do ácido cinámico, 3-0-metiltransferase de S-adenosil-metionina: cafeato; ligase da CoA:hidroxicinamato; sintetase da flavonona; isomerase da calcona-flavonona e 3'-0-metiltransferase da S-adenosil-metionina: 3'-4'-di-hidroxiflavonóide.

A actividade da fenilalanina amónia liase e da 3-0-metiltransferase de S-adenosil-metionina: cafeato foram detectadas na fracção solúvel das células do tapete (Wiermann, 1979; Rittschey & Wiermann, 1983) enquanto que para a isomerase da calcona se desconhece a sua localização exacta (Sutfeld & Wiermann, 1980). Com a utilização de técnicas de centrifugação em gradientes de sacarose, foi possível verificar que a 4-hidroxilase do ácido cinámico é uma enzima ligada a sistemas membranosos, tendo sido sugerida a sua localização nas membranas do retículo endoplasmático das células do tapete (Herdt & Wiermann, 1978; Wiermann, 1979).

Estas enzimas seriam então transportadas para o lóculo da antera onde e/ou já na parede do pólen se processaria a síntese dos flavonóides e das antocianinas.

4 - Proteínas da parede do pólen

Provavelmente todos os pólenes das Angiospermæ e das Gymnospermæ

possuem proteínas localizadas ao nível da parede (Knox & Heslop-Harrison, 1970). Estas proteínas ocorrem principalmente na intina, particularmente nas regiões dos poros, e também nas cavidades da exina. No entanto, as diferentes proteínas diferem quanto à sua origem; enquanto que as que se depositam na intina são sintetizadas nas células do gametófito, as depositadas na exina são sintetizadas nas do esporófito (Heslop-Harrison, 1975, 1976; Knox et al., 1975). Além disso, ao contrário do que sucede com as proteínas da intina, as que se encontram nas cavidades da exina são facilmente removidas e daí as dificuldades técnicas para as localizar convenientemente (Howlett et al., 1973; Heslop-Harrison et al., 1975).

No que diz respeito às proteínas da exina tem sido possível verificar a sua transferência a partir das células do tapete, durante os estádios da formação do pólen. Estes aspectos foram sobretudo evidenciados em algumas espécies das famílias das Malvaceæ e das Cruciferæ (Heslop-Harrison et al., 1973; Dickinson & Lewis, 1973), nas quais se observou a acumulação de material proteico nas cisternas do retículo endoplasmático das células do tapete, sendo as proteínas transportadas para as cavidades da parede do pólen, após degenerescência das células tapetais. Com a utilização de técnicas de imunofluorescência e citoquímica, foram estudados processos semelhantes de transferência de proteínas a partir do tapete, em Asteraceæ que possuem exina estruturalmente complexa e tapete plasmodial (Howlett et al., 1973; Vithanage & Knox, 1979) e em duas espécies de uma Cruciferæ do género *Iberis* L. (Heslop-Harrison et al., 1974). Pela quantificação citoquímica da esterase, enzima sintetizada nas células do tapete, foi possível demonstrar a sua transferência para as cavidades da exina, numa variedade de *Brassica oleracea* L. (Vithanage & Knox, 1976), em *Lolium perenne* L. e *Phalaris tuberosa* L. (Vithanage & Knox, 1980) e em *Primula obconica* Hance (Stevens & Murray, 1981).

Em várias espécies de Dicotyledoneæ (Pacini & Juniper, 1979 a; Pacini et al., 1981) foram demonstradas, nas regiões dos poros, proteínas de origem esporofítica

que, na maioria dos casos, coexistiam com as das regiões entre os poros, de origem gametofítica. Numa das espécies estudadas, *Olea europea* L., a deposição das proteínas nos poros tinha lugar antes da degenerescência das células do tapete, ao contrário do que está descrito para as proteínas interporais.

Vários estudos citoquímicos têm permitido a identificação das diferentes proteínas da parede do pólen e os resultados obtidos permitem concluir que as desidrogenases e as oxidases se localizam na exina enquanto que algumas transferases e hidrolases, nomeadamente amilase, esterase, e protease, são comuns à exina e à intina (Knox et al., 1975).

Grande parte destas proteínas sintetizadas nas células do tapete estão relacionadas com sistemas de reconhecimento envolvidos nas reacções de incompatibilidade inter- e intraespecíficos, observados durante a polinização, e com processos alérgicos.

5 - Reserva de nucleotídeos para a síntese dos ácidos nucleicos do pólen

O importante papel do tapete durante a microsporogénese levou alguns autores (Cooper, 1952; Linskens, 1958; Vasil, 1959) a sugerirem, com base em estudos de citoquímica, que as células do tapete representavam um local de acumulação de nucleotídeos que iriam contribuir para a síntese dos ácidos nucleicos nos micrósporos. Mais tarde, Stern (1961) e Stern & Hotta (1968) afirmaram também que as desoxirriboses necessárias à síntese do DNA dos micrósporos em desenvolvimento eram hidrolisadas e libertadas pelas células do tapete. Estes resultados foram, no entanto, vigorosamente rejeitados por outros autores com base em trabalhos de autorradiografia e espectrofotometria. Assim, Takats (1962) realizou um pormenorizado trabalho autorradiográfico em anteras de *Lilium longiflorum* Thunb. fornecendo timidina tritiada a anteras, durante o estádio de paquíteno da meiose, e verificou a existência de marcação no núcleo das células do tapete, a qual

diminuía, progressivamente, pouco antes de ter lugar a síntese do DNA dos micrósporos. Por outro lado, surgia marcação transitória na parede dos micrósporos mas o núcleo não incorporava marcação detectável. Em face destes resultados, o autor sugere a existência duma fonte de precursores do DNA exterior ao tapete mas afirma também que os produtos resultantes da degradação do DNA tapetal serão porventura utilizados pelos micrósporos, nomeadamente, na deposição da parte interna da sua parede. Opinião semelhante é apoiada por Heslop-Harrison & Mackenzie (1967) utilizando derivados da timidina [2-^{14}C] em anteras de *Lilium* L. e não tendo detectado qualquer transferência de material radioactivo do tapete para os esporos, durante o período pós-meiótico.

Linkens & Schrauwen (1968) fizeram determinações do conteúdo de DNA, RNA e nucleotídeos em fracções isoladas das células do tapete e de microsporócitos de anteras de *Lilium henryi* Baker e verificaram que a quantidade de DNA tapetal decresce progressivamente durante a meiose, não sendo detectável qualquer quantidade no estádio de tétrada. Por outro lado, a quantidade de RNA aumenta durante a meiose, atingindo o máximo durante o estádio de tétrada, período durante o qual a quantidade de DNA e de RNA da fracção meiócito/pólen é diminuta. Os autores sugerem assim que o tapete terá alguma influência no desenvolvimento dos meiócitos, nomeadamente no abastecimento de precursores do RNA.

Na realidade, o papel do tapete como fornecedor de precursores para a síntese dos ácidos nucleicos dos micrósporos em desenvolvimento é ainda assunto não totalmente esclarecido.

6 - "Pollenkitt" e trifina

O "pollenkitt" (Pankow, 1957) é uma camada lipídica que se deposita à volta dos grãos de pólen e que tem origem nas células do tapete, durante as fases finais do seu desenvolvimento.

Trabalhos realizados em anteras de *Lilium* L. (Heslop-Harrison, 1968, a,e) mostraram que no citoplasma das células do tapete se observam glóbulos osmiofílicos onde se depositam carotenóides os quais, após coalescência, se libertam por desorganização do tapete, migrando deste modo para o lóculo da antera e para as cavidades da exina da parede do pólen. O "pollenkitt" tem sido referido no pólen de várias plantas, nomeadamente num híbrido de *Lilium* L. (Reznickova & Dickinson, 1982) no qual as inclusões lipídicas se acumulam no citoplasma das células tapetais, juntamente com glóbulos provenientes dos plastídios, sendo realçada a formação dum sistema vacuolar especial associado ao metabolismo dos lípidos.

A trifina é semelhante ao "pollenkitt" mas difere deste pelo facto de conter proteínas e alguns constituintes citoplasmáticos, além dos lípidos hidrofóbicos.

Um estudo detalhado sobre a formação de "pollenkitt" em anteras de *Lilium* L. e de trifina em anteras de *Raphanus* (Tourn) L. (Dickinson, 1973) permitiu verificar que a fracção lipídica destas camadas protectoras do pólen se origina nos plastídios do tapete, os quais são, inicialmente, do tipo proplastídio evoluindo progressivamente para oleoplastos.

Vários atributos biológicos têm sido indicados para o "pollenkitt" e para a trifina, nomeadamente, na dispersão do pólen (Heslop-Harrison, 1968 b), como responsáveis pelo odor de certos pólenes actuando como atracção para os insectos (Van der Pijl, 1964) ou protegendo o pólen de radiações ultravioletas e/ou fenómenos de desidratação (Echlin, 1971 b; Pacini & Casadoro, 1981).

7 - Formação dos corpos de Ubisch

A principal e mais importante função das células do tapete das anteras das plantas superiores é a síntese da esporopolenina ou, pelo menos, dos seus precursores. Durante o estádio de tétrada, observam-se na superfície do tapete, junto do lóculo da antera, depósitos ou grãos de esporopolenina, designados "corpos de

Ubisch" embora tenham sido descritos muito antes dos trabalhos deste autor (Heslop-Harrison, 1968 b). Os corpos de Ubisch foram designados "orbículos" por Banerjee (1967) e por Rowley & Erdtman (1967), tendo sido também adoptada a designação de placas (Heslop-Harrison, 1962, 1963, a,b). Os corpos de Ubisch são estruturas esferoidais, com alguns micrómetros de diâmetro, podendo ocorrer isolados ou formando agregados, tendo sido observados nas anteras das Angiospermæ e de algumas Gymnospermæ. Em alguns casos, foi referida nos corpos de Ubisch a existência duma zona central lipídica à volta da qual se depositaria a esporopolenina, enquanto que noutros casos não foi observada a região central.

A microscopia electrónica trouxe um contributo importante para o estudo da formação e desenvolvimento dos corpos de Ubisch, sendo de destacar os trabalhos de Rowley (1963), Heslop-Harrison (1963 a,b) Skvarla & Larson (1966), Roland (1967), Echlin & Godwin (1968 a), Heslop-Harrison & Dickinson (1969), Risueño et al. (1969 a), Hoefert (1971), Christensen et al. (1972), Dickinson & Bell (1972, 1976 a,b), Rowley & Skvarla (1974 a), Cerceau-Larrival &Roland-Heydacker (1976), Steer (1977 a), Madjd & Roland-Heydacker (1978), Cousin (1979) e Abadie & Hideux (1979 a).

Quanto à formação dos corpos de Ubisch, divergem as opiniões sobre a interveniência do tapete em tal processo. Para uns autores, formar-se-iam em primeiro lugar "pro-orbículos" no interior das células do tapete. Neste processo foram responsabilizados, em alguns casos, as mitocôndrias (Krjatchenko, 1925; Heslop-Harrison, 1962), o retículo endoplasmático (Echlin & Godwin, 1968 a; Risueño et al., 1969 a; Willemse, 1971 b; Dickinson & Bell, 1972; 1976 a,b; Robertson, 1984 , Herich & Lux, 1985) tendo sido, também, sugerida a participação dos plastídios na síntese dos carotenóides da esporopolenina (Gabara, 1977; Ahokas, 1978). Após a sua formação, estes precursores seriam libertados para o lóculo da antera, onde rapidamente seriam envolvidos pela esporopolenina presente no fluido locular. Outra

corrente de opinião, sustenta que os pro-orbículos se originam em depressões do plasmalema do tapete, junto do lóculo da antera (Marquardt et al., 1968; Dickinson & Heslop-Harrison, 1969; Vasil & Aldrich, 1970; Christensen et al., 1972; Steer, 1977 a) não tendo sido observados nos organelos citoplasmáticos quaisquer depósitos que se assemelhem aos grãos de esporopolenina. Esta mesma opinião foi corroborada por Rowley & Skvarla (1974 a) que sugeriram que a superfície externa das células tapetais, onde se originam os corpos de Ubisch, funciona como um verdadeiro glicocálice, semelhante à camada polissacarídica descrita para as células animais (Bennett, 1969).

Os estudos iniciais sobre o desenvolvimento do tapete e a ontogénese dos corpos de Ubisch referem que estes apenas são produzidos pelas células do tapete secretor e não pelo amebóide (Echlin, 1971 a, b), opinião mais tarde seguida por Madjd & Roland-Heydacker (1978). No entanto, nas células do tapete plasmodial de *Gentiana acaulis* L. (Carraro & Lombardo, 1976) foi referida a presença de corpos de Ubisch, tendo sido sugerida a interveniência do aparelho de Golgi na sua formação. Em *Hydrocotyle mexicana* Chan & Schelit (Abadie et al., 1980-1981) foi mesmo sugerida a existência dum tipo de tapete intermédio ou misto, pelo facto de as suas células produzirem corpos de Ubisch mas ocorrer uma lise total e precoce das paredes celulares.

Esta discordância de opiniões terá levado alguns autores a sugerir a definição de novos parâmetros para a caracterização do tapete secretor e do tapete amebóide.

*

* *

Tendo em conta a diversidade de funções do tapete e a intervenção deste tecido na formação do grão de pólen, acompanhou-se, a nível ultraestrutural e citoquímico, a evolução das células do tapete das anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch.. Especial atenção foi dedicada ao estudo do sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso, característico do tapete desta espécie das Cucurbitaceæ e de outras espécies de Angiospermæ, e às várias etapas da secreção da esporopolenina. Paralelamente, estudaram-se as várias fases de formação da parede do grão de pólen, na tentativa de aclarar as inter-relações entre as células das gerações esporofítica e gametofítica.

Alguns resultados, ainda que preliminares, foram conseguidos com a incorporação de um composto radioactivo, acetato de sódio tritiado. Os resultados foram traduzidos pela quantificação da taxa de incorporação do isótopo com um espectrómetro de cintilação de líquidos e, a nível ultraestrutural, com técnicas de autorradiografia. Foram também registados o comportamento e alterações dos tecidos constituintes das anteras, quando sujeitas a tratamentos com substâncias intervenientes no metabolismo celular.

MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL

Neste estudo utilizaram-se anteras, em diferentes estádios de desenvolvimento, pertencentes a plantas das seguintes espécies:

Cucurbita polymorpha Duch. (Cucurbitaceæ)

Cucurbita pepo L. (Cucurbitaceæ)

Cucurbita ficifolia Bouché (= *C. melanosperma* Gasparr.) (Cucurbitaceæ)

Citrullus anguria Samp. (Cucurbitaceæ)

Cucumis melo L. (Cucurbitaceæ)

Cyclanthera sp. (Cucurbitaceæ)

Ecballium elaterium (L.) A. Richard (Cucurbitaceæ)

Lupinus sp. (Leguminosæ)

Solanum tuberosum L. (Solanaceæ)

2. MÉTODOS

2.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISSÃO

2.1.1. Fixação

Para observação do material, a nível ultraestrutural, realizaram-se as seguintes fixações:

- Pré-fixação em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 0,1 moles/dm^3 pH 7,2 (Sabatini et al., 1963), durante 4-6 horas a 0-4°C. Após lavagem cuidadosa durante a noite, no mesmo tampão mas com concentração 0,2 moles/dm^3, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio a 2% em tampão Veronal 0,1 moles/dm^3 (Palade, 1952), durante 2 horas à temperatura ambiente. Os fragmentos de anteras fixadas, foram então tratados com acetato de uranilo 1% em tampão

Veronal 0,1 moles/dm^3, durante 30 minutos.

- Pré-fixação em glutaraldeído e lavagem em tampão, idênticas às anteriormente indicadas, e pós-fixação em permanganato de potássio 2 % em tampão Veronal 0,1 moles/dm^3 (Luft, 1956) durante 2 horas a 0-4^oC.

- Fixação em permanganato de potássio a 2% em tampão Veronal 0,1 moles/dm^3 (Luft, 1956) durante 2 horas a 0-4^oC.

2.1.2. Desidratação e inclusão

Após a fixação, o material foi desidratado em séries ascendentes de acetona, e finalmente em óxido de propileno (Luft, 1961). O material foi então impregnado por misturas de óxido de propileno-Epon 812 e finalmente incluído na resina pura.

2.1.3. Cortes ultrafinos e contrastação

Os cortes ultrafinos foram executados, com facas de vidro ou de diamante, num ultramicrótomo LKB Ultrotome III, e recolhidos em grelhas de cobre.

Como contrastantes, utilizaram-se, sequencialmente, uma solução saturada de acetato de uranilo em álcool a 50% com ácido acético a 1% (Valentine, 1965), e uma solução de citrato de chumbo (Reynolds, 1963; Venable & Goggeshall, 1965).

Os cortes ultrafinos foram observados num microscópio electrónico Siemens Elmiskop IA, com abertura de condensador de 200 µm e de objectiva de 50 µm e com uma diferença de potencial de 80 Kv. As imagens foram registadas em película fotográfica Agfa-Gevaert 23D 56 ou Kodak 4489.

2.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO

As anteras a serem observadas no microscópio electrónico de varrimento foram fixadas só com glutaraldeído ou sofreram uma dupla fixação (glutaraldeído-ósmio)

idêntica à indicada em 2.1.1.. Após fixação, o material foi desidratado numa série ascendente de álcool e, seguidamente, seco por exposição ao ar numa estufa a 60°C. As peças desidratadas e secas foram montadas em suportes de alumínio, por meio de verniz ou de fita adesiva, sendo então metalizadas com ouro coloidal, depositando-se uma camada de cerca de 300Å de espessura de modo a tornar a superfície condutora.

As observações foram realizadas num microscópio electrónico Jeol JSM-35C a 25 Kv e as imagens registadas em película fotográfica Ilford FP_4.

2.3. MICROSCOPIA ÓPTICA

Após fixação e inclusão do material, tal como indicado para microscopia electrónica de transmissão, foram efectuados cortes semi-finos (1µm de espessura) com facas de vidro, os quais foram seguidamente corados com soluções aquosas de azul de metileno 1% em borax 1% e azul de Azur II 1%.

Os cortes montados em laminas de vidro foram observados num microscópio óptico Nikon e as imagens registadas em película fotográfica Kodak Panatomic X.

2.4. MÉTODOS CITOQUÍMICOS

2.4.1. Localização de polissacarídeos

A detecção citoquímica de polissacarídeos foi efectuada em material tratado para microscopia elecrónica de transmissão, com dupla fixação (glutaraldeído-tetróxido de ósmio). Os cortes ultrafinos foram recolhidos em grelhas de ouro e tratados segundo o método de Thiéry (1967). Este método baseia-se na marcação pelos sais de prata dos grupos aldeído, que resultam da oxidação, pelo ácido periódico, dos grupos ∝-glicol das moléculas de glucose dos polissacarídeos.

Os cortes foram previamente oxidados em ácido periódico 1% durante 30 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se uma lavagem em água bidestilada. Os cortes foram depois tratados por uma solução de tiosemicarbo-hidrazida 1% em ácido

acético 10%, durante 24 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram cuidadosamente lavados em soluções de ácido acético 10% e 5% e finalmente em água bidestilada. Seguiu-se o tratamento com proteinato de prata 1% em água e finalmente nova lavagem em água bidestilada. Os cortes foram observados ao microscópio electrónico, sem contrastação.

2.4.2. Extracção pela pronase

A digestão enzimática foi realizada segundo o método de Monneron & Bernhard (1966) em cortes ultrafinos recolhidos em grelhas de ouro e previamente tratados com peróxido de hidrogénio 6% durante 30 minutos à temperatura ambiente (Marinozzi & Gautier, 1961). Seguidamente, os cortes foram tratados com uma solução aquosa de pronase na concentração de 1 mg/dm^3 a 37^{o}C, durante vários períodos de tempo.

Nas experiências de controlo, os cortes foram tratados com água bidestilada, nas mesmas condições de tempo e temperatura, das experiências com a enzima activa.

2.4.3. Localização enzimática

A localização citoquímica, a nível ultraestrutural, de várias enzimas, foi efectuada em material fixado em glutaraldeído 1,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 moles/dm^3, durante 1 hora a 0-4^{o}C, ou numa mistura de glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% no mesmo tampão e durante o mesmo período de tempo. Após lavagem em tampão cacodilato de sódio 0,2 moles/dm^3, o material foi incubado no meio próprio para cada enzima ensaiada e depois pós-fixado em tetróxido de ósmio 2% em tampão Veronal 0,1 moles/dm^3, durante 2 horas à temperatura ambiente.

2.4.3.1. Fosfatase ácida

Para a localização da fosfatase ácida utilizou-se o meio de Gomori, modificado por Miller & Palade (1964). O material foi incubado durante 1 hora a 60^{o}C e

posteriormente a 37°C durante 1, 2 e 4 horas, no meio que contem como substrato o ß-glicerofosfato de sódio. Nas experiências de controlo, a incubação realizou-se no mesmo meio sem substrato.

2.4.3.2. Adenosina trifosfatase

A localização da adenosina trifosfatase foi realizada no meio de Wachstein & Meisel (1957) segundo Rowley e colaboradores (1973) durante 1 e 2 horas, a 23°C, tendo sido utilizado como substrato o sal de sódio da adenosina trifosfato (ATP). Nas experiências testemunha, o material foi incubado no meio sem substrato.

2.4.3.3. Glucose-6-fosfatase

Para a localização da glucose-6-fosfatase utilizou-se o meio de Wachstein & Meisel (1956) modificado por Leskès e colaboradores (1971) incluindo como substrato a glucose-6-fosfato (sal dipotássico). A incubação decorreu durante 1 e 2 horas a 30°C. Nas experiências de controlo, a incubação efectuou-se no meio sem substrato.

2.4.3.4. Ciclase adenílica

A localização da ciclase adenílica foi realizada no meio descrito por Al-Azzawi & Hall (1976), utilizando um substrato específico desta enzima, adenilil-imidodifosfato (AMP-PNP), durante 2 horas a 35°C. As experiências de controlo decorreram no meio ao qual se omitiu o substrato.

2.4.3.5. Citocromo c oxidase

A localização da enzima citocromo c oxidase foi efectuada no meio de Öpik (1975 a), utilizando como substrato a 3,3'-diaminobenzidina (DAB), durante vários períodos de tempo (3 a 15 horas) a 27°C. As experiências testemunha foram realizadas no meio sem substrato.

2.5. SOLUÇÕES UTILIZADAS NOS TRATAMENTOS DAS ANTERAS

Todos os tratamentos foram efectuados mergulhando hastes florais em soluções

das drogas a ensaiar, utilizando como controlo, sob condições ambientais idênticas o mesmo meio sem o produto cujo efeito se pretendia observar. A acção das drogas foi ensaiada durante vários períodos de tempo.

2.5.1. Acido giberélico

O ácido giberélico foi ensaiado em soluções aquosas, nas concentrações de 1,4 x 10^{-4}moles/dm^3, 2,8 x 10^{-4} moles/dm^3 e 2,8 x 10^{-3} moles/dm^3 durante 24 e 48 horas.

2.5.2. Acido mevalónico

O ácido mevalónico (sob a forma de lactona) foi fornecido em soluções aquosas, nas concentrações de 10^{-3} moles/dm^3 e 4 x 10^{-3} moles/dm^3 durante 24, 48, 72 horas e 6 dias.

2.5.3. Colquicina

A colquicina, em tampão fosfato 0,1 moles/dm^3 pH 7,0 ou em solução aquosa, foi fornecida às hastes florais nas concentrações de 0,05%, 0,5% e 1% durante 24 e 48 horas.

2.5.4. Glucose e sacarose

A acção da glucose e da sacarose foi ensaiada com soluções aquosas a 4%, durante vários períodos de tempo (24, 48, 72 horas e, no caso da glucose, prolongamento até 98 horas). Da solução de sacarose foram retiradas amostras, durante vários períodos de tempo, após a imersão das hastes florais, para a execução do teste de Benedict a fim de detectar a presença de açúcares redutores (Benedict, 1909; Purvis et al., 1966).

2.6. EXTRACÇÃO DE PIGMENTOS E DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE CAROTENÓIDES E DE CLOROFILAS

A extracção de pigmentos foi realizada segundo o método de Jungalwala & Cama (1962). Anteras, em diferentes fases de desenvolvimento, foram pesadas e imersas em etanol, durante 2 dias, na obscuridade. Foram, depois, homogeneizadas sucessivamente em etanol, acetona e éter de petróleo-éter dietílico (1:1, v/v) sendo retirados os vários extractos orgânicos, por centrifugação. Estes extractos foram adicionados e lavados com água, de modo a eliminar-se a acetona e o álcool. Da fracção orgânica restante, contendo os pigmentos, foram retiradas amostras para as determinações espectrofotométricas, realizadas num espectrofotómetro Shimadzu 240 Graphicord.

A determinação quantitativa de carotenóides totais foi efectuada segundo o método de Liaaen-Jensen & Jensen (1971) e das clorofilas segundo Strain e colabaradores (1971).

2.7. INCORPORAÇÃO DE UM ISOTOPO RADIOACTIVO [^{3}H]

Utilizou-se como precursor lipídico ^{3}H acetato de sódio (The Radiochemical Center, Amersham, U.K.) com 2,77 Ci /mmole de actividade específica. Este isótopo radioactivo, foi fornecido a hastes florais de *Cucurbita polymorpha* Duch. mergulhadas em soluções aquosas do produto na concentração de 20μCi/cm^3, durante vários períodos de tempo.

2.7.1. Medição da radioactividade

Para medição da radioactividade, isolaram-se anteras de hastes florais tratadas, durante intervalos de tempo variados. As anteras depois de isoladas, foram pesadas, homogeneizadas em 1 cm^3 de etanol e os produtos obtidos foram lançados em tubos de contagem, bem como 1 cm^3 de etanol utilizado na lavagem do homogenizador.

Depois de evaporado o solvente, adicionou-se o líquido de cintilação e procedeu-se às contagens.

Utilizou-se, para este efeito, um espectrómetro de cintilação de líquidos TRI-CARB (Packard) e frascos contentores de amostras da mesma proveniência, de vidro e com a capacidade de 15 cm^3. As leituras foram realizadas a 15°C em 10 cm^3 da solução de cintiladores (2,5-difeniloxazol (PPO) - 4g + 1,4-bis-[2-(4-metil-5-feniloxazolil)]-benzeno (POPOP) - 0,1g)/dm^3 tolueno.

As amostras cuja leitura se pretendia efectuar foram precedidas de um padrão de ^3H com actividade conhecida e de um ensaio em branco. A leitura obtida para o ensaio em branco e que corresponde ao "ruído de fundo" (R), isto é, ao somatório das interferências electrónicas produzidas no aparelho com as contagens devidas a radiações naturais e a eventuais contaminantes da câmara de contagem, foi subtraída à leitura das amostras, pelo que os valores utilizados na representação gráfica referem somente as acções físicas que ocorrem dentro dos tubos de contagem, devido à presença do radionuclídeo neles introduzido.

Calibrou-se o espectrómetro de modo a obter-se o "número de mérito máximo" para leituras de trítio. Este valor é dado pela expressão % E^2/R em que E é a eficiência de contagem. Este parâmetro obtem-se dividindo o valor da leitura em contagens por minuto (cpm) de um padrão de ^3H, obtido em condições variadas de amplificação e de selecção de amplitude de canal de contagem, pelo valor actual do padrão em desintegrações por minuto (dpm).

Não se considerou a "absorção interna", fenómeno devido à presença nos tubos de contagem de moléculas que absorvem ou que perturbam as transferências de energia nos componentes da solução de cintilação, e que seria conhecida mediante o estabelecimento da curva de calibração de absorção interna. Constituem justificação para esta decisão o facto de não interessar a determinação da actividade absoluta (dpm) das amostras e, principalmente a circunstância de a "estandardização externa

automática" apresentar valores muito próximos para todas as amostras, o que indica que a absorção interna era constante. Os valores (cpm) utilizados para o traçado do gráfico não são, portanto, os reais (dpm) mas os proporcionais a estes.

2.7.2. Autorradiografia ultraestrutural

Após os vários períodos de tempo de incorporação do ^{3}H acetato, foram retiradas anteras, em diferentes estádios de desenvolvimento, e fixadas pela técnica de rotina para microscopia electrónica de transmissão (Secção 2.1.1. deste Capítulo). Após inclusão foram efectuados cortes ultrafinos, recolhidos em lâminas de vidro, previamente cobertas com uma mono-camada de celoidina. Depois de secas, as lâminas sofreram uma carbonização e foram imersas em emulsão Ilford L_4 (Caro et al., 1962). A imersão das lâminas foi efectuada com o aparelho semi-automático de Kopriwa (1967). Após 1-4 meses de exposição, em caixas de Clay-Adams, as imagens foram reveladas, tendo sido utilizados dois reveladores: Elon-ácido ascórbico, com prévia latensificação pelo tiocianato de ouro (Salpeter & Szabo, 1972) e D19b. O tempo de revelação foi, em qualquer dos casos, 2 minutos. A fixação foi realizada com hipossulfito de sódio 24 %, durante 2 minutos.

Os cortes foram finalmente transferidos para grelhas de cobre, e após adelgaçamento da membrana de celoidina com acetato de isoamilo, contrastados com acetato de uranilo e citrato de chumbo.

A execução prática da técnica foi baseada no método descrito por Boyenal & Fischer (1976).

RESULTADOS

1. ULTRAESTRUTURA E EVOLUÇÃO DO TAPETE DAS ANTERAS DE *CUCURBITA POLYMORPHA* DUCH.

A maior parte dos resultados apresentados foram obtidos durante o estudo da microsporogénese em anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch., conhecida pelo nome vulgar de abóbora porqueira. Esta planta é herbácea, anual e monóica, possuindo folhas simples, alternas, pecioladas e sem estípulas. As flores são unissexuais, de corola amarela, campanulada e com as cinco pétalas fendidas até metade do seu comprimento. Esta espécie distingue-se das do mesmo género por possuir pedúnculos frutíferos, anguloso-sulcados (Sampaio, 1946).

De interesse particular nesta espécie, a anatomia do androceu. No estádio adulto, apresenta um comprimento médio de 1,5 cm e é constituído por 5 estames cujas anteras, longas e sinuosas, são concrescentes enrolando-se em espiral sobre a superfície do conectivo (Fig. 1). Cada antera monolobada encontra-se dobrada em S, com os três segmentos diferentes, ficando uma das extremidades na base e a outra no topo da flor. A observação duma imagem da base da flor (Fig. 2) permite confirmar a existência de 5 estames, distinguindo-se para cada um deles, uma das extremidades e uma dobra dos dois outros segmentos.

O estudo da anatomia interna das anteras foi efectuado através da observação de cortes semi-finos realizados na parte média da flor (Fig. 3). Cada antera compreende um lóbulo ou teca, subdividido em dois lóculos, cada um dos quais constituindo um saco polínico ou microsporângio, separados por tecido estéril. Cada microsporângio é constituido por camadas de células morfológica e funcionalmente distintas. Assim, uma observação mais cuidadosa (Fig. 4) permite distinguir uma camada periférica (epiderme), à qual se seguem, uma camada que nos estádios finais da maturação originará a camada fibrosa ou endotécio, uma camada mediana e mais internamente uma camada constituída pelas células do tapete. Internamente ao tapete localizam-se as células mães do pólen que vão originar a geração haplóide ou microgametófito. Estes vários tipos de células, que rodeiam as células polínicas, são

Androceu de *Cucurbita polymorpha* Duch. (microscopia electrónica de varrimento)

Fig. 1 - Estames da flor masculina. Cada antera (a pontuado) está dobrada em S, ficando uma extremidade na base (seta) e outra no topo da flor (dupla seta). 57X.

Fig. 2 - Parte basal da flor masculina, mostrando o conjunto dos 5 estames. 26X.

Microsporângios de *Cucurbita polymorpha* Duch.

Fig. 3 - Corte semi-fino dum lóbulo da antera constituído por 2 lóculos, cada um dos quais possuindo um microsporângio. 370X.

Fig. 4 - Parte de um microsporângio constituído pela epiderme (Ep), camada fibrosa ou endotécio (Cf), camada mediana (Cm), tapete (T) e células mães do pólen (CMP). 650X.

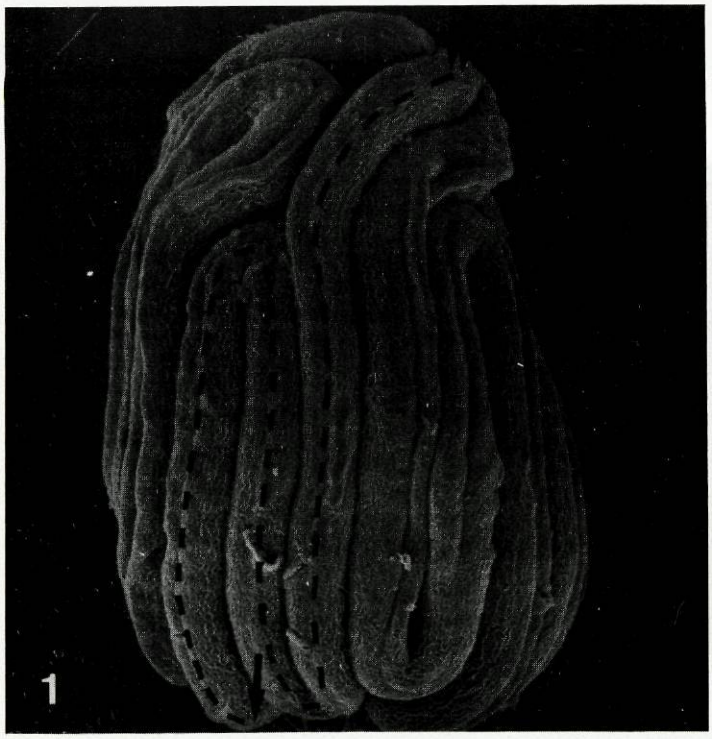
Aspectos de células da parede da antera de *Cucurbita polymorpha* Duch.

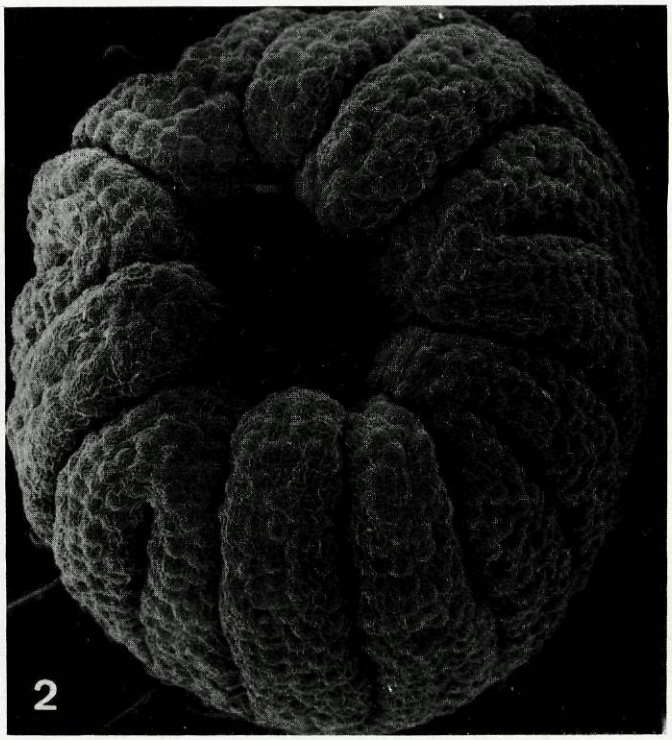
Fig. 5 - Células da parede da antera (epiderme). No citoplasma distinguem-se mitocôndrias (M), com cristas em arranjo paralelo (seta). Os plastídios (P) exibem corpo prolamelar (ponta de seta) de reduzidas dimensões. 22 000X.

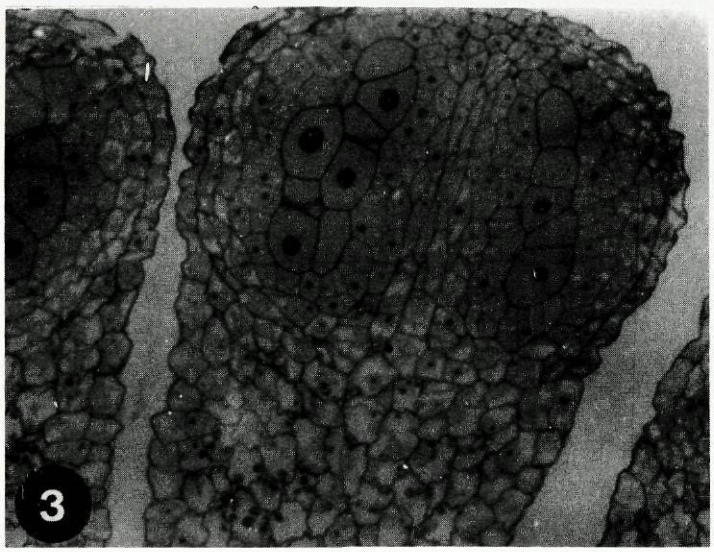
Fig. 6 - Aspecto de parte duma célula da parede na fase de grão de pólen diferenciado . No estroma dos plastídios depositam-se grãos de amido (A). 12 000X.

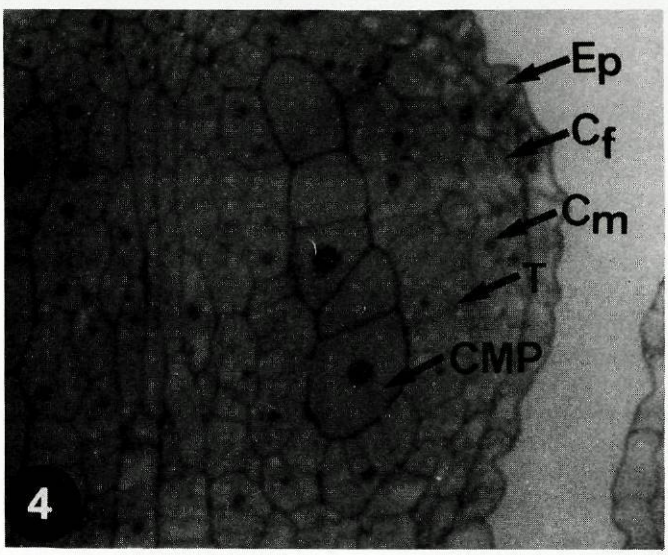
Fig. 7 - Porção de célula do endotécio com espessamento característico (PC). 16 000X.

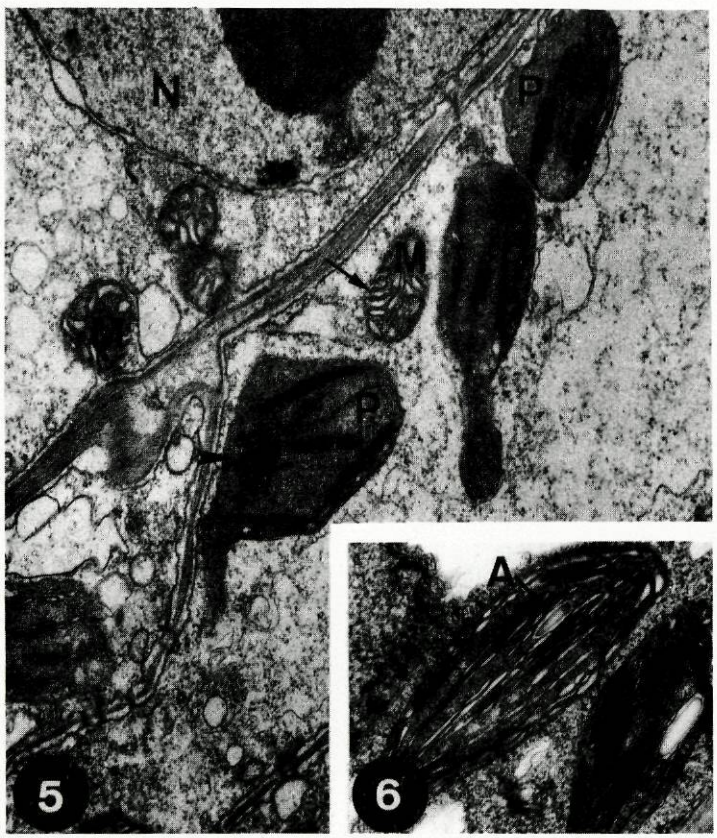
Fig. 8 - Célula da camada mediana. Além do núcleo volumoso (N), distinguem-se vacúolos (V), alguns elementos de retículo endoplasmático (RE), mitocôndrias (M) e plastídios (P). T - Célula do tapete. 54 000X.


1

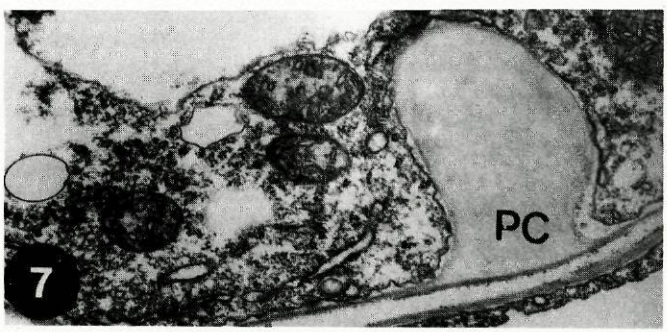

2

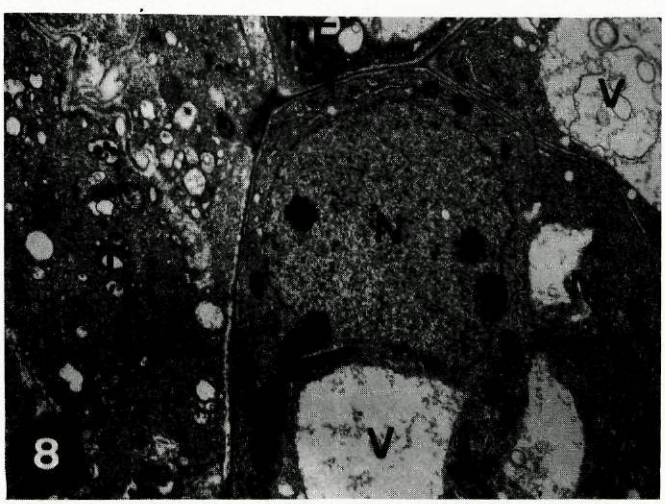

3


Ep
Cf
Cm
T
CMP
4


N
P
P
5

A
6


PC
7


V
V
8

ultraestruturalmente distintas e sofrem modificações durante a microsporogénese. As células da camada mais periférica (Fig. 5) são células diferenciadas, de contornos irregulares, limitadas por paredes celulósicas atravessadas por plasmodésmios. O citoplasma apresenta núcleo volumoso, poucos ribossomas e mitocôndrias com estroma mais ou menos denso aos electrões, e um sistema de cristas bem desenvolvido, dispondo-se estas por vezes em arranjos paralelos (Fig. 5). Nos plastídios observa-se já um sistema de tilacóides bem desenvolvido, podendo coexistir um corpo prolamelar de reduzidas dimensões, normalmente situado na extremidade do organelo. Esta estrutura dos plastídios mantem-se até à fase de micrósporo uninucleado e vacuolizado, e a partir deste estádio, depositam-se no estroma dos plastídios alguns grãos de amido, distinguindo-se, claramente, a formação de grana e intergrana no sistema lamelar destes organelos (Fig. 6).

Nas fases iniciais da microsporogénese, as células contíguas à epiderme apresentam morfologia semelhante mas, na fase de grão de pólen binucleado, diferencia-se a camada fibrosa ou endotécio. Estas células apresentam espessamentos característicos da parede (Fig. 7) que, nos estádios finais de desenvolvimento, têm aspecto fibroso.

As células da camada mediana (Fig. 8), que rodeiam externamente o tapete, são distintas das células periféricas da parede. Estas células, do tipo meristemático, possuem pequenos vacúolos, núcleo esférico onde se distinguem massas de cromatina condensada, numerosos ribossomas, mitocôndrias pequenas, alguns elementos de retículo endoplasmático rugoso e plastídios com sistema tilacoidal relativamente bem desenvolvido mas sem amido.

Em *Cucurbita polymorpha* Duch. as células que apresentam características ultraestruturais específicas são as que constituem o tapete e que irão ser objecto de estudo mais pormenorizado, sendo salientada a sua evolução durante a microsporogénese. No período pré-meiótico (Fig. 9), as células do tapete apresentam contorno rectangular e são rodeadas por uma parede primária, atravessada por numerosos plasmodésmios que permitem a comunicação entre as células.

Células do tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch. em fases iniciais de desenvolvimento

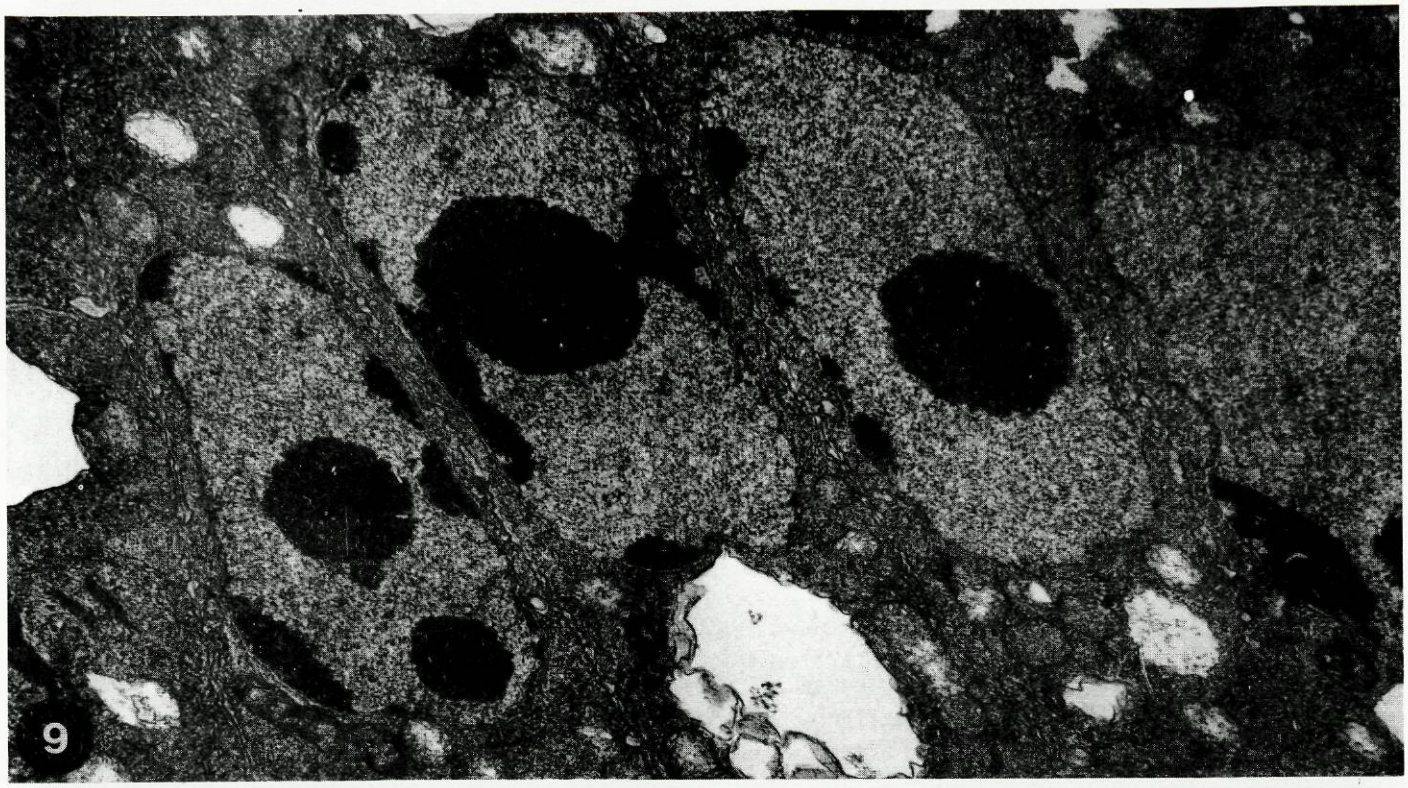
Fig. 9 - Aspecto característico das células do tapete nos estádios iniciais da microsporogénese. 15 600X.

Fig. 10 - Célula do tapete, em divisão de mitose. 18 000X

Fig. 11 - Célula do tapete em final de divisão. Entre as 2 células filhas, observa-se o fragmoplasto (F) que irá originar a nova parede celular. 14 400X.

Fig. 12a- Célula de tapete binucleada. Núcleo (N) com cromatina (cabeças de setas) associada ao invólucro (In) e nucléolo compacto (Nu). PC - parede celular; P - plastídio. 15 000X.

Fig. 12b-Pormenor do invólucro nuclear com poros (setas) e ribossomas (ponta de seta) apensos à membrana externa. 36 000X.



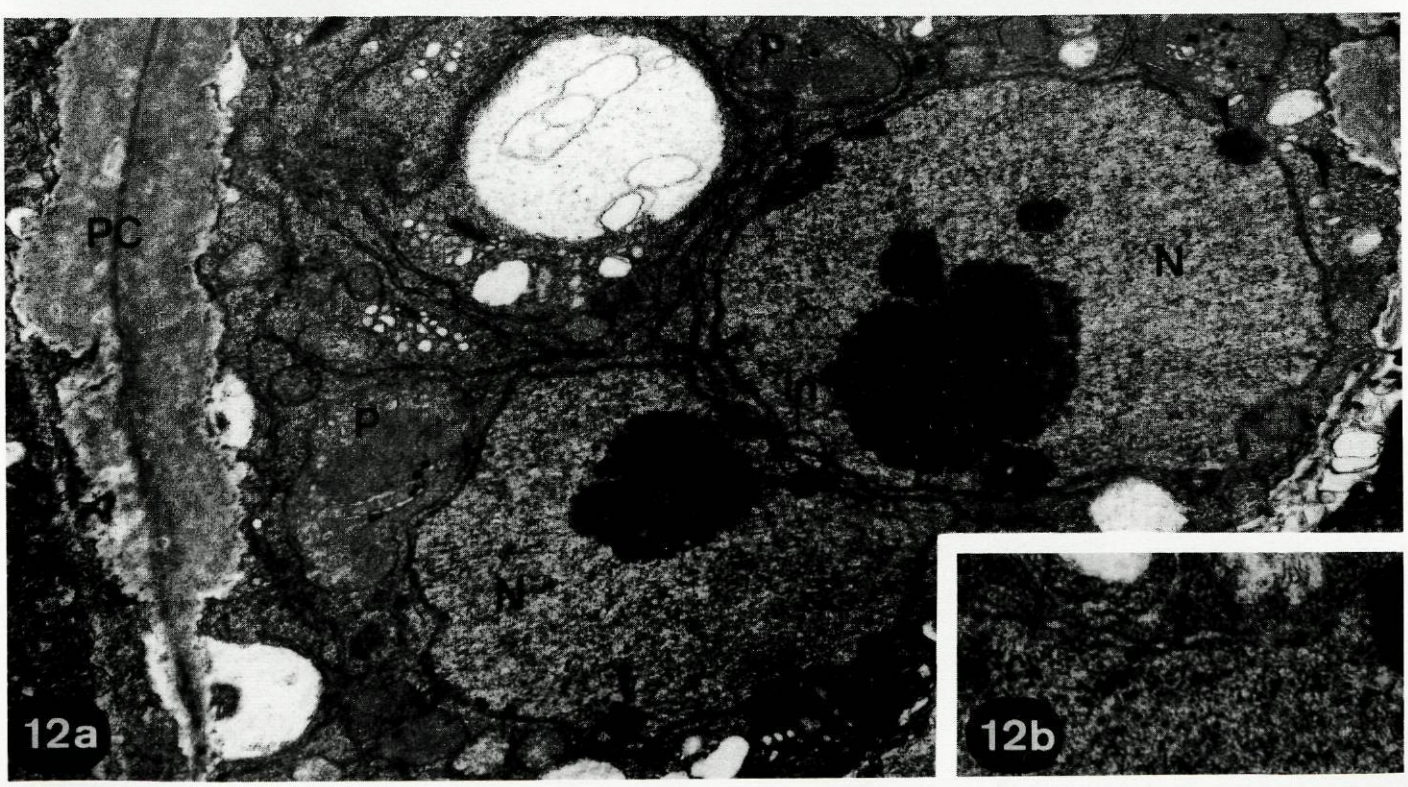
9



10



11



12a

12b

Antes do início da meiose, as células tapetais dividem-se mitoticamente, tendo sido possível observar figuras mitóticas características (Fig. 10) e também deposição de fragmoplastos, dividindo o citoplasma das células resultantes da divisão (Fig. 11). No entanto, nas células do tapete é frequente ocorrer a divisão do núcleo sem citocinese sendo, portanto, comuns as células binucleadas (Fig. 12 a). O núcleo volumoso, de forma oblongo-esférica, mede cerca de 10-12 µm e é rodeado por duas membranas com espessura média de 5-6 nm que limitam o espaço perinuclear com cerca de 25 nm. Associados ao folheto externo do invólucro nuclear observam-se ribossomas e alguns poros interrompem o invólucro (Fig. 12 b). No núcleo, distinguem-se massas de cromatina condensada associadas ao invólucro, e nucléolo de tipo compacto.

No citoplasma destas células distribuem-se os organelos característicos. As mitocôndrias (Figs. 13,14) apresentam morfologia variável, conforme o plano de corte, possuindo um comprimento médio de 1,6 µm e largura média de 0,6 µm. Na matriż mitocondrial, de baixa densidade electrónica, dispõem-se as cristas e em áreas claras, fibrilas de DNA (Nass & Nass, 1962; Kislev et al., 1965). Em algumas imagens favoráveis, é possível observar ligação das cristas à membrana mitocondrial interna (Fig. 14).

Os plastídios das células do tapete são do tipo proplastídio, limitados por duas membranas que englobam um estroma denso e granular onde se distinguem algumas membranas estromáticas (Figs. 15,16). De salientar, nesta fase inicial de desenvolvimento, quando ainda existem conexões citoplasmáticas entre o tapete e as células esporogénicas adjacentes (Fig. 15) a presença de grãos de amido, normalmente um por plastídio. O volume médio dos proplastídios é superior ao das mitocôndrias, apresentando comprimento de 2-3 µm e diâmetro transversal de 1-1,5 µm.

No citoplasma do tapete distinguem-se ainda os dictiosssomas (Figs. 16,17). Cada dictiossoma é constituído por 4-5 cisternas empilhadas, observando-se, na extremidade de algumas delas, a formação de vesículas. No entanto, nesta fase, os

Células do tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch. em fases iniciais de desenvolvimento

Fig. 13 - Mitocôndrias com cristas e áreas de DNA (setas). 15 200X.

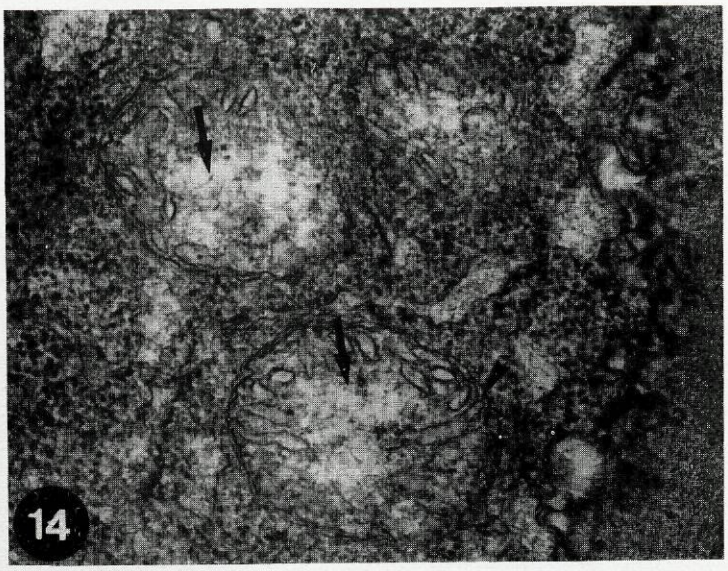
Fig. 14 - Pormenor de mitocôndrias com áreas claras com fibrilas de DNA (setas). Numa mitocôndria distingue-se ligação duma crista à membrana interna do invólucro mitocondrial (ponta de seta). 41 400X.

Fig. 15 - Plastídios (P) do tipo proplastídio com estroma denso onde se distribuem algumas lamelas estromáticas (pontas de setas) e grãos de amido (A). Nesta fase de desenvolvimento existem ainda ligações citoplasmáticas (plasmodésmios, seta) entre as células do tapete (T) e as células esporogénicas adjacentes (CE). PC - parede celular; RER - retículo endoplasmático rugoso. 20 000X.

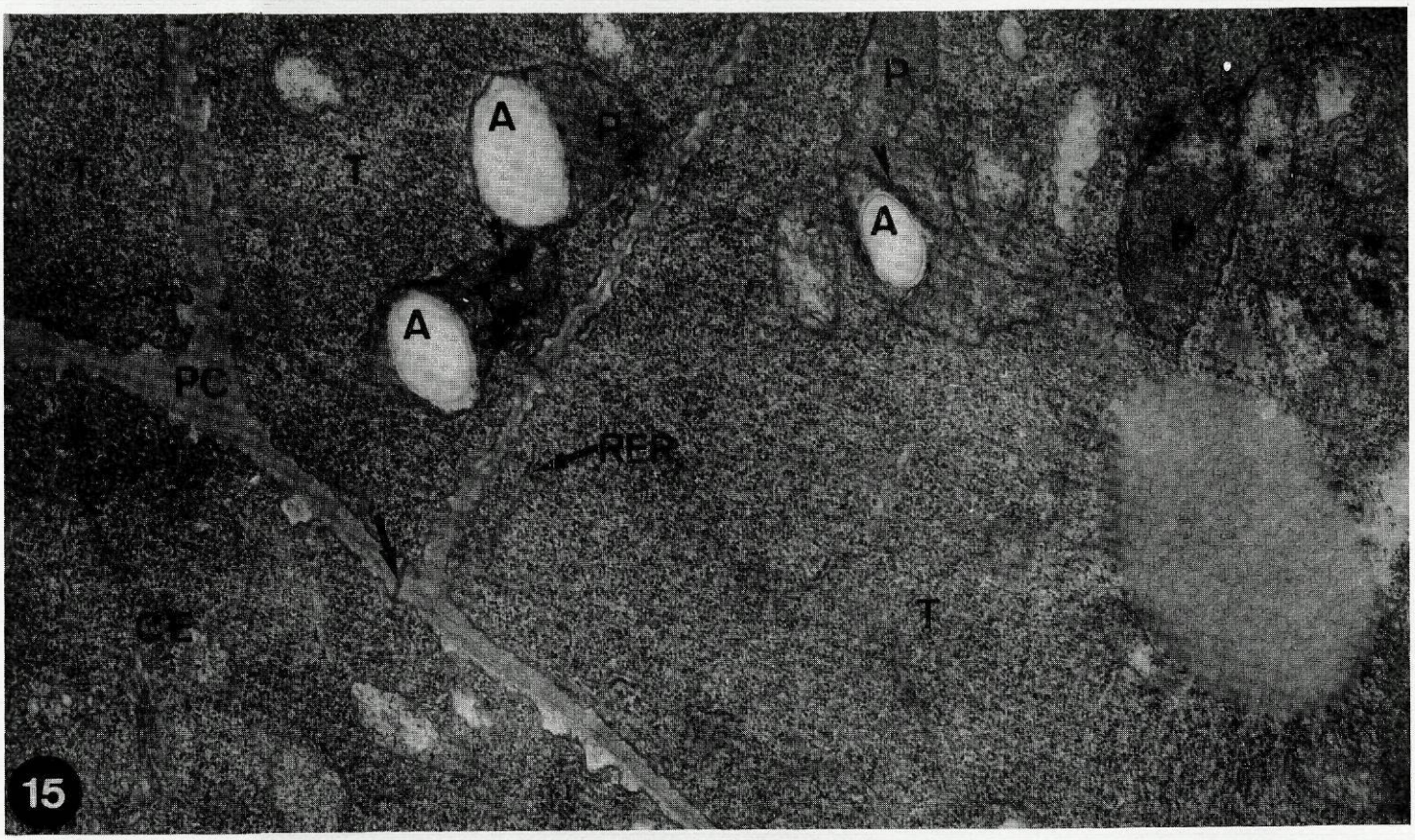
Figs. 16,17 - No citoplasma densamente povoado de ribossomas, distinguem-se o núcleo (N), plastídios (P) com amido (A), dictiossomas (D), elementos de retículo endoplasmático rugoso (RER), mitocôndrias (M) e alguns microtúbulos (setas).
Fig. 16 - 34 000X; Fig. 17 - 29 400X.



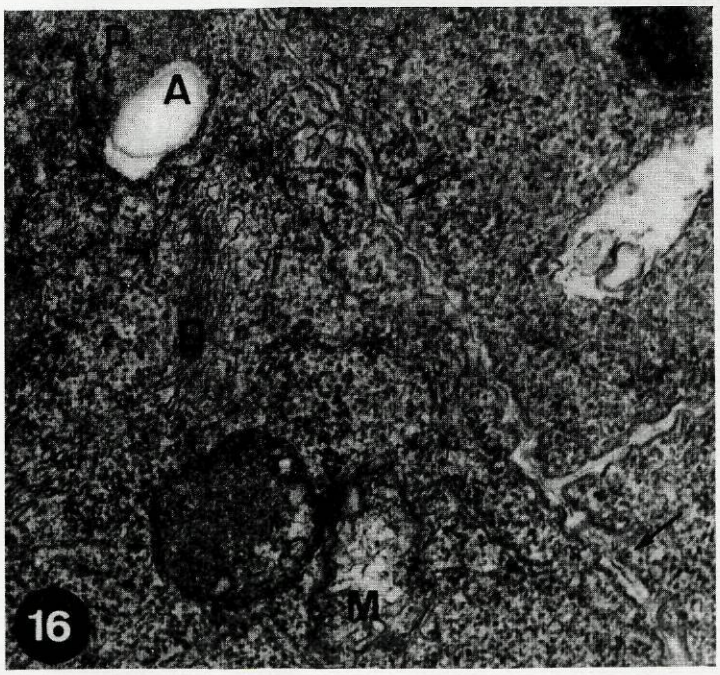
13



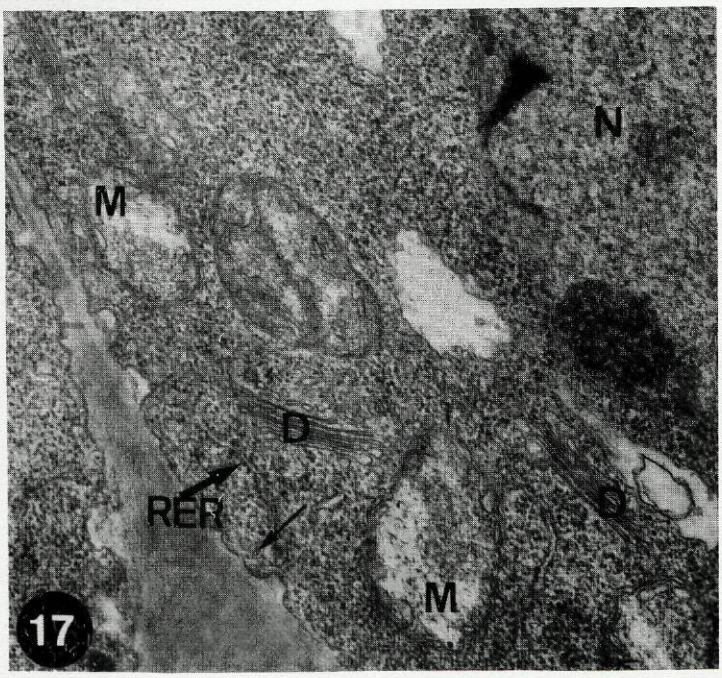
14



15



16



17

dictiossomas são pouco activos, sendo portanto reduzido o número de vesículas associadas às cisternas. De salientar também, a presença de microtúbulos citoplasmáticos, preferencialmente localizados junto da parede celular, e alguns elementos de retículo endoplasmático rugoso, predominando contudo os ribosomas livres distribuídos, em elevado número, pelo citoplasma destas células (Figs. 16, 17).

Quando as células esporogénicas iniciam a divisão de meiose, designando-se então por células mães do grão de pólen, o tapete sofre alterações evolutivas importantes. Estas alterações manifestam-se essencialmente nos plastídios, nos dictiossomas e, de modo muito peculiar, no retículo endoplasmático rugoso.

Embora no primeiro estádio da profase meiótica (leptóteno) existam ainda alguns grãos de amido no estroma dos plastídios, este hidrato de carbono deixa de se observar nas fases subsequentes e não se deposita mais nestas células. Assim, durante a meiose, torna-se evidente no estroma dos proplastídios uma inclusão paracristalina com dimensões de 0,5 μm a 0,7 μm (Fig. 18). Os cristais, constituídos por partículas esféricas de 50-70 Å de diâmetro, surgem com aspectos variados devido às diferentes orientações da estrutura em relação ao plano de corte. São, no entanto, vulgarmente observados dois aspectos: num deles, que corresponde à secção transversal da estrutura, as partículas assumem uma disposição hexagonal (cada uma fica rodeada por outras seis) com uma distância centro a centro de 20 nm (Fig. 19); noutro aspecto, que corresponde à secção longitudinal do cristal, as partículas agrupam-se numa série de linhas paralelas separadas por um espaço electronicamente transparente de 70-90 Å (Fig. 20). Esta inclusão cristalina não é limitada por membranas, embora apareça frequentemente associada às membranas dos tilacóides (Figs. 19,20). A fim de se obterem indicações sobre a constituição química desta inclusão fez-se actuar, sobre cortes ultrafinos, uma enzima proteolítica, a pronase, que possui um largo espectro de actuação (Monneron, 1966). Após o tratamento com a pronase, a inclusão aparecia mais degradada à medida que se aumentava o tempo de actuação da enzima, e ao fim de 15 horas de tratamento (Fig. 21) assistiu-se à remoção quase completa da inclusão. Estes resultados permitem

Células do tapete durante o estádio de meiose

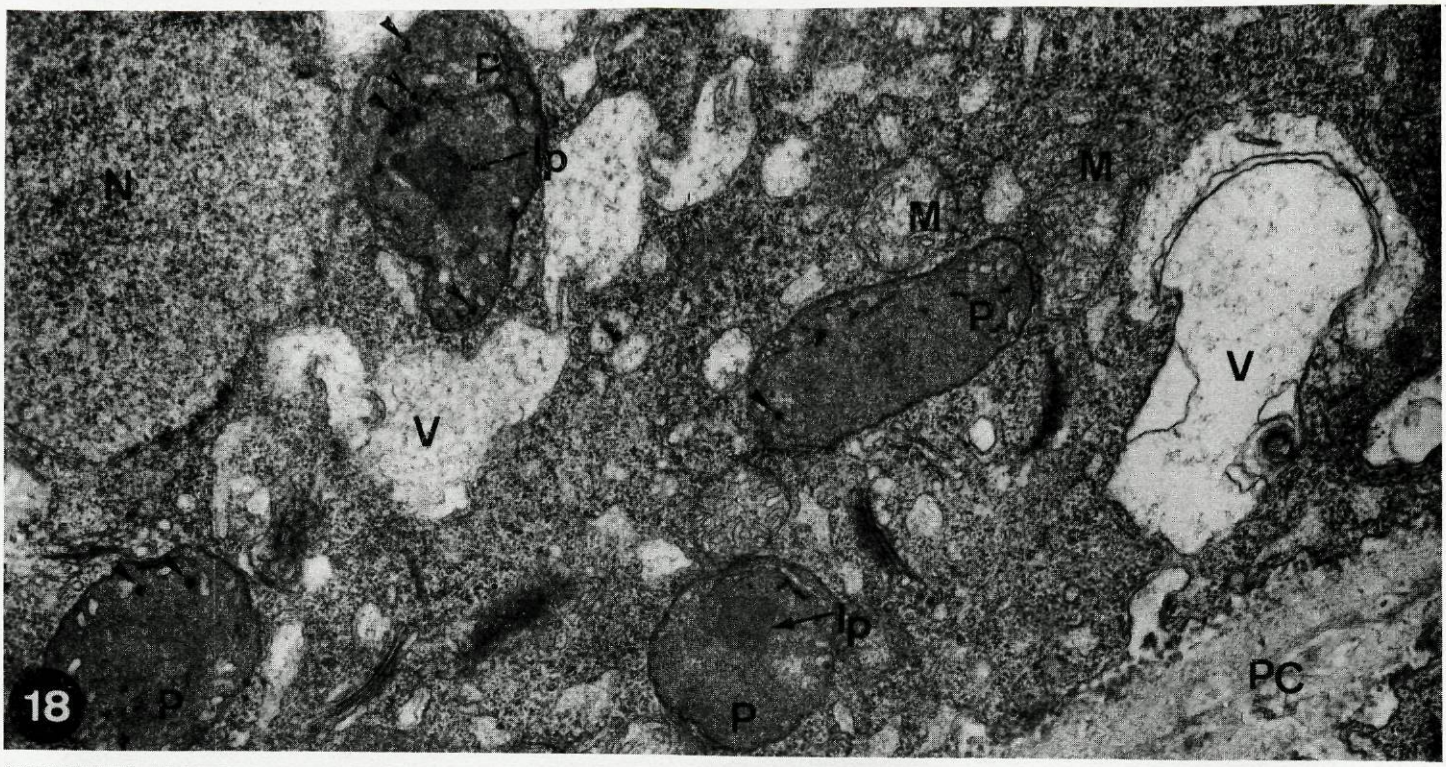
Fig. 18 - Proplastídios (P) sem amido e com uma inclusão paracristalina (Ip) e plastoglóbulos (pontas de setas). N - núcleo; PC - parede celular; M - mitocôndria; V-vacúolo. 19 200X.

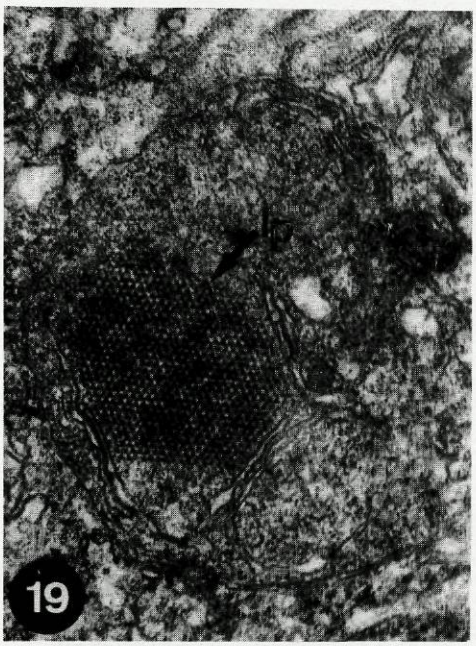
Figs. 19,20 - Aspectos da inclusão paracristalina (Ip) em corte transversal (Fig. 19) e longitudinal (Fig. 20).
Fig. 19 - 46 400X; Fig. 20 - 48 000X.

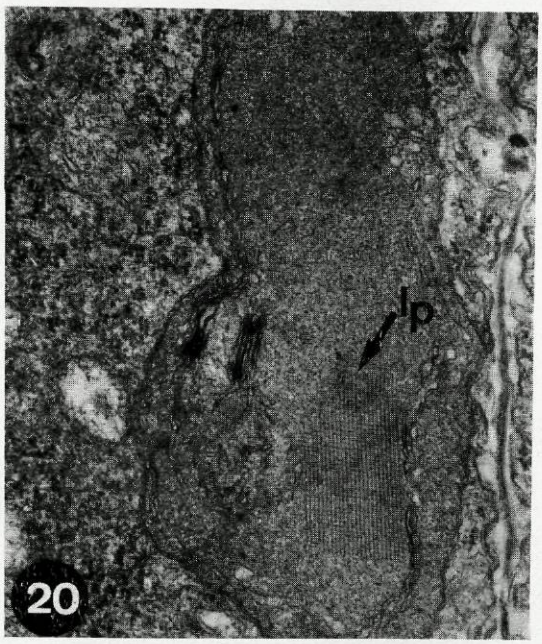
Fig. 21 - Aspecto da inclusão paracristalina (Ip) após actuação da pronase durante 15 horas. 47 600X.

Fig. 22 - Proplastídios (P) mostrando um sistema complexo de túbulos e plastoglóbulos associados (pontas de setas). N - núcleo. 17 000X.

Fig. 23 - Proplastídio (P) com estrangulamento sugestivo de situação de divisão. Alguns plastoglóbulos (pontas de setas) aparecem associados quer às lamelas estromáticas quer à inclusão paracristalina (Ip). M - mitocôndria. 19 000X.


N
P
lp
V
M
M
P
V
lp
P
PC
18


lp
19


lp
20


P
21


22


P
M
M
M
lp
23

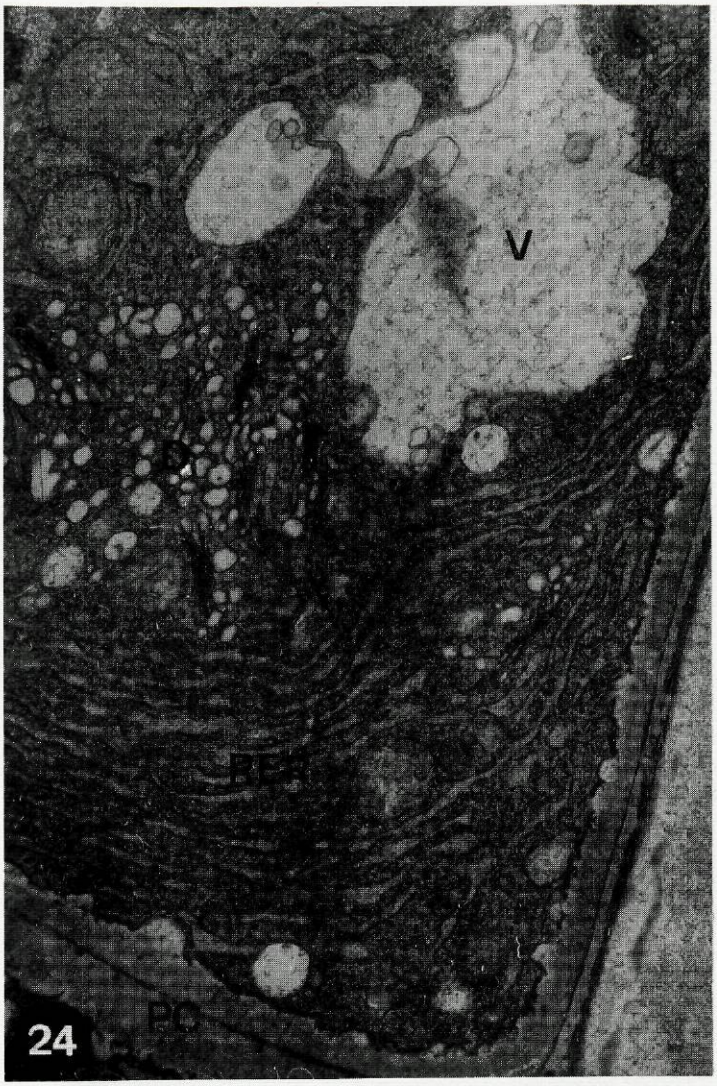
Células do tapete durante a meiose

Fig. 24 - Conjunto de dictiossomas (D) em fase activa com a produção de numerosas vesículas. V - vacúolo; PC - parede celular; RER - retículo endoplasmático rugoso. 16 800X.

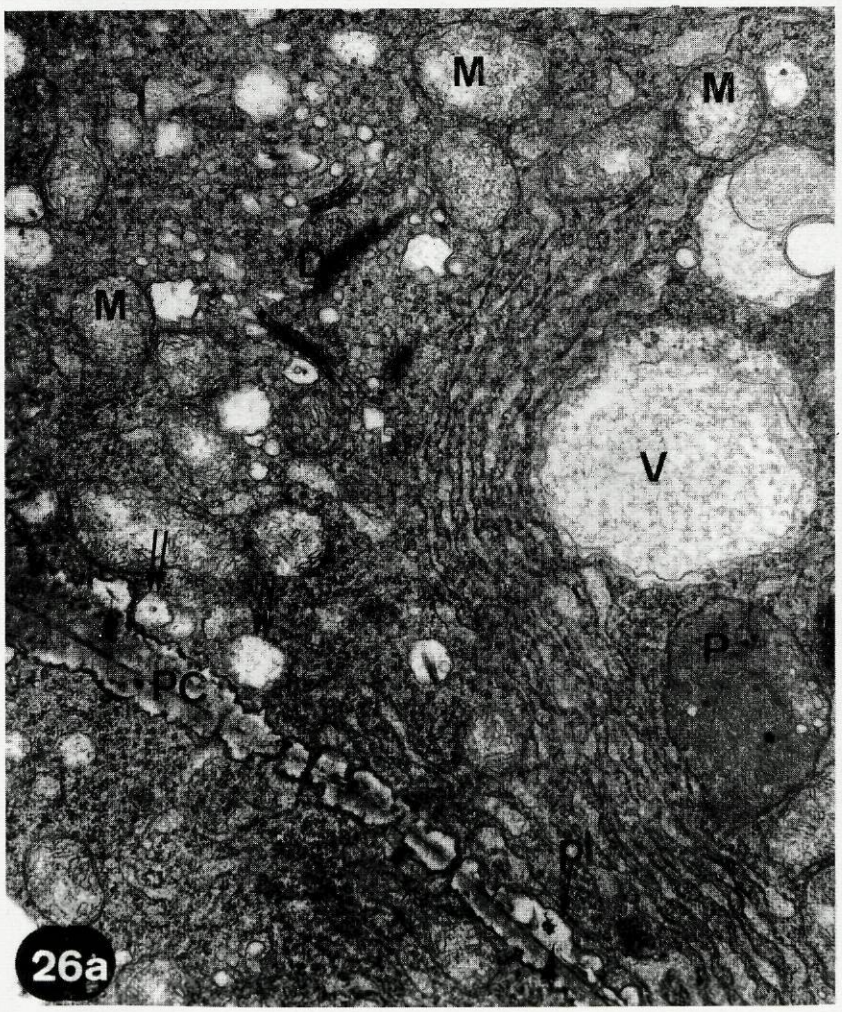
Figs. 25,26a - Fases de deslocamento das vesículas contendo mateial denso (setas), desde as cisternas até à periferia da célula (duplas setas). O material transportado encontra-se também no espaço entre o plasmalema e a parede celular (pontas de setas, Fig. 26a). N -núcleo; P - plastídio; PC - parede celular; pl - plasmalema; M-mitocôndria; V -vacúolo.
Fig. 25 - 14 700X; Fig. 26a - 16 800X.

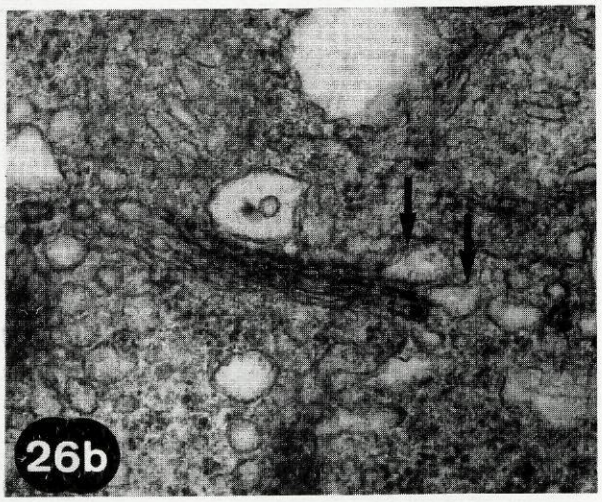
Fig. 26b - Maior ampliação de um dictiossoma mostrando a formação de vesículas na extremidade das cisternas (setas). 64 000X.

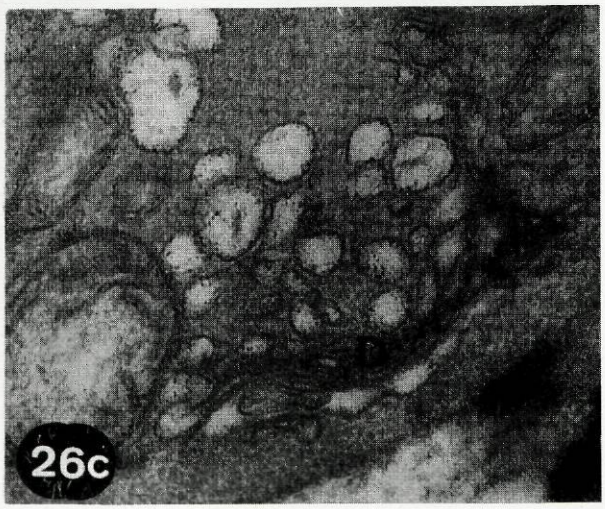
Fig. 26c - Vesículas associadas às cisternas dos dictiossomas (D) com ligeira positividade ao teste de Thiéry. 50 000X.


V
D
RER
PC
24


N
P
D
pl
PC
25


M
M
M
D
V
P
PC
26a


26b


26c

sugerir que esta estrutura é basicamente constituída por proteínas. Nestes proplastídios, o sistema lamelar é mais desenvolvido do que na fase anterior, o qual se organiza, por vezes, num complexo tubular ao qual aparecem associados plastoglóbulos, de densidade electrónica variável (Fig. 22). Alguns plastídios (Fig. 23) apresentam zonas de constrição que sugerem formas de divisão (Chaly & Possingham, 1981).

O aparelho de Golgi é um dos organelos com maior actividade nesta fase. Desde o início da meiose, numerosos dictiossomas povoam o citoplasma (Figs. 24, 25, 26a). Cada dictiossoma é constituído por 3-5 cisternas rodeadas por uma membrana de 4-5 nm de espessura. A grande actividade dos dictiossomas traduz-se pela enorme proliferação de vesículas que se formam na extremidade das cisternas (Fig. 26 b). No lúmen das cisternas observa-se material com determinada densidade electrónica e nas vesículas que se vão distribuindo pelo citoplasma é transportado um material finamente fibrilar e denso aos electrões (Fig. 25). As vesículas parecem transportar o material que contêm para o exterior da célula, facto traduzido pela sua presença junto do plasmalema (Figs. 25,26 a) e do material fibrilar no espaço entre a membrana celular e a parede (Fig. 26 a). Estas vesículas do aparelho de Golgi apresentam ligeira positividade ao teste de Thiéry (Fig. 26 c), específico para a localização de polissacarídeos (Thiéry, 1967).

O organelo citoplasmático que, nas células do tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch., apresenta alterações ultraestruturais significativas e invulgares é o retículo endoplasmático rugoso. Nos estádios iniciais da meiose, observam-se cisternas de retículo rugoso no citoplasma e algumas delas em comunicação com o plasmalema (Figs. 27, 28). As membranas do retículo endoplasmático têm cerca de 5 nm e limitam cisternas com espessura variável entre 30-50 nm. Nesta fase predomina o retículo do tipo rugoso, embora se distingam algumas zonas que não apresentam ribossomas associados às membranas. Seguidamente (Figs. 29, 30), assiste-se a uma proliferação das cisternas de retículo endoplasmático, que se distribuem em longas camadas, com a disposição paralela característica de algumas células secretoras

vegetais, nomeadamente de nectários de vários espécies (Rachmilevitz & Fahn, 1973, 1975; Fahn, 1979; Fahn & Benouaiche, 1979; Fahn & Rachmilevitz, 1975). Uma ampliação conveniente (Fig. 30) permite verificar que as cisternas de retículo endoplasmático, predominantemente do tipo rugoso, se encontram preenchidas por material finamente fibrilar, electronicamente denso.

É ainda durante a meiose que se iniciam as alterações que conduzem à formação de um sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso, característico destas células.

Em primeiro lugar, assiste-se a uma dilatação das cisternas e em determinados locais observam-se invaginações da membrana, englobando determinadas áreas de citoplasma (Fig. 31). O facto de se observarem frequentemente cisternas com vesículas ainda ligadas às membranas (Fig. 31) sugere que as vesículas, à medida que se vão formando, se destacam para o interior das cisternas, desligando-se da membrana que as originou. Com a continuação deste processo de vesiculação nos vários elementos do retículo endoplasmático, o citoplasma destas células do tapete fica preenchido, em grande parte, por cisternas dilatadas as quais englobam elevado número de vesículas pleomórficas, com dimensões muito variadas (Fig. 32). Este processo de vesiculação verifica-se também a partir da membrana externa do invólucro nuclear (Fig. 33), sendo em alguns casos, possível observar uma ligação directa entre a cisterna perinuclear e o plasmalema, através deste complexo sistema de retículo endoplasmático rugoso (Figs. 33,34). Devido ao seu processo de formação, estas vesículas apresentam ribossomas alinhados na face interna da membrana limitante, enquanto que outros ribossomas se distribuem pelo citoplasma (Fig. 35). No citoplasma sequestrado, além dos ribossomas são também, por vezes, englobados outros organelos, nomeadamente, dictiossomas (Fig. 36), mitocôndrias e plastídios (Fig. 37).

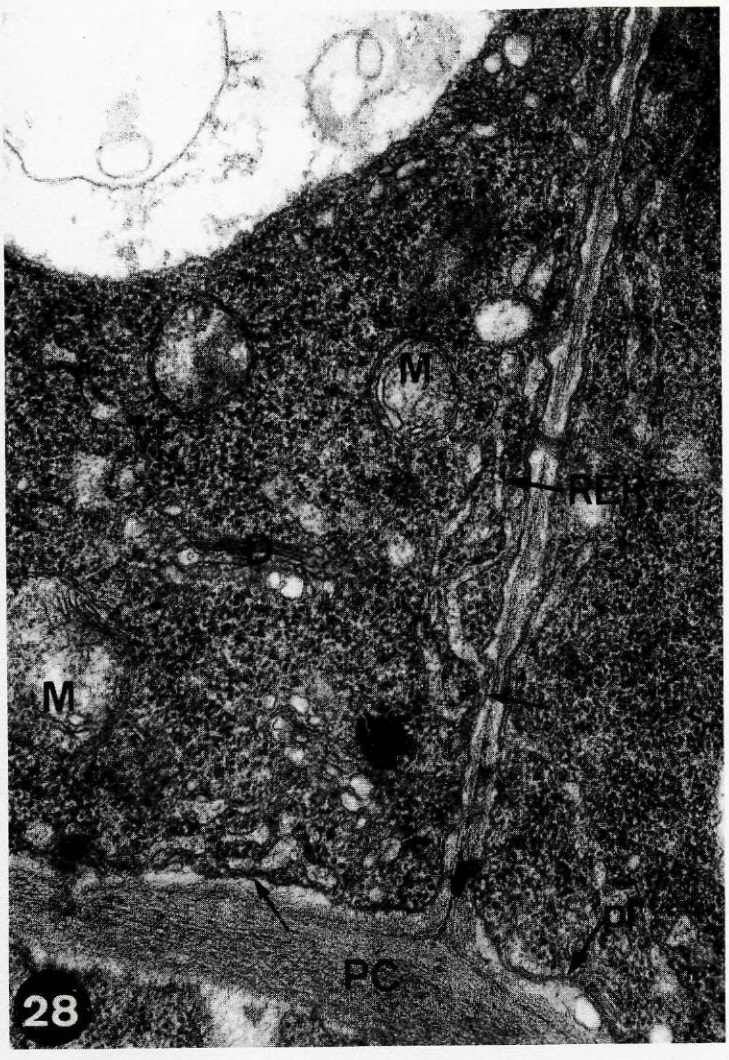
Posteriormente, inicia-se a formação dos corpos de Ubisch ou orbículos, designação aplicada às estruturas esferoidais de esporopolenina ou dos seus precursores, que se originam nas células do tapete das anteras das plantas

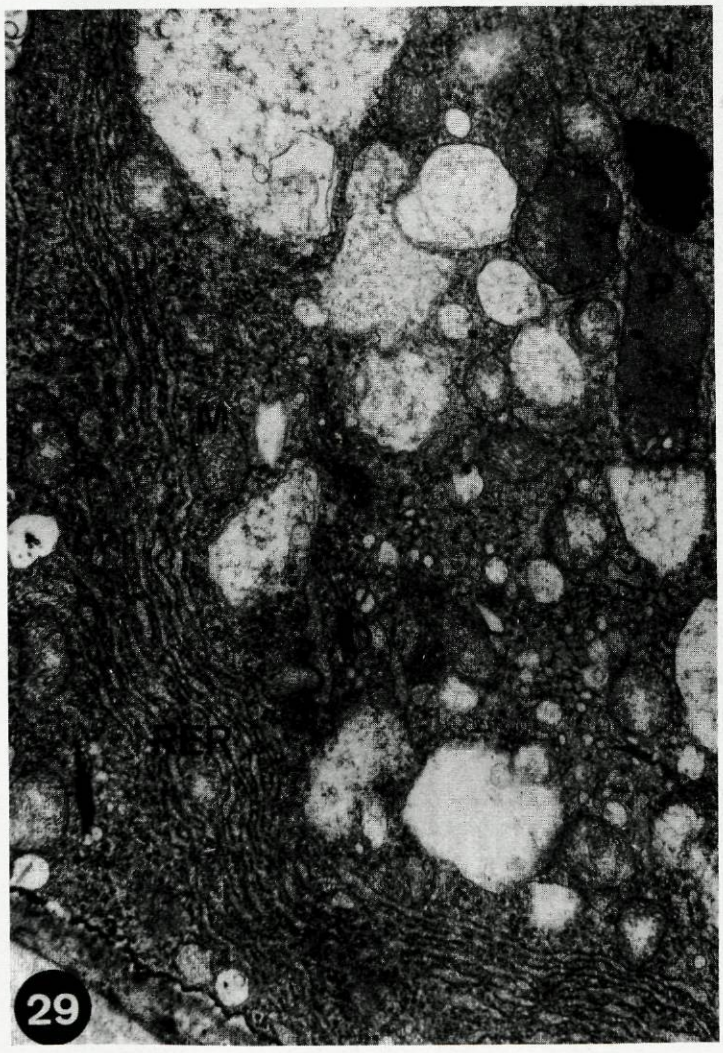
Células do tapete durante a meiose

Figs. 27,28 - Aspectos de células do tapete, observando-se cisternas de retículo endoplasmático rugoso (RER) no citoplasma, algumas das quais em continuidade com o plasmalema (setas). N - núcleo; M - mitocôndria; PC - parede celular; D - dictiossoma; pl - plasmalema; Microtúbulos - pontas de setas.
Fig. 27 - 18 400X; Fig. 28 - 35 000X

Figs. 29,30 - Cisternas de retículo endoplasmático rugoso (RER) distribuídas em longas camadas com disposição paralela e contendo material electronicamente denso. N - núcleo; M - mitocôndria; P - plastídio; D - dictiossoma.
Fig 29 - 15 000X; Fig. 30 - 15 200X.


N
N
RER
M
RER
27


M
RER
M
PC
28


M
M
29


P
M
N
30

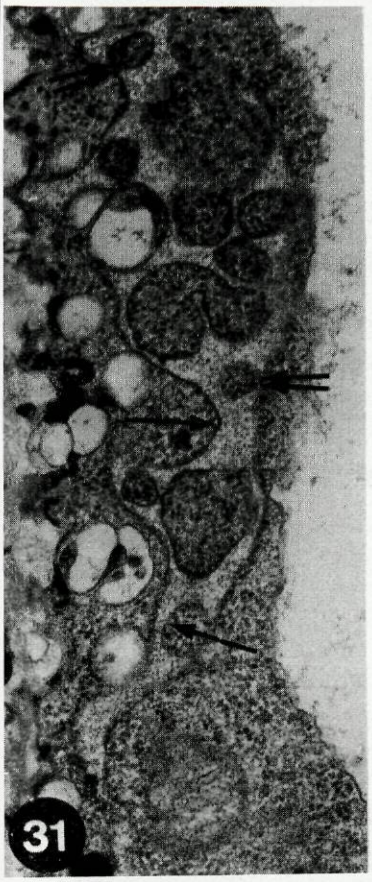
Células do tapete durante a meiose
Formação do sistema elaborado de reticulo endoplasmático rugoso

Fig. 31 - Fase inicial de dilatação das cisternas de retículo, observando-se invaginação da membrana (setas) para originar vesículas, algumas das quais ainda permanecem ligadas à membrana que lhes deu origem (duplas setas). 27 200X.

Fig. 32 - Sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso (RER) englobando elevado número de vesículas pleomórficas de dimensões variadas. 12 000X.

Fig. 33 - Vesiculação originada a partir da membrana externa do invólucro nuclear (setas). N - núcleo; MEN - membrana externa do invólucro nuclear; M - mitocôndria; D - dictiossoma; pl - plasmalema. 16 500X.

Fig. 34 - Sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso possibilitando a comunicação directa entre a cisterna perinuclear e o plasmalema (pl). N - núcleo; MEN - membrana externa do invólucro nuclear. 14 000X



31



32



33



34

superiores. Em *Cucurbita polymorpha* Duch., grânulos de esporopolenina com cerca de 0,1-0,3 μm de diâmetro surgem associados com o sistema elaborado do retículo endoplasmático rugoso (Figs. 38,39). Esta associação do retículo das células do tapete com a formação dos corpos de Ubisch foi sugerida para outras espécies, tanto de Angiospermæ como Gymnospermæ (Echlin & Godwin, 1968a; Risueño et al., 1969 a; Dickinson & Bell, 1972, 1976 a,b). Alguns grânulos de esporopolenina situam-se junto da periferia do citoplasma (Fig. 38) enquanto que outros ocupam já o espaço entre a membrana celular e a parede (Fig. 39). Estas diferentes posições dos corpos de Ubisch sugerem assim um movimento de transporte para o exterior da célula, o qual será possivelmente facilitado pela ligação directa do retículo endoplasmático rugoso com o plasmalema, que frequentemente se observa nestas células.

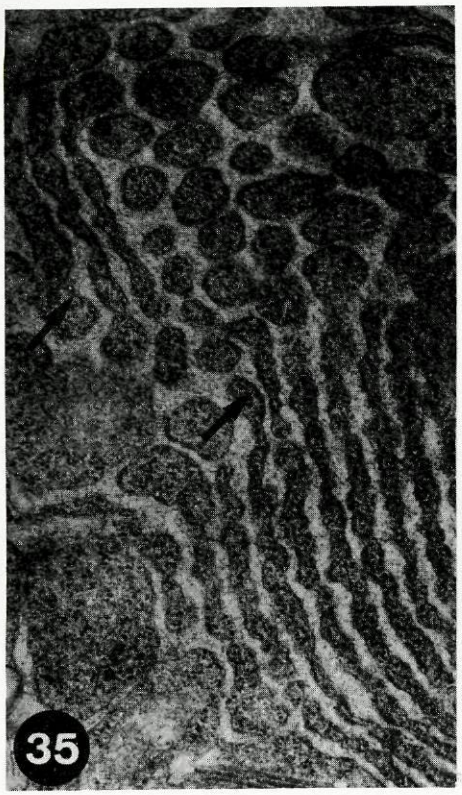
Após a divisão de meiose, que origina os quatro micrósporos haplóides rodeados pela parede especial de calose (tétrada), as células do tapete sofrem um alongamento considerável no sentido do comprimento (Fig. 40). A proliferação do sistema elaborado de retículo endoplasmático é de tal modo acentuado, que é possível distingui-lo mesmo com o nível de resolução proporcionado pela microscopia óptica.

Nesta fase, considerada como de maior actividade para as células do tapete (Echlin, 1971 a), assiste-se a um aumento, em tamanho e número, dos grãos de esporopolenina sendo mais frequente a sua localização ao longo do plasmalema (Fig. 41). As células do tapete, durante o estádio de tétrada, caracterizam-se por possuirem plasmalema com algumas convoluções, iniciando-se também a degenerescência da parede celular (Fig. 42). As cisternas dos dictiossomas, embora produzindo algumas vesículas, já não têm a actividade que caracteriza a fase anterior. As mitocôndrias não apresentam alterações ultraestruturais significativas. Nos plastídios (Figs. 42,43) parece intensificar-se o sistema de túbulos e cisternas, alguns dos quais apresentam certo grau de dilatação, sendo já raros os organelos que possuem a inclusão paracristalina (Fig. 44). Nos plastídios inicia-se a formação de pequenos vacúolos, limitados por uma membrana, que pode provavelmente resultar da dilatação das cisternas (Figs. 43,44). No final do estádio de tétrada, a dissolução da

Células do tapete durante a meiose
Formação do sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso (cont.)

Figs. 35,36,37 - Vários aspectos das vesículas pleomórficas que preenchem as cisternas do retículo. Na membrana limitante das vesículas distribuem-se ribossomas (setas) e o citoplasma sequestrado, além de ribossomas livres, engloba dictiossomas (D, Fig. 36), mitocôndrias (M) e plastídios (P) (Fig. 37).
Fig. 35 - 25 200X; Fig. 36 - 31 500X; Fig. 37 - 30 000.

Figs. 38,39 - Cisternas dilatadas de retículo com grânulos de esporopolenina (sp). Alguns situam-se na periferia da célula (Fig. 38, setas), enquanto que outros ocupam o espaço entre o plasmalema e a parede (Fig. 39, pontas de setas). PC - parede celular; M - mitocôndria; P - plastídio; D - dictiossoma; N - núcleo.
Fig. 38 - 18 400X; Fig. 39 - 18 800X.



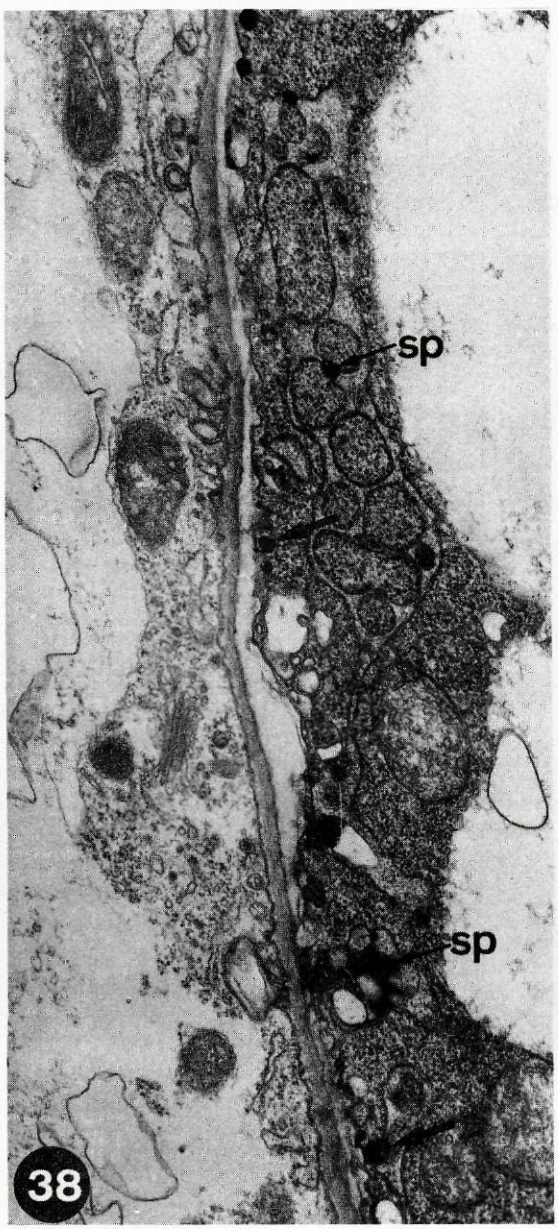
35



36



37



38



39

Células do tapete durante o estádio de tétrada

Fig. 40 - Corte semi-fino observando-se células da parede (PA) e do tapete (T) onde se distingue o sistema elaborado de retículo endoplasmático (seta). 1 950X

Fig. 41 - Depósitos de esporopolenina (sp) na periferia da célula e em continuidade com o retículo endoplasmático rugoso (RER). PC - parede celular. 10 800X.

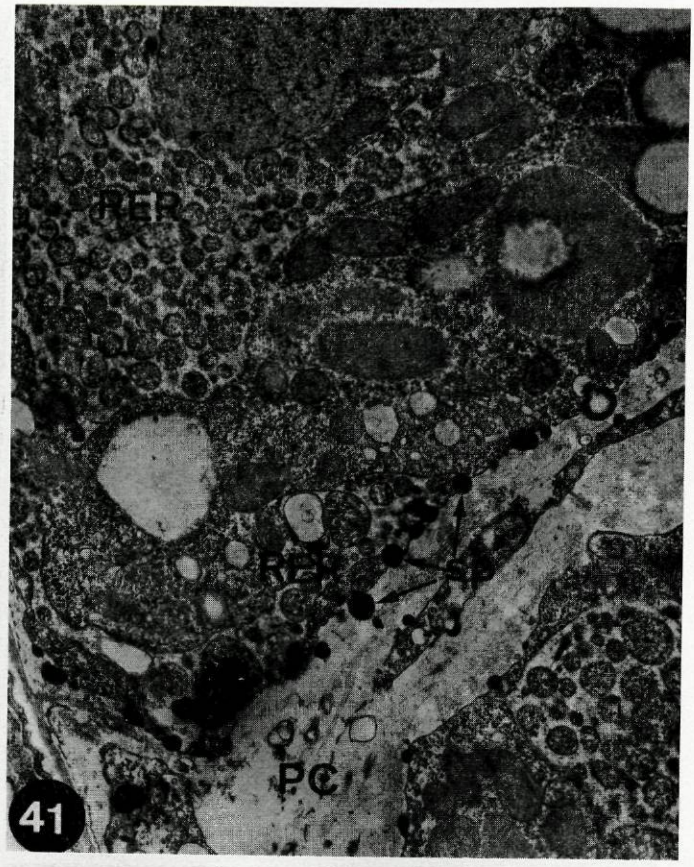
Fig. 42 - Plastídio (P) com túbulos, cisternas e plastoglóbulos. A parede (PC) apresenta sinais de degenerescência. D - dictiossoma. 15 400X.

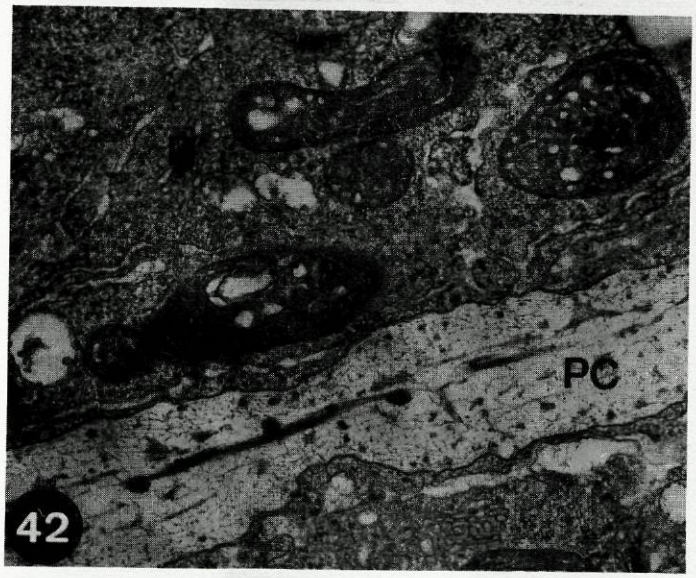
Figs. 43,44 - Aspectos de plastídios (P) com vacúolos (Vp) e com inclusão paracristalina (Ip, Fig. 44). 19 000X.

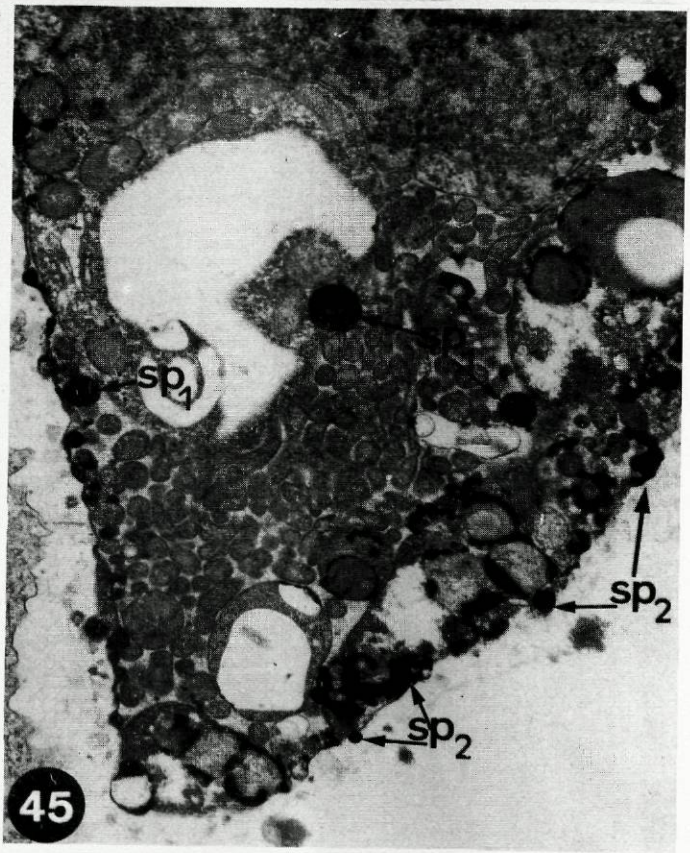
Figs. 45,46 - Depósitos de esporopolenina nas cisternas do retículo (sp_1) e outros na periferia (sp_2) isolados ou em agregados.

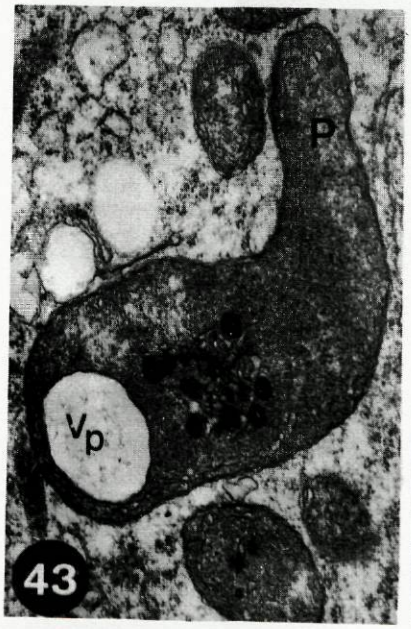
Fig. 45 - 11400X; Fig. 46 - 20 000X.

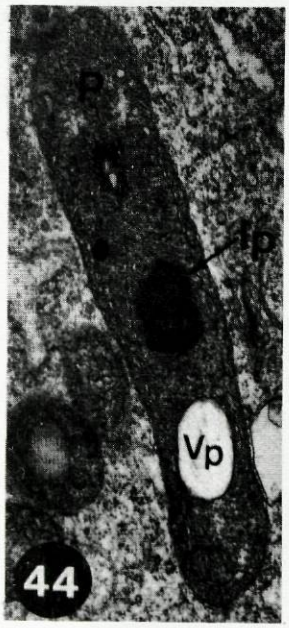

T
PA
40

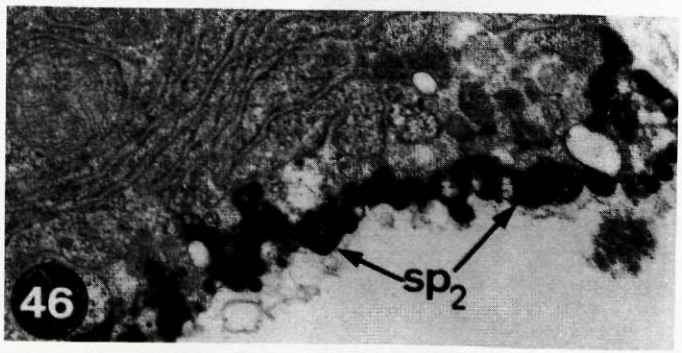

RER
RER
PC
41


PC
42


sp1
sp2
sp2
45


P
Vp
43


P
Vp
44


sp2
46

parede celular é quase completa (Figs. 45,46), principalmente nas paredes radial e tangencial. O desaparecimento da parede celular facilita assim a passagem dos grãos de esporopolenina para o lóculo da antera. Enquanto que alguns depósitos se observam ainda nas cisternas do sistema elaborado do retículo endoplasmático rugoso (Fig. 45), outros situam-se na periferia da célula formando, por vezes, agregados mais ou menos extensos (Figs. 45, 46).

Após a libertação dos micrósporos pela dissolução da parede especial de calose, a ultraestrutura do tapete que os rodeia é, de um modo geral, sobreponível à do estádio precedente (Fig. 47). De salientar, o sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso que ocupa uma área considerável do citoplasma. Nas cisternas dilatadas, observam-se ainda alguns depósitos de esporopolenina. É, mais uma vez, possível confirmar a origem das vesículas pleomórficas em invaginações da membrana do retículo, observando-se mesmo vesículas ainda em contacto com a membrana original e outras ligadas por um pedúnculo. De notar que organelos citoplasmáticos continuam a ser sequestrados nas vesículas pleomórficas. Estas células do tapete, embora mantendo a sua posição inicial na periferia do lóculo das anteras e em continuidade com as células da parede, já quase não possuem parede celular, persistindo apenas alguns vestígios junto da face tangencial interna (Fig. 47). No citoplasma tapetal, ocupado por pequenos vacúolos e com núcleo colocado centralmente, distribuem-se mitocôndrias cuja matriz apresenta elevada densidade electrónica e um sistema de cristas bem desenvolvido (Fig. 48). Distinguem-se ainda alguns dictiossomas com reduzido número de cisternas, alguns com um certo grau de curvatura, mas praticamente inactivos (Figs. 48, 49). Os plastídios (Fig. 49) surgem com uma morfologia particular, aumentando o tamanho dos vacúolos dos plastídios, cuja formação se tinha iniciado na fase anterior. No estroma continuam a observar-se plastoglóbulos, mas com certa diminuição do sistema de membranas, não sendo vulgar o aparecimento dos complexos tubulares.

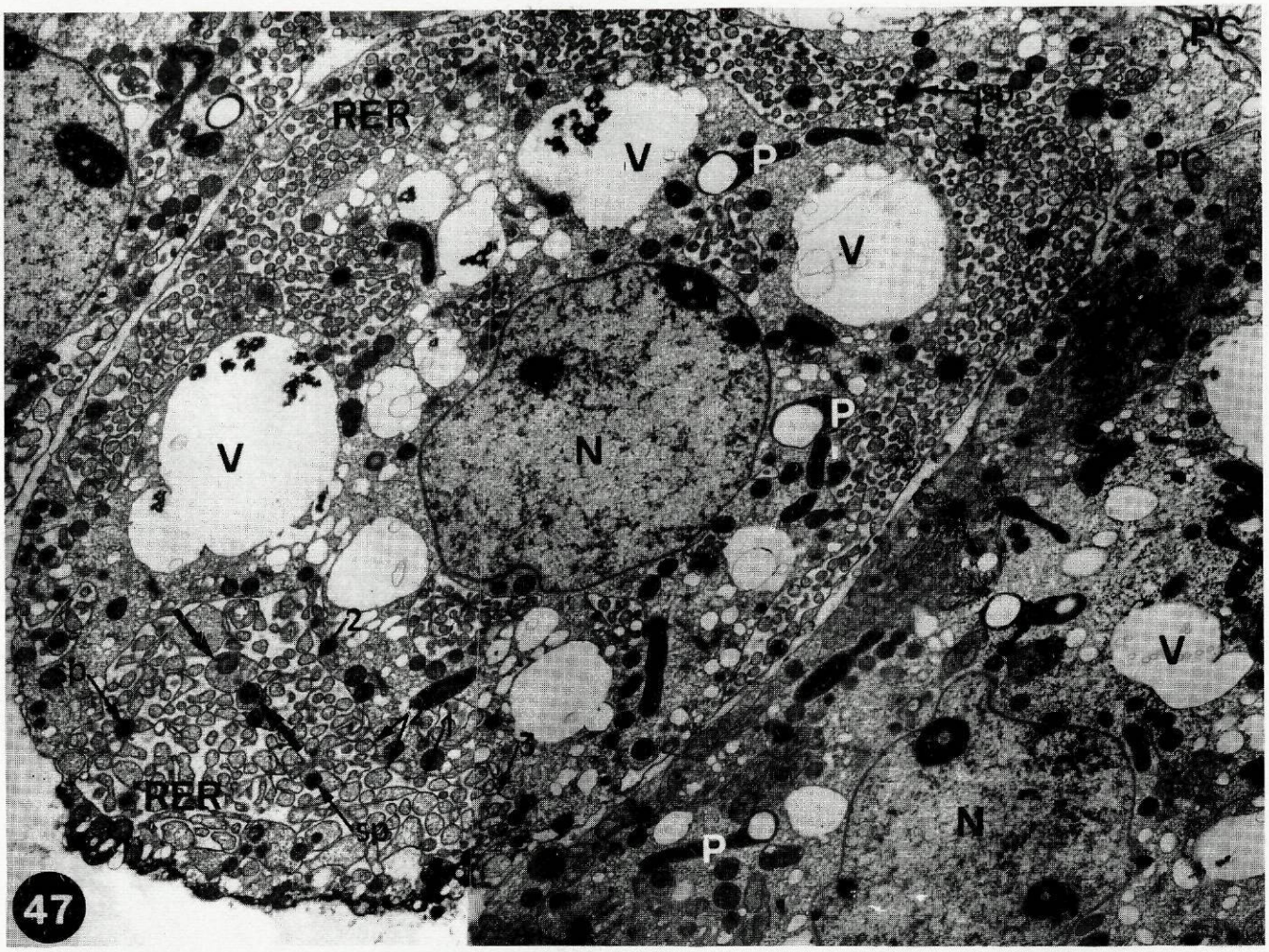
Posteriormente, mas ainda em fase anterior à divisão mitótica do núcleo do micrósporo, as células do tapete (Fig. 50), mantendo a sua posição periférica em

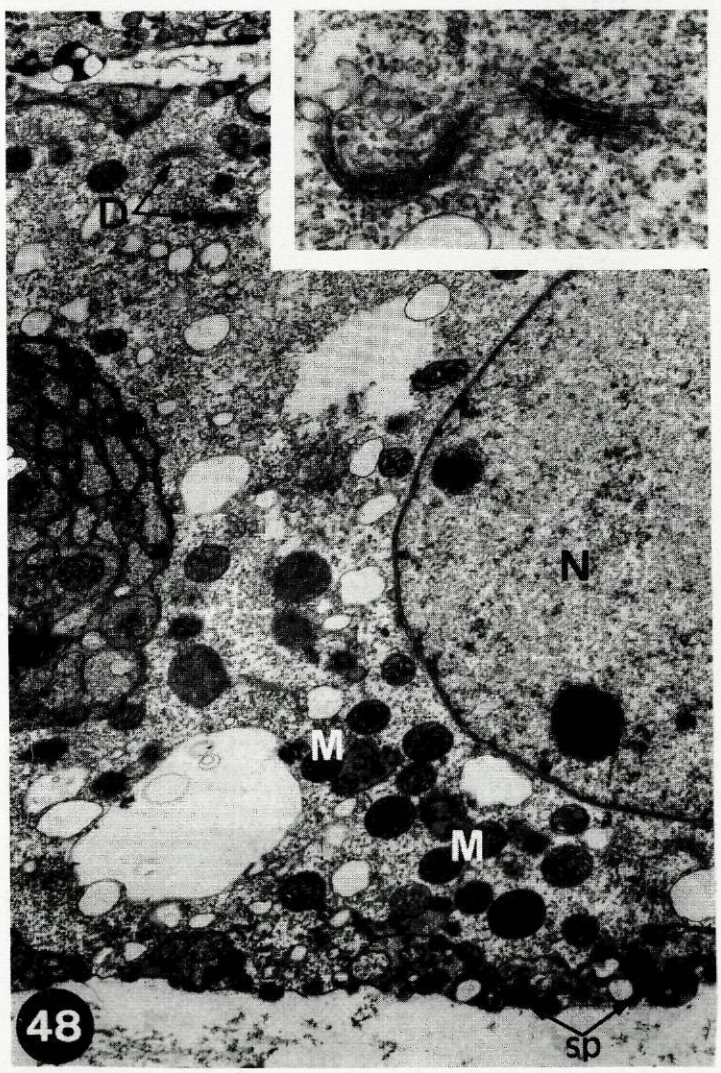
Tapete na fase de micrósporo livre

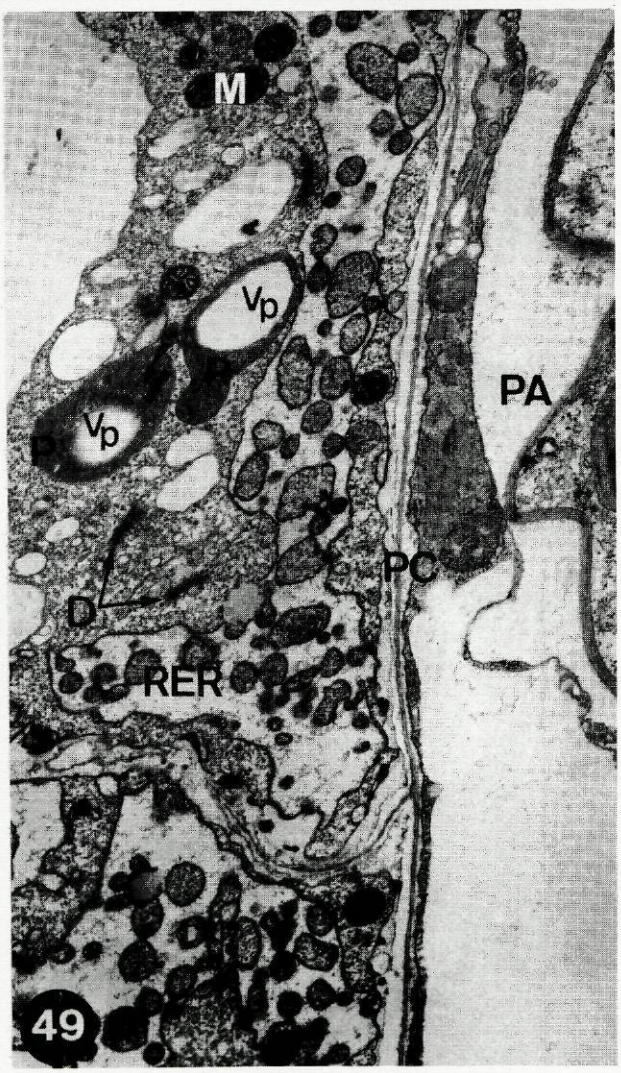
Fig. 47 - Células do tapete sem parede celular entre elas e na face junto do lóbulo da antera. Apenas persistem vestígios da parede celular (PC) junto das células da parede. No sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso (RER) é possível observar a origem das vesículas pleomórficas em invaginações da membrana da cisterna (1), algumas das quais ainda permanecem em continuidade com a membrana original (2) e outras ligadas por um pedúnculo (3). Nas cisternas dilatadas, onde ainda se observam depósitos de esporopolenina (sp), algumas das vesículas pleomórficas englobam organelos citoplasmáticos (setas). N - núcleo; P - plastídio; V - vacúolo. 5 700X.

Fig. 48 - Mitocôndrias (M) com matriz com considerável densidade electrónica e cristas bem desenvolvidas. Encaixe - dictiossomas inactivos com reduzido número de cisternas. N - núcleo; D - dictiossoma; sp - depósitos de esporopolenina. Fig. 48 - 10 400X; Encaixe - 25 200X.

Fig. 49 - Plastídios (P) com vacúolo de elevadas dimensões (Vp) e alguns plastoglóbulos (pontas de setas). PC - parede celular junto às células da parede (PA); M - mitocôndria; RER - retículo endoplasmático rugoso; D - dictiossoma. 9 400X.


RER
V
P
PC
V
V
N
P
V
RER
sp
N
P
47


D
N
M
M
sp
48


M
Vp
Vp
P
PA
PC
D
RER
49

continuidade com as células da parede, começam a apresentar certos sinais de degenerescência, que se iniciam pela diminuição do número de ribossomas citoplasmáticos. Os depósitos de esporopolenina localizam-se preferencialmente na periferia da célula.

No estádio de grão de pólen binucleado, são particularmente importantes as transformações operadas nos plastídios, cujo estroma fica ocupado por numerosos glóbulos lipídicos (Fig. 51). Estes plastídios assemelham-se aos oleoplastos descritos nas fases finais de desenvolvimento das células do tapete de outras plantas (Dickinson, 1973; Pacini & Casadoro, 1981). No citoplasma distinguem-se também depósitos lipídicos. A partir desta fase, assiste-se à desorganização total das células com a libertação dos organelos celulares (Fig. 52). É possível distinguir também as cisternas dilatadas do retículo rugoso (Fig. 53), observando-se por vezes ruptura da membrana limitante das cisternas, pelo que resulta a libertação das vesículas pleomórficas (Fig. 54).

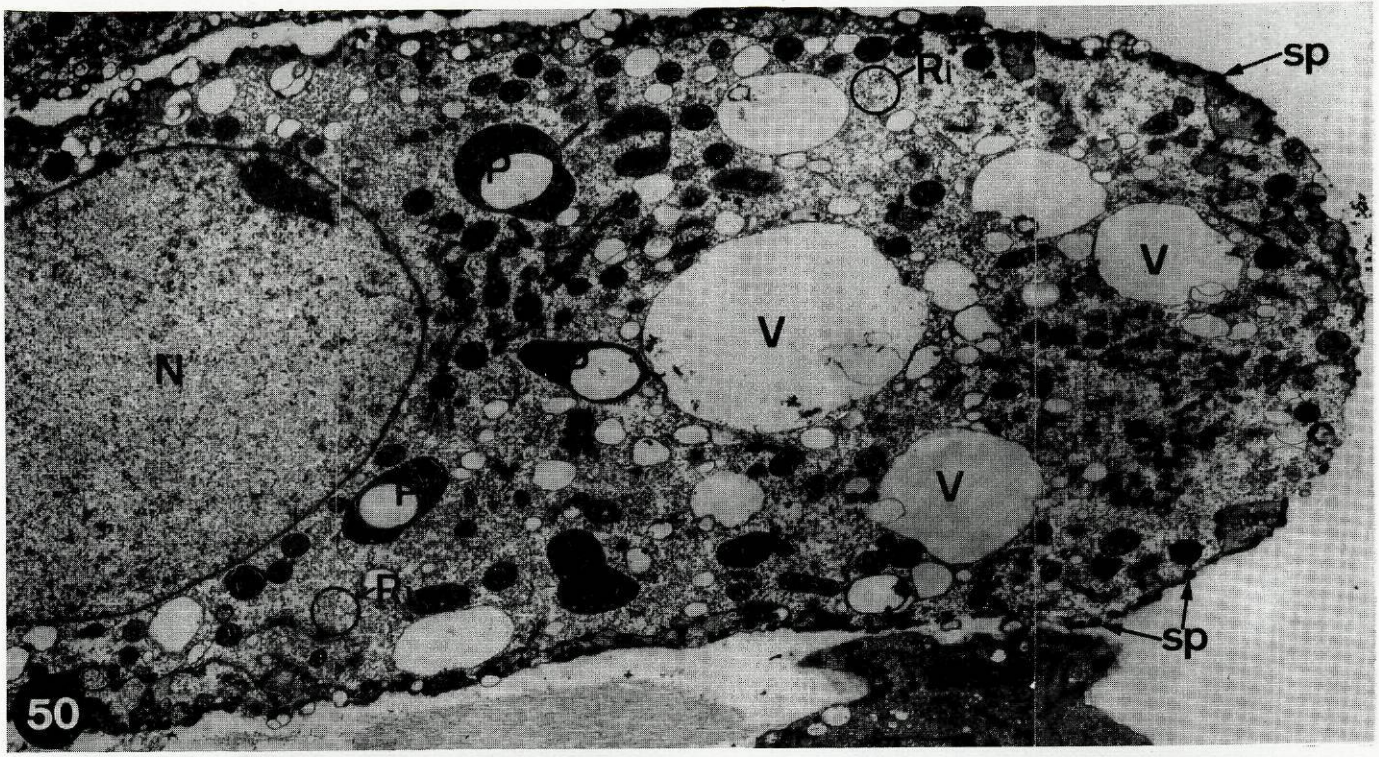
Neste estudo ultraestrutural sobre a evolução das células do tapete em *Cucurbita polymorpha* Duch. utilizámos geralmente, a fixação de rotina para microscopia electrónica (glutaraldeído seguido de tetróxido de ósmio). No entanto, para termos uma informação mais completa sobre este tecido, procedemos também à fixação do material com permanganato de potássio, e com glutaraldeído seguido de permanganato. A fixação glutaraldeído-permanganato (Fig. 55) oferecia melhor preservação da ultraestrutura celular do que quando se utilizava apenas o permanganato (Fig. 56). Esta diferença era sobretudo evidente no sistema elaborado do retículo endoplasmático rugoso. Com a dupla fixação (Fig. 57) obtinha-se boa preservação da estrutura enquanto que o permanganato (Fig. 58) conduzia à ruptura das membranas embora preservasse os depósitos de esporopolenina, o que também se verificou com a primeira fixação. De referir que com estes dois tipos de fixação, não era preservada a estrutura paracristalina do estroma dos plastídios destas células tapetais. Procurámos também detectar a presença de polissacarídeos (Thiéry, 1967) nas células do tapete (Fig. 59). As vesículas resultantes da actividade dos

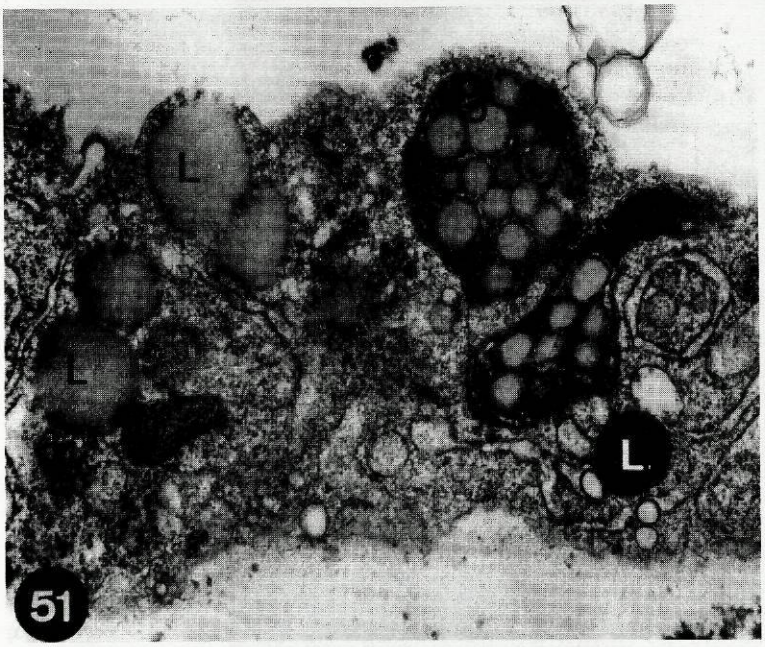
Células do tapete na fase de grão de pólen uni- e binucleado

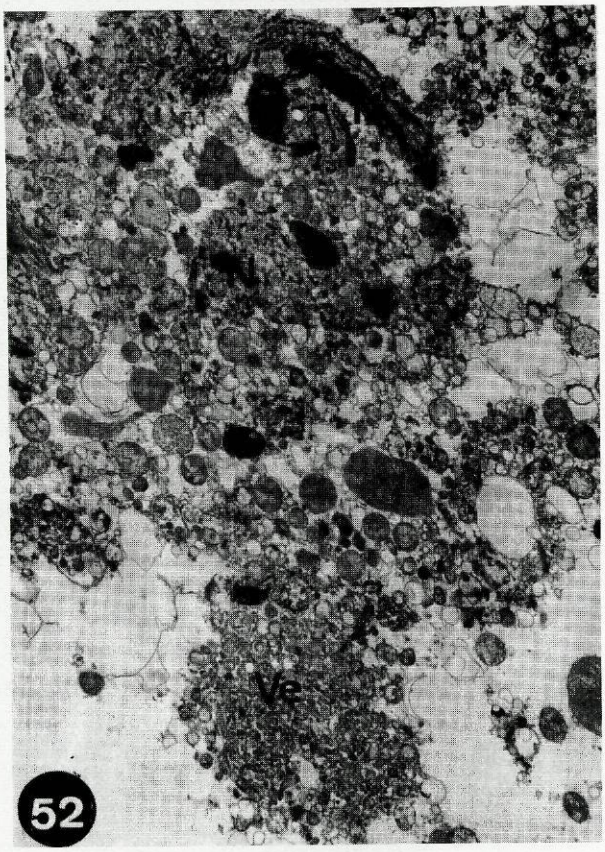
Fig. 50 - Parte de célula do tapete sem parede celular, dispondo-se a esporopolenina (sp) na periferia da célula. No citoplasma, o número de ribossomas (Ri) diminui consideravelmente. N - núcleo; P - plastídio; V - vacúolo. 6 800X.

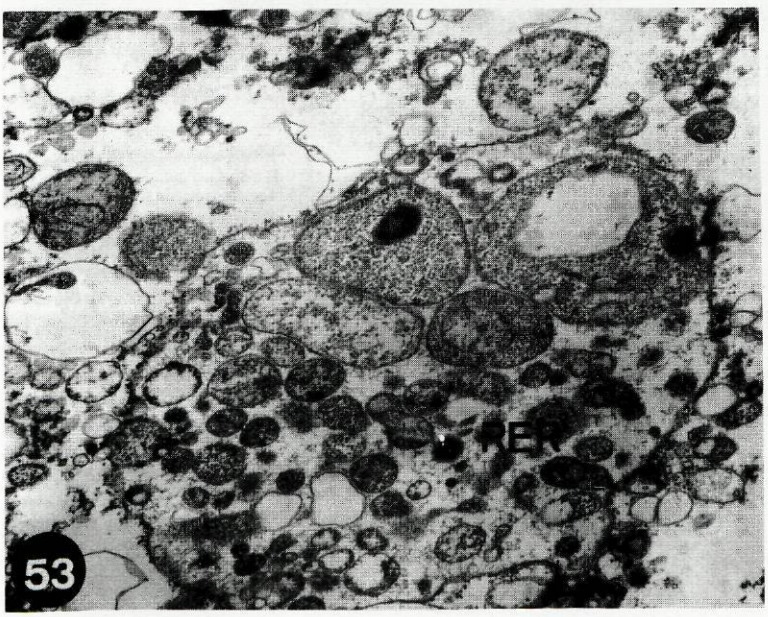
Fig. 51 - Oleoplastos (P_o) com numerosos glóbulos lipídicos. L - lípidos citoplasmáticos. 20 000X.

Figs. 52,53,54 - Fases de degenerescência das células do tapete.
Fig. 52 - Núcleo em desagregação (N) e vesículas pleomórficas (Ve). Fig. 53 - Cisterna do sistema elaborado de retículo rugoso (RER) com vesículas pleomórficas em várias fases de degenerescência. Fig. 54 - Ruptura da cisterna do retículo (R) com libertação das vesículas pleomórficas.
Fig. 52 - 5 250X; Fig. 53 - 14 800X; Fig. 54 - 12 400X.


Ri
sp
V
V
V
N
P
P
R
sp
50


L
L
L
51


Ve
52


ER
53

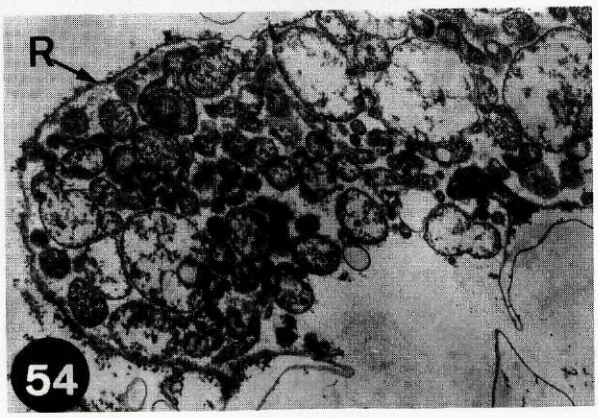
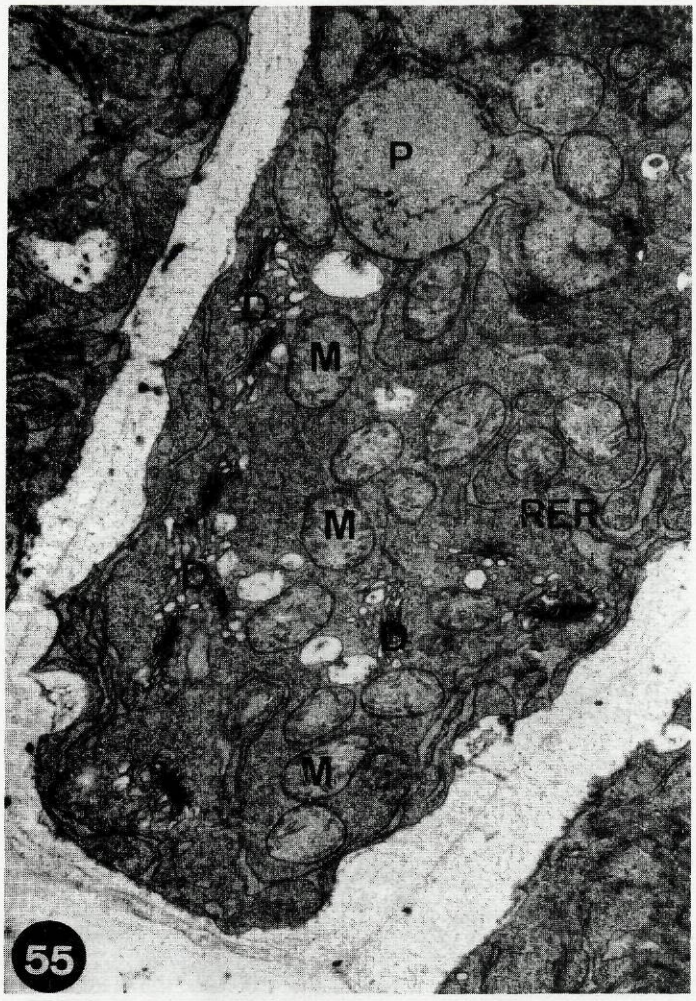

R
54

Fig. 55 - Célula do tapete após fixação glutaraldeído-permanganato de potássio, com boa preservação do sistema membranoso celular. P - plastídio; M - mitocôndria; D - dictiossoma; RER - retículo endoplasmático rugoso. 15 200X.

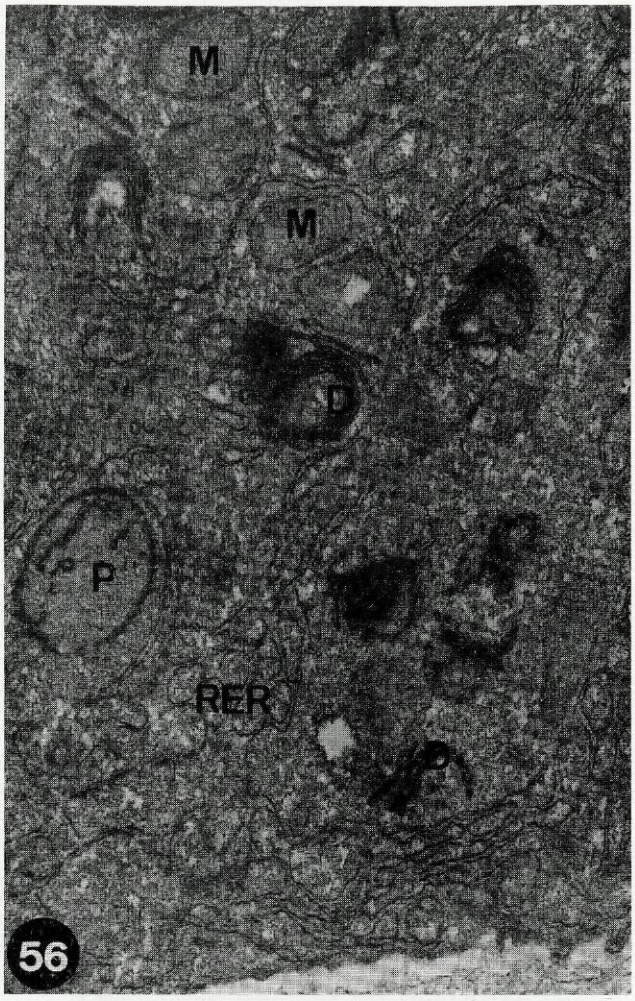
Fig. 56 -Célula do tapete após fixação com o permanganato de potássio. M - mitocôndria; P - plastídio; D - dictiossoma; RER - retículo endoplasmático rugoso. 22 800X.

Figs. 57,58 - Aspectos do sistema elaborado do retículo endoplasmático rugoso (RER) após fixação glutaraldeído-permanganato (Fig. 57) e só com o permanganato (Fig. 58). No primeiro caso observa-se boa preservação das membranas, enquanto que no segundo, há zonas de ruptura da membrana das vesículas pleomórficas (pontas de setas), embora estejam preservados os depósitos de esporopolenina (setas).
Fig. 57 - 18 000; Fig. 58 - 16 000X.

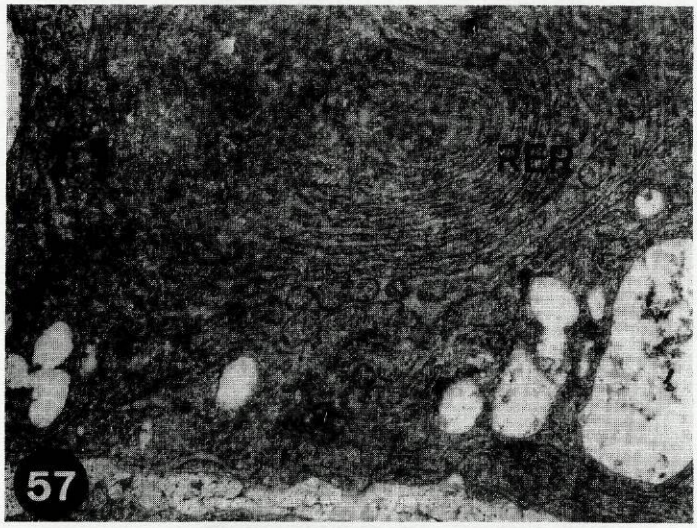
Fig. 59 - Teste de Thiéry nas células do tapete. As vesículas resultantes da actividade dos dictiossomas (setas) apresentam marcação enquanto que o sistema elaborado do retículo endoplasmático rugoso (RER) é Thiéry-negativo. Encaixe - pormenor de um dictiossoma com vesículas Thiéry-positivas (seta). M - mitocôndria; D - dictiossoma.
Fig. 59 - 40 000X; Encaixe - 78 000X.



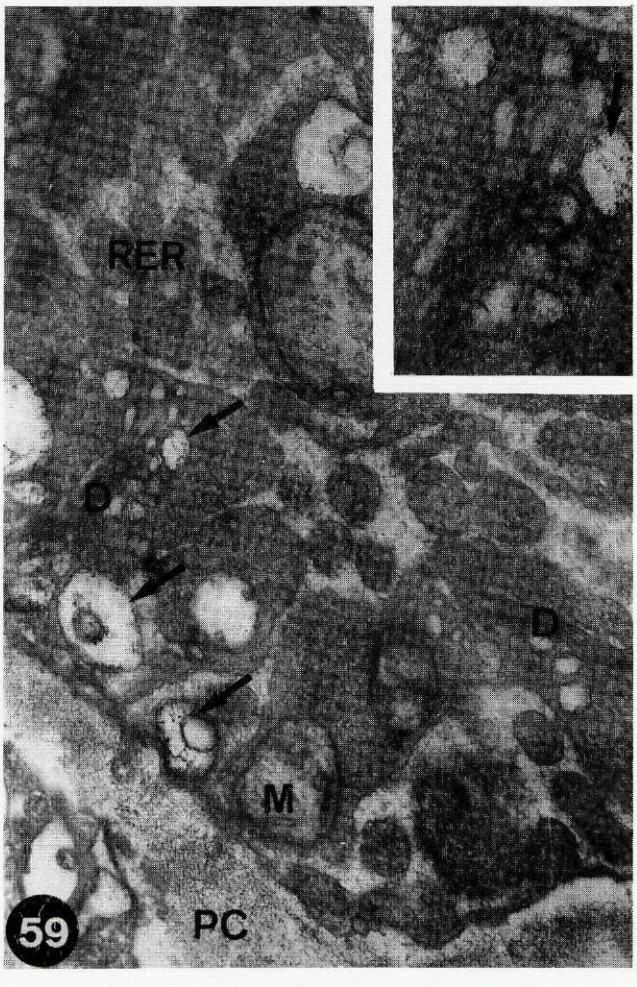
55



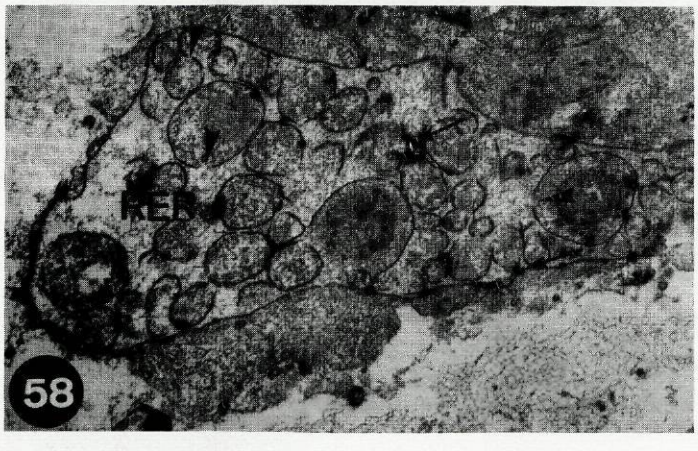
56



57



59



58

dictiossomas apresentavam marcação observando-se também ligeira actividade na parede. Pelo contrário, as cisternas dilatadas de retículo rugoso eram Thiéry-negativas.

2. FORMAÇÃO DA PAREDE DO GRÃO DE PÓLEN DE *CUCURBITA POLYMORPHA* DUCH.

De modo a estabelecer uma possível relação entre as duas gerações, esporofítica e gametofítica, o estudo da evolução das células do tapete foi acompanhado pela análise das várias fases de formação da parede do grão de pólen. Este processo ontogénico inicia-se na fase de tétrada, após a divisão meiótica das células mães do pólen. Antes de descrevermos a formação da parede do pólen referiremos, ainda que sumariamente, as principais transformações operadas na antera, desde as células esporogénicas até à formação das quatro células haplóides.

2.1. FASE PRELIMINAR DA FORMAÇÃO DA PAREDE

Células esporogénicas - Antes da meiose, as células esporogénicas apresentam características ultraestruturais semelhantes às das células meristemáticas. As células esporogénicas, rodeadas por uma parede celulósica, têm dimensões ligeiramente maiores que as células do tapete que as rodeia (Fig. 60, encaixe). No núcleo distingue-se um nucléolo proeminente, onde é já observável a segregação entre os componentes granular e fibrilar, no qual se distribuem centros fibrilares (Figs. 60, 61). Os centros fibrilares, que sofrem modificações de tamanho e estrututra consoante a actividade nucleolar, são constituídos por DNA e proteínas mas são transcripcionalmente inactivos (Risueño et al., 1982, Medina et al., 1983 a,b).

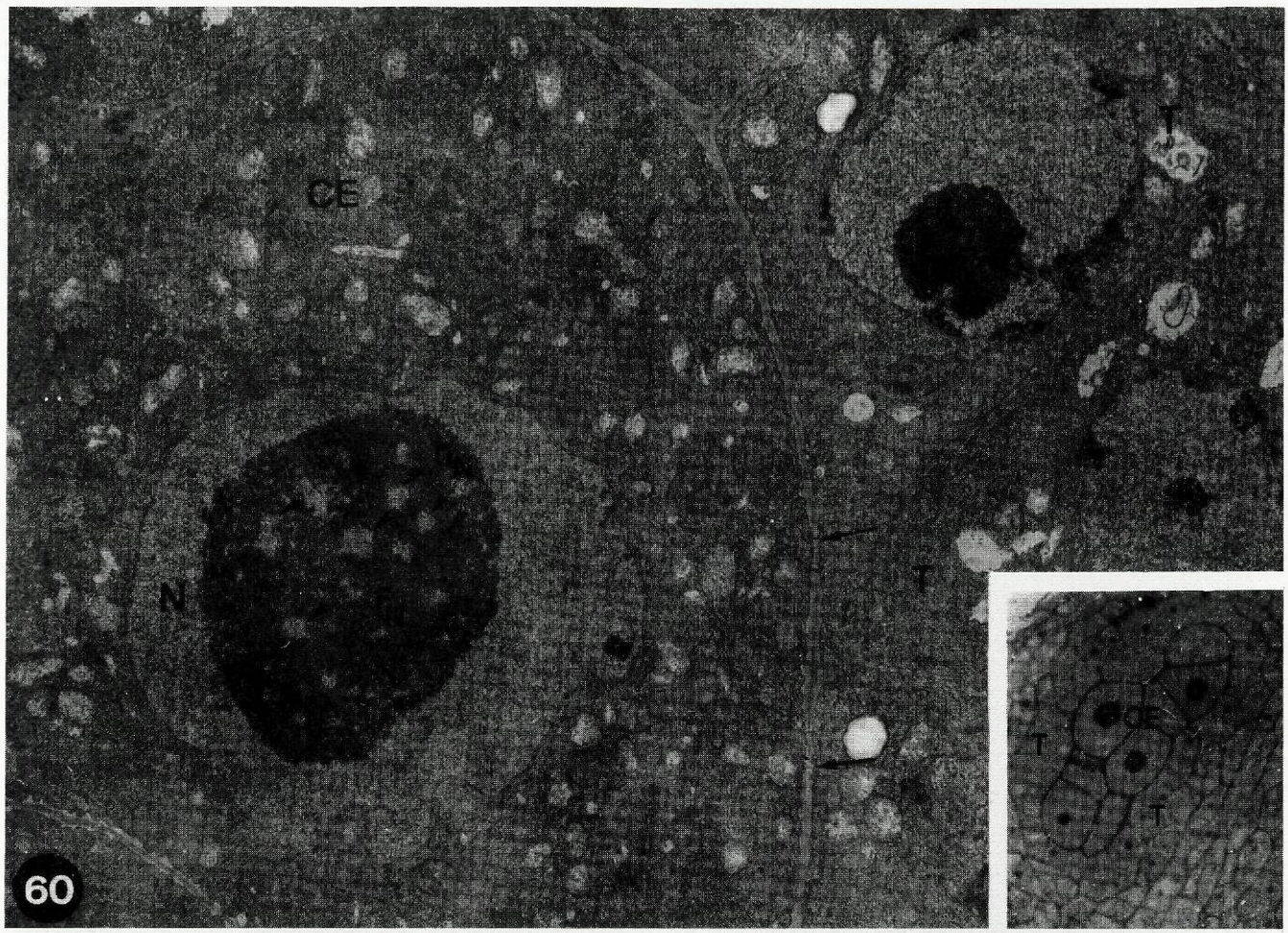
De salientar a existência de plasmodésmios, pondo em comunicação quer as células esporogénicas com as células do tapete (Fig. 60) quer as células esporogénicas entre si (Fig. 61). As mitocôndrias apresentam matriz pouco densa aos electrões e os proplastídios acumulam amido (Fig. 61,62). No citoplasma densamente povoado de ribossomas, distribuem-se alguns lípidos (Fig. 61) e, ocasionalmente, observam-se conjuntos de microfilamentos semelhantes aos descritos no núcleo das células mães do pólen de algumas Gramineæ (Bennett et al., 1979 a). Em *C. polymorpha* Duch. não observamos divisão mitótica do núcleo das células esporogénicas, o que nos leva a pensar que estas células funcionem directamente como células mães do pólen, que

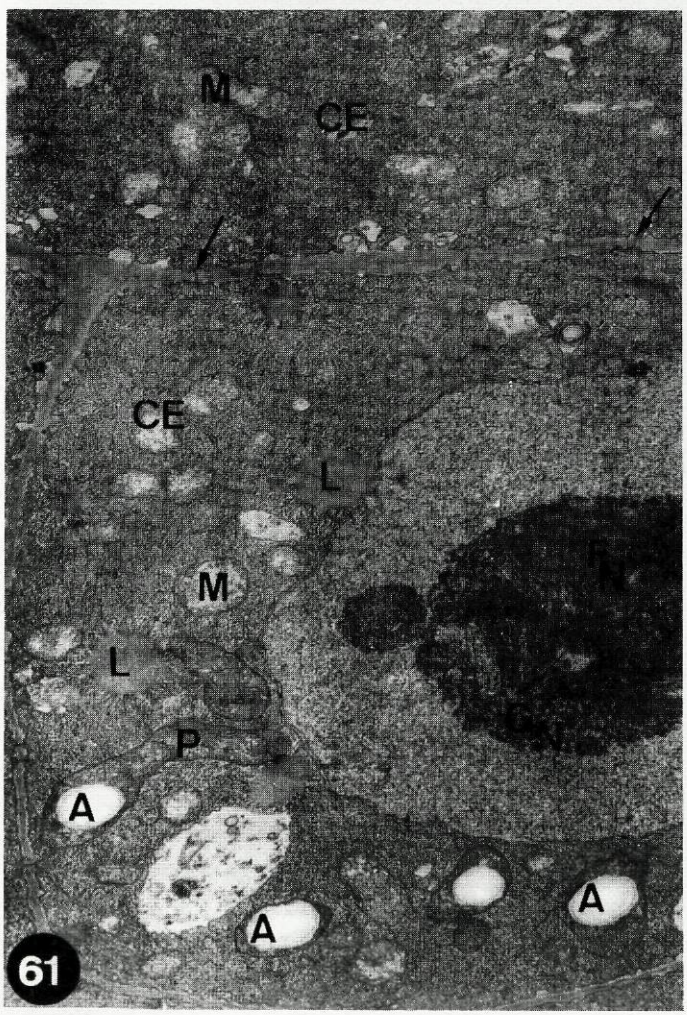
Células esporogénicas de *Cucurbita polymorpha* Duch.
(período pré-meiótico)

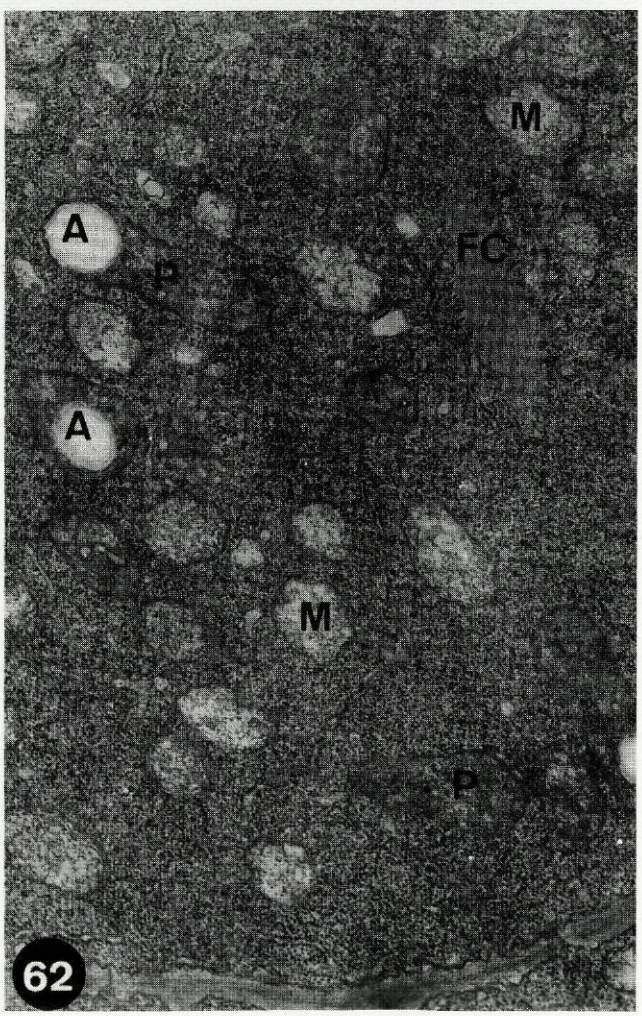
Fig. 60 - Aspecto duma célula esporogénica (CE) comunicando por plasmodésmios (setas) com as células adjacentes do tapete (T). Núcleo (N) com nucléolo onde no componente fibrilar (F_N) se distinguem centros fibrilares (pontas de setas). G_N- componente granular do nucléolo. Encaixe - corte semi-fino mostrando as células esporogénicas (CE) ligeiramente maiores que as células adjacentes do tapete (T)
Fig. 60 - 7 800X; Encaixe - 225X.

Fig. 61 - Células esporogénicas (CE) adjacentes comunicando por plasmodésmios (setas). Núcleo possuindo nucléolo que apresenta uma certa segregação dos componentes fibrilar (F_N) e granular (G_N). No citoplasma densamente povoado de ribossomas, distinguem-se lípidos (L), mitocôndrias (M) com matriz pouco densa e plastídios (P) com amido (A). 11 700X.

Fig. 62 - Parte do citoplasma duma célula esporogénica onde se distinguem mitocôndrias (M), plastídios (P) com amido (A) e um agregado de microfilamentos (FC). 20 000X.


CE
T
N
T
CE
T
T
60


M
CE
CE
L
M
L
P
A
A
A
61


M
A
P
FC
A
M
P
62

vão dividir-se por meiose.

Células mães do pólen

Leptóteno - No primeiro estádio da profase meiótica assiste-se a um aumento considerável das dimensões das células mães do pólen, em relação às células adjacentes do tapete (Fig. 63, encaixe). De salientar, a separação entre o plasmalema e a parede celular, iniciando-se assim a deposição da camada especial de calose (Fig. 63). Os plasmodésmios entre as células mães vão aumentando de tamanho (Fig. 63) enquanto que os situados entre as células polínicas e o tapete vão diminuindo de número e mantêm as suas dimensões (Fig. 64). O citoplasma mantém as características ultraestruturais da fase anterior (Fig. 63,64).

Zigóteno - De novo se observa um aumento considerável do volume das células mães do pólen (Fig. 65, encaixe). Já não se observam plasmodésmios entre estas células e as células do tapete; no entanto, os existentes entre as células polínicas vão-se transformando em canais de dimensões consideráveis . No citoplasma, nota-se já uma certa diminuição do número de ribossomas (Figs. 65,66) assim como dos plastídios com amido. Inicia-se agora uma fase activa dos dictiossomas com a produção de vesículas que parecem estar implicadas no aumento da espessura da camada de calose que se vai depositando à volta das células mães do pólen (Fig. 66), (Heslop-Harrison, 1966 b). No núcleo continua a processar-se a segregação dos componentes fibrilar e granular do nucléolo, observando-se a formação de corpos nucleolares, em associação com este componente nuclear ou livres no nucleoplasma (Fig. 67).

Paquíteno - Nesta fase, a de maior duração durante a profase meiótica, assistem-se a importantes modificações parietais e citoplasmáticas. Entre as células mães e o tapete adjacente, observa-se a parede de calose bem organizada não sendo atravessada por plasmodésmios, facto que se traduz por uma verdadeira

Células mães de *Cucurbita polymorpha* Duch.
(estádios de leptóteno e zigóteno)

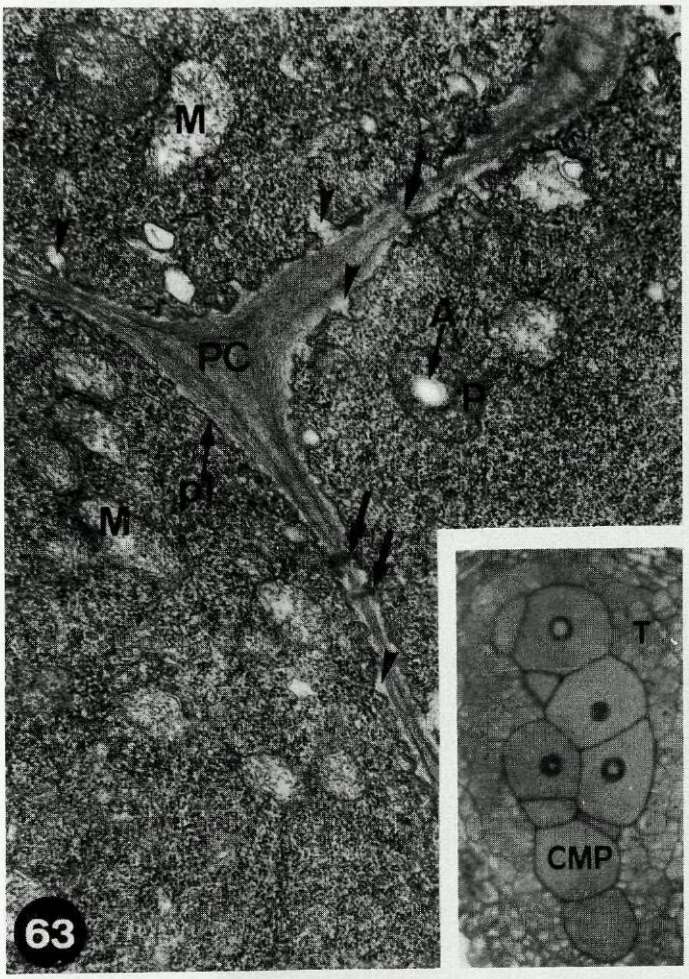
Fig. 63 - Leptóteno. Aspecto de confluência de três células mães cuja parede é atravessada por plasmodésmios (setas). De salientar, zonas de separação entre o plasmalema e a parede celular onde se inicia a deposição da calose (pontas de setas). M - mitocôndria; P - plastídio com amido (A); PC - parede celular; pl - plasmalema. Encaixe - corte semi-fino de parte do microsporângio; células mães (CMP) com dimensões superiores às do tapete (T).
Fig. 63 - 19 200X; Encaixe - 185X.

Fig. 64 - Leptóteno. Confluência de duas células mães (CMP) com uma célula do tapete (T). As paredes que separam estas células ainda são percorridas por plasmodésmios (setas). M - mitocôndria; L - lípido citoplasmático. 11 700X.

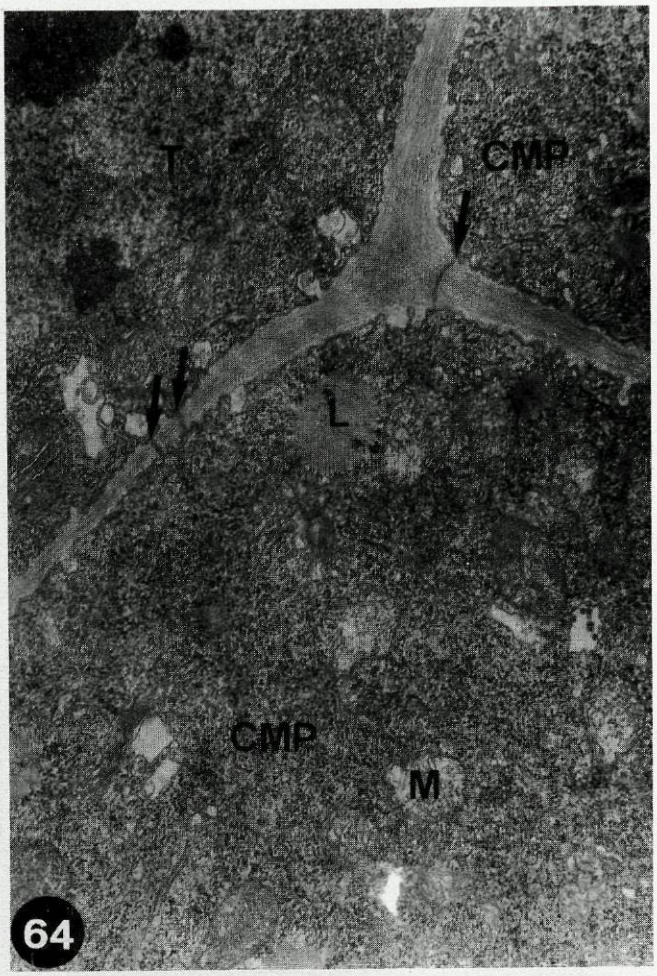
Fig. 65 - Zigóteno. Zona de separação de duas células mães. A calose (setas) continua a depositar-se entre a parede (PC) e o plasmalema (pl). P - plastídio. Encaixe - corte semi-fino das células mães do pólen (CMP) e do tapete (T).
Fig. 65 - 9 300X; Encaixe - 182,5X.

Fig. 66 - Zigóteno. Aspecto duma zona de citoplasma, da parede de celulose (PC) e da nova parede de calose em formação (C). Início da fase de actividade dos dictiossomas (D) com formação de vesículas produzidas pelas cisternas. M - mitocôndrias; P - plastídio. 16 500X.

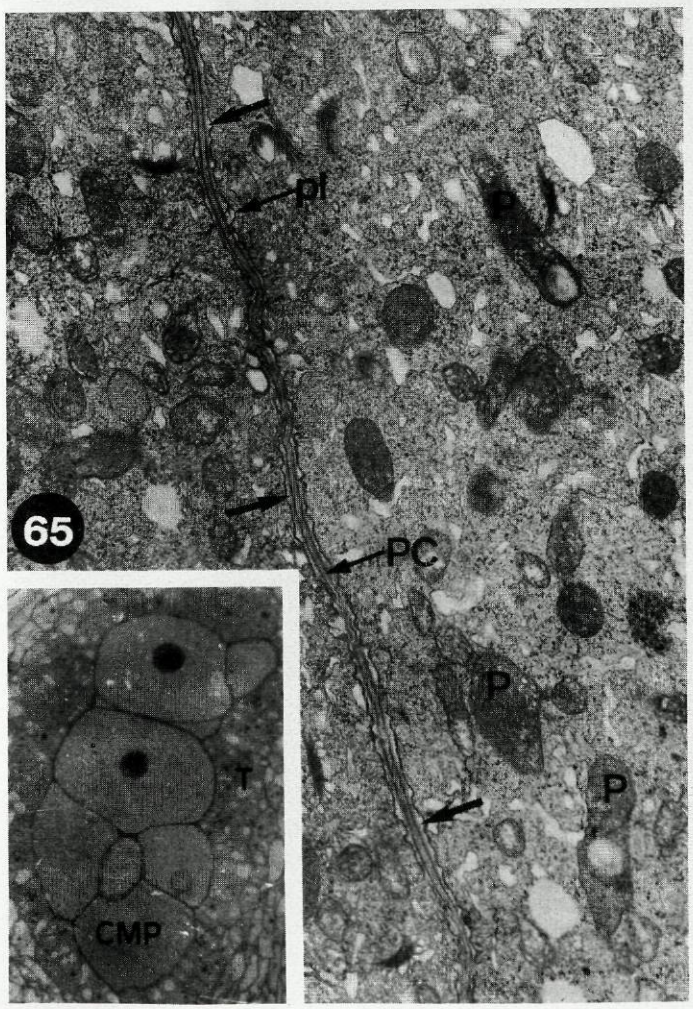
Fig. 67 - Zigóteno. Aspecto de parte do nucléolo com segregação dos componentes granular (G_N) e fibrilar (F_N). Formação de corpos nucleolares em associação com o componente fibrilar (seta) ou livres no nucleoplasma (dupla seta). 9 000X.



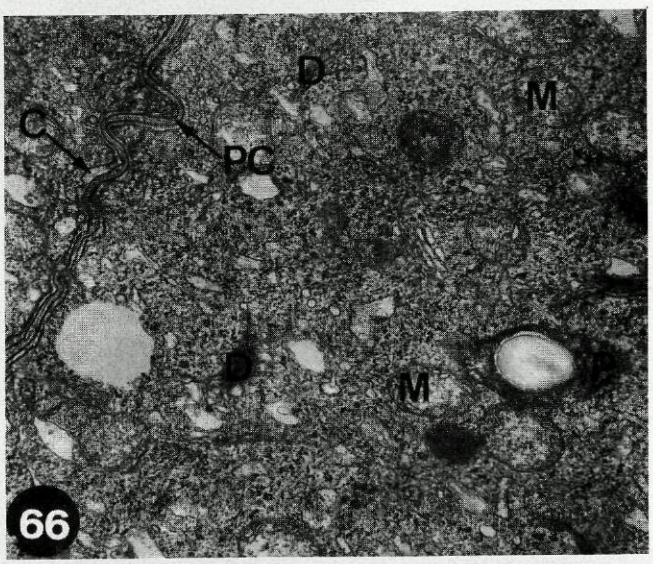
63



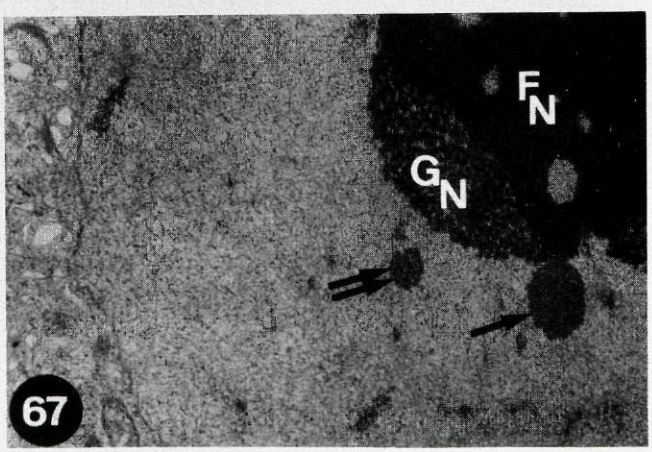
64



65



66



67

independência das células que pertencem a duas gerações diferentes (Fig. 68). Por outro lado, intensifica-se a comunicação entre as células polínicas pela formação de canais de dimensões tão elevadas que permitem mesmo a passagem de organelos duma célula para a outra (Fig. 69). Estes pontos de comunicação designados canais citomícticos foram inicialmente descritos em pormenor por Heslop-Harrison (1966 a,b). No citoplasma assiste-se a uma desdiferenciação dos organelos (Figs. 69,70,71). A população ribossómica apresenta um mínimo de densidade e no citoplasma começam a observar-se corpos com características semelhantes às do nucléolo e às formações com ele associadas e observadas durante o zigóteno (Fig. 70). A estes corpos, semelhantes ao nucléolo, surgem associados grânulos osmiofílicos com 30-50 nm de diâmetro. A desdiferenciação atinge também as mitocôndrias e os plastídios. Nas mitocôndrias assiste-se a uma diminuição das cristas ficando, no fim do paquíteno, o sistema membranar destes organelos quase que reduzido às duas membranas do invólucro (Fig. 69, encaixe) Também nos plastídios (Figs. 69,70) se reduz fortemente o sistema lamelar, surgindo alguns deles em forma de taça com aprisionamento de áreas citoplasmáticas (Fig. 69, encaixe). Nesta fase, já não se deposita amido no estroma destes organelos. De notar também o aparecimento de pequenos vacúolos que povoam o citoplasma (Figs. 70, 71). O invólucro nuclear apresenta elevado número de poros, observando-se no citoplasma numerosas cópias de fragmentos desta estrutura que constituem as "annulate lamellæ" (Kessel, 1968; Wischnitzer, 1970) (Fig. 71).

Diplóteno e Diacinese - Estas últimas fases da profase meiótica não diferem grandemente, a não ser no grau de condensação dos cromossomas. A parede de calose perfeitamente individualizada rodeia as células mães do pólen (Fig. 72). A parede junto das células do tapete apresenta sinais de degradação o que possivelmente facilita a separação das células polínicas da parede da antera (Fig. 73). Os canais citomícticos entre as células mães do pólen vão sendo obliterados por calose (Fig. 74), situação mais comum durante a diacinese. No citoplasma começa, ainda que

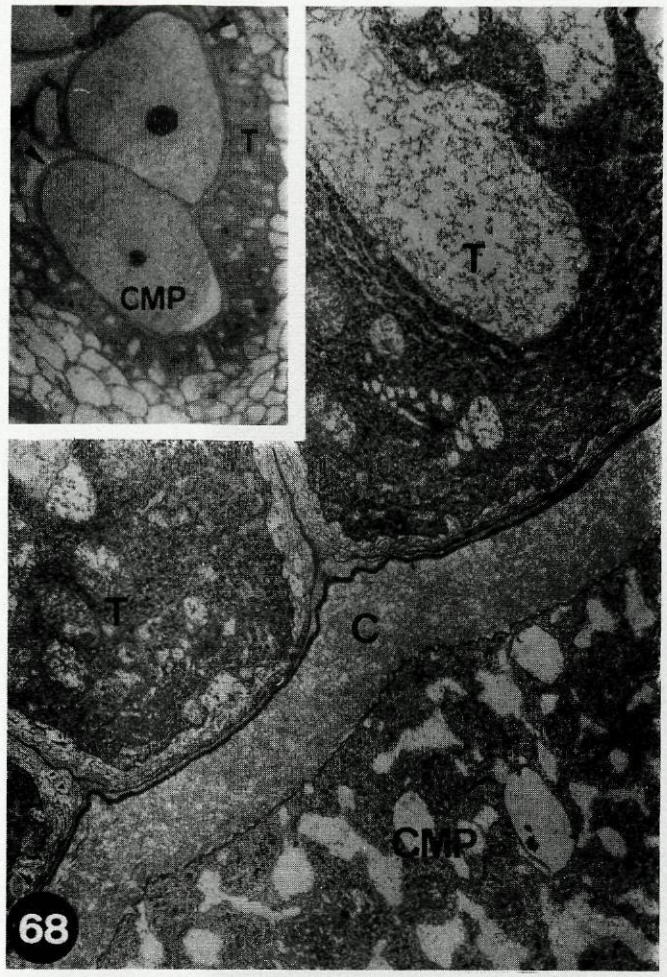
Células mães de *Cucurbita polymorpha* Duch.
(estádio de paquíteno)

Fig. 68 - Parede de calose (C) entre as células mães (CMP) e o tapete (T) completamente individualizada. Encaixe - células mães do pólen (CMP) em paquíteno distinguindo-se perfeitamente a parede de calose (ponta de seta). T - tapete.
Fig. 68 - 17 000X; Encaixe - 180X

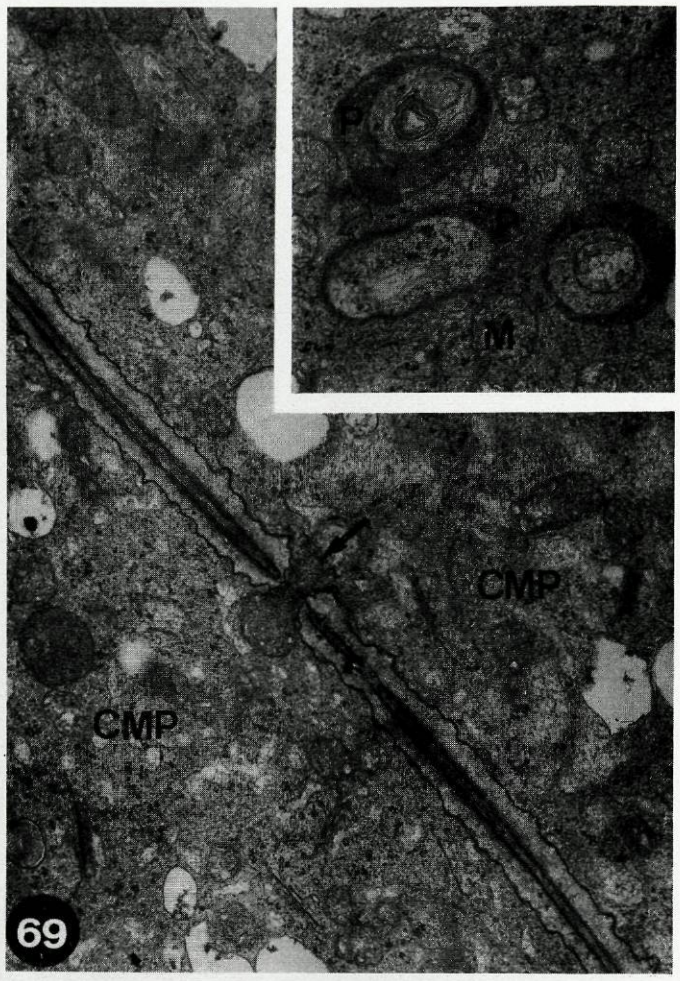
Fig. 69 - Zona de separação entre duas células mães do pólen (CMP). A parede apresenta um canal citomíctico pelo qual atravessa uma mitocôndria (seta). Encaixe - plastídios em forma de taça (P) e mitocôndrias (M) com reduzido número de cristas.
Fig. 69 - 15 600X; Encaixe - 17 600X.

Fig. 70 - Aspecto do citoplasma com reduzido número de ribossomas e corpos nucleolares (setas). Plastídios (P) e mitocôndrias (M) com reduzido sistema membranar. V - vacúolos. 12 000X.

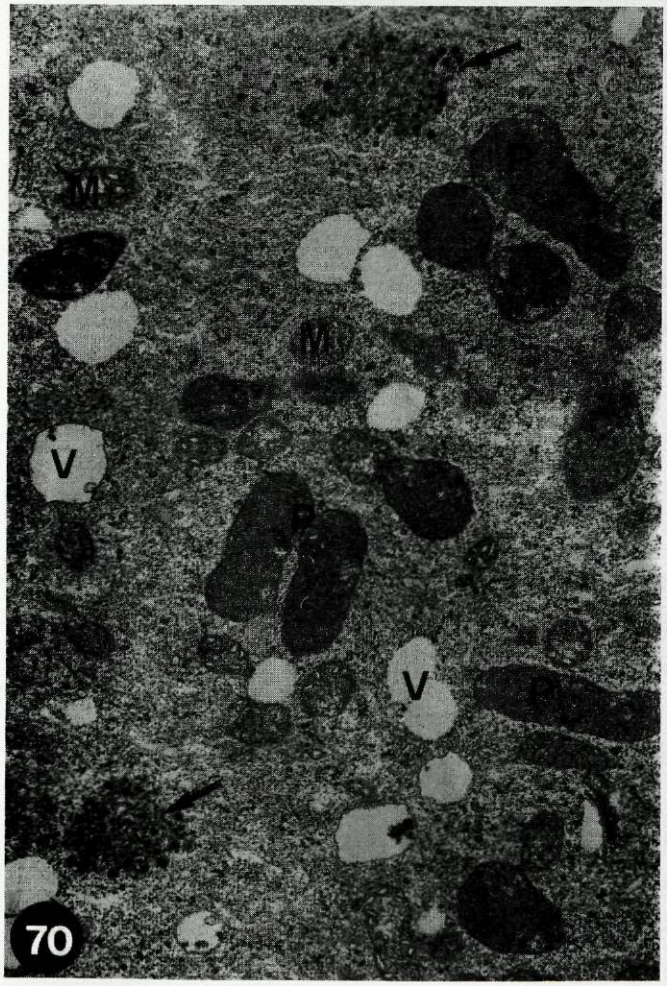
Fig. 71 - Invólucro nuclear (IN) com poros (pontas de setas). No citoplasma observam-se pequenos vacúolos (V) e elementos de "annulate lamellæ" (AL). 12 000X.



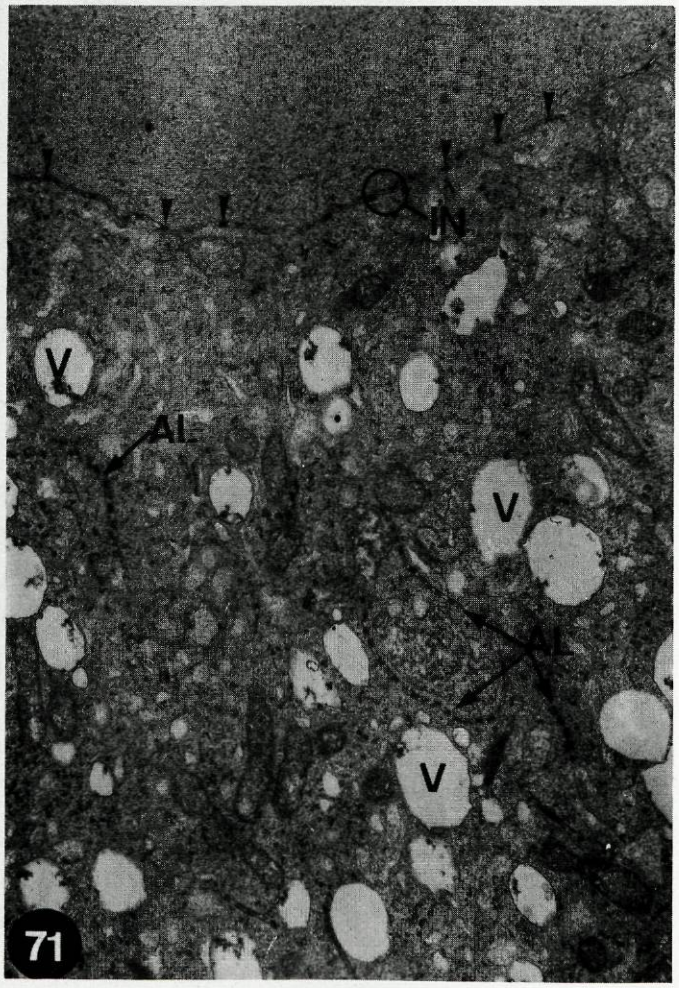
68



69



70



71

Células mães de *Cucurbita polymorpha* Duch.
(estádios de diplóteno e diacinese)

Fig. 72 - Corte semi-fino mostrando as células mães completamente rodeadas pela parede de calose (C). T - tapete; 170X.

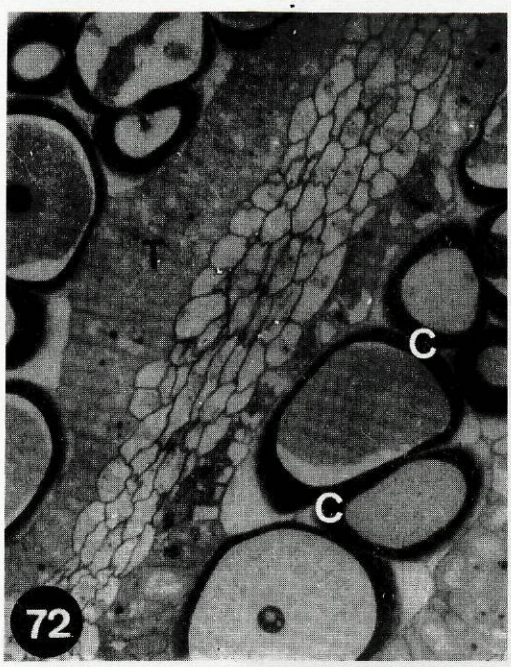
Fig. 73 - A parede de calose (C) apresenta sinais de degradação junto das células do tapete (T), o que irá possibilitar a separação e independência das células mães do pólen (CMP). RE - retículo endoplasmático. 11 400X.

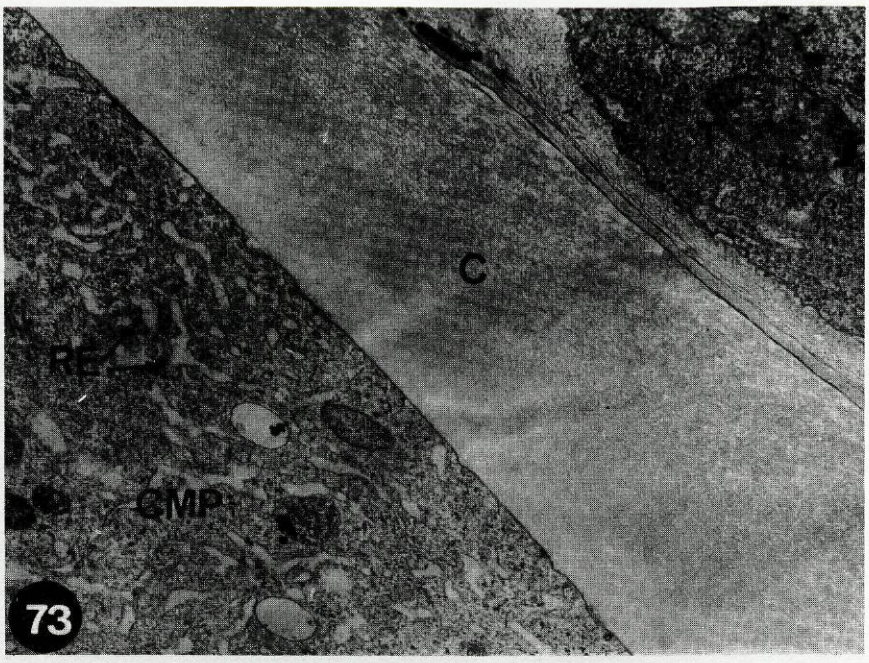
Fig. 74 - Parede de separação entre duas células polínicas, observando-se obliterado por calose um canal citomíctico (entre setas). 19 000X.

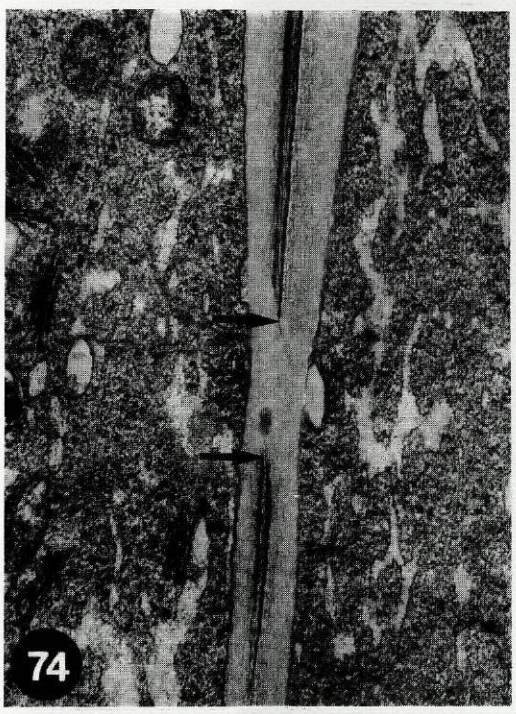
Fig. 75 - Aspecto do citoplasma com corpos com estrutura semelhante ao nucléolo (setas), plastídios (P) e mitocôndrias (M) em rediferenciação . V - vacúolos; RE - retículo endoplasmático. 21 500X.

Fig. 76 - Plastídios (P) em cujo estroma já se observam algumas lamelas estromáticas. M - mitocôndrias; V -vacúolo. 14 400X.

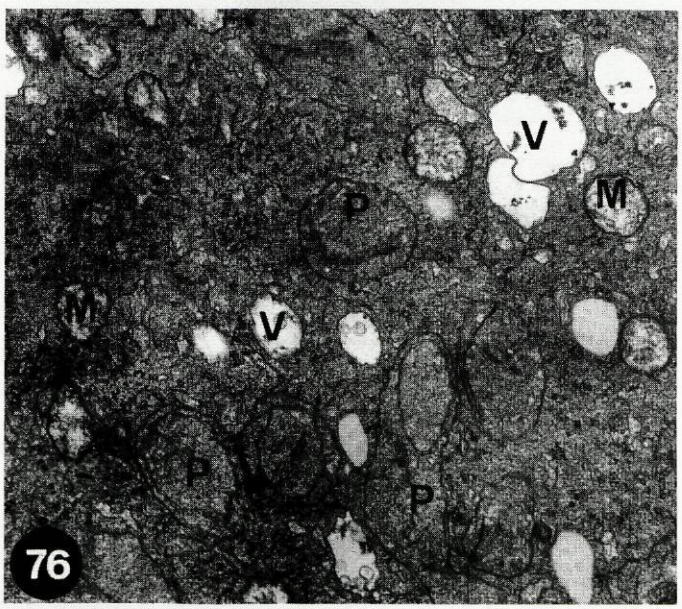
Fig. 77 - Porção do citoplasma com "annulate lamellæ" (AL), organelos rodeados por uma membrana e contendo material granular (seta) e elementos de retículo endoplasmático (RE). P - plastidio.19 000X.

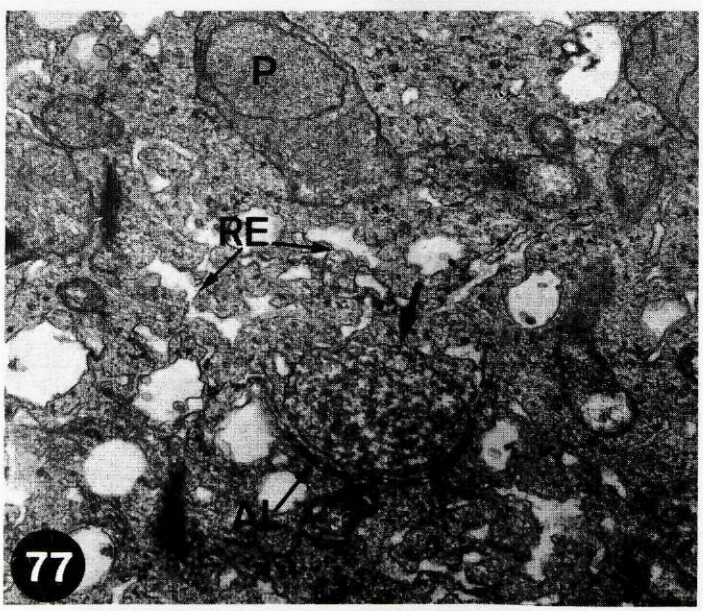

C
C
72


C
RE
CMP
73


74


M
RE
V
P
75


V
M
P
M
V
P
P
76


P
RE
77

lentamente, a operar-se um processo de rediferenciação. Os primeiros organelos a acusarem esse sintoma são os plastídios onde se inicia a reorganização do sistema lamelar (Figs. 75,76). Este processo inicia-se mais tardiamente nas mitocôndrias. Continuam, a povoar o citoplasma, os corpos de aspecto nucleolar (Fig. 75), os elementos da "annulate lamellæ" (Fig. 77) e estruturas limitadas por uma membrana, contendo material granular, que não foi possível identificar (Fig. 77). Durante o diplóteno e a diacinese aumentam, no citoplasma, os elementos de retículo endoplasmático (Figs. 73,75,77) que, de início, são predominantemente do tipo liso.

Após a profase meiótica, o material nuclear é dividido pelas células filhas e no final da segunda divisão assiste-se à formação da parede que divide o citoplasma destas quatro células haplóides. Durante todo este processo,é notória a proliferação de elementos de retículo endoplasmático, de tipo predominantemente liso (Fig. 78). Os dictiossomas produzem vesículas que foram implicadas no transporte dos constituintes das novas paredes das células polínicas (Echlin & Godwin, 1968 b; Willemse, 1971 d; Nakamura & Miki-Hirosige, 1982). Durante a formação do fragmoplasto (Fig. 79), numerosas vesículas, provavelmente derivadas da actividade do Golgi (Willemse, 1971 d; Ryan, 1984) associam-se com microtúbulos (Willemse, 1971 d; Wolniak, 1976, Ryan, 1984). Posteriormente, assiste-se à formação das novas paredes de calose (Fig. 80). É provável que as vesículas de maiores dimensões que agora se observam, resultem da coalescência das vesículas associadas aos microtúbulos. Inicia-se então a deposição de calose originando-se assim os quatro micrósporos haplóides. De salientar, junto das novas paredes em formação, a deposição de elementos de retículo endoplasmático que estarão, porventura, envolvidos de algum modo neste processo ontogénico.

Durante esta fase final da meiose, acentua-se a rediferenciação dos organelos citoplasmáticos (Fig. 81). Nos plastídios, intensifica-se a formação das lamelas estromáticas e as mitocôndrias apresentam matriz electronicamente densa e um sistema de cristas mais ou menos desenvolvido. Assiste-se também ao

Células mães do pólen de *Cucurbita polymorpha* Duch.
(fase final da divisão meiótica)

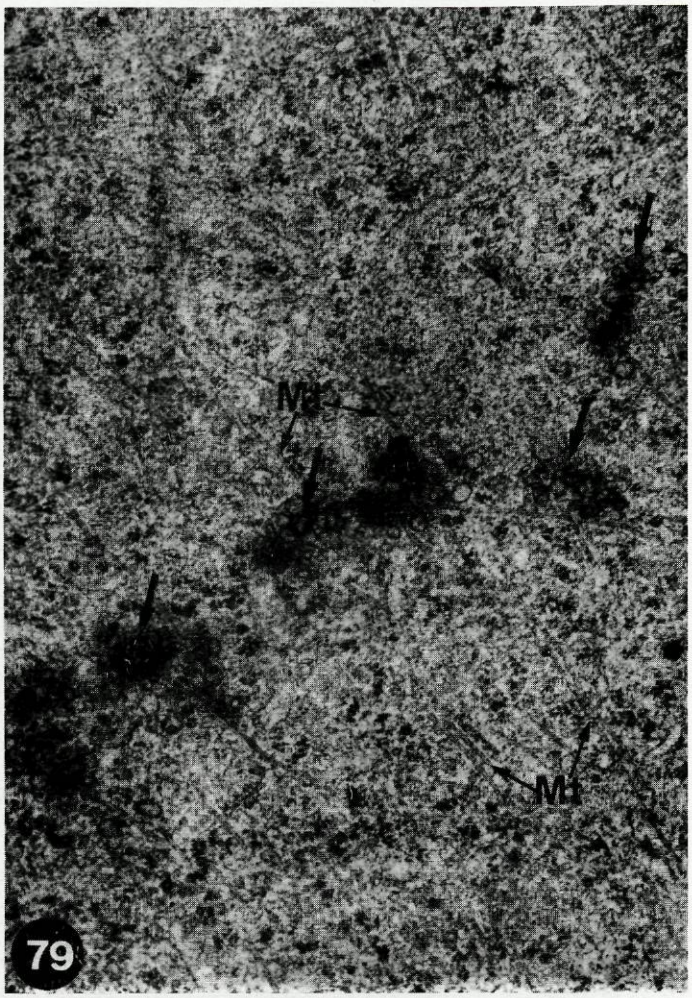
Fig. 78 - Aspecto do citoplasma periférico das células polínicas onde abunda o retículo endoplasmático (RE) predominantemente do tipo liso. Os dictiossomas produzem vesículas (pontas de setas). Nesta fase são também abundantes os corpos nucleolares (dupla seta). 26 000X.

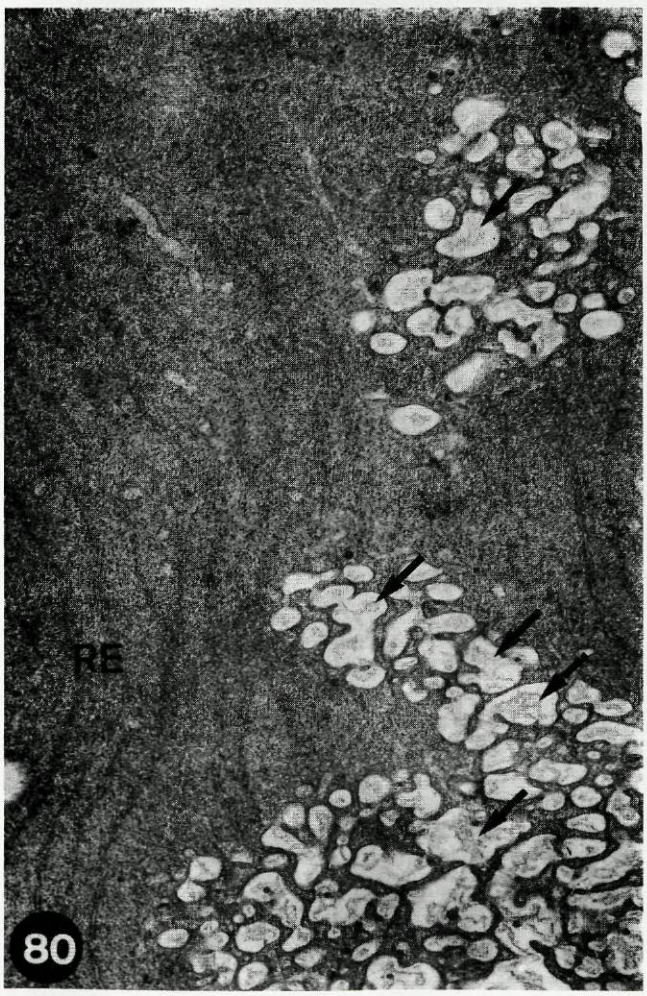
Fig. 79 - Formação do fragmoplasto, distinguindo-se microtúbulos (Mt) aos quais se associam numerosas vesículas (setas). 28 600X.

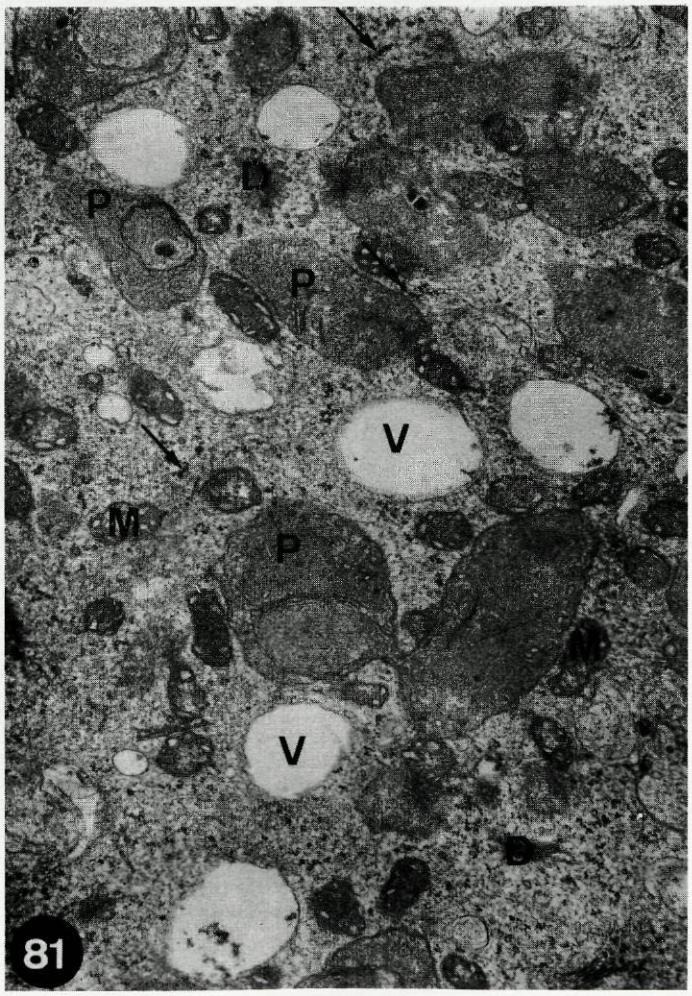
Fig. 80 - Início da formação das novas paredes de calose, observando-se material de densidade electrónica semelhante à da calose (setas) no interior de vesículas. RE - retículo endoplasmático. 15 000X.

Fig. 81 - Os organelos citoplasmáticos exibem um certo grau de rediferenciação. Nos plastídios (P) distinguem-se já lamelas estromáticas e as mitocôndrias (M) apresentam matriz densa e cristas. No citoplasma dispoem-se ribossomas livres e outros agregados em polissomas (setas). D - dictiossoma; V -vacúolo. 15 200X.


RE
78


M
M
79


RE
80


P
D
P
V
M
P
V
81

reaparecimento dos ribossomas, alguns livres e outros agregados em polissomas semelhantes aos já descritos nas células mães do pólen de *Ipomoea purpurea* Lamk. (Echlin, 1965). Ao mesmo tempo que se dá a repopulação ribossómica, observam-se também numerosos corpos nucleolares (Fig. 78) que apareceram no citoplasma dos meiócitos desde a profase.

2.2 FASE INICIAL DA FORMAÇÃO DA PAREDE

Todos os processos de diferenciação e actividade celulares, que descrevemos durante a meiose das células mães do grão de pólen, culminam com a formação de quatro micrósporos haplóides (Fig. 82, encaixe). Cada micrósporo é rodeado por uma parede de calose e, por sua vez, os quatro micrósporos que constituem a tétrada são também englobados por outra parede calósica comum, que representa a camada original que envolvia os meiócitos (Waterkeyn, 1962, 1964). Em *Cucurbita polymorpha* Duch., a espessura da parede de calose que rodeia as tétradas é de cerca de 2µm e, exteriormente, distinguem-se ainda os restos da parede celulósica dos microsporócitos, as quais apresentam alguns pontos de ruptura devido ao crescimento das tétradas.

Nesta fase, quando os micrósporos estão reunidos em tétrada, inicia-se a formação da parede do grão de pólen ou esporoderme, constituída essencialmente por esporopolenina e que se deposita entre a calose e o plasmalema. Na tétrada jovem, a membrana celular é contígua com a parede de calose observando-se, em certas zonas, a aposição de elementos de retículo endoplasmático rugoso (Fig. 82). Esta situação foi relacionada, com os locais onde se originarão os poros ou aberturas da parede do grão de pólen (Heslop-Harrison, 1963 a). No entanto, o plasmalema começa a sofrer convoluções originando-se assim uma zona de separação entre a membrana celular e a parede de calose, a qual é menos acentuada nas zonas de aposição do retículo endoplasmático (Fig. 83). Esta zona de separação vai-se acentuando, verificando-se nesse local, electronicamente transparente, a deposição de uma rede de microfibrilas (Fig. 84). Esta camada que servirá de matriz para a

futura parede do grão de pólen foi designada "primexina" (Heslop-Harrison, 1963 a,b), tendo outros autores (Rowley, 1971, 1973, 1976; Rowley & Dahl, 1977) preferido a designação de "glicocálice". Nesta fase de desenvolvimento, observam-se no citoplasma numerosos dictiossomas produzindo activamente vesículas , algumas das quais contendo material com determinada densidade electrónica (Figs. 85, 86). Estas vesículas parecem deslocar-se para a periferia da célula, sendo algumas observadas exteriormente ao plasmalema, junto da primexina (Fig. 87).

Nesta fase inicial do desenvolvimento da tétrada continua a operar-se, no citoplasma, a repopulação ribossómica. Os novos ribossomas aparecem isolados ou com a forma de polissomas, com configuração em espiral ou helicoidal (Fig. 88, encaixes). São evidentes as transformações operadas nos plastídios (Fig. 88). Estes organelos, com dimensões superiores aos dos estádios precedentes, apresentam estroma homogéneo, com algumas lamelas e alguns grãos de amido embora de dimensões reduzidas. As mitocôndrias distribuídas pelo citoplasma (Fig. 89), com formas esféricas ou de bastonete, apresentam matriz densa e sistema de cristas bem desenvolvido e um pouco dilatadas. De salientar, os corpos de origem nucleolar, semelhantes aos observados no citoplasma dos meiócitos, observando-se em alguns casos associação destas estruturas com os ribossomas citoplasmáticos (Fig. 89). Este tipo de associação tinha já sido observado nos meiócitos de outras espécies (Dickinson, 1981 b).

Na sequência deste processo ontogénico que vai originar a parede do pólen, surgem então regularmente dispostos na matriz de primexina os primeiros depósitos de material esporopolenínico. Para a descrição dos vários estratos da parede do grão de pólen de *Cucurbita polymorpha* Duch. utilizaremos preferencialmente a terminologia de Erdtman (1966). Assim, regularmente espaçados, depositam-se na primexina, atravessando-a radialmente desde o plasmalema em direcção à calose, elementos colunares de material electronicamente denso, que constituem as pro-báculas (Fig. 90). Estas formações vão posteriormente aumentando de tamanho por acréscimo de novo material (designando-se então por báculas) não tendo, no

Tétrada de *Cucurbita polymorpha* Duch.
Fases iniciais da deposição da parede

Fig. 82 - Aspecto do citoplasma periférico, observando-se aposição do retículo endoplasmático rugoso (RER) contra o plasmalema (pl) contíguo com a parede de calose (C). Encaixe - corte semi-fino; indicados por pontas de setas os restos da parede celulósica inicial rodeando as tétradas.
Fig. 82 - 19 000X; Encaixe - 275X.

Fig. 83 - Início da separação entre a calose (C) e o plasmalema, menos acentuada nas zonas de aposição do retículo endoplasmático (setas). 24 000X.

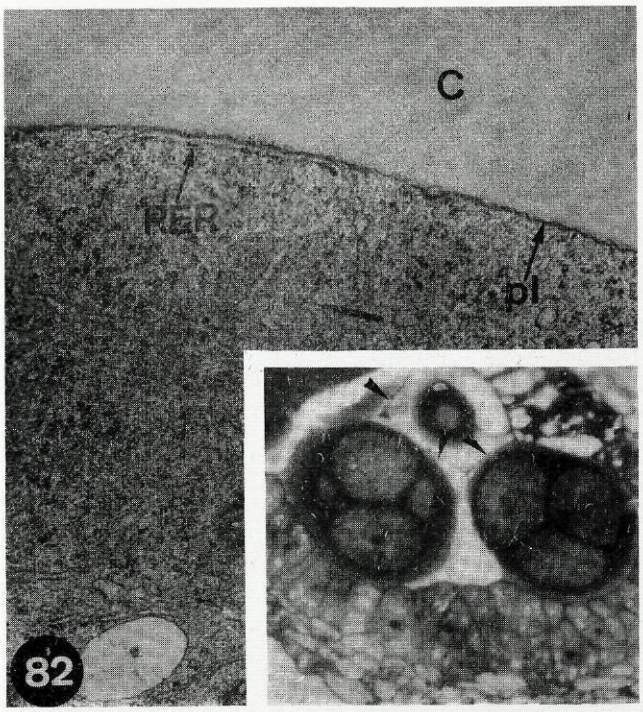
Fig. 84 - Primexina (PE) entre a calose (C) e o plasmalema (pl). 14 000X.

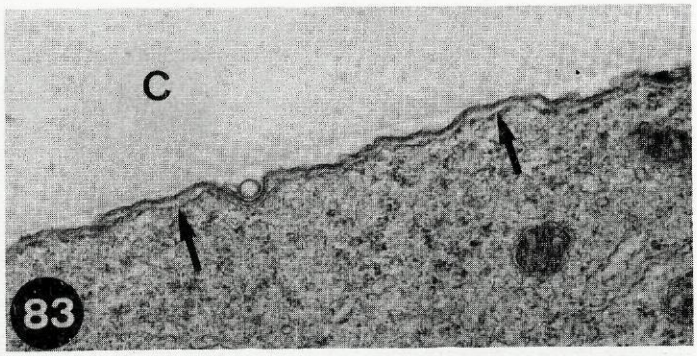
Figs. 85,86 - Dictiossomas rodeados por numerosas vesículas, algumas das quais contendo material electronicamente denso, com aspecto fibrilar (setas).
Fig. 85 - 17 500X; Fig. 86 - 26 500X.

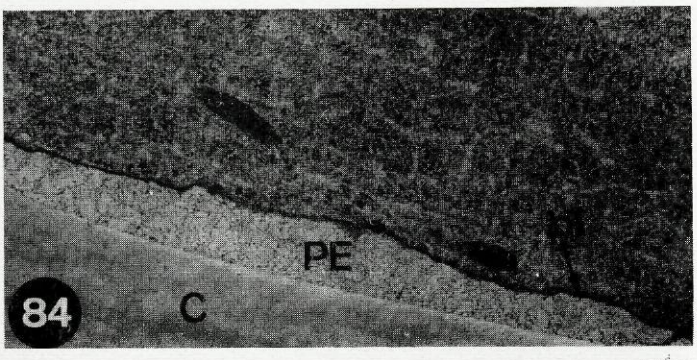
Fig. 87 - Algumas vesículas (setas) encontram-se exteriormente ao plasmalema, junto da primexina (PE). 27 500X.

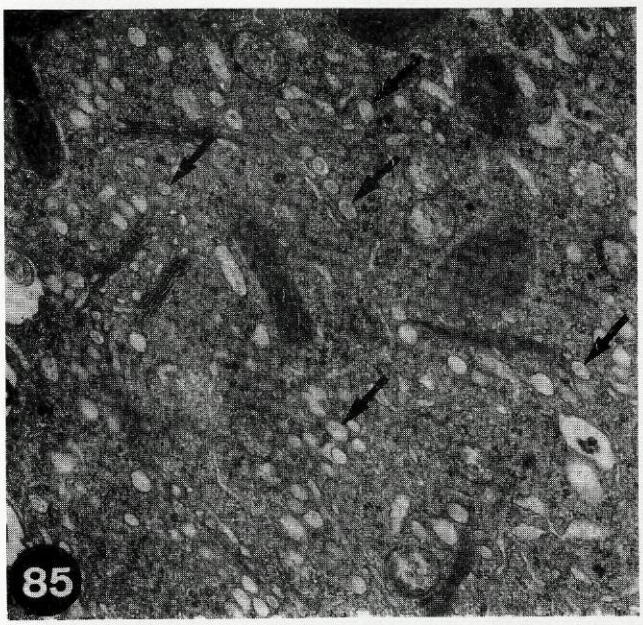
Fig. 88 - Plastídios (P) com algumas lamelas estromáticas e grãos de amido (A). Encaixe a - polissoma com configuração helicoidal (seta); Encaixe b - polissoma com configuração em espiral (seta).
Fig. 88 - 11 550X; Encaixe a - 49 500X; Encaixe b - 52 500X.

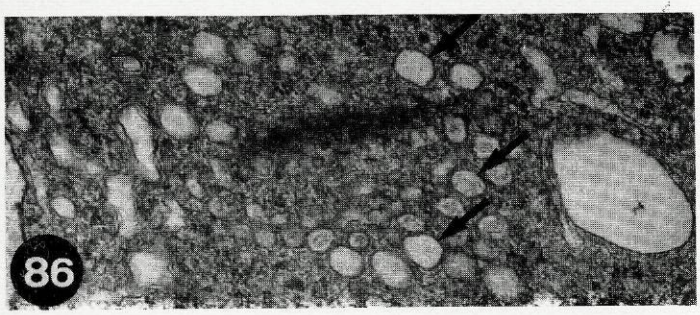
Fig. 89 - No citoplasma das tétradas jovens distinguem-se, além dos plastídios (P), mitocôndrias com matriz e cristas dilatadas (M), alguns elementos de retículo endoplasmático (RE) e corpos de origem nucleolar mostrando continuidade com ribossomas citopasmáticos (seta). 17 500X

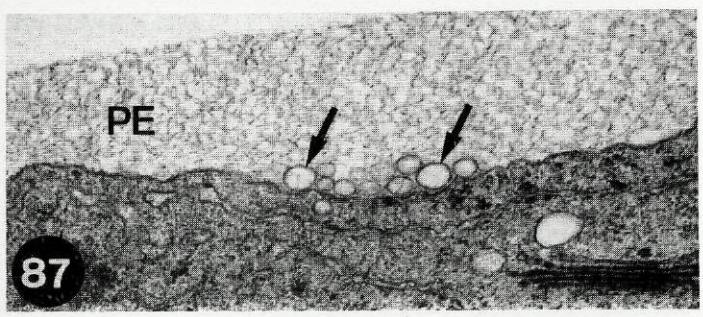

C
RER
pl
82

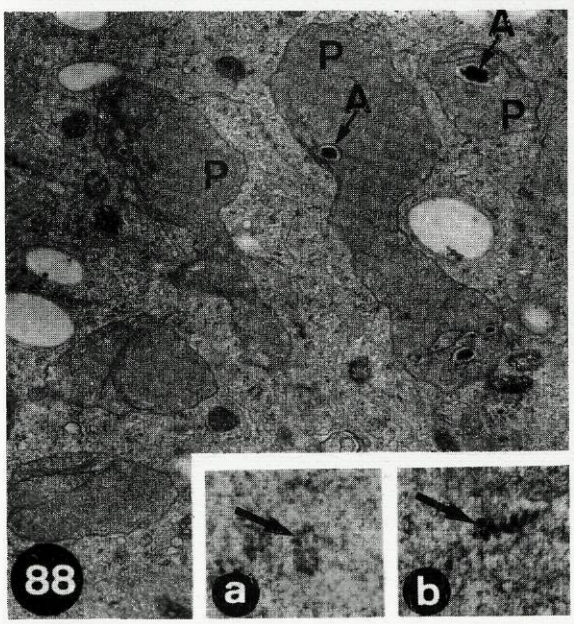

C
83


PE
C
84


85

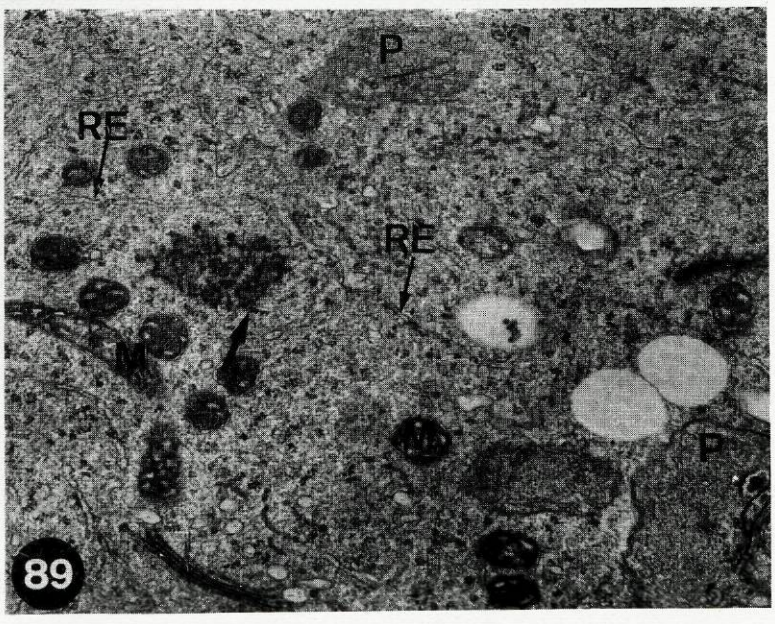

86


PE
87


P
A
A
P
P
88

a

b


P
RE
RE
M
P
89

entanto, sido observada qualquer relação entre a deposição das báculas e organelos citoplasmáticos.

Determinadas zonas do plasmalema, situado na base das báculas, apresentam dobras (Fig. 91) e na superfície da membrana deposita-se, posteriormente, material esporopolenínico com densidade electrónica semelhante à das báculas (Fig. 92). Estas membranas sobre as quais se deposita a esporopolenina foram inicialmente descritas por Rowley & Sowthworth (1967) e Dickinson & Heslop-Harrison (1968) e designadas por lamelas, "white lines" ou "tapes". Esta deposição vai-se intensificando de modo que surge uma nova camada, de textura homogénea, unindo as báculas pela base e que se denomina camada basal ou nexina 1 (Fig. 93). A reacção citoquímica característica dos polissacarídeos mostrou resultados diferentes na parede em formação. A primexina revelou-se Thiéry-positiva enquanto que a parede de calose e os estratos esporopolenínicos em desenvolvimento não apresentaram marcação. De notar que, nesta Cucurbitaceæ, não há a formação dum tecto ligando as báculas na extremidade superior, as quais permanecem sempre livres e apenas unidas na base, pela camada de nexina (Figs. 93, 94).

Em determinados locais da periferia do citoplasma do micrósporo, observam-se depressões acentuadas do plasmalema que constituem os locais dos futuros poros da parede celular (Fig. 94). Curioso referir que em *Cucurbita polymorpha* Duch. também na região dos poros se deposita primexina provavelmente relacionada com a presença, nestas regiões, de báculas semelhantes às que se depositam nas regiões entre as aberturas (Fig. 94). Nesta altura já não se observam os elementos de retículo endoplasmático rugoso que inicialmente se dispunham contra o plasmalema, parecendo referenciar o local das aberturas.

A camada de nexina 1 é interrompida na região dos poros (Figs. 94,95); no entanto, em toda a parede,tanto nos poros como na região entre eles, se distinguem báculas com dois tamanhos distintos (Figs. 92,94,95) que, após evolução, irão originar os dois tipos de espinhos da parede do pólen.

Nesta fase de evolução assiste-se já à dissolução da parede de calose, a qual é

atravessada por numerosos canais (Figs. 94,95) já descritos para outra espécie de *Cucurbita* e então designados "canais de corrosão" (Eschrich, 1964) e posteriormente referidos noutras espécies (Biddle, 1979).

O aspecto ultraestrutural do citoplasma na fase final do desenvolvimento da tétrada não é, significativamente, diferente da fase inicial. As mitocôndrias surgem novamente com matriz densa e cristas bem desenvolvidas (Figs. 96,97) e nos plastídios intensifica-se o desenvolvimento do sistema membranar e a formação dos grãos de amido (Figs. 96,97). De referir, o núcleo com nucleolo proeminente no qual se observa a segregação dos componentes granular e fibrilar (Fig. 97). O invólucro nuclear é atravessado por numerosos poros aos quais está associado um material electronicamente denso, apresentando assim um aspecto semelhante aos fragmentos de "annulate lamellæ", dispersos no citoplasma (Fig. 97). Os corpos de origem nucleolar continuam a povoar o citoplasma, o qual vai readquirindo a sua população ribossómica (Fig. 98). Os dictiossomas (Fig. 99) atravessam agora uma fase de pouca actividade, constituídos por cisternas empilhadas e reduzido número de vesículas.

2.3 FASE FINAL DA FORMAÇÃO DA PAREDE

A parede do grão de pólen continua o seu processo de formação após a desorganização das tétradas, por dissolução da calose que as envolvia, libertando-se assim as células haplóides ou micrósporos uninucleados.

No início da diferenciação dos micrósporos (Fig. 100) estes aumentam consideravelmente de volume, apresentando 80-90 µm de diâmetro máximo, e adquirem a forma esferoidal. O núcleo ocupa uma posição central no citoplasma, no qual se distribuem, numerosos e pequenos vacúolos. Mesmo a nível de microscopia óptica é possível distinguir a parede esporopolenínica, distribuindo-se à superfície alguns espinhos (báculas) que cobrem também a zona dos poros. De salientar uma vez mais, que as células do tapete (Fig. 100) mantêm a sua posição na periferia do lóculo da antera e embora já não possuam parede celular, mantêm ainda integridade citoplasmática.

Fases iniciais da deposição da parede (cont.)

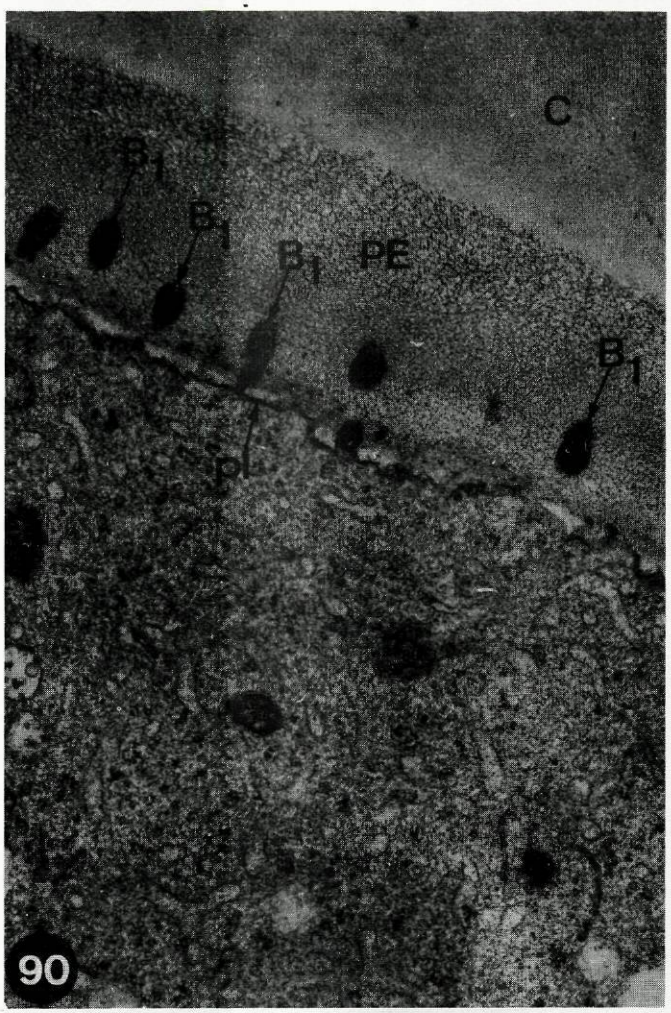
Fig. 90 - Na matriz primexínica (PE) dispõem-se radialmente as probáculas (B_1) desde o plasmalema (pl) em direcção à parede de calose (C). 23 200 X.

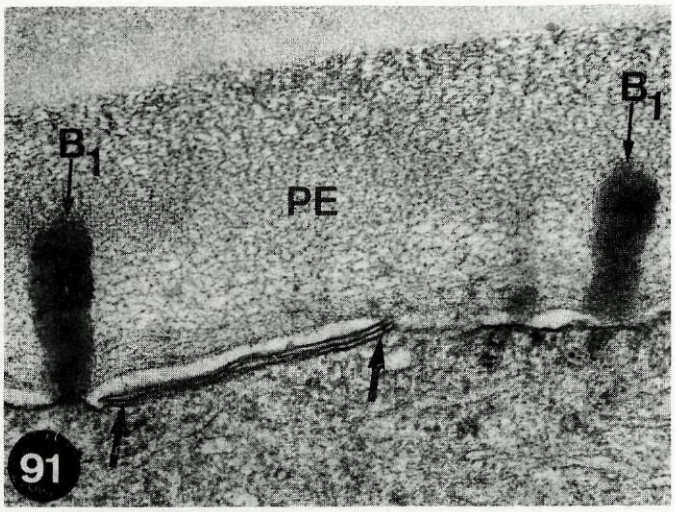
Fig. 91 - As báculas (B_1) aumentam de tamanho e em determinadas zonas do plasmalema observa-se a formação de dobras desta membrana (setas). PE - primexina. 39 600X.

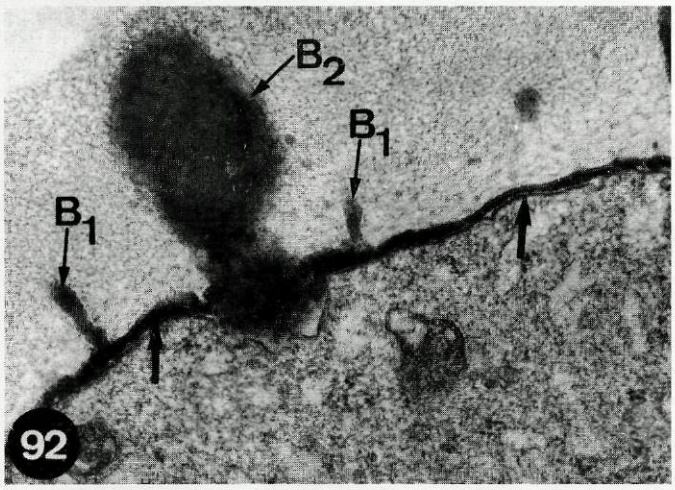
Fig. 92 - Sobre as membranas originadas a partir do plasmalema deposita-se material esporopolenínico (setas) semelhante ao das báculas que apresentam dois tamanhos distintos (B_1, B_2). 21 200X.

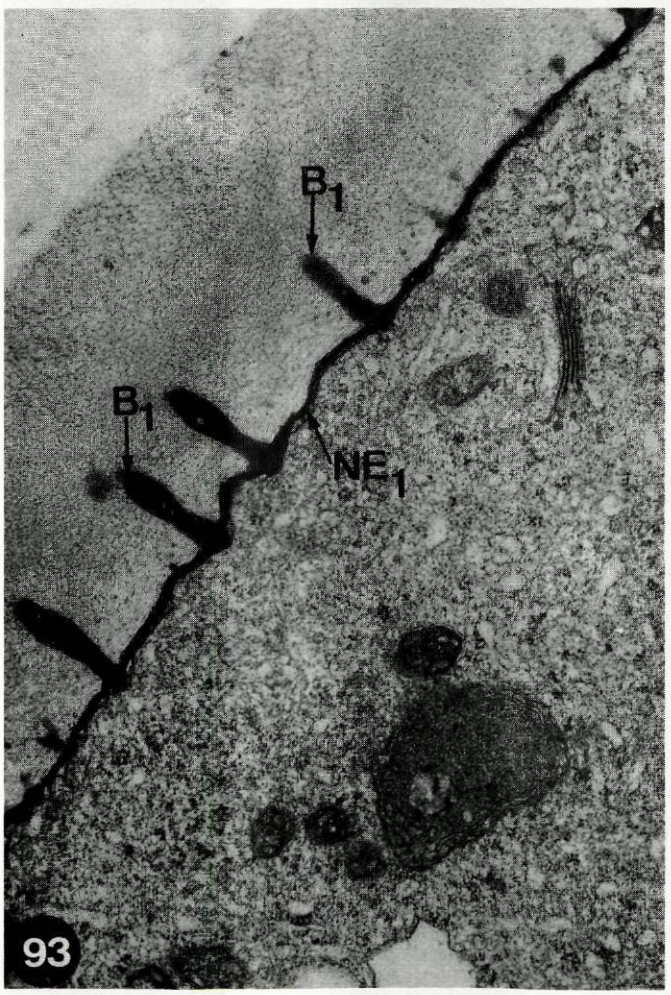
Fig. 93 - A parede do grão de pólen é inicialmente constituída por báculas (B_1) livres, ligadas na base por uma camada contínua designada por nexina 1 (NE_1). 23 000X.

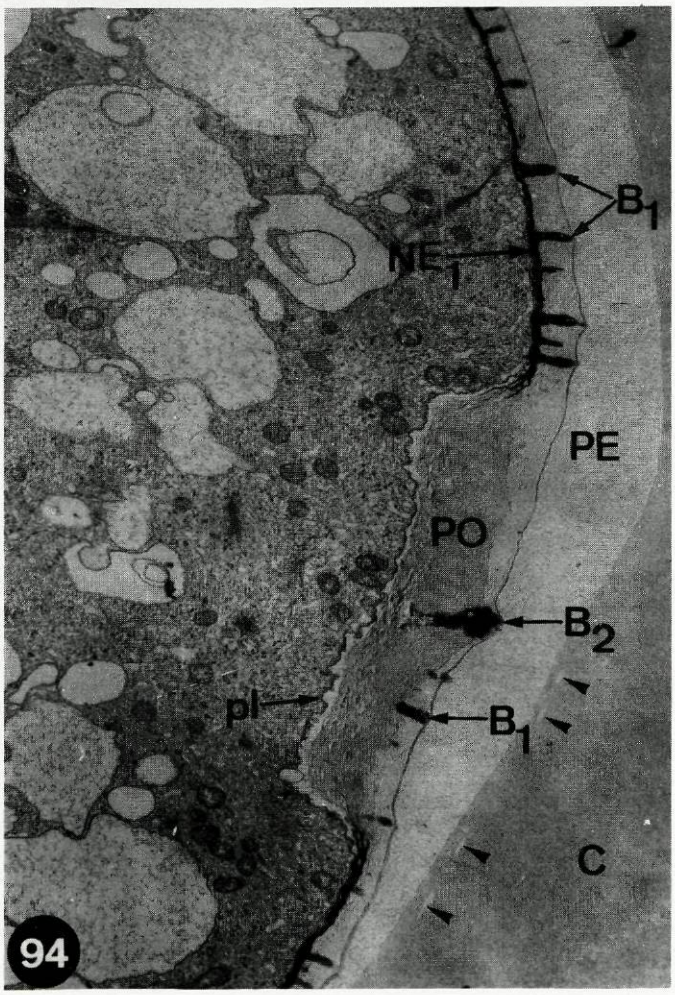
Fig. 94 - Em determinados locais da periferia do micrósporo, o plasmalema (pl) apresenta depressões que determinam o local dos poros (PO). Nas zonas dos poros e nas regiões entre eles depositam-se báculas (B_1,B_2) sobre a camada de nexina 1 (NE_1) a qual é interrompida ao nível dos poros. A calose (C) começa a sofrer dissolução, sendo percorrida por canais de corrosão (pontas de setas). PE - primexina. 7 000X.


C
B1
B1
B1
PE
B1
pl
90


B1
B1
PE
91


B2
B1
B1
92


B1
B1
NE1
93


B1
NE1
PE
PO
B2
pl
B1
C
94

Fases iniciais da formação da parede (conclusão)

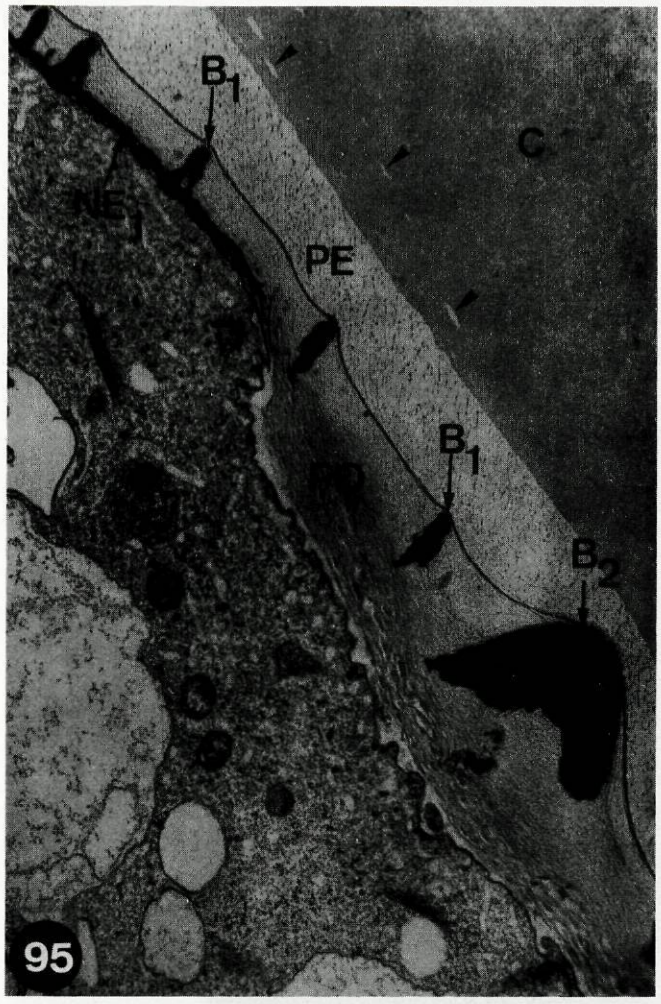
Fig. 95 - Aspecto da parede do pólen antes da dissolução da calose (C) onde já se notam canais de corrosão (pontas de setas). Báculas de dois tamanhos distintos (B_1,B_2) dispõem-se tanto nas regiões interporais como na zona dos poros (PO). A base das báculas é unida pela nexina 1 (NE_1) a qual é interrompida na zona dos poros. PE - primexina. 13 200X.

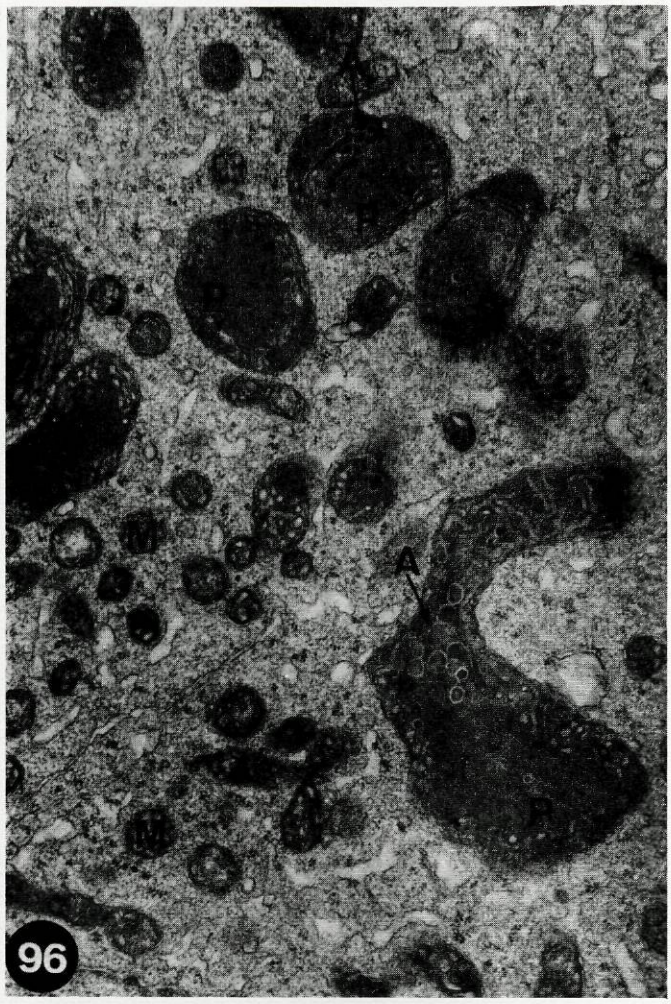
Fig. 96 - No citoplasma das tétradas, as mitocôndrias (M) apresentam matriz densa e cristas e os plastídios (P) sistema lamelar desenvolvido e maior número de grãos de amido (A). 20 000X.

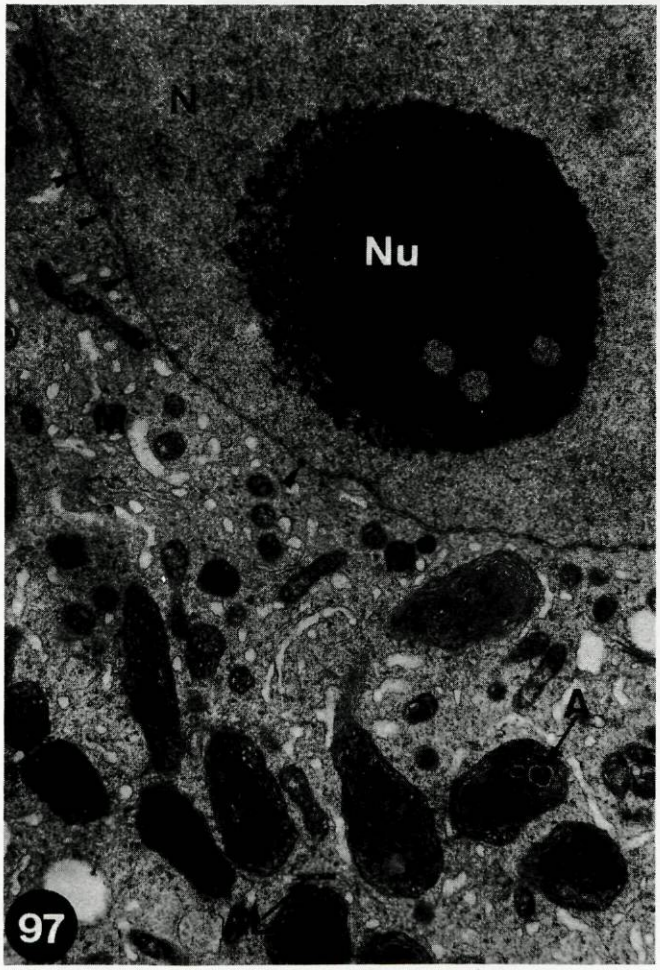
Fig. 97 - No núcleo (N) sobressai o nucléolo (Nu) proeminente e invólucro nuclear com poros aos quais está associado material electronicamente denso (pontas de setas). P - plastídios com amido (A); M - mitocôndria; AL - "annullate lamellæ"12 000X.

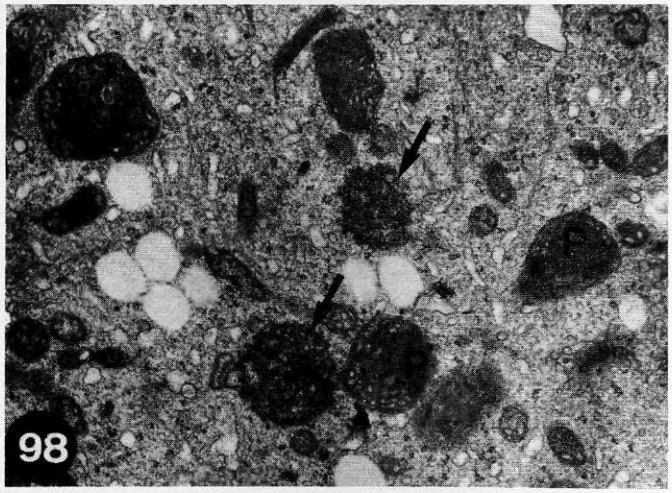
Fig. 98 - Os corpos de origem nucleolar (setas) continuam a observar-se no citoplasma onde se restabelece a população ribossómica. M - mitocôndria; P - plastídio. 15 200X.

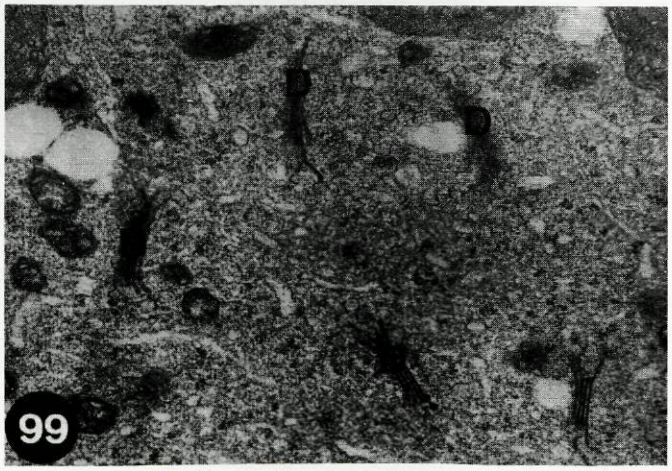
Fig. 99 - Os dictiossomas (D) atravessam uma fase de pouca actividade, com reduzido número de vesículas associadas. 16 800X.


B1
C
NE
PE
B1
B2
95


A
96


N
Nu
A
97


98


99

Na esporoderme do micrósporo (Fig. 101) operam-se transformações importantes em relação à fase anterior. É notável o aumento da espessura da nexina 1 assim como do comprimento e periodicidade dos espinhos. Entre a nexina 1 e o plasmalema, observa-se agora uma outra camada contínua mas de aspecto granular, que constitui a nexina 2. Esta nova camada, embora de textura diferente da nexina 1, é também constituída por esporopolenina.

Os poros da parede do pólen apresentam-se também bem diferenciados (Fig. 102). A nexina 1 é interrompida nestas zonas, ficando a abertura totalmente preenchida pelo material granular que constitui a nexina 2. Distribuídos na nexina 2 e em continuidade com a nexina 1 observam-se numerosas estruturas lamelares ("white lines" ou "tapes") semelhantes às observadas durante a fase inicial da formação da nexina 1. Uma maior ampliação (Fig. 103) permite observar a ultraestrutura destas lamelas que têm cerca de 100-400 nm de comprimento, sendo constituídas por uma faixa central de baixa densidade electrónica (5-8 nm de espessura), rodeada de um e outro lado por camadas electronicamente densas com 15-30 nm de espessura. De notar que a superfície do poro está coberta por espinhos semelhantes aos da restante parede do pólen.

Em alguns locais da parede em crescimento, foi possível observar grânulos de variadas dimensões com densidade electrónica semelhante à da esporopolenina (Figs. 104-107). Estes depósitos electronicamente densos localizam-se preferencialmente entre o plasmalema e a nexina 2 sendo, no entanto, alguns observados no citoplasma, junto do plasmalema (Figs. 104,105). Contudo, as observações efectuadas não permitiram relacionar estes depósitos intracelulares com qualquer organelo citoplasmático. Os grânulos densos foram também detectados, embora mais raramente, na nexina 2 (Fig. 106), observando-se em alguns casos contacto directo entre os depósitos e a nexina 1 (Fig. 107).

Para um estudo mais completo da esporoderme foram preciosas as observações efectuadas com o microscópio electrónico de varrimento. Os micrósporos esferoidais, cuja parede está rodeada externamente por espinhos de dimensões consideráveis,

Aspectos da fase final da formação da parede do pólen após a libertação dos micrósporos

Fig. 100 - Corte semi-fino mostrando micrósporos uninucleados e livres. O núcleo (N) ocupa posição central e no citoplasma distinguem-se pequenos vacúolos (V). A parede já se apresenta bem diferenciada, distribuindo-se na superfície, espinhos (B) tanto nas zonas dos poros (PO) como nas regiões interporais. As células do tapete (T) mantêm a sua posição na face interna da parede da antera e conservam integridade citoplasmática. 1 950X

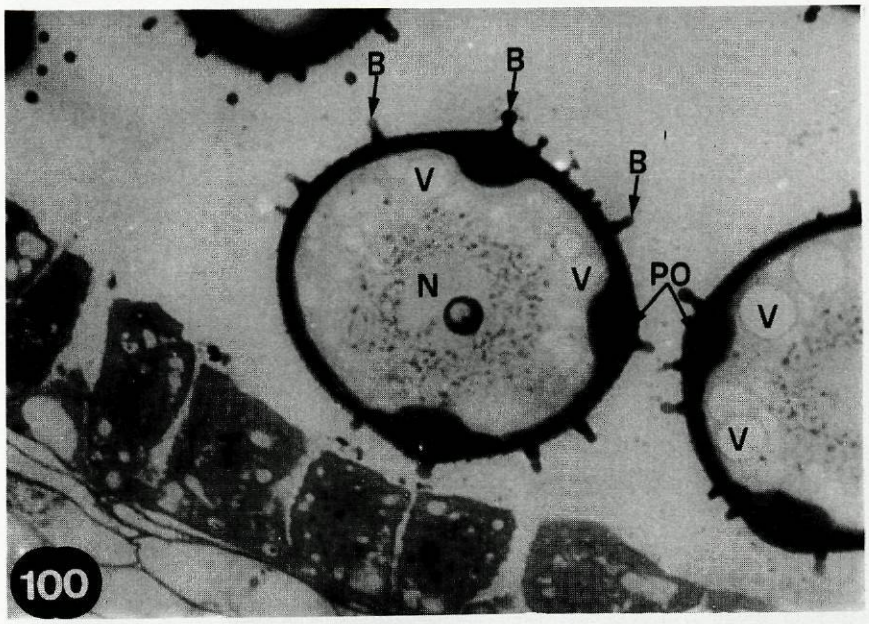
Fig. 101 - Nesta fase de desenvolvimento a parede apresenta-se constituída por numerosos espinhos (B_1) dispostos sobre a nexina 1 (NE_1). Entre esta e o plasmalema (pl) distingue-se uma camada de aspecto granular - nexina 2 (NE_2). 15 000X.

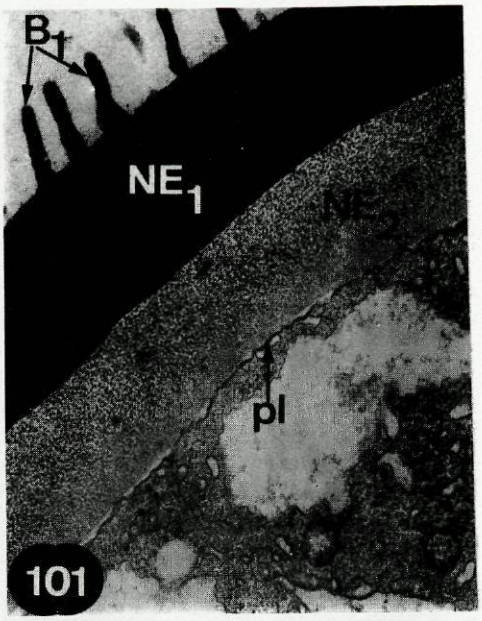
Fig. 102 - Aspecto de um poro o qual é totalmente preenchido pelo material granular da nexina 2 (NE_2), sendo interrompida a nexina 1 (NE_1). Na superfície do poro distribuem-se espinhos de dois tamanhos distintos (B_1, B_2) e o material granular da nexina 2 (NE_2) é atravessado por numerosas estruturas lamelares. 9 000X.

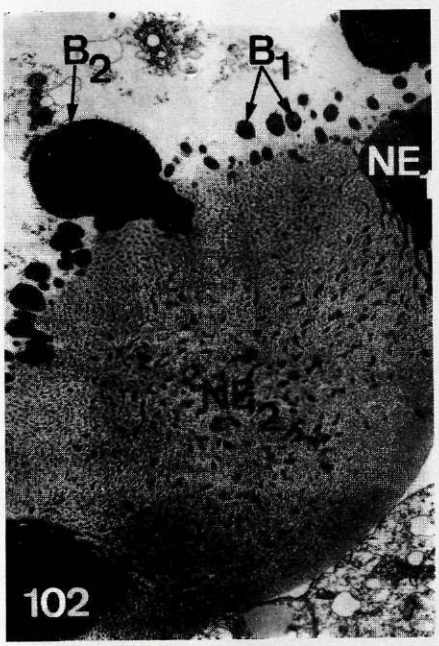
Fig. 103 - Ampliação mais elevada da nexina 2 (NE_2) do poro, distinguindo-se perfeitamente a estrutura das formações lamelares, as quais são constituídas por uma zona central clara (pontas de setas) dispondo-se de um e do outro lado material de densidade electrónica semelhante à da nexina 1 (NE_1) com a qual apresentam continuidade. 30 900X.

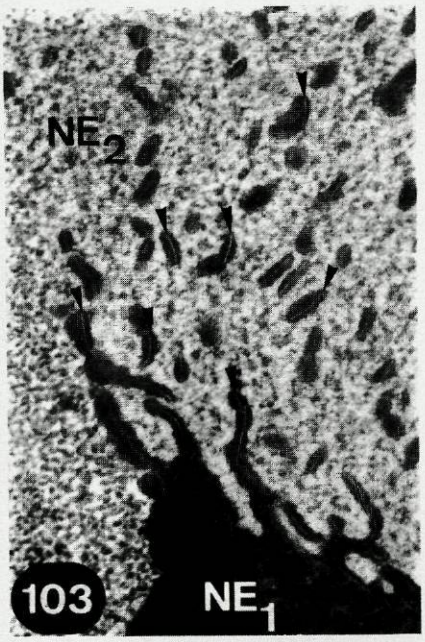
Figs. 104-107 - Grânulos densos (g) semelhantes aos depósitos de esporopolenina observam-se entre o plasmalema (pl) e a nexina 2 (NE_2) (Figs. 104, 105) mesmo na região do poro (Fig. 105, PO). Alguns grânulos densos (gc) são observados no citoplasma junto do plasmalema. Outros situam-se na nexina 2 (NE_2) (Fig. 106) e outros em contacto directo com a nexina 1 (NE_1) (Fig. 107).

Fig. 104 - 15 000X; Fig. 105 - 6 000X; Fig. 106 - 22 000X; Fig. 107 - 17 000X.

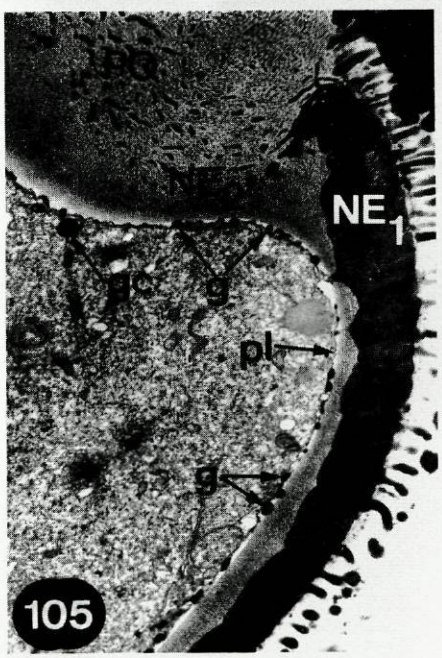

B
B
B
V
N
V
PO
V
V
100

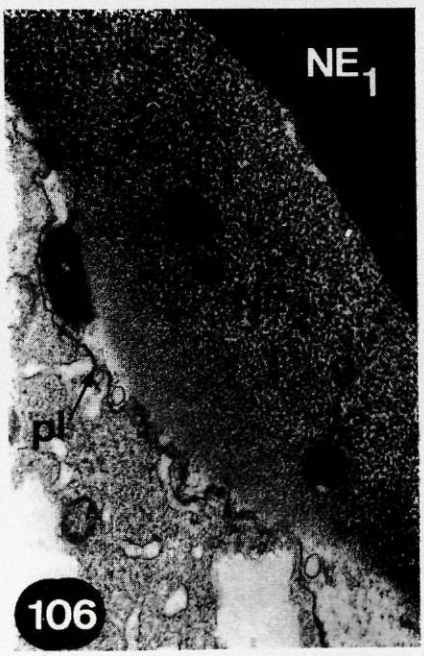

B1
NE1
pl
101

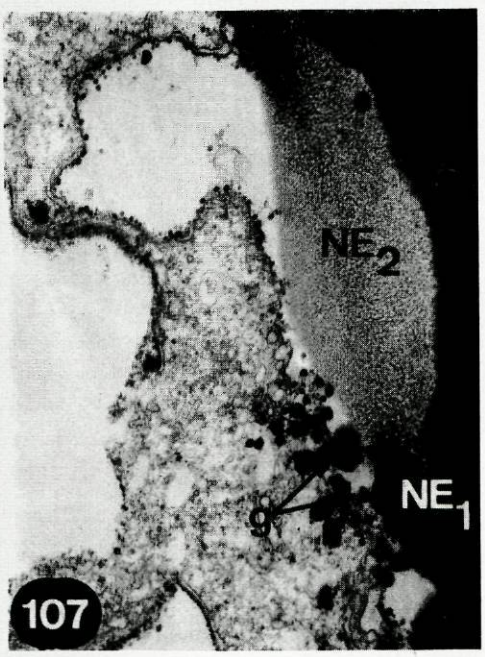

B2
B1
NE1
NE2
102


NE2
NE1
103


NE2
gc
g
pl
gc
104


PO
NE1
gc
g
pl
g
105


NE1
pl
106


NE2
g
NE1
107

amontoam-se nas anteras demarcando saliências na parede desta (Fig. 108). Um corte transversal das anteras, monolobadas e biloculares, permite distinguir os micrósporos esféricos nos sacos polínicos (Fig. 109). Os micrósporos esferoidais apresentam diâmetro máximo ligeiramente maior que após a libertação da parede de calose (120-130 µm). A observação de micrósporos isolados (Fig. 110) permite confirmar a sua forma e distinguir perfeitamente os espinhos de maiores dimensões. No entanto, uma maior ampliação (Fig. 111) mostra que, além dos espinhos de maiores dimensões, e que são menos numerosos, se encontram outros, de menores dimensões e mais numerosos, que se distribuem entre os de maiores dimensões. Regularmente distribuídos sobre a superfície do pólen observam-se os poros circulares e operculados, não havendo distinção, quanto ao modo de distribuição dos espinhos, entre estas regiões e as zonas inter-porais. Na verdade, foi possível distinguir perfeitamente dois tipos de espinhos (Fig. 112) que diferem não só no tamanho mas também na forma. Os maiores possuem 7-10 µm de comprimento e 3-4 µm de diâmetro basal, têm forma cónica e são pontiagudos. Os mais numerosos têm apenas 3-4 µm de comprimento e 1-1,5 µm de diâmetro basal, o qual é praticamente o mesmo em todo o comprimento, apresentando assim os espinhos forma cilindrica e extremidade arredondada.

Sobre a parede observam-se frequentemente extensos aglomerados de glóbulos que devem ser produto da actividade das células circundantes da parede da antera, nomeadamente, das células do tapete. Para as observações no microscópio electrónico de varrimento, utilizamos pólenes fixados apenas em glutaraldeído e outros sujeitos à dupla fixação glutaraldeído-ósmio. O facto destes glóbulos surgirem com maior frequência quando se utilizava a dupla fixação, leva-nos a sugerir que sejam constituídos por material lipídico (Hayat,1981) que, por conseguinte, não seria preservado só com a fixação pelo glutaraldeído. Testes histoquímicos confirmaram a natureza lipídica de glóbulos semelhantes, observados no pólen de *Amelanchier alnifolia* Nutt. (Olson, 1984) mas que parecem ter sido libertados pelos micrósporos, o que é sugerido pela sua localização preferencial nos poros.

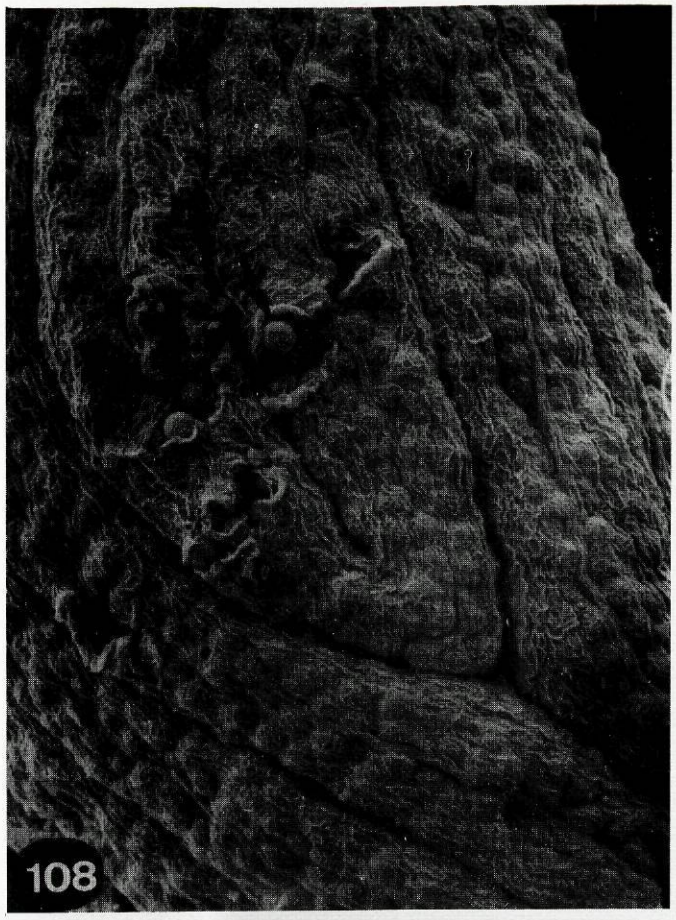
Aspectos das anteras e pólen em microscopia electrónica de varrimento

Fig. 108 - Anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch. distinguindo-se, na parede, as saliências correspondentes ao pólen que se acumula no interior. Por ruptura da parede da antera, ficaram expostos alguns grãos de pólen (setas). 39X.

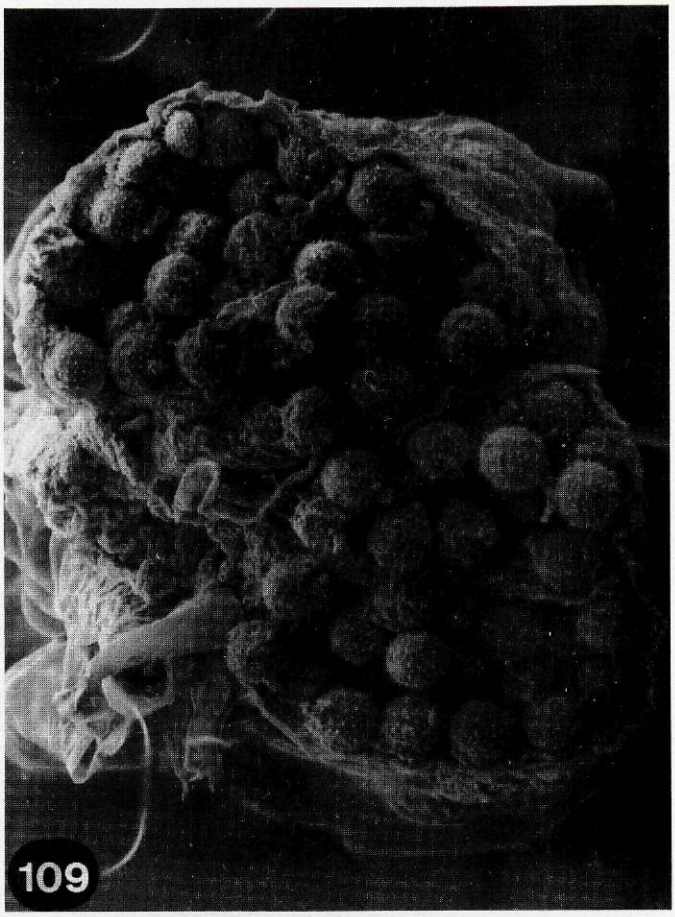
Fig. 109 - Corte transversal das anteras mostrando o pólen nos sacos polínicos. 75X.

Fig. 110 - Micrósporos esferoidais isolados, distinguindo-se os espinhos de maiores dimensões que recobrem exteriormente a parede. 150X.

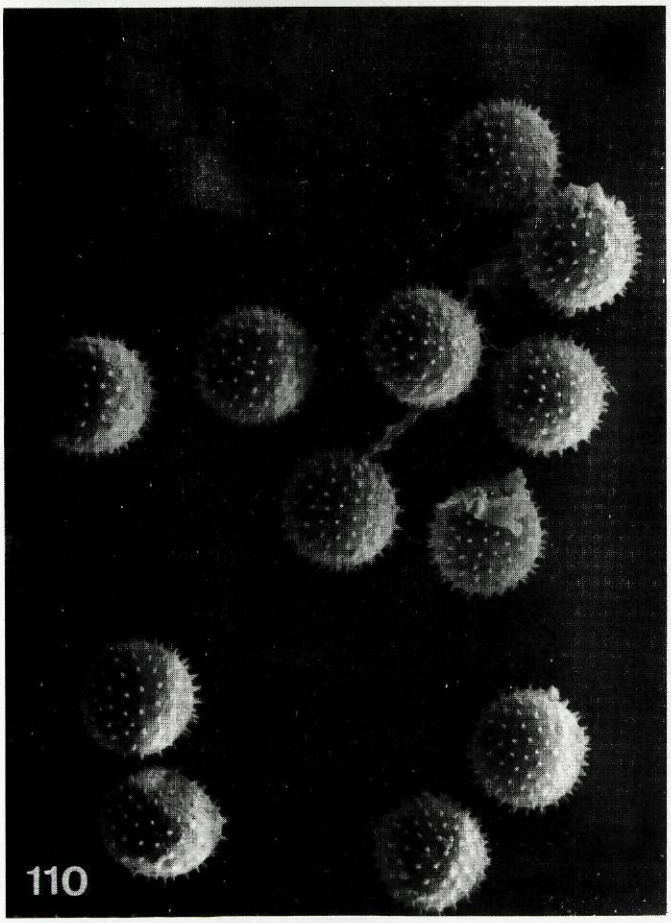
Fig. 111 - Micrósporo isolado sendo possível observar numerosos pequenos espinhos distribuídos entre os espinhos de maiores dimensões. Distinguem-se também, regularmente distribuídos alguns poros (setas). 750X.



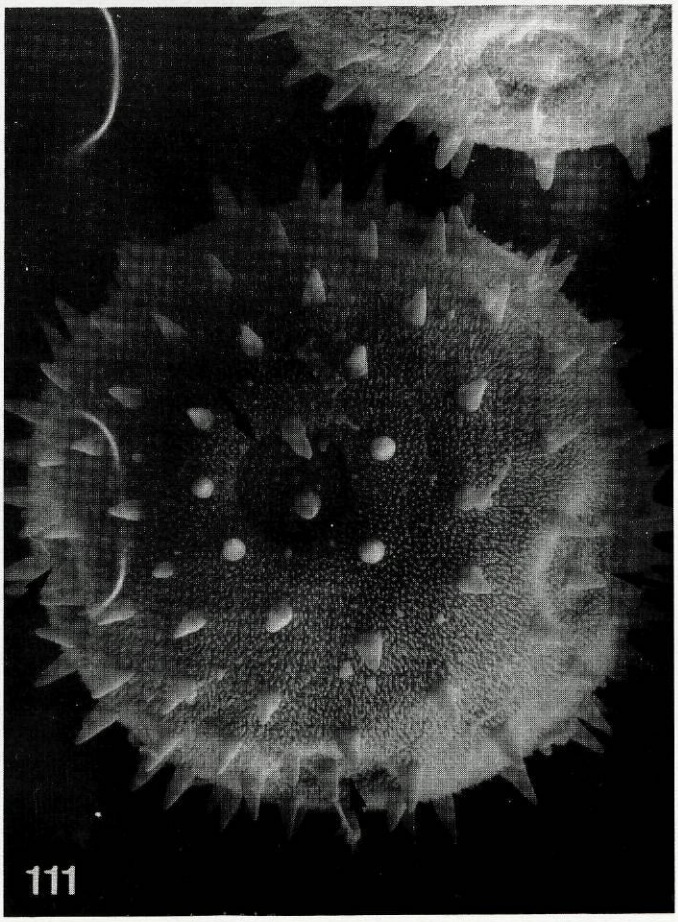
108



109



110



111

O estudo da morfologia externa da esporoderme foi acompanhado pelo estudo da morfologia interna com o microscópio electrónico de transmissão. A observação de cortes ultrafinos do pólen (Figs. 114,115) permite distinguir, além dos estratos já identificados, uma nova camada situada entre o plasmalema e a nexina 2 - a intina. De notar também que os espinhos de maiores dimensões (Fig. 114) não possuem uma estrutura compacta, distinguindo-se pequenas cavidades ou "foramens", grosseiramente circulares, distribuídos ao longo da estrutura. Estes "foramens" parecem ser apenas aberturas internas, pois a observação da morfologia externa dos espinhos não revelou quaisquer cavidades em comunicação com o exterior.

Assim, na fase final de desenvolvimento (Fig. 115) a parede do grão de pólen de *Cucurbita polymorpha* Duch. é constituída essencialmente por dois estratos fundamentais: interiormente a intina, essencialmente pectocelulósica e, exteriormente, a exina constituída por esporopolenina. Na exina, e segundo a terminologia de Erdtman (1966) que temos vindo a adoptar, há a considerar do interior para o exterior: a camada granular da nexina 2, à qual se segue a camada compacta e homogénea de nexina 1. Estas duas camadas apresentam espessura variável, a primeira entre 1,3-2 µm de espessura e a segunda 1,5-2 µm. Sobre a nexina 1 dispõem-se os espinhos, constituindo a sexina. Nesta espécie, a sexina é apenas formada pelas báculas livres (espinhos), não se assistindo à formação do tecto que, normalmente, une superiormente as báculas. Frequentemente, a nexina 1 é mais espessa na zona de inserção dos espinhos de maiores dimensões, onde se deposita uma nexina 2 extremamente delgada. Segundo a terminologia de Faegri (1956), os espinhos livres denominam-se columelas e a camada que os une tem a designação de camada basal ou "foot layer". Estes dois componentes constituem a exina externa ou ectexina, sob a qual se dispõe a camada granular que se denomina exina interna ou endexina. A exina interna de Faegri (1956) ou nexina 2 de Erdtman (1966) foi já denominada medina por Saad (1963 a,b).

Na parede do pólen, observam-se algumas zonas diferenciadas que constituem as aberturas características da esporoderme da maioria dos pólenes e que permitem

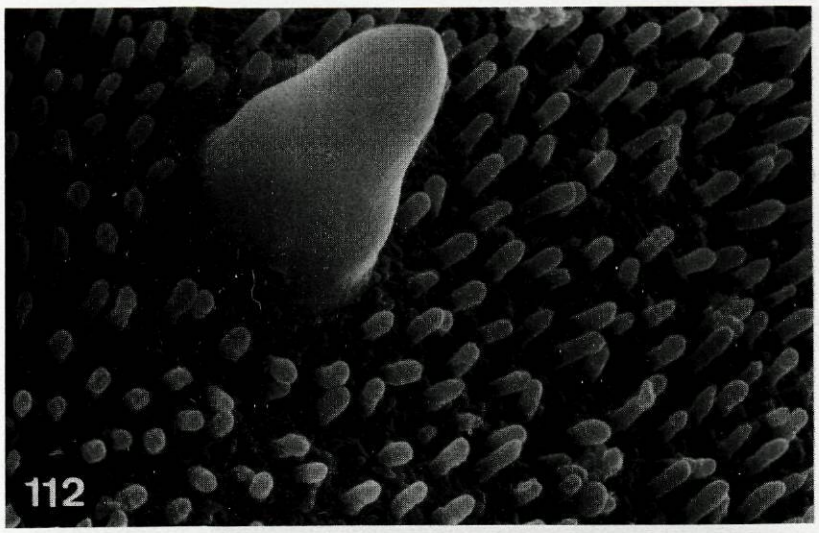
Morfologias externa e interna da esporoderme

Fig. 112 - A parede do pólen encontra-se, exteriormente, revestida por espinhos de dimensões e forma diferentes. Os de maiores dimensões são menos numerosos, entre os quais se distribuem os de menores dimensões. 7 000X.

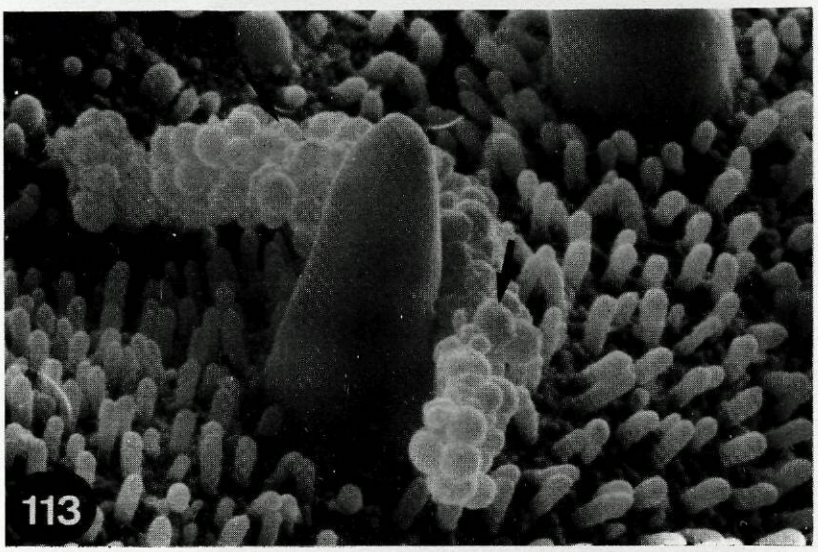
Fig. 113 - Sobre os espinhos da parede depositam-se, frequentemente, agregados mais ou menos extensos de estruturas globulares (setas). 6 500X.

Fig. 114 - Os espinhos de menores dimensões (B_1) apresentam textura homogénea mas nos de maiores dimensões (B_2), distinguem-se cavidades circulares ou "foramens" (setas). 12 000X.

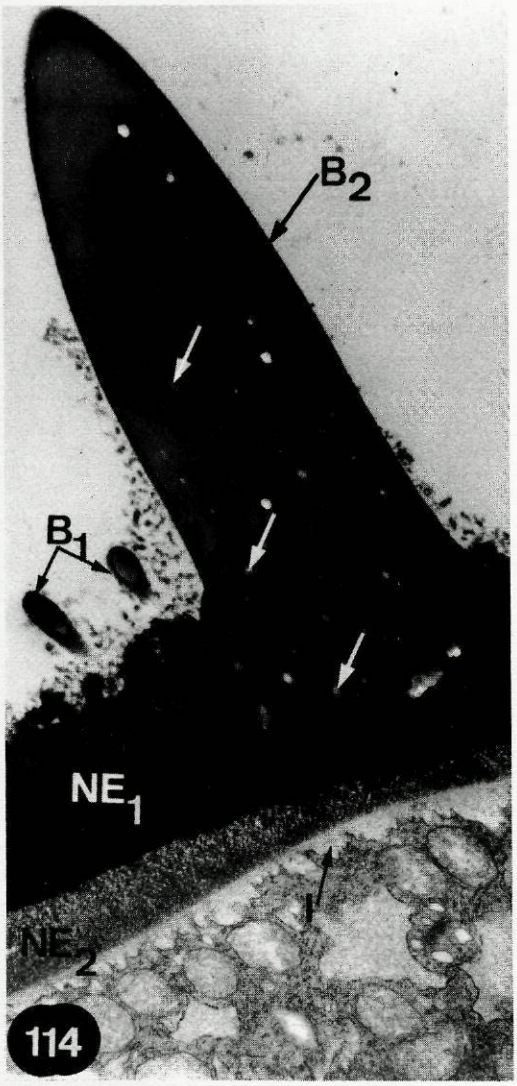
Fig. 115 - Estratificação da parede do pólen e distinção das várias camadas segundo as terminologias de Faegri (1956) e de Erdtman (1966). 7 400X.



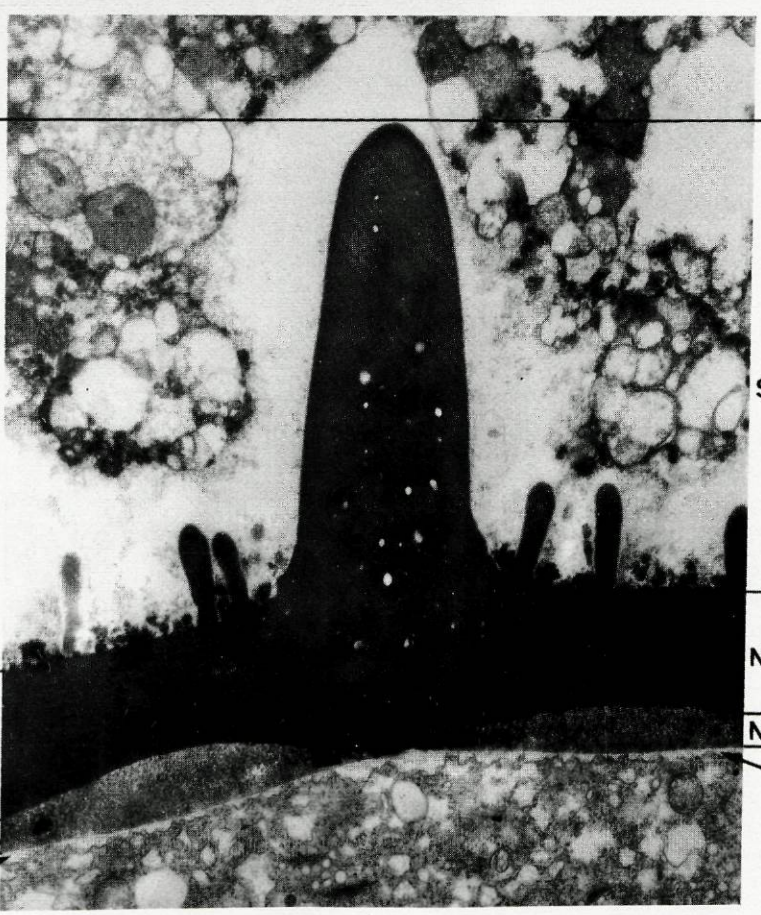
112



113



114



115

o crescimento do tubo polínico durante a germinação. Em *Cucurbita polymorpha* Duch. (Fig. 111,116) as aberturas são poros circulares, operculados, com 40-50 µm de diâmetro. Normalmente, (Fig. 116) cada poro é rodeado por quatro espinhos de maiores dimensões, existindo também um no centro do opérculo. No opérculo, coexistem os dois tipos de espinhos tal como nas regiões interporais. Esta situação foi confirmada em estudo de microscopia electrónica de transmissão (Fig. 117). Na região do poro, o material granular que o preenche (nexina 2) é mais electronicamente denso que na fase inicial de formação da parede, já não se observando as lamelas ou "tapes". Sobre o opérculo (Fig. 116) distribuem-se frequentemente glóbulos semelhantes aos observados sobre os espinhos interporais (Fig. 113). Na espécie em estudo, observam-se normalmente 7 poros, embora,ocasionalmente, se contem 8 ou 9. Ao nível dos poros, a intina, é consideravelmente espessa (Figs. 117,118) e atravessada por numerosas estruturas membranosas que resultam de invaginações do plasmalema (Fig. 118) e que funcionam, na esporoderme, como repositório de enzimas de origem gametofítica (Knox & Heslop-Harrison, 1969, 1970; Heslop-Harrison, 1975). Nesta fase, durante a qual se assiste à deposição da intina, é de realçar a actividade dos dictiossomas, produzindo numerosas vesículas (Fig. 119). Esta actividade do aparelho de Golgi foi já relacionada com a produção e transporte dos constituintes desta camada mais interna da parede do pólen (Heslop-Harrison, 1968 c, 1971 b) que é assim considerada de origem gametofítica.

No citoplasma dos micrósporos uninucleados livres de *Cucurbita polymorpha* Duch. operam-se importantes modificações. O núcleo que inicialmente apresenta uma posição central (Fig. 100), é, posteriormente, deslocado para uma posição periférica (Fig. 120), devido à formação dum grande vacúolo central, resultante da fusão dos pequenos vacúolos que povoam o citoplasma. No núcleo distingue-se um nucléolo proeminente, não havendo segregação dos componentes granular e fibrilar mas observando-se vacúolos e centros fibrilares (Fig. 120). No invólucro nuclear individualizam-se numerosos poros. As mitocôndrias apresentam aspectos morfológicos diversos, tendo, de início, matriz mais ou menos densa (Fig. 121)

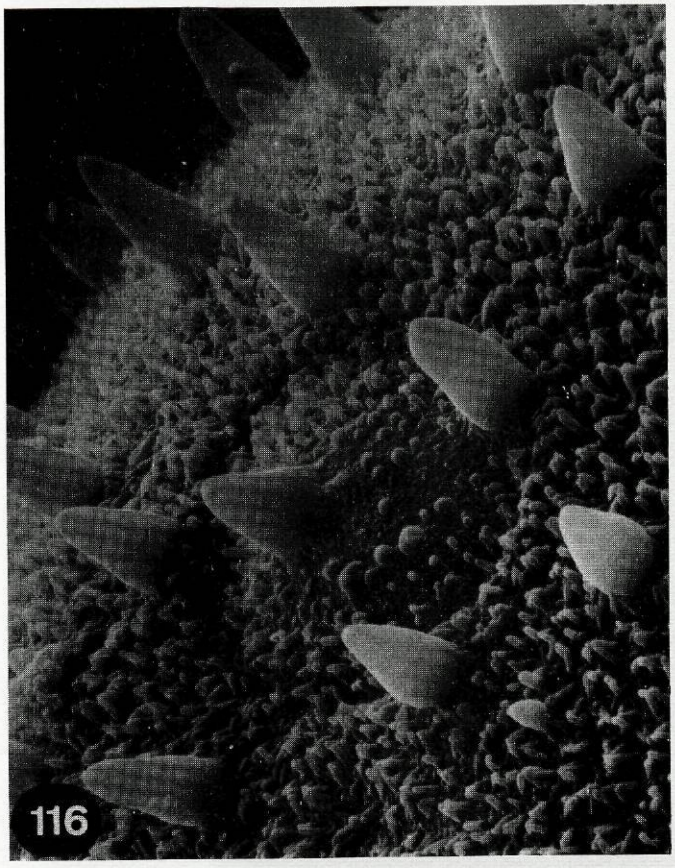
Aspectos da morfologia externa e interna dos poros

Fig. 116 - Imagem de microscopia electrónica de varrimento mostrando um poro circular com opérculo, no centro do qual se situa um espinho de maior dimensão enquanto que outros quatro rodeiam o poro. Sobre o opérculo distinguem-se estruturas globulares (pontas de setas). 3 000X.

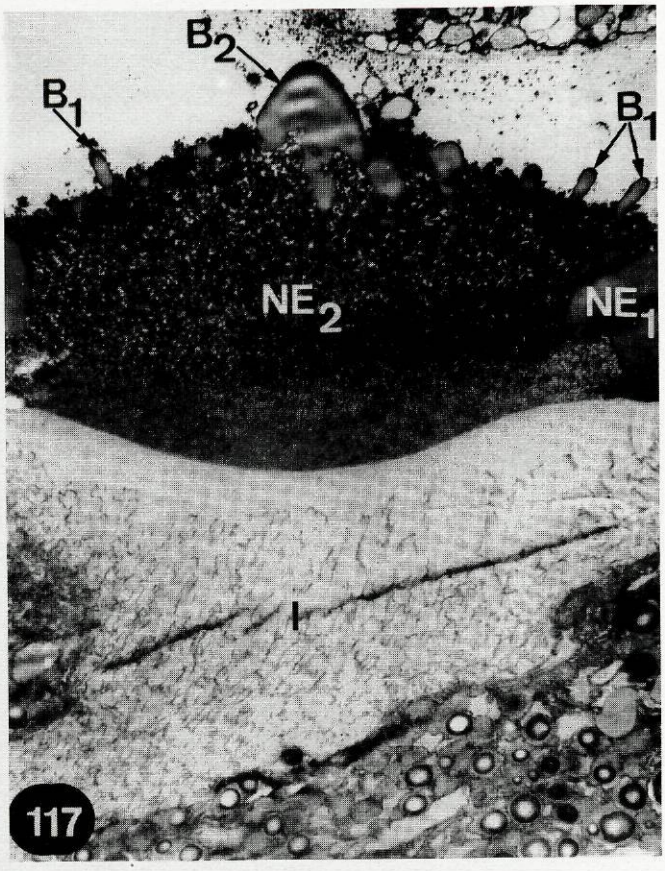
Fig. 117 - Aspecto do poro em microscopia electrónica de transmissão, observando-se a coexistência dos espinhos de maior dimensão (B_2) e os menores (B_1). NE_1 - nexina 1; NE_2 - nexina 2; I - intina. 3 400X.

Fig. 118 - Zona do poro onde a intina (I) é consideravelmente espessa e atravessada por numerosas estruturas membranosas resultantes de evaginações do plasmalema (setas). NE_1 - nexina 1; NE_2 - nexina 2. 8 000X.

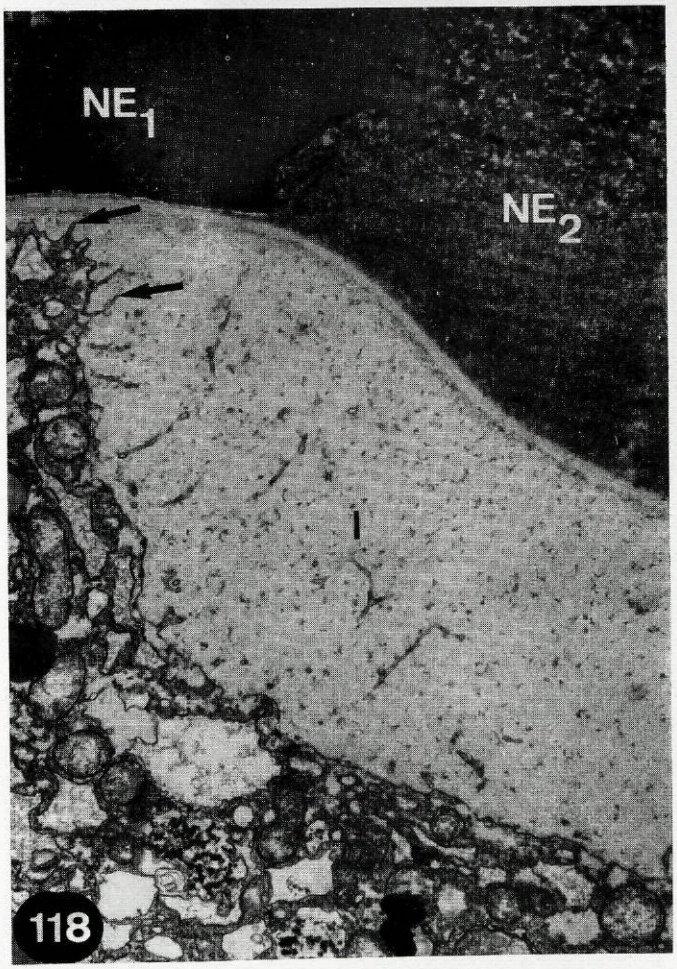
Fig. 119 - Durante a deposição da intina (I) é notória a actividade dos dictiossomas (D) produzindo numerosas vesículas. NE_1 - nexina 1; NE_2 - nexina 2. 15 200X.



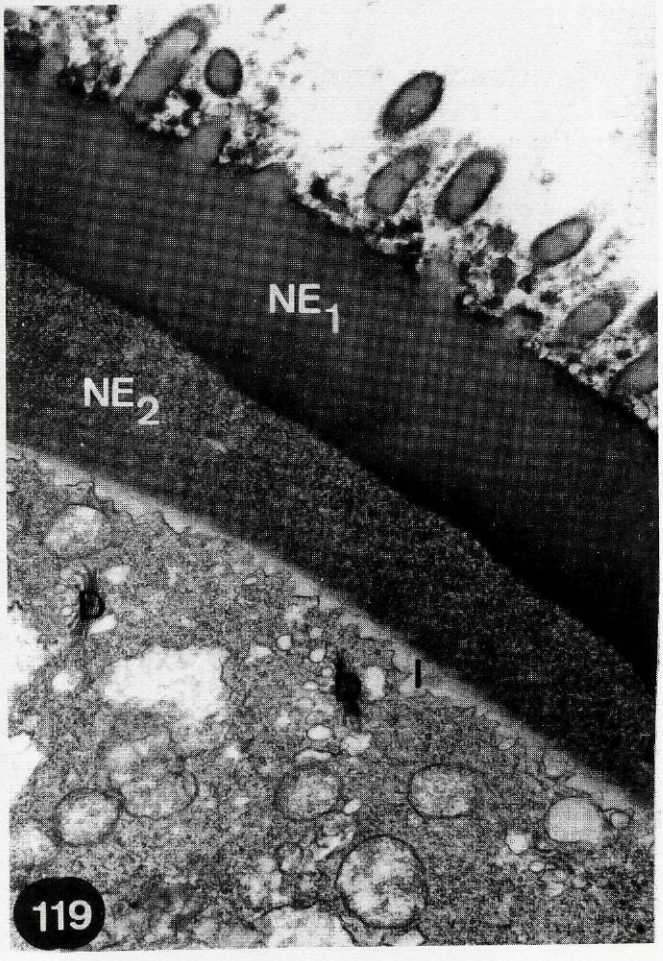
116



117



118



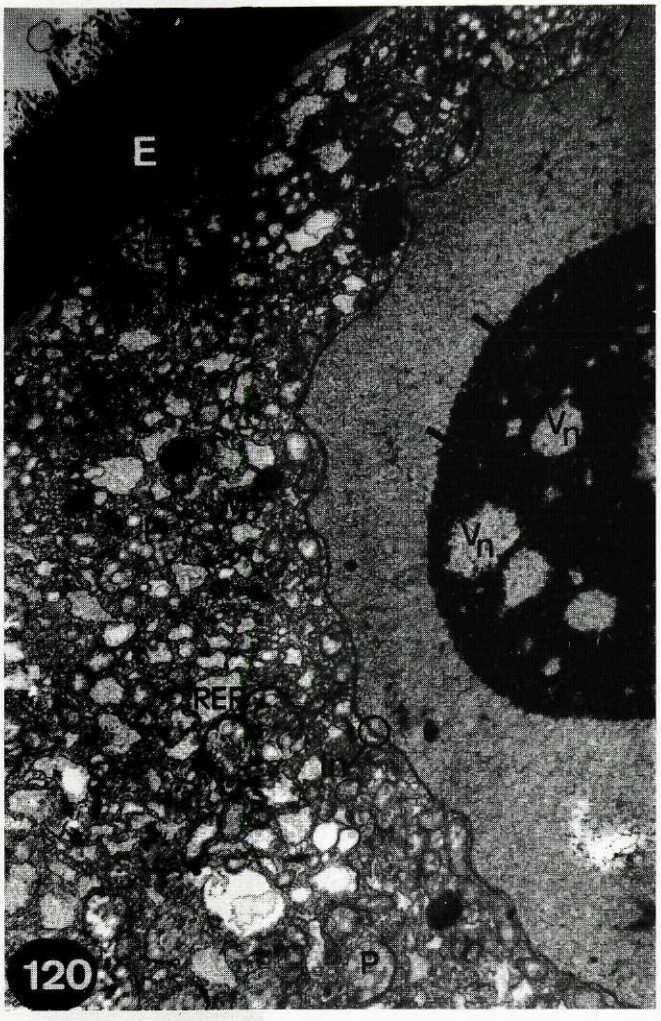
119

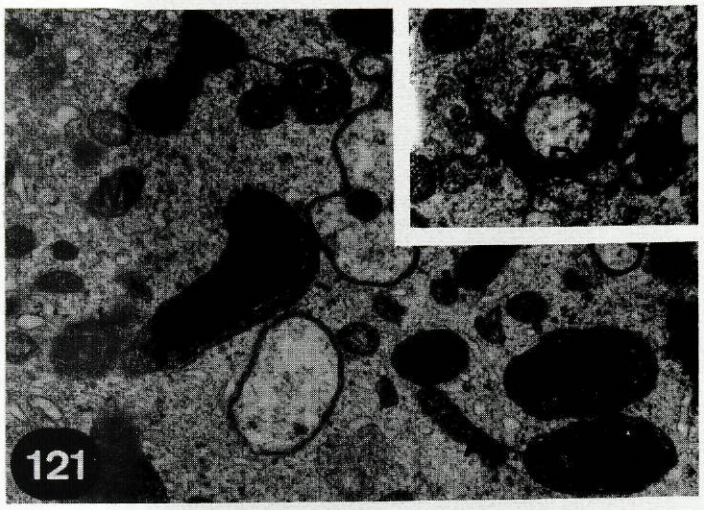
Alterações dos organelos citoplasmáticos durante a diferenciação dos micrósporos uninucleados

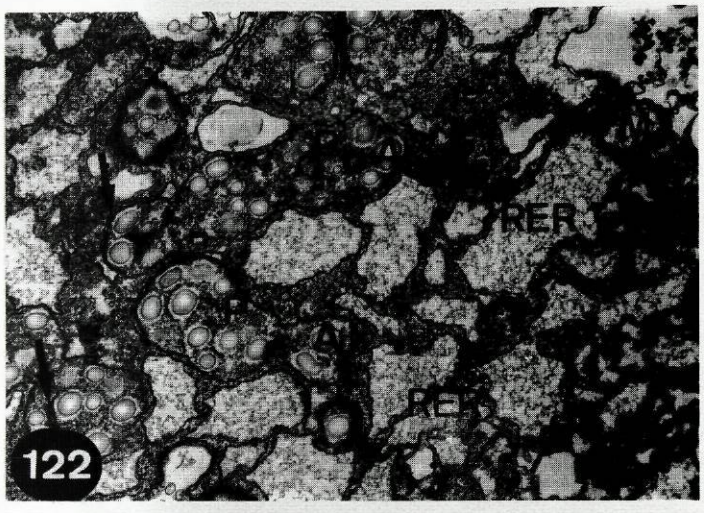
Fig. 120 - No micrósporo diferenciado, o núcleo ocupa uma posição periférica, distinguindo-se o nucléolo com vacúolos (V_n) e centros fibrilares (setas). O invólucro nuclear (In) apresenta numerosos poros. E - exina; I - intina; P - plastídios com amido; M - mitocôndria; RER - retículo endoplasmático rugoso. 5 700X.

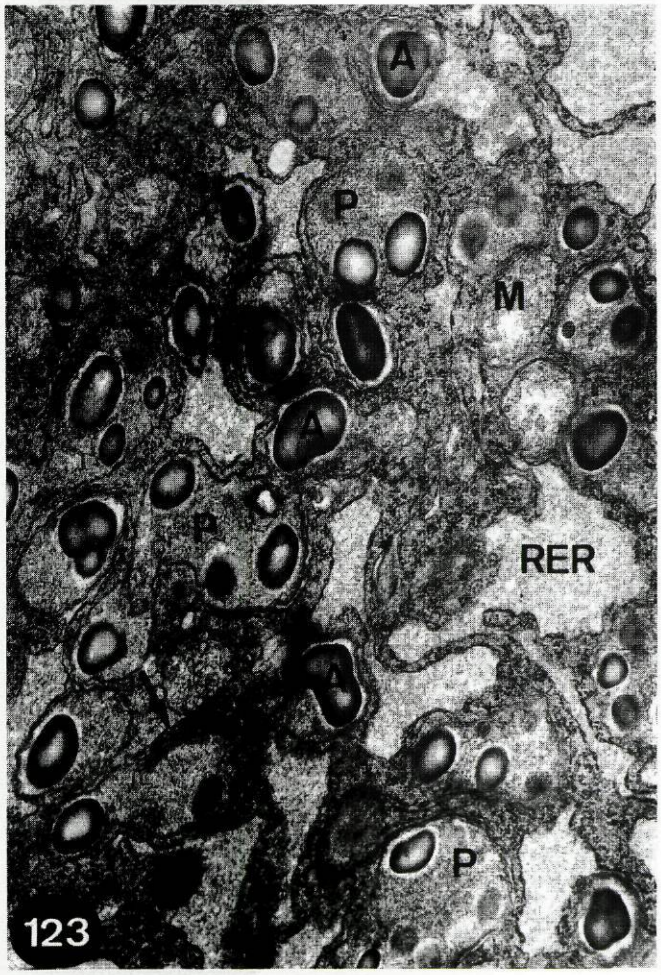
Fig. 121 - No citoplasma do micrósporo, após a sua individualização, os plastídios (P) apresentam estroma denso, com sistema lamelar bem desenvolvido (setas) e amido (A). M - mitocôndrias pequenas com matriz mais ou menos densa. Encaixe - Os dictiossomas (D) atravessam uma fase inicial de inactivação sendo constituídos por cisternas sem vesículas associadas.
Fig. 121 - 14 400X; Encaixe - 20 000X.

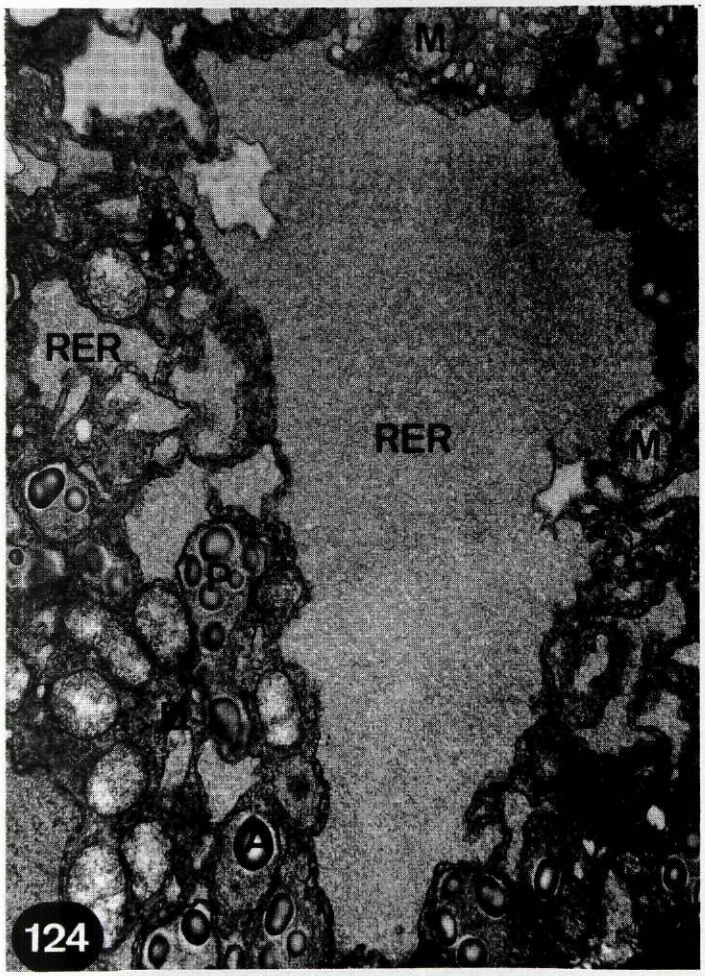
Fig. 122-124 - No micrósporo diferenciado, as mitocôndrias (M) têm matriz pouco densa; nos plastídios (P) o sistema lamelar (setas) vai, a partir desta fase, diminuindo progressivamente assim como o número de grãos de amido (A) embora o volume de cada um aumente. As cisternas de retículo rugoso (RER) surgem dilatadas, preenchidas com material densamente fibrilar. Os dictiossomas (D) surgem em plena actividade.
Fig. 122 - 12 800X; Fig. 123 - 19 000; Fig. 124 - 12 000X.


E
Vn
Vn
RER
P
120


121


RER
RER
122


A
P
M
A
P
RER
A
P
123


M
RER
RER
M
P
A
124

acabando por se observarem um reduzido número de cristas na matriz pouco densa (Fig. 123). Após a libertação dos micrósporos, o Golgi atravessa uma fase rápida de pouca actividade, observando-se os dictiossomas constituídos por várias cisternas, algumas das quais encurvadas e sem vesículas associadas (Fig. 121, encaixe). No entanto, e como já foi referido, os dictiossomas reiniciam uma fase de crescente actividade à medida que se vai depositando a intina (Fig. 119).

Os plastídios começam por apresentar estroma com densidade electrónica elevada, sistema de tilacóides bem desenvolvido e aumento do número de grãos de amido (Fig. 121). Posteriormente, o estroma sofre uma perda de densidade electrónica, diminui o número de lamelas estromáticas, e os grãos de amido apresentam variação de volume, o qual vai aumentando progressivamente, diminuindo o número de grãos por plastídio (Figs. 122,123).

No citoplasma do micrósporo diferenciado, apresentam particular morfologia as cisternas de retículo endoplasmático rugoso (Figs. 120-124). As cisternas surgem dilatadas, com forma irregular, sendo preenchidas por material fibrilar, cuja densidade vai aumentando progressivamente. Estas cisternas que povoam o citoplasma, surgem por vezes com dimensões apreciáveis em relação aos restantes organelos (Fig. 124).

3. ACÇÃO DE AGENTES QUÍMICOS NAS ANTERAS DE *CUCURBITA POLYMORPHA* DUCH.

A fim de estudar e aprofundar, durante a microsporogénese, as inter-relações entre as células esporofíticas e gametofíticas, submeteram-se anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch. à acção de várias drogas interferentes com o metabolismo celular. O estudo incidiu, essencialmente, sobre o efeito operado nas células polínicas, antes e durante a formação da parede de esporopolenina e, nas células do tapete, durante as mesmas fases.

3.1 - ACIDO GIBERÉLICO

O ácido giberélico, tal como as outras giberelinas, é uma hormona que ocorre naturalmente na maior parte das plantas superiores e a sua aplicação exógena pode induzir profundas e variadas alterações no metabolismo das células.

A descoberta das giberelinas teve origem numa doença detectada na planta do arroz (Kurosawa, 1926), que se traduzia por um excessivo crescimento das plantas e reduzido número de sementes. Hifas do fungo responsável por estas transformações foram, mais tarde, observadas nas plantas doentes (Sawada, 1912) e identificado como pertencente ao grupo dos Ascomycetæ e à espécie *Gibberella fujikuroi* (Saw) Wr. O produto activo foi então extraído e denominado giberelina (Yabuta, 1935). Com o aperfeiçoamento de técnicas de purificação foi possível isolar várias giberelinas, conhecendo-se hoje mais de seis dezenas de compostos diferentes. As giberelinas foram também descritas nas plantas superiores e a primeira a ser caracterizada numa Angiospermæ foi isolada por McMillan & Suter (1958), a partir de sementes de *Phaseolus coccineus* L. Nas plantas superiores, as giberelinas foram encontradas em ápices caulinares e foliares, plântulas e folhas, sendo de salientar a presença destas fito-hormonas no pólen de *Petunia hybrida* (Hook.)Vilm. (Barendse et al., 1970) e de três espécies de *Pinus* L. (Kamienska & Pharis, 1975; Kamienska et al., 1976 a,b) e em anteras de *Nigella hispanica* L. (Greyson & Tepfer, 1967) e *Lamium amplexicaule* L. (Lord, 1980).

Os diversos efeitos das giberelinas, quer em plantas intactas quer em culturas de tecidos, foram objecto de diversos artigos de revisão que referem aspectos bioquímicos, metabólicos e fisiológicos destas fito-hormonas (Paleg, 1965; Lang, 1970; Jones, 1973; Heden et al., 1978; Croizier, 1981; Evans, 1984; Naylor, 1984; Matthysse & Scott, 1984).

Embora o mecanismo de acção das giberelinas nas células das plantas ainda não seja perfeitamente conhecido, a giberelina em estudo (ácido giberélico), de fórmula molecular $C_{19}H_{22}O_6$, tem sido responsabilizada, por efeitos muito diversos no metabolismo celular. O ácido giberélico actua nas membranas celulares alterando quer a sua composição (Jusaitis et al., 1981) quer a sua estrutura e permeabilidade (Wood & Paleg, 1974; Jusaitis et al., 1982), interfere com a divisão (Stebbins et al., 1967, Kaufman et al., 1969; Köhler, 1977; Vercher et al., 1984) e com o alongamento celular (Kaufman et al., 1969; Sawhney & Srivastava, 1974; Mondal, 1975; Durnam et al., 1977; Rehm et al., 1978; De la Guardia & Benlloch, 1980; Vercher et al., 1984), estimula a síntese de enzimas hidrolíticas (Schaeverbeke, 1966; Jones, 1969 a,b; Jones & Price, 1970; Filner et al., 1969; Pyliotis et al., 1979; Zink, 1980, Akiyama et al., 1981 a,b; Mirbahar & Laidman, 1982), inibe a síntese de antocianinas (Gregor, 1974; Hinderer et al., 1984), promove a formação de polissomas (Armstrong & Jones, 1973; Martin & Northcote, 1983), interfere no crescimento e diferenciação de células em cultura (Tizio et al., 1970; Beasley & Ting, 1973, 1974; Minocha & Halperin, 1974; Altman & Goren, 1974; Kochba et al., 1974; Saussay & Gautheret, 1974; Haddon & Northcote, 1976; Coleman & Greyson, 1977; Phillips & Dodds, 1977; Watson & Halperin, 1981; Noma et al.,1982; Rücker, 1982; Kononowicz & Janick, 1984) e estabiliza os microtúbulos em células da folha de *Allium cepa* L. (Mita & Shibaoka, 1984).

De salientar que, anteras isoladas de *Allium cepa* L. durante a fase de leptóteno-zigóteno da meiose, continuavam o processo de divisão originando, após 6 dias de cultura, 87% de tétradas, quando ao meio da cultura era adicionado ácido giberélico na concentração de 5 mg/dm^3 (Vasil, 1957). O ácido giberélico induziu

também a formação de anteras num mutante de tomateiro sem estames (Phatak et al., 1966; Sawhney & Greyson, 1979) e estimulou o crescimento do tubo polínico do pólen de *Calotropis procera* (Ait.) Ait. (Malik & Mehan, 1975) e de *Pinus roxburghii* Sarg. (Dhawan & Malik, 1981).

Tendo em conta os diversos efeitos produzidos pelo ácido giberélico no metabolismo celular, e a fim de apreciar a sua interacção com as células polínicas e as células do tapete em desenvolvimento, esta hormona foi fornecida a hastes florais de *Cucurbita polymorpha* Duch. em diferentes concentrações ($1,4x10^{-4}$, $2,8x10^{-4}$ e $2,8x10^{-3}$ moles/dm^3) durante 24 e 48 horas. Sob a acção do ácido giberélico, numa concentração de $1,4x10^{-4}$ moles/dm^3 e durante 24 horas, as células polínicas, durante a meiose, apresentavam alterações ultraestruturais (Fig. 125). Nesta fase, durante a qual se deposita a parede especial de calose, é notória a proliferação no citoplasma de vesículas dilatadas, predominantemente do tipo liso (Figs. 125,126). No estroma dos plastídios, com sistema lamelar pouco desenvolvido, observam-se frequentemente grãos de amido e, ocasionalmente, cisternas associadas ao invólucro destes organelos (Fig. 126). Em fase mais adiantada da meiose, são frequentes os agregados de retículo endoplasmático rugoso, tipo "nebenkern" (Fig. 127).

Após 48 horas de tratamento, e sob a acção da mesma concentração, as células em meiose evidenciavam características diferentes (Fig. 128). Nos plastídios, já quase não se observava amido, embora em alguns organelos se depositassem pequenos grânulos deste polissacarídeo. Notava-se ainda uma certa relação de proximidade entre cisternas do retículo endoplasmático e o invólucro plastidial embora e, contrariamente ao observado ao fim de 24 horas, as cisternas reticulares apenas envolvessem os plastídios sem haver contiguidade entre os dois sistemas membranosos. A vesiculação no citoplasma era extremamente reduzida embora a população ribossómica não apresentasse alteração significativa. Resultados idênticos registaram-se após o tratamento das anteras com uma concentração de $2,8x10^{-4}$ moles/dm^3.

Nas células do tapete não se registaram alterações significativas. No citoplasma,

Efeito do ácido giberélico nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch.

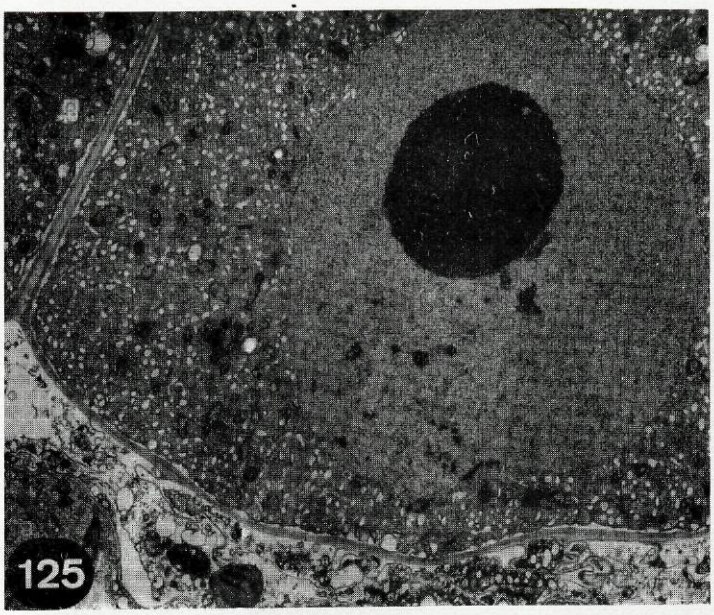
Fig. 125 - Aspectos das células polínicas no início da meiose e após 24 horas de tratamento, sobressaindo uma elevada vesiculação no citoplasma. 3 400X.

Fig. 126 - Na fase inicial da meiose, além da proliferação de vesículas, observam-se plastídios (P) com amido (A) e cisternas associadas ao invólucro plastidial (seta). 14 400X.

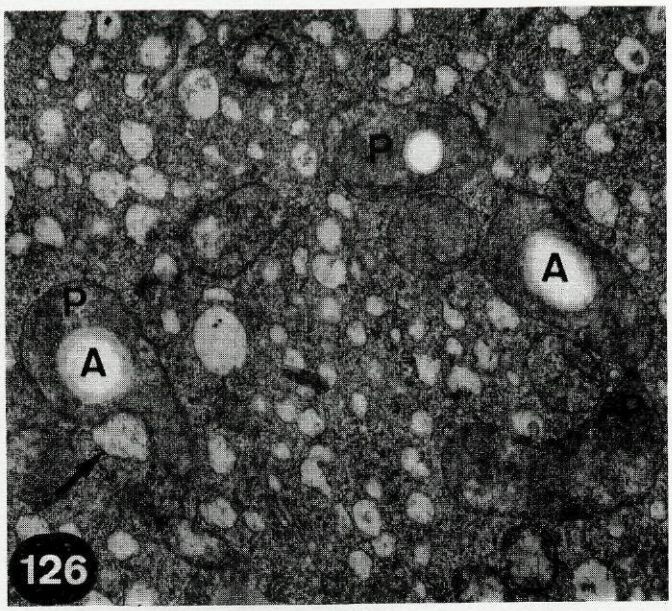
Fig. 127 - Durante a meiose, observa-se frequentemente o retículo endoplasmático rugoso (RER) com configuração tipo "nebenkern". 17 500X.

Fig. 128 - Após 48 horas de tratamento e em fases iniciais da meiose, os plastídios (P) já quase não apresentam amido (A) e as cisternas reticulares apenas rodeiam os invólucros plastidiais (setas).
Fig. 128 - 22 000X; Encaixe - 20 000X.

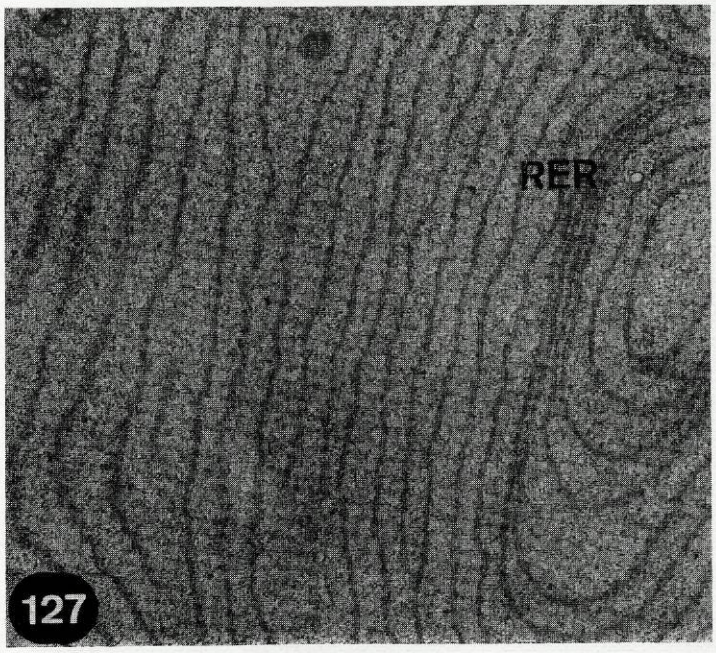
Figs.129,130 - Aspectos das células do tapete exibindo o sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso (RER) e plastídios (P) com inclusão paracristalina (seta). N - núcleo; M - mitocôndria; PC - parede celular.
Fig. 129 - 14 400X; Fig. 130 - 20 000X.



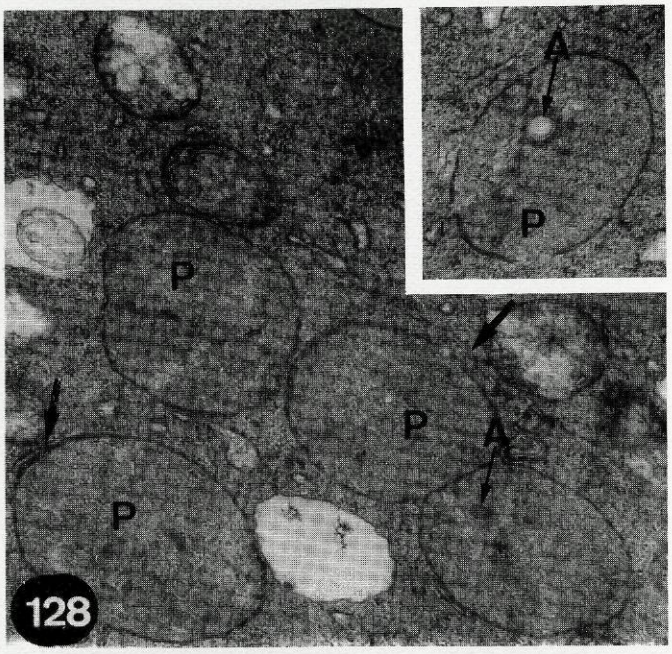
125



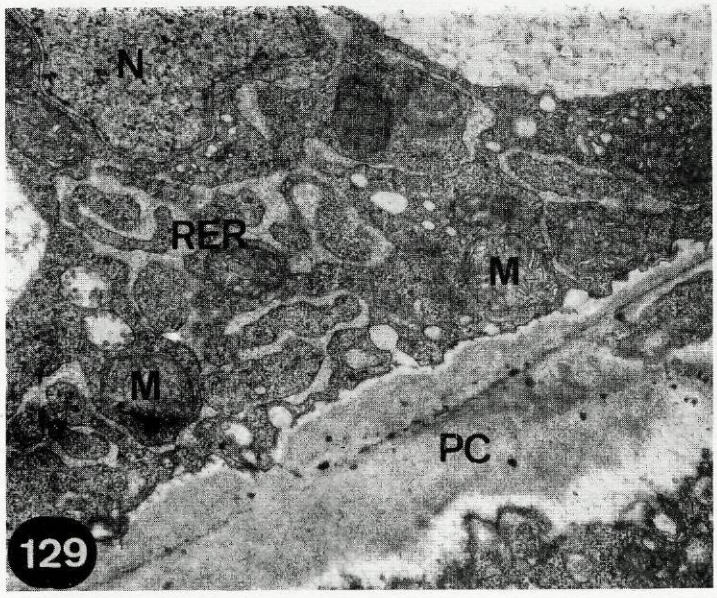
126



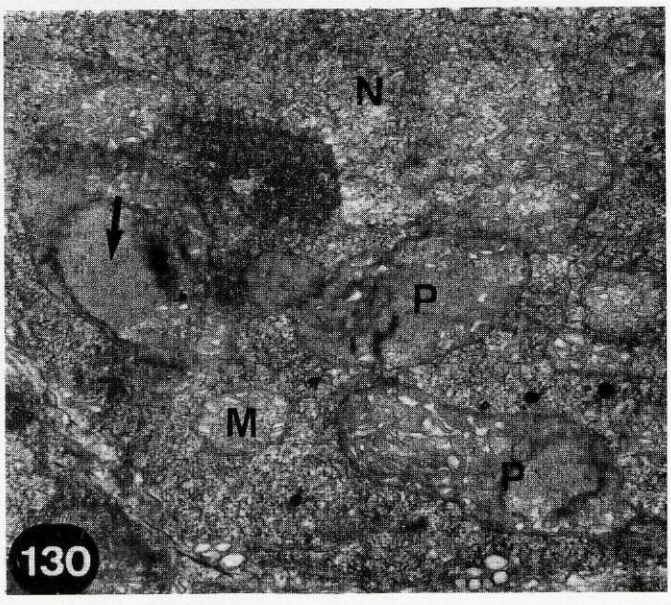
127



128



129



130

distinguia-se o sistema elaborado do retículo endoplasmático rugoso e as mitocôndrias, com poucas cristas (Fig. 129). Os plastídios apresentavam estrutura semelhante à das células sem tratamento, persistindo a inclusão paracristalina que, inicialmente, as caracteriza (Fig. 130).

Foi também ensaiada esta droga, numa concentração de $2,8x10^{-3}$ moles/dm^3, que se manifestou tóxica para estas células, conduzindo rapidamente à destruição da integridade citoplasmática.

3.2 ACIDO MEVALÓNICO

A exina da parede dos grãos de pólen é essencialmente constituída por esporopolenina, um polímero de carotenóides e de ésteres de carotenóides (Books & Shaw, 1968 a,b; 1971). O primeiro precursor específico dos terpenóides, no grupo dos quais se incluem os carotenóides, é o ácido mevalónico (MVA). Este composto de seis carbonos é originado através duma reacção catalisada pela enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), a partir do 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA), o qual provém da condensação de três moléculas de acetato (Goodwin, 1961). O mevalonato é depois convertido em isopentenilpirofosfato, que constitui a unidade fundamental para a biossíntese dos terpenóides.

Estudos realizados nos cromoplastos de *Capsicum annuum* L. (Camara et al.,1983), permitiram verificar que estes plastídios podem sintetizar MVA, pois foi possível acompanhar a redução enzimática do HMG-CoA a MVA, pelo que se conclui que a HMG-CoA redutase está activa nestes organelos. No entanto, os autores sugerem que não é de excluir a hipótese duma relação entre os cromoplastos e o retículo endoplasmático, que se sabe intervir na formação do MVA nas células das plantas. Na verdade, em fracções celulares de plântulas de *Pisum sativum* L. (Brooker & Russel, 1975, a,b) demonstrou-se a redução do HMG-CoA e 80% da actividade da HMG-CoA redutase foi associada à fracção microssómica. A enzima foi também identificada nos microssomas de plântulas de *Raphanus sativus* L. (Bach et

al., 1980; Bach & Lichtenthaler, 1982 a).

Estudos realizados sobre a acção de vários metabolitos na actividade da HMG-CoA redutase (Brooker & Russel, 1979) mostraram uma modificação de actividade após tratamento com a luz vermelha, a cordicepina, a cicloheximida, o ácido abscísico e o colesterol enquanto o ácido giberélico não apresentou qualquer efeito. O facto da diminuição da actividade enzimática sob a acção da luz vermelha ter sido compensada com tratamento posterior pelas radiações da luz do vermelho distante, levaram os autores a sugerir que o fitocromo regulará, ainda que indirectamente, a actividade desta enzima microssómica. A actividade da HMG-CoA redutase é também fortemente inibida pela mevinolina, metabolito isolado do fungo *Aspergillus terreus*, diminuindo assim a formação do MVA, tanto em células vegetais como animais (Bach & Lichtenthaler, 1982 a,b; Weinstock et al., 1984.).

Os trabalhos de Rogers e colaboradores (1966) realizados em cloroplastos de *Phaseolus vulgaris* L. mostraram que o invólucro destes plastídios é impermeável ao MVA. Conclusões semelhantes foram verificadas para os cloroplastos de *Avena sativa* L. (Wellburn & Hampp, 1976) e *Capsicum annuum* L. (Schneider et al., 1977); no entanto, no primeiro caso e quando as plantas eram sujeitas a períodos curtos de iluminação que motivava o aparecimento de estioplastos e na segunda espécie durante a transformação dos cloroplastos para cromoplastos, a permeabilidade dos invólucros ao MVA era evidente. Estudos autorradiográficos mostraram haver um mecanismo de transporte do MVA através do invólucro dos plastídios, cuja actividade varia com a fase de desenolvimento dos organelos (Cockburn & Wellburn, 1974). Estas diferentes apreciações, parecem apoiar a sugestão de Kirk & Tilney-Basset (1978) segundo os quais, os plastídios nunca são totalmente impermeáveis a este ácido.

Nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch., o ácido mevalónico (sob a forma de lactona) foi fornecido a hastes florais mergulhadas em soluções aquosas desta droga, para estudar o efeito produzido, por este precursor dos carotenóides, nas células polínicas, e mais especificamente, na síntese da esporopolenina.

A acção do mevalonato foi estudada nas concentrações de 10^{-3} moles/dm^3 e 4 x10^{-3} moles/dm^3 durante 24, 48, 72 horas e seis dias. Ao fim das 24 horas não se detectaram alterações significativas das células das anteras sujeitas ao tratamento. Porém, passadas 48 horas, e para qualquer das concentrações, observaram-se efeitos bem evidentes nas células mães do grão de pólen (Fig. 131). Durante a meiose, embora nas fases iniciais da divisão, dispunham-se na periferia das células, grânulos semelhantes aos da esporopolenina normalmente observada nas células do tapete, durante a fase de secreção. De referir também que, durante a microsporogénese normal, nunca foram observadas quaisquer granulações esporopolenínicas nas células mães, surgindo os primeiros depósitos na fase de tétrada, tal como foi descrito no ponto 2.2 deste capítulo. Além dos depósitos electronicamente densos, verificou-se que, principalmente, o citoplasma periférico apresentava alterações ultraestruturais. Nesta zona (Figs. 132,133) observava-se a dilatação do sistema membranar de retículo endoplasmático rugoso cujas cisternas ficavam ocupadas por vesículas pleomórficas limitadas por uma membrana. Esta membrana limitante apresentava alguns ribossomas associados mas em pequeno número, o que parece ser normal, pois durante a meiose assiste-se a uma diminuição da população ribossómica. As vesículas pleomórficas englobavam por vezes, organelos citoplasmáticos (Fig. 132). Esta faixa periférica das células polínicas, após tratamento com o mevalonato, assemelha-se ultraestruturalmente ao sistema elaborado do retículo endoplasmático rugoso, descrito como característico das células do tapete desta espécie das Cucurbitaceæ. De referir, também, que os depósitos de esporopolenina, embora dispondo-se preferencialmente junto do plasmalema (Figs. 131,132,133), surgiam também em associação com o sistema reticular (Fig. 133). Juntamente com as granulações de esporopolenina de pequenas dimensões, observavam-se outras maiores e de aspecto variável, mas com menor densidade electrónica (Fig. 133). Embora com alterações metabólicas profundas, as células mães do pólen apresentavam núcleos (Fig. 131) onde se detectavam os complexos sinaptonémicos e invólucro nuclear com numerosos poros, parecendo traduzir um

Efeito do ácido mevalónico nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch.

Fig. 131 - Nas células mães do pólen (CMP) distinguem-se depósitos de esporopolenina (sp) na periferia da célula. No núcleo (N) em divisão observam-se complexos sinaptonémicos (cs) e o invólucro nuclear é interrompido por numerosos poros (pontas de setas). No tapete (T) circundante sobressai o sistema elaborado de retículo endoplasmático (RER) cujas cisternas apresentam um certo grau de dilatação. 3 600X.

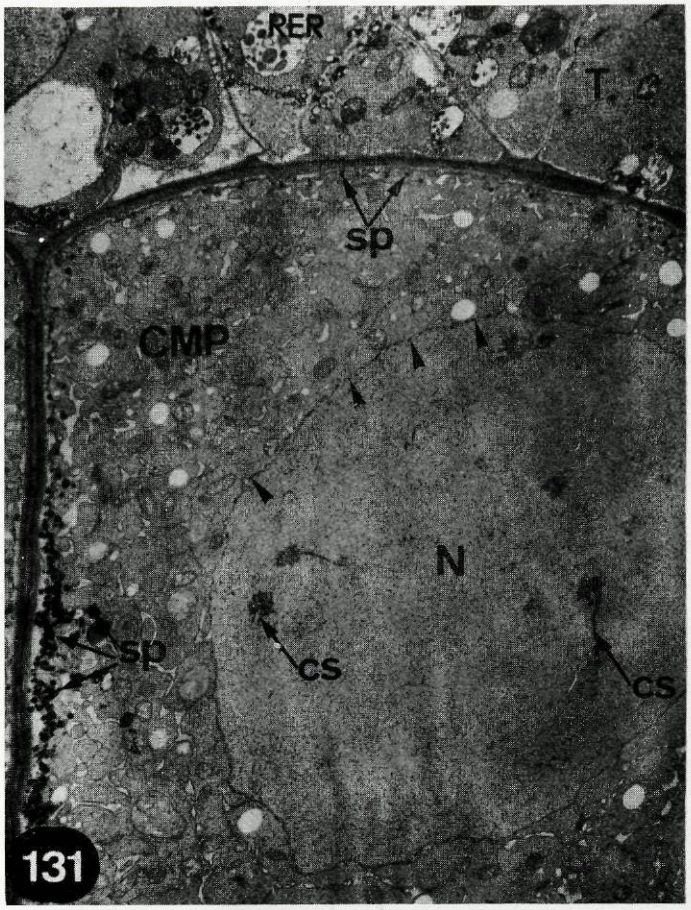
Fig. 132 - Aspecto do citoplasma periférico das células polínicas. Além dos grânulos de esporopolenina (sp) distingue-se o retículo endoplasmático rugoso (RER) com um sistema de vesiculação semelhante ao observado nas células do tapete desta espécie. Algumas das vesículas pleomórficas, limitadas por uma membrana, englobam mitocôndrias (M). P - plastídio; D - dictiossoma. 8 000X.

Fig. 133 - Nas células polínicas, os depósitos de esporopolenina (sp) embora prefrencialmente distribuídos na periferia da célula, surgem também no citoplasma em associação com cisternas do retículo endoplasmático rugoso (1). Observam-se também outros depósitos osmiofílicos mas com maiores dimensões e menor densidade electrónica (2). 14 000X.

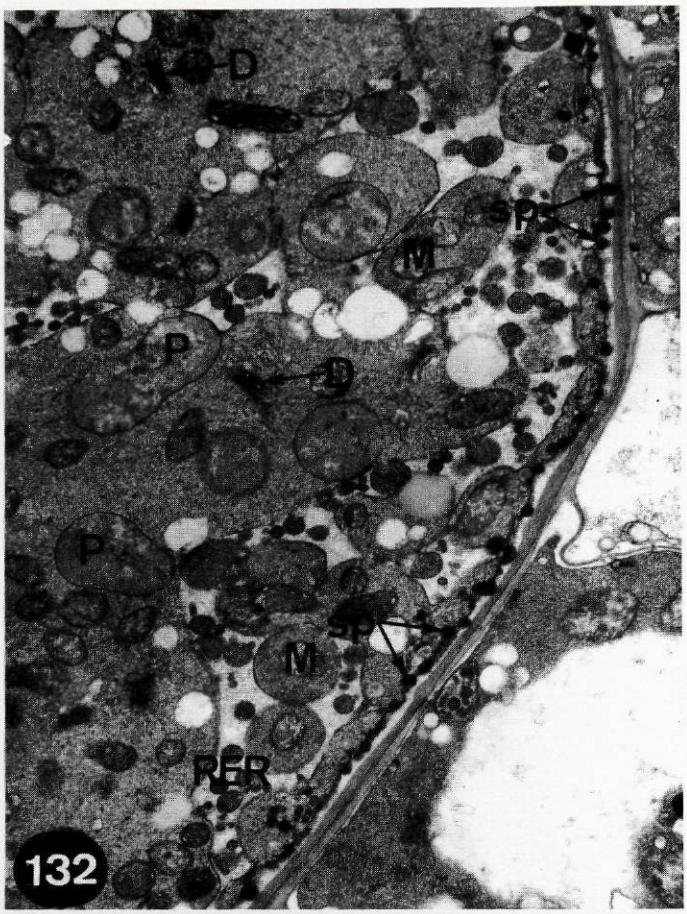
Fig. 134 - Aspecto de uma célula em estádio de tétrada, observando-se depósitos de esporopolenina (sp) entre o plasmalema (pl) e o poro em formação (PO). 13 600X.

Fig. 135 - Porção de células do tapete. Os plastídios (P) possuem uma inclusão paracristalina (Ip) e os glóbulos lipídicos (pontas de setas) apresentam maior densidade electrónica do que os das células de controlo. M - mitocôndria; PC - parede celular. 17 500X.

Fig. 136 - Aspecto da célula do tapete, distinguindo-se o sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso (RER) fazendo comunicação entre o núcleo (N) e a periferia da célula. sp - depósitos de esporopolenina; L - inclusão lipídica. 14 000X.



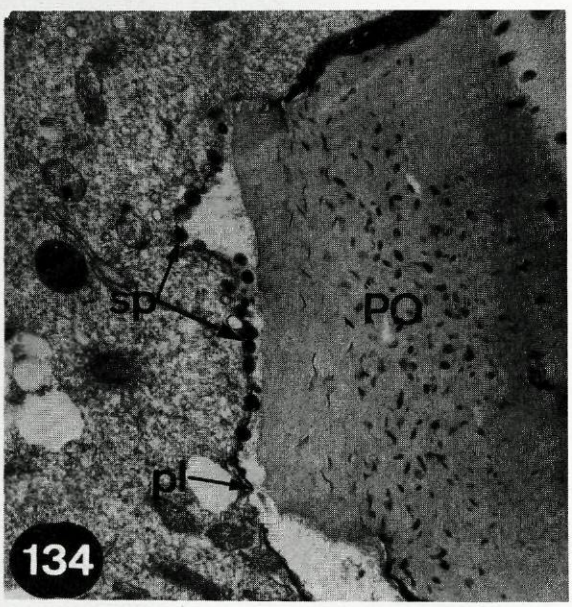
131



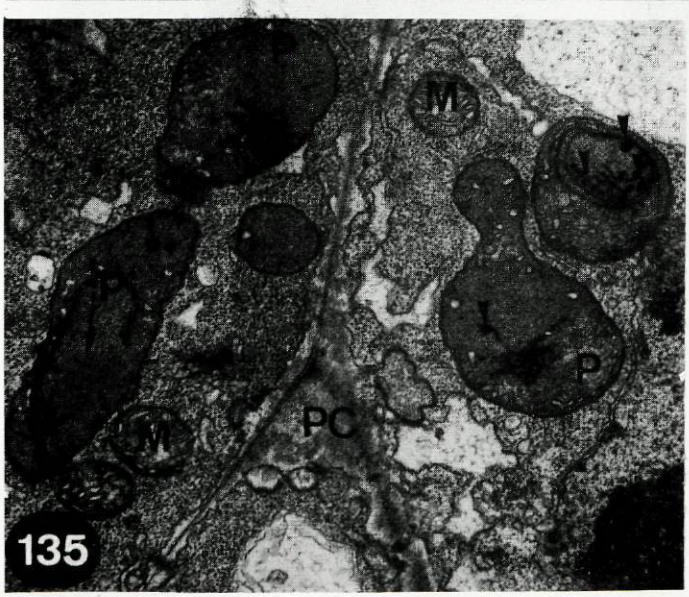
132



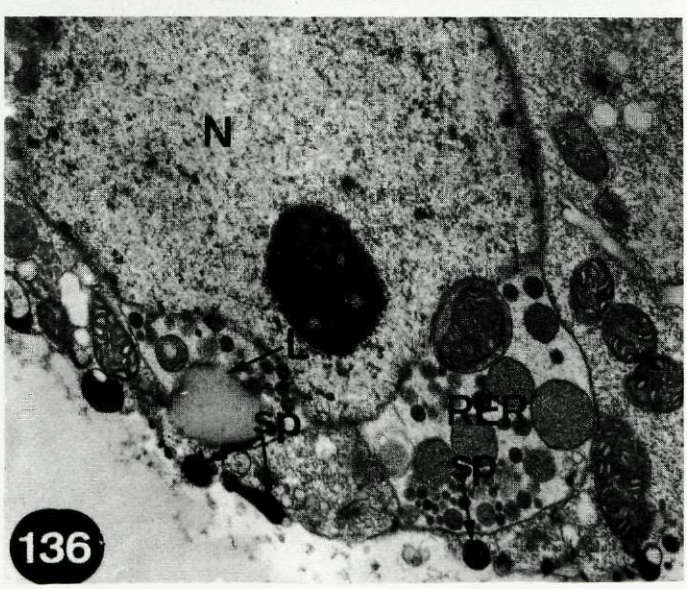
133



134



135



136

processo normal de divisão. Estas alterações surgiam também quando se prolongava o tempo de tratamento, embora as células evidenciassem então indícios de degenerescência.

Na fase de tétrada foram também observadas alterações, após o tratamento com o mevalonato (Fig. 134). Entre o plasmalema e a parede em formação, preferencialmente na região dos poros, observavam-se depósitos de esporopolenina semelhantes aos encontrados apenas no micrósporo jovem das plantas de controlo (capítulo 2.3, Resultados).

As células do tapete das anteras tratadas não apresentavam alterações muito significativas. No entanto, nos plastídos onde surgia a inclusão paracristalina característica, os glóbulos lipídicos apresentavam densidade electrónica mais elevada (Fig. 135). No tapete, surgia também o sistema elaborado do retículo endoplasmático rugoso embora as cisternas se apresentassem mais dilatadas, englobando reduzido número de vesículas (Fig. 131). Este sistema reticular aparecia também associado ao invólucro nuclear (Fig. 136), observando-se, nestas células, os depósitos de esporopolenina e outros lípidos de menor densidade electrónica.

3.3 COLQUICINA

A colquicina é um alcalóide isolado a partir dos bolbos e sementes de *Colchicum autumnale* L. (Pelletier & Caventon, 1820). Os primeiros trabalhos sobre a interferência da colquicina na mitose das células vegetais foram realizados por Dustin e colaboradores (1937). A partir de então, foram numerosos os resultados publicados sobre a influência desta droga em vários tipos de células e em variadas funções (Eigsti & Dustin, 1955), sendo a maior parte dos efeitos explicados pela interacção da colquicina com os microtúbulos.

Os primeiros estudos sobre a acção da colquicina na mitose revelaram que, por acção deste alcalóide, as células são bloqueadas em metafase. A colquicina actua assim, especificamente, no ciclo mitótico por inibição da formação dos microtúbulos do fuso, originando núcleos poliplóides. No entanto, esta acção inibitória só ocorre se

processo normal de divisão. Estas alterações surgiam também quando se prolongava o tempo de tratamento, embora as células evidenciassem então indícios de degenerescência.

Na fase de tétrada foram também observadas alterações, após o tratamento com o mevalonato (Fig. 134). Entre o plasmalema e a parede em formação, preferencialmente na região dos poros, observavam-se depósitos de esporopolenina semelhantes aos encontrados apenas no micrósporo jovem das plantas de controlo (capítulo 2.3, Resultados).

As células do tapete das anteras tratadas não apresentavam alterações muito significativas. No entanto, nos plastídos onde surgia a inclusão paracristalina característica, os glóbulos lipídicos apresentavam densidade electrónica mais elevada (Fig. 135). No tapete, surgia também o sistema elaborado do retículo endoplasmático rugoso embora as cisternas se apresentassem mais dilatadas, englobando reduzido número de vesículas (Fig. 131). Este sistema reticular aparecia também associado ao invólucro nuclear (Fig. 136), observando-se, nestas células, os depósitos de esporopolenina e outros lípidos de menor densidade electrónica.

3.3 COLQUICINA

A colquicina é um alcalóide isolado a partir dos bolbos e sementes de *Colchicum autumnale* L. (Pelletier & Caventon, 1820). Os primeiros trabalhos sobre a interferência da colquicina na mitose das células vegetais foram realizados por Dustin e colaboradores (1937). A partir de então, foram numerosos os resultados publicados sobre a influência desta droga em vários tipos de células e em variadas funções (Eigsti & Dustin, 1955), sendo a maior parte dos efeitos explicados pela interacção da colquicina com os microtúbulos.

Os primeiros estudos sobre a acção da colquicina na mitose revelaram que, por acção deste alcalóide, as células são bloqueadas em metafase. A colquicina actua assim, especificamente, no ciclo mitótico por inibição da formação dos microtúbulos do fuso, originando núcleos poliplóides. No entanto, esta acção inibitória só ocorre se

a colquicina estiver presente, em quantidade suficiente, no fim da profase e o efeito desaparece rapidamente após a remoção da droga (Deysson, 1968). Numerosos trabalhos, alguns dos quais utilizando colquicina marcada radioactivamente, mostraram que esta droga impede a polimerização dos microtúbulos, por ligação à tubulina (Taylor, 1965; Borisy & Taylor, 1967 a,b; Wilson & Meza, 1973), tendo-se verificado que a ligação se efectua com uma das subunidades da proteína (Owellen et al., 1972). Esta ligação, dependente da temperatura, é do tipo de ligação de hidrogénio e/ou ligação hidrofóbica (Margulis, 1973).

A acção da colquicina foi ensaiada em vários modelos celulares, nomeadamente, em culturas tanto de células animais (Taylor, 1965) como vegetais (Jeffs & Northcote, 1967; Hepler & Jackson, 1969) visando principalmente o efeito produzido nos microtúbulos do fuso mitótico. No entanto, a colquicina afecta também outros microtúbulos, que não fazem parte do fuso mitótico, nomeadamente os microtúbulos citoplasmáticos intervenientes nas várias fases da diferenciação da parede das células vegetais (Pickett-Heaps, 1967), os microtúbulos do axopódio de *Actinosphærium nucleophilum* (Barrett) (Tilney, 1968), os microtúbulos de células musculares em diferenciação (Warren, 1968) e também microtúbulos do estroma dos plastídios duma planta superior (Salema & Santos, 1980). De salientar também que nem todos os microtúbulos são sensíveis à colquicina. A insensibilidade à acção deste alcalóide manifestou-se nos microtúbulos de flagelos (Behnke & Forer, 1967; Brown & Bouck, 1973), de aparelhos mitóticos isolados (Sauaia & Mazia, 1961), das hifas de um fungo (Heath, 1975) e das células radiculares de *Colchicum* sp. (Santos-Dias & Mesquita, 1977).

A acção da colquicina, durante a divisão meiótica e no posterior desenvolvimento do gametófito masculino, depende do estádio de desenvolvimento das células, da concentração da droga e do tempo de tratamento, ainda que outras alterações das células acompanhem a actuação deste alcalóide (Eigsti & Dustin, 1955). Assim, as anteras do material em estudo foram submetidas à acção da colquicina, a fim de apreciar não só a interferência com o processo meiótico mas também as

alterações produzidas nas células do gametófito e do esporófito, nomeadamente no tapete.

Nas células do tapete e, logo após 24 horas de tratamento, assistia-se a uma hipertrofia das cisternas do retículo endoplasmático rugoso (Figs. 137,138) que ocorria para quaisquer das concentrações ensaiadas (0,05%, 0,5% e 1%). Algumas alterações foram observadas no aparelho de Golgi, verificando-se a deposição de vesículas na vizinhança dos dictiossomas (Figs. 138,139). Em certos casos, era evidente a desintegração quase total dos dictiossomas, originando as vesículas de transporte (Fig. 139). Os restantes organelos celulares não apresentavam modificações significativas, mas a análise pormenorizada de várias microfotografias de células tratadas, não revelou quaisquer microtúbulos citoplasmáticos.

Nas células polínicas, durante a meiose, foram também observados alguns efeitos da colquicina, além da interferência com a divisão nuclear. Assim, em determinadas zonas do invólucro nuclear verificou-se, na região entre os poros, o afastamento das membranas interna e externa, originando a formação de dilatações localizadas (Fig. 140). No citoplasma destas células, as cisternas de retículo endoplasmático, além de certa dilatação, dispunham-se em arranjos mais ou menos concêntricos, que também se observavam nos elementos da "annulate lamellæ", característicos destas células (Fig. 141). Os dictiossomas apresentavam um certo grau de desorganização, surgindo dilatadas as vesículas associadas aos dictiossomas (Fig. 142). De salientar, após tempos de tratamentos prolongados (48 e 72 horas), o aparecimento entre os cromossomas de agregados de túbulos cujo diâmetro individual era de 10-15 nm (Fig. 143). Agregados semelhantes embora de dimensões mais elevadas (25-40 nm de diâmetro) foram também observados, para as mesmas concentrações, mas já na fase de micrósporo uninucleado (Fig. 144). Em alguns destes túbulos, imagens favoráveis revelavam uma estriação transversal (Fig. 144, encaixe). No citoplasma do micrósporo eram frequentes, nas células tratadas, arranjos de retículo endoplasmático rugoso, tipo "nebenkern" (Fig. 145). Todas estas alterações foram observadas quer quando a colquicina era fornecida à planta em solução aquosa

Efeito da colquicina nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch.

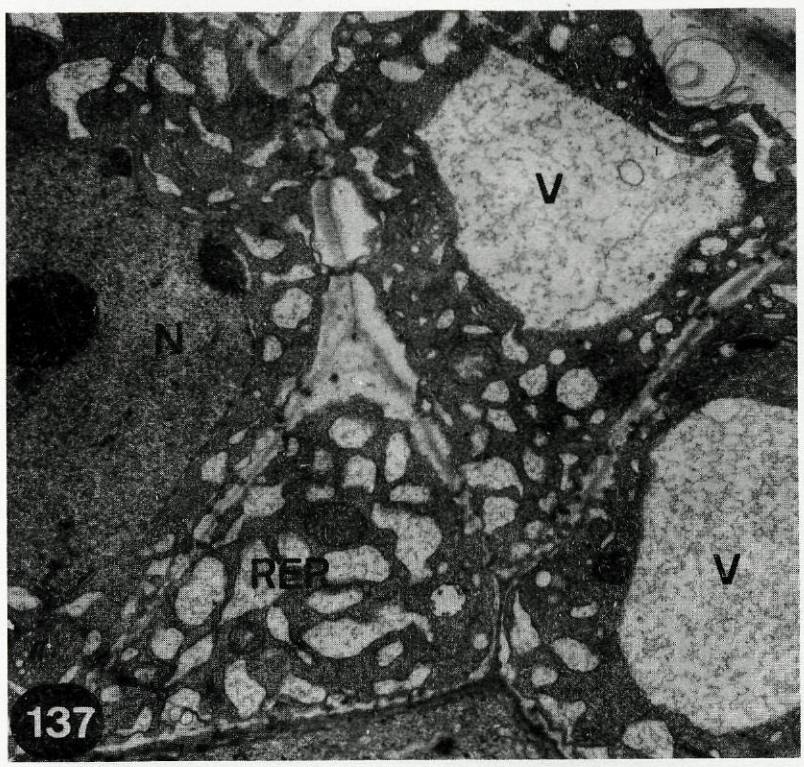
Fig. 137 - Aspecto das células do tapete sendo evidente a hipertrofia das cisternas do retículo endoplasmático rugoso (RER). N - núcleo; V - vacúolo. 7 800X.

Figs. 138, 139 - Porções de células do tapete mostrando a desorganização dos dictiossomas (D) que apresentam vesículas agrupadas na vizinhança das cisternas . RER - retículo endoplasmático rugoso.
Fig. 138 - 17 500X; Fig. 139 - 25 000X.

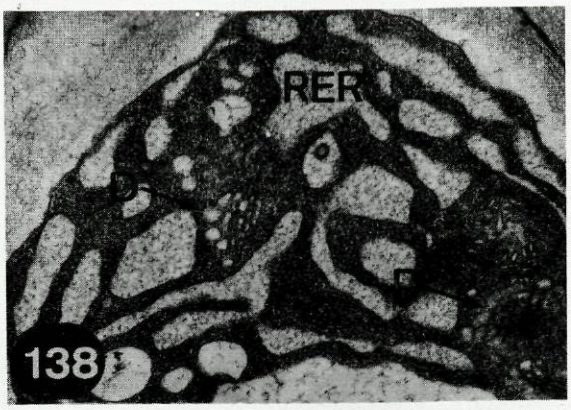
Fig. 140 - Célula polínica durante a meiose. O invólucro do núcleo (N) apresenta locais de dilatação (c). Os elementos do retículo dispõem-se em arranjos mais ou menos concêntricos (RER). 11 400X.

Figs. 141-143 - No citoplasma das células polínicas, os elementos da "annulate lamellæ" (AL) surgem em disposição concêntrica (Fig. 141), os dictiossomas (D) apresentam certo grau de desorganização com dilatação das vesículas (pontas de setas) (Fig. 142) e observam-se também agregados de microfilamentos (setas) (fig. 143).
Fig. 141 - 11 400X; Fig. 142 - 20 000X; Fig. 143 - 25 000X.

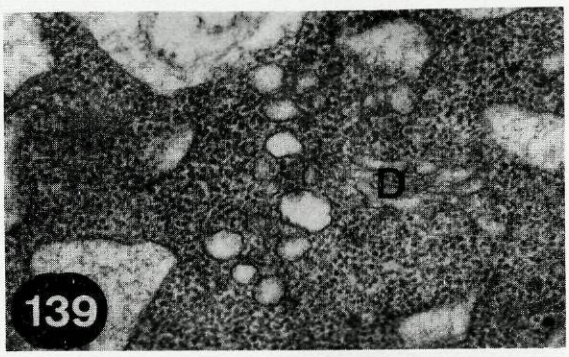
Figs. 144, 145 - Aspectos do citoplasma do micrósporo uninucleado. Os agregados de túbulos (Fig. 144, setas) apresentam dimensões mais elevadas do que os observados nos meiócitos, e em alguns distingue-se uma estriação transversal (Fig. 144, encaixe- pontas de setas). O retículo endoplasmático rugoso assume configurações tipo "nebenkern" (fig. 145).
Fig. 144 - 15 000X; encaixe - 34 200X; Fig. 145 - 14 400X.



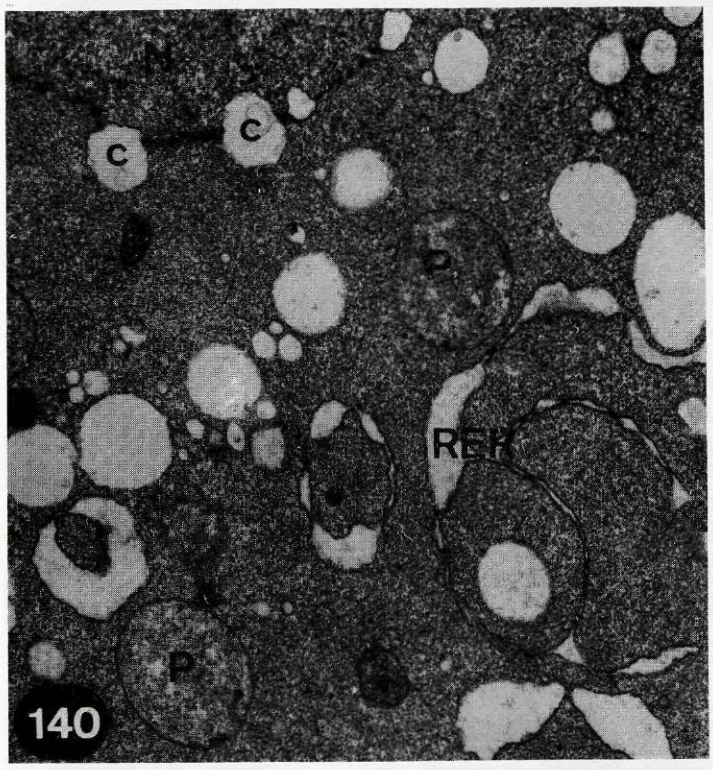
137



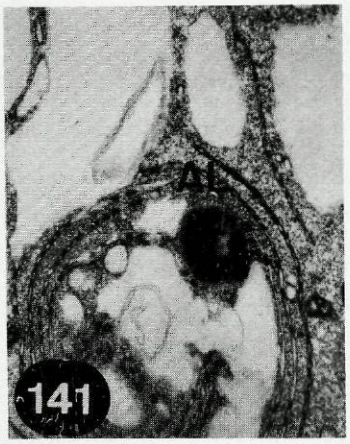
138



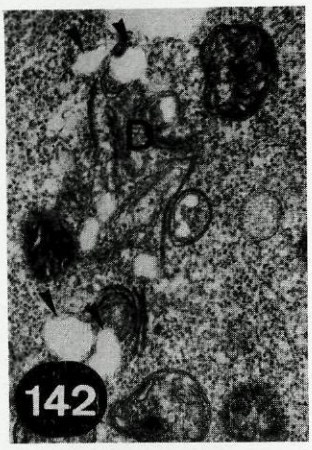
139



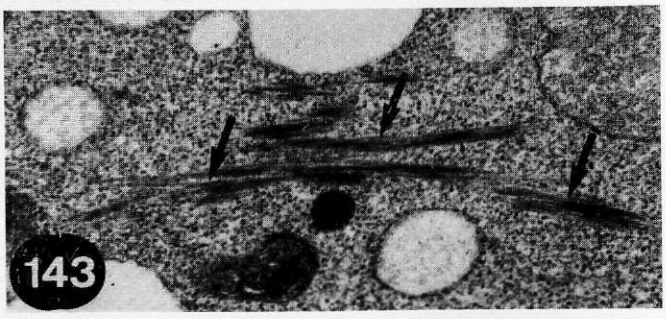
140



141

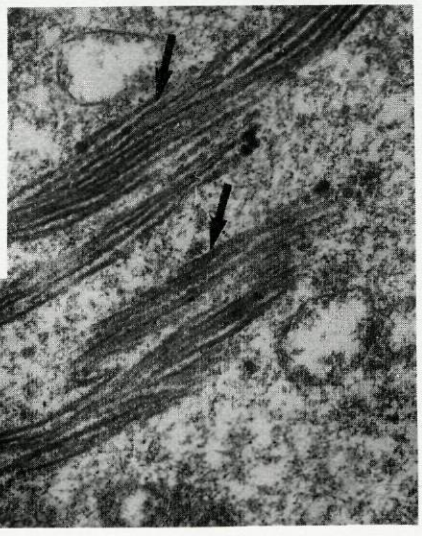


142

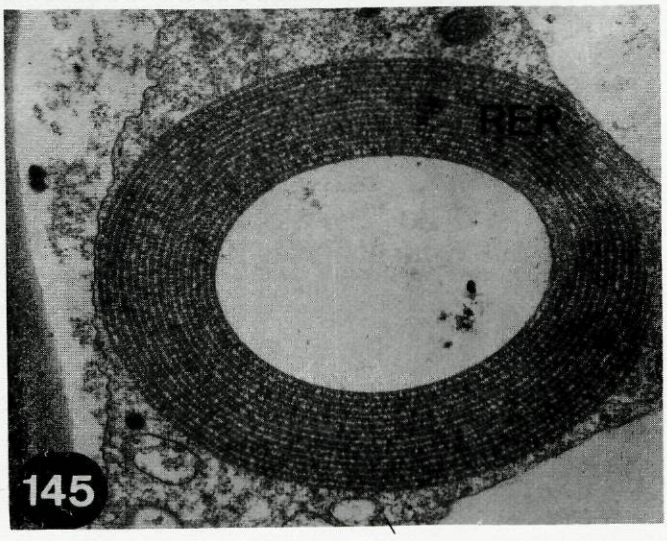


143





144



145

ou em tampão fosfato. De referir, que o tratamento com este alcalóide conduzia à degenerescência de elevado número de células, tal como foi referido em culturas de micrósporos isolados (Nitsch, 1977) e no pólen de outra Cucurbitaceæ (Basu & Datta, 1977), onde também foram descritas alterações da morfologia e dimensões dos grãos, assim como aumento da esterilidade. Não se observaram, contudo, alterações na deposição da exina, referidas como um dos efeitos da acção da colquicina (Heslop-Harrison, 1971 a).

3.4 GLUCOSE E SACAROSE

Durante a microsporogénese, os hidratos de carbono desempenham um papel importante nos vários processos metabólicos que, a partir das células mães do grão de pólen, originam a geração haplóide.

Durante a germinação do grão de pólen e o crescimento do tubo polínico, os açúcares são utilizados como substratos tanto para os processos respiratórios como para a formação da parede do tubo e para a síntese do amido. Em muitas plantas, o crescimento do tubo polínico é influenciado pela adição de sacarose ao meio de cultura (Hrabetová & Tupy, 1964; Stanley, 1971; Ferrari & Wallace, 1975; Nygaard, 1977; Sfakiotkis, 1978; Singh et al., 1977; Nakamura et al., 1980; Dhawan & Malik, 1981; Kamizyô & Tanaka, 1982; Nakamura & Suzuki, 1985) embora, em algumas espécies, a glucose tenha sido o melhor substrato (Hrabetová & Tupy, 1964; Nakamura et al., 1980).

A acção da sacarose tem sido também salientada durante a cultura de células polínicas, permitindo a divisão das células mães do pólen de *Tradescantia* L. (Shimakura, 1934) e, em determinadas concentrações, a mitose do núcleo germinativo (Kamizyô & Tanaka, 1982) ou promovendo a diferenciação de plantas a partir do pólen, em culturas de anteras de várias espécies (Nitsch & Nitsch, 1969; Keller et al., 1975; Nitsch, 1977; Sopory, 1979; Maheshwari et al., 1980, 1982; Dunwell & Thurling, 1985; Marsolais & Kasha, 1985).

A sacarose é utilizada como fonte principal de carbono para a formação do

amido que se acumula nos plastídios (Porter, 1962). Numa célula, podem coexistir plastídios que produzem amido e outros que não apresentam esta capacidade biossintética, o mesmo sucedendo com os plastídios de muitos tecidos e de diferentes zonas da mesma planta (Jenner, 1982). No entanto, o amido pode ser induzido experimentalmente nos plastídios de quase todas as espécies e em zonas da planta que normalmente não o acumulam. Os cromoplastídios da polpa do fruto de *Solanum tuberosum* L. acumulavam amido após 24 horas de incubação de fragmentos deste tecido em solução aquosa de sacarose a 4% (Salema, 1969). Em muitas Monocotyledoneæ que não produzem amido, os plastídios passaram a acumular este hidrato de carbono, após incubação de tecidos destas espécies em soluções de sacarose (Gateś & Simpson, 1968). O mesmo se verificou em espigas isoladas de *Triticum aestivum* L. (Jenner & Rathjen, 1972 a,b), no endosperma das sementes da mesma espécie (Jenner & Rathjen, 1975), em fragmentos de folha de *Cucumis sativus* L (Van Hasselt & Strikwerda, 1976) e no grão de *Oryza sativa* L. (Singh et al., 1978). Em fragmentos de folha de *Nicotiana tabacum* L. (Herold, 1978) e do endosperma de milho (Shannon & Liu, 1984) o amido acumulava-se após a incubação, quer em sacarose quer em glucose.

Para o estudo da acção destes dois hidratos de carbono, nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch., hastes florais foram mergulhadas em soluções aquosas de sacarose e glucose a 4% e colocadas na obscuridade durante vários períodos de tempo (24, 48, 72 e no caso da glucose, prolongamento até 98 horas).

Após o tratamento com a glucose, verificou-se que, nas células esporogénicas e nas células mães do pólen no início da meiose, os plastídios acumulavam grãos de amido (Fig. 146). Esta situação é idêntica à encontrada nas células do controlo, embora nos plastídios das células tratadas apareçam mais que um grão de amido, enquanto que no controlo apenas se observava um grão deste hidrato de carbono por plastídio.

Durante o ciclo meiótico e nas fases subsequentes não se registaram alterações em relação às células do controlo. De referir que após o início da deposição da parede

Efeito da glucose e da sacarose nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch.

Figs. 146 a 149 - Células tratadas com glucose

Fig. 146 - Aspecto de uma célula mãe, no início de meiose. Os plastídios apresentam amido, em alguns casos (pontas de setas) com mais do que um grão deste polissacarídeo por organelo. 4 000X.

Fig. 147 - Aspecto de uma célula mãe, em estádio avançado de meiose. Os plastídios (P) estão pouco diferenciados e não acumulam amido. 21 000X.

Fig. 148 - Porção de célula do tapete. Plastídio (P) semelhante aos das células de controlo. M - mitocôndria; RER - retículo endoplasmático rugoso; PC - parede celular. 19 000X.

Fig. 149 - Porção de uma célula da parede da antera mostrando plastídios com amido (A). PC - parede celular. 16 800X.

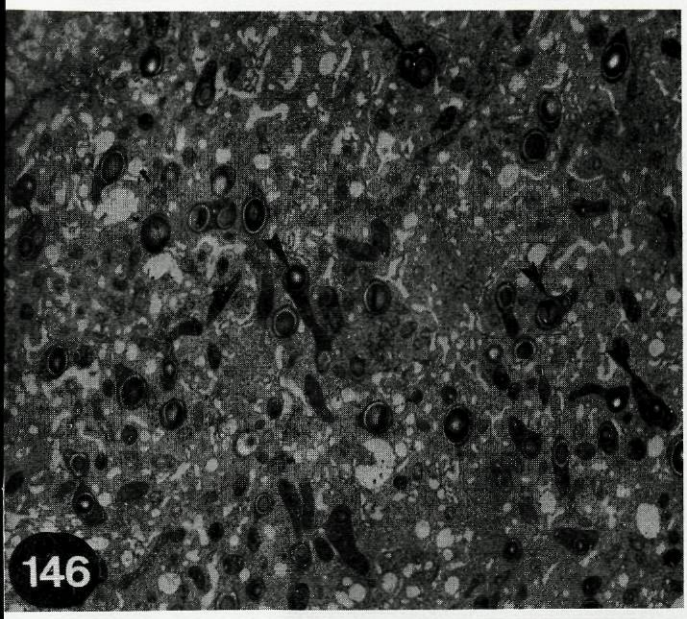
Figs. 150 a 153 - Células tratadas com sacarose

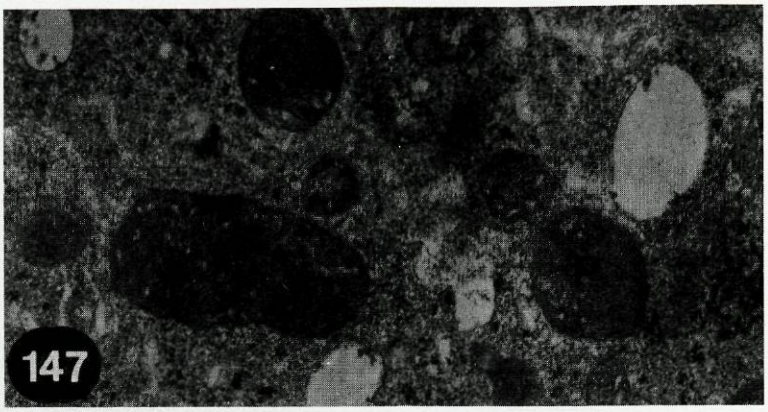
Fig. 150 - Aspecto de uma célula mãe, no início da meiose. Plastídios com amido (A). 10 200X.

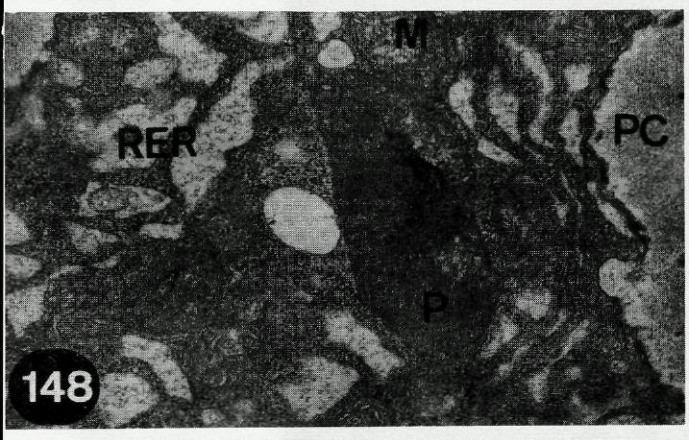
Fig. 151 - Aspecto de uma célula mãe, em estádio avançado de meiose. Plastídio (P) pouco diferenciado, sem amido. 17 500X.

Fig. 152 - Porção de uma célula do tapete. Os plastídios (P) assemelham-se aos das células do controlo e não acumulam amido. M - mitocôndria; D - dictiossoma. 21 600X.

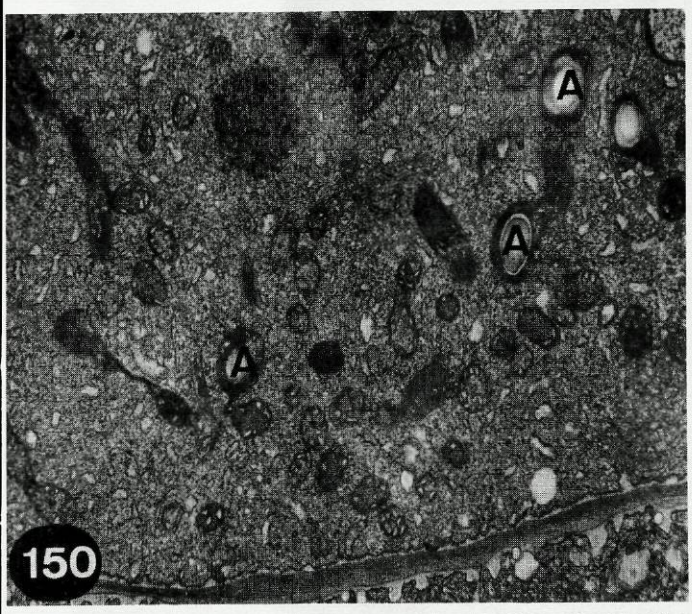
Fig. 153 - Aspecto de uma célula da parede da antera com os organelos característicos: núcleo (N), mitocôndrias (M), retículo endoplasmático (RE) e plastídios (P). De notar que os plastídios não possuem amido. 14 400X.

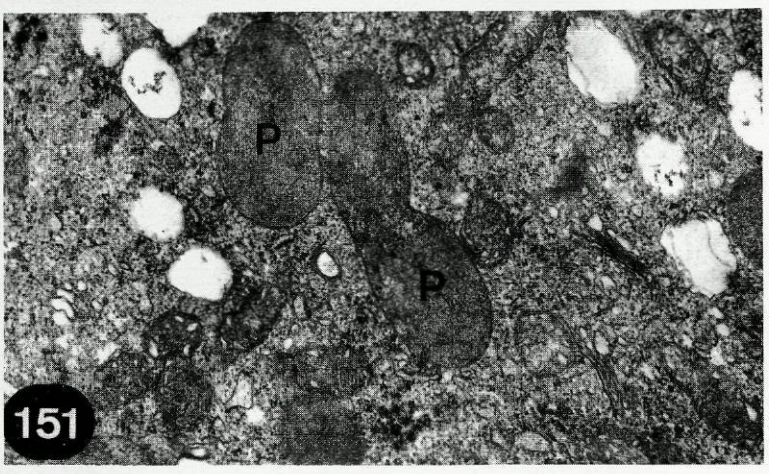

146


147


M
RER
PC
P
148


A
A
A
149


A
A
A
150


P
P
151


M
P
P
152


P
N
RE
153

da calose, os plastídios das células mães do pólen, já não apresentavam amido (Fig. 147), mesmo quando se prolongava o tempo de tratamento com a solução aquosa da glucose. A mesma situação ocorreu em relação às células do tapete (Fig. 148). Porém, na fase inicial da microsporogénese, os plastídios das células da parede da antera passaram a acumular amido (Fig. 149), logo após 24 horas de incubação na solução de glucose.

Quando as hastes florais eram mergulhadas numa solução aquosa de sacarose, os plastídios dos meiócitos assemelhavam-se ao controlo, apenas se observando um grão de amido por plastídio (Fig. 150). Após o início da deposição da calose, os plastídios deixavam de apresentar este polissacarídeo (Fig. 151). Nas células do tapete (Fig. 152), os plastídios apresentavam um sistema tubular complexo mas não acumulavam amido. Nas células da parede da antera (Fig. 153) e, contrariamente ao registado após incubação com a solução de glucose, no estroma dos plastídios nunca se observou amido.De referir, no entanto, que o teste de Benedict, para a detecção de açúcares redutores, realizado com amostras retiradas do meio de incubação deu resultado negativo após 24 horas mas já acusava alguma positividade para mais de 48 horas de tratamento. Tais resultados indicavam, portanto, que a sacarose após 24 horas ainda se encontrava no meio de incubação, mas tinha sido posteriormente hidrolisada.

4. LOCALIZAÇAO CITOQUÍMICA DE ALGUMAS ENZIMAS A NÍVEL ULTRAESTRUTURAL NAS ANTERAS DE *CUCURBITA POLYMORPHA* DUCH.

Durante o desenvolvimento do pólen, desenrolam-se variados processos metabólicos, aos quais está associada a actividade de numerosas enzimas. Durante a microsporogénese, as mais activas são as relacionnadas com a replicação do DNA, a síntese do RNA e o desenvolvimento da parede do pólen. No grão de pólen, tecido não clorofilino, e especialmente associadas com a parede, numerosas enzimas metabolizam os substratos, quer endógenos quer exógenos, essenciais à germinação do tubo polínico (Stanley & Linskens, 1974).

Na sequência deste estudo, sobre a intervenção das células do tapete durante o desenvolvimento do pólen, estudou-se a localização de algumas enzimas, a nível ultraestrutural, a fim de apreciar a actividade metabólica destas células. Assim, seleccionaram-se algumas enzimas, que incluiram três hidrolases, uma liase e uma oxidoredutase. A classificação das várias enzimas ensaiadas foi baseada nas Recomendações do Comité de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica (1978) (1).

Nas reacções de localização enzimática é, normalmente, necessário fixar os tecidos. No entanto, parece haver uma relação directa entre a acção do fixador e o grau de inactividade da enzima. Este efeito depende do tipo e da concentração do fixador assim como da temperatura e do tempo de fixação. Nestes estudos de citoquímica foi, assim, necessário reduzir o tempo utilizado na fixação de rotina com o glutaraldeído e, em outros casos, ou reduzir a sua concentração ou fazer actuar conjuntamente outro fixador, enzimaticamente menos agressivo (formaldeído). Quaisquer destas alterações, embora permitissem uma melhor preservação da actividade enzimática, traduziram-se consequentemente numa deficiente fixação da ultraestrutura das células.

---

(1) "Recommendations of the Nomenclature Committee of the Intern. Union of Biochem. on the Nomenclature and Classification of Enzymes". Acad. Press (1979).

4.1. HIDROLASES

4.1.1 - Fosfatase ácida (E.C. 3.1.3.2.)

A fosfatase ácida foi das enzimas mais extensivamente estudada e detectada no pólen das variadas espécies (Brewbaker, 1971; Stanley & Linskens, 1974).

A nível ultraestrutural, com a utilização de técnicas de citoquímica, foi possível, em algumas espécies (Horvat, 1969; Knox & Heslop-Harrison, 1971 a; Nakamura, 1979; Shoup et al., 1981) associar a actividade da fosfatase ácida com a intina da parede do grão de pólen. Esta enzima foi responsabilizada pela desintegração da intina, aquando da germinação do pólen (Nakamura, 1979). Em algumas plantas, o citoplasma das células mães do pólen, durante a profase meiótica, apresentavam níveis elevados de enzimas hidrolíticas (Knox et al., 1970, 1971), entre as quais a fosfatase ácida que foi identificada por métodos citoquímicos (Bird et al., 1983). Esta enzima hidrolítica foi também localizada citoquimicamente no tubo polínico de *Portulaca grandiflora* Hooker (Malik et al., 1969/70) e de *Prunus avium* L. (Lin et al., 1977).

Nas anteras das plantas, a fosfatase ácida foi considerada uma enzima de origem gametofítica (Knox et al., 1975; Vithanage & Knox, 1976, 1980) embora no pólen de *Helianthus annuus* L. (Vithanage & Knox, 1979) tenha também sido encontrada na exina, depósito das enzimas de origem esporofítica. Após a libertação dos esporos, o tapete apresentava uma elevada actividade da fosfatase ácida, que decrescia progressivamente e se transferia para a exina, após a dissolução do tapete.

Com a finalidade de saber se esta enzima estaria activa no tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch., fragmentos de anteras foram incubados no meio de Gomori, modificado por Miller & Palade (1964). De acordo com esta técnica, as peças foram colocadas no meio de incubação durante uma hora a 60°C e, posteriormente, a 37°C durante 1,2 e 4 horas. A marcação mais significativa observou-se ao fim de 4 horas de incubação. Nas células do tapete (Fig. 154), os depósitos electronicamente densos distribuiam-se junto do plasmalema, no invólucro dos plastídios e das mitocôndrias, e nos dictiossomas. Alguns plastídios apresentavam também marcação das membranas

Localização citoquímica da fosfatase ácida nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch.

Fig. 154 - Célula do tapete após incubação no meio de Gomori.Observam-se depósitos densos no invólucro dos plastídios (P) e das mitocôndrias (M), nos dictiossomas (D) e no plasmalema (pl). De notar que a parede celular (PC) não apresenta marcação. 15 000X.

Fig. 155 - Aspecto do sistema elaborado do retículo endoplasmático rugoso (RER) das células do tapete no mesmo meio de incubação, apresentando depósitos densos (pontas de setas) em associação com as membranas do retículo e dos organelos sequestrados. 28 000X.

Fig. 156 - Aspecto do material de controlo, incubado no meio de Gomori, sem substrato, não se distinguindo depósitos densos semelhantes aos da localização enzimática. RER - retículo endoplasmático rugoso. 30 000X.

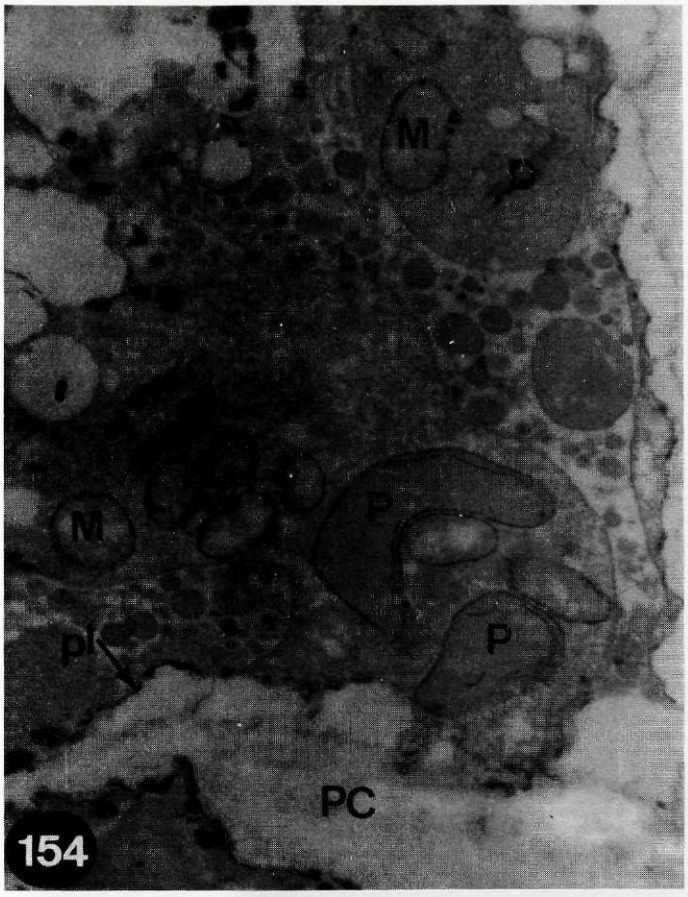
Localização citoquímica da ATPase nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch.

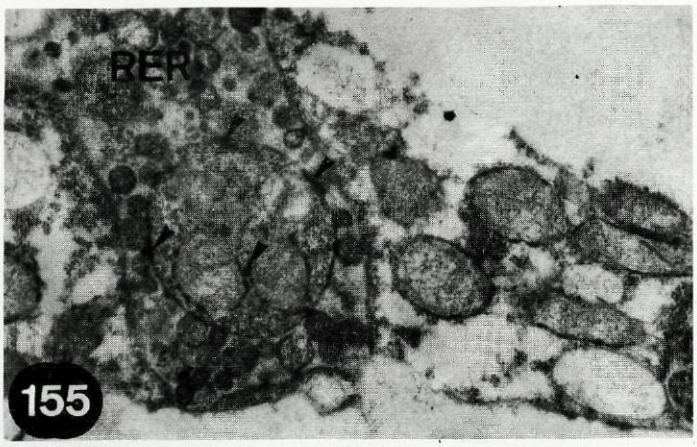
Fig. 157 - Célula do tapete após incubação no meio de Wachstein & Meisel. Os depósitos resultantes da reacção enzimática surgem associados com o plasmalema (pl) e o tonoplasto (to) e no interior dos vacúolos (V). RER - retículo endoplasmático rugoso; PC - parede celular. 20 400X.

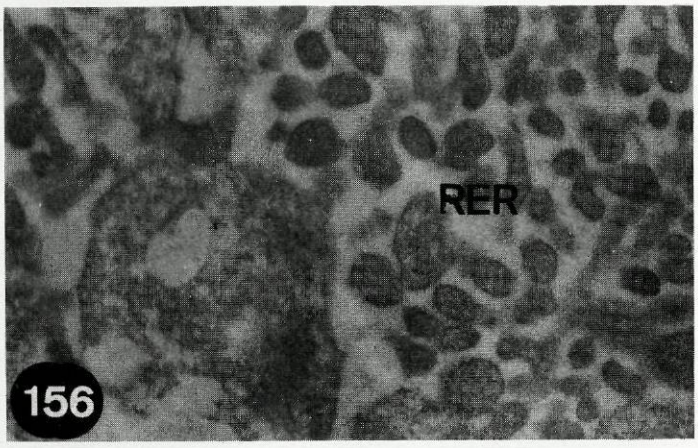
Fig. 158 - Aspecto das células do tapete nas experiências de controlo, não se observando marcação. RER - retículo endoplasmático rugoso; V - vacúolo; pl - plasmalema; depósitos de esporopolenina (setas). 31 000X.

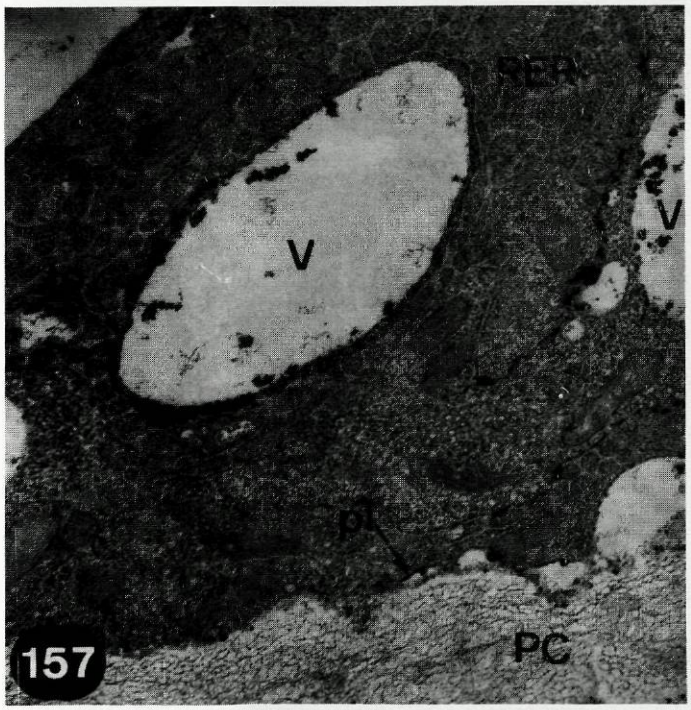
Fig. 159 - Estádio de tétrada, após incubação no meio de Wachstein & Meisel. Fase inicial da deposição da parede, observando-se já alguns depósitos de esporopolenina (setas) entre o plasmalema e a parede de calose (C). Os depósitos densos da reacção localizam-se nas cisternas de retículo endoplasmático (RE). 30 000X.

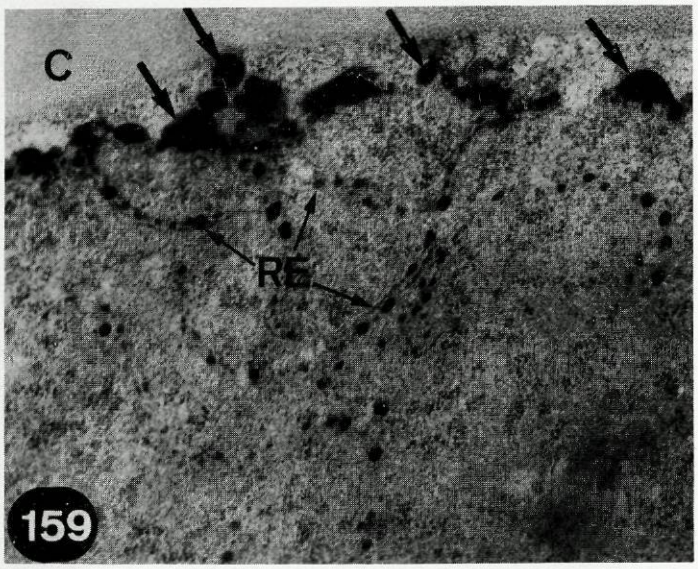
Fig. 160 - Estádio semelhante ao anterior, aparecendo marcados os vacúolos (V). 24 000X.


M
M
P
P
pl
PC
154

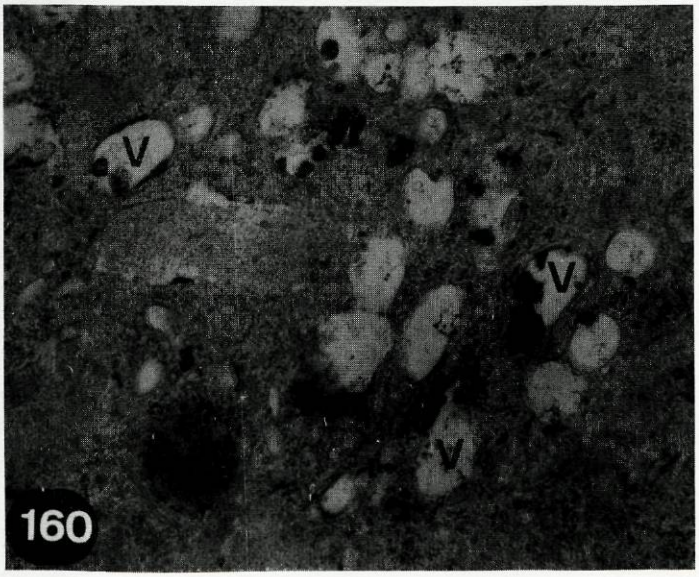

RER
155


RER
156


RER
V
V
pl
PC
157


C
RE
159


V
RER
158


V
V
V
160

estromáticas. Nas vesículas pleomórficas que caracterizam o retículo endoplasmático rugoso destas células, verificou-se também alguma marcação, tanto na membrana reticular como no invólucro dos organelos sequestrados (Fig. 155). Apesar da grande diversidade de organelos reactivamente positivos, não observamos marcação da parede celular e do núcleo.

Como controlo (Fig. 156), utilizou-se o meio sem substrato, e nos tecidos assim tratados não se verificou marcação.

De referir que, apesar da elevada marcação das células do tapete, nas células mães do pólen, durante a meiose, não se detectou marcação significativa.

4.1.2. Adenosina trifosfatase (ATPase)(E.C.3.6.1.3.)

São raras as referências da actividade da ATPase nos grãos de pólen (Brewbaker, 1971; Stanley & Linskens, 1974). A actividade desta enzima foi detectada, nomeadamente, no tubo polínico de *Portulaca grandiflora* Hooker (Malik et al., 1969/70) e, a nível ultraestrutural, no pólen de algumas espécies pertencentes a 5 famílias diferentes (Rowley et al., 1973). Posteriormente (Hedge & Andrade, 1982/83) foi referida a actividade desta enzima durante a microsporogénese em *Datura* L. O estudo efectuado revelou elevada actividade da enzima nas células do tapete e nas células mães durante a meiose. Durante a fase de tétrada observou-se uma diminuição da actividade que era novamente recuperada nos micrósporos livres e nos grãos de pólen, especialmente no citoplasma junto da parede.

Durante o estudo da microsporogénese em *Cucurbita polymorpha* Duch., procurou-se verificar a actividade e localização, a nível ultraestrutural, da ATPase. Esta enzima hidrolítica catalisa a hidrólise do ATP originando fosfato inorgânico e envolvendo libertação de energia. Fragmentos de anteras, pré-fixadas, foram incubadas no meio da Wachstein & Meisel (1957) segundo Rowley et al. (1973), durante 1 e 2 horas a 23^{o}C. Nas experiências testemunha, o material foi incubado no mesmo meio sem o substrato. Nas células do tapete, observou-se a deposição do produto da reacção essencialmente associado ao plasmalema e ao tonoplasto,

existindo também marcação no interior dos vacúolos (Fig. 157). Nas células do controlo (Fig. 158) estas membranas celulares não exibiam marcação.

Durante a fase inicial da formação da parede, com os micrósporos ainda envolvidos pela parede de calose (Fig. 159), verificou-se que membranas de retículo endoplasmático, dispostas na periferia do citoplasma apresentavam os depósitos electronicamente densos. Nos vacúolos do citoplasma (Fig. 160) observou-se também a deposição dos produtos de reacção.

4.1.3. Glucose-6-fosfatase (E.C.3.1.3.9)

A glucose-6-fosfatase é uma enzima importante no metabolismo dos hidratos de carbono. Esta enzima participa em variados processos metabólicos, nomeadamente na síntese da glucose-6-fosfato ou na sua hidrólise , originando, deste modo, glucose e fosfato inorgânico.

Embora se desconheça qualquer referência à presença desta enzima nos grãos de pólen ou nos tecidos da antera, tentamos conhecer a sua localização a nível ultraestrutural, durante a microsporogénese em *C. polymorpha* Duch..

Esta enzima é particularmente sensível aos fixadores. Embora o glutaraldeído tenha sido, inicialmente indicado como inactivando esta enzima, outros estudos (Goldfischer et al., 1964) demonstraram a actividade da glucose-6-fosfatase, após fixação com este dialdeído.

Fragmentos de anteras pré-fixados em glutaraldeído em tampão cacodilato, foram incubados no meio de Wachstein & Meisel (1956) modificado por Leskès e colaboradores (1971), durante 1 e 2 horas a 30^{o}C. Para melhor detectar o local de deposição dos produtos de reação observaram-se cortes ultrafinos não contrastados e outros apenas ligeiramente contrastados pelo citrato de chumbo.

Ao fim de 1 hora de incubação, as células do tapete apresentavam marcação ao nível do plasmalema (Fig. 161), que se tornava mais intensa quando o tempo de incubação atingia 2 horas (Fig. 162). Em alguns casos as imagens observadas sugeriam uma deposição dos depósitos densos ao longo dos plasmodésmios (Fig. 162).

Localização citoquímica da glucose-6-fosfatase nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch.

Figs. 161-163 - Células do tapete após incubação no meio de Wachstein & Meisel modificado por Leskès e colaboradores (1971).

Fig. 161 - Após 1 hora de incubação, o produto denso da reacção depositou-se no plasmalema (pl). PC - parede celular; RER - retículo endoplasmático rugoso. 25 800X.

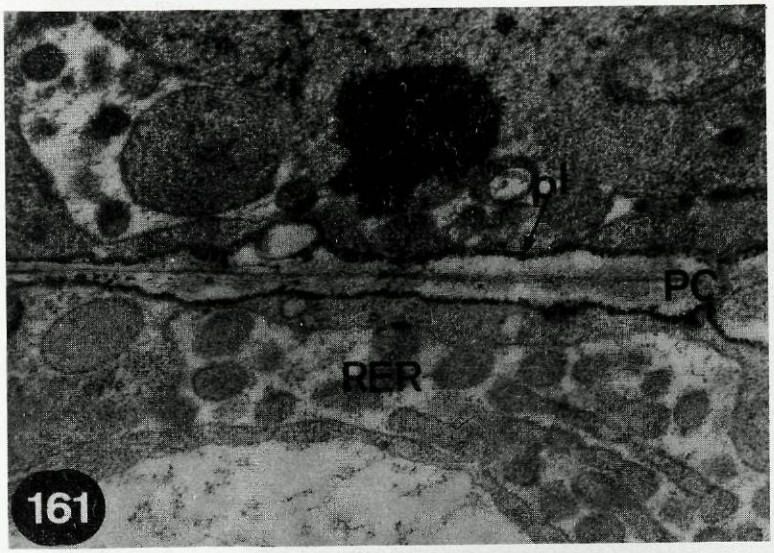
Fig. 162 - Após 2 horas de incubação, a marcação ao nível do plasmalema (pl) era mais intensa e os depósitos densos atravessavam a parede (PC) possivelmente, ao nível de um plasmodésmio (seta). 28 800X.

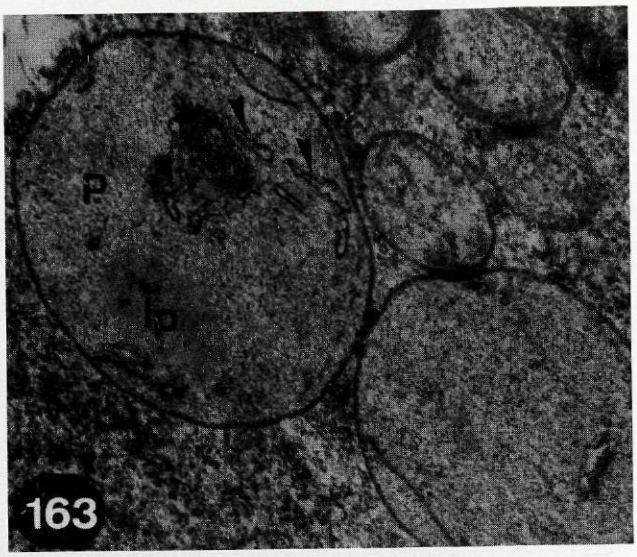
Fig. 163 - Aspecto de um plastídio (P), característico do tapete, apresentando uma inclusão paracristalina (Ip) e ligeira marcação do sistem lamelar (pontas de setas). 27 000X.

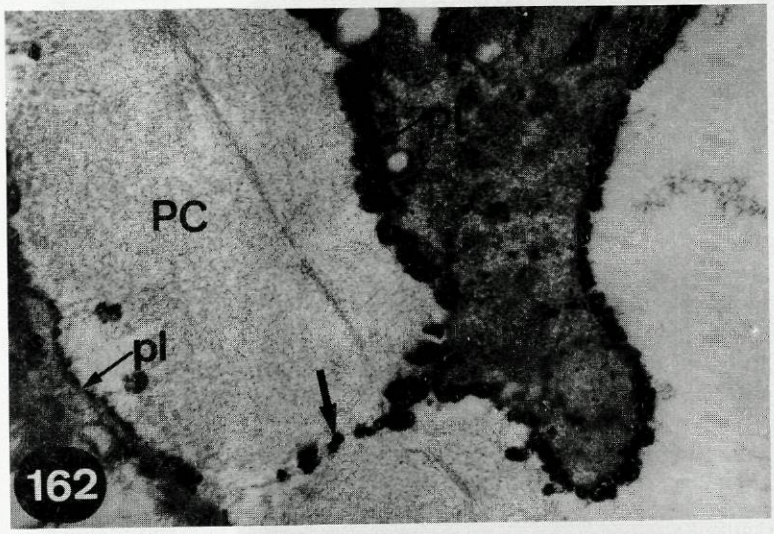
Fig. 164 - Aspecto de uma célula de controlo. O plasmalema (pl) não apresenta marcação. PC - parede celular; RER - retículo endoplasmático rugoso. 36 000X.

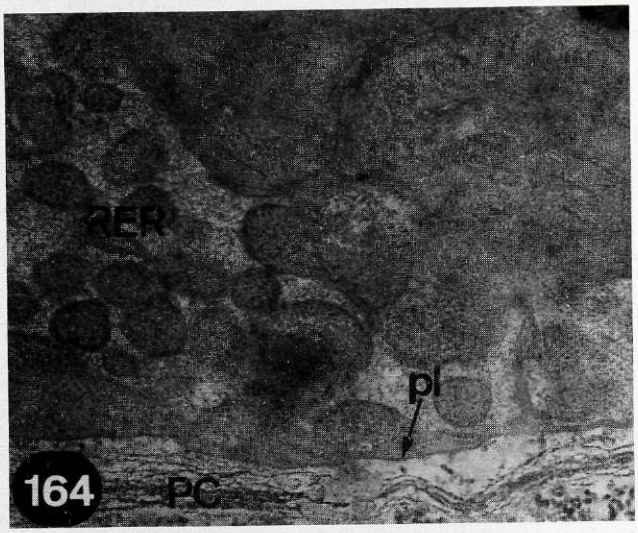
Fig. 165 - Células do tapete após incubação no meio com DMSO. Oservou-se marcação da cisterna perinuclear (CPN), do retículo endoplasmático (RE), dos dictiossomas (D) e das membranas das mitocôndrias (M) e dos plastídios (P). O plasmalema (pl) apenas apresentou uma ligeira reacção, em alguns locais (setas). Corte não contrastado. 23 500X.

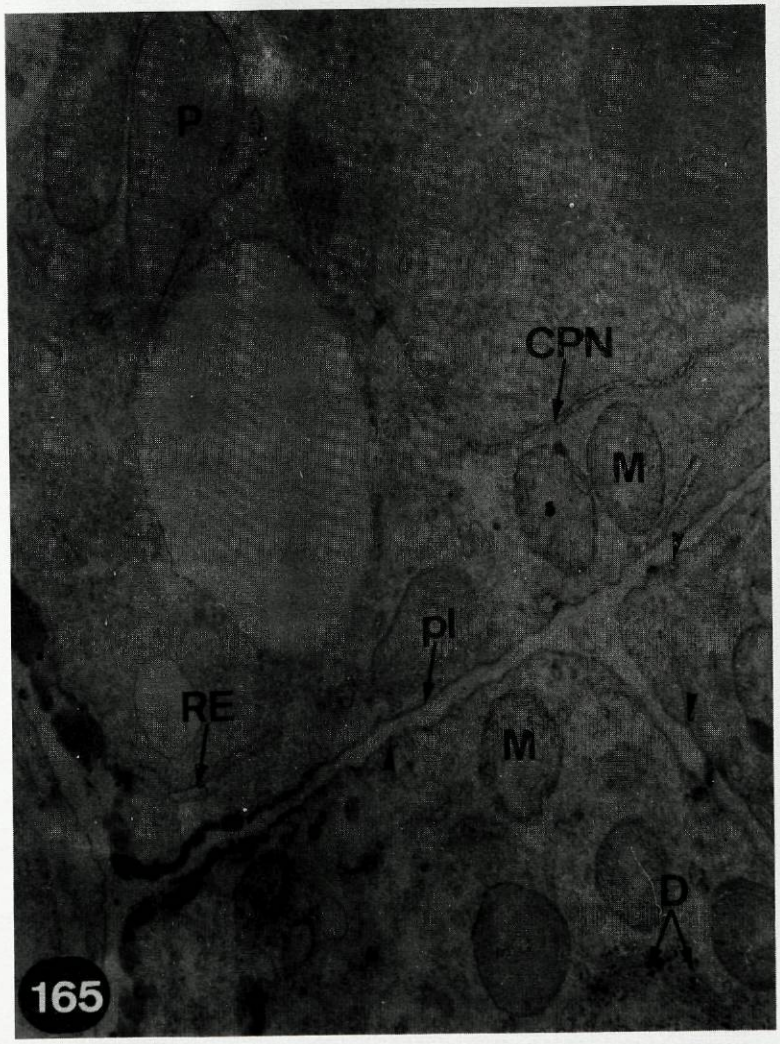
Fig. 166 - Aspecto de uma célula mãe do grão de pólen após incubação no meio com DMSO, apresentando marcação generalizada, nos dictiossomas (D), retículo endoplasmático (RE), membranas de mitocôndrias (M) e de plastídios (P) e membranas de alguns vacúolos (V). Corte não contrastado. 23 500X.

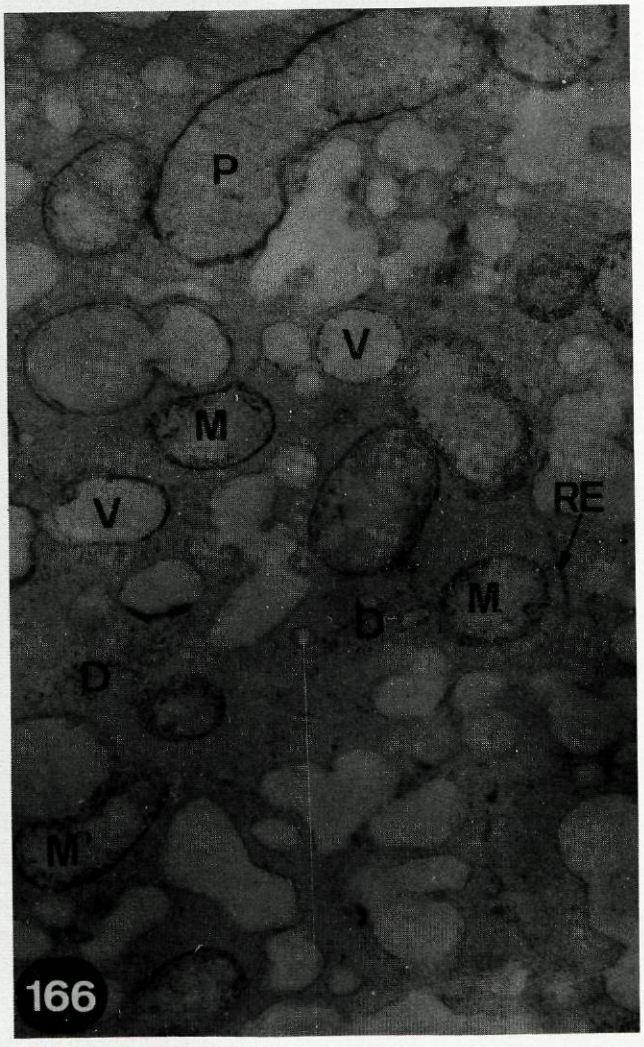

pl
PC
RER
161


P
163


PC
pl
162


RER
pl
164
PC


P
CPN
M
pl
RE
M
D
165


P
V
M
V
RE
M
D
M
166

Nos plastídios destas células (Fig. 163) registou-se uma ligeira marcação, localizada preferencialmente no sistema lamelar destes organelos. Nas experiências de controlo, os tecidos foram incubados no meio sem substrato, não se tendo observado marcação (Fig. 164).

Em face dos resultados observados e pondo a hipótese de que a fraca marcação das membranas plastidiais e ausência de marcação nas cisternas do retículo endoplasmático resultasse de deficiente penetração do meio de incubação, adicionou-se, ao referido meio, dimetilsulfóxido (DMSO). O tratamento com o DMSO tem permitido uma melhor preservação e marcação da actividade enzimática, pois este agente crioprotector acelera a penetração do meio de incubação (Hayat, 1974, 1981). A preservação da actividade enzimática após adição do DMSO ao meio de incubação, parece resultar do aumento da permeabilidade das membranas das células e/ou dos organelos (Ghajar & Harmon, 1968; Misch & Misch, 1968; Gander & Moppert, 1969), facilitando a penetração dos substratos.

Surpreendentemente, após incubação dos tecidos no meio adicionado com DMSO, a deposição do produto de reacção foi bastante generalizada. Nas células do tapete (Fig. 165) a marcação atingiu a cisterna perinuclear, os dictiossomas, os elementos de retículo endoplasmático e as membranas das mitocôndrias e dos plastídios. De referir, que o plasmalema só apresentava, uma ligeira marcação em poucos locais. Nas células mães do grão de pólen (Fig. 166) verificou-se uma deposição do produto denso da reacção nas membranas dos vários organelos celulares, marcação que não se observou quando o material foi incubado no meio sem DMSO.

4.2. LIASES

4.2.1. Ciclase adenílica (E.C.4.6.1.1.)

A ciclase adenílica (Sutherland et al., 1962) cataliza a formação do AMP cíclico a partir do ATP, na presença de iões magnésio. O pirofosfato inorgânico foi identificado como o outro produto da reacção (Rall & Sutherland, 1962).

Nesta reacção enzimática, o uso de ATP como substrato foi severamente

criticado pelo facto de ser também o utilizado para a actividade da ATPase, não sendo, assim, possível distinguir se os produtos da reacção resultavam da actividade de uma ou de outra enzima. Deste modo, foi usado no meio de incubação, um análogo do ATP em sua substituição, o adenilil-imidodifosfato (AMP-PNP) (Rodbell et al., 1971; Krishma et al., 1972; Howell & Whitfield, 1972), pela primeira vez sintetizado em 1971 por Yount e colaboradores. O AMP-PNP é convertido em AMP cíclico e imidodifosfato pela ciclase adenílica, mas não é hidrolisado pela ATPase. O AMP-PNP pode ser utilizado como substrato por outras enzimas, mas nenhuma está associada a membranas (Wagner & Bitensky, 1973).

Numerosos estudos citoquímicos utilizaram este substrato para demonstrar a localização da ciclase adenílica tanto nas células animais (Cheng & Farquhar, 1976; Cutler et al., 1977; Cutler, 1983; Hiura & Fujita, 1977; Fujimoto et al., 1981; Chen, 1982; Tzarvulkova-Denkova et al., 1982; Vorbrodt, 1984) como vegetais (Farnham, 1975; Al-Azzawi & Hall, 1976; Hilton & Nesius, 1978; Bhatla & Chopra, 1984; Nougarède et al., 1985).

Embora este método citoquímico tenha sido motivo de algumas críticas (Lemay & Jarett, 1975; Kempen et al., 1978), pelo facto do nitrato de chumbo ser utilizado numa concentração que poderia provocar a hidrólise não enzimática do AMP-PNP, outros estudos utilizando métodos bioquímicos e citoquímicos rejeitaram estas críticas (Cutler, 1975; Cheng & Farquhar, 1976).

Na literatura da especialidade não se encontraram referências quanto à localização citoquímica da ciclase adenílica nas anteras das plantas. De salientar apenas o trabalho de Katsumata e colaboradores (1978) referente a determinações bioquímicas no pólen em germinação de *Pinus densiflora* S. et Z.. Estes autores verificaram que a actividade da ciclase adenílica e o nível do AMP cíclico aumentava durante a germinação, mesmo na presença de certos antibióticos, admitindo assim que a concentração do AMP cíclico, regulada pela enzima, tinha um papel importante no início da germinação.

Na tentativa de localizar citoquimicamente a ciclase adenílica nas células do

Localização citoquímica da ciclase adenílica nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch.

Figs. 167,168 - Aspecto de parte de células do tapete após incubação no meio de Al-Azzawi & Hall (1976). A deposição do produto denso da reacção apareceu apenas nos dictiossomas (D). M- mitocôndria; V - vacúolo; depósitos de esporopolenina - pontas de setas.
Fig. 167 - 26000X; fig. 168 - 25 000X.

Fig. 169 - Aspecto de uma célula de tapete da experiência de controlo, onde se nota a ausência de marcação. D - dictiossoma; M - mitocôndria; RER - retículo endoplasmático rugoso. 30 000X.

Fig. 170 - Célula mãe do grão de pólen após incubação no meio de Al-Azzawi & Hall (1976). O produto denso da reacção aparece associado ao invólucro nuclear (IN), aos dictiossomas (D), ao retículo endoplasmático (RE) e a pequenas vesículas distribuídas pelo citoplasma (pontas de setas). Notar a ausência de marcação das mitocôndrias (M), dos plastídios (P) e do plasmalema (pl). 12 000X.

Fig. 171 - Aspectos de uma célula da parede da antera após incubação no meio de Al-Azzawi & Hall (1976). A marcação atinge o invólucro nuclear (IN), o retículo endoplasmático (RE), os dictiossomas (D) e os tilacóides dos plastídios (P) mas não se observa no invólucro destes organelos, assim como nas mitocôndrias (M) e no plasmalema (pl). 22 000X.

Localização citoquímica da citocromo oxidase nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch.

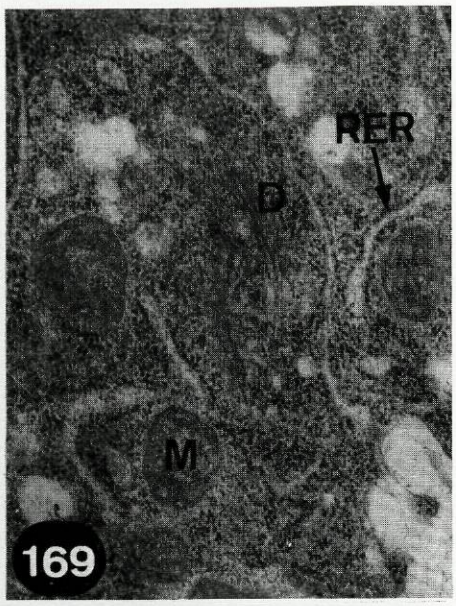
Figs. 172, 173 - Aspecto de células do tapete após incubação no meio de Opik (1975 a,b). A deposição do produto denso da reacção aparece associado às cristas das mitocôndrias (M). RER - retículo endoplasmático rugoso.
Fig. 172 - tempo de incubação -3 horas, 24 000X; Fig. 173 - tempo de incubação - 15 horas, 24 000X.

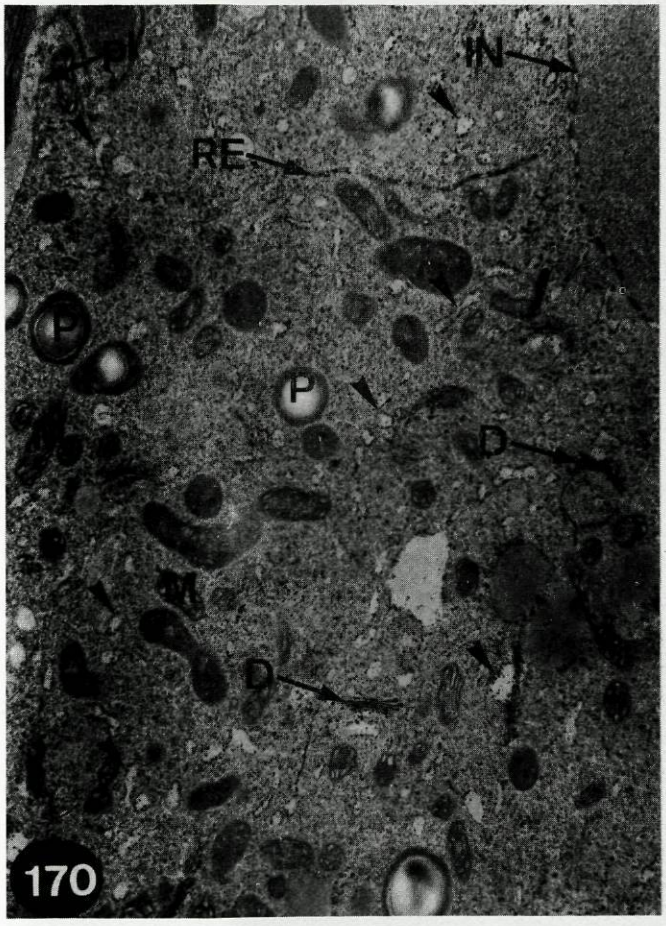
Fig. 174 - Aspecto da célula do tapete das experiências de controlo. Notar a ausência de marcação. M - mitocôndria; RER - retículo endoplasmático rugoso. 16 800X.

Fig. 175 - Aspecto de mitocôndrias das células mães do pólen, observando-se alguma deposição do produto denso da reacção nas cristas mitocondriais (pontas de setas). 18000X.


M
D
167

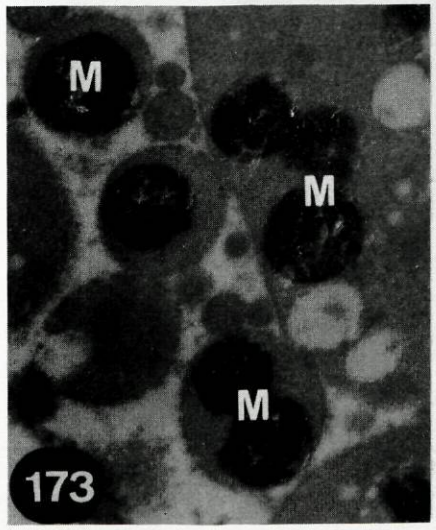

V
M
168

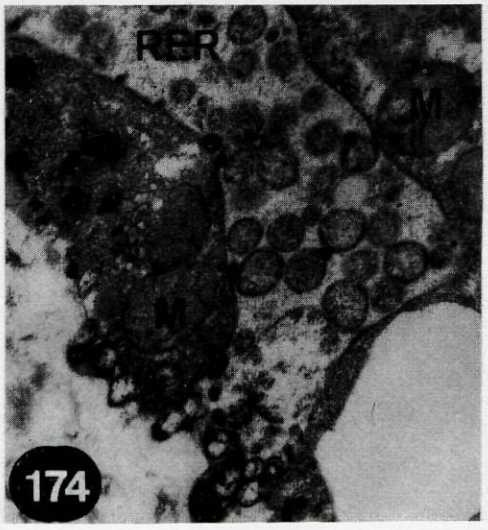

RER
D
M
169


IN
RE
P
P
D
M
D
170


IN
RE
M
P
P
D
pl
171


RER
M
M
M
172


M
M
M
173


RER
M
M
174


175

tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch., fragmentos de anteras, pré-fixadas em glutaraldeído-formaldeído, foram incubados no meio de Al-Azzawi & Hall (1976), sem incluir o dextran associado ao tampão, durante 2 horas a 35° C. Nas experiências de controlo, utilizou-se o mesmo meio sem substrato (AMP-PNP).

Nas células do tapete (Figs. 167,168) a marcação surgiu preferencialmente associada aos dictiossomas, enquanto que os restantes organelos citoplasmáticos não apresentavam os produtos densos da reacção. Nas células de controlo (Fig. 169) não se observou qualquer depósito que traduzisse a actividade da enzima.

Curiosamente, as células que rodeiam o tapete apresentavam uma marcação mais generalizada. Assim, nas células mães do grão de pólen (Fig. 170) além dos dictiossomas, os produtos da reacção surgiam associados às membranas do invólucro nuclear, do retículo endoplasmático e de numerosas vesículas distribuídas pelo citoplasma. De notar que o sistema membranoso das mitocôndrias e dos plastídios, e o plasmalema não apresentavam marcação. Nas células da parede (Fig. 171) que rodeiam externamente o tapete, a marcação apareceu associada ao invólucro nuclear, ao retículo endoplasmático e aos dictiossomas mas também aos tilacóides dos cloroplastos. Não se registou marcação do plasmalema e das mitocôndrias.

Os resultados obtidos mostraram assim, que os diferentes tecidos constituintes da antera mostram uma distribuição diferente desta enzima hidrolítica.

4.3. OXIDOREDUTASES

4.3.1. Citocromo c oxidase (E.C.1.9.3.1.)

Em estudos efectuados sobre a evolução e participação das células do tapete na microsporogénese, as mitocôndrias foram dos organelos hipoteticamente relacionados com a síntese da esporopolenina (Krajachenko, 1925; Heslop-Harrison, 1962). Deste modo, tornava-se importante conhecer a actividade metabólica das mitocôndrias, nas quais se processa a fosforilação oxidativa durante a respiração. A cadeia respiratória compreende uma série de citocromos (proteínas contendo ferro) que asseguram, sequencialmente, a transferência de electrões, desde as flavoproteínas até ao

oxigénio molecular. O citocromo terminal que reage com o oxigénio molecular designa-se citocromo oxidase, sendo constituído pelos citocromos a e a_3. Uma vez que a reacção está dependente do citocromo c, o termo citocromo oxidase aplica-se, frequentemente ao conjunto dos citocromos a, a_3 e c (Sexton & Hall, 1978).

A localização citoquímica, a nível ultraestrutural da citocromo c oxidase, serviu para verificar a funcionalidade das mitocôndrias do tapete, nas anteras de *C. polymorpha* Duch. Para a localização desta enzima, ensaiou-se o meio de Öpik (1975, a,b) que utiliza como substrato o 3',3'-diaminobenzidina (DAB). Este substrato foi, inicialmente, incluído no meio de incubação para a detecção da citocromo c oxidase por Seligman e colaboradores (1968). Estes autores verificaram que o DAB é oxidado originando um produto insolúvel, que polimeriza espontaneamente e reage com o tetróxido de ósmio, depositando-se sob a forma de um composto electronicamente denso, designado por "negro de ósmio".

Foi também demonstrado que o DAB intervém na reacção ao nível do citocromo c, reduzindo-o e é, por sua vez, reoxidado pelos restantes citocromos do complexo. Esta sequência de reacção que se opera na superfície externa da membrana mitocondrial interna, foi também confirmada por estudos bioquímicos (Cammer & Moore, 1973), que demonstraram a utilização do oxigénio, durante a incubação de mitocôndrias com DAB e a interacção do substrato ao nível do citocromo c, na cadeia respiratória.

Nas células das plantas, o DAB foi usado como substrato para a localização ultraestrutural de várias enzimas oxidativas, nomeadamente a peroxidase (Czaninski & Catesson, 1969, 1970; Poux, 1969, 1974; Hall & Sexton, 1972,1974; Henry & Jensen, 1973;Goff, 1975; Hanzely & Vigil, 1975; Henry 1975, b,c; Giordani, 1977; Catesson et al., 1978; Czaninski, 1978; Micalef, 1978; Olah & Mueller, 1981) e a catalase (Frederick & Newcomb, 1969; Marty, 1970 a; Vigil, 1970; Henry & Jensen, 1973; Bierglmayer et al., 1974; Hanzely & Vigil, 1975; Henry, 1975 b). A oxidação do DAB, por acção da luz, foi usada para localizar a actividade do fotossistema I nos tilacóides dos plastídios (Nir & Seligman, 1970; Nir & Pease, 1973; Marty , 1977;

Porat et el., 1978; Wrischer, 1977, 1978 b).

Fragmentos de anteras, pré-fixados em glutaraldeído, foram incubados no meio de Öpik, durante vários períodos de tempo, entre 3 a 15 horas, a 27°C. Como controlo, utilizou-se o mesmo meio a que se omitiu o substrato. As incubações, quer das experiências de localização enzimática, quer das experiências de controlo, foram realizadas na obscuridade, pelo facto do DAB sofrer oxidação não enzimática por acção da luz, e se ligar, irreversivelmente, ao citocromo c (Hirai, 1968).

Nas células do tapete e ao fim de 3 horas de incubação (Fig. 172) observou-se a deposição do DAB oxidado, resultante da reacção enzimática, nas cristas mitocondriais. A deposição do produto reactivo foi-se acentuando com o prolongamento da incubação e ao fim de 15 horas (Fig. 173), o material denso preenchia quase completamente as mitocôndrias, obscurecendo a estrutura. Nas células das experiências de controlo (Fig. 174) não se registou marcação das mitocôndrias. Nas células mães do grão de pólen (Fig. 175) registou-se também uma certa marcação das cristas das mitocôndrias, embora menos evidente do que nas células do tapete. Esta situação é, porventura, devido à deficiente penetração do meio de incubação através da espessa camada de calose que rodeia os meiócitos. Também as mitocôndrias do citoplasma dos micrósporos reunidos em tétrada e das células da parede da antera, apresentaram reacção positiva para a actividade da citocromo c oxidase.

De referir que, no material em apreço, a fixação pelo glutaraldeído não inibiu, pelo menos completamente, a actividade enzimática, embora se tenham praticado tempos de fixação inferiores aos normais para as anteras. A inibição da actividade da citocromo c oxidase por acção deste dialdeído embora referida por alguns autores (Sabatini et al., 1963; Novikoff, 1972) não foi reconhecida por Öpik (1975 a), que verificou que a penetração do DAB era mais lenta nas células incubadas sem pré-fixação.

5. TAPETE COM SISTEMA ELABORADO DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EM ANTERAS DE OUTRAS ESPÉCIES

A ocorrência, nas células do tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch., dum sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso constituído por cisternas dilatadas incluindo vesículas pleomórficas, levou ao estudo de outras espécies da mesma família a fim de saber se este organelo apresentava, no tapete dessas espécies, a mesma ultraestrutura.

Observaram-se não só espécies pertencentes ao mesmo género, mas também outras pertencentes a géneros diferentes. Assim, o tapete de *Cucurbita ficifolia* Bouché e *Cucurbita pepo* L. (Figs. 176, 177, 178) desenvolviam o sistema elaborado do retículo rugoso, em continuidade com o invólucro nuclear (Fig. 176) e com o plasmalema (Fig. 178). Em associação com as cisternas dilatadas de retículo foram também observados depósitos de esporopolenina (Fig. 177).

Em outros géneros das Cucurbitaceæ foram também observadas as mesmas características do retículo endoplasmático rugoso. Em *Citrullus anguria* Samp. (Figs. 179, 180) verificou-se esta alteração do retículo rugoso e, por vezes, ligação directa do invólucro nuclear com o plasmalema através deste sistema membranar (Fig. 179). Depósitos de esporopolenina, isolados ou em agregados (Fig. 180), foram também observados no tapete desta espécie. O mesmo se verificou em *Cucumis melo* L. sendo de realçar a presença dos grânulos de esporopolenina no invólucro nuclear (Fig. 181). De salientar, nestas células do tapete, o aspecto particular dos plastídos (Fig. 182) possuindo, parte do sistema lamelar sob a forma de um corpo tipo prolamelar.

Numa outra Cucurbitaceæ, *Ecballium elaterium* (L.) A. Richard, o sistema elaborado do retículo endoplasmático rugoso preenchia grande parte do citoplasma das células do tapete, sendo também observado em continuidade com o invólucro nuclear (Fig. 183). Nestas células, os plastídios possuiam amido na mesma fase em que o retículo rugoso atingia o máximo de diferenciação.

Este aspecto elaborado do retículo endoplasmático rugoso não é, no entanto, característico desta família das Angiospermæ. Numa outra espécie, do género

Fig. 176 - Aspecto de célula do tapete de *Cucurbita ficifolia* mostrando a ligação do sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso (RER) ao núcleo (N). 19 000X.

Fig. 177 - Associação de depósitos de esporopolenina (setas) ao sistema de retículo rugoso (RER) no tapete de *Cucurbita ficifolia*. 18 500X.

Fig. 178 - Parte de uma célula de *Cucurbita pepo* ocupada pelo sistema elaborado de retículo rugoso (RER). D - dictiossoma; M - mitocôndria; PC - parede celular. 15 500X.

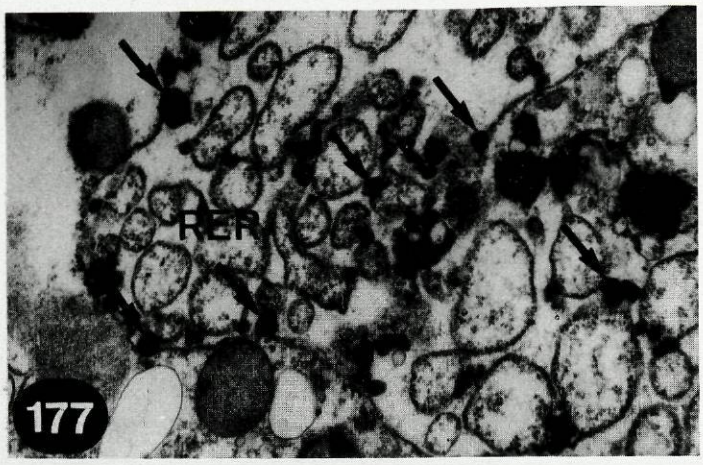
Fig. 179 - Sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso (RER) estabelecendo ligação directa entre o núcleo (N) e o plasmalema (pl) em células do tapete de *Citrillus anguria*. PC - parede celular. 29 400X.

Fig. 180 - Aspecto da periferia de células do tapete de *Citrillus anguria* mostrando depósitos de esporopolenina (setas). RER - sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso. 20 000X.

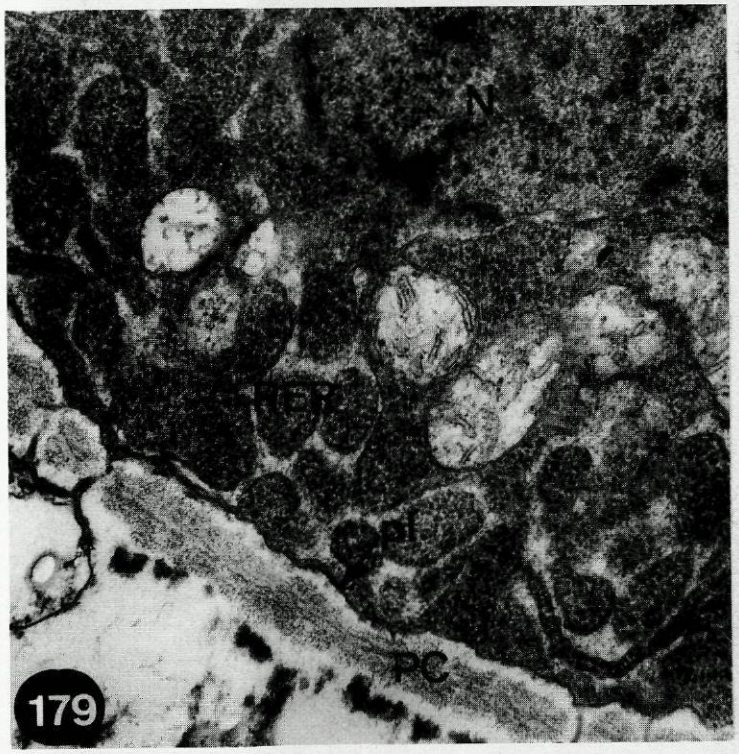
Fig. 181 - Parte de célula do tapete de *Cucumis melo*. O retículo rugoso (RER) estabelece ligação entre o invólucro do núcleo (N) e o plasmalema (pl). Em associação com a membrana celular e na cisterna perinuclear depositam-se grânulos de esporopolenina (setas). 21 600X.

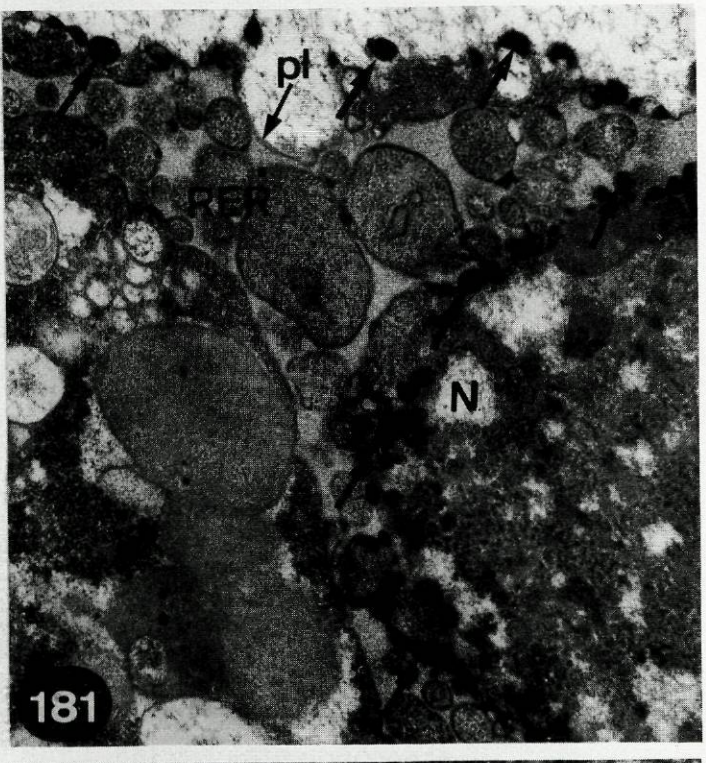
Fig. 182 - Aspectos dos plastídios (P) do tapete de *Cucumis melo* possuindo corpo tipo prolamelar. RER - sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso; M - mitocôndria. 20 400X.


RER
RER
N
176


RER
177


PC
M
D
RER
178


N
RER
PI
PC
179


pl
RER
N
181


180


M
M
182

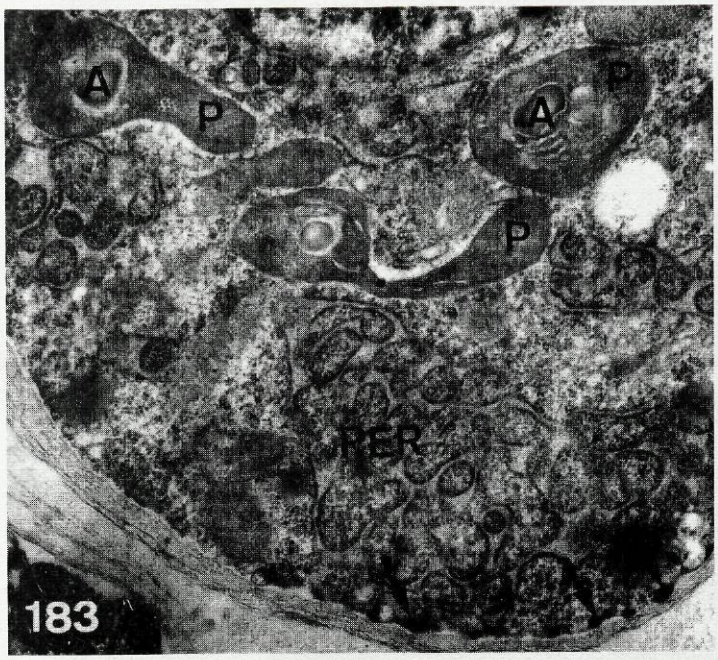
Fig. 183 - Aspecto de uma célula do tapete de *Ecballium elaterium* . De salientar o sistema elaborado de retículo rugoso (RER) e plastídios (P) com amido (A). Grânulos de esporopolenina - setas. 17 000X.

Fig. 184 - Nas células do tapete de *Cyclanthera* as cisternas do retículo endoplasmático rugoso (RER) dispõem-se em arranjos contínuos e empilhados. 16 800X.

Fig. 185 - Nas células do tapete de *Lupinus* é evidente a proliferação do sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso (RER). D - dictiossoma; P- plastídio; M - mitocôndria; grânulos de esporopolenina - setas. 13 000X.

Fig. 186 - Aspecto de uma célula do tapete de *Lupinus* mostrando a dilatação da cisterna perinuclear contendo vesículas originadas a partir da membrana nuclear externa (MNE). N - núcleo. 31 500X.

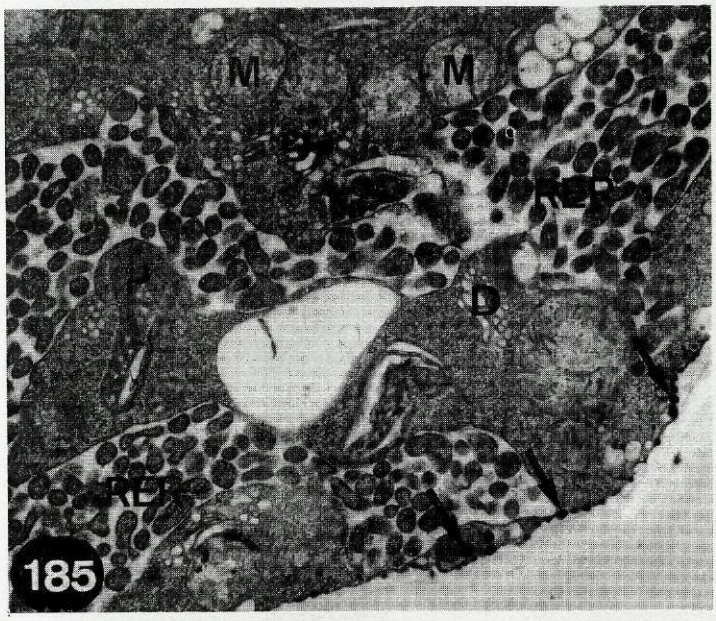
Fig. 187 - Célula do tapete de *Solanum tuberosum* . O sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso (RER) põe em comunicação directa o núcleo (N) e o plasmalema (pl). P - plastidio. 11 200X.



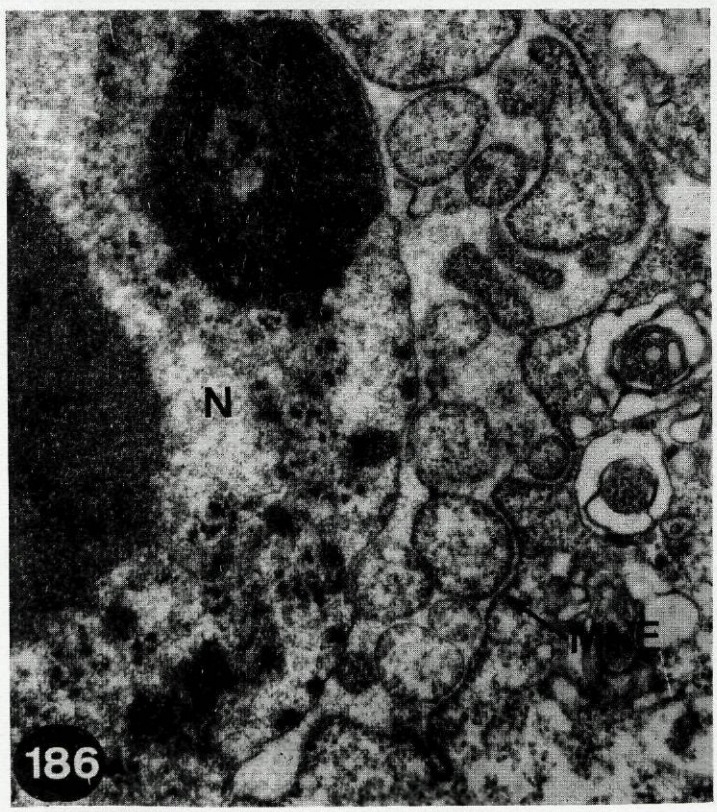
183



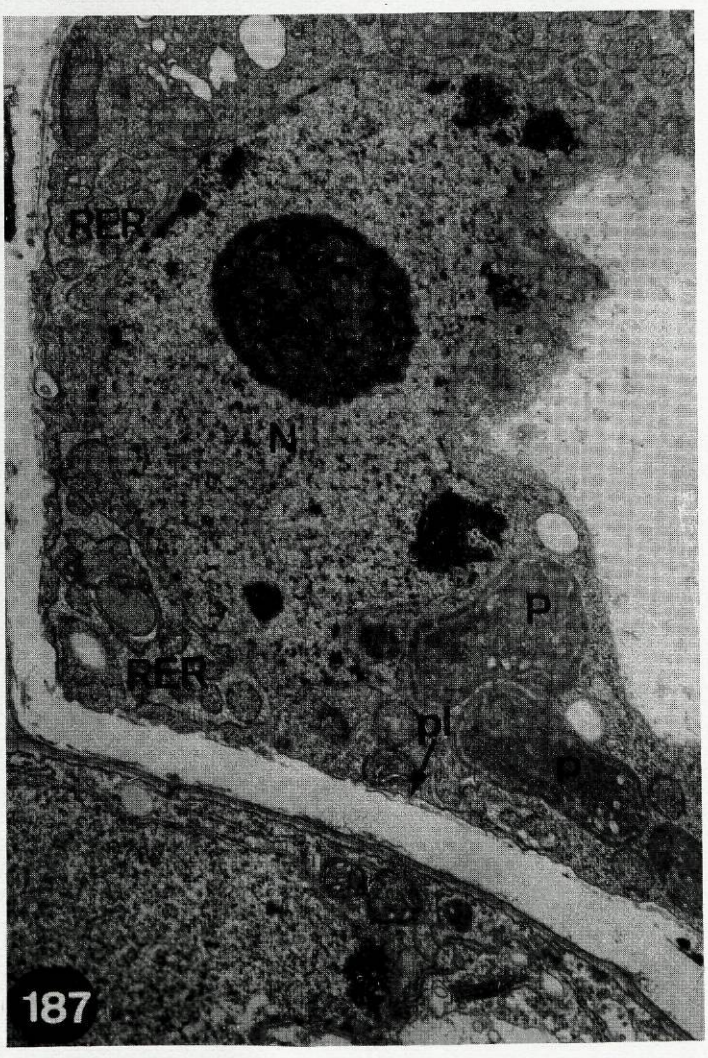
184



185



186



187

Cyclanthera (Fig. 184), o retículo rugoso dispõe-se sob a forma de longas cisternas, por vezes, empilhadas e dispostas paralelamente à superfície celular. Este arranjo do retículo endoplasmático, típico das células do tapete de muitas Angiospermæ, não sofreu qualquer diferenciação para o tipo de sistema elaborado.

Além de não caracterizar todos os géneros das Cucurbitaceæ, o sistema elaborado de retículo endoplasmático foi observado em espécies pertencentes a outras famílias, acidentalmente observadas. Em *Lupinus* sp. (Leguminosæ) (Fig. 185) as cisternas dilatadas do retículo preenchiam grande parte do citoplasma, contactando, em algumas situações, com o plasmalema e os depósitos de esporopolenina. Nestas células tapetais, o mesmo sistema de formação de vesículas pleomórficas foi observado a partir da membrana externa do invólucro nuclear (Fig. 186). Finalmente, numa espécie das Solanaceæ, *Solanum tuberosum* L. , o sistema elaborado do retículo rugoso é também característico das células do tapete, estabelecendo frequentemente a ligação entre o invólucro nuclear e a membrana celular (Fig. 187). De referir que, numa outra espécie desta família, *Lycopersicum esculentum* Mill. (resultados não publicados), o retículo endoplasmático rugoso apresentava características comuns a *Cyclanthera* sp. (Fig. 184).

6. INCORPORAÇÃO DE ^{3}H ACETATO NAS ANTERAS DE *CUCURBITA POLYMORPHA* DUCH. RESULTADOS PRELIMINARES.

Nos trabalhos respeitantes à ontogenia do pólen e às relações entre estas células gametofíticas e as células esporofíticas do tapete, têm sido frequentemente abordados a evolução e processos de transferência de vários nutrientes, nomeadamente, proteínas, ácidos nucleicos e lípidos. O uso de compostos marcados radioactivamente oferece grandes possibilidades no estudo de todos estes processos metabólicos, a fim de obter conhecimentos não só sobre a transferência do produto marcado mas também sobre o nível e localização dos vários processos biossintéticos. No que respeita à síntese das proteínas, a incorporação de leucina e arginina tritiadas permitiu verificar que as proteínas sintetisadas no citoplasma do tapete migram, sob a forma de moléculas intactas ou polipeptídeos simples, para o núcleo das células polínicas (Albertini, 1967; 1971). A utilização de triptofano marcado possibilitou a demonstração de um processo paralelo de transferência de proteínas sem histonas (Albertini & Souvré, 1974).

No que respeita aos ácidos nucleicos,os trabalhos realizados em anteras de *Rhoeo discolor* Hance com a utilização de uridina e timidina tritiadas revelaram não haver transferência de DNA do tapete para os meiócitos e micrósporos. No entanto, os micrósporos sintetizavam RNA a partir de precursores que lhes eram fornecidos após a hidrólise do RNA do tapete (Albertini, 1965,1971). O estudo da incorporação destes precursores radioactivos e a utilização de autorradiografia ultraestrutural mostrou que nos meiócitos de *Lilium* L. (Porter et al. 1982,1983a) a síntese do DNA ocorria no núcleo, durante as fases de zigóteno e paquíteno. Durante a profase meiótica processava-se também a síntese do RNA. Métodos autorradiográficos foram também utilizados durante o estudo da acção de baixas temperaturas no metabolismo do DNA e do RNA em anteras de *Rhoeo discolor* Hance sob condições experimentais (Souvré; 1971, 1974, 1981; Souvré & Albertini 1974, 1978).

Os mecanismos de síntese e transferência de polissacarídeos foram estudados com o uso de glucose e meso-inositol marcados radioactivamente (Southworth, 1971;

Albertini & Souvré, 1978; Rosenfield et al.1978; Rosenfield & Lowes, 1978 a, b; Manthey & Dickinson, 1978; Miki-Hirosige & Nakamura, 1981; Albertini et al. 1981 a).Os resultados das autorradiografias mostraram que a glucose tritiada atravessa a parede de calose que rodeia os microsporócitos (Southworth, 1971; Albertini & Souvré, 1978; Albertini et al. 1981 a) e que o tapete apenas fornece ao pólen em desenvolvimento glucídeos simples (Albertini et al.,1981 a). Miki-Hirosige & Nakamura (1981) reconheceram a incorporação de inositol marcado radioactivamente nos componentes polissacarídicos das placas celulares, na intina, no amido dos amiloplastos, em inclusões lipídicas, na exina e parede dos orbículos (locais ricos em esporopolenina), e também na cromatina nuclear. Estes autores não detectaram, contudo, transferência de material marcado entre o tapete e o pólen em desenvolvimento.

O acetato e o mevalonato marcados radioactivamente têm sido os precursores lipídicos mais utilizados, e os resultados obtidos mostraram que são incorporados em locais relacionados com a síntese da esporopolenina e da exina (Southworth, 1971; Shaw, 1971; Brooks & Shaw, 1977, 1978; Atkinson et al., 1972).

Das diferentes vias metabólicas, interessou-nos particularmente a envolvida na síntese de carotenóides, a fim de apreciar o seu envolvimento e relacionamento com a biossíntese e locais de deposição da esporopolenina. Este capítulo do trabalho, que incidiu essencialmente sobre a incorporação dum precursor lipídico radioactivo (acetato de sódio ^{3}H) foi precedido pelo estudo da composição dos carotenóides totais das anteras e respectivas alterações durante as várias fases ontogénicas.

Os pigmentos totais foram extraídos, a partir do material fresco, segundo o método de Jungalwala & Cama (1962).

A fracção éter de petróleo-éter dietílico contendo o material orgânico foi utilizada para leituras espectrofotométricas. O cálculo da concentração dos carotenóides totais foi efectuado separadamente para cada uma das fases seguintes: estádio de meiose (células mães do pólen), fase inicial da formação da parede (tétrada), fase final de formação da parede do pólen (micrósporo) e fase de pólen no

início e no final da diferenciação. Os resultados obtidos (Gráfico 1) mostraram que após a meiose, acompanhando o desenvolvimento do grão de pólen se verificou um aumento consideravelmente significativo da quantidade de carotenóides, que na fase de grão de pólen diferenciado atingia valores cerca de 3 vezes superiores aos da fase inicial. Simultaneamente (Gráfico 1) foram determinados os conteúdos de clorofilas, para os mesmos estádios, tendo-se registado, pelo contrário, um decréscimo significativo, a partir da fase que coincidia com o início da formação da parede do pólen.

Com os diferentes extractos correspondentes as várias fases estudadas foram também traçados os respectivos espectros de absorção (Gráfico 2). Os traçados obtidos revelaram que nas três primeiras fases de desenvolvimento (célula mãe, tétrada e micrósporo) a composição qualitativa dos carotenóides se mantem (absorção máxima a 435 nm) enquanto na fase de grão de pólen há uma ligeira variação da composição de carotenóides (absorção máxima a 445 nm) em relação às fases anteriores. No entanto, trabalhos realizados com outra espécie de Cucurbitaceæ (*Cucurbita pepo* L.) sugeriram que a composição de carotenóides destas anteras se mantém praticamente constante durante a microsporogénese (Shaw, 1971).

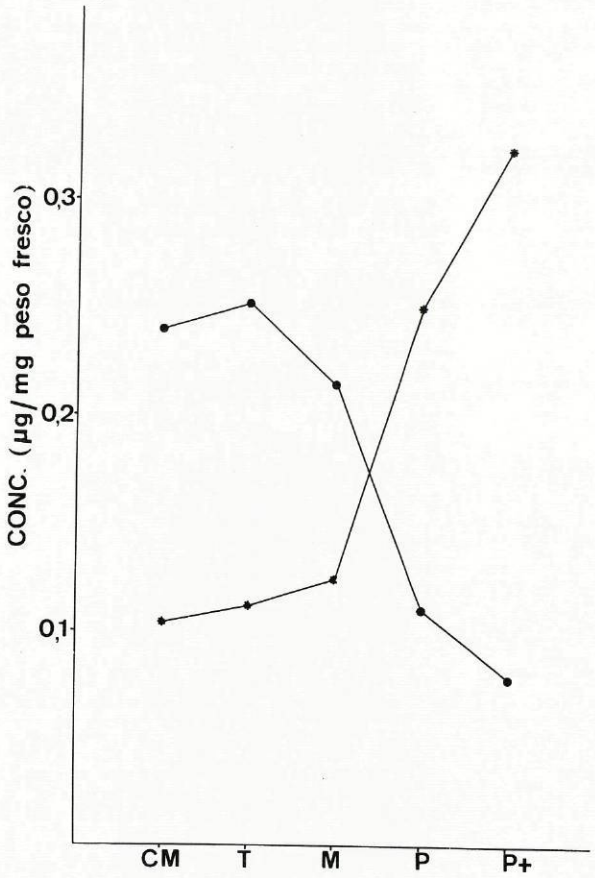
Na tentativa de aprofundar o mecanismo da síntese da esporopolenina, e a intervenção do tapete em tal processo, nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch. ensaiamos como precursor lipídico o acetato tritiado, com 2,77 Ci/mmole de actividade específica. O composto foi fornecido a hastes florais mergulhadas em soluções aquosas, na concentração de 20 $\mu Ci/cm^3$. Ao fim de vários períodos de tempo foram recolhidas amostras das anteras tratadas. Para cada tempo foram realizadas medições de radioactividade com um espectrómetro de cintilação de líquidos. As contagens efectuadas nas anteras tratadas (Gráfico 3) traduziram a quantidade de produto absorvido, tendo-se assistido a um aumento gradual da absorção do produto marcado.

Paralelamente, fragmentos das anteras tratadas foram fixadas e processadas para autorradiografia a nível ultraestrutural. Os cortes foram recobertos com uma

Gráfico 1 - Variação das quantidades totais de carotenóides (✱——✱) e de clorofilas (●——●) nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch., durante os estádios de células mães (CM), tétrada (T), micrósporo (M) e grão de pólen nas fases inicial (P) e final (P+) de diferenciação.

Gráfico 2 - Espectros de absorção em éter de petróleo: éter dietílico dos carotenóides das anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch. nas fases de célula mãe (———), tétrada (-----), micrósporo (— · — ·) e pólen diferenciado (— — —).

GRÁFICO 1



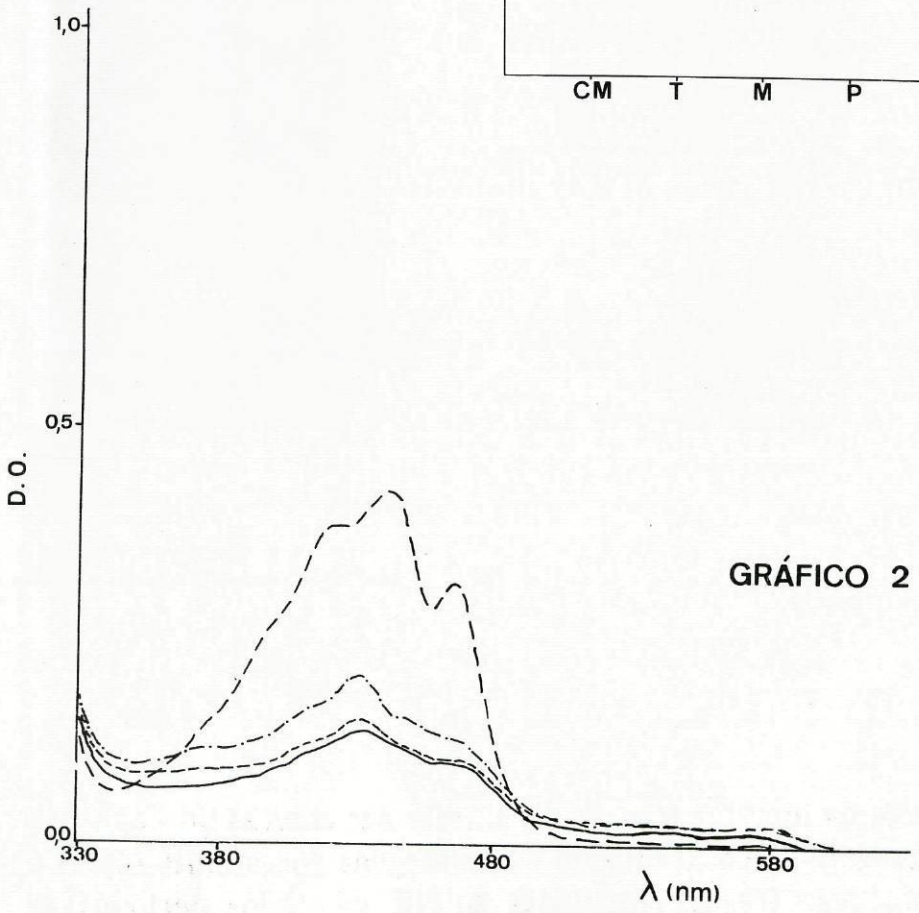


GRÁFICO 2

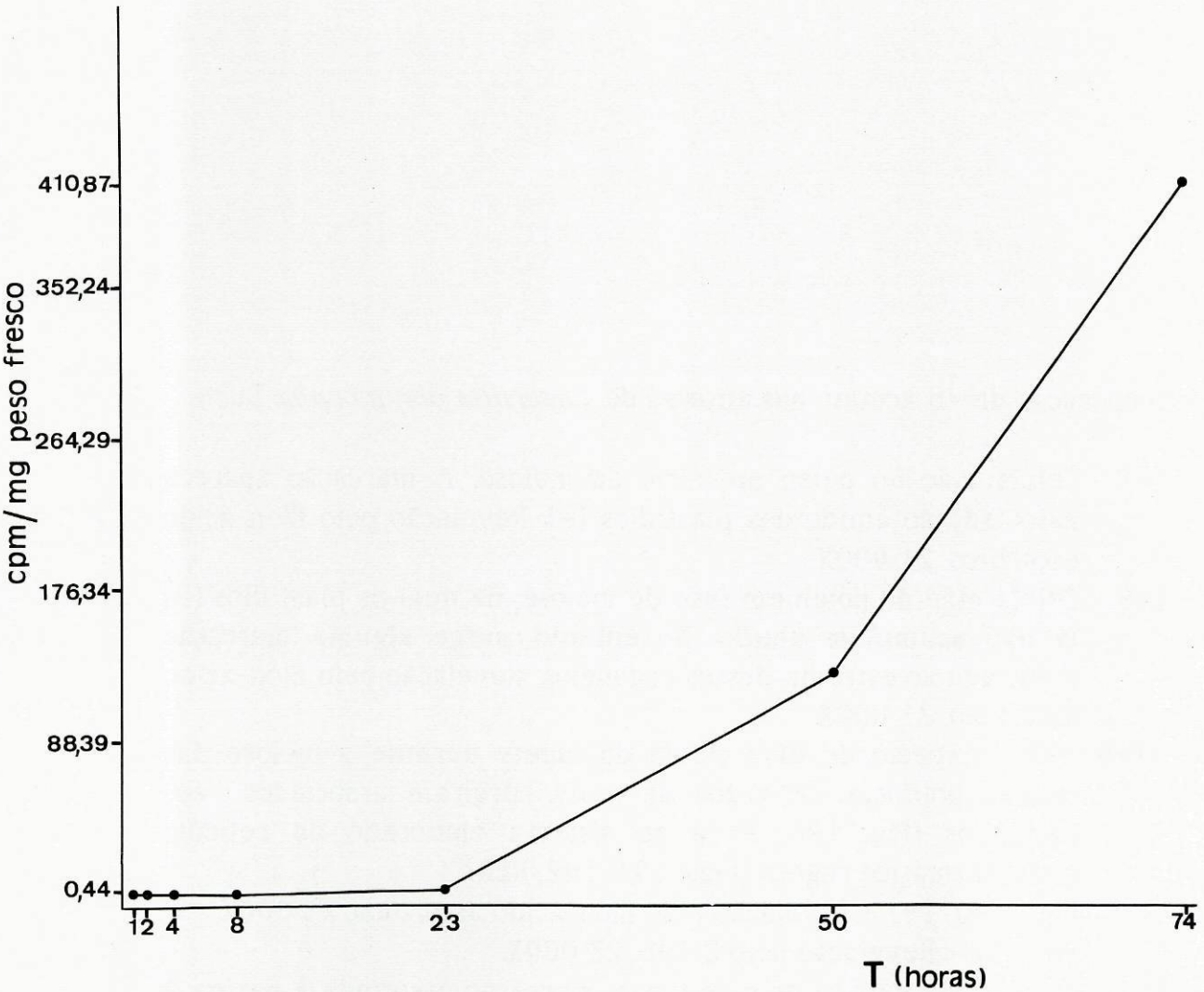

410,87
352,24
264,29
176,34
88,39
0,44
cpm/mg peso fresco
1
2
4
8
23
50
74
T (horas)

GRÁFICO 3

Incorporação de ^{3}H acetato nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch.

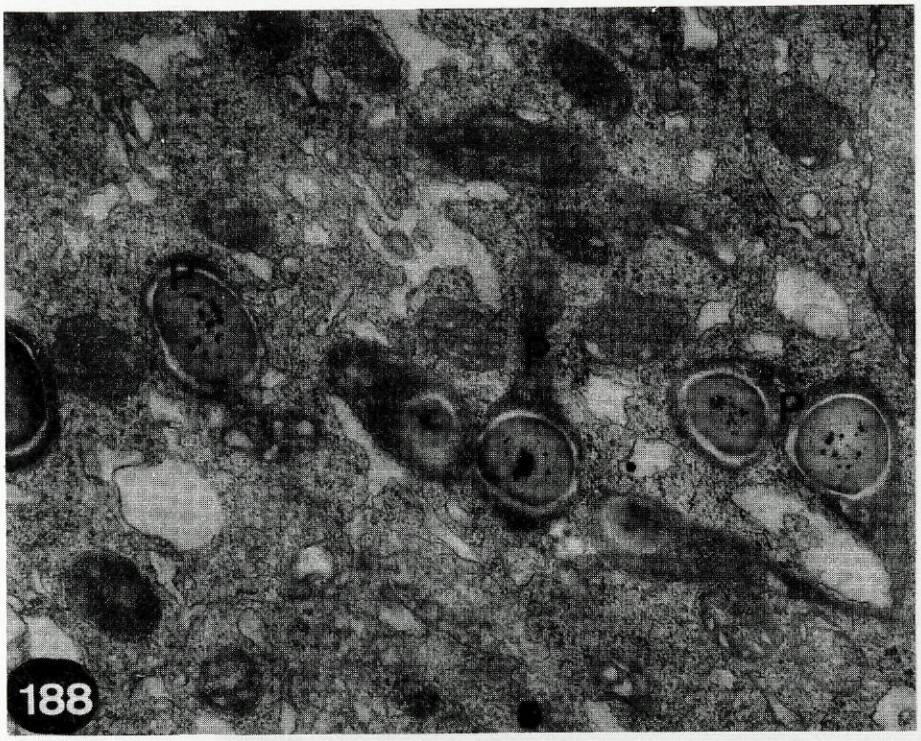
Fig. 188 - Célula mãe do pólen no início da meiose. A marcação aparece associada ao amido dos plastídios (P). Revelação pelo Elon-ácido ascórbico. 21 000X.

Fig. 189 - Célula mãe do pólen em fase de meiose, na qual os plastídios (P) já não acumulam amido. No entanto, surge alguma marcação associada ao estroma destes organelos. Revelação pelo Elon-ácido ascórbico. 21 000X

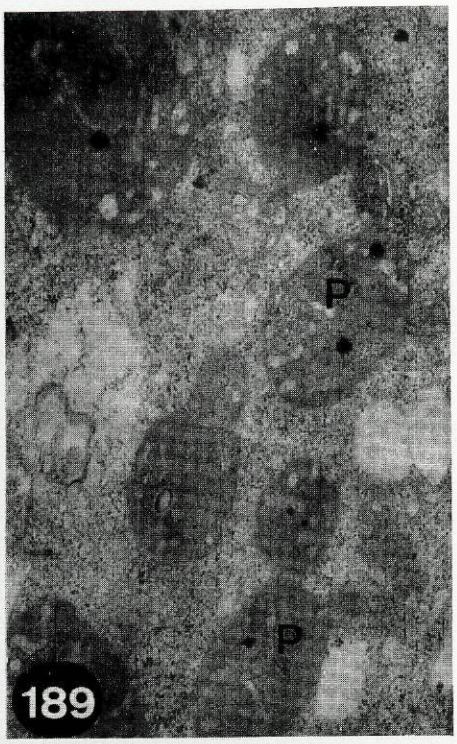
Figs. 190-192 - Aspecto de uma célula do tapete durante a meiose das células polínicas. Os grãos de prata surgiram associados aos plastídios (Fig. 190, P) e ao sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso (Figs. 191, 192, RER).
Figs. 190, 191 - Revelação pelo Elon-ácido ascórbico. 25 000X.
Fig. 192 - Revelação pelo D 19b. 23 000X.

Fig. 193 - Aspecto da parede do pólen, com marcação associada à nexina 2 (NE_2). Revelação pelo D 19b. 19 000X.

Fig. 194 - Associação do acetato marcado ao sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso (RER) das células do tapete, na fase de grão de pólen. Revelação pelo D 19b. 17 000X.



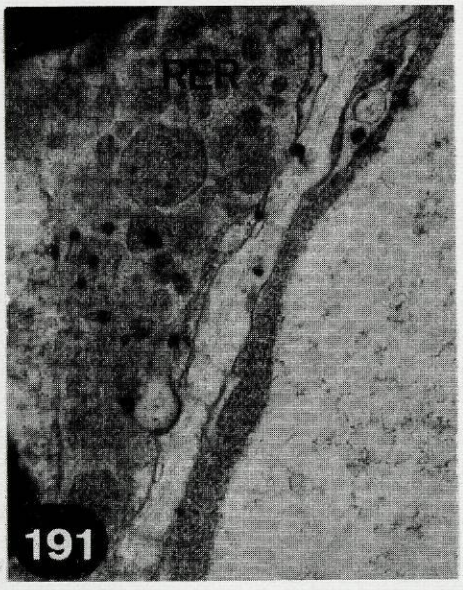
188



189



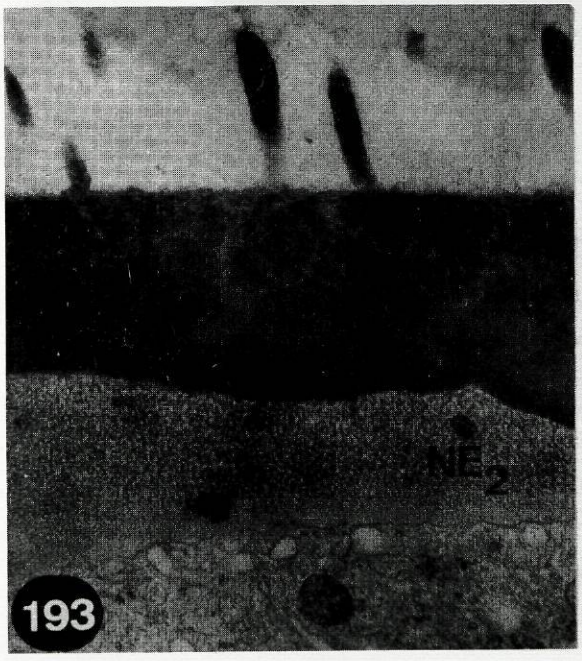
190



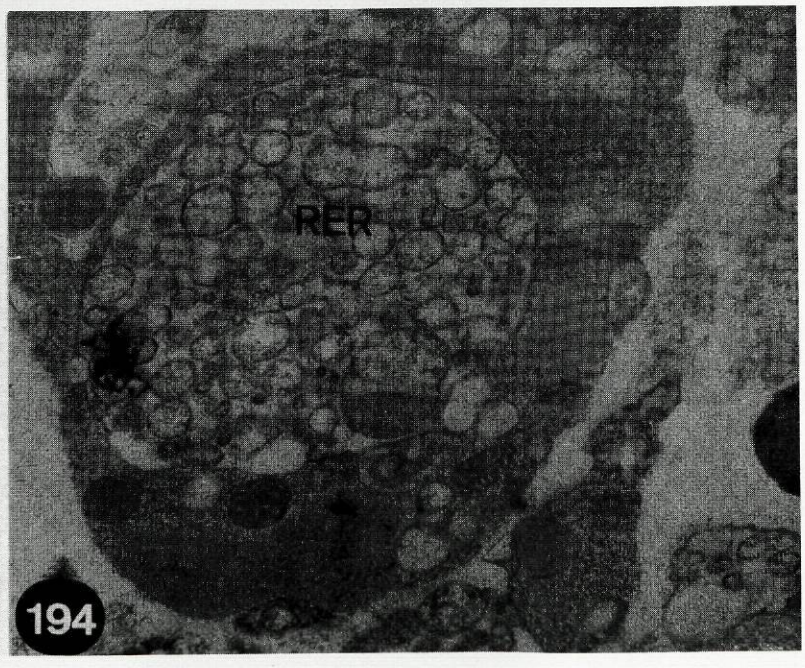
191



192



193



194

para autorradiografia a nível ultraestrutural. Os cortes foram recobertos com uma emulsão fotográfica Ilford L_4 (Caro et al., 1962), e como se desconhecia o tempo óptimo para a exposição desta emulsão a este produto radioactivo, houve necessidade de se ensaiarem vários tempos de exposição. (1,2,3 e 4 meses) Após estes períodos de exposição, o material sofreu latensificação pelo tiocianato de ouro e foi posteriormente revelado com o Elon/ácido ascórbico ou com o D19b. Após fixação fotográfica e contrastação, os cortes foram observados ao microscópio electrónico.

As imagens observadas mostraram que, nas células mães do grão de pólen e nas fases iniciais da meiose, o acetato radioactivo era incorporado no amido dos plastídios (Fig. 188). Em fases posteriores, quando já não se depositava o amido, ainda se observava alguma marcação no estroma plastidial. (Fig. 189).

Nas células do tapete, durante a meiose, o composto tritiado foi incorporado nos plastídios (Fig.190) e no sistema elaborado do retículo endoplasmático rugoso (Figs.191,192).

Nos micrósporos, após a desorganização da calose, foi possível observar a incorporação do composto radioactivo na parede em diferenciação. Os grãos de prata surgiram, preferencialmente, associados à nexina 2 (Fig. 193). Rodeando os micrósporos livres, as células do tapete, que já não possuiam parede celular, apresentavam a marcação, normalmente, associada ao sistema elaborado do retículo endoplasmático rugoso (Fig. 194).

As imagens observados sugeriram haver reduzida incorporação do produto radioactivo, pelo menos, a partir do fim da meiose, tanto nas células polínicas como no tapete adjacente. Como o tempo de exposição foi prolongado até 4 meses, é possível que os resultados obtidos apenas resultem da reduzida concentração do produto absorvido, pelo que se torna necessário realizar novos ensaios, utilizando o acetato tritiado em concentrações mais elevadas.

DISCUSSÃO

1. ULTRAESTRUTURA E EVOLUÇÃO DO TAPETE DAS ANTERAS DE *CUCURBITA POLYMORPHA* DUCH.

As anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch. apresentam uma anatomia particular. Os cinco estames, cada um deles em forma de S, encontram-se unidos numa coluna central maciça. Este tipo de associação é característica de alguns géneros das Cucurbitaceæ, família em que é notável a diversidade dos androceus das diferentes espécies.

Durante a microsporogénese, mereceram-nos particular atenção as células do tapete e as inter-relações deste tecido do esporófito com as células gametofíticas em desenvolvimento.

No início deste processo ontogénico, as células do tapete são do tipo meristemático e sofrem divisões de mitose que, frequentemente, não são acompanhadas por divisão do citoplasma, o que conduz ao aparecimento de células binucleadas. No tapete, os dictiossomas, os plastídios e o retículo endoplasmático rugoso, apresentam actividade metabólica particular, sofrendo alterações ultraestruturais e funcionais, que serão discutidas em pormenor.

O aparelho de Golgi das células do tapete é constituído por numerosos dictiossomas que, durante a meiose, iniciam um período de intensa actividade, traduzida pela formação de numerosas vesículas que se originam a partir das extremidades das cisternas. A actividade dos dictiossomas vai diminuindo a partir do fim da meiose e, na fase de micrósporos livres, são apenas constituídos por algumas cisternas empilhadas, sem vesículas associadas, o que parece traduzir uma certa inactividade. Um ciclo funcional idêntico foi referido para os dictiossomas de outras espécies, nomeadamente, no tapete de *Helleborus fœtidus* L. (Echlin & Godwin, 1968 a) *Tradescantia bracteata* Small (Mepham & Lane, 1969 b), *Pinus sylvestris* L. (Willemse, 1971 b), *Pinus banksiana* Lamb. (Dickinson & Bell, 1976 a) *Antirrhinum* L. (Lombardo & Carraro, 1976 a), *Avena* L. (Steer, 1977 b), *Ceratozamia mexicana* Brongn. (Audran, 1978, 1981) e *Rhoeo discolor* Hance (Souvré & Albertini, 1982).

Nas células do tapete de *Tradescantia bracteata* Small a fase de intensa actividade dos dictiossomas e o movimento das vesículas para o exterior das células, coincidiu com a degenerescência da parede do tapete, o que levou Mepham & Lane (1969 b) a sugerirem que as vesículas derivadas dos dictiossomas conduziam as enzimas hidrolíticas necessárias aos processos de lise que então se iniciam. No tapete de *Helleborus fœtidus* L. (Echlin & Godwin, 1968 a) e de *Tradescantia bracteata* Small (Mepham & Lane, 1969 b) enzimas (calases) também conduzidas pelas vesículas dictiossómicas foram referidas como responsáveis pela dissolução da parede especial de calose que rodeia as células mães do grão de pólen. É,assim, possível que no tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch. a proliferação de vesículas a partir das cisternas dictiossómicas e o seu trajecto através do citoplasma, permitam o transporte das enzimas necessárias, quer à lise da parede celular quer à desintegração da camada de calose.

As vesículas resultantes da actividade do Golgi apresentaram reacção positiva quando cortes ultrafinos foram tratados pelo método de Thiéry para a detecção de polissacarídeos. Resultado paralelo foi observado no tapete de *Allium sativum* L. "clone" *Piemonte* (Gori,1982) tendo-se verificado grande acumulação, no lóculo da antera, dos polissacarídeos transportados pelos dictiossomas, representando possivelmente local de armazenamento destes compostos, para serem utilizados pelo pólen em desenvolvimento. A síntese de polissacarídeos foi também atribuída aos dictiossomas do tapete de *Helleborus* L. (Echlin, 1971 a). Estudos citoquímicos e autorradiográficos realizados em anteras de *Rhoeo discolor* Hance (Albertini & Souvré, 1978; Albertini et al., 1981 a,b; Souvré & Albertini, 1982) mostraram, no entanto, que a síntese de polissacarídeos nas células do tapete é fraca ou aleatória, sendo fornecidos apenas glucídeos simples, solúveis, às células gametofíticas. Nesta espécie, intensa actividade polissacarídica registou-se apenas nos plastídios do tapete, após a formação do grão de pólen binucleado.

A actividade do Golgi foi também realçada durante o desenvolvimento das células do tapete de *Delphinium* L. (Gabara, 1975), antes da meiose das células

polínicas, tendo sido relacionada com a síntese e secreção do material da parede.

Os plastídios do tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch. apresentam, durante a ontogenia destas células, alterações significativas. Antes da meiose das células polínicas, os plastídios do tapete, do tipo proplastídio, acumulam amido, normalmente, um grão por organelo. De um modo geral nas anteras das plantas superiores, o amido está presente transitoriamente nas células do tapete, embora em algumas espécies tenham sido referidos amiloplastos neste tecido. (Py, 1932).

No material em estudo, quando já não se observam plasmodésmios entre as células do tapete e as células polínicas adjacentes e estas iniciam a divisão meiótica, os plastídios deixam de acumular amido e, no estroma destes organelos, observa-se uma estrutura paracristalina, sem membrana limitante embora frequentemente associada às lamelas estromáticas. Técnicas de digestão enzimática pela pronase conduziram à quase completa desagregação da estrutura, o que sugere ser basicamente constituída por proteínas. A referência, na literatura da especialidade, a estruturas cristalinas nas células do tapete são escassas. Durante o desenvolvimento do tapete de várias espécies vegetais foram observados plastídios designados por "proteoplastos", pelo facto de incluirem proteínas (Py, 1932). Nos plastídios do tapete de *Silene pendula* L. (Heslop-Harrison, 1963 a) e *Lycopersicum peruvianum* Mill. (Pacini & Cresti, 1978), foram também observadas estruturas cristalinas de natureza proteica, provavelmente funcionando como proteína de reserva (Heslop-Harrison, 1963 a, 1964). Inclusões paracristalinas constituídas por proteínas foram também encontradas no tapete de *Lycopersicum esculentum* Mill., em anteras infectadas com vírus tipo baciliforme (Abreu & Santos, 1975; Abreu et al., 1981) e cristais de oxalato de cálcio foram descritos no tapete de algumas espécies de Leguminosæ, Lamiaceæ e Comelinaceæ (Buss et al., 1969; Buss & Lersten, 1972).

A presença de inclusões, amorfas ou cristalinas, no estroma dos plastídios das plantas superiores, foi referida por vários autores (Gunning, 1965; Srivastava, 1966; Price et al., 1966; Newcomb, 1967; Price & Thomson, 1967; Salema & Badenhuizen,

1967; Gunning et al., 1968; Gifford & Stewart, 1968, Stetler & Laetsch, 1969; Ames,1972; Boasson et al., 1972; Hinchman, 1972; Salema et al., 1972; Cran & Possingham, 1973, 1974 a; Freeman, 1973; Lee & Thompson, 1973; Ames & Pivorun, 1974; Esau, 1975 a; Henry, 1975 a,b; Hoefert & Esau, 1975, Simpson et al., 1975; Hurkman & Kennedy, 1976, 1977; Miller et al., 1976; Sprey, 1976; Martin & Larbalestier, 1977; Platt-Aloia & Thomson, 1977; Sprey & Lambert, 1977; Suzuki, 1978; Mares et al., 1979; Mesquita et al., 1980). Em alguns casos, o aparecimento de estruturas cristalinas foi induzida sob condições de "stress" fisiológico (Gunning et al., 1968; de Greef & Verbelen, 1973; Larsson et al., 1973; Cran & Possingham, 1974 b; Pyliotis & Goodchild, 1975; Sprey, 1977; Wrischer, 1978 a). O papel destas inclusões tem sido motivo de especulação. Nos leucoplastos da raiz de *Phaseolus vulgaris* L. (Newcomb, 1967) e nas células da epiderme e dos estames de *Beta* L. (Hoefert & Esau, 1975), as inclusões foram consideradas como locais de armazenamento de proteínas de reserva. Nos cloroplastos de várias espécies (Srivastava, 1966; Price & Thomson, 1967; Stetler & Laetsch, 1969; Boasson et al., 1972; Salema et al., 1972; Ames & Pivorun, 1974; Cran & Possingham, 1974 a; Henry, 1975 a, b; Hurkman & Kennedy, 1977; Platt-Aloia & Thomson, 1977; Mares et al., 1979), as inclusões proteicas foram relacionadas com a formação do sistema lamelar dos plastídios em desenvolvimento. Outros investigadores (Salema & Badenhuizen, 1967) sugeriram que as inclusões dos amiloplastos de *Pellionia daveauana* N.E.Br. representam locais de armazenamento de hidratos de carbono ou proteínas e relacionaram o seu desaparecimento com a formação do amido. Nos cromoplastos das sépalas de *Strelitzia reginæ* Ait (Simpson et al., 1975) foi sugerido que os cristais proteicos representavam uma forma de armazenamento de energia relacionada com a síntese dos carotenóides, uma vez que as estruturas cristalinas desapareciam imediatamente antes da formação das fibrilas de carotenos, e não se depositava amido nestes plastídios.

As inclusões cristalinas dos cloroplastos de *Spinacea oleracea* L (Larsson et al., 1973; Cran & Possingham, 1974 b; Sprey , 1976, 1977; Sprey & Lambert, 1977),

Avena L. (Gunning et al., 1968) e *Phaseolus vulgaris* L. (Pyliotis & Goodchild, 1975), que apresentam uma estrutura semelhante à dos cristais dos plastídios do tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch., foram considerados como sendo constituídas pela proteína fracção 1, a enzima ribulose-1,5-difosfato carboxilase (E.C. 4.1.1.39) (Kawashima & Wildman, 1970). Segundo Sprey (1976) e Sprey & Lambert (1977), as inclusões cristalinas possuiam também, em parte, ATPase. A ribulose-1,5-difosfato carboxilase é uma enzima solúvel do estroma plastidial que se tornaria inactiva, sob a forma cristalina (Sprey, 1976). Embora o tapete não seja um tecido clorofilino, não é de excluir a hipótese de que as inclusões cristalinas dos proplastídios possam ser constituídas por ribulose-1,5-difosfato carboxilase, uma vez que esta enzima não é exclusiva dos plastídios fotossintéticos. Na verdade, a actividade da ribulose-1,5-difosfato carboxilase foi detectada nos proplastídios de tecidos não fotossintéticos, nomeadamente, no endosperma de *Ricinus* L. (Benedict, 1973; Osmond et al.,1975; Gillen et al., 1976; Boyle et al., 1986), de cotilédones de *Cucurbita pepo* L. (Ap Rees et al., 1975) e de células em cultura do tabaco, embora em pequena quantidade (Washitani & Sato, 1977). De particular interesse o facto da ribulose-1,5-difosfato carboxilase do endosperma apresentar também actividade de oxigenase (Osmond et al., 1975). Boyle e colaboradores (1986) demonstraram que os leucoplastos do endosperma incorporam o precursor da subunidade menor desta enzima, de modo análogo aos cloroplastos, mas através de um mecanismo que requer ATP. A localização desta enzima nos proplastídios com baixa actividade especifica, sugere uma incompleta repressão deste sistema enzimático, normalmente associado aos cloroplastos dos tecidos fotossintéticos. No entanto, o papel da ribulose difosfato carboxilase/oxigenase nos tecidos não fotossintéticos não está ainda perfeitamente esclarecida, embora tenha sido sugerida a presença das enzimas do ciclo de Calvin nestes proplastídios (Benedict, 1973).

Nos proplastídios do tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch., a inclusão cristalina deposita-se após o desaparecimento do amido. Se esta inclusão incorporasse a proteína fracção 1, seria possível sugerir que actuaria numa via

alternativa à neoglucogénese, conduzindo à formação de glucose "de novo" e consequentemente à formação de amido. A deposição da inclusão após o desaparecimento do amido, traduziria, porventura, a inactividade da ribulose difosfato carboxilase. No entanto, estudos realizados sobre a actuação desta enzima nos proplastídios do endoperma de *Ricinus* L. admitem como pouco provavél que a carboxilação da ribulose-1,5-difosfato inicie o mecanismo de biossintese da sacarose (Osmond et al., 1975).

É também de admitir que a inclusão proteica dos plastídios destas células do tapete represente apenas uma forma de armazenamento de proteinas de reserva, tal como foi sugerido, para situações idênticas, no tapete de *Silene pendula* L. (Heslop-Harrison, 1963 a, 1964).

Após a divisão de meiose e durante a fase em que os quatro micrósporos se encontram rodeados por calose, a inclusão paracristalina só se observa raramente e assiste-se a uma proliferação do sistema lamelar, apresentando algumas cisternas um certo grau de dilatação. Após a libertação dos micrósporos, já não se observa a inclusão paracristalina nos plastídios e distinguem-se, no estroma, vacúolos que designamos por vacúolos plastidiais e que provavelmente resultam da dilatação de lamelas estromáticas.

Vacúolos plastidiais derivados da dilatação de vesículas foram descritos em plastídios que sofreram mutações (Knoth, 1975; Khera & Tilney-Bassett, 1976 a, b; Orsenigo & Rascio, 1976; Vaughn & Wilson, 1980; Vaughn et al., 1980 a,b), em plastidios dos cotilédones de *Cucurbita pepo* L. tratados com uma trietilamina (Simpson et al., 1974), nos plastídios de folhas de *Beta vulgaris* L. com deficiência de ferro (Platt-Aloia et al., 1983) e nos plastídios das folhas de *Ligustrum ovalifolium* Hassk. em diferentes condições de luminosidade (Kunst & Wrischer, 1984). Na generalidade dos casos, a formação de vesículas a partir da dilatação dos tilacóides foi associada a processos de degenerescência dos plastídios. Nos plastídios de *Beta vulgaris* L. (Platt-Aloia et al., 1983), as vesículas estromáticas foram relacionadas com o transporte, para o interior dos organelos, de compostos, nomeadamente,

proteínas membranares ou ferro. Nas folhas de *Ligustrum ovalifolium* Hassk. (Kunst & Wrischer, 1984) o aumento dos vacúolos plastidiais foi acompanhado pelo aparecimento de numerosos plastoglóbulos. Também no tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch. se inicia uma nova fase de síntese de inclusões lipídicas que, após a degenerescência dos plastídios, são transportados para a parede do grão de pólen para constituir o "pollenkitt". Do mesmo modo, nas células do tapete de *Olea europaea* L. (Pacini & Casadoro, 1981), os plastídios diferenciam-se em oleoplastos, enquanto que em *Lilium* L. e *Raphanus* L. (Dickinson, 1973) este tipo de plastídio foi designado por cromoplasto. No tapete de *Lilium* L. (Reznickova & Dickinson, 1982) foi também sugerido que os carotenóides constituintes do "pollenkitt" se originam nos plastídios, possivelmente dissolvidos nos glóbulos lipídicos. Em outras espécies, a diferenciação dos plastídios é um pouco diversa. No tapete de *Tradescantia* L. (Mepham, 1970), antes da fase de degenerescência, os plastídios acumulam alguns depósitos polissacarídicos e no tapete de *Pinus* L. observaram-se amiloplastos (Dickinson, 1973).

O retículo endoplasmático rugoso é o organelo que, no tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch. apresenta características e evolução específicas, constituindo um sistema altamente elaborado. A diferenciação deste sistema reticular inicia-se durante a meiose das células polínicas e traduz-se por uma dilatação gradual das cisternas, ocorrendo depois invaginações da membrana, originando vesículas de vários tamanhos, com ribossomas apensos à superfície interna da membrana. A semelhança destas vesículas com os micoplasmas levou alguns autores a confundi-los com estes organismos patogénicos (Lombardo et al., 1970; Pellegrini & Gerola, 1970; Amici & Favali, 1972), situação já denunciada por Florance & Cameron (1974) e Esau e colaboradores (1976).

As vesículas englobando áreas citoplasmáticas e, por vezes, organelos celulares, destacam-se posteriormente e distribuem-se no interior da cisterna que os originou. Este processo de vesiculação vai aumentando e o sistema elaborado de retículo

rugoso atinge o seu máximo de desenvolvimento após a divisão meiótica das células mães do grão de pólen, ocupando grande parte do citoplasma.

Esta configuração ultraestrutural do retículo endoplasmático rugoso descrito nas células do tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch. (Santos & Abreu, 1975; Santos et al., 1977) foi também observado no tapete de *Antirrhinum majus* L. (Lombardo & Carraro, 1976 a), *Pelargonium zonale* Mill, *Kalanchoe obtusa* Engl. (Lombardo & Carraro, 1976 b) e *Gentiana acaulis* L. (Carraro & Lombardo, 1976). Nas células do tapete de *Paeonia tenuifolia* L. (Marquardt et al., 1968), foi tambem referida a dilatação do retículo endoplasmático, com a produção de numerosas vesículas, embora estas alterações só se registassem durante o periodo pré-meiótico. Marquardt et al. (1968) e Lombardo & Carraro (1976 a,b) sugerem que este aspecto traduz uma proliferação das membranas do retículo endoplasmático, que representa, provavelmente, um aumento considerável da actividade deste organelo. Mais recentemente (Tiwari & Gunning, 1986 e) foi também referida, no tapete invasivo de um híbrido do género *Canna*, a diferenciação de retículo endoplasmático semelhante ao sistema elaborado de reticulo rugoso. Este sistema reticular, preferencialmente localizado na periferia das células e frequentemente em contacto com o plasmalema, foi relacionado com processos de secreção, embora os autores afirmem não terem observado qualquer tipo de actividade relacionada com a produção da esporopolenina.

Aspectos morfológicos semelhantes aos do sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso foram também observados em outros tecidos vegetais. Nas células de aleurona de *Hordeum vulgare* L., o processo de vesiculação do retículo endoplasmático foi relacionado com a síntese da ∝-amilase, induzida pelo tratamento das células com ácido giberélico (Jones, 1969 b). Unzelman & Healey (1974) descreveram este sistema elaborado de retículo rugoso, que denominaram "RER poculiforme", nos tricomas de *Pharbitis nil* Chois., relacionando-o com a actividade de síntese e exportação de mucilagem. Este tipo ultraestrutural de retículo endoplasmático rugoso foi também relacionado com funções de biossíntese, nas

células em diferenciação do endosperma de *Triticum aestivum* L. (Mares et al., 1976) e de *Trigonella* L. (Meier & Reid, 1977), durante o desenvolvimento de sementes de *Aptenia cordifolia* (L.fil.) N.E.Br. (Kristen, 1976), nos laticíferos de *Papaver somniferum* L. (Nessler & Mahlberg, 1977), nas células de aleurona das cariopses de *Hordeum vulgare* L. (Cochrane & Duffus, 1980), nas células parenquimatosas da semente de *Phaseolus vulgaris* L. (Yeung, 1983) e durante o desenvolvimento do embrião de *Triticum aestivum* L. (Smart & O'Brien, 1983) e *Zea mays* L. (Schel et al.,1984).

O sistema elaborado do retículo endoplasmático rugoso foi também associado a processos de diferenciação que conduziam à lise do citoplasma. Tal facto foi descrito nas células em desenvolvimento do saco embrionário de *Linum catharticum* L. em que o processo de degenerescência se manifestou pela vesiculação do espaço perinuclear (D'Alascio Deschamps, 1973). Nas células do nucelo de *Diplotaxis erucoides* D.C., a degenerescência destas células foi traduzida pela vesiculação e aumento das ligações do retículo endoplasmático com a membrana nuclear (Pacini et al., 1975), situação idêntica à observada durante a degenerescência deste tecido em *Cortaderia jubata* Lem. (Philipson, 1978). Esta alteração do retículo endoplasmático rugoso foi também relacionada com os processos de lise do citoplasma, durante a diferenciação de células floémicas de *Oryza* L. (Pellegrini & Gerola, 1970; Amici & Favali, 1972), *Trifolium* Tour. (Lombardo et al., 1970), *Prunus* Tour. (Florance & Cameron, 1974) e *Spinacea* L. (Esau et al., 1976), de elementos de xilema de *Atkinsonia ligustrina* F. Muell. (Fineran & Ingerfeld, 1982) e das fibras sub-epidérmicas das folhas de *Stipa tenacissima* L. (Harche, 1984). A actividade lítica destes elementos reticulares foi ainda referida nas fases iniciais de degenerescência do sinergídio de *Quercus gambelii* Nutt. (Mogensen, 1972), nas células glandulares de *Comandra* Nutt. (Toth & Kuijt, 1976) e de *Citrus deliciosa* Ten. (Bosabalidis & Tsekos, 1982).

Durante o desenvolvimento do endosperma de *Triticum vulgare* L. (Buttrose, 1962) e dos anterídeos de uma Hepaticæ (Carothers, 1972 a,b), nas células do

nucelo durante a embriogénese em *Hordeum vulgare* L. (Norstog, 1974), durante o desenvolvimento do haustório de *Phthirusa pyrifolia* Eichl. (Dobbins & Kuijt, 1974), nas células do endosperma de *Capsella* Medicus (Schulz & Jensen, 1974), em células envolvidas em processos de secreção (Birchem & Brown, 1979; Joel & Fahn, 1980 a,b) e em protoplastos isolados a partir de tubos polínicos (Pargney, 1982) foram também observadas alterações semelhantes do retículo endoplasmático embora não lhes tenham sido atribuídas funções específicas.

A dilatação dos elementos do retículo endoplasmático e subsequente vesiculação, originada também a partir das membranas do invólucro nuclear, foram observadas em células animais (Hadek & Swift, 1962; Parks, 1962; Blackburn & Vinijchaikul, 1969; Ashhurst & Costin, 1974, 1976; Ehrlich et al., 1974; Wassermann, 1976; Miyawaki & Taketomi, 1978; Thomopoulos & Kastritsis, 1983; Beaudry-Lonergan et al., 1985), tendo sido relacionadas com aspectos funcionais, nomeadamente, de secreção e processos de degenerescência.

No tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch. observou-se também este processo de vesiculação a partir da membrana externa do invólucro nuclear e, frequentemente, a ligação directa da cisterna perinuclear com o plasmalema, através do sistema elaborado do retículo endoplasmático. A associação directa do retículo endoplasmático com o plasmalema, descrita em algumas células vegetais (Larson, 1965; Carothers, 1972 a,b; Morré & Mollenhauer, 1974; Unzelman & Healey, 1974; Singh & Mogensen, 1976; Meier & Reid, 1977; Rodriguez-Garcia & Sievers, 1977; Joel & Fahn, 1980 b), sugere uma transferência directa de metabolitos do retículo endoplasmático para o plasmalema, como processo alternativo ao mais generalizado, em que as vesículas de Golgi intervêm como veículo de transporte. Nos grãos de pólen de *Beta vulgaris* L. (Hoefert, 1969) foi descrita a ligação do invólucro nuclear com um sistema reticular complexo que, por sua vez, estabelecia ligação com o plasmalema. Este sistema reticular estaria provavelmente relacionado com a síntese de proteínas e a transferência de substâncias do núcleo para o exterior da célula.

Processos de invaginação ou evaginação do invólucro nuclear observados nos

esporos de *Lycopodium* L. (Gullvåg, 1970), em micrósporos de Gymnospermæ (Aldrich & Vasil, 1970; Vasil & Aldrich, 1970; Dickinson & Bell, 1970; Vasil, 1978), em grãos de pólen de Angiospermæ (Gimenez-Martin et al., 1970) e em células do endotécio das anteras de *Allium cepa* L. (Risueño et al., 1975), foram também relacionados com transporte núcleo-citoplasmático.

É também provável que o sistema elaborado de retículo endoplasmático observado nas células do tapete do material em estudo, represente uma proliferação das membranas reticulares traduzindo um aumento da actividade metabólica destas células, durante a formação do grão de pólen. A associação do retículo endoplasmático à cisterna perinuclear poderá também estar relacionada com a transferência de materiais ou de informação necessária para os processos biossintéticos que ocorrem no tapete. A ligação directa, frequentemente observada, do retículo rugoso com o plasmalema, sugere que o transporte, pelo menos de algumas das substâncias sintetizadas no tapete, e que funcionem como precursores de metabolitos a serem incorporados no pólen, se efectue directamente através do retículo endoplasmático, sem intervenção directa dos dictiossomas.

No entanto, após esta fase de síntese activa, iniciam-se nas células do tapete processos de degenerescência que conduzem à lise celular. Como foi descrito no Capítulo 4.1.1 dos Resultados, foi detectada nos organelos sequestrados nas vesículas reticulares, a actividade da fosfatase ácida, enzima relacionada com processos de lise. Assim, não é de excluir a hipótese que, a partir de determinada fase da ontogenia do tapete, nas membranas reticulares que limitam as vesículas pleomórficas se inicie a síntese de enzimas líticas, participando assim na degenerescência das células. Aliás, a formação de enclaves citoplasmáticos rodeados por membranas de retículo endoplasmático, que se transformam em vacúolos autofágicos, foi já referida em outras células vegetais (Nougarède, 1963; Thornton, 1968; Marty, 1970b, 1972, 1973; Tourte, 1970; Coulomb & Coulomb, 1972; Coulomb et al, 1972; Cresti et al., 1972; Mesquita, 1972; Matile, 1975; Matile & Wiemken, 1976; Kupila-Ahvenniemi et al., 1978; Schulz & Jensen, 1978, 1981; Noher De Halac, 1980).

O processo de biossíntese mais relevante nas células do tapete é o da formação dos precursores da esporopolenina, a serem incorporados na parede do pólen em desenvolvimento. Em *Cucurbita polymorpha* Duch., já durante a meiose das células polínicas se observa, em associação com o retículo endoplasmático, deposição de grânulos electronicamente densos, ultraestruturalmente semelhantes aos descritos em outras espécies com a designação de corpos de Ubisch ou orbículos e constituídos essencialmente por esporopolenina ou pelos seus precursores.

A esporopolenina, um biopolímero de carotenóides e ésteres de carotenóides (Brooks & Shaw, 1968 a, 1971) é um composto quimicamente inerte (Gherardini & Healey, 1969), resistente à acetólise (Erdtman, 1952) e apenas solúvel por tratamento com hidróxido de potássio, oxidantes fortes e certas bases orgânicas (Southworth, 1974; Rowley & Prijanto, 1977; Kress, 1986). Foi também demonstrada a degradação parcial da esporopolenina pela acção de substâncias presentes no estigma (Gherardini & Healey, 1969) e por certos microorganismos (Elsik, 1971). Recentemente, foi referido um outro composto, um óxido monohidratado da 4-metilmorfolina, como solvente efectivo da esporopolenina (Loewus et al., 1985). Estudos realizados com variedades, férteis e estéreis de *Hordeum vulgare* L. (Ahokas, 1982), relacionaram a produção da esporopolenina nas células do tapete com a actividade da enzima lipoxigenase (E.C. 1.13.11.12.). Esta enzima e as isoenzimas associadas estariam ligadas à produção de carotenóides oxidados, que funcionariam como precursores da esporopolenina. O mesmo autor (Ahokas, 1976) tinha já identificado uma enzima (esterase) capaz de hidrolisar a esporopolenina. A dissolução parcial da esporopolenina foi conseguida pela acção de uma mistura de várias enzimas, permitindo a obtenção de protoplastos a partir de grãos de pólen de *Petunia* Juss. (Bajaj & Davey, 1974). Além do pólen das Angiospermæ e das Gymnospermæ, a esporopolenina foi também detectada nos esporos das Pteridophyta, Fungi e Algæ (Brooks, 1971; Brooks & Shaw, 1971; Atkinson et al., 1972; Good & Chapman, 1978; Burczyk & Czygan, 1983; Maeda, 1984; Brunner &

Honegger, 1985). De referir, no entanto, que a esporopolenina não se encontra apenas nos gametófitos masculinos. Colorações histoquímicas revelaram um composto com propriedades semelhantes às da esporopolenina num constituinte da parede do macroprotálo de *Pinus sylvestris* L. (Willemse, 1971 a) e dos megaspóros de *Selaginella* Beauv. (Beltz & Horner, 1970; Buchen & Sievers, , 1978).

A relação directa entre a síntese da esporopolenina e a produção de carotenóides e ésteres de carotenóides foi bem evidenciada com os vários trabalhos de Brooks & Shaw (1968 a,b; 1971, 1977, 1978). De salientar que no fungo *Rhizopus sexualis* (Smith) Callen não se produzem carotenóides e consequentemente os esporos não possuem esporopolenina (Holleyhead, 1972). O mesmo se verificou em mutantes de *Chlorella fusca* (Burczyk & Czygan, 1983). Esta relação carotenóides-esporopolenina foi, contudo, posta em causa por Prahl e colaboradores (1985) num estudo efectuado com anteras de *Cucurbita pepo* L. Os autores verificaram, utilizando um inibidor da síntese de carotenóides, que a inibição deste processo biossintético não tinha qualquer influência na deposição da esporopolenina. Sugeriram, no entanto, como o inibidor ensaiado apenas interfere na fase final da síntese dos carotenóides, que se formem ainda alguns carotenóides insaturados que assegurem a síntese normal da esporopolenina.

Numerosos trabalhos referem a formação e diferenciação dos orbículos e a sua possível ligação com a diferenciação da parede do pólen. No entanto, as opiniões não são totalmente concordantes e alguns pontos continuam por esclarecer. Um dos pontos de controvérsia é sobre a origem dos orbículos nas células do tapete. De acordo com Heslop-Harrison (1962, 1963 a, 1964) as mitocôndrias do tapete de *Cannabis sativa* L. participariam na formação dos orbículos, enquanto que em *Paeonia* L. (Marquardt et al., 1968), *Lilium* L. (Heslop-Harrison & Dickinson, 1969), *Podocarpus macrophyllus* D.Don. (Vasil & Aldrich, 1970) e *Avena* L. (Steer, 1977 a), estas estruturas surgiam associadas ao plasmalema. No tapete de *Helleborus foetidus* L. (Echlin & Godwin, 1968 a), *Allium cepa* L. (Risueño et al., 1969 a), *Pinus sylvestris* L. (Willemse, 1971 b), *Rhigozum trichotomum* (Burch.) (Robertson, 1984), *Lilium*

henryi Baker (Herich & Lux, 1985), *Lavandula dentata* L. (Suarez-Cervera & Seoane-Camba, 1986) e *Tradescantia virginiana* L. (Tiwari & Gunning, 1986 c), foi descrita uma associação intima entre os orbículos ou os seus precursores e o retículo endoplasmático. Dickinson & Bell (1972, 1976 a,b) sugerem que o retículo endoplasmático rugoso é o responsável pela síntese dos precursores da esporopolenina. Em *Sorghum bicolor* (L.) Moench., Christensen e colaboradores (1972) localizaram os orbículos em convoluções do plasmalema e em associação com elementos do retículo endoplasmático. Nas células do tapete de *Dactylis glomerata* L. (Gabara, 1977) e de *Hordeum vulgare* L. (Ahokas, 1978) os plastídios foram considerados os locais mais prováveis de síntese dos carotenóides da esporopolenina. Recentemente, (Pennell & Bell, 1986) foi sugerido que no tapete de *Taxus baccata* L., os orbículos se formariam na parede das células, onde se localizavam. No tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch. os resultados obtidos não permitem concluir rigorosamente sobre a intervenção de qualquer organelo na síntese da esporopolenina. As imagens observadas mostraram, porém, que os orbículos aparecem associados com o sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso e, em fases ontogeneticamente mais avançadas, com o plasmalema. Parece, assim, possível sugerir que o retículo endoplasmático funcione como veículo de transporte dos orbículos para o exterior da célula, não sendo possível tirar conclusões sobre a sua intervenção directa na síntese da esporopolenina.

A participação do tapete no fornecimento da esporopolenina, sob a forma de orbículos, para a parede do pólen, foi indicada em várias espécies vegetais, tanto de Gymnospermæ (Vasil & Aldrich, 1970; Willemse, 1971 b; Dickinson & Bell, 1972, 1976 a,b), como de Angiospermæ (Rowley, 1962 b, 1963; Heslop-Harrison, 1963 b, 1968 a; Skvarla & Larson, 1966; Banerjee, 1967; Echlin & Godwin, 1968 a; Heslop-Harrison & Dickinson, 1969; Risueño et al., 1969 a; Christensen et al., 1972; Christensen & Horner, 1974; Rowley & Skvarla, 1974 a; Cerceau-Larrival & Roland-Heydacker, 1976; Gabara, 1977; Ahokas, 1978; Madjd & Roland-Heydacker, 1978; Horner & Pearson, 1978; Abadie & Hideux, 1979 a; Cousin, 1979; Pacini &

Juniper, 1979 b, Reznickova & Willemse, 1980; Robertson, 1984; Hideux & Abadie, 1985) e mesmo numa Pteridophyta (Lehmann et al., 1984). Por outro lado, estudos ultraestruturais realizados em outras plantas, nomeadamente, *Parkinsonia aculeata* L. (Larson & Lewis, 1962), *Daphne* L. (Garagaty-Feissly, 1968), *Tradescantia bracteata* Small (Mepham & Lane, 1968, 1969 a; Mepham, 1970), *Impatiens balsamina* L. (Dupuis, 1976), *Ceratozamia mexicana* Brongn. (Audran, 1978, 1980,1981), *Mahonia aquifolium* Nutt. (Roland-Heydacker, 1979) e *Calatropis procera* (Ait.) Ait. (Dan Dicko-Zafimahova & Audran, 1981) sugerem que o tapete não tem qualquer intervenção na diferenciação da parede do pólen.

De referir também que noutros casos, como foi descrito no tapete de *Ipomoea purpurea* Lamk. (Godwin et al., 1967) e *Ilex europaeus* L. (Misset & Gourret, 1984), embora não tenha sido observada a formação de orbículos, os autores não excluem a possibilidade de intervenção do tapete na formação da parede polínica. Recentemente, (Herich & Lux, 1985) os orbículos das células do tapete de *Lilium henryi* Baker foram considerados como fazendo parte do compartimento lítico destas células esporofíticas, não havendo qualquer referência à sua participação na diferenciação da esporoderme.

Na espécie em estudo, apenas pudemos verificar que os orbículos se originam nas células do tapete, fornecendo assim, pelo menos em parte, algum dos precursores a serem incorporados na parede do pólen em formação. A função destas células do esporófito, durante a microsporogénese, foi evidentemente apresentada nos microsporângios de *Vinca rosea* L. onde, devido a infecção com micoplasmas, o gametófito degenerava, mas persistia a síntese de esporopolenina nas anteras (Cousin & Abadie, 1982).

Em *Cucurbita polymorpha* Duch., e enquanto que no citoplasma se assiste à síntese dos grãos de esporopolenina, verifica-se uma gradual desorganização da parede das células do tapete, o que possivelmente facilita a migração dos orbículos para as células do gametófito. Nestas células do tapete, que mantêm a sua posição na periferia do lóculo da antera, tem lugar um novo processo de síntese que se traduz

pela já referida formação de plastoglóbulos nos plastídios e pelo aparecimento de gotas lipídicas no citoplasma. Nas células do tapete de *Lilium* L. (Heslop-Harrison, 1968 a,e) foram referidos corpos lipídicos que, segundo este autor, conduzem os carotenóides e formam o "pollenkitt". Estruturas morfológica e funcionalmente semelhantes foram descritas no tapete de *Antirrhinum* L. (Lombardo & Carraro, 1976 a). Nas anteras de *Lilium* L. (Reznickova & Willemse, 1980) estes glóbulos lipídicos foram considerados como uma segunda geração de corpos tipo orbículos e, no tapete de *Turgenia latifolia* (L.) Hoffm. (Abadie et al., 1980-1981; Cerceau -Larrival et al., 1980-1981) designados por macro-orbículos pelas suas elevadas dimensões, embora não tenha sido claramente definida a sua ligação com o "pollenkitt", depositado na exina dos pólenes. Embora as inclusões lipídicas que observamos na fase final da ontogenia do tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch. possuam densidade electrónica menor que a dos orbículos anteriormente descritos, é possível sugerir que evoluam e vão contribuir para a formação do "pollenkitt".

2. FORMAÇÃO DA PAREDE DO GRÃO DE PÓLEN DE *CUCURBITA POLYMORPHA* DUCH.

2.1. FASE PRELIMINAR DA FORMAÇÃO DA PAREDE

Nas anteras das plantas superiores, e antes da formação da parede do grão de pólen, as células esporogénicas directamente ou após uma divisão de mitose, originam as células mães do grão de pólen. Em *Cucurbita polymorpha* Duch., as células esporogénicas parecem funcionar directamente como células mães do pólen, pois das várias observações efectuadas não se registaram aspectos de divisão nuclear. Estas células, tipicamente meristemáticas, são rodeadas por uma parede celulósica (Heslop-Harrison, 1966 a; Skvarla & Larson, 1966; Willemse, 1971 c; Vasil, 1973) embora nas anteras de *Tradescantia bracteata* Small, Mepham & Lane (1969 b) refiram que as paredes das células do tapete e das células esporogénicas são essencialmente pectícas, em contraste com as da camada mediana, do endotécio e da epiderme que são de natureza celulósica. Numerosos plasmodésmios facilitam as inter-relações entre as células do tecido esporogénico e o tapete adjacente, tal como foi referido para algumas espécies (Heslop-Harrison, 1966 a; Vasil , 1967; Christensen et al., 1972; Horner & Rogers, 1974; Horner, 1977; Albertsen & Palmer, 1979) embora, em geral, só se identifiquem comunicações entre as células esporogénicas.

Quando nas células mães do pólen se iniciam as divisões de meiose para originar os quatro núcleos haplóides, importantes modificações se operam, nomeadamente, ao nivel da parede e do plasmalema. Em *Lycopersicum* Mill. e *Cucurbita* L. (Weiling, 1962 a, b) foram descritas invaginações do plasmalema, originando vesículas que posteriormente se destacavam e migravam para o interior das células polínicas tendo o autor sugerido que estas vesículas de pinocitose funcionavam como veículo de transporte entre o exterior e o interior da célula. Durante a meiose em *Cucurbita ficifolia* Bouché (Eschrich, 1964), em *Allium cepa* L. (Risueño et al.,1973) e em *Triticum aestivum* L. (McQuade & Young-Rottler, 1984) foi mesmo observada a ruptura da membrana celular e a formação de uma nova membrana, designada por

plasmalema secundário. Estas alterações do plasmalema não foram, no entanto, detectadas no material em estudo, no qual a membrana celular apresentava apenas um perfil sinuoso, de modo idêntico ao indicado, nomeadamente, para as células mães de *Pinus sylvestris* L. (Willemse, 1971 c) e de *Ribes rubrum* L. (Genevès, 1973). Progressivamente, nos meiócitos deposita-se a parede especial de calose, entre o plasmalema e a parede celulósica. Já em 1962, Waterkeyn tinha demonstrado, utilizando técnicas de microscopia óptica, a presença de camadas de calose rodeando os meiócitos. Processo idêntico, foi posteriormente, descrito em *Zea mays* L. (Skvarla & Larson, 1966) verificando-se que a deposição da calose era precedida pela separação do plasmalema da parede inicial. Heslop-Harrison (1966 b) sugeriu que a deposição da calose se iniciava nas regiões de contacto das células mães e adiantou que os dictiossomas estariam envolvidos na síntese e deposição dos polimeros de D-glucose, necessários à formação da calose. A deposição da calose, rodeando os meiócitos, foi considerada como condição necessária para o prosseguimento da meiose normal (Echlin & Godwin, 1968 b), tendo sido posteriormente descrita por outros autores (Horner & Lersten, 1971; Risueño et al., 1973; Horner & Rogers, 1974; Horner, 1977; Biddle, 1979; Lee et al., 1979; Albertsen & Palmer, 1979; Pacini & Juniper, 1979 b; Gori, 1983).

De salientar, que durante as fases iniciais da profase I se identificam, em determinados locais da parede entre células mães adjacentes, zonas de contacto que atingem dimensões consideráveis. Estas conexões citoplasmáticas tinham já sido observadas noutra espécie de *Cucurbita* L. (Eschrich, 1963) e posteriormente descritas em outras plantas (Heslop-Harrison, 1964, 1966 a,b; Risueño et al., 1969 b; Ledbetter & Porter, 1970) , quando os meiócitos entravam em leptóteno, e foram designadas por canais citomícticos. A espessura destas conexões citoplasmáticas é variável consoante as espéçies, tendo sido referidos valores mais comuns de 0,5-1,5 µm. Ainda que inicialmente descritos como característica taxonónica (Heslop-Harrison, 1966 a), os canais citomícticos foram mais tarde (Whelan, 1974) considerados como característica dos meiócitos das

Angiospermæ, tendo sido observados em 25 espécies de Dicotyledoneæ e 5 de Monocotyledoneæ. Estes canais, quando observados no microscópio electrónico de varrimento (Whelan et al., 1974) surgem com aspecto de buracos rodeados pelo plasmalema ou preenchidos por citoplasma coagulado, tendo técnicas electrofisiológicas demonstrado que são junções de baixa resistência eléctrica (Spitzer, 1970). Os canais citomícticos, através dos quais se observou o movimento de organelos citoplasmáticos, nomeadamente, de plastídios, mitocôndrias, elementos de reticulo endoplasmático e, por vezes, do núcleo, permitem um transporte rápido e uma distribuição equitativa dos nutrientes, tendo sido sugerido que tal facto será responsável pelo sincronismo observado no desenvolvimento das células do microsporângio (Heslop-Harrison, 1966 a,b; Vasil, 1967). Em algumas Gymnospermæ (Vasil & Aldrich, 1970) e em Cycadales (Audran, 1980) onde não se observaram canais citomícticos entre os meiócitos, o desenvolvimento é assincrónico. Estudos posteriores (Morisset, 1978; De & Sharma, 1983) correlacionaram a transferência de material genético através dos canais citomícticos das anteras como uma anormalidade patológica que levaria à degenerescência das células e à esterilidade do pólen.

Os canais citomícticos são menos frequentes no fim da profase meiótica, diminuindo progressivamente por obliteração com calose, de modo que no início da meiose II, as células mães do pólen ficam completamente rodeadas pela parede de calose, totalmente independentes umas das outras. A parede de calose designada "filtro molecular" por Heslop-Harrison, isola assim o citoplasma das células haplóides do meio circundante, permitindo a passagem de nutrientes mas impedindo a de moleculas de maiores dimensões. Estudos realizados com material radioactivo (Heslop-Harrison & Mackenzie, 1967) demonstraram, enquanto não se depositava completamente a parede de calose, a passagem do material marcado para o citoplasma dos meiócitos ou dos micrósporos, sendo esta completamente inibida após a sua deposição. Estudos realizados com outros materiais, revelaram a passagem através da parede de calose, de ferro coloidal (Rowley & Dunbar, 1970), de glucose e

de acetato de sódio mas não de fenilalanina (Southworth, 1971). Em relação a ^{3}H-glucose, conclusões semelhantes foram encontradas em ensaios com anteras de *Rhoeo discolor* Hance (Albertini & Souvrè, 1978; Albertini et al., 1981 a,b).

São bem conhecidas dos citologistas, mesmo só com a utilização de técnicas de microscopia de luz, as profundas alterações que sofrem o citoplasma e os organelos dos meiócitos das anteras. Neste capítulo são de realçar os trabalhos iniciais de Guilliermond (1920,1924) e Py (1932). A microscopia electrónica permitui, contudo, um estudo mais pormenorizado e completo das alteracões sub-celulares que acompanham a meiose. Em *Cucurbita polymorpha* Duch., durante a meiose, assistiram-se a determinadas transformacões, sendo de salientar a alteração do metabolismo dos ácidos nucleicos traduzida, em parte, pela variacão da população ribossómica, e a desdiferenciação e rediferenciação de organelos citoplasmáticos, nomeadamente, os plastídios e as mitocôndrias.

No que respeita à variação dos ácidos nucleicos, observa-se uma redução drástica do número de ribossomas durante o zigóteno-paquíteno. O decréscimo da população ribossómica, já registada em outras espécies (Mackenzie & Heslop-Harrison, 1967; Dickinson & Heslop-Harrison, 1970 a; Rashid et al., 1982), traduz uma diminuição rápida da quantidade de RNA citoplasmático (Mackenzie & Heslop-Harrison, 1967; Knox et al., 1970). Trabalhos mais recentes (Porter et al., 1983 b,1984) permitiram concluir que na quantidade de RNA eliminado durante a profase meiótica, se inclui elevada percentagem de RNA mensageiro. A remoção de RNA citoplasmático é efectuada por degradação enzimática. Na verdade, através de métodos citofotométricos (Knox et al., 1970,1971) e citoquímicos (Bird et al.,1983) foi possível determinar a actividade de enzimas hidrolíticas, acompanhando o decréscimo de RNA citoplasmático. A população ribossómica e a quantidade de RNA são restabelecidos após a divisão meiótica, tendo sido sugerido que o RNA sintetizado no núcleo durante a profase serviria como precursor do novo RNA citoplasmático (Porter et al., 1982, 1983 a, 1984). Várias hipóteses sugerem o modo

como a população ribossómica se restabelece no citoplasma. Em *Cucurbita polymorpha* Duch. este processo parece ser efectuado através da formação de estruturas semelhantes aos nucleolóides, inicialmente descritos nos meiócitos de *Lilium* L. (Dickinson & Heslop-Harrison, 1970a; Williams et al., 1973). Os nucleolóides são inclusões ribonucleoproteicas semelhantes aos nucléolos e que se libertam no citoplasma desde a anafase I. Porém, no material em estudo, estas estrutruras encontraram-se nos meiócitos desde o zigóteno, tal como foi descrito durante a formação dos óvulos de *Pisum sativum* L. (Medina et al.,1981). Nestas células meióticas, foi mesmo possível verificar que os nucleolóides resultavam da actividade do organizador nucleolar, durante a desorganização do nucléolo (Medina & Risueño, 1981). Estruturas semelhantes aos nucleolóides foram também descritas durante a formação do saco embrionário em *Hemerocallis* L. (Sato, 1985) e durante a mitose de células radiculares de *Brodiaea uniflora* (Lindley) Engler, submetidas a baixas temperaturas (Sato & Sato, 1984), tendo estes últimos autores demonstrado que derivam do componente fibrilar do nucléolo embora especulem quanto à sua função.

Além dos nucleolóides, o restabelecimento da população ribossómica tem sido explicada, no caso das Gymnospermæ, pelo transporte dos precursores através de modificações especiais do invólucro nuclear (Aldrich & Vasil, 1970; Dickinson & Bell, 1970; Dickinson & Potter, 1975, 1979) e, nos microsporócitos de *Rhoeo spathacea* (Sw.) Stearn. (Williams & Heslop-Harrison,1975), através de cisternas membranosas, semelhantes a elementos de retículo endoplasmático, associadas aos cromossomas metafásicos, que facilitariam a transferência de RNA para o citoplasma.

Ainda no que respeita às transformações da população ribossómica durante a meiose, convém referir que no citoplasma dos meiócitos de *Lilium longiflorum* Thunb. (Dickinson & Andrews, 1977) e de *Nicotiana tabacum* L. (Rashid et al., 1982) foram descritas modificações de elementos do retículo endoplasmático rugoso, dispostos em camadas circulares concêntricas, delimitando uma determinada área de citoplasma. Os ribossomas destes enclaves citoplasmáticos permaneciam

inalterados, enquanto que ao mesmo tempo se assistia à eliminação da restante população ribossómica. Pensa-se que estas inclusões permitiriam a conservação de elementos da geração esporofítica necessários ao desenvolvimento pós-meiótico, ou a continuidade da síntese proteica durante a meiose, período durante o qual estava reduzido o número de organelos envolvidos na síntese das proteínas. Estas inclusões membranosas não foram, no entanto, observadas no material em estudo, em qualquer das fases da meiose.

Também durante a meiose, ocorre a síntese de DNA. As opiniões divergem quanto ao local de síntese deste ácido nucleico, tendo sido referido o núcleo, particularmente, durante o zigóteno e o paquiteno (Riley & Bennett, 1971; Porter et al., 1982, 1983 a). Embora grande parte dos estudos indiquem o núcleo como local de síntese do DNA, estudos autorradiográficos realizados em microsporócitos de *Lilium* L. (Smyth, 1982; Smyth & Shaw, 1979; Bird et al., 1983) indicam que, embora quiescentes nos estados iniciais da meiose, os proplastídios dos meiócitos sintetizavam activamente DNA, tendo sido também atribuída alguma percentagem de síntese às mitocôndrias.

Estas alterações metabólicas dos ácidos nucleicos são acompanhadas por fenómenos de desdiferenciação e rediferenciação de organelos citoplasmáticos, bem evidentes no caso dos plastídios e das mitocôndrias. Este processo foi acompanhado em várias espécies (Bal & De, 1961; Maruyama, 1968; Luck & Jordan, 1980; Dickinson, 1981 a: Rashid et al., 1982; Bird et al., 1983), e, em algumas delas, a desdiferenciação era de tal ordem que levou alguns autores a sugerirem o desaparecimento temporário dos organelos (Bal & De, 1961). No entanto, o aperfeiçoamento das técnicas de microscopia electrónica revelou que tal não acontecia, embora durante a meiose numa Pteridophyta (Pettitt, 1978) e a megasporogénese numa Angiospermæ (Dickinson & Potter, 1978) se assistisse à eliminação de alguns organelos citoplasmáticos.

Em *Cucurbita polymorpha* Duch. as mitocôndrias transformaram-se em organelos com matriz pouco densa e as cristas foram reduzindo progressivamente de

número. Esta situação é paralela à observada em *Tradescantia paludosa* E. Anders. & R.E. Woodson (Maruyama, 1968) e *Hyacinthoides non-scripta* (L.) Chouard ex Rothm (Luck & Jordan, 1980). A partir do fim da segunda fase da meiose, assiste-se à rediferenciação das mitocôndrias, as quais reassumem o aspecto normal. Nas mitocôndrias dos microsporócitos de *Lilium henryi* Baker (Dickinson, 1982), e durante a rediferenciação, observou-se a acumulação de material electronicamente denso na matriz mitocondrial, tendo sido sugerido tratar-se de depósitos de RNA e proteínas (Dickinson & Potter, 1978).

Durante a meiose, os plastídios do material em estudo apresentaram também um ciclo de desdiferenciação e rediferenciação. Nas células esporogénicas, estes organelos com um sistema lamelar pouco desenvolvido, contêm grãos de amido, que vão diminuindo, no início da profase e deixam de se observar a partir do paquíteno. Este hidrato de carbono acumula-se de novo no estroma dos plastídios, a partir da fase de tétrada. Nas espécies estudadas o ciclo do amido é variável. Em *Tradescantia paludosa* E. Anders & R.E. Woodson (Maruyama, 1968) e *Hyacinthoides non-scripta* (L.) Chouard ex Rothm (Luck & Jordan, 1980) os plastídios não possuem amido no início da profase enquanto que em *Lilium longiflorum* Thunb. (Dickinson & Heslop-Harrison, 1970 b) os amiloplastos são característicos das células pré-meióticas. Em *Lilium* e *Hiacynthoides* o amido só reaparece nos plastídios dos micrósporos jovens, enquanto que em *Tradescantia* já se deposita a partir da diacinese.

Nos plastídios dos meiócitos de *Lilium longiflorum* Thunb. (Dickinson & Heslop-Harrison, 1970 b; Dickinson 1981 a, b; Bird et al., 1983) foi também observada uma inclusão rara, constituida por elementos membranosos associados a partículas densas aos electrões (MPA - "membrane particle association"), que técnicas de digestão enzimática revelaram conter RNA e proteínas. Os autores sugerem que tal inclusão representa a individualização, nos plastídios, de um sistema autónomo e independente do núcleo que permitiria a síntese do novo RNA e proteínas. Além disso, a formação de MPA nos plastídios em divisão, parece sugerir uma determinada

relação com este processo. As alterações descritas nos microsporócitos no que respeita ao decréscimo da população ribossómica e à desdiferenciação e rediferenciação dos plastídios e das mitocôndrias poderão estar relacionadas com a transição entre a geração esporofítica e gametofítica. Estas modificações não são, no entanto, peculiares da microsporogénese das plantas superiores. Na realidade, factos paralelos foram descritos durante a oogénese em fetos (Bell & Mühlethaler, 1964; Bell et al., 1966; Tourte, 1975; Shefffield & Bell, 1979) e a megasporogénese em algumas espécies (Woodcock & Bell, 1968; Dickinson & Potter, 1978; Medina et al., 1981).

O nucléolo tem sido também um dos componentes nucleares cuja estrutura e actividade foi acompanhada durante a profase meiótica, tanto nos microsporócitos (Das, 1965; Dickinson & Heslop-Harrison, 1970 a; Williams et al., 1973; La Cour & Wells, 1975; Jordan & Luck, 1976; Luck & Jordan, 1977; Venot et al., 1979) como nos megasporócitos (Dickinson & Potter, 1978; Medina & Risueño, 1981). Em *Cucurbita polymorpha* Duch. verificou-se, a partir das fases iniciais da profase meiótica, a segregação dos componentes granular e fibrilar. A segregação dos componentes nucleolares foi também referida durante a profase meiótica em *Endymion non-scriptus* (L.) Garcke (Jordan & Luck, 1976) tendo sido relacionada com o movimento do organizador nucleolar para a periferia do nucléolo, como resultado da sua inactivação. Porém, em certos casos (Risueño et al., 1980; Medina & Risueño, 1981) o processo de segregação, que pareceu ser independente do movimento do organizador nucleolar foi relacionado com a síntese dos precursores dos ribossomas que, como já foi referido, são transportados para o citoplasma sob a forma de nucleolóides ou corpos nucleolares densos. De referir, também, que estudos autorradiográficos sobre a síntese do RNA durante a ontogenia (Reynolds & Raghavan, 1982) e a embriogénese (Raghavan, 1979 a,b) do pólen de *Hyoscyamus niger* L., associados a dados estereológicos (Reynolds, 1984) mostraram que o componente granular do nucléolo é mais desenvolvido durante o período de síntese deste ácido nucleico.

No citoplasma dos meiócitos de *Cucurbita polymorpha* Duch. foram também observados elementos de "annulate lamellæ" que se continuam no estádio de tétrada, mas desaparecem quando os micrósporos se libertam. Esta estrutura, inicialmente descrita nas células animais, nomeadamente em células embriogénicas, tumorais e cancerosas (Kessel, 1968; Wischnitzer, 1970) foi, posteriormente, observada nos microsporócitos de *Lilium* L. (Sen, 1970), nos micrósporos jovens de *Lilium longiflorum* Thunb. (Dickinson, 1971 a), em células vegetais em cultura (Franke et al., 1972) e durante a formação do grão de pólen de *Canna generalis* Bailey (Scheer & Franke, 1972). Estruturalmente, as "annulate lamellæ" são constituídas por cisternas, frequentemente interrompidas por numerosos poros semelhantes aos poros nucleares. Estas estruturas podem dispôr-se em elementos isolados, como nos meiócitos de *Cucurbita polymorpha* Duch. e nos micrósporos jovens de *Lilium longiflorum* Thunb. (Dickinson, 1971 a), ou em arranjos paralelos como no pólen de *Canna generalis* Bailey (Scheer & Franke, 1972). No material em estudo, apenas foi observada esta estrutura no citoplasma, tal como nos microsporócitos referidos, mas existem algumas referências à sua ocorrência no interior do núcleo (Kessel, 1968; Wischnitzer, 1970; Franke et al., 1972). Quanto à origem da "annulate lamellæ" tem sido sugerida a sua formação a partir de cisternas do invólucro nuclear, como no caso dos micrósporos jovens de *Lilium longiflorum* Thunb. (Dickinson, 1971 a), ou a partir do retículo endoplasmático rugoso através de um processo degenerativo, como no pólen de *Canna generalis* Bailey (Scheer & Franke, 1972). A função da "annulate lamellæ" no citoplasma dos meiócitos e dos micrósporos é ainda assunto não esclarecido, tendo sido, no entanto, sugerida a sua participação na reorganização do citoplasma do microgametófito e subsequente crescimento (Dickinson, 1971 a).

O aparelho de Golgi é também um dos organelos celulares que sofre alterações durante a meiose. Em *Tradescantia paludosa* E. Anders & R.E. Woodson foi mesmo descrito um ciclo de organização e de desintegração dos dictiossomas, durante várias fases de desenvolvimento (Bal & De, 1961) e para a mesma espécie foi, mais tarde (Maruyama, 1965, 1966), sugerido que o Golgi se desintegrava durante a meiose,

surgindo de novo no citoplasma dos micrósporos, a partir de cisternas resultantes da vesiculação do invólucro nuclear, processo que ocorria durante a diacinese. Embora em alguns casos, nomeadamente durante a meiose de *Canna generalis* Bailey (Skvarla, 1971) não tenham sido observados aspectos morfológicos dos dictiossomas que traduzam actividade secretora, em outras situações (Heslop-Harrison, 1966 b; Echlin & Godwin, 1968 b) foi realçada a participação activa dos dictiossomas na síntese dos precursores da calose que rodeia os meiócitos. No material em apreço, a intervenção dos dictiossomas foi mais evidente no final da meiose. Vesículas, derivadas possivelmente do Golgi, organizavam os fragmoplastos que dividiam o citoplasma dos meiócitos pelas quatro células filhas.

2.2. FASE INICIAL DA FORMAÇÃO DA PAREDE

Em *Cucurbita polymorpha* Duch. a formação das quatro células haplóides, reunidas em tétrada por um invólucro de calose, segue o esquema geral descrito para as outras Dicotyledoneæ, de modo que a separação do citoplasma pelas células filhas é simultânea no final da meiose II. Nesta fase ainda se observam vestígios da parede de celulose que constituiam as paredes primárias dos meiocitos, situação idêntica à descrita em *Helleborus foetidus* L. (Echlin & Godwin, 1968b) e *Olea europæa* L. (Pacini & Juniper, 1979b). No entanto, em *Cannabis sativa* L. (Heslop-Harrison, 1964,1966a) e *Helianthus annuus* L. (Horner, 1977) verificou-se que a dissolução da parede celulósica dos meiócitos ocorria simultâneamente com a deposição da calose, enquanto que em *Allium tuberosum* Roxb., *Cyclamen persicum* Miller (Bhandari et al., 1981) e *Allium sativum* L. (Gori, 1983) a parede inicial permanecia intacta, só se desorganizando ao mesmo tempo que a parede de calose, aquando da libertação dos micrósporos.

A desintegração da parede de celulose das células mães do pólen foi atribuida à actividade de enzimas sintetizadas nas células do tapete, embora não tenha sido excluida a hipótese das enzimas líticas serem também sintetizadas nas células mães do pólen (Mepham & Lane, 1969b). No entanto, o facto de em *Allium sativum*

L. a degradação da celulose se iniciar na zona de contacto com a parede de calose, levou Gori (1983) a implicar os meiócitos na síntese das enzimas hidrolíticas.

Quando as células haplóides se encontram ainda reunidas em tétrada, pela parede especial de calose, inicia-se a formação da esporoderme. Tem sido mesmo salientado que a parede do pólen não se inicia antes da deposição das camadas de calose e que estas não se desorganizam sem que se reconheça a estrutura básica da esporoderme (Godwin, 1968; Echlin & Godwin, 1968b). Estudos realizados em *Ipomoea purpurea* Lamk. (Waterkeyn & Bienfait, 1968, 1970) atribuem à parede de calose um papel activo na formação da parede polínica, funcionando como molde para a exina em desenvolvimento. A mesma relação foi sugerida para algumas espécies de Gymnospermæ (Willemse, 1971 e) e de Angiospermæ (Horner & Lersten, 1971; Ford, 1971; Willemse, 1972; Dunbar, 1973a), sendo de salientar os trabalhos de Mepham & Lane (1969 b, 1970) e Mepham (1970) em *Tradescantia bracteata* Small em que, teoricamente, a exina se depositava totalmente antes da dissolução da calose. Em *Pergularia daemia* Chiov. (Vijayaraghavan & Shukla, 1977) a deposição de exina rudimentar, sem ornamentação, foi atribuída à ausência de calose rodeando as tétradas, embora em outros casos, a calose tenha apenas influenciado indirectamente a formação da parede, uma vez que a maior parte da exina se depositou após a libertação dos micrósporos (Christensen et al., 1972).

A formação da esporoderme inicia-se pela deposição, entre a parede especial de calose e o plasmalema dos micrósporos, de uma camada fibrilar designada "primexina" (Heslop-Harrison, 1963 a,b). Esta matriz é, segundo alguns autores, constituída por polissacarídeos ácidicos e neutros (Waterkeyn & Bienfait, 1970; Geneves, 1974) enquanto que outros sugerem que a primexina é formada por celulose, baseados quer em estudos sobre a acção da celulase (Heslop-Harrison, 1968 d) quer pela reacção positiva ao teste de Thiéry (Vazart, 1970; Flynn, 1971). No entanto, Rowley (1971, 1973, 1976) e Rowley & Dahl (1977) preferiram designar esta camada, onde se inicia a deposição da exina, por "glicocálice" devido à sua semelhança estrutural e funcional com o glicocálice descrito para as células

animais (Bennett, 1969). Este glicocálice seria uma especialização da membrana celular dos micrósporos, constituída por mucopolissacarideos ácidos. Embora com diferentes designações esta camada serve, segundo diversos autores, de local e molde a deposição da exina. Excepção deve ser feita, porém, para os esporos das Marchantiales e Sphaerocarpales (Denizot, 1976) cuja parede é constituida por exina, mas onde não foi detectada qualquer camada primexinica. A ausência de primexina foi tambem indicada, durante a formação da parede, numa espécie da família das Cycadaceæ (Zavada,1983).

Em *Cucurbita polymorpha* Duch. a primexina apresenta aspecto fibrilar e positividade ao teste de Thiéry. Antes da deposição desta camada polissacarídica, observamos a deposição de elementos do retículo endoplasmático rugoso sob determinadas zonas do plasmalema do micrósporo. Esta situação é comparável à descrita para outras espécies (Heslop-Harrison, 1963 a; Skvarla & Larson, 1966; Echlin & Godwin, 1968 b; Godwin, 1968; Dickinson, 1970 a; Christensen & Horner, 1974; Horner, 1977; Horner & Pearson, 1978; Nabli, 1974, 1979; Rodriguez-Garcia et al., 1982), tendo sido relacionada com a posição dos poros da parede do grão de pólen. Nestes locais não se verifica a deposição da primexina, tendo os autores sugerido que tal facto resultava da impossibilidade de acesso das vesículas de Golgi que continham os precursores do material fibrilar, servindo de obstáculo os elementos do retículo endoplasmático. Em outros casos, porém, nomeadamente em *Pisum* L. e *Lens* Miller (Biddle, 1979) não foi observada qualquer relação do retículo endoplasmático , nem de qualquer outro organelo celular, com a formação dos poros.

Curiosamente, no material em estudo, e após o início da deposição da primexina, deixou de se observar a associação do retículo endoplasmático com o plasmalema, e o material fibrilar da primexina depositou-se a volta de toda a célula, mesmo na região dos futuros poros. Tal facto, embora pouco vulgar durante a formação da parede da maioria das espécies, não é contudo inédito. Em *Tradescantia paludosa* E. Anders & R. E. Woodson , Horvat (1966) descreveu a existência duma "película"

contínua adjacente ao plasmalema e que funcionava como precursora da esporoderme. Uma matriz primexínica contínua foi também descrita na tétrada de *Nelumbo nucifera* Gaertner (Flynn & Rowley, 1971) e de *Campanula rapunculoides* L. (Dunbar, 1973 b). Em *Epilobium angustifolium* L. (Rowley, 1975, 1976) foi mesmo observado que o desenvolvimento do glicocálice era mais acentuado na região dos poros e em *Ipomoea* (Godwin et al., 1967) a martiz primexínica depositava-se na região dos poros mas numa camada mais delgada do que nas regiões interporais. Em *Sorghum bicolor* (L.) Moench. (Christensen & Horner, 1974) a primexina é interrompida na região do poro mas foi observada uma zona desta camada sob o opérculo em desenvolvimento, o qual apresenta o mesmo tipo de ornamentação que a restante parede do pólen.

É na matriz primexínica que se organizam os primeiros depósitos de esporopolenina, constituindo as pro-báculas, dispostas regularmente desde o plasmalema em direcção à parede de calose. Estes elementos cilíndricos, apresentam já nesta fase dois tamanhos distintos que corresponderão, na parede já formada, aos dois tipos de espinhos. A natureza química das pro-báculas é assunto não totalmente esclarecido, podendo muito possivelmente haver variação da composição durante o seu desenvolvimento (Heslop-Harrison, 1971 b; Dickinson, 1976 a). A densidade electrónica do material exínico das pro-báculas vai aumentando progressivamente (Echlin & Godwin, 1968 b; Heslop-Harrison, 1968 d; Christensen & Horner, 1974) e este aumento de afinidade para o ósmio sugere um aumento do seu conteúdo lipídico. O material exínico das pro-báculas não é resistente a acetólise, sendo assim diferente da exina completamente diferenciada, o que levou Heslop-Harrison (1968 d) a designá-lo por protoesporopolenina.

Nesta Cucurbitaceæ não foi observada, pelo menos nesta fase inicial de desenvolvimento, uma relação entre a deposição dos elementos de exina e qualquer organelo citoplasmático,situação comparável à descrita para outras espécies (Godwin, 1968; Dunbar, 1963 a; Christensen et al. 1972; Horner & Pearson, 1978). No entanto, a deposição das pro-báculas foi supostamente determinada pelo retículo

endoplasmático (Heslop-Harrison, 1963 b; Skvarla & Larson, 1966; Gabara, 1974; Nabli, 1974; Dickinson, 1976 a; Dickinson & Potter, 1976), por microtubulos (Dickinson & Potter, 1976), por mitocôndrias (Vazart, 1970), por vesiculas do Golgi controladas por microtúbulos (Dickinson , 1970 a, 1976 a; Echlin & Godwin, 1968 b) ou por ribossomas e estruturas vesiculares, provavelmente derivadas dos dictiossomas (Heslop-Harrison, 1968 b).

As pro-báculas vão aumentando de tamanho e o seu material vai adquirindo maior densidade electrónica. Seguidamente, assiste-se à formação da nexina 1 ou camada basal, que une a base das baculas. O modo de formação da nexina 1 nesta Cucurbitaceæ é semelhante ao inicialmente descrito por Rowley & Southworth (1967) durante a formação da parede dos micrósporos de uma Angiospermæ (*Anthurium* Schott) e dos esporos de uma hepática (*Scapania nemorosa* (L.) N ab E.) e considerado como um processo generalizado da deposição da esporopolenina, a qual apos polimerização se deposita de um e do outro lado de estruturas membranosas, com aspecto tripartido, semelhante as "unit membrane". Estas formações cuja espessura total varia entre 7 e 10 nm, têm merecido várias designações, nomeadamente, lamelas, "tapes" e "white lines". Este processo de deposição de esporopolenina foi observado e aceite como caracteristico de elevado número de Angiospermæ (Southworth, 1966, 1983; Godwin et al., 1967; Dickinson & Heslop-Harrison, 1968; Godwin, 1968; Echlin & Godwin, 1969; Dickinson, 1976 a,b; Argue, 1971; Dunbar, 1973 a; Mattson, 1976; Rowley & Dahl, 1977; Horner & Pearson, 1978; Abadie & Hideux, 1979 b; Nabli, 1979; Nakamura, 1979; Stone et al., 1979; Shoup et al., 1980, 1981; Willemse & Reznickova, 1980; Audran & Batcho, 1981; El-Ghazaly, 1982; Gupta & Nanda, 1983; Hideux & Abadie, 1985; El-Ghazaly & Jensen, 1986), Gymnospermæ (Gullvåg, 1966; Vasil & Aldrich, 1970, 1971; Dickinson, 1971 b; Willemse, 1971 a, e; Rohr, 1977) assim como de algumas Algæ (Atkinson et al., 1972; Good & Chapman, 1978) e mesmo dos esporos de Briophyta (Horner et al., 1966; Heckman, 1970; Sorsa, 1976; Denizot, 1976; Steinkamp & Doyle, 1979; Brown & Lemmon, 1980; Brown et al., 1986) e Pteridophyta (Lugardon, 1976). Em alguns

casos (Rowley & Southworth, 1967; Dunbar & Erdtman, 1969; Shoup et al., 1980; Gupta & Nanda, 1983) e tal como observamos no material em estudo, estas lamelas foram encontradas na base das báculas originando o material exínico da nexina 1 mas tambem na região dos poros, estabelecendo comunicação entre a nexina 1, interrompida a esse nivel, e o material granular que preenche estas aberturas da parede.

A origem e constituição quimica destas lamelas ainda não esta perfeitamente esclarecida, embora tenha sido reconhecido que não são exactamente membranas biologicas. Várias hipóteses têm sido avançadas sobre a origem destas estruturas lamelares. Em *Pinus* L. e *Lilium* L. (Dickinson, 1976 a) foi indicada a participação do Golgi, sugestão mais tarde corroborada em *Ipomoea purpurea* L. (Roth) (Gupta & Nanda, 1983). Por outro lado, em *Cosmos bipinnatus* Cav (Dickinson, 1976 a) tal origem foi atribuida ao reticulo endoplasmático, e em outras especies pertencentes as Angiospermæ (Dickinson & Heslop-Harrison, 1968; Mattsson, 1976; Guedes, 1982) e Gymnospermæ (Rohr, 1977) e mesmo em Hepaticæ (Denizot, 1976) foi implicado o plasmalema. A semelhança destas lamelas com as "unit membrane" foi fortemente contestada por Christensen & Horner (1974) que sugeriram tratar-se apenas de interfaces lipidicas originadas 'de novo' as quais se associava outro material, possivelmente de natureza proteica, de que fariam parte uma ou várias enzimas envolvidas na sintese da esporopolenina.

Durante esta fase inicial da formação da parede, no citoplasma dos microsporos, observaram-se os organelos celulares caracteristicos. Nucleo com nucleolo volumoso, mitocôndrias de pequenas dimensões e cristas desenvolvidas, plastidios com algumas lamelas e grãos de amido e corpos de origem nucleolar, possivelmente responsaveis pela repopulação dos ribossomas. De salientar, a intensa actividade dos dictiossomas, em elevado numero e extremamente activos, produzindo numerosas vesiculas. A distribuição das vesiculas pelo citoplasma e a localizaçao de algumas delas entre o plasmalema e a parede de calose, sugerem que estas formações funcionam como

veículo de transporte, excretando o seu conteúdo no exterior do citoplasma. Na realidade, não podemos excluir a hipótese de que o Golgi intervenha, pelo menos em parte, na produção e transporte do material polissacarídico constituinte da primexina, cuja deposição ocorre nesta fase da microsporogénese. Estas observações estão de acordo com outras efectuadas nas tétradas de *Helleborus* L. (Echlin & Godwin, 1969), *Lilium* L. (Dickinson, 1970 a), *Abies* Miller (Lepousé, 1970), *Pinus* L. (Dickinson, 1971 b; Willemse, 1971 a,e), *Gasteria* Duval. (Willemse, 1972), *Mahonia* Nutt. (Roland-Heydacker, 1979) e *Ceratozamia* Brongn. (Audran, 1981). A actividade dos dictiossomas diminui significativamente no final desta fase, embora os outros organelos celulares não sofram grandes alterações. O ciclo de transformação dos dictiossomas, com fase activa no início do estádio de tétrada e diminuição de actividade no final desta fase, foi também salientado durante o mesmo período da microsporogénese em *Pinus sylvestris* L. (Willemse, 1971 c) mas diferente do observado em *Rhoeo discolor* Hance, *Begonia semperflorens* L., *Cleome spinosa* L., *Saintpaulia ionantha* Wendl. e *Helleborus foetidus* L. (Abreu & Dexheimer, 1973).

2.3 FASE FINAL DA FORMAÇÃO DA PAREDE

A libertação dos micrósporos uninucleados, fase em que se forma completamente a parede do grão de polen, efectua-se pela dissolução rápida da parede de calose. Esta dissolução mediada pela calase, origina oligossacarídeos com ligação ß-1,3 (ex. laminaribiose e laminaritriose) os quais libertam resíduos de glucose que se acumulam no lóculo da antera. Foi até sugerido (Larson & Lewis, 1962; Eschrick, 1964; Waterkeyn, 1964) que os produtos sóluveis, resultantes da dissolução deste polímero polissacarídico, intervêm no metabolismo dos micrósporos e funcionam como substrato para a síntese da esporopolenina.

Nesta fase, os espinhos e a nexina 1 aumentam consideravelmente de volume, sendo bem evidentes, na região dos poros, as estruturas lamelares com depósitos de esporopolenina de um e do outro lado da estrutura membranosa.

De salientar, a formação de um novo estrato, sob a camada continua e

homogénea da nexina 1. Trata-se de uma camada granular, de espessura variável, designada nexina 2, que é consideravelmente mais espessa na região dos poros, onde a nexina 1 é interrompida. Nesta fase da formação da parede, imediatamente após a libertação dos micrósporos, registou-se a presença de glóbulos osmiofílicos de estrutura e densidade electrónica semelhante às da esporopolenina da sexina e da nexina 1. Estes grânulos densos localizam-se perferencialmente entre o plasmalema e a parede, por vezes, em contacto intimo com a nexina 1 e, outras vezes, disseminados na nexina 2. Em alguns micrósporos foi possível observar estas formações no citoplasma periférico, às vezes em associação com vesículas membranosas, mas normalmente livres. Na maioria das espécies estudadas não se encontram referências a estas formações, embora grânulos semelhantes aos observados em *Cucurbita polymorpha* Duch. tenham sido referidos entre o plasmalema e a exina de *Populus tremula* L. (Rowley & Erdtman, 1967) e de *Canna generalis* Bailey (Skvarla & Rowley, 1970), no citoplasma dos micrósporos de *Helleborus foetidus* L. (Echlin & Godwin, 1969) e na nexina 2 e intina de *Lens* Miller e *Pisum* L. (Biddle, 1979). É provável, tal como foi indicado para estas espécies, que estes grânulos densos, que parecem provir do citoplasma da célula haplóide, intervenham de algum modo para a formação da nexina 2 uma vez que nesta camada não foram observadas as lamelas ou "white lines" que se responsabilizaram, em parte, pela formação e crescimento das outras camadas da exina.

É na fase de micrósporo uninucleado, antes da divisão mitótica, que se completa a parede, com a deposição da intina que é a camada situada mais internamente, imediatamente exterior ao plasmalema e contínua à volta da superfície do protoplasto. Esta camada é constituída por polissacarideos, nomeadamente pectinas, hemicelulose e celulose (Roland, 1971; Southworth, 1973; Hara et al., 1977; Heslop-Harrison & Heslop-Harrison, 1982) e calose (Waterkeyn, 1964; Albertini & Souvré, 1978; Ashford & Knox, 1980) juntamente com proteínas (Heslop-Harrison, 1975, 1979).

A observação de camadas concêntricas na intina sugere uma deposição por fases

(Stanley & Linskens, 1974) tendo mesmo sido referidos estratos citoquimicamente distintos (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison, 1980; Heslop-Harrison & Heslop-Harrison, 1982). Em *Lilium longiflorum* Thunb. a intina foi subdividida em três camadas (Nakamura, 1979; Nakamura & Miki-Hirosige, 1985) e, nas gramíneas é de salientar a camada mais externa da intina, conhecida por camada Z ("Zwischenkorper") constituída por pectinas. Em várias Monocotyledoneæ foram consideradas duas camadas distintas na intina: uma camada externa (intina externa) constituída essencialmente por polissacarideos pécticos e outra camada interna (intina interna) onde predominam os compostos celulósicos (Kress & Stone, 1982, 1983), enquanto que a intina do pólen de *Amphibolis griffithii* J.M.Black constitui excepção (McConchie et al., 1982) pelo facto de apresentar uma distribuição uniforme de polissacarídeos e proteínas.

Em *Cucurbita polymorpha* Duch. a deposição da intina foi efectuada por intervenção de vesículas resultantes da actividade dos dictiossomas do micrósporo. A intervenção do aparelho de Golgi na formação deste estrato da parede do pólen foi também indicado para a maior parte das espécies estudadas (Heslop-Harrison, 1968 b,c, 1975; Echlin & Godwin, 1969; Mepham & Lane, 1970; Argue, 1971; Roland, 1971; Dunbar, 1973 a; Roland-Heydacker, 1979; Stone et al., 1979; Willemse & Reznickova, 1980; Sangwan & Camefort, 1983; Suarez-Cervera & Seoane-Camba, 1986) embora noutros casos tenham sido envolvidos os microtúbulos (Mattsson, 1976; Owens & Dickinson, 1983), os plasmalemassomas (Rowley & Skvarla, 1974 b) e vesículas originadas a partir da membrana nuclear interna (Gullvåg, 1970).

Durante o desenvolvimento desta camada, túbulos ou folhetos membranosos resultantes da evaginação do plasmalema são incorporados, quer em toda a superfície (Knox, 1971) quer preferencialmente junto dos poros (Knox & Heslop-Harrison, 1970), tal como observamos em *Cucurbita polymorpha* Duch.. Em mais de 50 famílias de plantas vasculares foram detectadas, nestas inclusões membranosas da intina, a actividade de variadas enzimas sintetizadas no citoplasma do gametófito (Knox & Heslop-Harrison, 1969,1970), nomeadamente a fosfatase

ácida, esterase não específica, amilase, protease e ribonuclease. Técnicas citoquímicas a nível ultraestrutural confirmaram a localização da fosfatase ácida (Horvat, 1969; Knox & Heslop-Harrison, 1971 a; Nakamura, 1979), tendo também sido detectada actividade de DNAse em vesículas distribuídas ao longo da intina (Vaughn, 1982). Algumas destas enzimas hidrolíticas foram relacionadas com fenómenos de germinação e penetração do tubo polínico no estigma (Knox & Heslop-Harrison, 1970) enquanto que outras proteínas (antigénios e alergénios) foram relacionadas com reacções de compatibilidade (Knox, 1971; Heslop-Harrison, 1971 a; Knox & Heslop-Harrison, 1971 b).

Após a diferenciação do micrósporo, com a formação de um grande vacúolo central que faz deslocar o núcleo para a periferia do citoplasma, (situação que antecede a divisão mitótica para originar o grão de pólen binucleado) e após a deposição da intina, a esporoderme está já completamente formada. Desconhece-se, até ao momento, qualquer estudo sobre a ultraestrutura da parede do pólen de *Cucurbita polymorpha* Duch. embora a estrutura e morfologia da parede do pólen das Cucurbitaceæ tenham já sido descritas a nível de microscopia óptica (Awasthi, 1962; Marticorena, 1963; Jeffrey, 1964; Saad, 1964; Keraudren-Aymonin et al., 1969). Estes autores descrevem, para o género *Cucurbita* L., grãos esferoidais, com diâmetro médio de 150-200 µm e recobertos de espinhos. Os poros são circulares e esferoidais, tendo sido referido e de acordo com as nossas observações, com mais frequência 7 poros. No entanto, as diversas observações efectuadas permitiram encontrar, embora com reduzida frequência, 8 e 9 poros. Esta variação do número de poros foi também referida para *Cucurbita maxima* Duch. (Keraudren-Aymonin et al. 1969) e *C. moschata* Duch. ex Poiret (Awasthi, 1962). Este último autor refere que as alterações do número e tipo de aberturas, serão provavelmente o resultado de fenómenos de hibridização. Esta variação do número de poros no pólen da mesma espécie foi já apontada para outros casos, nomeadamente, para algumas espécies de Malvaceæ, cujos grãos de pólen apresentam, também, superfície com espinhos e número de aberturas superior a 6 (Saad, 1960).

Em *Cucurbita polymorpha* Duch. os poros apresentam uma distribuição mais ou menos uniforme em toda a superficie do grão. Estudos efectuados com células mães de pólen submetidas à acção da colquicina (Dover, 1972) e forças de centrifugação (Sheldon & Dickinson, 1983), na sequência de trabalhos de Heslop-Harrison (1971 d), permitiram relacionar a posição das aberturas da parede com os microtúbulos. Nas células sujeitas a tratamento com este alcalóide, o qual interfere com a formação do fuso mitótico, observou-se a formação da esporoderme mas os poros ou não se individualizavam ou distribuiam-se irregularmente. O mesmo se verificava se as células fossem centrifugadas antes da formação do fuso mitótico. Foi também sugerido que no caso de poros dispersos, o arranjo das aberturas ocorreria, em cada micrósporo, independentemente das outras células da tétrada (Muller, 1979).

Os poros operculados de *Cucurbita polymorpha* Duch. apresentam o mesmo tipo de espinhos que a restante parede do pólen. Os espinhos são de duas dimensões diferentes, morfologicamente semelhantes aos que ornamentam a parede dos pólenes de algumas Angiospermæ, tendo sido referidos no genero *Hibiscus* L. os de dimensões mais elevadas, cujo comprimento atinge 33 µm (Erdtman, 1952).

No material em estudo, os espinhos apresentam uma superficie sem cavidades. Porém, o estudo da estrutura interna destes elementos da sexina, revelou a existência de pequenas cavidades grosseiramente circulares ou "foramens", semelhantes aos já descritos na exina de *Parkinsonia aculeata* L. (Larson & Lewis, 1961, 1962), de *Poa annua* L. (Rowley, 1962 a), de *Photinia japonica* Benth & Hook (Larson et al., 1962), de espécies da tribo Heliantheæ das Asteraceæ (Skvarla & Larson, 1965; Skvarla & Turner, 1969) e de *Cosmos bipinnatus* Cav. (Blackmore & Barnes, 1985). Estes "foramens" são cavidades internas que, em algumas Compostas, coexistem com aberturas em comunicação com o exterior, normalmente distribuidas na base dos espinhos e do tecto (Tomb et al., 1974; Horner & Pearson, 1978; Salgado-Labouriau, 1982). Quanto à função destas cavidades da exina, as opiniões divergem. Larson & Lewis (1961) avançaram a hipótese de que representam áreas de baixa impregnação de esporopolenina estando, de algum modo, relacionadas com a

deposição deste constituinte da parede. Horner & Pearson (1978) admitem, porém, que os "foramens" funcionam como canais de armazenamento e transporte de materiais para o interior e exterior da exina, podendo também facilitar a expansão e crescimento deste estrato da parede.

Em algumas espécies (Rowley, 1973; El-Ghazaly & Jensen, 1985), a exina foi caracterizada pela presença de um sistema de microcanais que se distribuiam nesta camada da parede. Os microcanais continham material fibrilar, em contacto directo com o plasmalema. Quando observados ao microscópio electrónico de transmissão, os orbículos e a exina apresentam-se com aspecto de estruturas uniformes. Porém, algumas observações recentes (Rowley & Dahl, 1982; Dunbar & Rowley, 1984; Hesse, 1985; Southworth, 1985 a,b, 1986) sugerem que estas estruturas não são homogéneas, tendo sido descritas unidades ou subunidades de elementos esporopoleninicos. O diâmetro destas subunidades vai aumentando ao longo das diferentes fases de desenvolvimento, possivelmente, por adição sequencial de moléculas de esporopolenina. A justaposição e/ou polimerização das subunidades originara finalmente a exina e os orbículos.

Durante esta fase da deposição completa da parede do grão de pólen de *Cucurbita polymorpha* Duch., os organelos cuja evolução merecem especial atenção são os plastídios e o retículo endoplasmático rugoso.

Nas várias espécies estudadas, os plastidios apresentam comportamento diferente. Nesta planta, após a rediferenciação que estes organelos atravessaram durante a meiose, assiste-se a um aumento significativo da quantidade de amido. Desde o estádio de tétrada, o número de grãos de amido por plastídio vai aumentando, até que na fase de micrósporo vacuolizado se observam vários grãos deste polissacarideo de reserva no estroma destes organelos, que podem, então, classificar-se como amiloplastos. Entre esta espécie e as descritas na literatura da especialidade, há grande diversidade de períodos durante os quais se observa amido nos plastidios. Em posições extremas encontra-se *Beta vulgaris* L. em que se observa

amido em todas as fases da microsporogénese (Hoefert, 1969) em contraste com o "clone" *Piemonte* de *Allium sativum* L. no qual não foi observado amido em qualquer célula da antera (Gori & Ferri, 1982). A ocorrência de plastídios com amido foi descrita nos micrósporos uninucleados de várias espécies de Angiospermæ (Maruyama, 1968; Pacini & Cresti, 1976; Rodriguez-Gracia & Garcia, 1978; Luck & Jordan, 1980; Willemse & Reznickova, 1980; Dickinson, 1981 a,b, 1982; Dickinson & Willson, 1983) enquanto que noutras espécies, nomeadamente, em *Rhoeo discolor* Hance (Abreu & Dexheimer, 1973), *Impatiens balsamina* L. (Dupuis, 1974) e *Datura metel* L. (Sangwan & Camefort, 1983) os plastídios não acumulavam este hidrato de carbono.

Em alguns casos, foram sugeridas hipóteses sobre a génese e degradação do amido. Em *Scilla non-scripta* H. & L. foi sugerido que o amido, cuja deposição se iniciava nos plastídios do micrósporo, tinha como origem a camada especial de calose que se degrada para a libertação das células (Rodriguez-Garcia & Garcia, 1978) enquanto que Dupuis (1974) relacionou o desaparecimento do amido dos plastídios do micrósporo uninucleado com o início da organização da exina. Em *Lilium* L. a síntese do amido foi associada a inclusões presentes no estroma dos plastídios e designadas por "membrane particle association" (MPA), que testes citoquímicos demonstraram conter elevada percentagem de hidratos de carbono (Dickinson & Willson, 1983).

O retículo endoplasmático rugoso apresenta aspectos peculiares no micrósporo uninucleado de *Cucurbita polymorpha* Duch.. As cisternas rugosas exibem aspectos diversos com dimensões variadas, dilatando-se e acumulando material finamente granular, possivelmente de natureza proteica. Não se conhecem na literatura da especialidade, referências a inclusões proteicas no retículo rugoso dos micrósporos, embora no pólen de *Gossipium hirsutum* L. (Fisher et al.,. 1968) tenham sido descritas bolsadas de retículo endoplasmático que armazenam proteínas, lípidos, hidratos de carbono e RNA, no pólen de *Malus comunis* Poiret (Cresti et al., 1983) cisternas dilatadas de retículo rugoso armazenem proteínas de reserva, e reservas

proteolipidicas se acumulem no retículo do gametófito feminino de *Ginkgo biloba* L. (Dexheimer, 1975), mas cuja morfologia é, em qualquer dos casos, distinta da que observamos.

No entanto, são variadas as referências, nas células das plantas, a dilatações das cisternas do retículo rugoso acumulando material granuloso, filamentoso, tubular ou mesmo cristalino. Assim, foram descritas estas inclusões nos pêlos radiculares de *Raphanus sativus* L. (Bonnett & Newcomb, 1965), no nucelo de *Gossipium hirsutum* L. (Jensen, 1965), em elementos crivosos das folhas de *Isoetes muricata* Dur. (Kruatrachue & Evert, 1974), nas células em diferenciação do xilema das folhas de *Mimosa pudica* L. (Esau, 1975 b), em vários géneros de Brassicaceæ (Cresti et al., 1974; Hoefert, 1975; Jørgensen et al., 1977; Ponzi et al., 1978) e Capparaceæ (Jørgensen et al., 1977; Ponzi et al., 1978; Behnke & Eschlbeck, 1978), em células de tecido caloso de *Armoracia* Gilib. (Gailhofer et al., 1979), nas células basais da lígula de *Isoetes lacustris* L. (Kristen & Biedermann, 1981), e também em células de caules jovens de duas espécies de *Rhipsalis* Gaertn (Santos & Salema, 1983). Aspectos semelhantes foram também observados em células animais, nomeadamente, em fibroblastos durante a síntese de colagéneo (Goldberg & Green, 1964; Ross & Benditt, 1964) e em células do endotélio vascular de ratos (Weibel & Palade, 1964).

No micrósporo de *Cucurbita polymorpha* Duch. as cisternas do retículo endoplasmático acumulam material densamente granular, com aspecto muito semelhante ao originalmente observado por Bonnett & Newcomb (1965), surgindo tambem apensos às membranas do retículo, ribossomas livres e outros em agregados tipo polissoma. A função destas inclusões proteicas nas cisternas dilatadas de retículo endoplasmático rugoso é ainda obscura. Em *Mimosa pudica* L. (Esau, 1975 b) e *Isoetes muricata* Dur. (Kruatrachue & Evert, 1974) foi sugerida a sua relação com a formação dos espessamentos secundários das paredes celulares, embora, no segundo caso, não tenha sido excluída a hipótese de funcionarem apenas como substâncias ergásticas. Jensen (1965) e Ponzi e colaboradores (1978) adiantaram a

hipótese de que estas acumulações funcionem como reservas proteicas ou enzimáticas, essenciais à nutrição e/ou desenvolvimento, durante a embriogénese. Esta última sugestão parece ser a mais aplicável às acumulações do microsporo devendo, provavelmente, constituir material de reserva a ser utilizado aquando da germinação do tubo polínico.

3. ACÇÃO DE AGENTES QUÍMICOS NAS ANTERAS DE *CUCURBITA POLYMORPHA* DUCH.

3.1 ACIDO GIBERELICO

Nas células das plantas, o ácido giberélico interfere com variados processos metabólicos, alguns dos quais se traduzem em alterações a nivel ultraestrutural. Nas células de aleurona das sementes de *Hordeum vulgare* L. (Jones, 1969 a,b) , o ácido giberelico induziu um aumento consideravel das cisternas do reticulo endoplasmático rugoso, as quais se distribuiam paralelamente, em agregados. Acção semelhante se registou no reticulo rugoso das células polinicas de *Cucurbita polymorpha* Duch. Na camada de aleurona, após esta fase de latência, assistiu-se, também, ao aumento do numero de ribossomas, associados às membranas do reticulo, que adquiriam a configuração polissómica, iniciando-se então a sintese de uma enzima hidrolitica, a α-amilase, que ia actuar sobre o amido do endosperma das sementes. Seguia-se então, a fragmentação do reticulo em numerosas vesiculas, às quais se associava o transporte da α-amilase. Resultados semelhantes foram descritos por Vigil & Ruddat (1973), Armstrong & Jones (1973) e Obata (1979), tendo este ultimo autor referido que a proliferação do reticulo endoplasmático rugoso ocorria durante o periodo de sintese da enzima e a secreção se traduzia apenas por uma aproximação do reticulo com o plasmalema.

Nos cotiledones de *Lactuca sativa* L. (Das, 1973), a acção do ácido giberélico motivou o desaparecimento do amido dos plastidios assim como diminuição do sistema lamelar. Assistiu-se também ao aumento do volume do nucléolo e diminuição dos polissomas no citoplasma. Em cloroplastos isolados do hipocótilo de *Cucumis sativus* L. (Katsumi et al., 1982; Kazama & Katsumi, 1983, 1984), o ácido giberélico conduziu à degradação do amido, embora este hidrato de carbono não sofresse qualquer alteração, se a hormona actuasse após a incubação dos plastidios numa solução de sacarose. Os autores concluiram, assim, que a degradação do amido, por acção do ácido giberélico, é devida à inibição da síntese do amido mas não acelera a sua degradação.

Em folhas de *Digitaria decumbens* Stent. verificou-se um aumento da actividade das enzimas degradativas do amido, após incubação com o ácido giberélico (Carter et al., 1973) e durante o desenvolvimento do embrião de duas espécies de *Medicago* Tour. foi também sugerida uma relação directa entre a síntese do ácido giberélico, que ocorre nestas células, e a degradação do amido (Sangduen et al., 1983).

Efeitos opostos foram referidos no gametófito de *Lygodium flexuosum* (L.) Sw. (Trivedi & Kher, 1977) onde o ácido giberélico, além de favorecer o aumento do número de ribossomas, dictiossomas, mitocôndrias e cloroplastos, provocou também , nestes últimos organelos, a formação de amido. Estas alterações traduziram, por conseguinte, um aumento da actividade das células. Nas células do endosperma de *Ricinus communis* L., o ácido giberélico foi responsabilizado pelo aumento da actividade de várias enzimas intervenientes no ciclo da gluconeogénese (Marriott & Northcote, 1975; Wrigley & Lord, 1977; Gonzalez & Delsol, 1981).

Nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch. não é fácil a explicação do efeito do ácido giberélico no amido dos plastídios das células polínicas em meiose. Após 24 horas de tratamento, observaram-se grãos de amido nos plastídios e após 48 horas o tamanho dos grãos era significativamente menor. A razão deste comportamento torna-se ainda mais obscura pois, tal como foi descrito no Capítulo 2 dos Resultados, os plastídios apresentam amido antes da meiose, o qual vai progressivamente desaparecendo, deixando de se observar entre as fases de zigóteno e de paquíteno. Não é, assim, de excluir a hipótese de que as imagens observadas ao fim de 24 e de 48 horas coincidam, respectivamente, com a fase anterior e final do desaparecimento do amido. Nesta situação, o ácido giberélico não deve ter exercido qualquer acção no amido já existente nos plastídios, tal como foi referido nos plastídios de *Cucumis sativus* L., quando a hormona exercia a sua acção após a incubação dos plastídios em meio com sacarose, o que conduzia à síntese do amido (Katsumi et al., 1982; Kazama & Katsumi, 1983, 1984). Em culturas de tecidos derivados de anteras de *Helianthus annuus* L. (Santos & Salema, 1984), o ácido giberélico, presente no meio de cultura, também não impediu a formação de amido nos plastídios.

Se, no entanto, se estava em presença dum estádio anterior à fase de degradação do amido, então é possível sugerir que a diminuição da quantidade de amido seja devida à acção do ácido giberélico, embora esta acção não se manifestasse durante a fase inicial de 24 horas. Assim, e tal como foi referido para as células de aleurona (Jones, 1969 a,b) poderá existir um período de latência, após o qual as enzimas hidrolíticas são sintetizadas.

Os trabalhos publicados sobre a acção do ácido giberélico em diferentes tecidos apresentam, como referido, resultados contraditórios. Enquanto que nas células de aleurona se assiste ao aumento da síntese da α-amilase, a actividade desta enzima não é afectada quando a hormona é fornecida a culturas de tecido caloso de *Nicotiana tabacum* L. (Leung & Thorpe, 1985). Mesmo nas células de aleurona de *Hordeum vulgare* L., a hormona estimulou a libertação de sacarose mas não teve qualquer influência na síntese do dissacarídeo (Chrispeels et al., 1973). Já em 1972, Paleg & West tinham referido que, nas células do endosperma que continham amido não era observado qualquer efeito das giberelinas, enquanto que se desencadeava uma série de processos metabólicos quando a hormona atingia a camada de aleurona circundante. Resultados paralelos registaram-se no material em estudo pois, embora, o ácido giberélico alterasse o metabolismo das células polínicas, não teve qualquer efeito sobre o tapete que as rodeia. Resultados antagónicos foram também encontrados em culturas de tecidos, no que respeita à acção desta hormona na diferenciação de elementos de xilema (Minocha & Halperin, 1974; Phillips & Dodds, 1977; Watson & Halperin, 1981).

Na realidade, o efeito produzido varia grandemente com o tecido em causa e a concentração utilizada. Podemos, no entanto, verificar que nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch., o ácido giberélico interferiu com o desenvolvimento das células mães do grão de pólen, alterando de algum modo a actividade metabólica destas células.

3.2 ACIDO MEVALÓNICO

A presença de carotenóides nas anteras das plantas é conhecida desde longa data, encontrando-se também estes compostos nas algas e fungos que produzem esporos (Shaw, 1971). A fim de relacionar os carotenóides com a esporopolenina presente na parede dos grãos de pólen, Brooks & Shaw (1968 a,b, 1971) e Shaw (1971) decidiram realizar a polimerização oxidativa de vários carotenóides, utilizando diferentes condições experimentais e vários catalizadores. Assim, vários carotenóides, incluindo o ß-caroteno, e ésteres de carotenóides, polimerizados nas mesmas condições, originaram, na maioria dos casos, polímeros semelhantes à esporopolenina natural.

A incorporação de precursores radioactivos nos carotenóides tem sido utilizada para estudar a sua localização no pólen em desenvolvimento e aprofundar as inter-relações do pólen com o tapete. Os precursores mais utilizados foram o ^{3}H-acetato, o ^{14}C-mevalonato e a ^{3}H-colina. Quanto ao precursor presentemente em estudo, o mevalonato, os resultados não têm sido concordantes. Este precursor não foi incorporado nas anteras de *Gerbera jamesonii* Hook. (Southworth, 1971) enquanto que em *Lilium* L. se verificou a incorporação do mevalonato na anteroxantina, embora este composto não fosse significativamente detectado na esporopolenina (Brooks & Shaw, 1977, 1978). No entanto, Albertini e colaboradores (1981 a) demonstraram, através de estudo autorradiográfico a nível de microscopia óptica, a incorporação de ^{14}C-mevalonato na exina do pólen em desenvolvimento de *Rhoeo discolor* Hance, assim como no citoplasma do tapete, a partir da fase de tétrada.

Nas anteras do material em estudo, o ácido mevalónico (sob a forma de lactona) foi fornecido a hastes florais imersas em solução aquosa do composto. O tratamento motivou alterações significativas da ultraestrutura das células mães do pólen, que se traduziram, essencialmente, pelo aparecimento de grânulos de aspecto e densidade electrónica semelhantes aos depósitos de esporopolenina das células do tapete. Como o mevalonato é um precursor dos carotenóides, parece possível sugerir que a aplicação exógena desencadeou todo o processo de síntese da esporopolenina. Parece,

no entanto, que este processo biossintético ocorreu, prematuramente, durante o desenvolvimento ontogénico da antera pois, no estádio normal, só durante a fase de tétrada se inicia a deposição dos primeiros elementos esporopoleninicos, que vão contribuir para a formação da parede do pólen.Durante a microsporogénese normal, é na primexina, camada disposta entre o plasmalema e a calose das tétradas, que se depositam os precursores esporopoleninicos, funcionando a primexina como molde para a parede em formação (como referido no Capítulo 2.2 dos Resultados). É provável que a inexistência de primexina nas células mães justifique a disposição desordenada dos depósitos de esporopolenina.

Nas células das plantas, os plastídios têm sido responsabilizados pela síntese dos carotenóides, pelo menos a partir da formação do mevalonato. Vários trabalhos têm referido a síntese de carotenóides, ocorrendo tanto em cloroplastos como em cromoplastos e estioplastos (Rogers et al., 1966; Treharne et al., 1966; Subbarayan et al., 1970; Bickel & Schultz, 1976; Ridley & Ridley, 1979; Grumbach & Forn, 1980; Camara et al., 1982, 1985 a,b; Camara, 1984; Beyer et al., 1985; Kleinig & Beyer, 1985). No material em estudo e após o fornecimento do mevalonato, não foi possível relacionar, ultraestruturalmente, os plastídios com a deposição do material electronicamente denso semelhante à esporopolenina.Estes depósitos, além da sua localização preferencial no plasmalema, foram também observados em relação com as cisternas de retículo endoplasmático rugoso, que exibia um certo grau de dilatação com a formação de vesículas, o que o assemelhava ao sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso característico das células do tapete desta espécie. A inexistência, pelo menos aparente, de qualquer relação nestas células, entre a síntese de carotenóides e os plastídios poderá ter explicação noutros trabalhos publicados que localizam, pelo menos alguns dos passos da biossíntese dos carotenóides, em outros compartimentos celulares. Assim, algumas das enzimas responsáveis por estas reacções biossintéticas foram localizadas no citoplasma de folhas variegadas, sem cloroplastos, de *Pelargonium* L. e *Hibiscus* L. (Rogers et al., 1966) e dos cotilédones de *Cucumis* L. (Loomis & Battaile, 1963), na fracção microssómica de plântulas de

Pisum sativum L. (Brooker & Russell, 1975 b) e nos proplastídios e mitocôndrias do endosperma de *Ricinus communis* L. (Green et al., 1975). Sabe-se também que a síntese dos carotenóides em *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. é dependente do DNA nuclear (Sirevåg & Levine, 1973). Estudos realizados com um inibidor da síntese dos carotenóides, mostraram que o produto não podia penetrar nos cloroplastos em desenvolvimento, pelo que o seu efeito inibidor deveria ser exercido a partir do citoplasma (Ridley & Ridley, 1979). Nas folhas de *Triticum* L. e nos frutos de *Capsicum* L. (Camara, 1984) verificou-se que a síntese duma das enzimas do metabolismo dos carotenóides, a sintetase do fitoflueno, é sintetizada nos ribossomas 80 S. Finalmente, o estudo da biossíntese dos carotenóides em *Neurospora crassa* Shear & Dodge (Mitzka-Schnabel & Rau, 1980, 1981) revelou que a actividade máxima da génese dos carotenos (cerca de 80%) estava localizada em duas fracções membranares, que incluíam a membrana citoplasmática e, em particular, as membranas do retículo endoplasmático.

Todos estes resultados parecem sugerir que este processo metabólico possa resultar da intervenção de vários organelos celulares ou que, pelo menos, algumas das enzimas intervenientes sejam sintetizadas em determinado local e depois transportadas para o local de síntese.

A biossíntese dos carotenóides nas anteras das plantas ainda não está totalmente esclarecida, desconhecendo-se os mecanismos bioquímicos que controlam a síntese destes pigmentos, a partir de precursores metabólicos comuns em vez de, alternativamente,conduzirem à síntese de esteróides ou de outros compostos (Stanley & Linskens, 1974).

3.3 COLQUICINA

Os trabalhos que se conhecem sobre a acção da colquicina nas anteras das plantas superiores, durante a meiose, visam apenas os efeitos produzidos na divisão nuclear e nos cromossomas, omitindo quaisquer outros efeitos a nível citoplasmático, que possam interferir no desenvolvimento do gametófito. O efeito da colquicina foi

ensaiado nas anteras, em cultura (Walker, 1957; de la Peña & Puertas, 1978; de la Peña et al., 1979) ou em hastes florais (Driscoll et al., 1967; Roy, 1975; Bennett et al., 1979 b; Hotta et al., 1979; Toledo et al., 1979), tendo sido descritas alterações na evolução do processo meiótico. De salientar, a inibição do emparelhamento dos cromossomas homólogos (Driscoll et al., 1967; de la Peña & Puertas, 1978) e a interferência nos mecanismos e condições de formação dos quiasmata (Dover & Riley, 1973; de la Peña et al., 1979; Bennett et al., 1979 b; Toledo et al., 1979). A colquicina fornecida às células mães do pólen impediu, também, a formação do fuso mitótico nas anteras de *Tradescantia* L. (Walker, 1957), *Triticum* L. (Dover, 1972) e *Zea* L. (Roy, 1975), possivelmente, por ligação às subunidades da tubulina inibindo a polimerização dos microtúbulos, induzindo assim a formação de mónadas em vez de tétradas.

A nível ultraestrutural apenas se conhecem os efeitos da colquicina nas anteras de *Triticum æstivum* L. (Bennett & Smith, 1979 a,b). Tratamentos prolongados induziram o aparecimento, nas células do tapete, de inclusões paracristalinas, que os autores relacionaram com a actividade funcional destas células (Bennett & Smith, 1979 a). Porém, nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch. independentemente da concentração da colquicina, do tempo de tratamento e da fase de evolução do tapete, estas células nunca apresentaram estruturas semelhantes às descritas nas anteras do trigo.Também nestas anteras e no estádio normal (Bennett et al., 1979 a) as células mães do pólen apresentam feixes intranucleares de microfibrilas que não desaparecem por acção da colquicina, embora a concentração utilizada impeça a polimerização dos microtúbulos do fuso mitótico (Bennett & Smith, 1979 b). Recentemente, no tapete plasmodial de *Tradescantia virginiana* L. (Tiwari & Gunning, 1986 d) foi referida a intervenção da colquicina na secreção da esporopolenina, conduzindo à deposição desordenada deste biopolimero.

As alterações observadas nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch. após tratamento pela colquicina, nomeadamente, a dilatação da cisterna perinuclear e do retículo endoplasmático, a desorganização dos dictiossomas, o aparecimento de

agregados de filamentos e as configurações tipo "nebenkern" do retículo endoplasmático rugoso, foram,em parte, já referidas em outras células, após a acção deste alcalóide. Assim, nas células meristemáticas da raiz de *Allium cepa* L. (Wirkus & Meenakshi, 1968) foram descritas invaginações da membrana nuclear interna, além da formação de polirribossomas e disposição do retículo liso em estruturas multilamelares, e nas células da folha de *Sedum telephium* L. foi observada a dilatação dos grana dos cloroplastos, surgindo também alterados o retículo endoplasmático e as mitocôndrias (Santos, 1979). Estudos bioquímicos realizados em células animais, demonstraram a ligação da colquicina a proteínas das membranas do invólucro nuclear e do retículo endoplasmático (Stadler &Franke, 1974).

Nos axopódios de *Actinosphærium nucleofilum* (Barrett) (Tilney, 1968) após a desorganização dos microtúbulos por acção da colquicina, observava-se a deposição de material finamente fibrilar e de macrotúbulos com cerca de 320 Å de diâmetro, os quais se encontravam também, após despolimerização dos microtúbulos, por acção de baixas temperaturas (Tilney & Porter, 1967). Os túbulos observados nos micrósporos de *Cucurbita polymorpha* Duch. apresentam diâmetro semelhante aos destes macrotúbulos, embora os observados nas células polínicas durante a meiose sejam de menores dimensões. Tal como referido por Tilney & Porter (1967) e Tilney (1968) é possível que os túbulos, observados depois do tratamento pela colquicina, resultem da desorganização dos microtúbulos. A formação de inclusões tubulares, após adição desta alcalóide, foi também descrita em células de *Allium* L. (Deysson, 1975), no nucleoplasma e citoplasma de células de cultura de *Sedum telephium* (Santos, 1979) e em células animais "in vivo" e em cultura (De Brabender et al., 1975).

Quanto à desorganização dos dictiossomas, é conhecida a acção directa ou indirecta da colquicina, inibindo fenómenos de secreção por interferência com o deslocamento de vesículas derivadas dos dictiossomas, para a periferia da célula. Tal situação foi detectada nas células do hipocótilo de *Lactuca sativa* L. (Srivastava et al., 1977) e em algumas células animais (Moskalewki et al., 1975; Patzelt et al., 1977;

Knudson et al., 1978).

A formação de agregados concêntricos de cisternas do retículo endoplasmático rugoso foi referida, pela acção da colquicina, tanto em células vegetais, nomeadamente,nos tubos polínicos de *Lobelia erinus* L. (Dexheimer, 1966 b) e nas células meristemáticas das raizes de *Allium cepa* L. (Mesquita, 1966) como em células animais (Knudson et al., 1978).Disposições tipo "nebenkern" do retículo endoplasmático foram também referidas, tanto em condições normais como experimentais, nos meristemas radiculares de *Hyacinthus orientalis* L. em estádio de anoxia (Gavaudan et al., 1960), nos tubos polínicos de *Lobelia erinus* L. tratados pelo cloranfenicol (Dexheimer, 1966 a), nas células meristemáticas da raiz de *Allium cepa* L. após tratamento pelo fenil-uretano (Mesquita, 1968) e por inibidores da respiração (Podbielkowska et al., 1975), nas células dos primórdios foliares de *Betula verrucosa* Ehrh. (Dereuddre, 1971), nos micrósporos uninucleados de *Saintpaulia ionantha* Wendl. (Abreu & Dexheimer, 1973), nas células dos ápices caulinares do trigo (Pomeroy & Andrews, 1978 a,b), nos embriões de *Pyrus malus* L. (Bouvier-Durand et al., 1981) por acção de baixas temperaturas, nas raízes de *Lycopersicum esculentum* Mill. (Morisset, 1983) e também durante a maturação do embrião de *Sinapsis alba* L. (Bergfeld &Schopfer, 1984). De um modo geral,quer nas situações naturais quer em condições experimentais, a formação dos "nebenkerns" do retículo endoplasmático rugoso foi relacionada com alterações da actividade metabólica das células. No presente caso, parece possível sugerir também que os agregados reticulares correspondam a uma resposta a alterações do metabolismo, devido à acção da colquicina.

É também possível que as alterações observadas nestas anteras com o tratamento pela colquicina resultem de um efeito secundário deste alcalóide. Na verdade, sabe-se que a colquicina interfere com variados processos metabólicos, não directamente relacionados com a desagregação dos microtúbulos. Assim, a colquicina tem sido relacionada com síntese de DNA, RNA e proteínas (Chakraborty & Biswas, 1965; Gustafsson, 1968; Fitzgerald & Brehant, 1970; Kurmich & Zimmerman, 1972),

com mecanismos de processos de secreção (Robins & Juniper, 1980; Godfrey et al., 1982; Oda et al., 1983), com alterações da ultraestrutura da membrana celular (Wunderlik et al., 1973), com o transporte de RNA do núcleo para o citoplasma (Agutter & Suckling, 1982; Schumm & Webb, 1982) e também com a estabilidade dos polirribossomas (Walker & Whitfield, 1985).

O facto de se terem observado alterações por acção directa ou indirecta da colquicina, tanto nas células do tapete como nas células polínicas, sugere uma possível interferência nas relações entre os dois tipos de células. Tal situação foi já referida durante a meiose em *Lilium speciosum* Thunb. (Bennett et al., 1979 b), tendo os autores adiantado a hipótese de que o alcalóide interfere com o transporte entre o tapete e os microsporócitos.

3.4 GLUCOSE E SACAROSE

No pólen, a glucose e a sacarose são os açúcares livres que se encontram em maior concentração. A quantidade relativa destes compostos varia consoante as espécies e as condições fisiológicas (Stanley & Linskens, 1974). O mesmo se verifica quanto à presença de amido. Baker & Baker (1979, 1982) verificaram que as Angiospermæ compreendem famílias caracterizadas por possuírem pólen com amido, enquanto que o pólen de outras famílias não o acumulam. Dentro da mesma família, algumas espécies apresentam pólen com amido e outras sem este hidrato de carbono.

Nas células mães do grão de pólen, durante a meiose, é variável a presença de amido nos plastídios. Em alguns casos (Heslop-Harrison, 1963 a; Vasil & Aldrich, 1970; Audran, 1978, 1981; Albertini & Souvré, 1978; Souvré, 1981) os plastídios acumulam amido durante a meiose, enquanto que noutros este polissacarídeo não se deposita neste estádio (Dickinson & Heslop-Harrison, 1970 b; Luck & Jordan, 1980) ou só se observa durante algumas fases (Maruyama, 1968).

Também nas células do tapete, a presença ou ausência de amido é variável consoante as espécies e, na mesma espécie, durante a microsporogénese. Durante o período meiótico, foram observados plastídios com amido no tapete de *Pinus* L.

(Willemse, 1971 b), *Ceratozamia* Brongn. (Audran, 1978), *Lens* Miller (Biddle, 1979) e *Parthenium hysterophorus* L. (Rudramuniyappa, 1985), mas sem amido no de *Tradescantia* L. (Mepham & Lane, 1969 b), *Antirrhinum* L. (Lombardo & Carraro, 1976 a) e *Rhoeo discolor* Hance (Souvré & Albertini, 1982).

Para as outras camadas da parede da antera, as referências são escassas, embora nas anteras de *Zea mays* L. (Panchaksharappa & Rudramuniyappa, 1974), *Iphigenia pallida* Bak. (Panchakskarappa & Syamasendar, 1974) e *Pisum* L. (Biddle, 1979) se tenha observado amido nas células da parede, do endotécio e da camada mediana. O mesmo se verificou nas anteras de *Lilium candidum* L. (Reznickova & Willemse, 1980), tendo os autores admitido que este produto de reserva forneça os precursores essenciais para o pólen em desenvolvimento.

No material em apreço, não se observou, durante a meiose, amido nas células da parede da antera e, no tapete e nas células mães do grão de pólen, este hidrato de carbono só se evidenciou no período pré-meiótico e no início deste estádio de divisão. Após o tratamento das anteras com glucose, registou-se um aumento do número de grãos de amido por plastídio, no início da meiose. Depois da deposição da parede de calose, e tal como no estádio normal, os plastídios não acumulavam amido. O mesmo se verificou nas células do tapete, embora nos plastídios das células da parede se acumulasse este polissacarídeo. O tratamento com a sacarose não induziu a formação de amido em qualquer dos diferentes tipos de células constituintes da antera.

Os resultados observados parecem sugerir que a glucose penetrou facilmente as celulas mães do pólen mas a parede de calose passou a impedir a passagem deste monossacarideo. Estas observações estão em contradição com as de Southworth (1971) e de Albertini & Souvré (1978) que concluiram, através de estudos autorradiográficos, que a glucose passava livremente através da calose dos microsporócitos. A parede de calose foi, no entanto, considerada como um "filtro molecular", permitindo a passagem de nutrientes mas impedindo a penetração de moléculas de dimensões mais elevadas como, por exemplo, a timidina tritiada (Heslop-Harrison & Mackenzie, 1967).

Pode também admitir-se a hipótese de que a glucose tenha penetrado a parede de calose mas tenha sido impedida de atravessar o invólucro dos plastídios. Esta hipótese parece pouco provável pois sabe-se que o invólucro dos cloroplastos parece permitir a passagem de glucose (Heber, 1974; Walker, 1976; Heber & Heldt, 1981) e nas células da parede da antera a passagem efectuou-se pois, ao contrário do processo ontogénico normal, depositou-se amido nos plastídios. Embora o transporte da glucose seja inibido por uma concentração elevada do composto no meio (Schafer et al., 1977), este monossacarídeo, que constitui grande parte dos produtos resultantes da degradação do amido (Heldt et al., 1977; Peavey et al., 1977), é transportado por meio de um translocador específico associado à membrana interna do invólucro plastidial (Schafer et al., 1977).

Experiências realizadas com hastes florais isoladas de cravo (*Dianthus* L.) mergulhadas em soluções aquosas de glucose, mostraram que a glucose é transformada em sacarose antes de ser translocada para as flores (Ho & Nichols, 1975). A sacarose acumula-se então nas peças florais e nas folhas e tem de ser posteriormente hidrolisada para que glucídeos livres sejam utilizados pela flor (Paulin, 1979; Paulin & Droillard, 1982).

Em face destas considerações, e admitindo a hipótese de que o mecanismo de transporte da glucose nas hastes florais de *Cucurbita polymorpha* Duch. é análoga à observada em *Dianthus* L., poderíamos avançar a hipótese de que, nas anteras desta Cucurbitaceæ em estudo, não se encontrem as enzimas necessárias à hidrólise da sacarose. Esta mesma hipótese poderia aplicar-se ao facto de não se ter observado a formação de amido, quando se forneceu uma solução de sacarose às hastes florais. Na verdade, diversos estudos efectuados em vários laboratórios, mostraram que o invólucro dos cloroplastos é impermeável à sacarose e que este composto não é sintetizado nestes organelos isolados (Heber & Willenbrink, 1964; Nobel, 1969; Heldt & Sauer, 1971; Wang & Nobel,1971; Walker, 1976; Avigad, 1982). O mesmo se verificou nos amiloplastos de tecidos de reserva, onde a sacarose é previamente hidrolisada em trioses fosfato, antes que os átomos de carbono penetrem no plastídio

(Liu & Shannon, 1981; Preiss, 1982). Esta teoria não tem sido, no entanto, partilhada por todos os autores. Estudos efectuados com sementes de trigo (Jenner, 1974), embriões de soja (Thorne, 1982) e discos foliares de *Phaseolus coccinius* Lamk. (Daie, 1985) concluiram que a utilização da sacarose não está dependente da hidrólise extra ou intracelular. Thorne (1982) adiantou mesmo que a entrada do açúcar para os vacúolos e para os proplastídios se faz com a molécula de sacarose intacta.

De salientar, contudo, que experiências realizadas com culturas de pólen de *Pinus mugo* Turra (Nygaard, 1977) mostraram que a sacarose incorporada no meio de cultura, é aí hidrolisada em frutose e glucose antes de ser utilizada, durante o crescimento do tubo polínico e na síntese do amido. Situação idêntica foi descrita durante a germinação do pólen de *Camellia japonica* L. (Nakamura et al., 1980) e de *Lilium longiflorum* Thunb. (Deshusses et al., 1981).

A hidrólise da sacarose é realizada por acção de invertases associadas à parede celular ou presentes nos vacúolos, ou pela reacção inversa da catalisada pela sintase da sacarose, no citoplasma. A actividade da invertase foi detectada no pólen de várias espécies (Brewbaker, 1971; Lendzian & Schafer, 1973; Stanley & Linskens, 1974; Singh et al., 1977; Bryce & Nelson, 1979; Nakamura et al., 1980; Singh & Knox, 1984). Nestas espécies, a utilização da sacarose para a síntese de polissacarídeos far-se-á através da hidrólise da sacarose. É, no entanto possível, que esta hidrolase não se encontre ou não esteja activa nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch., impedindo assim a utilização da sacarose.Também não é de excluir a hipótese, adiantada por Bryce & Nelson (1979) de que os produtos resultantes da hidrólise da sacarose possam ser utilizados em outras vias metabólicas nomeadamente, a glicólise, o ciclo das pentoses e a biossíntese de polissacarídeos da parede, em vez da síntese do amido.

4. LOCALIZAÇÃO CITOQUÍMICA DE ALGUMAS ENZIMAS A NÍVEL ULTRAESTRUTURAL NAS ANTERAS DE *CUCURBITA POLYMORPHA* DUCH.

4.1. HIDROLASES

4.1.1. Fosfatase ácida

Nas células vegetais, a enzima hidrolítica mais extensivamente estudada é a fosfatase ácida. Porém, nas plantas, as fosfatases ácidas não são específicas (Shaw, 1966; Matile, 1975), característica que facilita o seu envolvimento em vários processos líticos na célula.

As células do tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch. apresentaram elevada actividade, quando incubadas no meio de Gomori. Assim, manifestaram reacção positiva o plasmalema, o invólucro das mitocôndrias e dos plastídios, e os dictiossomas. Alguma marcação foi também encontrada no sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso.

Nas células das plantas, são várias as referências, a nível ultraestrutural, desta enzima hidrolítica, cujos resultados estão de acordo com os observados neste trabalho. A localização citoquímica da fosfatase ácida no plasmalema foi referida no tubo polínico de *Prunus avium* L. (Lin et al., 1977), no pólen de *Tradescantia* L. (Horvat, 1969) e de *Crocus vernus* (L.) Hill. (Knox & Heslop-Harrison, 1971 a) e, desde o início da meiose, no tapete de *Taxus baccata* L. (Pennell & Bell, 1986). Parece provável que esta localização traduza, no caso do pólen, a passagem da enzima do citoplasma para a intina, onde se deposita. De salientar, o estudo realizado durante a microsporogénese em *Zamia floridana* A. DC. (Zavada, 1983) em que a actividade da fosfatase ácida foi detectada no plasmalema das células do tapete e, nos micrósporos durante a formação da esporoderme, aparecia associada ao plasmalema e a vesículas citoplasmáticas. Esta localização enzimática levou o autor a sugerir que a fosfatase ácida desempenhe um papel importante na esterificação do isopentenil pirofosfato, um precursor envolvido no processo de biossíntese de carotenóides, estando assim implicado na formação da esporopolenina.

A marcação ao nível do plasmalema foi descrita por outros autores,

nomeadamente, em tecidos esporogénicos (Geneves, 1969), em meristemas radiculares (Poux, 1970), nos tecidos nutritivos de certas zoocecídeas (Bronner, 1973, 1974), em células crivosas (Sauter, 1977) em laticíferos em diferenciação (Giordani, 1981), em células caulinares (Moore & Walker, 1981) e em células estomáticas (Couot-Gastelier & Louguet, 1985). Embora alguns autores não atribuam função especial para a fosfatase ácida do plasmalema, outros implicam esta enzima no transporte activo de açúcares.

A marcação de fosfatase ácida nas membranas das mitocôndrias e dos plastídios tem sido também descrita para algumas células vegetais, embora sejam escassas as referências existentes. De referir, a reacção positiva observada nas mitocôndrias das células xilémicas de *Phaseolus vulgaris* L. (Charvat & Esau, 1975), nas células floémicas de *Nicotiana tabacum* L. (Bentwood & Cronshaw, 1976), nas células das glândulas digestivas de *Drosera capensis* L. (Dexheimer, 1978 a), nas células meióticas de *Lilium* L. (Bird et al., 1983) e nas células epiteliais do escutelo de *Hordeum vulgare* L. (Chaffey & Harris, 1985), embora diversos autores considerem os depósitos intramitocondriais de fosfato de chumbo como artefacto. A presença de fosfatase ácida nas mitocôndrias das células mães do pólen de *Lilium* L. (Bird et al., 1983) foi relacionada com o início da degradação que estes organelos vão sofrer durante a meiose. Também, nas células do tapete, após este período de síntese activa, os diversos organelos celulares vão degenerando, acabando estas células por sofrer uma autólise completa.

A fosfatase ácida foi também indicada como activa nos cloroplastos das células xilémicas de *Phaseolus vulgaris* L. (Charvat & Esau, 1975) e em proplastídios de células das raízes de *Vicia faba* L. (Gahan & McLean, 1969) e de *Lens esculenta* Moench. (Nougarède & Pilet, 1976) e nos meiócitos femininos de *Capsella* Medicus (Schulz & Jensen, 1981). A actividade desta enzima nos proplastídios do tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch. poderá estar, tal como nas mitocôndrias, relacionada com o início do processo degenerativo que vai atingir estas células.

Os dictiossomas são, também, dos organelos que manifestam reacção positiva à

fosfatase ácida. Tal facto foi descrito nas células meristemáticas (Poux, 1963 a,b; Coulomb, 1969; Gahan & McLean, 1969; Coulomb & Coulon, 1971; Marty, 1972; Coulomb & Coulomb, 1972; Pellegrini, 1974), em zonas de abscisão de folhas (Hall & Sexton, 1974), em células de elementos condutores de xilema e floema (Charvat & Esau, 1975; Bentwood & Cronshaw, 1976), em células de glândulas digestivas (Dexheimer, 1978 a) e em vários tipos de células vegetais (Dauwalder et al., 1969; Poux, 1974). A presença de fosfatase ácida nos dictiossomas levou, a maioria dos autores, a admitir que estes organelos participam na destruição de elementos de origem intra ou extracelular. Este processo realiza-se por intermédio de vesículas golgianas que veiculam um certo número de hidrolases activas a pH ácido, funcionando de modo análogo aos lisossomas das células animais.

O retículo endoplasmático rugoso, característico das células do tapete da espécie em estudo, apresentava uma certa actividade da fosfatase ácida, observando-se também marcação das membranas de retículo que limitavam as vesículas pleomórficas. A marcação do retículo endoplasmático, ainda que não seja característica geral das células vegetais, foi referida por vários autores, em tecidos condutores (Catesson & Czaninski, 1967; Arsanto, 1972; Esau & Charvat, 1975; Sauter, 1977), em colócitos em crescimento (Roland, 1969), em vários tipos de células vegetais (Dauwalder et al., 1969), em células meristemáticas de raiz (Poux, 1970), nos esporos de *Matteucia struthiopteris* (L.) Todd (Olsen & Gullvåg, 1971), nos tecidos nutritivos de zoocecídeas (Bronner, 1973, 1974), em células glandulares (Dexheimer, 1978 a), em células de aleurona (Pyliotis et al.,1979), em meiócitos femininos de *Capsella* Medicus (Schulz & Jensen, 1981), em células estomáticas (Couot-Gastelier & Louget, 1985) e na epiderme dos óvulos de *Gossypium hirsutum* L. (Joshi et al., 1985). De salientar, que nos meiócitos de *Lilium* L.,a fosfatase ácida foi também encontrada nas membranas de retículo endoplasmático, dispostas em camadas concêntricas (Bird et al., 1983). Na realidade, as características morfológicas do compartimento lítico das células, sugerem que o retículo endoplasmático rugoso é o principal local de síntese das enzimas digestivas (Matile, 1975).

Trabalhos ultraestruturais e bioquímicos assinalam a actividade da fosfatase ácida na parede celular (De Jong et al., 1967; Poux, 1970; Hall & Sexton, 1974; Bronner, 1973; 1974; Esau & Charvat, 1975; Toth & Kuijt, 1977; Dexheimer, 1978 a; Giordani, 1981; Joshi et al., 1985) e no nucléolo das células vegetais (Sanchez-Pina et al., 1980). Nas células do tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch.,no entanto, estes organelos não apresentavam marcação.

Às fosfatases ácidas têm sido atribuídas numerosas funções, incluindo mobilização de produtos de reserva (Ashford & Jacobsen, 1974; Colson, 1979), transporte de metabolitos, nomeadamente, de hidratos de carbono (Catesson & Czaninski, 1967, Gahan & McLean, 1969; Dexheimer, 1978 a), autólise do citoplasma e das paredes celulares (Poux, 1963 a; Coulomb & Coulon, 1971; Hall & Sexton, 1974; Matile, 1975; Giordani, 1981) e diferenciação celular (Fosket & Miksche, 1966; Onofeghara, 1972; Catesson, 1973; Shaykh & Roberts, 1974; Bentwood & Cronshaw, 1976; Dosier & Riopel, 1977; Jacqmard, 1978; Joshi et al., 1985).

A actividade de fosfatase ácida demonstrada nas células do tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch. poderá estar relacionada com a principal função destas células, que é o transporte de substâncias para o pólen em crescimento. Também não é de excluir a hipótese, principalmente no caso dos organelos sequestrados nas vesículas pleomórficas resultantes da actividade do retículo endoplasmático, que a enzima participe no fenómeno de autólise celular que ocorre nas células do tapete, durante a fase final da microsporogénese.

4.1.2. Adenosina trifosfatase (ATPase)

Os métodos citoquímicos para a detecção das actividades ATPásicas, que usam os iões chumbo para precipitar o fosfato inorgânico libertado através da hidrólise enzimática, embora postos em causa por alguns autores (Moses & Rosenthal, 1968; Tice, 1969: Van Steveninck, 1979) foram considerados válidos por outros (Novikoff, 1967; Essner, 1973; Hall et al., 1980).

Na generalidade das células das plantas, a actividade da ATPase foi associada a

membranas, essencialmente ao plasmalema e ao tonoplasto, e relacionada com fenómenos de transporte (Hodges, 1976)

Nas células do tapete das anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch. foram o tonoplasto e o plasmalema que mostraram actividade da ATPase. A marcação destas membranas celulares foi também referida noutras células vegetais, nomeadamente, em meristemas radiculares (Poux, 1967; Shifrin & Levine, 1968; Hall, 1969; Malone et al., 1977), em elementos condutores (Gilder & Cronshaw, 1973, a, b, 1974; Cronshaw & Bentwood, 1977; Sauter, 1977; Winter-Sluiter et al., 1977; Browning et al., 1980; Didehvar & Baker, 1986; Oparka, 1986), nas células das raizes e folhas de *Suaeda maritima* Dum. (Hall & Davie, 1975), nas células glandulares de *Drosera capensis* L. (Dexheimer, 1978 b), nos óvulos de *Saintpaulia ionantha* Wendl (Mogensen, 1981), em células de *Chara corallina* Klein ex Willd. (Price & Whitecross, 1983), nos cotilédones de *Pisum* L. (Nougarède et al., 1983) e nas células epiteliais do escutelo de *Hordeum vulgare* L. (Chaffey & Harris, 1985). A localização da ATPase no plasmalema e no tonoplasto das células vegetais foi também confirmada bioquimicamente (Balke & Hodges, 1975, 1979; Leonard & Hotchkiss, 1976; Hendrix & Kennedy, 1977; Lurie & Hendrix, 1979; Travis & Booz, 1979; Du Pont et al., 1981; Perlin & Spanswick, 1981;Niemitz & Willenbrink, 1985; Kasamo, 1986).

Nas células mães do pólen a marcação da ATPase revelou-se, não só em associação com o tonoplasto e no interior dos vacúolos, mas também nas cisternas de retículo endoplasmático, dispostas na periferia da célula. Na literatura de especialidade existem também algumas referências sobre a actividade da ATPase associada ao retículo endoplasmático, nomeadamente, em elementos condutores de floema (Catesson, 1973; Gilder & Cronshaw, 1973, a,b; Browning et al., 1980) e de xilema (Cronshaw & Bentwood, 1977; Winter-Sluiter et al., 1977), em células da raiz de *Zea mays* L. (Malone et al., 1977), nos óvulos de *Saintpaulia ionantha* Wendl (Mogensen, 1981) e nas células de transferência do xilema dos cotilédones de *Pisum* L. (Nougarède et al., 1983).

Nas anteras da Cucurbitaceæ em estudo, a associação preferencial da actividade

da ATPase ao plasmalema e ao tonoplasto, quer nas células do tapete quer nas células polínicas em desenvolvimento, parece garantir o metabolismo de transporte que durante a microsporogénese se opera entre o esporófito e o gametófito. Além dos nutrientes que passam através do tapete para o pólen em desenvolvimento, também as células haplóides, tal como sugerido por Rowley e colaboradores (1973) recebem os iões presentes no lóculo da antera, que acumulam nos vacúolos, possivelmente, por um processo de transporte activo. A presença da ATPase nas cisternas de retículo endoplasmático poderá traduzir a sua intervenção em fenómenos de transporte intracelular que têm lugar nas células polínicas, essencialmente, durante a formação da parede do grão de pólen. A actividade desta enzima hidrolítica nas células do tapete e nas células mães do pólen, durante a meiose, nas anteras de *Datura* L. (Hedge & Andrade, 1982/1983) e o seu declínio após esta fase, foi relacionada com este processo de divisão nuclear A partir da fase de micrósporo, a elevada actividade de ATPase foi correlacionada com a grande actividade metabólica necessária à diferenciação e viabilidade do polen

No pólen de *Brassica* L. (Gaude & Dumas, 1984) foi demonstrada, pela primeira vez, a actividade da ATPase numa camada de estrutura trilamelar e com algumas caracteristicas morfológicas, enzimológicas e fisico-químicas duma membrana biológica. Tal estrutura membranar, a rodear externamente a exina da esporoderme, foi designada por camada exínica externa, tendo sido implicada em processos de adesão e reconhecimento, durante a fecundação.

4.1.3. Glucose-6-fosfatase

Nas células animais, onde foi citoquimicamente demonstrada, a glucose-6-fosfatase foi considerada como enzima marcadora específica do retículo endoplasmático (Leskes et al., 1971; Farquhar et al., 1974; Drochmans et al., 1975).

Nas celulas das plantas, esta enzima tem sido pouco estudada. A nível ultraestrutural conhece-se apenas a sua localização nos colócitos em crescimento de *Ballota nigra* (Roland, 1969), nas células radiculares de *Beta vulgaris* L. (Hall, 1977),

nas glândulas digestivas de *Drosera capensis* L. (Dexheimer, 1979) e nas células da raiz de *Zea mays* L. (Moore &McClelen, 1985). Roland (1969) observou a formação dos depósitos densos, resultantes da actividade da enzima, no plasmalema e no retículo endoplasmático. Na raiz de *Beta* L. (Hall, 1977), a glucose-6-fosfatase manifestou-se no plasmalema e no tonoplasto. Nas glândulas de *Drosera capensis* L. (Dexheimer, 1979) e nas raiz de *Zea mays* (Moore & McClelen, 1985), cujas células apresentavam uma fase de secreção, a actividade da enzima apareceu associada ao plasmalema e à parede celular. A presença constante da glucose-6-fosfatase no plasmalema das células vegetais estudadas, levou Dexheimer (1979) a sugerir que, ao contrário das células animais onde não foi detectada, grande parte da actividade desta enzima, nas células das plantas, estaria concentrada na membrana citoplasmática. A presença da glucose-6-fosfatase no plasmalema das células secretoras citadas, levou os respectivos autores (Dexheimer, 1979; Moore & McClelen, 1985) a relacionar a sua actividade com o transporte dos produtos de secreção. Esta hipótese poderá ser, razoavelmente, aplicada às células do tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch. pois estas células estão envolvidas em processos de secreção de vários metabolitos e seu transporte para as células adjacentes.

A justificação para a marcação generalizada observada após incubação no meio ao qual se adicionou DMSO não é óbvia. Torna-se mesmo mais difícil, pelo facto do plasmalema, significativamente marcado no meio sem DMSO, praticamente não apresentar produtos de reacção. Os resultados obtidos paracem conduzir-nos à hipótese de que este agente crioprotector teria provocado a difusão dos produtos da reacção e que a sua localização possa representar, assim, um artefacto.

4.2. LIASES

4.2.1. Ciclase adenílica.

A actividade da ciclase adenílica, tem sido extensivamente estudada nas células animais (Robison et al., 1968; Jost & Rickenberg, 1971; Abel & Monahan, 1973) devido ao importante papel regulador do AMP-cíclico, em vários processos

metabólicos, tendo sido mesmo designado por "mensageiro secundário" (Robinson et al., 1968).

A ocorrência do AMP-cíclico e da ciclase adenílica nas células das plantas foi posta em causa por alguns autores (Alvarez et al., 1974; Niles & Mount, 1974; Amrhein, 1977). No entanto, vários investigadores conseguiram demonstrar, com êxito, nas plantas, a presença de AMP-cíclico e da enzima envolvida na sua biossíntese (Becker & Ziegler, 1973; Brown & Newton, 1973, 1981; Raymond et al., 1973; Wellburn et al., 1973; Drlica et al., 1974; Giannattasio et al., 1974; Kessler & Levinstein, 1974; Miller & Galsky, 1974; Bressan et al., 1976, 1980; Handa & Johri, 1976, 1977; Smith et al., 1977; Ashton & Polya, 1978; Brown et al., 1979: Newton et al., 1980). Nas células das plantas, foram também referidos alguns efeitos fisiológicos dos nucleotídeos cíclicos. Nas sementes de cevada, Galsky & Lippincott (1969) verificaram que, tal como o ácido giberélico, o AMP cíclico promove a síntese da α-amilase. Este nucleotídeo cíclico manifestou também, analogamente ao ácido giberélico, efeitos estimuladores na síntese de algumas enzimas, nomeadamente da ATPase (Earle & Galsky, 1971) da protease e da fosfatase ácida (Nickells et al., 1971) e da nitrato redutase (Higgins et al., 1974). Alguns estudos relacionaram também a actividade do AMP-cíclico com a das auxinas. Nas sementes de *Cicer arietinum* L. (Azhar & Murti, 1971), o tratamento com o ácido indolacético estimulava a síntese do AMP-cíclico. Cromatina isolada a partir de coleóptilos de *Avena* L., com AMP-cíclico no meio de isolamento, apresentava um aumento da síntese do RNA, comparável à obtida com o ácido indolacético (Salomon & Mascarenhas, 1972), tendo os autores sugerido que, nos sistemas vegetais, o AMP-cíclico intervem nos efeitos provocados pelas auxinas.

Trabalhos realizados com um musgo *Bryum argenteum* L. (Bhatla & Chopra, 1979; Chopra & Bhatla, 1981) mostraram que o AMP-cíclico desempenha um papel importante na indução de "clones" masculinos e femininos e, em *Chlamydomonas reinhardtii* Dang., verificou-se que um aumento do nível deste nucleotídeo cíclico inibe o movimento dos flagelos e a sua regeneração nas estirpes selvagens, sem

contudo inibir a multiplicação das células (Rubin & Filner, 1973).

Nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch., os produtos resultantes da actividade da enzima responsável pela síntese do AMP-cíclico, a ciclase adenílica, não apresentaram localização constante nos diferentes tecidos. Assim, enquanto que nas células do tapete a actividade da enzima apareceu preferencialmente associada aos dictiossomas, nas células mães do grão de pólen e nas células da parede da antera a actividade foi mais generalizada, surgindo também, além do aparelho de Golgi, em associação com outras membranas celulares, nomeadamente, as do invólucro nuclear, do retículo endoplasmático, de vesículas citoplasmáticas e dos tilacóides dos cloroplastos.

Nas células das plantas, são raros os estudos sobre a localização citoquímica, a nível ultraestrutural, da ciclase adenílica, sendo assim mal conhecidos os locais de acção da enzima. Nas células dos meristemas radiculares de *Zea mays* L. e *Pisum sativum* L., a actividade da enzima surgiu associada às membranas do invólucro nuclear, do retículo endoplasmático e do plasmalema da primeira espécie mas só se localizou no plasmalema das células da ervilheira (Al-Azzawi & Hall, 1976). Mas nos meristemas do hipocótilo de *Pisum sativum* L. a enzima funcionou ao nível dos vacúolos citoplasmáticos e, na coifa do mesmo material, no retículo endoplasmático liso (Hilton & Nesius, 1978). Em células jovens de *Trifolium repens* L. os produtos resultantes da reacção enzimática marcaram o invólucro nuclear, o plasmalema e o sistema membranoso dos cloroplastos (Tu, 1979). A actividade da ciclase adenílica tinha já sido citoquimicamente localizada na membrana externa do invólucro cloroplastidial de *Euglena gracilis* Klebs. (Schwelitz, 1974) e bioquimicamente demonstrada nos estioplastos de *Avena* L. (Wellburn et al., 1973) e nos cloroplastos de *Phaseolus vulgaris* L. (Brown et al., 1979). Nos ápices germinativos de *Bryum argenteum* L. os produtos da reacção enzimática localizaram-se no plasmalema, no tonoplasto e no sistema membranoso dos plastídios (Bhatla & Chopra, 1984). Nas células de transferência do xilema e do floema dos cotilédones de *Pisum sativum* L. apenas o plasmalema apresentou marcação enzimática (Nougarède et al., 1985). Dos

trabalhos referidos, ressalta uma variação dos locais de acção enzimática, não só em células de espécies diferentes, como até em diferentes tecidos da mesma espécie. Não é, portanto, de estranhar a diversidade de resultados obtidos nos diferentes tecidos das anteras do material em estudo. Contrariamente à quase generalidade dos trabalhos citados, nos vários tecidos testados, o plasmalema nunca apresentou actividade enzimática, a qual apareceu sempre associada aos dictiossomas, organelo que nos tecidos das outras espécies nunca apresentou marcação. No entanto, em algumas células animais (Mckeel & Jarett, 1974; Cheng & Farquhar, 1976; Fujimoto et al., 1981; Vorbrodt et al., 1984) a actividade da ciclase adenílica manifestou-se ao nível do aparelho de Golgi.

Os resultados obtidos após incubação de fragmentos de anteras no meio específico para a detecção citoquímica da actividade da ciclase adenílica, sugerem que esta enzima está activa nestas células, mais intensamente nas que, após crescimento e diferenciação, vão originar os grãos de pólen. A acção do AMP-cíclico foi considerada de grande significado fisiológico como regulador do crescimento das células animais (Abel & Monahan, 1973) e na diferenciação de elementos reprodutores nas células vegetais (Bhatla & Chopra, 1979, 1984; Chopra & Bhatla, 1981).

4.3 OXIREDUTASES

4.3.1 Citocromo c oxidase

A actividade da citocromo c oxidase foi bioquimicamente determinada no pólen das espécies estudadas, tendo sido relacionada com as actividades metabólicas envolvidas na germinação do tubo polínico (Brewbaker, 1971; Stanley & Linskens, 1974).

As mitocôndrias das células do tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch., quando incubadas no meio contendo DAB, apresentaram um comportamento semelhante ao descrito nas células de coleóptilos de *Oryza sativa* L. (Opik, 1975 a). Assim, todas as mitocôndrias da mesma célula apresentavam o mesmo grau de actividade, mas em

células diferentes o grau de marcação podia variar. Esta situação verificou-se entre as mitocôndrias das células do tapete e as das células mães do pólen. Sabe-se também que na microsporogénese, as enzimas mitocôndriais (citocromo oxidase e desidrogenase succínica) permanecem activas durante a meiose (Sauter, 1971).

A reacção positiva das cristas mitocondriais à actividade da citocromo c oxidase foi também referida em mitocôndrias das folhas do espinafre (Nir & Seligman, 1970), dos laticíferos de *Euphorbia characias* L. (Marty, 1970 a), de folhas de *Coleus blumei* Benth. (Marty, 1977) e de folhas estioladas de *Phaseolus vulgaris* L. (Wrischer, 1978 b), quando os tecidos eram incubados, na obscuridade, em meio contendo DAB. Este substrato foi também utilizado para a marcação das membranas das mitocôndrias de células animais (Novikoff & Goldfischer, 1969).

Os resultados obtidos nas anteras desta Cucurbitaceæ permitem concluir que as mitocôndrias das células do tapete apresentavam actividade da citocromo c oxidase, o que torna possível sugerir uma certa relação entre esta actividade enzimática e os elevados níveis energéticos necessários aos diversos processos biossintéticos que ocorrem neste tecido.

5. TAPETE COM SISTEMA ELABORADO DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EM ANTERAS DE OUTRAS ESPÉCIES

Após a observação e estudo detalhado do sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso que caracterizava, em todas as fases ontogénicas, as células do tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch., propusemo-nos verificar se no tapete das anteras de outras espécies e géneros da mesma família, o retículo rugoso apresentava alterações semelhantes. Os resultados obtidos mostraram que nas espécies observadas pertencentes ao género *Cucurbita* (*Cucurbita ficifolia* Bouché, *Cucurbita pepo* L.) durante o desenvolvimento do tapete, o retículo rugoso adquiria a configuração do sistema elaborado descrito. Espécies pertencentes a outros géneros de Cucurbitaceæ (*Citrullus anguria*, Samp. *Cucumis melo* L., *Ecballium elaterium* (L.) A. Richard), exibiam idêntico sistema reticular. Resultados idênticos foram registados para o tapete das anteras de *Cucumis sativus* L. (Santos & Abreu, 1977; Abreu, 1984).

No entanto, esta característica ultraestrutural do tapete não é comum a todos os géneros das Cucurbitaceæ, pois em *Cyclanthera* sp. o retículo endoplasmático rugoso dispunha-se em camadas paralelas de cisternas não dilatadas e, não foi observada a formação do sistema elaborado em qualquer fase do desenvolvimento. Além disso, num género da família das Leguminosæ (*Lupinus*) e numa espécie de Solanaceæ (*Solanum tuberosum* L.) o sistema elaborado do retículo endoplasmático rugoso ocupava grande parte do citoplasma tapetal. Em todas as espécies em que o retículo endoplasmático assumia a forma de sistema elaborado, observaram-se depósitos de esporopolenina nas cisternas dilatadas, tal como foi descrito para o tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch.. Esta associação sugere também uma relação, mais ou menos íntima, do retículo endoplasmático com a síntese da esporopolenina ou dos seus precursores ou, pelo menos, a intervenção deste organelo no transporte dos orbículos.

Os restantes organelos dos diferentes tapetes observados apresentavam características ultraestruturais normais. De salientar, porém, os plastídios do tapete

de *Cucumis melo* L.. De um modo geral, os plastídios das células do tapete são de tipo proplastídio, possuindo por vezes amido, como se observou em *Ecballium elaterium* (L.) A. Richard e um sistema lamelar pouco desenvolvido. Pelo contrário, os plastídios de *Cucumis melo* L. continham uma inclusão constituída por túbulos, tipo corpo prolamelar, mas que não se convertiam em tilacóides. Este tipo de plastídio tinha já sido observado no tapete de *Cucumis sativus* L. (Santos & Abreu, 1977; Abreu, 1984), e nos plastídios do tapete de *Tradescantia bracteata* Small (Mepham & Lane, 1969 b) foram observados corpos prolamelares, em vários estádios de organização. Plastídios com um sistema tubular complexo semelhante ao observado em *Cucumis melo* L. tinham sido anteriormente referidos em outros tipos de células. Nas células do suspensor do embrião de *Ipomoea purpurea* Lamk. (Ponzi & Pizzolongo, 1972, 1973) o complexo tubular foi relacionado com a acumulação de proteínas específicas, a serem utilizadas durante o crescimento do embrião. Nas células glandulares de *Cannabis sativa* L. (Hammond & Mahlberg, 1978) a estrutura paracristalina, semelhante ao corpo prolamelar, foi relacionada com a actividade secretora das células. Nas sementes de duas Cucurbitaceæ (*Cucurbita pepo* L. e *Cyclanthera explodens* Naud.) foram também observados plastídios com um complexo de túbulos tipo corpo prolamelar. Durante a maturação das sementes, este sistema tubular desorganizava-se e concomitantemente ocorria a formação de plastoglóbulos onde se localizavam, provavelmente, os pigmentos protoclorofílicos (Sundqvist & Ryberg, 1979; Ryberg et al., 1980). O complexo tubular que observamos nos plastídios do tapete de *Cucumis melo* L. poderá, possivelmente, estar relacionado com a actividade metabólica destas células.

6. INCORPORAÇÃO DE ^{3}H ACETATO NAS ANTERAS DE *CUCURBITA POLYMORPHA* DUCH. RESULTADOS PRELIMINARES

O acetato de sódio, radioactivamente marcado, tem sido grandemente utilizado para o estudo do metabolismo de lípidos, incluindo os que são sintetizados durante a formação e germinação dos grãos de pólen.

Durante a germinação do pólen de *Tradescantia paludosa* E. Anders & R.E.Woodson (Whipple & Mascarenhas, 1978) o (1-^{14}C) acetato foi incorporado em lípidos neutros e polares, tendo os autores concluído que as enzimas para a biossíntese destes compostos não eram sintetizados "de novo", estando já presentes no pólen, antes da germinação. A incorporação deste mesmo isótopo nos lípidos polares e apolares foi também reconhecida durante o crescimento do tubo polínico de *Crotalaria juncea* (Malik & Chawla, 1983). Este precursor lipídico foi também incorporado na esporopolenina dos esporos de *Mucor mucedo* e *Neurospora crassa* e também nos grãos de pólen de *Cucurbita pepo* l(Shaw, 1971; Brooks & Shaw, 1977, 1978).

Durante o desenvolvimento dos microsporócitos e do tapete de *Rhoeo discolor* Hance foi realizado um estudo autorradiográfico a nível de microscopia óptica, utilizando vários precursores de lípidos e de polissacarídeos (Albertini et al., 1981 a,b). Os resultados referentes à incorporação de acetato marcado mostraram que este composto é incorporado no citoplasma dos meiócitos, aumentando a taxa de incorporação no pólen jovem, ao nível da exina. Nas células do tapete, o acetato foi activamente incorporado durante a meiose das células polínicas e mais fracamente, embora significativamente nas fases seguintes. Os autores relacionam esta elevada incorporação nas células do tapete, com o aumento significativo de membranas principalmente de retículo rugoso, das mitocôndrias e dos proplastídios que têm lugar nestas células, durante a meiose.

O ^{3}H acetato de sódio foi também utilizado para o estudo da evolução dos amiloplastos do microgametófito de *Lilium longiflorum* Thunb. (Miki-Hirosige & Nakamura, 1983) e é, na literatura da especialidade, o único trabalho que apresenta

os resultados de autorradiografia a nível ultraestrutural. Os resultados apresentados apenas registam a incorporação do isótopo radioactivo no amido dos plastidios do grão de pólen e sugerem haver transferência de marcação para inclusões lipídicas, que posteriormente se depositam no citoplasma das células haplóides. Os autores não fazem, contudo, qualquer referência quanto ao local ou locais de incorporação do acetato nos estádios iniciais da microsporogénese nem nas células do tapete.

A marcação do amido foi também observada nos meiócitos de *Cucurbita polymorpha* Duch. embora a marcação também se verificasse no estroma dos plastidios, após a hidrólise deste polissacarídeo.

A incorporação de acetato marcado em açúcares foi claramente demonstrada nos cotilédones de sementes de *Cucurbita pepo* L. antes da germinação (Thomas & Ap. Rees, 1972) e nos embriões de *Lactuca sativa* L. (Raymond et al. 1985). Estes estudos autorradiográficos mostraram que grande parte da radioactividade resultante do acetato marcado apareceu associado principalmente com a estaquiose e a sacarose.

Os resultados obtidos, ainda que preliminares, sobre a incorporação do acetato tritiado nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch., parecem sugerir que, nas células do tapete, tanto os plastídios como o retículo endoplasmático rugoso poderão estar implicados na produção da esporopolenina. A incorporação do composto radioactivo nos plastídios das células polínicas poderá apoiar a hipótese de que as células do gametófito intervenham, pelo menos em parte, neste processo biossintético.

RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho procurou estudar-se a ultraestrutura e evolução das células do tapete das anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch. e, seguir a intervenção destas células do esporófito na formação da parede do grão de pólen. O estudo ultraestrutural foi complementado com o estudo da actividade destas células, traduzida na localização citoquímica de algumas enzimas intervenientes no metabolismo celular. Foram também registadas as alterações ultraestruturais sofridas quando as anteras eram sujeitas a tratamentos com substâncias que poderiam intervir em determinados processos metabólicos. O estudo das inter-relações das células do tapete com a parede do grão de pólen foi ainda aprofundado com a utilização de um isótopo radioactico - acetato de sódio tritiado - que é um precursor lipídico e que poderia, deste modo, dar algumas indicações sobre o objectivo pretendido.

1. Em *Cucurbita polymorpha* Duch., o androceu apresenta uma anatomia particular e é formado por 5 estames concrescentes, cujas anteras apresentam configuração sinuosa, em forma de S. O tapete constitui o tecido mais interno da parede da antera e rodeia as células do gametófito em desenvolvimento.

A ultraestrutura e evolução das células do tapete foi seguida e comparada com as várias fases da ontogenia do pólen e, mais particularmente, com as várias etapes da formação da esporoderme. Assim, registaram-se vários aspectos:

1.1. Durante a fase que coincide com o estádio de células esporogénicas e com a divisão de meiose que origina as quatro células haplóides, o tapete apresenta características ultraestruturais semelhantes às das células meristemáticas. De salientar, a evolução sofrida pelos plastídios. Antes da meiose das células mães, os plastídios acumulam amido e, durante a meiose, já não se observa este hidrato de carbono e no estroma dos organelos deposita-se uma inclusão paracristalina de natureza proteica.

Os dictiossomas iniciam uma fase activa, com proliferação de numerosas

vesículas que se distribuem pelo citoplasma em direcção à periferia da célula, podendo esta actividade estar relacionada com a síntese e transporte da calase, enzima interveniente na dissolução da calose das tétradas.

Durante a meiose, o retículo endoplasmático rugoso, bem desenvolvido, inicia uma série de alterações que se traduzem pela dilatação das cisternas e invaginações da membrana, englobando áreas citoplasmáticas, por vezes, contendo organelos. Este processo origina vesículas pleomórficas que posteriormente se destacam para o interior das cisternas. Esta vesiculação ocorre também a partir da membrana externa do invólucro nuclear. Ainda durante a meiose, inicia-se a deposição de grânulos densos de esporopolenina ou dos seus precursores, que constituem os orbículos ou corpos de Ubisch. Os orbículos surgem preferencialmente associados com o retículo endoplasmático rugoso.

1.2. Quando nas células que vão originar o gametófito se inicia a formação da esporoderme, acentua-se, nas células do tapete, a vesiculação do retículo endoplasmático rugoso que se transforma num sistema altamente elaborado. Registou-se também um aumento em tamanho e número, dos depósitos de esporopolenina que surgem, então, não só no sistema reticular, mas também junto do plasmalema. As paredes das células do tapete iniciam então um processo de degenerescência.

1.3. Durante a fase final da formação da esporoderme, o sistema elaborado de retículo rugoso ocupa uma área considerável do citoplasma. Estas células, embora mantendo a sua posição inicial na periferia do lóculo da antera, já não possuem parede celular.

Os plastídios apresentaram também alterações, desaparecendo a estrutura paracristalina e observando-se, no estroma, vacúolos plastidiais, possivelmente resultantes da dilatação de lamelas estromáticas. Nestes organelos observaram-se também plastoglóbulos que vão evoluindo e, nas fases finais da diferenciação, os plastídios adquirem o aspecto de oleoplastos. Após a degenerescência do tapete, observaram-se, juntamente com os organelos em fase de desorganização, glóbulos

lipídicos, possivelmente derivados dos oleoplastos e que vão alojar-se na parede do pólen, constituindo o "pollenkitt".

A desorganização da parede das células do tapete, mantendo as células a sua posição na periferia do lóculo antera, e a síntese de esporopolenina, são características que, segundo critérios consagrados (Echlin, 1971 a,b), permitem classificar o tapete das anteras. Deste modo, o tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch. será classificado como secretor ou parietal.

2. Durante o desenvolvimento da geração esporofítica, foram estudados mais pormenorizadamente, as várias fases da formação da parede do grão de pólen.

2.1. A fase preliminar da formação da esporoderme foi caracterizada pela deposição de uma parede de calose, entre o plasmalema e a parede celulósica que rodeava as células esporogénicas. A deposição da calose marcou o início da divisão meiótica das células esporogénicas, de que resultou a formação das células haplóides.

Durante a profase da meiose, os plasmodésmios que inicialmente atravessam as paredes celulares, transformam-se em canais de dimensões consideráveis, designados por canais citomícticos. Estes canais foram progressivamente obliterados por calose, de modo que, no início da segunda fase da meiose, as células mães do grão de pólen ficaram completamente rodeadas por calose, totalmente independentes umas das outras.

Durante a profase meiótica, verificou-se também um processo de desdiferenciação e rediferenciação das mitocôndrias e dos plastídios. Nas mitocôndrias, a desdiferenciação traduziu-se pela diminuição e, em alguns casos, desaparecimento das cristas o que levou ao aparecimento de organelos com matriz pouco densa, cujo sistema membranoso era praticamente constituído pelo invólucro mitocondrial. A partir da segunda fase da meiose, assistiu-se à rediferenciação destes organelos que passaram a apresentar as características usuais.

Nos plastídios, a desdiferenciação traduziu-se pelo desaparecimento do amido, a

partir da fase de zigóteno, e pela diminuição do sistema das membranas estromáticas. Este processo acentuou-se mais durante a fase de paquíteno e de modo semelhante ao das mitocôndrias, a partir da segunda fase meiótica, registou-se a rediferenciação dos organelos, com a deposição de novos grãos de amido e a reorganização do sistema lamelar.

De salientar, também, as alterações que atingiram os ribossomas citoplasmáticos. A partir do zigóteno-paquíteno observou-se uma redução drástica do número de ribossomas. A partir da segunda fase meiótica, a população ribossómica foi restabelecida, possivelmente, através da formação de inclusões de estrutura semelhante ao nucléolo (nucleolóides), que inicialmente se encontravam associadas a este componente nuclear e posteriormente se distribuíam pelo citoplasma.

No citoplasma dos meiócitos foram também observados elementos de "annulate lamellæ" e a actividade do aparelho de Golgi registou-se, principalmente, no final da meiose, com a produção de vesículas que organizavam o fragmoplasto que dividia o citoplasma dos meiócitos, de modo a originar as quatro células haplóides.

2.2. A formação da parede do grão de pólen iniciou-se quando os quatro micrósporos haplóides ainda estavam reunidos em tétrada, pela parede de calose. Este processo teve origem numa camada de natureza celulósica (primexina), depositada entre o plasmalema e a calose. Na primexina, de aspecto fibrilar e com reacção positiva ao teste de Thiéry, organizaram-se os primeiros elementos da esporoderme, as báculas, constituídos por esporopolenina, depositando-se depois uma nova camada esporopoleninica unindo a base das báculas (nexina 1). Esta camada basal encontrava-se interrompida nas regiões das aberturas ou poros da parede.

Nesta fase, as mitocôndrias e os plastídios continuavam o seu processo de rediferenciação, assistindo-se à completa repopulação dos ribossomas.

2.3. É após a libertação dos micrósporos haplóides e antes da formação do grão de pólen binucleado, que se completa a formação da esporoderme. Entre a nexina 1 e o plasmalema deposita-se uma outra camada granular, esporopoleninica (nexina 2) e entre esta e o plasmalema, a intina essencialmente de natureza pecto-celulósica.

Antes da formação da intina, observaram-se na nexina 2, junto do plasmalema e no citoplasma periférico, depósitos com forma e densidade electrónica semelhante aos orbículos do tapete.

Assim, a parede do pólen de *Cucurbita polymorpha* Duch. compreende a intina, situada internamente e, externamente, a exina. A exina (de natureza esporopoleninica) compreende a sexina (constituída por espinhos com dois tamanhos distintos e que resultaram da evolução das báculas) e a nexina que compreende a nexina 1 (camada homogénea, só interrompida na região dos poros) e a nexina 2 (camada de aspecto granular, contínua, que preenche os poros).

Na parede do grão de pólen desta espécie, distribuem-se 7-9 poros operculados, que possuem espinhos idênticos aos das regiões inter-porais. A deposição da esporopolenina na nexina 1 ocorreu em associação com estruturas membranosas, semelhantes a membranas designadas por lamelas, "white lines" ou "tapes" e inicialmente descritas por Rowley & Southworth (1967) e por Dickinson & Heslop-Harrison (1968).

Durante a fase final da formação da esporoderme, foi também acompanhada a evolução dos organelos citoplasmáticos, merecendo especial atenção os plastídios que acumulavam amido e evoluíam para amiloplastos e o retículo endoplasmático rugoso, cujas cisternas dilatadas, acumulavam material granular,possivelmente de natureza proteica.

3. Estudou-se, também, a acção de vários agentes químicos que interferem com alguns processos metabólicos e que poderiam alterar a ontogenia das células do tapete e do gametófito, intervindo, de algum modo, na relação entre as duas gerações celulares.

O ácido giberélico não provocou, nas células do tapete, alterações que se traduzissem por modificações da ultraestrutura.Nas células mães do grão de pólen verificou-se uma proliferação de vesículas no citoplasma, e o amido dos plastídios pareceu, de algum modo, afectado pela acção desta fito-hormona. O retículo

endoplasmático rugoso adquiriu configurações tipo "nebenkern".

O ácido mevalónico foi ensaiado pelo facto de se tratar dum precursor de carotenóides, que poderia interferir na síntese da esporopolenina. Os efeitos deste tratamento traduziram-se pelo aparecimento de depósitos de densidade electrónica semelhante à dos orbículos, que se depositaram na periferia dos meiócitos. De salientar que, no desenvolvimento normal, os primeiros depósitos de esporopolenina surgiam apenas na fase de tétrada. Alguns depósitos densos surgiram também em associação com o retículo endoplasmático rugoso, que passou a apresentar aspectos semelhantes ao sistema elaborado, característico das células do tapete da espécie em estudo. Nas células do tapete surgiram também depósitos lipídicos que não foram observados nas células sem tratamento.

O tratamento pela colquicina, alcalóide que promove a despolimerização dos microtúbulos mas que provoca também numerosos efeitos secundários, induziu, nas células do tapete, a hipertrofia do retículo rugoso e a desorganização dos dictiossomas. Nas células mães do pólen, os efeitos traduziram-se pela dilatação localizada do invólucro nuclear, por configurações tipo "nebenkern" do retículo endoplasmático rugoso e pela deposição de microfilamentos. Em fase mais diferenciada, após a libertação de micrósporos uninucleados, surgiram no citoplasma agregados de túbulos com dimensões superiores às dos microtúbulos.

A glucose e a sacarose foram fornecidas às anteras em desenvolvimento de modo a funcionarem como fonte exógena de hidratos de carbono. Nos meiócitos observou-se um aumento da quantidade de amido nos plastídios, mas apenas após tratamento com a glucose e nas fases que normalmente o acumulavam. Após tratamento com a glucose, os plastídios das células da parede da antera e que usualmente não possuem amido, passaram a acumular este hidrato de carbono. A sacarose, em qualquer das células dos tecidos da antera, não provocou a síntese deste polissacarídeo de reserva. Nas células do tapete, a glucose e a sacarose não induziram alterações que tivessem tradução morfológica.

4. A actividade metabólica dos tecidos do gametófito e do esporófito foi também avaliada pela localização citoquímica de algumas enzimas, a nível ultraestrutural.

A actividade da fosfatase ácida manifestou-se no plasmalema, no invólucro das mitocôndrias e dos plastídios e nos dictiossomas das células do tapete. Ligeira actividade foi encontrada no sistema elaborado do retículo endoplasmático rugoso. A actividade desta enzima poderá estar relacionada com o transporte de substâncias para o pólen em crescimento e, a sua presença nos organelos sequestrados nas vesículas pleomórficas que constituem o sistema elaborado do retículo endoplasmático rugoso, poderá traduzir uma intervenção nos processos de lise, que ocorrem nas fases finais da ontogenia do tapete. Nas células mães do grão de pólen não foi detectada actividade significativa desta enzima hidrolítica.

A actividade da adenosina trifosfatase apareceu associada com o tonoplasto e o plasmalema das células do tapete. Nas células haplóides, nas fases iniciais da formação da parede, a actividade da ATPase foi detectada nos vacúolos e em cisternas do retículo rugoso na periferia do citoplasma. Em qualquer das situações, esta enzima poderá estar relacionada com mecanismos de transporte de nutrientes.

A actividade da glucose-6-fosfatase foi significativamente detectada no plasmalema das células do tapete, tendo também marcado, ainda que fracamente, o sistema de lamelas estromáticas dos plastídios. Após adição de dimetilsulfóxido ao meio de incubação,o plasmalema deixou de apresentar marcação, a qual se generalizou a todas as membranas, quer das células do tapete quer dos meiócitos. É provável que este agente crioprotector tenha provocado a difusão dos produtos de reacção.

A actividade da liase ensaiada, a ciclase adenílica, apareceu preferencialmente associada aos dictiossomas das células do tapete e nos meiócitos e nas células da parede da antera, apareceram marcadas várias membranas, nomeadamente,as dos dictiossomas, do invólucro nuclear, do retículo endoplasmático, dos tilacóides dos plastídios e vesículas citoplasmáticas.

Nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch. a actividade respiratória das

mitocôndrias foi, em parte, traduzida pela actividade da citocromo c oxidase. A actividade desta enzima foi verificada nas mitocôndrias do tapete e das células mães do pólen.

5. A observação de um sistema altamente elaborado de retículo endoplasmático rugoso no tapete de *Cucurbita polymorpha* Duch., sugeriu a observação do tapete das anteras de espécies de outros géneros da mesma família, a fim de averiguar se se tratava de uma característica taxonómica. Os resultados encontrados levaram a concluir que não se tratava duma característica do tapete das anteras da família das Cucurbitaceæ, pois pelo menos numa planta do género *Cyclanthera* não se observou o sistema elaborado de retículo rugoso que estava, no entanto,presente no tapete de algumas espécies desta família (*Citrullus anguria* Samp., *Cucumis melo* L., *Ecballium elaterium* (L.) A.Richard) e de outras espécies do género *Cucurbita* (*C. pepo* L. e *C.ficifolia* Bouché). O sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso foi também observado no tapete de plantas pertencentes a outras famílias de Angiospermæ (*Lupinus* sp.- Leguminosæ; *Solanum tuberosum* L.- Solanaceæ).

6. Um precursor lipídico radioactivamente marcado, o acetato de sódio tritiado, foi fornecido a hastes florais de *Cucurbita polymorpha* Duch. a fim de apreciar a intervenção das células do tapete e das células polínicas na formação dos precursores da esporopolenina. As anteras tratadas foram processadas para autorradiografia ultraestrutural e os resultados obtidos, embora preliminares, parecem sugerir que tanto as células do esporófito como as do gametófito intervêm na síntese dos carotenóides. O facto de a marcação aparecer associada aos plastídios e ao sistema elaborado de retículo rugoso das células do tapete, leva a admitir que estes organelos celulares poderão intervir, directa ou indirectamente, neste mecanismo de biossíntese. A mesma hipótese se poderá aplicar às células polínicas, nas quais o acetato foi incorporado no amido dos plastídios nas fases iniciais da meiose e se manteve, embora em menor quantidade, no estroma destes organelos, durante a

meiose.

*

* *

A actividade metabólica das células do tapete e das células polínicas foi testemunhada através de resultados ultraestruturais, citoquímicos e autorradiográficos. No desenvolvimento do tapete e do pólen estão envolvidas três vias metabólicas distintas : hidratos de carbono, lípidos e proteínas.

O metabolismo dos hidratos de carbono diz respeito, essencialmente, à formação e dissolução da camada de calose que envolve os meiócitos, à deposição da intina na parede do grão de pólen e à desintegração da parede das células do tapete e da parede primária das células mães do pólen. Os produtos resultantes da dissolução da calose e da parede celulósica do tapete e dos meiócitos, representam glucídeos simples que serão utilizados pelo pólen em desenvolvimento.

O mecanismo de síntese de lípidos está principalmente relacionado com a produção de esporopolenina. Nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch., as observações ultraestruturais e os resultados autorradiográficos apontam e sugerem que tanto as células do esporófito como as do gametófito participam neste processo de biossíntese.

Embora as células do tapete possam representar o principal local de síntese da esporopolenina, parece possível afirmar que as células do gametófito também possuem esta capacidade biossintética. A observação de depósitos, de forma e densidade electrónica semelhantes à dos orbículos do tapete, em associação com a parede em desenvolvimento e com o citoplasma das células polínicas, a sua indução por acção de um precursor exógeno e a incorporação de um precursor lipídico radioactivo tanto nas células do tapete como nas células polínicas, são factos que apoiam esta hipótese.

Aliás, a participação conjunta das células do esporófito e do gametófito na síntese da esporopolenina foi também evidenciada em anteras de Angiospermæ e

Gymnospermæ (Heslop-Harrison, 1968 d; Heslop-Harrison & Dickinson, 1969; Vasil & Aldrich, 1970; Dickinson & Bell, 1972; Rohr, 1977; Hideux & Abadie, 1980-1981; Cerceau-Larrival et al., 1980-1981). A dupla origem do material esporopoleninico levou mesmo à adopção das designações de esporopolenina T e esporopolenina S para a que é originada, respectivamente, a partir do tapete e do micrósporo (Dickinson, 1976 a). Este autor considera mesmo que as duas formas representam, também, dois polímeros de substâncias diferentes: a esporopolenina do esporo mais flexível, permitindo a expansão após a sua libertação das tétradas e a esporopolenina produzida pelo tapete, mais rígida, depositada nos micrósporos livres.

No metabolismo dos lípidos há ainda a considerar uma segunda fase de produção destes compostos, possivelmente a partir dos oleoplastos do tapete, e que vão contribuir para a constituição do "pollenkitt".

A actividade relacionada com o metabolismo das proteínas é traduzida essencialmente pela acção de enzimas. Em processos de síntese, há a salientar as enzimas intervenientes na formação de novas paredes celulares (celulósicas ou de calose) e nos processos de biossíntese da esporopolenina. Outras enzimas participam em processos de desorganização das paredes do tapete e as calases produzidas por este tecido degradam a parede de calose que envolve os meiócitos.

Estas três vias metabólicas interdependentes são possivelmente controladas por um mecanismo complexo que controla o desenvolvimento da antera, tendo sido indicado, com um papel fundamental neste processo, o meio de natureza bioquímica que preenche o lóculo da antera e põe em contacto o tapete com as células haplóides (Hideux & Abadie, 1980-1981; Pacini & Juniper, 1979 b; Pacini & Franchi, 1983). As inter-relações entre as células das gerações esporofítica e gametofítica poderão também alicerçar-se na origem comum destes dois tipos de células (Hideux & Abadie, 1980-1981). As inter-relações funcionais entre o tapete e o pólen foram também confirmadas durante a formação de haplóides em cultura. Sunderland & Rogers (1977), Wernicke & Kohlenbach (1977), Dunwell (1978) e Raghavan (1978) implicaram, substâncias originadas no tapete, na indução das divisões embriogénicas,

em grãos de pólen isolados ou no pólen de anteras, em cultura.

*

* *

As inter-relações esporófito-gametófito merecem e necessitam ser mais aprofundadas, pois as dúvidas subsistem e alguns aspectos continuam por esclarecer. O assunto poderá ser abordado com o uso de precursores radioactivos específicos dos carotenóides e outros metabolitos.

Um outro aspecto importante a resolver é o do isolamento do tapete, de modo a permitir o estudo de processos biossintéticos, nomeadamente da esporopolenina e dos fenilpropanóides. Aqui podem dar contribuição importante as técnicas de cultura asséptica de tecidos, cultivando células do tapete isoladas por micromanipulação, ou culturas de protoplastos destas células.

Importante é, também, conhecer o metabolismo dos ácidos nucleicos nas células do tapete, pois como foi sugerido por Raghavan (1981) o mRNA poderá codificar a síntese de enzimas responsáveis pela senescência deste tecido ou pela formação dos precursores de ácidos nucleicos e da esporopolenina.

Todos estes aspectos serão encarados futuramente de modo a obter maior informação sobre o papel do tapete durante a formação do microgametófito e mesmo na embriogénese do pólen. Estas áreas oferecem grandes possibilidades para o estudo da ontogenia e fisiologia das duas gerações celulares que constituem as anteras das plantas superiores pois segundo a opinião de Rosen (1968) - "Pollen offers opportunities and challenges because it is unique among higher plant tissues. Yet this very uniquiness also adds to its value in research on fundamental and universal problems".

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Cucurbita polymorpha Duch. anthers are composed by 5 monolobed stamens with a long sinuous S shape. Along microsporogenesis, the ultrastructure and evolution of tapetal cells was studied and compared during the various stages of pollen wall formation.

Tapetum plastids display an evolutionary process, which begins at pre-meiotic stage, when those proplastids accumulate starch. Later on, during meiosis, this carbohydrate disappears and in the stroma was observed a pronase-sensitive, paracrystalline inclusion. When microspores have already initiate the formation of sporoderm, the proteic inclusions of the plastids of the tapetum are replaced by vacuoles, possibly originated by dilation of stroma lamellæ. At the end of this ontogenic process, before the degenerescence that leads to the senescence of this cells, plastids (considered as oleoplasts) accumulate lipids, which constitute the pollenkitt, to be later deposited on the pollen surface.

Rough endoplasmic reticulum (RER) of these tapetal cells exhibits peculiar aspects, appearing as a complex and elaborate system, with dilated cisternæ, containing numerous vesicle-like structures limited by a single membrane, formed through invagination of the RER membrane. This vesiculation process leads to the engulfment of cytoplasm and even organelles and to the appearance of ribosomes lining the inner face of the vesicles bounding membranes. The same process of vesiculation occurrs at the outer membrane of the nuclear envelope. This membrane is often in contact with plasmalemma, through this elaborate system of RER to which is directly connected. The formation of vesicles by RER membranes increases throughout microsporogenesis and in association with this elaborate system, sporopollenin containing bodies (orbicles or Ubisch bodies) were observed. By the end of microsporogenesis they appear mostly located near and outside the plasmalemma.

When pollen mother cells are at meiosis, tapetal dictiosomes show an intense phase of activity, producing vesicles which spread through the cytoplasm to the cell surface. This activity may be related to the synthesis and transport of callase, an

enzyme which degrads the callose wall around the tetrads.

After callose disorganization, tapetal cell wall also disorganizes progressively, producing protoplasts which maintain their original position at the periphery of the anther loculus. This situation and the formation of sporopollenin bodies allow to recognize the tapetum of *Cucurbita polymorpha* Duch. as secretory or parietal.

During the ontogeny of gametophytic cells pollen wall formation was studied. The preliminary phase was characterized by the deposition of callose wall between plasmalemma and cellulosic wall of sporogenous cells. Cytomictic channels are seen at the beginning of meiosis, being progressively obliterated by callose and then pollen mother cells became completely invested by callose. The plastids and the mitochondria show a cycle of di- and rediferentiation. The number of ribosomes decreases significantly in early meiosis and is later replenished, a process probably involving inclusions newly arising in the cytoplasm (nucleoloids).

Pollen wall formation begins when the four microspores are still enclosed by the callose wall. The first formed cellulosic wall is the primexine, laid down between plasmalemma and callosic wall. At the fibrilar primexine, the first elements of sporopollenin (bacula) are established. The bases of bacula are held together by the footlayer or nexine 1.

After the spores release from the tetrad, it was observed a thickening of bacula (with two distinct profiles) and of nexine 1. Soon after, between plasmalemma and nexine 1, another sporopolleninic granular layer - nexine 2 was deposited and finally the pecto-cellulosic intine, thus completing the sporoderm of *Cucurbita polymorpha* pollen. The exine comprises the external sexine and the internally located nexine. The sexine is formed by two types of free spines derived from the evolution of the bacula. The nexine is formed by two layers - nexine 1, at the base of the spines, which is homogenous and absent in the porus regions, and the granular nexine 2, which increases in thickness under apertures. The cellulosic intine appears as a thin layer surrounding the pollen grain. These pollen grains are seen as spheroids, having 7-9 operculated apertures with spines similar to those of the interporal regions.

The deposition of sporopollenin at nexine 1 arises associated with membrane-like structures, probably derived from plasmalemma, and firstly named as lamellæ, white lines or tapes. The tapes were also observed at the porus regions in continuity with nexine 1.

Anthers of this Cucurbitaceæ were subjected to the action of several treatments using chemical agents in order to interfere with the metabolism and relationships between tapetal and gametophytic cells. After gibberellic acid treatment, pollen mother cells already displayed some ultrastructural alterations, translated into a vast cytoplasmic vesiculation, formation of endoplasmic reticulum stacks of the "nebenkern" type, and a spatial association of plastid envelopes and endoplasmic reticulum cisternæ. The treatment by mevalonate (a carotenoid precursor) produced the most significative alterations in pollen mother cells, translated into a deposition of electron dense granules at the plasmalemma and the endoplasmic reticulum, similar to the ones characteristic of tapetal cells. This situation may suggest that mevalonate triggered the premature synthesis and/or deposition of sporopollenin. Colchicine treatment promoted a considerably hipertrophy of rough endoplasmic reticulum, a deposition of Golgi vesicles from the dictyosomes and an absence of cytoplasmic microtubules. Glucose and sucrose did not affect the normal microsporogenesis, but in some cases glucose promoted formation of starch.

The metabolic activity of sporophytic and gametophytic cells were essayed by the cytochemical localization of some enzymes. In the tapetum, acid phosphatase activity was observed in the plasmalemma, in the envelopes of both mitochondria and plastids and in dictyosomes. During the senescence of this tissue, the activity was associated with organelles sequestred in pleomorphic vesicles of the rough endoplasmic reticulum. ATPase was found in the plasmalemma and in the tonoplast of tapetal cells. Pollinic cells showed ATPase activity associated with vacuoles and cisternæ of rough endoplasmic reticulum. Glucose-6-phosphatase activity was mostly associated with the plasmalemma of tapetal cells. Electron dense deposits from adenylate cyclase activity appeared preferentially associated to dictyosomes of

tapetal cells, whereas in the initial stages of pollen grain differentiation, a more general distribution of the reaction products was observed, located in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, dictyosomes and cell membrane. The functional activity of mitochondria was confirmed by the ultrastructural localization of cytochrome c oxidase in these organelles in all cells of the anthers.

Radioactive acetate was supplied to anthers of *C. polymorpha* to study lipid metabolism involved in sporopollenin biosynthesis. The preliminary results obtained showed that ^{3}H acetate was incorporated by plastids and by the elaborate system of endoplasmic reticulum of tapetal cells. In pollen mother cells the radioactive precursor appeared in the plastids. These results suggest that both sporophytic and gametophytic cells are likely to be involved in the synthesis of sporopollenin precursors.

The relationships sporophytic-gametophytic cells need to be researched. This type of study will imply the use of precursors of carotenoids and other metabolites. A most useful approach would come by isolation of tapetal cells to study metabolic pathways of sporopollenin synthesis and to cultivate them "in vitro" as a versatile model system capable to supply a variety of information. These possibilities will be considered to deeper the role of this unique tissue during gametophytic development and pollen embryogenesis.

BIBLIOGRAFIA

ABADIE,M.,CERCEAU-LARRIVAL, M-T. & ROLAND-HEYDACKER, F. 1980-1981 - Quelques aspects de la production des tapis dans les anthères de deux ombellifères: *Turgenia latifolia* (L.) Hoffm. et *Hydrocotyle mexicana* Cham. et Schlecht. **Ann. Sci. Nat. Bot., 2/3**: 149-162.

_____ & HIDEUX, M. 1979 a - L'anthère de *Saxifraga cymbalaria* L. ssp. *huetiana* (Boiss.) Engl. et Irmsch. en microscopie électronique (MEB et MET). 1. Généralités. Ontogenèse des orbicules. **Ann. Sci. Nat. Bot., 1**:199-233.

_____ & _____ 1979 b - L'anthère de *Saxifraga cymbalaria* L. ssp. *huetiana* (Boiss.) Engl. et Irmsch. en microscopie électronique (MEB et MET). 2. Ontogenèse du sporoderme. **Ann. Sci. Nat. Bot., 1**:237-281.

_____ & _____ 1983. Les anthères de *Saxifraga clusii* Gouan et de *Saxifraga sempervivum* C. Koch.. Quelques phases de l'ontogenèse des cellules tapétales et sporales. **Ann. Sci. Nat. Bot., 5**:71-95.

ABELL, C.W. & MONAHAN, T.M. 1973. The role of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in the regulation of mammalian cell division. **J. Cell. Biol., 59**: 549-558.

ABREU,I. 1984 - Estudo ultrastrutural e citoquímico da microsporogénese em *Cucumis sativus* L. Tese de Doutoramento.

_____ & DEXHEIMER, J. 1973 - Étude des variations présentées, pendant la gamétogenèse, par les organites cytoplasmiques de la cellule végétative des grains de pollen de quelques espèces d'angiospermes. **Rev. gén. Bot., 80**:245-278.

_____ & SANTOS, A. 1975 - Cristais proteicos em células do tapete de *Lycopersicum esculemtum* Mill. infectadas com vírus tipo baciliforme. X Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Microscópia Electrónica. (resumo).

_____ , _____ & SALEMA, R. 1981 - Fine structure of protein crystals and bacilliform-type virus in anthers of *Lycopersicum esculentum* Mill. **Bol. Soc. Brot. , Sér. 2, 55**:9-17.

AGUTTER, P.S. & SUCKLING, K.E. 1982 - Effect of colchicine on mammalian liver nuclear envelope and on nucleo-cytoplasmic RNA transport. **Biochim. Biophys. Acta, 698**:223-229.

AHOKAS, H. 1976 - Evidence of a pollen esterase capable of hydrolysing sporopollenin. **Experientia, 32**:175-177.

_____ 1978 - Cytoplasmic male sterility in barley. II. Physiology and anther cytology of msm 1. **Hereditas, 89**:7-21.

_____ 1982 - Cytoplasmic male sterility in barley. VIII. Lipoxygenase activity and anther amino nitrogen in the msm 1-Rfm 1a system. **Plant Physiol., 69**:268-272.

AKIYAMA, T., UCHIMIYA, H. & SUZUKI, H. 1981 a - Gibberellic acid-induced increase in activity of a particular isozyme of acid phosphatase in wheat half-seeds. **Plant & Cell Physiol., 22**:1023-1028.

_____ , _____ & _____ 1981 b - Gibberellic acid-stimulated de novo syntheses of a particular isoenzyme of acid phosphatase in wheat half-seeds. **Plant & Cell Physiol., 22**:1029-1034.

AL-AZZAWI, M. J. & HALL, J. L. 1976 - Cytochemical localization of adenyl cyclase activity in maize root tips. **Plant Sci. Letters, 6**:285-289.

ALBERTINI, L. 1965 - Étude autoradiographique des synthèses d'acide ribonucleique (RNA) au cours de la microsporogenèse chez le *Rhoeo discolor* (Hance). **C. R. Acad. Sci. Paris, 260**:651-653.

_____ 1967 - Étude autoradiographique des synthèses de protéines au cours de la microsporogenèse chez le *Rhoeo discolor* Hance. **C. R. Acad. Sc. Paris, 264**:2773-2776.

_____ 1971 - Les acides nucléiques et les protéines au cours de la microsporogénèse chez le *Rhoeo discolor* Hance.Étude autoradiographique et cytophotométrique. **Rev. Cytol. et Biol. vég., 34**:49-92.

_____ , GRENET-AUBERGER, H. & SOUVRE, A. 1981 a - Étude autoradiographique de l'incorporation de précurseurs des polysaccharides et des lipides dans les microsporocytes et le tapis de *Rhoeo discolor* Hance. **Caryologia, 34**:53-68.

_____, _____ & _____ 1981 b - Polysaccharides and lipids in microsporocytes and tapetum of *Rhoeo discolor* Hance. Cytochemical study. **Acta Soc. Bot. Pol., 50**:21-28.

_____ & SOUVRÉ, A. 1974 - Non-histone protein synthesis during microsporogenesis in the *Rhoeo discolor* Hance. In **"Fertilization in Higher Plants"** pag. 49-56. Ed. H.F.Linskens. North-Holland Publ. Comp. The Netherlands.

_____ & _____ 1978 - Les polysaccharides des microsporocytes et du tapis chez le *Rhoeo discolor* Hance. Étude cytochimique et autoradiographique (glucose ^{3}H). **Bull. Soc. bot. Fr. Actualités botaniques, 125**:45-50.

ALBERTSEN, M.C. & PALMER, R. G. 1979 - A comparative light- and electron-microscopic study of microsporogenesis in male sterile (ms_1) and male fertile soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.). **Amer. J. Bot., 66**:253-265.

ALDRICH, H.C. & VASIL, I.K. 1970 - Ultrastructure of postmeiotic nuclear envelope in microspores of *Podocarpus macrophyllus*. **J. Ult. Res., 32**:307-315.

ALTMAN, A. & GOREN, R. 1974 - Interrelationships of abscisic acid and gibberellic acid in the promotion of callus formation in the abscission zone of citrus bud cultures. **Physiol. Plant., 32**:55-61.

ALVAREZ, R., MOORE, T. C. & VANDEPEUTE, J. 1974 - Formation of adenosine 5'-phosphorofluoridate and the assay of adenyl cyclase in barley seeds. **Plant Physiol., 53**:144-148.

AMES, I. H. 1972 - The fine structure of genetic tumor cells. **Amer. J. Bot., 59**:341-345.

_____ & PIVORUN, J.P. 1974 - A cytochemical investigation of a chloroplast inclusion. **Amer. J. Bot., 61**:794-797.

AMICI, A & FAVALI, M.A. 1972 - Thymidine-^{3}H labelling of mycoplasma-like bodies in roots of rice plants affected by a yellows-type disease. **Protoplasma, 75**:37-43.

AMRHEIN, N. 1977 - The current status of cyclic AMP in higher plants. **Ann. Rev. Plant Physiol., 28**:123-132.

AP REES, T., THOMAS, S.M., FULLER, W.A. & CHAPMAN, B. 1975 - Location of gluconeogenesis from phosphoenolpyruvate in cotyledons of *Cucurbita pepo*. **Biochim. Biophys. Acta, 385**:145-156.

ARGUE, C.L. 1971 - Pollen of the Butomaceæ and Alismataceæ. I. Development of the pollen wall in *Butomus umbellatus* L. **Grana, 11**:131-144.

ARSANTO, P. 1972 - Localisation infrastructurale des activités phosphatasiques acides au cours de la différenciation des tissus conducteurs de l'hypocotyle de l'*Ecballium elaterium* (Cucurbitacée). **C.R. Acad. Sc. Paris, 274**:2041-2044.

ARMSTRONG, J.E. & JONES, R. L.1973 - Osmotic regulation of α-amylase synthesis and polyribosome formation in aleurone cells of barley. **J. Cell Biol., 59**:444-455.

ASHFORD, A.E. & JACOBSEN, J.V. 1974 - Cytochemical localization of phosphatase in barley aleurone cells: the pathway of gibberellic acid-induced enzyme release. **Planta,120**:81-105.

ASHFORD, A.E. & KNOX, R.B. 1980 - Characteristics of pollen diffusates and pollen wall cytochemistry in poplars. **J.Cell Sci., 44**:1-17.

ASHHURST, D.E. & COSTIN, N.M. 1974 - The development of a collagenous connective tissue in the locust, *Locusta migratoria*. **Tissue & Cell, 6**:279-300.

_____&_____ 1976 - The secretion of collagen by insects:uptake of [^{3}H] proline by collagen-synthesizing cells in *Locusta migratoria* and *Galleria mellonella*. **J.Cell Sci.,20**:377-403.

ASHTON, A.R. & POLYA, G.M. 1978 - Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in axenic rye grass endosperm cell cultures. **Plant Physiol., 61**:718-722.

ATKINSON, A.W.Jr., GUNNING, B.E.S. & JOHN, P.C.L. 1972 - Sporopollenin in the cell wall of *Chlorella* and other algae:ultrastructure, chemistry and incorporation of ^{14}C-acetate, studied in synchronous cultures. **Planta, 107**:1-32.

AUDRAN, J-C.,1978 - Cytobiologie de la microsporogénèse, de la palynogenèse et du tapis chez *Ceratozamia mexicana* (Cycadecées). **Annales Univ. A.R.E.R.S., 15**:1-26.

_____ 1980 - Microspores, pollen grains and tapetum ontogeny in *Ceratozamia mexicana* (Cycadaceæ): an ultrastructural study. **Phytomorphology, 29**:350-362.

_____ 1981 - Pollen and tapetum development in *Ceratozamia mexicana* (Cycadaceæ) : sporal origin of the exinic sporopollenin in Cycads. **Rev.Paleobotany and Palynology, 33**:315-346.

_____ & BATCHO, M. 1981 - Cytochemical and infrastructural aspects of pollen and tapetum ontogeny in *Silene dioica* (Caryophillaceæ), **Grana, 20**:65-80.

AVIGAD, G. 1982 - Sucrose and other disaccharides. In "**Encyclopedia of Plant Physiol.**" **New Series. vol. 13 A**, pag. 217-347, Ed. F.A.Loewus & W. Tanner. Springer-Verlag, New York.

AWASTHI, P. 1962 - On the morphology of the pollen grains of two species of *Cucurbita* L. **Pollen et Spores, 4**:263-268.

AZHAR, S. & MURTI, C. R. K. 1971 - Effect of indole-3-acetic acid on the synthesis of cyclic 3'-5' adenosine phosphate by Bengal gram seeds. **Biochem. Biophys. Res. Comm., 43**:58-64.

BACH, T.J. & LICHTENTHALER, H.K. 1982 a - Mevinolin: a highly specific inhibitor of microsomal 3-hydroxyl-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase of radish plants. **Z. Naturforsch., 37 c**:46-50.

_____ & _____ 1982 b - Inhibition by mevinolin of mevalonate formation and plant root elongation. **Naturwissenschaften, 68**:242.

_____ , _____ & RETEY,J. 1980 - Properties of membrane-bound 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (EC. 1.1.1.34.) from radish seedlings and some aspects of its regulation. In "**Biogenesis and Function of Plant Lipids**" pag. 355-361, Ed. P.Mazliak,P.Benveniste, C.Costes & R.Douce. Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

BAJAJ, Y.P.S. & DAVEY, M.R. 1974 - The isolation and ultrastructure of pollen protoplasts. In "**Fertilization in Higher Plants**" pag. 73-80. Ed. H.F. Linskens. North-Holland Publishing Comp.- The Netherlands.

BAKER, H.G. & BAKER, I. 1979 - Starch in Angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. **Amer. J. Bot., 66**:591-600.

_____ & _____ 1982 - Starchy and starchless pollen in the Onograceæ. **Ann. Missouri Bot. Gard., 69**:748-754.

BAL, A.K. & DE, D. N. 1961 - Developmental changes in the submicroscopic morphology of the cytoplasmic components during microsporogenesis in *Tradescantia* . **Dev. Biol., 3**:241-254.

BALKE, N.E. & HODGES, T.K. 1975 - Plasma membrane adenosine triphosphatase of oat roots. Activation and inhibition by Mg^{2+} and ATP. **Plant Physiol.55**:83-86.

_____ & _____ 1979 - Comparison of reductions in adenosine triphosphatase content, plasma membrane-associated adenosine triphosphatase activity, and potassium absorption in oat root by diethylstilbestrol. **Plant Physiol., 63**:53-56.

BANERJEE, U.C. 1967 - Ultrastructure of the tapetal membranes in grasses. **Grana, 7**:365-377.

BARENDSE, G.W. M., RODRIGUES PEREIRA, A.S., BERKERS, P. A., DRIESSEN, F. M. , van EYDEN-EMONS, A. & LINSKENS, H. F. 1970 . Citado por Naylor, A. W. 1984.

BASU, R. K. & DATTA, S. K. 1977 - Effects of X-rays and colchicine on pollen of *Trichosanthes anguina* L. (Cucurbitaceæ). **Grana, 16**:105-109.

BEASLEY, C.A. & TING, I. P. 1973 - The effects of plant growth substances on *in vitro* fiber development from fertilized cotton ovules. **Amer. J. Bot., 60**:130-139.

_____ & _____ 1974 - Effects of plant growth substances on *in vitro* fiber development from unfertilized cotton ovules. **Amer. J. Bot., 61**:188-194.

BEAUDRY-LONERGAN, M., THIERY, G. & BERGERON, M. 1985 - Osmium impregnation of the endoplasmic reticulum correlates with the functional status of prostatic secretory cells. **Biology of the Cell, 54**:181-186.

BECKER, D. & ZIEGLER, H. 1973 - Cyclisches adenosin-3':5'-monophosphat in pflanzlicken Leitbahnen?. **Planta, 110**:85-89.

BEHNKE, H.-D. & ESCHLBECK, G. 1978 - Dilated cisternæ in Capparales - an attempt towards the characterization of a specific endoplasmic reticulum. **Protoplasma, 97**:351-363.

BEHNKE, O. & FORER, A. 1967 - Evidence for four classes of microtubules in individual cells. **J.Cell Sci., 2**:169-192.

BELL, P.R. , FREY-WYSSLING, A. & MÜHLETHALER, K. 1966 - Evidence for the discontinuity of plastids in the sexual reproduction of a plant. **J. Ultr. Res., 15**:108-121.

_____ & MÜHLETHALER, K. 1964 - The degeneration and reappearance of mitochondria in the egg cells of a plant. **J. Cell Biol., 20**:235-248.

BELTZ, C. K. & HORNER, H.T. 1970 - A light and electron microscope study of megaspore wall development in *Selaginella* **Amer. J. Bot., 57**:740.

BENEDICT, C.R. 1973 - The presence of ribulose 1,5-diphosphate carboxylase in the nonphotosynthetic endosperm of germinating castor beans. **Plant Physiol.,51**:755-759.

BENEDICT, S.R. 1909 - A reagent for the detection of reducing sugars. **J Biol. Chem., 5**:485-487.

BENNETT, H.S. 1969 - The cell surface : components and configurations. In "**Handbook of Molecular Cytology**" pag. 1261-1293. Ed. A. Lima de Faria. North-Holland Publishing Comp. Amsterdam, London.

BENNETT, M.D. & SMITH, J.B. 1979 a - Colchicine- induced paracrystals in the tapetum of wheat anthers. **J. Cell Sci., 38**:23-32.

_____ &_____ 1979 b - The effect of colchicine on fibrillar material in wheat meiocytes. **J. Cell Sci., 38**:33-47.

_____ ,_____ , SIMPSON, S. & WELLS, B. 1979 a - Intranuclear fibrillar material in cereal pollen mother cells. **Chromosoma, 71**:289-332.

_____ , TOLEDO, L.A. & STERN, H. 1979 b - The effect of colchicine on meiosis in *Lilium speciosum* cv. "Rosemede". **Chromosoma, 72**:175-189.

BENTWOOD, B.J. & CRONSHAW, J. 1976 - Biochemistry and cytochemical localization of acid phosphatase in the phloem of *Nicotiana tabacum*. **Planta, 130**:97-104.

BERGFELD, R. & SCHOPFER, P. 1984 - Transitory development of rough endoplasmic reticulum aggregates during embryo maturation in seeds of mustard (*Sinapsis alba* L.). **Eur. J. Cell Biol., 34**:27-33.

BEYER, P., WEISS, G. & KLEINIG, H. 1985 - Solubilization and reconstitution of the membrane-bound carotenogenic enzymes from daffodil chromoplasts. **Eur. J. Biochem., 153**:341-346.

BHANDARI, N.N., BHARGAVA, M. & GEIER, T. 1981 - A persisting cellulosic wall of microspore mother cells during microsporogenesis in *Allium tuberosum* Rottl. and *Cyclamen persicum* Mill. **Ann. Bot., 48**:425-431.

BHATLA, S.C. & CHOPRA, R.N. 1979 - Inhibition of sex induction in *Bryum argenteum* due to high concentration of sucrose and its reversal by cyclic 3',5'-adenosine monophasphate. **Z. Pflanzenphysiol., 92**:375-378.

_____ &_____ 1984 - Subcellular localization of adenylate cyclase in the shoot apices of *Bryum argenteum* Hedw. **Ann. Bot., 54**:195-200.

BHOJWANI, S.S. & BHATNAGAR, S.P. 1977. Citado por Abadie, M. & Hideux, M. 1979 a.

BICKEL, H. & SCHULTZ, G. 1976 - Biosynthesis of plastoquinone and ß-carotene in isolated chloroplasts. **Phytochem.,15**:1253-1255.

BIDDLE, J. A. 1979 - Anther and pollen development in garden pea and cultivated lentil. **Can. J. Bot.,57**:1883-1900.

BIEGLMAYER, C., RUIS, H. & GRAF, J. 1974 - Cytochemical localization of catalase activity in glyoxysomes from castor bean endosperm. **Plant Physiol.,53**:276-278.

BINO, R.J. 1985 a - Histological aspects of microsporogenesis in fertile, cytoplasmic male sterile and restored fertile *Petunia hybrida* **Theor. Appl. Genet., 69**:423-428.

_____ 1985 b - Ultrastructural aspects of cytoplasmic male sterility in *Petunia hybrida* **Protoplasma, 127**:230-240.

BIRCHEM, R. & BROWN, C.L. 1979 - Ultrastructure of paraquat-treated slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.). **Amer. J. Bot., 66**:1208-1218.

BIRD, J., PORTER, E.K. & DICKINSON, H.G. 1983 - Events in the cytoplasm during male meiosis in *Lilium*. **J. Cell Sci.,59**:27-42.

BLACKBURN, W.R. & VINIJCHAIKUL, K. 1969 - The pancreas in Kwashiorkor. An electron microscopic study. **Laboratory Investigation,20**:305-318.

BLACKMORE, S. & BARNES, S. H. 1985 - *Cosmos* pollen ontogeny: a scanning electron microscope study. **Protoplasma,126**:91-99.

BOASSON, R., LAETSCH, W.M. & PRICE, I. 1972 - The etioplast- chloroplast transformation in tobacco: correlation of ultrastructure, replication and chlorophyll synthesis. **Amer. J. Bot.,59**:217-223.

BOEHM, K. 1931. Citado por Stone, D. E. et al., 1981.

BONNETT, H. T. Jr. & NEWCOMB, E. H. 1965 - Polyribosomes and cisternal accumulations in root cells of radish. **J. Cell Biol., 27**:423-432.

BORISY, G.G. & TAYLOR, E.W. 1967 a - The mechanism of action of colchicine. Binding of colchicine-^{3}H to cellular protein. **J. Cell Biol., 34**:525-533.

_____ & _____ 1967 b - The mechanism of action of colchicine. Colchicine binding to sea urchin eggs and the mitotic apparatus. **J. Cell Biol., 34**:535-548.

BOSABALIDIS, A. & TSEKOS, I. 1982 - Ultrastructural studies on the secretory cavities of *Citrus deliciosa* Ten. II. Development of the essential oil-accumulating central space of the gland and process of active secretion.**Protoplasma, 112**:63-70.

BOUVIER-DURAND, M., DEREUDDRE, J. & COME, D. 1981 - Ultrastructural changes in the endoplasmic reticulum during dormancy release of apple embryos (*Pyrus malus* L.). **Planta,151**:6-14.

BOYENVAL, J. & FISCHER, J. 1976 - Dipping technique. **J. Microscopie Biol. Cell., 27**:115-120.

BOYLE, S.A., HEMMINGSEN, S.M. & DENNIS, D.T. 1986 - Uptake and processing of the small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase by leucoplasts from the endosperm of developing castor oil seeds. **Plant Physiol.,81**:817-822.

BRESSAN, R. A., HANDA, A. K., QUADER, H. & FILNER, P. 1980 - Synthesis and release of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate by *Ochromonas malhamensis* . **Plant Physiol.,65**:165-170.

_____ , ROSS, C.W. & VANDEPEUTE, J. 1976 - Attempts to detect cyclic 3':5'-monophosphate in higher plants by three assay methods. **Plant Physiol.,57**:29-37.

BREWBAKER, J.L. 1971 - Pollen enzymes and isoenzymes. In "**Pollen: Development and Physiology** pag.156-170, Ed. J. Heslop-Harrison. Butterworth - London.

BRONNER, R. 1973 - Localisations ultrastructurales de l'activité phosphotasique acide (= phosphomonoestérase acide) dans les cellules nourricières de la galle du *Biorhiza pallida* OL. sur le *Quercus pedunculata*. **C. R. Acad.Sc.Paris, 276**:2677-2680.

_____ 1974 - Localisations histochimiques et cytochimiques de l'activité phosphatasique acide dans la galle du cynipide *Andricus curvator* Hartig sur le *Quercus pedunculata* Ehrh. **Marcellia,38**:3-10.

BROOKER, J.D. & RUSSEL, D.W. 1975 a - Properties of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Pisum sativum* seedlings. **Arch. Biochem. Biophys., 167**:723-729.

_____ & _____ 1975 b - Subcellular localization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Pisum sativum* seedlings. **Arch. Biochem. Biophys.,167**:730-737.

_____ & _____ 1979 - Regulation of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from pea seedlings: rapid post-translational phytochrome-mediated decrease in activity and *in vivo* regulation by isoprenoid products. **Arch. Biochem. Biophys., 198**:323-334.

BROOKS, J. 1971 - Some chemical and geochemical studies on sporopollenin. In "**Sporopollenin**" pag. 351-407. Ed. J. Brooks, P. R. Grant, M. Muir, P. van Gijzel & G. Shaw. Academic Press,London.

_____ & SHAW, G. 1968 a - Chemical structure of the exine of pollen walls and a new function for carotenoids in nature. **Nature, 219**:532-533.

_____ & _____ 1968 b - The post-tetrad ontogeny of the pollen wall and the chemical structure of the sporopollenin of *Lilium henryi*. **Grana, 8**:227-234.

_____ & _____ 1971 - Recent developments in the chemistry, biochemistry, geochemistry and post-tetrad ontogeny of sporopollenins derived from pollen and spore exines. In "**Pollen: Development and Physiology**" pag. 99-114. Ed. J. Heslop-Harrison. Butterworths, London.

_____ & _____ 1977 - Recent advances in the chemistry and geochemistry of pollen and spore walls. **Trans. Bose Res. Inst., 40**:19-38.

_____ & _____ 1978 - Sporopollenin: a review of its chemistry, palaeochemistry and geochemistry. **Grana, 17**:91-97.

BROWN, D.L. & BOUCK, G.B. 1973 - Microtubule biogenesis and cell shape in *Ochromonas* II. The role of nucleating sites in shape development. **J. Cell Biol., 56**:360-378.

BROWN, E.G., AL-NAJAFI, T. & NEWTON, R.P. 1979 - Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate,adenylate cyclase and a cyclic AMP binding-protein in *Phaseolus vulgaris*. **Phytochemistry, 18**:9-14.

_____ & NEWTON, R.P. 1973 -Occurrence of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in plant tissues.**Phytochemistry, 12**:2683-2685.

_____ & _____ 1981 - Cyclic AMP and higher plants. **Phytochemistry, 20**:2453-2463.

BROWN, R.C. & LEMMON, B.E. 1980 - Ultrastructure of sporogenesis in a moss, *Dictrichum pallidum*. III. Spore wall formation. **Amer. J. Bot., 67**:918-934.

_____ , _____ & RENZAGLIA, K.S. 1986 - Sporocytic control of spore wall pattern in liverworts. **Amer. J. Bot., 73**:593-596.

BROWNING, A.J., HALL, J.L. & BAKER, D.A. 1980 - Cytochemical localization of ATPase activity in phloem tissues of *Ricinus communis*. **Protoplasma, 104**:55-65.

BRUNNER, U. & HONEGGER, R. 1985 - Chemical and ultrastructural studies on the distribution of sporopolleninlike biopolymers in six genera of lichen phycobionts. **Can. J. Bot., 63**:2221-2230.

BRYCE, W.H. & NELSON, O.E. 1979 - Starch-synthesizing enzymes in the endosperm and pollen of maize. **Plant Physiol., 63**:312-317.

BUCHEN, B. & SIEVERS, A. 1978 - Megasporogenese von *Selaginella* . II. Ultrastrukturelle und cytochemische Untersuchungen zur Sekretion von Lipiden. **Protoplasma, 96**:319-328.

BURCZYK, J. & CZYGAN, F.-C. 1983 - Occurrence of carotenoids and sporopollenin in the cell wall of *Chlorella fusca* and of its mutants. **Z. Pflanzenphysiol., 111**:169-174.

BUSS, P. A. Jr., GALEN, D.F. & LERSTEN, N.R. 1969 - Pollen and tapetum development in *Desmodium glutinosum* and *D. illinoense* (Papilionoideæ; Leguminosæ). **Amer. J. Bot., 56**:1203-1208.

_____ & LERSTEN, N.R. 1972 - Crystals in tapetal cells of the Leguminosæ. **Bot. J. Linn. Soc., 65**:81-85.

_____ & _____ 1975 - Survey of tapetal nuclear number as a taxonomic character in Leguminosæ. **Bot. Gaz.,136**:388-395.

BÜSTOW, R. 1955 - Citado por Vasil, I.K. , 1967.

BUTTROSE, M.S. 1962 - Ultrastructure of the developing wheat endosperm. **Aust. J. Biol. Sci., 16**:305-317.

CAMARA, B. 1984 - Terpenoid metabolism in plastid sites of phytoene synthetase activity and synthesis in plant cells. **Plant Physiol., 74**:112-116.

_____ , BARDAT, F. & MONÉGER, R. 1982 - Sites of biosynthesis of carotenoids in *Capsicum* chromoplasts. **Eur. J. Biochem., 127**:255-258.

_____ , _____ , DOGBO, O., BRANGEON, J. & MONÉGER, R. 1983 - Terpenoid metabolism in plastids. Isolation and biochemical characteristics of *Capsicum annuum* chromoplasts. **Plant Physiol., 73**:94-99.

_____ , DOGBO, O., d' HARLINGUE, A., KLEINIG, H. & MONEGER, R. 1985 a - Metabolism of plastid terpenoids: lycopene cyclization by *Capsicum* chromoplast membranes. **Biochim. Biophys. Acta, 836**:262-266.

_____, _____, BARDAT,F, & MONEGER,R. 1985 b - Conversion enzymatique du pyrophosphate de préphytoène en caroténoides par des plastes isolés. **C.R. Acad. Sc. Paris, 301**:749-752.

CAMMER, W. & MOORE, C.L. 1973 - Oxidation of 3,3'-diaminobenzidine by rat liver mitochondria. **Biochemistry, 12**:2502-2509.

CARO, L.G., van TUBERGEN, R.P. & KOLB, J.A. 1962 - High-resolution autoradiography. I. Methods. **J. Cell Biol., 15**:173-188.

CAROTHERS, Z.B. 1972 a - Membrane continuity between plasmalemma and nuclear envelope in spermatogenic cells of *Blasia*. **Science, 175**:652-654.

_____ 1972 b - Studies of spermatogenesis in the Hepaticæ. II. Continuity between plasmalemma and nuclear envelope in androgonial cells of *Blasia* . **J. Cell Biol., 52**:273-282.

CARRARO, L. & LOMBARDO, G. 1976 - Tapetal ultrastructural changes during pollen development. III. Studies on *Gentiana acaulis*. **Caryologia, 29**:345-349.

CARTER, J.L., GARRARD, L.A. & WEST, S.H. 1973 - Effect of gibberellic acid on starch degrading enzymes in leaves of *Digitaria decumbens*. **Phytochemistry, 12**:251-254.

CATESSON, A.M. 1973 - Observations cytochimiques sur les tubes criblés de quelques Angiospermes. **J. Microscopie, 16**:95-104.

_____ & CZANINSKI,Y. 1967 - Mise en évidence d'une activité phosphatasique acide dans le reticulum endoplasmique des tissus conducteurs de Robinier et de Sycomore. **J. Microscopie, 6**:509-514.

_____, _____ & MONTIES, B. 1978 - Caractères histochimiques des peroxydases pariétales dans les cellules en cours de lignification. **C.R. Acad. Sc. Paris, 286**:1787-1790.

CERCEAU-LARRIVAL, M-T., ABADIE, M., ALBERTINI, L., AUDRAN, J-C., CORNU, A., COUSIN, M-T., DAN DICKO-ZAFIMAHOVA, L., DUC, G., FERGUSON, I.K., HIDEUX, M., NILSSON, S., ROLAND-HEYDACKER, F. & SOUVRE, A. 1980-1981 - Relations sporophyte-gametophyte: assise tapétale-pollen. **Ann. Sc. Natur. Bot., 13 eme Serie, Tome 2 et 3**:69-92.

_____ & ROLAND-HEYDACKER, F. 1976 - Ontogénie et ultrastructure de pollens d'Ombellifères. Tapis et corps d'Ubisch. **C.R. Acad. Sc. Paris, 283**:29-32.

CHAFFEY, N.J. & HARRIS, N. 1985 - Localization of ATPase activity on the plasmalemma of scutellar epithelial cells of germinating barley (*Hordeum vulgare* L.). **J. Exp. Bot., 36**:1612-1619.

CHAKRABORTY, A. & BISWAS, B.B. 1965 - The effect of colchicine on nucleic acid and protein synthesis. **Exptl. Cell Res., 38**:57-65.

CHALY, N. & POSSINGHAM, J. V. 1981 - Structure of constricted proplastids in meristematic plant tissues. **Biol. Cell., 41**:203-210.

CHARVAT, I. & ESAU, K. 1975 - An ultrastructural study of acid phosphatase localization in *Phaseolus vulgaris* xylem by the use of an azo-dye method. **J. Cell Sci., 19**:543-561.

CHATIN, J. 1870. Citado por Sankara Rao,K. & Chinnappa, C.C. 1983.

CHENNAVEERAIAH, M.S. & SHIVAKUMAR, P.M. 1983 - Pollen bud formation and its role in *Ophiorrhiza* spp. **Ann. Bot., 51**:449-452.

CHEN, S.-Y. 1982 - Adenylate cyclase and exocytosis of membrane-coating granules in oral mucosa. **J. Submicrosc. Cytol.,14**:253-262.

CHENG, H. & FARQUHAR, M.G. 1976 - Presence of adenylate cyclase activity in Golgi and other fractions of rat liver II. Cytochemical localization within Golgi and ER membranes. **J. Cell Biol.,70**:671-684.

CHENG, P.C., GREYSON, R.I. & WALDEN, D.B. 1979 - Comparison of anther development in genic male-sterile (ms 10) and in male-fertile corn (*Zea mays*) from light microscopy and scanning electron microscopy. **Can. J. Bot., 57**:578-596.

CHOPRA, R.N. & BHATLA, S.C. 1981 - Involvement of cyclic 3'-5' adenosine monophosphate and other purine derivatives in sex induction in the moss *Bryum argenteum* . **Z. Pflanzenphysiol.,103**:393-402.

CHRISPEELS, M.J., TENNER, A.J. & JOHNSON, K.D. 1973 - Synthesis and release of sucrose by the aleurone layer of barley : regulation by gibberellic acid. **Planta, 113**:35-46.

CHRISTENSEN, J.E. & HORNER, H.T. Jr. 1974 - Pollen pore development and its spatial orientation during microsporogenesis in the grass *Sorghum bicolor* **Amer. J. Bot.,61**:604-623.

_____, _____ & LERSTEN, N.R. 1972 - Pollen wall and tapetal orbicular wall development in *Sorghum bicolor*. **Amer. J. Bot., 59**:43-58.

COCHRANE, M.P. & DUFFUS, C.M. 1980 - The nucellar projection and modified aleurone in the crease region of developing caryopses of barley (*Hordeum vulgare* L. var. *distichum*).**Protoplasma, 103**:361-375.

COCKBURN, B.J. & WELLBURN, A.R. 1974 - Changes in the envelope permeability of developing chloroplasts. **J. Exp. Bot., 25**:36-49.

COLEMAN, W.K. & GREYSON, R.I. 1977 - Promotion of root initiation by gibberellic acid in leaf discs of tomato (*Lycopersicum esculentum*) cultured in vitro. **New Phytol., 78**:47-54.

COLHOUN, C.W. & STEER, M.W. 1981 - Microsporogenesis and the mechanism of cytoplasmic male sterility in maize. **Ann. Bot.,48**:417-424.

COLSON, M. 1979 - Localisation ultrastructurale de l'activité phosphatasique acide et des phosphates dans les radicules d'*Allium cepa* en vie ralentie et au début de l'hydratation germinative. Effect de traitement brefs à basse température (-196°C). **Ann. Sc. Natur., Bot., 13 eme Serie, 1**:21-38.

COOPER, D.C. 1952. Citado por Stanley, R. G. & Linskens, H. F. 1974.

COULOMB, P. 1969 - Mise en évidence de structures analogues aux lysosomes dans le meristème radiculaire de la courge (*Cucurbita pepo* L. Cucurbitacée). **J. Microscopie, 8**:123-138.

_____ & COULOMB, C. 1972 - Processus d'autophagie cellulaire dans les cellules de méristèmes radiculaires de la courge (*Cucurbita pepo* L. Cucurbitacée) mis en état d'anoxie. **C. R. Acad. Sc. Paris, 274** :214-217.

_____ , _____ & COULON, J. 1972 - Origine et fonctions des phytolysosomes dans le méristème radiculaire de la courge (*Cucurbita pepo* L. Cucurbitacée). I.Origine des phytolysosomes. Relations reticulum endoplasmique-dictiosomes-phytolysosomes. **J. Microscopie, 13**:263-280.

_____ & COULON, J. 1971 - Fonctions de l'appareil de Golgi dans les méristèmes radiculaires de la courge (*Cucurbita pepo* L. Cucurbitacée). **J. Microscopie, 10**:203-214.

COUOT-GASTELIER, J. & LOUGUET, P. 1985 - Ultrastructural localization of acid phosphatase activity in the guard cell of *Tradescantia virginiana* L. **Cytobios, 43**:87-95.

COUSIN, M-T. 1979 - Tapetum and pollen grains of *Vinca rosea* (Apocynaceæ). **Grana, 18**:115-128.

_____ & ABADIE, M. 1982 - Action des mycoplasmes sur l'anthère. Étude en microscopies photonique et électronique. **Rev. Cytol. Biol. véget.-Bot., 5**:41-57.

CRAN, D.G. & POSSINGHAM, J.V. 1973 - The fine structure of avocado plastids. **Ann. Bot., 37**:993-997.

_____ & _____ 1974 a - Plastid thylakoid formation. **Ann. Bot., 38**:843-847.

_____ & _____ 1974 b - The effect of cell age on chloroplast structure and chlorophyll in cultured spinach leaf discs. **Protoplasma, 79**:197-213.

CRANG, R.E. & MAY, G. 1974 - Evidence for silicon as a prevalent element component in pollen wall structure. **Can. J. Bot., 52**:2171-2174.

CRESTI, M., CIAMPOLINI, F. & SARFATTI, G. 1983 - Ultrastructural features of *Malus communis* L.mature pollen. In "**Pollen: Biology and Implications for Plant Breeding**" pag. 165-172. Ed. D. L. Mulcahy & E. Ottaviano. Elsevier Science Publishing Co., Inc.

_____, PACINI, E. & SARFATTI, G. 1972 - Ultrastructural studies on the autophagic vacuoles in *Eranthis hiemalis* endosperm. **J. Submicr. Cytol., 4**:33-44.

_____ , _____ & SIMONCIOLI, C. 1974 - Uncommon paracrystalline structures formed in the endoplasmic reticulum of the integumentary cells of *Diplotaxis erucoides* . **J. Ultr. Res., 49**:218-223.

CRONSHAW, J. & BENTWOOD, J. 1977 - Cytochemical localization of nucleoside phosphatases in the xylem of *Nicotiana tabacum* , *Pisum sativum* and *Ricinus communis*. **Biol. Cellulaire, 28**:281-290.

CROZIER, A. 1981 - Aspects of the metabolism and physiology of gibberellins. In "**Advances in Botanical Research**" Volume 9 pag. 33-149. Ed. H. W. Woolhouse. Academic Press Inc., London.

CUTLER, L.S. 1975 - Comments on the validity of the use of lead nitrate for the cytochemical study of adenylate cyclase. **J. Histochem. Cytochem., 23**: 786-787.

_____ 1983 - Cytochemical methods for the localization of adenylate cyclase. A review and evaluation of the efficacy of the procedures. **J. Histochem. Cytochem., 31**:85-93.

_____ , MOORADIAN, B.A. & CHRISTIAN, C. 1977 - Concurrent cytochemical localization of adenylate cyclase and peroxydase in the developing rat submandibular gland. **J. Histochem. Cytochem., 25**:1207-1212.

CZANINSKI, Y. 1978 - Localisation ultrastructurale d'activités peroxydasiques dans les parois du xylème du Blé pendant leur différenciation. **C. R. Acad. Sc. Paris, 286**:957-959.

_____ & CATESSON, A.M. 1969 - Localisation ultrastructurale d'activités peroxydasiques dans les tissues conducteurs végétaux au cours du cycle annuel. **J. Microscopie, 8**:875-888.

_____ &_____ 1970 - Activités peroxydasiques d'origines diverses dans les cellules d'*Acer pseudoplatanus* (tissues conducteurs et cellules en culture). **J. Microscopie, 9**:1089-1102.

DAIE, J. 1985 - Sugar transport in leaf discs of *Phaseolus coccinius* . **Plant Physiol., 64**:553-558.

D'ALASCIO DESCHAMPS, R. 1973 - Organisation du sac embryonaire du *Linum catharticum* L., espèce récoltée en station naturelle; étude ultrastructurale. **Bull. Soc. bot. Fr., 120**:189-200.

DAN DICKO-ZAFIMAHOVA, L. & AUDRAN, J-C. 1981 - Etude ontogénique de la pollinie de *Calotropis procera* (Asclepiadaceaæ). Apports préliminaires de la microscopie électronique. **Grana, 20**:81-99.

DAS, G. 1973 - Gibberellin-induced changes in ultrastructure of lettuce cotyledons. **Ann. Bot., 37**:999-1004.

DAS, N.K. 1965 - Inactivation of the nucleolar apparatus during meiotic prophase in corn anthers. **Exptl. Cell Res., 40**:360-364.

DAUWALDER, M., WHALEY, W.G. & KEPHART, J.E. 1969 - Phosphatases and differentiation of Golgi apparatus. **J. Cell Sci., 4**:455-497.

DAVIS, G.L. 1966 Citado por Stone, D. E. et al., 1981.

DE, M. & SHARMA, A.K. 1983 - Cytomixis in pollen mother cells of an apomictic ornamental *Ervatamia divaricata* (Linn.) Alston. **Cytologia, 48**:201-207.

DE BRABANDER, M., van DE VEIRE, R., AERTS, F., GEUENS, G., BORGERS, M., DESPLENTER, L. & DE CREE, J. 1975 - Oncodazole (R. 17934) : a new anti-cancer drug interfering with microtubules. Effects on neoplastic cells cultured in vitro and in vivo. In "**Microtubules and Microtubule Inhibitors**" pag.509-521. Ed. M. Borgers & M. de Brabander. North-Holland Publishing Comp.,Amsterdam.

DE GREEF, J.A. & VERBELEN, J.P. 1973 - Physiological stress and crystallites in leaf plastids of *Phaseolus vulgaris* L. **Ann. Bot., 37**:593-596.

DE JONG, D.W., JANSEN, E.F. & OLSON, A.C. 1967 - Oxidoreductive and hydrolytic enzyme patterns in plant suspension culture cells. **Exptl. Cell Res., 47**:139-156.

DE LA GUARDIA, M.D. & BENLLOCH, M. 1980 - Effects of potassium and gibberellic acid on stem growth of whole sunflower plants. **Plant Physiol., 49**:443-448.

DE LA PEÑA, A. & PUERTAS, M.J. 1978 - Colchicine induced asynapsis and C-meiosis in pollen mother cells of cultivated anthers of rye. **Chromosoma (Berl.), 68**:261-267.

_____ , _____ , CERMEÑO, M. C. & GIRALDEZ, R. 1979 - Evidence of crossing-over inhibition in rye anthers cultured with colchicine. **Chromosoma (Berl.), 72**:151-155.

DENIZOT, J. 1976 - Remarques sur l'édification des différentes couches de la paroi sporale à exine lamellaire de quelques Marchantiales et Sphaerocarpales. In "**The evolutionary significance of the exine**" pag. 185-210. Ed. I. K. Ferguson & J. Muller. Linnean Society of London. Academic Press.

DEREUDDRE, J. 1971 - Sur la présence de groupes de saccules appartenant au réticulum endoplasmique dans les cellules des ébauches foliaires en vie ralentie de *Betula verrucosa* Ehrh. **C. R. Acad. Sc. Paris, 273**:2239-2242.

DESHUSSES, J. GUMBER, S.C. & LOEWUS, F.A. 1981 - Sugar uptake in lily pollen. A proton symport. **Plant Physiol., 67**:793-796.

DeVRIES, A.PH. & IE, T.S. 1970 - Electron-microscopy on anther tissue and pollen of male sterile and fertile wheat (*Triticum aestivum* L.). **Euphytica, 19**:103-120.

DEXHEIMER, J. 1966 a - Sur les modifications du réticulum endoplasmic des grains de pollen de *Lobelia erinus* (L.) traités par le chloramphénicol. **C. R. Acad. Sc. Paris, 262**:853-855.

_____ 1966 b - Sur les modifications, sous l'action de diverses substances, du réticulum endoplasmique des tubes polliniques de *Lobelia erinus* L. **C. R. Acad. Sc. Paris, 263**:1703-1705.

_____ 1975 - Sur la production de reserves proteolipidiques par les cellules du gametophyte femelle du *Ginkgo biloba*. **Cytologia, 40**:583-593.

_____ 1978 a - Localisation ultrastructurale des phosphatases acides (phosphomonoestérases acides) dans les cellules des glandes digestives du *Drosera capensis* L. pendant la synthèse de mucilage. **Rev. Cytol. Biol. végét. -Bot., 1**:49-57.

_____ 1978 b - Etude de la sécretion de mucilage par les cellules des glandes digestives de *Drosera capensis* L. Localisation ultrastructurale des phosphatases neutres et de l'ATPase. **Z. Pflanzenphysiol., 86**:189-201.

_____1979 - Ultrastructural localization of enzymatic activities in the cells of the digestive gland of *Drosera capensis* L. during the mucigenic phase. Detection of glucose-6-phosphatase activity. **Cytologia, 44**:153-160.

DEYSSON, G. 1968 - Antimitotic substances. **Int. Rev. Cytol., 24**:99-148.

_____ 1975 - Microtubules and antimitotic substances. In "**Microtubules and Microtubule Inhibitors**". pag. 427-451. Ed. M.Borgers & De Brabender,M. North-Holland Publishing Comp. Amsterdam.

DHAWAN, A.K. & MALIK, C.P. 1981 - Effect of growth regulators and light on pollen germination and pollen tube growth in *Pinus roxburghii* Sarg. **Ann. Bot., 47**:239-248.

DICKINSON, H.G. 1970 a - Ultrastructural aspects of primexine formation in the microspore tetrad of *Lilium longiflorum*. **Cytobiologie, 1**:437-449.

_____ 1970 b - The fine structure of a peritapetal membrane investing the microsporangium of *Pinus banksiana*. **New Phytol., 69**: 1065-1068.

_____ 1971 a - Nucleo-cytoplasmic interaction following meiosis in the young microspores of *Lilium longiflorum*; events at the nuclear envelope. **Grana, 11**:117-127.

_____ 1971 b - The role played by sporopollenin in the development of pollen in *Pinus banksiana*. In "**Sporopollenin**" pag. 31-65. Ed. J. Brooks, P. R. Grant, M. Muir, P. van Gijzel & G. Shaw. Academic Press, London.

_____ 1973 - The role of plastids in the formation of pollen grain coatings. **Cytobios, 8**:25-40.

_____ 1976 a - Common factors in exine deposition. In "**The evolutionary significance of the exine**" pag. 67-89. Ed. I. K. Ferguson & J. Muller. Academic Press, London.

_____ 1976 b - The deposition of acetolysis-resistant polymers during the formation of pollen. **Pollen et Spores, 18**:321-334.

_____ 1981 a - The structure and chemistry of plastid differentiation during male meiosis in *Lilium henryi*. **J. Cell Sci., 52**:223-241.

_____ 1981 b - Cytoplasmic differentiation during microsporogenesis in higher plants. **Acta Soc. Bot. Poloniae, 50**:3-12.

_____ 1982 - The development of pollen. **Rev. Cytol. Biol. végét. - Bot., 5**:5-19.

_____ & ANDREWS, L. 1977 - The role of membrane-bound cytoplasmic inclusions during gametogenesis in *Lilium longiflorum* Thunb. **Planta, 134**:229-240.

_____ & BELL, P.R. 1970 - Nucleocytoplasmic interaction at the nuclear envelope in post meiotic microspores of *Pinus banksiana*. **J. Ultr. Res., 33**:356-359.

_____ & _____ 1972 - The role of tapetum in the formation of sporopollenin containing structures during microsporogenesis in *Pinus banksiana*. **Planta, 107**:205-215.

_____ & _____ 1976 a - Development of the tapetum in *Pinus banksiana* preceding sporogenesis. **Ann. Bot., 40**:103-113.

_____ & _____ 1976 b - The changes in the tapetum of *Pinus banksiana* accompanying formation and maturation of the pollen. **Ann. Bot., 40**:1101-1109.

_____ & HESLOP-HARRISON, J., 1968 - Common mode of deposition for the sporopollenin of sexine and nexine. **Nature, 220**:926-927.

_____ & _____ 1970 a - The ribosome cycle, nucleoli, and cytoplasmic nucleoloids in the meiocytes of *Lilium*. **Protoplasma, 69**:187-200.

_____ & _____ 1970 b - Citado por Dickinson, H. G., 1981 a.

_____ & LEWIS, D. 1973 - Citado por Heslop-Harrison, J. 1975

_____ & POTTER, U. 1975 - Post meiotic nucleo-cytoplasmic interaction in *Pinus banksiana*: the secretion of RNA by the nucleus. **Planta, 122**:99-104.

_____ & _____ 1976 - The development of patterning in the alveolar sexine of *Cosmos bipinnatus*. **New Phytol., 76**:543-550.

_____ & _____ 1978 - Cytoplasmic changes accompanying the female meiosis in *Lilium longiflorum* Thunb. **J. Cell. Sci., 29**:147-169.

_____ & _____ 1979 - Post-meiotic nucleo-cytoplasmic interaction in *Cosmos bipinnatus*. Early events at the nuclear envelope. **Planta, 145**:449-457.

_____ & WILLSON, C. 1983 - Two stages in the redifferentiation of amyloplasts in the microspores of *Lilium*. **Ann. Bot., 52**:803-810.

DIDEHVAR, F. & BAKER, D.A. 1986 - Localization of ATPase in sink tissues of *Ricinus*. **Ann. Bot., 57**:823-828.

DOBBINS, D.R. & KUIJT, J. 1974 - Anatomy and fine structure of the mistletoe haustorium (*Phtlirusa pyrifolia*). II. Penetration attempts and formation of the gland. **Amer. J. Bot., 61**:544-550.

DOSIER, L.W. & RIOPEL, J.L. 1977 - Differential enzyme activity during trichoblast differentiation in *Elodea canadensis*. **Amer. J. Bot., 64**:1049-1056.

DOVER, G.A. 1972 - The organization and polarity of pollen mother cells of *Triticum aestivum*. **J. Cell Sci.,11**:699-711.

_____ & RILEY, R. 1973 - The effect of spindle inhibitors applied before meiosis on meiotic chromosome pairing. **J. Cell Sci., 12**:143-161.

DRLICA, K.A., GARDNER, J.M. & KADO, C.I. 1974 - Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate levels in normal and transformed cells of higher plants. **Biochem. Biophys. Res. Comm.,56**:753-759.

DRISCOLL, C.J., DARVEY, N.L. & BARBER, H.N. 1967 - Effect of colchicine on meiosis of hexaploid wheat. **Nature, 216**:687-688.

DROCHMANS, P., WANSON, J-C. & MOSSELMANS, R. 1975 - Isolation and subfractionation on Ficoll gradients of adult rat hepatocytes. Size, morphology and biochemical characteristics of cell fractions. **J. Cell Biol., 66**:1-22.

DUCKER, S.C., PETTITT, J.M. & KNOX, R.B. 1978 - Biology of Australian seagrasses: pollen development and submarine pollination in *Amphibolis antarctica* and *Thalassodendron ciliatum* (Cymodoceaceæ). **Aust. J. Bot.,26**:265-285.

DUNBAR, A. 1973 a - Pollen development in the *Eleocharis palustris* Group (Cyperaceæ). I. Ultrastructure and ontogeny. **Bot. Notiser, 126**:197-254.

_____ 1973 b - Pollen ontogeny in some species of Campanulaceæ. A study by electron microscopy. **Bot. Notiser, 126**:277-315.

_____ & ERDTMAN, G. 1969 - On the pollen grains of *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceæ). **Grana, 9**:63-71.

_____ & ROWLEY, J.R. 1984 - *Betula* pollen development before and after dormancy: exine and intine. **Pollen et Spores, XXVI**:299-338.

DUNWELL, J.M. 1978 - Division and differentiation in cultured pollen. **Proc. 4th. Intern. Congr. Plant Tissue and Cell Culture**. pag. 103-112. Ed. T.A. Thorpe, University of Calgary, Canada.

_____ & THURLING, N. 1985 - Role of sucrose in microspore embryo production in *Brassica napus* ssp. *oleifera*. **J. Exp. Bot., 36**:1478-1491.

DuPONT, F.M. , BURKE, L.L. & SPANSWICK, R.M. 1981 - Characterization of a partially purified adenosine triphosphatase from a corn root plasma membrane fraction. **Plant Physiol., 67**:59-63.

DUPUIS, F. 1974 - Evolution of the plastidial system during the microsporogenesis in *Impatiens balsamina* L. In "**Fertilization in Higher Plants**" pag. 65-71. North-Holland Publishing Comp. Amsterdam. The Netherlands.

_____ 1976 - Sur une éventuelle sécrétion de sporopollenine dans les méiocytes d'*Impatiens balsamina* L. **Bull. Soc. bot. Fr., 123**:243-248.

DURNAM, D.J., STUART, D.A. & JONES, R.L. 1977 - Cell elongation and cell division in elongating lettuce hypocotyls. **Plant Physiol., 59, supl.**:72.

DUSTIN, A.P., HAVAS, L. & LITS, F. 1937. Citado por Eigsti, O. J. & Dustin, P. 1955.

EAMES, A.J. 1961 - "**Morphology of the Angiosperms**". McGraw Hill Book Company, Inc., New York, London.

EARLE, K.M. & GALSKY, A.G. 1971.Citado por Brown, E. G. & Newton, R. P.,1981.

ECHLIN, P. 1965 - An apparent helical arrangement of ribosomes in developing pollen mother cells of *Ipomoea purpurea* (L.) Roth. **J. Cell Biol.,24**:150-153.

_____ 1971 a - Production of sporopollenin by the tapetum. In "**Sporopollenin**" pag. 220-247. Ed. J. Brooks, P. R. Grant, M. D. Muir, P. van Gijzel & G. Shaw. Academic Press, London & New York.

_____ 1971 b - The role of tapetum during microsporogenesis of Angiosperms. In "**Pollen: Development and Physiology**" pag. 41-46. Ed. J. Heslop-Harrison. Butterworths, London.

_____ & GODWIN, H. 1968 a - The ultrastructure and ontogeny of pollen in *Helleborus foetidus*L. I. The development of the tapetum and Ubisch bodies. **J. Cell Sci.**,**3**:161-174.

_____ & _____ 1968 b - The ultrastructure and ontogeny of pollen in *Helleborus foetidus* L. II. Pollen grain development through the callose special wall stage. **J. Cell Sci.**, **3**:175-186.

_____ & _____ 1969 - The ultrastructure and ontogeny of pollen in *Helleborus foetidus* L. III. The formation of the pollen grain wall.**J. Cell Sci.**, **5**:459-477.

EDWARDSON, J.R. 1970 - Cytoplasmic male sterility. **The Bot. Rev.**, **36**:341-420.

EHRLICH, H., ROSS, R. & BORNSTEIN, P. 1974 - Effects of antimicrotubular agents on the secretion of collagen. A biochemical and morphological study. **J. Cell Biol.**, **62**:390-404.

EIGSTI, O.J. & DUSTIN, P. 1955 - **Colchicine in Agriculture, Medecine, Biology and Chemistry**. Iowa State College Press, Ames, Iowa.

EL- GHAZALY, G. 1982 - Ontogeny of the pollen wall of *Leontodon autumnalis* (Hypochoeridinæ, Compositæ). **Grana**, **21**:103-113.

_____ & JENSEN, W.A. 1985 - Studies of the development of wheat (*Triticum aestivum*) pollen. III. Formation of microchannels in the exine. **Pollen et Spores**, **XXVII**:5-14.

_____ & _____ 1986 - Studies of the development of wheat (*Triticum aestivum*) pollen. I. Formation of the pollen wall and Ubisch bodies. **Grana**, **25**:1-29.

ELSIK, W.C. 1971 - Microbiological degration of sporopollenin. In "**Sporopollenin**" pag. 480-509. Ed. J.Brooks, P.R. Grant, M. Muir, P.van Gijzel & G. Shaw. Academic Press, London & New York.

ERDTMAN, G. 1952 - **Pollen Morphology and Plant Taxonomy. Vol. I. Angiosperms.** Chronica Botanica, Waltham, Mass.

_____ 1966 - A propos de la stratification de l'exine. **Pollen et Spores**, **VIII**:5-7.

_____ 1969 - **Handbook of Palynology**. Scandinavian Univ. Books. Munksgaard, Copenhagen, Denmark.

ESAU, K.1975 a - Crystalline inclusion in thylakoids of spinach chloroplasts. **J. Ultr. Res.**, **53**:235-243.

_____ 1975 b - Dilated endoplasmic reticulum cisternae in differentiating xylem of minor veins of *Mimosa pudica* L. leaf. **Ann. Bot.**, **39**:167-174.

_____ 1977 - **Anatomy of Seed Plants**. 2nd. Edition. John Wiley and Sons, New York.

_____ & CHARVAT, I.D. 1975 - An ultrastructural study of acid phosphatase localization in cells of *Phaseolus vulgaris* phloem by the use of the azo dye method. **Tissue & Cell**, **7**:619-630.

_____ , MAGYAROSY, A. C. & BREAZEALE, V. 1976 - Studies of the mycoplasma-like organism (MLO) in spinach leaves affected by the aster yellows disease. **Protoplasma**, **90**:189-203.

ESCHRICH, W. 1961 - Citado por Mascarenhas, J. P., 1975.

_____ 1963 - Cytoplasmabrucken zwischen den Pollenmutterzellen von *Cucurbita ficifolia* im Elektronenmikroskop. **Protoplasma**, **56**:718-722.

_____ 1964 - Die Callosesynthese bei Pollenmutterzellen von *Cucurbita ficifolia* . In "**Pollen: Physiology and Fertilization**" pag. 48-51. Ed. H. F. Linskens. North Holland Publisching Comp., Amsterdam.

ESSNER, E. 1973 - Phosphatases. In "**Electron Mycroscopy of Enzymes. Principles and Methods. Vol. 1**". pag. 44-76. Ed. M. A. Hayat. Van Nostrand Reinhold Company, New York, London.

_____ 1974 - Hemoproteins. In "**Electron Mycroscopy of Enzymes.Principles and Methods. Vol. 2.**" pag. 1-33. Ed. M. A. Hayat. Van Nostrand Reinhold Company, New York, London.

EVANS, M.L. 1984 - Functions of hormones at the cellular level of organization. In " **Encyclopedia of Plant Physiol. New Series, Vol. 10**" ,pag. 23-79. Ed. T. K. Scott. Springer-Verlag. Berlin.

FÆGRI, K. 1956 - Recent trends in palynology. **The Bot. Rev., 22**:639-664.

_____ & IVERSEN, J. 1950 - **Text-book of modern pollen analysis.** Ejnar Munksgaard, Copenhagen.

_____ & _____ 1975 - **Textbook of pollen analysis.** 3th. revised edition. Scandinavian Univ. Books. Munksgaard, Denmark.

FAHN, A. 1979 - Ultrastructure of nectaries in relation to nectar secretion. **Amer. J. Bot., 66**:977-985.

_____ & BENOUAICHE, P. 1979 - Ultrastructure, development and secretion in the nectary of banana flowers. **Ann. Bot., 44**:85-93.

_____ & RACHMILEVITZ, T. 1975 - An autoradiographical study of nectar secretion in *Lonicera japonica* Thunb. **Ann. Bot., 39**:975-976.

FARNHAM, C.J.M. 1975 - Cytochemical localization of adenylate cyclase and 3',5'-nucleotide phosphodiesterase in *Dictyostelium* **Exptl. Cell Res., 91**:36-46.

FARQUHAR, M.G., BERGERON, J.J.M. & PALADE, G.E. 1974 -Cytochemistry of Golgi fractions prepared from rat liver. **J. Cell Biol., 60**:8-25.

FERRARI, T.E. & WALLACE, D.H. 1975 - Germination of *Brassica* pollen and expression of incompatibility in vitro. **Euphytica, 24**:757-765.

FILNER, P., WRAY, J.L. & VARNER, J.E. 1969 - Enzyme induction in higher plants. **Science, 165**:358-367.

FINERAN, B.A. & INGERFELD, M. 1982 - Graniferous tracheary elements in the haustorium of *Atkinsonia ligustrina,* a root hemi-parasite of the Loranthaceæ. **Protplasma, 113**:150-160.

FISHER, D.B., JENSEN, W.A. & ASHTON, M.E. 1968 - Histochemical studies of pollen: storage pockets in the endoplasmic reticulum (ER). **Histochemie, 13**:169-182.

FITZGERALD, P.H. & BREHANT, L.A. 1970 - Depression of DNA synthesis and mitotic index by colchicine in cultured human lymphocytes. **Exptl. Cell Res., 59**:27-31.

FLORANCE, E.R. & CAMERON, H.R. 1974 - Vesicles in expanded endoplasmic reticulum cisternae. Structures that resemble mycoplasma-like bodies. **Protoplasma, 79**:337-348.

FLYNN, J.J. 1971 - Surface membrane specializations and the pollen wall. In "**Pollen: Development and Physiology**". pag. 121-124. Ed. J. Heslop-Harrison. Butterworths, London.

_____ & ROWLEY, J.R. 1971 - The primexine of *Nelumbo nucifera* . **Experientia, 27**:227-228.

FORD, J. H. 1971 - Ultrastructural and chemical studies of pollen wall development in the Epacridaceæ. In "**Sporopollenin**". pag.130-173. Ed. J. Brooks, P. R. Grant., M. Muir, P. van Gijzel & G. Shaw. Academic Press, London.

FOSKET, D.E. & MIKSCHE, J.P. 1966 - A histochemical study of the seedling shoot apical meristem of *Pinus lambertiana*. **Amer. J. Bot., 53**:694-702.

FRANCESCHI, V.R. & HORNER, H.T.Jr. 1979 - Nuclear condition of the anther tapetum of *Ornithogalum caudatum* during microsporogenesis. **Cytobiologie, 18**:413-421.

FRANKE, W.W., SCHEER, U. & FRITSCH, H. 1972 - Intranuclear and cytoplasmic annulate lamellae in plant cells. **J. Cell Biol., 53**:823-827.

FREDERICK, S.E. & NEWCOMB, E.H. 1969 - Cytochemical localization of catalase in leaf microbodies (peroxisomes). **J. Cell. Biol., 43**:343-353.

FREEMAN, T.P. 1973 - Developmental anatomy of epidermal and mesophyll chloroplasts in *Opuntia basilaris* leaves. **Amer. J. Bot., 60**:86-91.

FUJIMOTO, K., TOIBANA, M. & OGAWA, K. 1981 - New cytochemical method for adenylate cyclase and guanylate cyclase with dimethyl sulfoxide. **Acta Histochem. Cytochem., 14**:687-704.

GABARA, B. 1974 - A possible role for the endoplasmic reticulum in exine formation. **Grana, 14**:16-22.

_____ 1975 - Characterization of fibrous compound of Golgi vesicles in tapetal cells of *Delphinium*. **Protoplasma, 86**:159-168.

_____ 1977 - A role of plastids in the exine formation. **Proc. of the XVth Czechoslovak Conference on Electron Microscopy. Vol. A.** pag. 88-89. Ed. V. Vikeicky & J. Ludvik. Czechoslovak Academy of Sciences, Prague.

GAHAN, P.B. & McLEAN, J. 1969 - Subcellular localization and possible functions of acid ß-glycerophosphates and naphthol esterases in plant cells. **Planta, 89**:126-135.

GAILHOFER, M., THALER, I. & RUCKER, W. 1979 - Dilatiertes ER in Kalluszellen und in Zellen von in vitro Kultivierten Pflanzchen von *Armoracia rusticana*. **Protoplasma, 98**:263-274.

GALSKY, A.G. & LIPPINCOTT, J.A. 1969. Citado por Brown, E. G. & Newton, R. P., 1981.

GANDER, E.S. & MOPPERT, J.M. 1969 .Citado por Hayat, M. A., 1973.

GARAGATY-FEISSLY, C. 1968 -Sur les modifications de l'ultrastructure des cellules tapétales du genre *Daphne* au cours du dévelopement des grains de pollen. **Bull. Soc. Bot. Suisse, 79**:221-227.

GATES, J.W. & SIMPSON, G.M. 1968 -The presence of starch and alpha-amylase in the leaves of the plants. **Can. J. Bot., 46**:1459-1462.

GAUDE, T. & DUMAS, C. 1984 - A membrane-like structure on the pollen wall surface in *Brassica*. **Ann. Bot., 54**:821-825.

GAVAUDAN, P., POUSSEL, H. & GUYOT, M. 1960 - Production expérimentale dans la cellule végétale anoxique de "nebenkerns" ergastoplasmiques. **C. R. Acad. Sc. Paris, 250**:4029-4031.

GENEVES, L. 1964 - Phénomènes ultrastructuraux intervenant au cours de l'édification des membranes dans les microspores de *Ribes rubrum* L. **C. R. Acad. Sc. Paris, 259**:627-630.

_____ 1969 - Répartition de l'activité de la phosphatase acide dans le tissu sporogène d'*Hypnum rusciforme* en rapport avec son évolution, à l'échelle des ultrastructures **C. R. Acad. Sc. Paris, 269**:1066-1069.

_____ 1973 - Elaboration de polysaccharides destinés à s'incorporer dans les parois, en cours de la méiose, dans les anthères du *Ribes rubrum* L. (Grossulariaceés). **C. R. Acad. Sc. Paris, 277**:169-172.

_____ 1974 - Distribution des polysaccharides pariétaux, en rélation avec l'évolution de diverses cytomembranes, dans les méiocytes staminaux du *Ribes rubrum* (Grossulariaceés), principalement, au cours du cloisonnement. **J. Microscopie, 19**:65-88.

GHAJAR, B.M. & HARMON, S.A. 1968 - The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on permeability of *Staphylococcus aureus*. **Biochem. Biophys. Res. Comm., 32**:940-944.

GHERARDINI, G.L. & HEALEY, P.L. 1969 - Dissolution of outer wall of pollen grain during pollination. **Nature, 224**:718-719.

GIANNATTASIO, M., MANDATO, E. & MACCHIA, V. 1974 - Content of 3',5' cyclic AMP and cyclic AMP phosphodiesterase in dormant and activated tissues of Jerusalem artichoke tubers. **Biochem. Biphys. Res. Comm., 57**:365-371.

GIFFORD, E.M.Jr. & STEWART, K.D. 1968 - Inclusions of the proplastids and vacuoles in the shoot apices of *Bryophyllum* and *Kalanchoe*. **Amer. J. Bot., 55**:269-279.

GILDER, J. & CRONSHAW, J. 1973 a - Adenosine triphosphatase in the phloem of *Cucurbita*. **Planta, 110**:189-204.

_____ & _____ 1973 b - The distribution of adenosine triphosphatase activity in differentiating and mature phloem cells of *Nicotiana tabacum* and its relationship to phloem transport. **J. Ultr. Res., 44**:388-404.

_____ & _____ 1974 - A biochemical and cytochemical study of adenosine triphosphatase activity in the phloem of *Nicotiana tabacum*. **J. Cell Biol., 60**:221-235.

GILLEN, L.A.F., WONG, J.H.H. & BENEDICT, C.R. 1976 - Development of ribulose 1,5-diphosphate carboxylase in nonphotosynthetic endoperms of germinating castor beans. **Plant Physiol., 57**:589-593.

GIMENEZ-MARTIN, G., RISUEÑO, M.C. & SOGO, J.M. 1970 - Development of the vegetative cell in the pollen grain. **Cytologia, 35**:77-90.

GIORDANI, R. 1977 - Localisation ultrastructurale de l'activité peroxydasique lors du processus de perforation des parois au cours de la différenciation des laticifères articulés de *Lactuca sativa* L. **C. R. Acad. Sc. Paris, 285**:97-100.

_____ 1981 - Activités hidrolasiques impliquées dans le processus de dégradation pariétal durant la différenciation des laticifères articulés. **Biol. Cell.**, **40**:217-224.

GODFREY, P.P., LEMBRA, L. & COLEMAN, R. 1982 - Effects of colchicine and vinblastine on output of proteins into bile. **Biochem. J.**, **208**:153-157.

GODWIN, H. 1968 - The origin of the exine. **New Phytol.**, **67**:667-676.

_____, ECHLIN, P. & CHAPMAN, B. 1967 - The development of the pollen grain wall in *Ipomoea purpurea* (L.) Roth. **Rev. Palaeob. Palynol.**, **3**:181-195.

GOEBEL, K. Citado por Vasil, I., 1967.

GOFF, C.W. 1975 - A light and electron microscopic study of peroxidase localization in the onion root tips. **Amer. J. Bot.**, **62**:280-291.

GOLDBERG, B. & GREEN, H. 1964 - An analysis of collagen secretion by established mouse fibroblast lines. **J. Cell Biol.**, **22**:227-258.

GOLDFISCHER, S., ESSNER, E. & NOVIKOFF, A.B. 1964 - The localization of phosphatase activities at the level of ultrastructure. **J. Histochem. Cytochem.**, **12**:72-95.

GONZALEZ, E. & DELSOL, M.A. 1981 - Induction of glyconeogenic enzymes by gibberellin A_3 in endosperm of castor bean seedlings. **Plant Physiol.**, **67**:550-554.

GOOD, B.H. & CHAPMAN, R.L. 1978 - The ultrastructure of *Phycopeltis* (Chroolepidaceae: Chlorophyta). I. Sporopollenin in the cell wall. **Amer. J. Bot.**, **65**:27-33.

GOODWIN, T.W. 1961 - Biosynthesis and function of carotenoids. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, **12**:219-244.

GORI, P. 1982 - Accumulation of polysaccharides in the anther cavity of *Allium sativum*, clone *Piemonte*. **J. Ultr. Res.**, **81**:158-162.

_____ 1983 - Ultrastructural changes in the wall of the sporogenous cells in *Allium sativum*, clone *Piemonte* during microsporogenesis. **Ann. Bot.**, **51**:139-143.

_____ & FERRI, S. 1982 - Ultrastructural study of the microspore development in *Allium sativum* cl. *Piemonte*. **J. Ultr. Res.**, **79**:341-349.

GRAYBOSCH, R.A. & PALMER, R.G. 1985 - Male sterility in soybean (*Glycine max*). I. Phenotypic expression of the msz mutant. **Amer. J. Bot.**, **72**:1738-1750.

GREEN, T.R., DENNIS, D.T. & WEST, C.A. 1975 - Compartmentation of isopentenyl pyrophosphate isomerase and prenyl transferase in developing castor bean endosperm. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, **64**:976-982.

GREGOR, H.D. 1974 - Einfluß von Gibberellinsaure (GA_3) auf die PAL- Aktivitat und die Synthese von phenylpropanderivaten in Zellkulturen von *Haplopappus gracilis*. **Protoplasma**, **80**:273-277.

GREYSON, R.I. & TEPFER, S.S. 1967 - Emasculation effects on the stamen filament of *Nigella hispanica* and their partial reversal by gibberellic acid. **Amer. J. Bot.**, **54**:971-976.

_____, WALDEN, D.B. & CHENG, P.C. 1980 - LM, TEM and SEM observations of anther development in the genic male-sterile (ms 9) mutant of corn *Zea mays*. **Can. J. Genet. Cytol.**, **22**:153-166.

GRUMBACH, K.H. & FORN, B. 1980 - Chloroplast autonomy in acetyl-coenzyme-A formation and terpenoid biosynthesis. **Z. Naturforsch.**, **35c**:645-648.

GUEDES, M. 1982 - Exine stratification, ectexine structure and angiosperm evolution. **Grana**, **21**:161-170.

GUERIN, P. 1924 - Citado por Sankara Rao, K. & Chinnappa, C.C. 1983.

GULLVAG, B.M. 1966 - The fine structure of some Gymnosperm pollen walls. **Grana**, **6**:435-475.

_____ 1970 - Release of nuclear material during the development of *Lycopodium annotinum* L. spores. A possible method for transfer of genetic information from nucleus to wall during intine morphogenesis. **Grana**, **10**:31-34.

GUILLIERMOND, A. 1920.Citado por Heslop-Harrison J., 1971 c.

_____ 1924. Citado por Heslop-Harrison J., 1971 c.

GUNNING, B.E.S. 1965 - The fine-structure of chloroplast stroma following aldehyde - osmium tetroxide fixation. **J. Cell Biol.**, **24**:79-93.

_____, STEER, M.W. & COCHRANE, M.P. 1968 - Occurrence, molecular structure and induced function of the "stromacentre" in plastids. **J. Cell Sci.**, **3**:445-456.

GUPTA, S.C. & NANDA, K. 1978 a - Studies in the Bignoniaceæ. I. Ontogeny of dimorphic tapetum in *Pyrostegia*. **Amer. J. Bot.**, **65**:395-399.

_____ & _____ 1978 b - Ontogeny and histochemistry of dimorphic tapetum in *Tecoma stans* anthers. **Bull. Soc. bot. Fr., Actualités Botaniques, 125(1-2)**:129-134.

_____ & _____ 1983 - Development of tapes in the pollen exine of *Ipomoea* (Convolvulaceæ). **Grana, 22**:141-146.

GUSTAFSSON, M.K.S. 1968 - Effect of colchicine on DNA synthesis in plerocercoids of *Diphyllobothrium dendriticum*. **Expti. Cell Res., 50**:1-8.

HADDON, L. & NORTHCOTE, D.H. 1976 - The influence of gibberellic acid and abscisic acid on cell and tissue diferentiation of bean callus. **J. Cell Sci., 20**:47-55.

HADEK, R. & SWIFT, H. 1962 - Nuclear extrusion and intracisternal inclusions in the rabbit blastocyst. **J. Cell Biol., 13**:445-451.

HALL, J.L. 1969 - Localization of cell surface adenosine triphosphatase activity in maize roots. **Planta, 85**:105-107.

_____ 1977 - Fine structural and cytochemical changes occurring in beet discs in response to washing. **New Phytol., 79**:559-566.

_____ & DAVIE, C.A.M. 1975 - Fine structure and localization of adenosine triphosphatase in the halophyte *Suaeda maritima*. **Protoplasma, 83**:209-216.

_____, BROWNING, A.J. & HARVEY, D.M.R. 1980 - The validity of the lead precipitation technique for the localization of ATPase activity in plant cells. **Protoplasma, 104**:193-200.

_____ & SEXTON, R. 1972 - Cytochemical localization of peroxidase activity in root cells. **Planta, 108**:103-120.

_____ & _____ 1974 - Fine structure and cytochemistry of the abscission zone cells of *Phaseolus* leaves. II. Localization of peroxidase and acid phosphatase in the separation zone cells . **Ann. Bot., 38**:855-858.

HAMMOND, C.T. & MAHLBERG, P.G. 1978 - Ultrastructural development of capitate glandular hairs of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceæ). **Amer. J. Bot., 65**:140-151.

HANDA, A.K. & JOHRI, M.M. 1976 - Cell differentiation by 3',5'-cyclic AMP in a lower plant. **Nature, 259**:480-482.

_____ & _____ 1977 - Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in moss protonema. A comparison of its levels by protein kinase and Gilman assays. **Plant Physiol., 59**:490-496.

HANZELEY, L. & VIGIL, E.L. 1975 - Fine structural and cytochemical analysis of phragmosomes (microbodies) during cytokinesis in *Allium* root tip cells. **Protoplasma, 86**:269-277.

HARA, A., YAMASHITA, H. & KOBAYASHI, A. 1977 - Isolation of a polysaccharide from the inner cell wall, intine, of pollen of *Cryptomeria japonica* . **Plant & Cell Physiol., 18**:381-386.

HARCHE, M. 1984 - Origine et différenciation des fibres sous-épidermiques de la feuille d'alfa (*Stipa tenacissima* L.). **Ann. Sc. Natur., Bot., Paris, 13 eme Série, 6**:207-226.

HAYAT, M. A. 1973 - Specimen preparation. In "**Electron Microscopy of Enzymes. Principles and Methods. Vol. I**" pag.1-43. Ed. M. A. Hayat. Van Nostrand Reinhold Comp., New York, London.

_____ 1981 - **Fixation for Electron Microscopy**. Academic Press, Inc. (London) Ltd.

HEATH, I.B. 1975 - The effect of antimicrotubule agents on the growth and ultrastructure of the fungus *Saprolegnia ferax* and their ineffectiveness in disrupting hyphal microtubules. **Protoplasma, 85**:147-176.

HEBER, U. 1974 - Metabolite exchange between chloroplasts and cytoplasm. **Ann. Rev. Plant Physiol., 25**:393-421.

_____ & HELDT, H.W. 1981 - The chloroplast envelope: structure, function and role in leaf metabolism. **Ann. Rev. Plant Physiol., 32**:139-168.

_____ & WILLENBRINK, J. 1964 - Sites of synthesis and transport of photosynthetic products within the leaf cell. **Biochem. Biophys. Acta, 82**:313-324.

HECKMAN, C.A. 1970 - Spore wall structure in the Jungermanniales. **Grana, 10**:109-119.

HEDDEN, P., MAcMILLAN, J. & PHINNEY, B.O. 1978 - The metabolism of gibberellins. **Ann. Rev. Plant Physiol., 29**:149-192.

HEDGE, R.R. & ANDRADE, L. 1982/83 - Anther development in *Datura* : distribution of proteins, esterase and adenosine triphosphatase. **Plant Sci. Let., 28**:95-101.

HELDT, H.W., CHON, C.J., MARONDE, D., HEROLD, A., STANKOVIC, Z.S., WALKER, D.A., KRAMINER, A., KIRK, M.R. & HEBER, U. 1977 - Role of ortophosphate and other factors in the regulation of starch formation in leaves and isolated chloroplasts. **Plant Physiol., 59**:1146-1155.

_____ & SAUER, F. 1971 - The inner membrane of the chloroplast envelope as the site of specific metabolite transport. **Biochem. Biophys. Acta, 234**:83-91.

HENDRIX, D.L. & KENNEDY, R.M. 1977 - Adenosine triphosphatase from soybean callus and root cells. **Plant Physiol., 59**:264-267.

HENRY, E. W. 1975 a - Polyphenol oxidase activity in thylakoid and membrane-bound granular components of *Nicotiana tabacum* chloroplasts. **J. Microscopie, 22**:109-116.

_____ 1975 b - Peroxidases in tobacco zone tissue. III. Ultrastructural localization in thylakoids and membrane-bound bodies of chloroplasts. **J. Ultr. Res., 52**:289-299.

_____ 1975 c - Peroxidases in tobacco abscission zone tissue. IV. Fine structural localization in endoplasmic reticula during ethylene-induced abscission. **Caryologia, 28**:477-487.

_____ & JENSEN, T.E. 1973 - Peroxidases in tobacco abscission zone tissue. I. Fine-structural localization in cell walls during ethylene-induced abscission. **J. Cell Sci., 13**:591-601.

HEPLER, P. K. & JACKSON, W. T. 1969 - Isopropyl N-phenylcarbamate effects spindle microtubule orientation in dividing endosperm cells of *Haemanthus katherinæ* Baker. **J. Cell Sci., 5**:727-743.

HERD, Y.R. & STEER, M.W. 1984 - Microsporogenesis in genic male-sterile lines of barley (*Hordeum vulgare*). **Can. J. Bot., 62**:1127-1135.

HERDT, E., SUTFELD, R. & WIERMANN, R. 1978 - The occurrence of enzymes involved in phenylpropanoid metabolism in the tapetum fraction of anthers. **Cytobiologie, 17**:433-441.

_____ & WIERMANN, R. 1978 - Die subzellulare Lokalisation von Enzymen des Phenylpropanoidstoffwechsels im Antherentapetum : Phenylalanin-ammonium-lyase, Zimtsaure 4-Hydroxylase, SAM: Kaffeesaure 3-0-Methyltransferase. **Protoplasma, 96**:283-292

HERICH, R. & LUX, A. 1985 - Lytic activity of Ubisch bodies (orbicles). **Cytologia, 50**:563-569.

HEROLD, A. Starch synthesis from exogenous sugars in tobacco leaf discs. **J. Exp. Bot., 29**:1391-1401.

HESLOP-HARRISON, J. 1962 - Origin of exine. **Nature, 195**:1069-1071.

_____ 1963 a - Ultrastructural aspects of differentiation in sporogenous tissue. **Symp. Soc. Exp. Biol., 17**:315-340.

_____ 1963 b - An ultrastructural study of pollen wall ontogeny in *Silene pendula*. **Grana, 4**:7-24.

_____ 1964 - Cell walls, cell membranes and protoplasmic connections during meiosis and pollen development. In "**Pollen: Physiology and Fertilization**" pag. 39-47. Ed. H. F. Linskens. North-Holland Publishing Comp. Amsterdam.

_____ 1966 a - Cytoplasmic connections between angiosperm meiocytes. **Ann. Bot., 30**:221-230.

_____ 1966 b - Continuités cytoplasmiques au cours de la formation des spores chez les plantes à fleurs. **Endeavour, 25**:65-72.

_____ 1968 a - Anther carotenoids and the synthesis of sporopollenin. **Nature, 220**:605.

_____ 1968 b - Pollen wall development. **Science, 161**:230-237.

_____ 1968 c - Some fine structural features of intine growth in the young microspore of *Lilium henryi*. **Portugalia Acta Biologica, Série A, 10**:235-246.

_____ 1968 d - Wall development within the microspore tetrad of *Lilium longiflorum*. **Can. J. Bot., 46**:1185-1192.

_____ 1968 e - Tapetal origin of pollen-coat substances in *Lilium*. **New Phytol., 67**:779-786.

_____ 1969 - An acetolysis-resistant membrane investing tapetum and sporogenous tissue in the anthers of certain Compositæ. **Can. J. Bot., 47**:541-542.

_____ 1971 a - Sporopollenin in the biological context. In "**Sporopollenin**" pag. 1-30. Ed. J. Brooks, P. R. Grant, M. Muir, P. van Gijzel & G. Shaw. Academic Press, London.

_____ 1971 b - The pollen wall : structure and development. In "**Pollen: Development and Physiology**" pag. 75-98. Ed. J. Heslop-Harrison. Butterworths, London.

_____ 1971 c - The cytoplasm and its organelles during meiosis. In "**Pollen: Development and Physiology**" pag. 16-31. Ed. J. Heslop-Harrison. Butterworths, London.

_____ 1971 d - Wall pattern formation in Angiosperm microsporogenesis. **Symp. Soc. Exp. Biol., 25**:277-300.

_____ 1975 - The physiology of the pollen grain surface. **Proc. R. Soc. Lond. B., 190**:275-299.

_____ 1976 - The adaptive significance of the exine. In "**The evolutionary significance of the exine**" pag. 27-38. Ed. J. K. Ferguson & J. Muller. Academic Press, London.

_____ 1979 - Aspects of the structure, cytochemistry and germination of the pollen of rye (*Secale cereale* L.). **Ann. Bot., 44** (Supl. 1):1-47.

_____ & DICKINSON, H.G. 1969 - Time relationships of sporopollenin synthesis associated with tapetum and microspores in *Lilium*. **Planta, 84**:199-214.

_____ & HESLOP-HARRISON, Y. 1980 - Cytochemistry and function of the Zwischenkorper in grass pollen. **Pollen et Spores, XXII**:5-10.

_____, _____, KNOX, R. B. & HOWLETT,B. 1973 - Pollen-wall proteins :"gametophytic" and "sporophytic" fractions in the pollen walls of the Malvaceæ. **Ann. Bot., 37**:403-412.

_____, KNOX, R. B. & HESLOP-HARRISON, Y. 1974 - Pollen wall proteins: exine -held fractions associated with incompatibility response in Cruciferæ. **Theor. Appl. Genet., 44**:133-137.

_____, _____, _____ & MATTSSON, O. 1975 - Pollen-wall proteins : emission and role in incompatibility responses. In "**The Biology of the male gamete**" **Biol. J. Linn. Soc., 7**.Suppl. 1:189-202. Ed. J.G. Duckett & P. A. Racey.

_____ & MACKENZIE, A. 1967 - Autoradiography of soluble [2-^{14}C] thymidine derivatives during meiosis and microsporogenesis in *Lilium* anthers. **J. Cell. Sci., 2**:387-400.

HESLOP-HARRISON, Y. & HESLOP-HARRISON, J. 1982 - The microfibrillar component of the pollen intine : some structural features. **Ann. Bot., 50**:831-842.

HESSE, M. 1985 - Hemispheric surface processes of exine and orbicules in *Calluna* (Ericaceæ). **Grana, 24**:93-98.

HIDEUX, M. & ABADIE, M. 1980-1981 - The anther of *Saxifraga cymbalaria* L. ssp. *huetiana* (Boiss.) Engl. and Irmsch : A study by electron microscopy (SEM and TEM). 3. Dynamics of the relationships between tapetal and sporal cells. **Ann. Sci. Nat. Bot., 2/3**:27-37.

_____ & _____ 1985 - Cytologie ultrastructurale de l'anthère de *Saxifraga*. I. Période d'initiation des précurseurs des sporopollénines au niveaux des principaux types exiniques. **Can. J. Bot., 63**:97-112.

HIGGINS, T.J.V., GOODWIN, P.B. & CARR, D.J. 1974 - The induction of nitrate reductase in mung bean seedlings. **Aust. J. Plant Physiol., 1**:1-8.

HILTON, G.M. & NESIUS, K.K. 1978 - Localization of adenylate cyclase in meristems of young pea hypocotyls. **Physiol. Plant., 42**:49-52.

HINCHMAN, R.R. 1972 - The ultrastructural morphology and ontogeny of oat coleoptile plastids. **Amer. J. Bot., 59**:805-817.

HINDERER, W., PETERSEN, M. & SEITZ, H.U. 1984 - Inhibition of flavonoid biosynthesis by gibberellic acid in cell suspension cultures of *Daucus carota* L. **Planta, 160**:544-549.

HIRAI, K.I. 1968. Citado por Sexton, R. & Hall, J. L., 1978.

HIURA, M. & FUJITA, H. 1977 - Cytochemical localization of adenylate cyclase activity in the theca folliculi of the mouse Graafian follicle. **Histochemistry, 51**:321-326.

HO, L. C. & NICHOLS, R. 1975 - The role of phloem transport in the translocation of sucrose along the stem of carnation cut flowers. **Ann. Bot., 39**:439-446.

HODGES, T.K. 1976 - ATPases associated with membranes of plant cells. In "**Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 2 Part A**" pag. 260-283. Ed. U. Luttge & M. G. Pitman. Springer Verlag, New York.

HOEFERT, L.L. 1969 - Ultrastructure of *Beta* pollen. I. Cytoplasmic constituints. **Amer. J. Bot., 56**:363-368.

_____ 1971 - Ultrastructure of tapetal cell ontogeny in *Beta*. **Protoplasma, 73**:397-406.

_____ 1975 - Tubules in dilated cisternae of endoplasmic reticulum of *Thlaspi arvense* (Cruciferæ). **Amer. J. Bot., 62**:756-760.

_____ & ESAU, K. 1975 - Plastid inclusions in epidermal cells of *Beta*. **Amer. J. Bot., 62**:36-40.

HOLLEYHEAD, R. 1972. Citado por Brooks, J. & Shaw, G., 1977.

HORNER, H.T.Jr. 1977 - A comparative light- and electron-microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male-sterile sunflower (*Helianthus annuus*). **Amer. J. Bot., 64**:745-759.

_____ & LERSTEN, N.R. 1971 - Microsporogenesis in *Citrus limon* (Rutaceæ). **Amer. J. Bot., 58**:72-79.

_____ , _____ & BOWEN, C.C. 1966 - Spore development in the liverworth *Riccardia pinguis*. **Amer. J. Bot., 53** :1048-1064.

_____ & PEARSON, C.B. 1978 - Pollen wall and aperture development in *Helianthus annuus* (Compositæ : Heliantheæ). **Amer. J. Bot., 65**:293-309.

_____ & ROGERS, M.A. 1974 - A comparative light and electron microscope study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male-sterile pepper (*Capsicum annuum*). **Can. J. Bot., 52**:435-441.

HORVAT, F. 1966 - Contribution à la connaissance de l'ultrastructure des parois du pollen de *Tradescantia paludosa* L. **Grana, 6**:416-434.

_____ 1969 - Localisation en microscopie électronique, de la phosphatase acide dans l'intine de la microspore,chez *Tradescantia paludosa* A. et W. **Grana, 9**:16-33.

HOTTA, Y., BENNETT, M. D., TOLEDO, L. A. & STERN, H. 1979 - Regulation of R-protein and endonuclease activities in meiocytes by homologous chromosome pairing. **Chromosoma (Berl.), 72**:191-201.

HOWLETT, B.J., KNOX, R.B. & HESLOP-HARRISON, J. 1973 - Pollen-wall proteins: release of the allergen antigen E from intine and exine sites in pollen grains of ragweed and *Cosmos*. **J. Cell Sci., 13**:603-619.

HOWELL, S.L. & WHITFIELD, M. 1972 - Cytochemical localization of adenylate cyclase activity in rat islets of Langerhans. **J. Histochem. Cytochem., 20**:873-879.

HRABETOVA, E. & TUPY, J. 1964 - The growth effect of some sugars and their metabolism in pollen tubes. In "**Pollen : Physiology and Fertilization**" pag.95-101 Ed. H. F. Linskens.North-Holland Publishing Comp., Amsterdam.

HURKMAN, W.J. & KENNEDY, G.S. 1976 - Fine structure and development of proteoplasts in primary leaves of mung bean. **Protoplasma, 89**:171-184.

_____ & _____ 1977 - Development and cytochemistry of the thylakoidal body in tobacco chloroplasts. **Amer. J. Bot., 64**:86-95.

IIJIMA, M. 1962 - A comparative study on tapetum. **Cytologia, 27**:375-385.

IZHAR, S. & FRANKEL, R. 1971 - Mechanism of male sterility in *Petunia* :the relationship between pH, callase activity in the anthers, and the breakdown of the microsporogenesis. **Theor. Appl. Genet., 41**:104-108.

JACQMARD, A. 1978 - Histochemical localization of enzyme activity during floral evocation in the shoot apical meristem of *Sinapsis alba*. **Protoplasma, 94**: 315-324.

JEFFREY, C. 1964 - A note on pollen morphology in Cucurbitaceæ. **Kew Bull., 17**:473-477.

JEFFS, R.A. & NORTHCOTE, D.H. 1967 - The influence of indol-3yl acetic acid and sugar on the pattern of induced differentiation in plant tissue culture. **J. Cell. Sci., 2**:77 88.

JENNER, C.F. 1974 - An investigation of the association between the hydrolysis of sucrose and its absorption by grains of wheat. **Aust. J. Plant Physiol. 1**:319-329.

_____ 1982 - Storage of starch. **Encyclopedia of Plant Physiology. New Series, Vol 13A** pag. 700-747. Ed. F. A. Loewus & W. Tanner. Springer-Verlag, Berlin.

_____ & RATHJEN, A.J. 1972 a - Factors limiting the supply of sucrose to the developing wheat grain. **Ann. Bot., 36**:729-741.

_____ & _____ 1972 b - Limitations to the accumulation of starch in the developing wheat grain. **Ann. Bot., 36**:743-754.

_____ & _____ 1975 - Factors regulating the accumulation of starch in ripening wheat grain. **Aust. J. Plant Physiol., 2**: 311-322.

JENSEN, W.A. 1965 - The composition and ultrastructure in the nucellus in cotton. **J. Ultr. Res., 13**:112-128.

JOEL, D.M. & FAHN, A. 1980 a - Ultrastructure of the resin ducts of *Mangifera indica* L. (Anacardiaceæ). 1. Differentiation and senescence of the shoot ducts. **Ann. Bot., 46**:225-233.

_____ & _____ 1980 b - Ultrastructure of the resin ducts of *Mangifera indica* L. (Anacardiaceæ). 2. Resin secretion in the primary stem ducts. **Ann. Bot., 46**:779-783.

JONES, R.L. 1969 a - Gibberellic acid and the fine structure of barley aleurone cells. I. Changes during the lag-phase of α-amylase synthesis. **Planta, 87**:119-133.

_____ 1969 b - Gibberellic acid and the fine structure of barley aleurone cells. II. Changes during the synthesis and secretion of α-amylase. **Planta, 88**:73-86.

_____ 1973 - Gibberellins: their physiological role. **Ann. Rev. Plant Physiol., 24** :571-598.

_____ & Price, J.M. 1970 - Gibberellic acid and the fine structure of barley aleurone cells. III. Vacuolation of the aleurone cell during the phase of ribonuclease release. **Planta, 94**:191-202.

JORDAN, E.G. & LUCK, B.T. 1976 - The nucleolus organizer and the synaptonemal complex in *Endymion non-scriptus* (L.). **J. Cell Sci., 22**:75-86.

JØRGENSEN, L.B., BEHNKE, H.-D. & MABRY, T.J. 1977 - Protein-accumulating cells and dilated cisternæ of the endoplasmic reticulum in three glucosinolate-containing genera: *Armoracia, Capparis, Drypetes*. **Planta, 137**:215-224.

JOSHI, P.A., STEWART, J.McD. & GRAHAM, E.T. 1985 - Localization of ß-glycerophosphatase activity in cotton fiber during differentiation. **Protoplasma, 125**:75-85.

JOST, J-P. & RICKENBERG, H.V. 1971 - Cyclic AMP. **Ann. Rev. Biochem., 40**:741-774.

JUNGALWALA, F.B. & CAMA, H.R. 1962 - Carotenoids in *Delonix regia* (Gul Mohr) flower. **Biochem. J., 85**:1-8.

JUSAITIS, M., PALEG, L.G. & ASPINALL, D. 1981 - Effects of temperature and gibberellic acid on phospholipid composition of *Avena sativa* stem segments. **Phytochemistry, 20**:1529-1538.

_____, _____ & _____ 1982 - The influence of gibberellic acid and temperature on the growth rate of *Avena sativa* stem segments. **Plant Physiol., 70**:532-539.

KAMIENSKA, A., DURLEY, R.C. & PHARIS, R.P. 1976 a - Isolation of gibberellins A_3, A_4 and A_7 from *Pinus attenuata* pollen. **Phytochemistry, 15**:421-424.

_____, _____ & _____ 1976 b - Endogenous gibberellins of pine pollen. III. Conversion of 1,2-[^{3}H] GA_4 to gibberellins A_1 and A_{34} in germinating pollen of *Pinus attenuata* Lemm. **Plant Physiol., 58**:68-70.

_____ & PHARIS, R.P. 1975 - Endogenous gibberellins of pine pollen. II. Changes during germination of *Pinus attenuata, P. coulteri* and *P. ponderosa* pollen. **Plant Physiol., 56**:655-659.

KAMIZYO, A. & TANAKA, N. 1982- Studies on the generative nuclear division. IV. Effect of sucrose in the artificial medium on the generative nuclear division in *Tradescantia paludosa*. **Cytologia, 47**:207-217.

KASAMO, K. 1986 - Purification and properties of the plasma membrane H^+-translocating adenosine triphosphatase of *Phaseolus mungo* L. roots. **Plant Physiol., 80**:818-824.

KATSUMATA, T., TAKAHASHI, N. & EJIRI, S-I. 1978 - Changes of cyclic AMP level and adenylate cyclase activity during germination of pine pollen. **Agric. Biol. Chem., 42**:2161-2162.

KATSUMI, M., KAZAMA, H., YAMADA, J. & MATSUMURA, M. 1982 - Gibberellin-induced suppression of chloroplast starch formation from exogenous sucrose in isolated epidermis of light-grown cucumber hypocotyls. **Plant & Cell Physiol., 23**:953-958.

KAUFMAN, P.B., PETERING, L.B. & ADAMS, P.A. 1969 - Regulation of growth and cellular differentiation in developing *Avena* internodes by gibberellic acid and indole-3-acetic acid. **Amer J. Bot., 56**:918-927.

KAWASHIMA, N. & WILDMAN, S.G. 1970 - Fraction I protein. **Ann. Rev. Plant Physiol., 21**:325-358.

KAZAMA, H. & KATSUMI, M. 1983 - Gibberellin-induced changes in the water absorption, osmotic potential and starch content of cucumber hypocotyls. **Plant & Cell Physiol., 24**:1209-1216.

_____ & _____ 1984 - Gibberellin-induced changes in starch content in isolated chloroplasts of light grown cucumber hypocotyls. **Plant & Cell Physiol., 25**:1095-1098.

KELLER, W.A., RAJHATHY, T. & LACAPRA, J. 1975 - *In vitro* production of plants from pollen in *Brassica campestris*.**Can. J. Genet. Cytol., 17**:655-666.

KEMPEN, H.J.M., DE PONT, J.J.H.H.M., BONTING,S.L. & STADHOUDERS, A.M. 1978 - The cytochemical localization of adenylate cyclase: fact or artifact? **J. Histochem. Cytochem., 26**:298-312.

KERAUDREN-AYMONIN, M., STRAKA, H. & SIMON, A. 1969 - Palynologia Madagassica et Mascarenica. **Pollen et Spores, 11**:299-332.

KESSEL, R.G. 1968 - Annulate lamellae. **J. Ultr. Res., Suppl., 10**:5-82.

KESSLER, B. & LEVINSTEIN, R. 1974 - Adenosine 3'5'-cyclic monophosphate in higher plants: assay, distribution and age-dependency. **Biochim. Biophys. Acta, 343**:156-166.

KHERA, P.K. & TILNEY-BASSETT, R.A.E. 1976 a - Fine structural observations of embryo development in *Pelargonium* X *Hortorum* Bailey: with normal and mutant plastids. **Protoplasma, 88**:7-23.

_____ & _____ 1976 b. Fine structural observations of the cotyledons in germinating seeds of *Pelargonium* X *Hortorum* Bailey: with normal and mutant plastids. **Protoplasma, 88**:201-214.

KIRK, J.T.O. & TILNEY-BASSETT, A.E. 1978 - **The plastids. Their chemistry,structure, growth and inheritance**. Elsevier/North Holland Biomedical Press.Revised second edition. Amsterdam.

KISLEV, N. SWIFT, H. & BOGORAD, L. 1965 - Nucleic acids of chloroplasts and mitochondria in swiss chard. **J. Cell Biol., 25**:327-344.

KLEINEHOLLENHORST, G., BEHRENS, H., PEGELS, G., SRUNK, N. & WIERMANN, R. 1982 - Formation of flavonol-3-0-diglycosides and flavonal-3-0-triglycosides by enzyme extracts from anthers of *Tulipa* cr. Apeldoorn. **Z. Naturforsch., 37c**:587-599.

KLEINIG, H. & BEYER, P. 1985 - Carotene synthesis in spinach (*Spinacia oleracea* L.) chloroplasts and daffodil (*Narcissus pseudonarcissus* L.) chromoplasts. In "**Methods in Enzymology**", **vol. 110, Part A**, pag. 267-273. Ed. J.H.Law & H.C.Rilling. Academic Press, New York.

KNOTH, von R. 1975 - Struktur und Funktion der genetischen information in den Plastiden. XIV. Die Auswirkungen der Plastommutationen en: alba-1 von *Antirrhinum majus* und en: gilva-1 von *Pelargonium zonale* auf die Feinstruktur der Plastiden. **Biol. Zbl., 94**:681-694.

KNOX, R.B. 1971 - Pollen-wall proteins:localization, enzymic and antigenic activity during development in *Gladiolus* (Iridaceæ). **J. Cell Sci., 9**:209-237.

_____, DICKINSON, H.G. & HESLOP-HARRISON, J. 1970 - Cytochemical observations on changes in RNA content and acid phosphatase activity during the meiotic prophase in the anther of *Cosmos bipinnatus* Car. **Acta Bot. Neerl., 19**:1-6.

_____, _____ & _____ 1971 - Cytoplasmic RNA and enzyme activity during the meiotic prophase in *Cosmos bipinnatus* . In "**Pollen: Development and Physiology**" pag. 32-35. Ed. J. Heslop-Harrison. Butterworths, London.

_____ & HESLOP-HARRISON, J. 1969 - Cytochemical localization of enzymes in the wall of the pollen grain. **Nature, 223**:92-94.

_____ & _____ 1970 - Pollen-wall proteins: localization and enzymic activity. **J. Cell Sci., 6**:1-27.

_____ & _____ 1971 a - Pollen-wall proteins: electron microscopic localization of acid phosphatase in the intine of *Crocus vernus*. **J. Cell Sci., 8**:727-733.

_____ & _____ 1971 b - Pollen-wall proteins: the fate of intine-held antigens on the stigma in compatible and incompatible pollinations of *Phalaris tuberosa* L. **J. Cell Sci., 9**:239-251.

_____ , _____ & HESLOP-HARRISON, Y. 1975 - Pollen-wall proteins: localization and characterization of gametophytic and sporophytic fractions. In "**The biology of the male gamete**" **Biol. J. Linn. Soc. 7 suppl. 1**:177-187. Ed. J.G. Duckett & P.A. Racey.

KNUDSON, C., STEMBERGER, B.H. & PATTON, S. 1978 - Effects of colchicine on ultrastructure of the lactating mammary cell: membrane involvement and stress of the Golgi apparatus. **Cell Tiss. Res., 195**:169-181.

KOCHBA, J., BUTTON, J., SPIEGEL-ROY, P., BORNMAN, C.H. & KOCHBA, M. 1974 - Stimulation of rooting of *Citrus* embryoids by gibberellic acid and adenine sulphate. **Ann. Bot., 38**:795-802.

KÖHLER, D. 1977 - Zellteilung und Zellstreckung unter dem Einfluß von Gibberellin-saure und Rotlicht bei Zwerg- und Normalerbsen (*Pisum sativum*). **Z. Pflanzenphysiol., 82**:125-136.

KONONOWICZ, H. & JANICK, J. 1984 - Response of embryogenic callus of *Theobroma cacao* L. to gibberellic acid and inhibitors of gibberellic acid synthesis. **Z. Pflanzenphysiol.**, 113:359-366.

KOPRIWA, B.M. 1967 - A semiautomatic instrument for the radioautoradiographic coating tecnhique. **J. Histochem. Cytochem., 14**:923-928.

KRESS, W.J. 1986 - The use of ethanolamine in the study of pollen wall stratification. **Grana, 25**:31-40.

_____ & STONE, D.E. 1982 - Nature of the sporoderm in monocotyledons, with special reference to the pollen grains of *Canna* and *Heliconia*. **Grana, 21**:129-148.

_____ & STONE, D.E. 1983 - Pollen intine structure, cytochemistry and formation and function in Monocots. In "**Pollen: biology and implications for plant breeding**" pag. 159-163. Ed. D.L. Mulcahy & E. Ottaviano. Elsevier Science Publishing, Co., Inc.

KRISHNA, G. & HARWOOD, J.P. 1972 - Requirement for guanosine triphosphate in the prostaglandin activation of adenylate cyclase of platelet membranes. **J. Biol. Chem., 247**:2253-2254.

KRISTEN, U. 1976 - Die Morphologie der Schleimsekretion im Fruchtknoten von *Aptenia cordifolia*. **Protoplasma, 89**:221-233.

_____ & BIEDERMANN, M. 1981 - Ultrastructure, origin and composition of the protein bodies in the ligule of *Isoetes lacustris*. **Ann. Bot., 48**:655-663.

KRJATCHENKO, D. 1925 - De l'activité des chondriosomes pendant le développement des grains de pollen dans *Lilium croceum* Chaix.. **Rev. Gen. Bot., 37**:193-211.

KRUATRACHUE, M. & EVERT, R.F. 1974 - Structure and development of sieve elements in the leaf of *Isoetes muricata*. **Amer. J. Bot., 61**:253-266.

KUNST, L.K. & WRISCHER, M. 1984 - Adaptation changes of plastids in the leaves of *Ligustrum ovalifolium* Hassk. var. *aureum* at different light intentities. **Protoplasma, 123**:132-137.

KUPILA-AHVENNIEMI, S., PIHAKASKI, S. & PIHAKASKI, K. 1978 - Wintertime changes in the ultrastructure and metabolism of the microsporangiate strobili of the scotch pine. **Planta, 144**:19-29.

KUROSAWA, E., 1926 - Citado por Crozier, A.1981.

KUZMICH, M.J. & ZIMMERMAN, A.M. 1972 - Colcemid action on the division schedule of synchonized *Tetrahymena*. **Expit. Cell Res., 72**:441-452.

LaCOUR, L.F. & WELLS,B. 1975 - The nucleolus at prophase of meiosis in three plants: an ultrastructural study. **Proc. R. Soc. Lond. B., 191**:231-243.

LANG, A. 1970 - Gibberellins: structure and metabolism. **Ann. Rev. Plant Physiol., 21**:537-570.

LARSON, D.A. 1965 - Fine-structural changes in the cytoplasm of germinating pollen. **Amer. J. Bot., 52**:139-154.

_____ & LEWIS, C.W.Jr. 1961 - Fine structure of *Parkinsonia aculeata* pollen. I.The pollen wall. **Amer. J. Bot., 48**:934-943.

_____ & _____ 1962 - Pollen wall development in *Parkinsonia aculeata*. **Grana, 3**:21-27.

_____ , SKVARLA, J.J. & LEWIS, C.W.Jr. 1962 - An electron microscope study of exine stratification and fine structure. **Pollen et Spores, 4**:233-246.

LARSSON, C., COLLIN, C. & ALBERTSSON, P-A. 1973 - The fine structure of chloroplast stroma crystals. **J. Ultr. Res., 45**:50-58.

LASER, K.D. & LERSTEN, N.R. 1972 - Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. **The Bot. Rev., 38**:425-454.

LEDBETTER, M.C. & PORTER, K.R. 1970 - **Introduction to the fine structure of plant cells**. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg.

LEE, R.E. & THOMPSON, A. 1973 - The stromacentre of plastids of *Kalanchoe pinnata* Persoon. **J. Ultr. Res., 42**:451-456.

LEE, S.L.J., GRACEN, V.E. & EARLE, E.D. 1979 - The cytology of pollen abortion in C-cytoplasmic male sterile corn anthers. **Amer. J. Bot., 66**:656-667.

_____ & WARMKE, H.E. 1979 - Organelle size and number in fertile and T-cytoplasmic male-sterile corn. **Amer. J. Bot., 66**:141-148.

LEHMANN, H., NEIDHART, H.V. & SCHLENKERMANN, G. 1984 - Ultrastructural investigations on sporogenesis in *Equisetum fluviatile*. **Protoplasma, 123**:38-47.

LEMAY, A. & JARETT, L. 1975 - Pitfalls in the use of lead nitrate for the histochemical demonstration of adenylate cyclase activity. **J. Cell Biol., 65**:39-50.

LENDZIAN, K. & SCHAFER, E. 1973 - Invertases of pollen of *Haemanthus albiflos*. **Phytochemistry, 12**:1227-1228.

LEONARD, R.T. & HOTCHKISS, C.W. 1976 - Cation-stimulated adenosine triphosphatase activity and cation transport in corn roots. **Plant Physiol., 58**:331-335.

LEPOUSÉ, J. 1970 - Étude des premiers stades des enveloppes des grains de pollen de Sapin. **C. R. Acad. Sc. Paris, 270**:2929-2931.

LESKES, A., SIEKEVITZ, P. & PALADE, G.E. 1971 - Differentiation of endoplasmic reticulum in hepatocytes. I.Glucose-6-phosphatase distribution in situ. **J. Cell Biol., 49**:264-287.

LEUNG, D.W. & THORPE, T.A. 1985 - Occurence of α-amylases in tobacco callus: some properties and relationships with callus induction and shoot primordium formation. **J. Plant Physiol., 117**:363-370.

LIAAEN-JENSEN, S. & JENSEN, A. 1971 - Quantitative determination of carotenoids in photosynthetic tissues. In "**Methods in Enzymology**", **Vol. 23 Part A** pag 586-602. Ed. A.San Prieto. Academic Press.

LIN, J., UWATE, W.J. & STALLMAN, V. 1977 - Ultrastructural localization of acid phosphatase in the pollen tube of *Prunus avium* L. (sweet cherry). **Planta, 135**:183-190.

LINSKENS, H.F. 1958. Citado por Stanley, R.G. & Linskens, H.F. 1974.

LINSKENS, H.F. & SCHRAUWEN J. 1968 - Quantitative nucleic acid determinations in the microspore and tapetum fractions of lily anthers. **Proc. K. ned. Acad. Wet. Sect. C, 71**:267-279.

LIU, T-T.Y. & SHANNON, J.C. 1981 - Measurement of metabolites associated with nonaqueously isolated starch granules from immature *Zea mays* L. endosperm. **Plant Physiol., 67**:525-529.

LOEWUS, F.A., BALDI, B.G., FRANCESCHI, V.R., MEINERT, L.D. & McCOLLUM, J.J. 1985 - Pollen sporoplasts: dissolution of pollen walls. **Plant Physiol., 78**:652-654.

LOMBARDO, G., BASSI, M. & GEROLA, F.M. 1970 -Mycoplasma development and cell alterations in white clover affected by clover dwarf. An electron microscopy study. **Protoplasma, 70**:61-71.

_____ & CARRARO, L. 1976 a - Tapetal ultrastructural changes during pollen development. I.Studies on *Antirrhinum maius*. **Caryologia, 29**:113-125.

_____ & _____ 1976 b - Tapetal ultrastructural changes during pollen development. II.Studies on *Pelargonium zonale* and *Kalanchöe obtusa*. **Caryologia, 29**:339-344.

LOOMIS, W.D. & BATTAILE, J. 1963 - Biosynthesis of terpenes. III.Mevalonic kinase from higher plants. **Biochim. Biophys. Acta, 67**:54-63.

LORD, E.M. 1980 - Physiological controls on the production of cleistogamous and chasmogamous flowers in *Lamium amplexicaule* L. **Ann. Bot., 44**:757-766.

LUCK, B.T. & JORDAN, E.G. 1977 - The nucleolus and meiosis during microsporogenesis in *Endymion non-scriptus* (L.). **J. Cell Sci., 25**:111-123.

_____ & _____ 1980 - The mitochondria and plastids during microsporogenesis in *Hyacinthoides non-scripta* (L.) Chouard. **Ann. Bot., 45**:511-514.

LUFT, J.H. 1956 - Permanganate - a new fixative for electron microscopy. **J. Biophys. Biochem. Cytol., 2**:799-801.

_____ 1961 - Improvements in epoxy resin embedding methods. **J. Biophys. Biochem. Cytol., 9**:409-412.

LUGARDON, B. 1976 - Sur la structure fine de l'exospore dans les divers groupes de Ptéridophytes actuelles (microspores et isospores).In "**The evolutionary significance of the exine**" pag 231-250. Ed. I.K. Ferguson & J. Muller. Academic Press, London.

LURIE, S. & HENDRIX, D.L. 1979 - Differential ion stimulation of plasmalemma adenosine triphosphatase from leaf epidermis and mesophyll of *Nicotiana rustica* L. **Plant Physiol., 63**:936-939.

MACKENZIE, A., HESLOP-HARRISON, J. & DICKINSON, H.G. 1967 - Elimination of ribosomes during meiotic prophase. **Nature, 215**:997-999.

MADJD, A. & ROLAND-HEYDACKER, F. 1978 - Sécrétions et dégénérescence des cellules du tapis dans l'anthère du *Soja hispida* Moench., Papilionaceæ. **Grana, 17**:167-174.

MAEDA, Y. 1984 - The presence and location of sporopollenin in fruiting bodies of the cellular slime molds. **J. Cell Sci., 66**:297-308.

MAHESHWARI, S.C., RASHID, A. & TYAGI, A.K. 1982 - Haploids from pollen grains - retrospect and prospect. **Amer. J. Bot., 69**:865-879.

_____ , TYAGI, A.K. & MALHOTRA, K. 1980 - Induction of haploidy from pollen grains in Angiosperms - the current status. **Theor. Appl. Genet., 58**:193-206.

MAHESWARI DEVI, H. 1962 . Citado por Sankara Rao, k. & Chinnappa, C.C. 1983.

_____ & LAKSHMINARAYANA, S.1977. Citado por Sankara Rao, k. & Chinnappa, C.C. 1983.

_____ & SATYANARAYANA, P. 1971. Citado por Sankara Rao, k. & Chinnappa, C.C.1983.

MALIK, C.P. & CHAWLA, J. 1983 - Effect of carbon dioxide on lipid metabolism in *Crotolaria juncea* pollen suspension culture. **Phytochemistry, 22**:297-298.

_____ & MEHAN, M. 1975 - Interaction between cycocel and gibberellic acid in pollen tube elongation of *Calotropis procera*. **Curr. Sci., 44**:785-786.

_____ TEWARI, H.B. & SOOD, P.P. 1969-1970 - On the functional significance of certain phosphatases in the germinating pollen grains of *Portulaca grandiflora*. **Portugalia Acta Biologica, Ser. A, 11**:245-252.

MALONE, C.P., BURKE, J.J. & HANSON, J.B. 1977 -Histochemical evidence for the occurrence of oligomycin-sensitive plasmalemma ATPase in corn roots. **Plant Physiol., 60**:916-922.

MANTHEY, A.E. & DICKINSON, D.B. 1978 -Metabolism of myo-inositol by germinating *Lilium longiflorum* pollen. **Plant Physiol., 61**:904-908.

_____ COOTE, M.A. & POSSINGHAM, J.V. 1979 - Membrane-bound plastid inclusions and chloroplast thylakoid formation in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Ann. Bot., 43**:191-196.

MARES, D., JEFFREY, C. & NORSTOG, K. 1976 - The differentiation of the modified aleurone of wheat endosperm : nuclear membrane-mediated endoplasmic reticulum development. **Plant Sci. Letters, 7**:305-311.

MARGULIS, L. 1973 - Colchicine sensitive microtubules. **Int. Rev. Cytol., 34**:333-361.

MARINOZZI, V. & GAUTIER, A. 1961 - Essais de cytochimie ultrastructurale. Du rôle de l'osmium réduit dans les "colorations" électroniques. **C. R. Acad. Sc. Paris, 253**:1180-1182.

MARQUARDT, H., BARTH, O.M. & von RAHDEN, U. 1968 -Zytophotometrisches und elektronenmikroskopische Beobachtungen über die Tapetumzellen in den Antheren von *Paeonia tenuifolia*. **Protoplasma, 65**:407-421.

MARRIOTT, K.M. & NORTHCOTE, D.H. 1975 - The induction of enzyme activity in the endosperm of germinating castor-bean seeds. **Biochem. J., 152**:65-70.

MARSOLAIS, A.A. & KASHA, K.J. 1985 - Callus induction from barley microspores. The role of sucrose and auxin in a barley anther culture medium. **Can. J. Bot., 63**:2209-2212.

MARTICORENA, C. 1963 - Material para una monografia de la morfologia del polen de Cucurbitaceæ. **Grana, 4**:78-91.

MARTIN, C. & NORTHCOTE, D.H. 1983 - The action of exogenous gibberellic acid on polysome formation and translation of mRNA in germinating castor-bean seeds. **Planta, 158**:16-26.

MARTIN, E.S. & LARBALESTIER, G. 1977 - A membrane-bound plastid inclusion in the epidermis of leaves of *Taraxacum officinale*. **Can. J. Bot., 55**:222-225.

MARTY, D. 1977 - Localisation ultra-structurale des sites d'activité des photosystèmes I et II dans les chloroplastes in situ. **C. R. Acad. Sc. Paris, 285**:27-30.

MARTY, F. 1970 a - Les peroxysomes (microbodies) des laticifères d'*Euphorbia characias* L. Une étude morphologique et cytochimique. **J. Microscopie, 9**:923-948.

_____ 1970 b - Rôle du système membranaire vacuolaire dans la différenciation des laticifères d'*Euphorbia characias* L. **C. R. Acad. Sc. Paris, 271**:2301-2304.

_____ 1972 - Distributions des activités phosphatasiques acides au cours du processus d'autophagie cellulaire dans les cellules du meristème radiculaire d'*Euphorbia characias* L. **C. R. Acad. Sc. Paris, 274**:206-209.

_____ 1973 - Mise en évidence d'un appareil provacuolaire et de son rôle dans l'autophagie cellulaire et l'origine des vacuoles. **C. R. Acad. Sc. Paris, 276**:1549-1552.

MARUYAMA, K. 1965 - Cyclic changes of the Golgi body during microsporogenesis in *Tradescantia paludosa*. **Cytologia, 30**:354-374.

_____ 1966 - Behavior of membrane system in the cell during cell divisions of microsporogenesis in *Tradescantia paludosa*. II. Meiosis. **Cytologia, 31**:237-256.

_____ 1968 - Electron microscopic observation of plastid and mitochondria during pollen development in *Tradescantia paludosa*. **Cytologia, 33**:482-497.

MASCARENHAS, J.P. 1975 - The biochemistry of angiosperm pollen development. **The Bot. Rev., 41**:259-313.

MATILE, Ph. 1975 - **The lytic compartment of plant cells. Cell Biology Monographs Vol. 1**. Springer Verlag, New York.

_____ & WIEMKEN, A. 1976 - Interactions between cytoplasm and vacuole. In "**Encyclopedia of Plant Physiology. New Series Vol. 3**" pag. 255-287. Ed. C.R. Stocking & U. Heber. Springer Verlag, Berlin.

MATTHYSSE, A.G. & SCOTT, T.K. 1984 - Functios of hormones at the whole plant level of organization. In "**Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Vol. 10**" pag. 219-243. Ed. T.K. Scott. Springer Verlag, Berlin.

MATTSSON, O. 1976 - The development of dimorphic pollen in *Tripogandra* (Commelinaceæ). In "**The evolutionary significance of the exine**" pag. 163-183. Ed. I.K. Ferguson & J. Muller. Academic Press, London.

McCONCHIE, C.A., KNOX, R.B., DUCKER, S.C. & PETTITT, J.M. 1982 - Pollen wall structure and cytochemistry in the seagrass *Amphibolis griffithii* (Cymodoceaceæ). **Ann. Bot., 50**:729-732.

McCOY, R.W. 1949.Citado por Sankara Rao, K. & Chinnappa, C.C. 1983.

McKEEL, D.W.Jr. & JARETT, L. 1974 - The enrichment of adenylate cyclase in the plasma membrane and Golgi subcellular fractions of porcine adenohypophysis. **J. Cell Biol., 62**:231-236.

McMILLAN, J. & SUTER, P.J. 1958. Citado por Crozier, A. 1981.

McQUADE, H.A. & YOUNG- ROTTLER, A.M. 1984 - Observations on premeiocytes of wheat. **Amer. J. Bot., 71**: 228-238.

MECHELKE, F. 1952 - Citado por Vasil, I.K. 1967.

MEDINA, F.J. & RISUEÑO, M.C. 1981 - Nucleolar structure and dynamics during meiotic prophase in pea ovules. **Biol. Cell., 42**:79-86

_____, _____ & RODRIGUEZ-GARCIA, M.I. 1981 - Evolution of the cytoplasmic organelles during female meiosis in *Pisum sativum* L. **Planta, 151**:215-225.

_____, _____, _____ & SANCHEZ-PINA, M.A. 1983 a - The nucleolar organizer (NOR) and fibrillar centres during plant gametogenesis. **J. Ultr. Res., 85**:300-310.

_____, _____ &MORENO DIAZ DE LA ESPINA, S. 1983 B - 3-D reconstruction and morphometry of fibrillar centres in plant cells in relation to nucleolar activity. **Biol. Cell., 48**:31-38.

MEIER, H. & REID, J.S.G. 1977 - Morphological aspects of the galactomannan formation in the endosperm of *Trigonella foenum-graecum* L. (Leguminosæ) **Planta, 133**:243-248.

MEPHAM, R.H. 1970 - Development of the pollen grain wall: further work with *Tradescantia bracteata*. **Protoplasma, 71**:39-54.

_____ & LANE, G.R. 1968 - Exine and the role of the tapetum in pollen development. **Nature, 219**:961-962.

_____ & _____ 1969 a - Role of the tapetum in the development of *Tradescantia* pollen. **Nature, 221**:282-284.

_____ & _____ 1969 b - Formation and development of the tapetal periplasmodium in *Tradescantia bracteata*. **Protoplasma, 68**:175-192.

_____ & _____ 1970 - Observations on the fine structure of developing microspores of *Tradescantia bracteata*. **Protoplasma, 70**:1-20.

MESQUITA, J.F. 1966 - Sur les modifications du réticulum endoplasmique et des mitochondries dans les cellules méristématiques des racines d'*Allium cepa* traitées par la colchicine. **C.R. Acad. Sc. Paris, 263**:1827-1829.

_____ 1968 - Sur les modifications ultrastructurales produites par le phényl-uréthane dans les cellules méristématiques des racines d'*Allium cepa* L. **C.R. Acad. Sc. Paris, 267**:303-305.

_____ 1972 - Ultrastructure de formations comparables aux vacuoles autophagiques dans les cellules des racines de l'*Allium cepa* L. et du *Lupinus albus* L. **Cytologia, 37**:95-110.

_____ SANTOS DIAS, J.D. & MARTINHO, A.P. 1980 -Chromoplast differentiation in fruits of *Musa* sp. (banana-tree). **Biol. Cell., 39**:343-348.

MICALEF, H. 1978 - Localisation d'activités peroxydasiques dans les cellules végétatives de l'*Ulva lactuca* L. (Chlorophycées, Ulvales). **C.R. Acad. Sc. Paris, 287**:1281-1283.

MIKI-HIROSIGE, H. & NAKAMURA, S. 1981 - The metabolic incorporation of label from myoinositol-2-^{3}H by the growing young anther of *Lilium longiflorum*. **Acta Soc. Bot. Pol., 50**:77-82.

_____ & _____ 1983 - Growth and differentiation of amyloplasts during male gamete development in *Lilium longiflorum* .In "**Pollen:Biology and implications for plant breeding**" pag. 141-147. Ed. L. Mulcahy & E. Ottaviano. Elsevier Science Publ. Comp. Inc.

MIKULSKA, E., ZOLNIEROWICZ, H. & WALEK-CZERNECKA, A. 1969 - Citado por Souvré, A. & Albertini, L. 1982.

MILLER, F. & PALADE, G.E. 1964 - Lytic activities in renal protein absorption droplets. An electron microscopical cytochemical study. **J. Cell Biol., 23**:519-552.

MILLER, J.J. & GALSKY, A.G. 1974 - Radioimunological evidence for the presence of cyclic-AMP in *Hordeum* seeds. **Phytochemistry, 13**:1295-1296.

MILLER, K.R., BLOODGOOD, R.A. & STAEHELIN, L.A. 1976 - Crystals within thylakoids: a structural analysis. **J. Ultr. Res., 54**:29-36.

MINOCHA, S.C. & HALPERIN, W. 1974 - Hormones and metabolites which control tracheid differentiation, with or without concomitant effects on growth, in cultured tuber tissue of *Helianthus tuberosus* L. **Planta, 116**:319-331.

MINTER, T.C. & LORD, E.M. 1983 - A comparison of cleistogamous and chasmogamous floral development in *Collomia grandiflora* Dougl. ex Lindl. (Polemoniaceæ).**Amer. J. Bot., 70**:1499-1508.

MIRBAHAR, R.B. & LAIDMAN, D.L. 1982 - Gibberellic acid-stimulated α-amylase secretion and phospholipid metabolism in wheat aleurone tissue. **Biochem. J., 208**:93-100.

MISCH, D. & MISCH, M.S. 1968 - Citado por Hayat, M.A. 1973.

MISSET, M.T. & GOURRET, J.P. 1984 - Accumulation of smooth cisternæ in the tapetal cells of *Ulex europaeus* L. (Papilionoideæ). **J. Cell Sci., 72**:65-74.

MITA, T. & SHIBAOKA, H. 1984 - Gibberellin stabilizes microtubules in onion leaf sheat cells. **Protoplasma, 119**:100-109.

MITZKA-SCHNABEL, U. & RAU, W. 1980 - The subcellular distribution of carotenoids in *Neurospora crassa*. **Phytochemistry, 19**:1409-1413.

_____ & _____ 1981 - Subcellular site of carotenoid biosynthesis in *Neurospora crassa* .**Phytochemistry, 20**:63-69.

MIYAWAKI, M. & TAKETOMI, Y. 1978 - The occurrence of an extended perinuclear space in androgenic gland cells of the crayfish, *Procambarus clarki*. **Cytologia, 43**:351-355.

MOGENSEN, H.L. 1972 - Fine structure and composition of the egg apparatus before and after fertilization in *Quercus gambelii*: the functional ovule. **Amer. J. Bot., 59**:931-941.

_____ 1981 - Ultrastructural localization of adenosine triphosphatase in the ovules of *Saintpaulia ionantha* (Gesneriaceæ) and its relation to synergid function and embryo sac formation. **Amer. J. Bot., 68**:183-194.

MONDAL, M.H. 1975 - Effects of gibberellic acid, calcium, kinetin, and ethylene on growth and cell wall composition of pea epicotyls. **Plant Physiol., 56**:622-625.

MONNERON, A. 1966 - Utilisation de la pronase en cytochimie ultrastructurale **J. Microsc., 5**:583-596.

_____ & BERNHARD, W. 1966 - Action de certaines enzymes sur des tissus inclus en Epon. **J. Microsc., 5**:697-714.

MOORE, R. & McCLELEN, C.E. 1985 - The involvement of glucose -6- phosphatase in mucilage secretion by root cap cells of *Zea mays*. **Ann. Bot., 56**:139-142.

_____ & WALKER, D.B. 1981 - Studies of vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. III. The involvement of acid phosphatase in the lethal cellular senescence associated with an incompatible heterograft. **Protoplasma, 109**:317-324.

MORISSET, C. 1983 - Effect of energetic shortage, upon the ultrastructure of some organelles, in excised roots of *Lycorpersicum esculentum* cultivated *in vitro* .I. Reversible structural modifications of the endoplasmic reticulum. **Cytologia, 48**:349-362.

MORISSET, P. 1978 - Cytomixis in pollen mother cells of *Ononis* (Leguminosæ). **Can. J. Genet. Cytol., 20**:383-388.

MORRE, D.J. & MOLLENHAVER, H.H. 1974 - The endomembrane concept: a functional integration of endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. In" **Dynamic aspects of plant ultrastructure**" pag. 84-137. Ed. A.W. Robards. Mc Graw Hill, London

MOSES, H.L. & ROSENTHAL, A.S. 1968 - Pitfalls in the use of lead ion for histochemical localization of nucleoside phosphatases. **J. Histochem. Cytochem., 16**:530-539.

MOSKALEWSKI, S., THYBERG, J., LOHMANDER, S. & FRIBERG, U. 1975 - Influence of colchicine and vinblastine on the Golgi complex and matrix deposition in chondrocyte aggregates. An ultrastructural study. **Exptl. Cell Res., 95**:440-454.

MULLER, J. 1979 - Form and function in Angiosperm pollen. **Ann. Missouri Bot. Gard., 66**:593-632.

NABEESA, E. & NEELAKANDAN, N. 1985 - Development of *Abelmoschus esculentus* (Malvaceæ) pollen. **Grana, 24**:3-10.

NABLI, M.A. 1974 - Contribution à l'étude de la primexine chez le *Teucrium flavum* L. (Labiatæ). **C.R. Acad. Sc. Paris, 278**:2921-2924.

_____ 1979 - Différents aspects de l'ontogenèse de l'exine chez quelques Angiospermes. **Ann. Sci.Nat., Bot., 13 eme série, 1**:129-149.

NAKAMURA, N., SADO, M. & ARAI, Y. 1980 - Sucrose metabolism during the growth of *Camellia japonica* pollen. **Phytochemistry, 19**:205-209.

_____ & SUZUKI, H. 1985 - Inhibition of *Camellia japonica* pollen tube growth by maltose. **Plant Cell Physiol., 26**:1011-1018.

NAKAMURA, S. 1979 - Development of the pollen grain wall in *Lilium longiflorum* . **J. Electron Microsc. 28**:275-284.

_____ & MIKI-HIROSIGE, H. 1982 -Coated vesicles and cell plate formation in the microspore mother cell. **J. Ultr. Res., 80**:302-311.

_____ & _____ 1985 - Fine-structural study on the formation of the generative cell wall and intine-3 layer in a growing pollen grain of *Lilium longiflorum* . **Amer. J. Bot., 72**:365-375.

NANDA, K. & GUPTA, S.C. 1977 - Citado por Pacini, E. & Juniper, B.E. 1983.

_____ & _____ 1978 - Studies in the Bignoniaceæ. II. Ontogeny of dimorphic anther tapetum in *Tecoma*. **Amer. J. Bot., 65**:400-405.

NASS, M.M.K. & NASS, S. 1962 - Citado por Nass, M.M.K. & Nass, S. 1963.

_____ & _____ 1963 - Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. Fixation and electron staining reactions. **J. Cell Biol., 19**:593-611.

NAYLOR, A.W. 1984 - Function of hormones at the organ level of organization. In "**Encyclopedia of Plant Physiology-New Series.**" **Vol. 10**. Pag. 172-218. Ed. T.K. Scott. Springer-Verlag.

NÄSSLER, C.L. & MAHLBERG, P.G. 1977 - Ontogeny and cytochemistry of alkaloidal vesicles in laticifers of *Papaver somniferum* L. (Papaveraceæ). **Amer. J. Bot., 64**:541-551.

NEWCOMB, E.H. 1967 - Fine structure of protein-storing plastids in bean root tips. **J. Cell Biol., 33**:143-163.

NEWTON, R.P., GIBBS, N., MOYSE, C.D., WIEBERG, J.L. & BROWN, E.G. 1980 - Mass spectrometric identification of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate isolated from a higher plant tissue. **Phytochemistry, 19**:1909-1911.

NICKELLS, M.W., SCHAEFFER, G.M. & GALSKY, A.G. 1971. Citado por Brown, E.G. & Newton, R.P. 1981.

NIEMIETZ, C. & WILLENBRINK, J. 1985 - The function of tonoplast ATPase in intact vacuoles of red beet is governed by direct and indirect ion effects. **Planta, 166**:545-549.

NILES, R.M. & MOUNT, M.S. 1974 - Failure to detect cyclic 3':5'-adenosine monophosphate in healthy and crown gall tumorous tissues of *Vicia faba*. **Plant Physiol., 54**:372-373.

NIR, I. & PEASE, D.C. 1973 - Chloroplast organization and the ultrastructural localization of photosystems I and II. **J. Ultr. Res., 42**:534-550.

_____ & SELIGMAN, A.M. 1970 - Photooxidation of diaminobenzidine (DAB) by chloroplast lamellae. **J. Cell Biol., 46**:617-620.

NITSCH, C. 1977 - Culture of isolated microspores. In "**Applied and Fundamental aspects of Plant cell, Tissue and Organ culture**" pag. 268-278. Ed. J. Reinert & Y.P.S. Bajaj. Springer-Verlag, Berlin.

NITSCH, J.P. & NITSCH, C. 1969 - Haploid plants from pollen grains. **Science, 163**:85-87.

NOBEL, P.S. 1969 - Ligth-induced changes in the ionic content of chloroplasts in *Pisum sativum*. **Biochim. Biophys. Acta, 172**:134-143.

NOHER DE HALAC, I. 1980 - Fine structure of nucellar cells during development of the embryo sac in *Oenothera biennis* L. **Ann. Bot., 45**:515-521.

NOMA, M., HUBER, J., ERNST, D. & PHARIS, R.P. 1982 - Quantitation of gibberellins and the metabolism of [^{3}H] gibberellin A_1 during somatic embryogenesis in carrot and anise cell cultures. **Planta, 155**:369-376.

NORSTOG, K. 1974 - Nucellus during early embryogeny in barley: fine structure. **Bot. Gaz., 135**:97-103.

NOURAREDE, A. 1963 - Premières observations sur l'infrastructure et sur l'évolution des cellules des jeunes ébauches foliaires embryonnaires du *Tropæolum majus* L. Cytologie de l'hydratation germinative et des premières étapes de la germination. **C. R. Acad. Sc. Paris, 257**:1495-1497.

_____ LANDRE, P. & REMBUR, J. 1983 - Activités ATPasiques du noeud cotylédonaire et du bourgeon cotylédonaire du pois inhibé, réactivé ou soumis à la fusicoccine. **Can. J. Bot., 61**:119-134.

_____, _____, _____ & HERNANDEZ, M.N. 1985 - Des variations d'activités de la 5'-nucléotidase et de l'adénylate-cyclase sont-elles des composantes de la levée d'inhibition du bourgeon cotylédonaire du pois? **Can. J. Bot., 63**:309-323.

_____ & PILET, P.-E. 1967 - Activité et localisation, au niveau des infrastructures, de la phosphomonoestérase acide dans la racine et dans les jeunes feuilles du *Lens culinaris* L. **C. R. Acad. Paris, 265**:663-666.

NOVAK, F. & BETLACH, J. 1970 - Development and karyology of the tapetal layer of anthers in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). **Biol. Plantarum, 12**:275-280.

NOVIKOFF, A.B. 1967 - Enzyme localizations with Wachstein-Meisel procedures: real or artifact. **J. Histochem. Cytochem., 15**:353-354.

_____ 1972 - Citado por Essner, E. 1974.

_____ & GOLDFISCHER, S. 1969 - Visualization of peroxisomes (microbodies) and mitochondria with diaminobenzidine. **J. Histochem. Cytochem., 17**:675-680.

NYGAARD, P. 1977 - Utilization of exogenous carbohydrates for tube growth and starch synthesis in pine pollen suspension cultures. **Physiol. Plantarum, 39**:206-210.

OBATA, T. 1979 - Fine structural changes in barley aleurone cells during gibberellic acid-induced enzyme secretion. **Ann. Bot., 44**:333-337.

ODA, K., MISUMI, Y & IKEHARA, Y. 1983 - Disparate effects of monensin and colchicine on intracellular processing of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. **Eur. J. Biochem., 135**:209-216.

OEHLER, E. 1927 - Citado por Sankara Rao, K. & Chinnappa, C.C. 1983.

OKSALA, T. & THERMAN, E. 1977 - Endomitosis in tapetal cells of *Eremurus* (Liliaceæ). **Amer. J. Bot., 64**:866-872.

OLAH, A.F. & MUELLER, W.C. 1981 - Ultrastructural localization of oxidase and peroxidative activities in a carrot suspension cell culture. **Protoplasma, 106**:231-248.

OLSEN, L.T. & GULLVÅG, B.M. 1971 - The presence of acid phosphatases in swelling spores of *Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod. **Grana, 11**:111-116.

OLSON, A.R. 1984 - Structural aspects of pollination in *Amelanchier alnifolia* (Maloideæ). **Can. J. Bot., 62**:858-864.

ONEFEGHARA, F.A. 1972 - Histochemical localization of enzymes in *Tapinanthus bangwensis*: acid phosphatase. **Amer. J. Bot., 59**:549-556.

OPARKA, K.J. 1986 -Phloem unloading in the potato tuber. Pathways and sites of ATPase. **Protoplasma, 131**:201-210.

ÖPIK, H. 1975 a - The reaction of mitochondria in the coleoptiles of rice (*Oryza sativa* L.) with diaminobenzidine. **J. Cell Sci., 17**:43-55.

_____ 1975 B - Staining of sieve tube mitochondria in coleoptiles of rice (*Oryza sativa* L.) with diaminobenzidine. **Planta, 122**:269-271.

ORSENIGO, M. & RASCIO, N. 1976 - Chloroplast fine structure in the japonica-2 maize mutant exposed to continuous illumination. I. The green tissues. **Cytobios, 16**:171-182.

OSMOND, C.B., AKAZAWA, T. & BEEVERS, H. 1975 - Localization and properties of ribulose diphosphate carboxylase from castor bean endosperm. **Plant Physiol., 55**:226-230.

OVERMAN, M.A. & WARMKE, H.E. 1972 - Cytoplasmic male sterility in sorghum. II. Tapetal behaviour in fertile and sterile anthers. **J. Hered., 63**:227-234.

OWELLEN, R.J., OWENS, A.H. Jr. & DONIGIAN, D.W. 1972 - The binding of vincristine, vinblastine and colchicine to tubulin. **Biochem. Biophys. Res. Comm., 47**:685-691.

OWENS, S.J. & DICKINSON, H.G. 1983 - Pollen wall development in *Gibasis* (Commelinaceæ). **Ann. Bot., 51**:1-15.

PACINI, E. & CASADORO, G. 1981 - Tapetum plastids of *Olea europaea* L. **Protoplasma, 106**:289-296.

_____ & CRESTI, M. 1976 - Close association between plastids and endoplasmic reticulum during pollen grain development in *Lycopersicum peruvianum*. **J. Ultr. Res., 57**:260-265.

_____ & _____ 1978 - Ultrastructural characteristics of the tapetum and microspore mother cells in *Lycopersicum peruvianum* during meiotic prophase. **Bull. Soc. Bot. Fr., Actualités botaniques, 125** :121-128.

_____ & FRANCHI, G.G. 1983 - Pollen grain development in *Smilax aspera* L. and possible functions of the loculus. In "**Pollen: Biology and Implications for Plant Breeding**" pag. 183-190. ed. D.L. Mulcahy & E. Ottaviano, Elsevier Science Publ. Comp. Inc.

_____ & _____ & SARFATTI, G. 1981 - On the widespread occurrence of poral sporophytic proteins in pollen of Dicotyledons. **Ann. Bot., 47**:405-408.

_____ & JUNIPER, B.E.1979 a - The ultrastructure of pollen-grain development in the olive (*Olea europaea*). I. Proteins in the pore. **New Phytol., 83**:157-163.

_____ & _____ 1979 b - The ultrastructure of pollen-grain development in the olive (*Olea europaæ*).2. Secretion by the tapetal cells. **New Phytol., 83**:165-174.

_____ & _____ 1983 - The ultrastructure of the formation and development of the amoeboid tapetum in *Arum italicum* Miller. **Protoplasma, 117**:116-129.

_____ , SIMONCIOLI, C. & CRESTI, M. 1975 - Ultrastructure of nucellus and endosperm of *Diplotaxis erucoides* during embryogenesis. **Caryologia, 28**:525-538.

PALADE, G.E. 1952 - A study of fixation for electron microscopy. **J. Exp. Med., 95**:285-298.

PALEG, L.G. 1965 - Physiological effects of gibberellins. **Ann. Rev. Plant Physiol., 16**:291-322.

_____ & WEST, C.A. 1972 - The gibberellins. In: "**Plant Physiology- A Treatise. vol VI B: Physiology and Development: The Hormones**. pag. 146-181. Ed. F.C. Steward. Academic Press, London.

PANCHAKSHARAPPA, M.G. 1962 - Citado por Stone, D.E. , Seller, S.C. & Kress, W.J. 1981.

_____ & RUDRAMUNIYAPPA, C.K. 1974 - Localization of nucleic acids and insoluble polysaccharides in the anther of *Zea mays* L. . A histochemical study. **Cytologia, 39**:153-160.

_____ & SYAMASENDAR, J. 1974 - A cytochemical study of anther development in *Iphigemia pallida* Bak. **Cytologia, 39**:133-138.

PANKOW, H. 1957 - Citado por Heslop-Harrison, J. 1968 a.

PARGNEY, J-C. 1982 - Etude des ultrastructures cellulaires au cours de la plasmolyse et de l'isolement des protoplastes issus de tubes polliniques d'*Iris pseudacorus* et de *Clivia nobilis*. **Z. Pflanzenphysiol., 107**:237-249.

PARKS, H.F. 1962 - Unusual formation of ergastoplasm in parotid acinous cells of mice. **J. Cell Biol., 14**:221-234.

PATZELT, C., BROWN, D. & JEANRENAUD, B. 1977 - Inhibitory effect of colchicine on amylase secretion by rat parotid gland. Possible localization in the Golgi area. **J. Cell Biol., 73**:578-593.

PAULIN, A. 1979 - Évolution des glucides dans les divers organes de la Rose coupée (var. carina) alimentée temporairement avec une solution glucosée. **Physiol. Vég., 17**:129-143.

_____ & DROILLARD, M-J. 1982 - Synthèse et hydrolyse du saccharose dans l'œillet alimenté avec une solution glucosée. **Physiol. Plant., 56**:317-323.

PEAVEY, D.G., STEUP, M. & GIBBS, M. 1977 - Characterization of starch breakdown in the intact spinach chloroplast. **Plant Physiol., 60**:305-308.

PELLEGRINI, L. 1974 - Localisation infrastructurale des activités phosphatasiques acides dans les cellules de l'apex végétatif chez *Cystoseira stricta* Sauvagean (Phéophycée-Fugale). **C.R. Acad. Sc. Paris, 279**:481-484.

_____ & GEROLA, F.M. 1970 - Mycoplasma-like bodies in phloem cells of *Oryza sativa*. Electron microscope observations. **Caryologia, 23**:639-646.

PELLETIER, P.J. & CAVENTOU, J. 1820 - Citado por Eigsti, O.J. & Dustin, P. 1955.

PENNELL, R.I. & BELL, P.R. 1985 - Microsporogenesis in *Taxus baccata* L.: The development of the archaesporium. **Ann. Bot. 56**:415-427.

_____ & _____ 1986 - Microsporogenesis in *Taxus baccata* L.: The formation of the tetrad and development of the microspores. **Ann. Bot. 57**:545-555.

PERIASAMY, K. & KANDASAMY, M.K. 1981 - Development of the anther of *Annona squamosa* L. **Ann. Bot. 48**:885-893.

PERLIN, D.S. & SPANSWICK, R.M. 1981 - Characterization of ATPase activity associated with corn leaf plasma membranes. **Plant Physiol., 68**:521-526.

PETTITT, J.M. 1978 - Regression and elimination of cytoplasmic organelles during meiosis in *Lycopodium*. **Grana, 17**:99-105.

_____ 1981 - Reproduction in seagrasses: pollen development in *Thalassia hemprichii*, *Halophila stipulacea* and *Thalassodendron ciliatum*. **Ann. Bot., 48**:609-622.

PHATAK, S.C., WITTWER, S.H., HONMA, S. & BUKOVAK, M.J. 1966 - Gibberellin-induced anther and pollen development in a stamen-less tomato mutant. **Nature, 209**:635-636.

PHILIPSON, M.N. 1978 - Nucellar degeneration in *Cortaderia* (Gramineæ). **Protoplasma, 95**:361-369.

PHILLIPS, R. & DODDS, J.H. 1977 - Rapid differentiation of tracheary elements in cultured explants of Jerusalem artichoke. **Planta, 135**:207-212.

PICKETT-HEAPS, J.D. 1967 - The effects of colchicine on the ultrastructure of dividing plant cells, xylem wall differentiation and distribution by cytoplasmic microtubules. **Dev. Biol., 15**:206-236.

PLATT-ALOIA, K.A. & THOMSON, W.W. 1977 - Chloroplast development in young sesame plants. **New Phytol., 78**:599-605.

_____, _____ & TERRY, N. 1983 - Changes in plastid ultrastructure during iron nutrition-mediated chloroplast development. **Protoplasma, 114**:85-92.

PODBIELKOWSKA, M., ZARKA-MACIEJEWSKA, B. & KACPERSKA-PALACZ, A. 1975 - Morphology of protoplast as affected by an inhibition of respiration. **Protoplasma, 83**:201-208.

POMEROY, M.K. & ANDREWS, C.K.J. 1978 a - Ultrastructural changes in shoot apex cells of winter wheat seedlings during ice encasement. **Can. J. Bot., 56**:786-794.

_____ & _____ 1978 b - Metabolic and ultrastructural changes in winter wheat during ice encasement under field conditions. **Plant Physiol., 61**:806-811.

PONZI, R. & PIZZOLONGO, P. 1972 - The ultrastructure of suspension cells of *Ipomoea purpurea* Roth. **J. Submicr. Cytol., 4**:199-204.

_____ & _____ 1973 - Ultrastructure of plastids in the suspension cells of *Ipomoea purpurea* Roth. **J. Submicr. Cytol.**, 5:257-263.

_____ , _____ & CAPUTO, G. 1978 - Ultrastructural particularities in ovular tissues of some Rhoeadales taxa and their probable taxonomic value. **J. Submicr. Cytol., 10**:81-88.

PORAT, N., BEN-HAYYIM, G. & FRIEDBERG, I. 1978 - Localization of oxidized 3,3'-diaminobenzidine deposits in chloroplasts. **Protoplasma, 93**:397-403.

PORTER, E.K., BIRD, J.M. & DICKINSON, H.G. 1982 - Nucleic acid synthesis in microsporocytes of *Lilium* cv. cinnabar: events in the nucleus. **J. Cell Sci., 57**:229-246.

_____ , _____ & _____ 1983 a - Nucleic acid metabolism during meiosis in higher plants. In "**Pollen: Biology and Implications for Plant Breeding**" pag. 127-133. Ed. D.L. Mulcahy & E. Ottaviano. Elsevier Science Publ. Comp., Inc.

_____ , PARRY, D. & DICKINSON, H.G. - 1983 b - Changes in poly $(A)^+$ RNA during male meiosis in *Lilium*. **J. Cell Sci., 62**:177-186.

_____ , _____ BIRD, J. & DICKINSON, H.G. 1984 - Nucleic acid metabolism in the nucleus and cytoplasm of Angiosperm meiocytes. In "**Controlling Events in Meiosis**" pag. 363-379. 38th Symp. Soc. Exptl. Biol. Ed. C.Evans.

PORTER, H.K. 1962 - Synthesis of polysaccharides of higher plants. **Ann. Rev. Plant Physiol., 13**:303-328.

POUX, N. 1963 a- Localisation de la phosphatase acide dans les cellules méristématiques de blé (*Triticum vulgare* Vill). **J. Microscopie, 2**:485-489.

_____ 1963 b - Localisation des phosphates et de la phosphatase acide dans les cellules des embryos de blé (*Triticum vulgare* Vill) lors de la germination. **J. Microscopie, 2**:557-568.

_____ 1967 - Localisation d'activités enzymatiques dans les cellules du méristème radiculaire de *Cucumis sativus* L. I. Activités phosphatasiques neutres dans les cellules du protoderme. **J. Microscopie, 6**:1043-1058.

_____ 1969 - Localisation d'activités enzymatiques dans les cellules du méristème radiculaire de *Cucumis sativus* L. I. Activité peroxydasique. **J. Microscopie, 8**:855-866.

_____ 1970 - Citado por Matile, Ph. 1975.

_____ 1974 - Localisation des activités phosphatasiques acides et peroxydasiques au niveau des ultrastructures végétales. **J. Microscopie, 21**:265-274.

PRAHL, A-K., SPRINGSTUBBE, H., GRUMBACH, K. & WIERMANN, R. 1985 Studies on sporopollenin biosynthesis: the effect of inhibitors of carotenoid biosynthesis on sporopollenin accumulation. **Z. Naturforsch., 40 c**:621-626.

PRAKASH, N., FOREMAN, D.B. & GRIFFITH, S.J. 1984 - Gametogenesis in *Galbulimina belgraveana* (Himantandraceæ). **Aust. J. Bot., 32**:605-612.

PREISS, J. 1982 - Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. **Ann. Rev. Plant Physiol., 33**:431-454.

PRICE, G.D. & WHITECROSS, M.I. 1983 - Cytochemical localization of ATPase activity on the plasmalemma of *Chara corallina*. **Protoplasma, 116**:65-74.

PRICE, J.L. & THOMSON, W.W. 1967 -Occurrence of a crystalline inclusion in the chloroplasts of *Macadamia* leaves. **Nature, 214**:1148-1149.

PRICE, W.C., MARTINEZ, A.P. & WARMKE, H.E. 1966 - Crystalline inclusions in chloroplasts of the coconut palm. **J. Ultr. Res., 14**:618-621.

PRITCHARD, A.J. & HUTTON, E.M. 1972 - Anther and pollen development in male-sterile *Phaseolus atropurpureus*. **J. Heredity, 63**:280-282.

PURVIS, M. J., COLLIER, D.C. & WALLS, D. 1966 - **Laboratory Tecnhiques in Botany**. 2nd edition. Butterworths, London.

PY, G. 1932 - Recherches cytologiques sur l'assise nourricière des microspores et les microspores des plantes vasculaires. **Rev. Gen. Bot., 44**:316-368; 369-413;450-462;484-510.

PYLIOTTIS, N.A., ASHFORD, A.E., WHITECROSS, M.I. & JACOBSEN, J.V 1979 Localisation of gibberellic acid-induced acid phosphatase activity in the endoplasmic reticulum of barley aleurone cells with the electron microscope. **Planta, 147**:134-140.

PYLIOTTIS, N.A. & GOODCHILD, D.J. 1975 - Induced and normal crystalline inclusions in plastids revealed by freeze-fracturing. **Protoplasma, 85**:277-283.

QUAST, L. & WIERMANN, R. 1973 - Über das Vorkommen verschieden substituierter Chalk n während der Mikrosporogense bei *Tulipa*. **Experientia, 29**:1165-1166.

RACHMILEVITZ, T. & FAHN, A. 1973 - Ultrastructure of nectaries of *Vinca rosea* L., *Vinca majo* L. and *Citrus sinensis* Osbeck cv. *Valencia* and its relation to the mechanism of nectar secretion. **Ann. Bot., 37**:1-9.

_____ & _____ 1975 - The floral nectary of *Tropaeolum majus* L. - The nature of the secretory cells and the manner of nectar secretion. **Ann. Bot., 39**:721-728.

RAGHAVAN, V. 1978 - Origin and development of pollen embryoids and pollen calluses in cultured anther segments of *Hyoscyamus niger* (Henbane). **Amer. J. Bot., 65**:984-1002.

_____ 1979a - Embryogenic determination and ribonucleic acid synthesis in pollen grains of *Hyoscyamus niger* (Henbane). **Amer. J. Bot., 66**:36-39.

_____ 1979b - An autoradiographic study of RNA synthesis during pollen embryogenesis in *Hyoscyamus niger* (henbane). **Amer. J. Bot., 66**:784-795.

_____ 1981 - A transient accumulation of poly (A)-containing RNA in the tapetum of *Hyoscyamus niger* during microsporogenesis. **Dev. Biol., 81**:342-348.

RALL, T.W. & SUTHERLAND, E.W. 1962 - Adenyl cyclase. II.The enzymatically catalyzed formation of adenosine 3',5'-phosphate and inorganic pyrophosphate from adenosine triphosphate. **J. Biol. Chem., 237**:1228-1232.

RASHID, A., SIDDIQUI, A.W. & REINERT, J. 1982 - Subcellular aspects of differentiation of microspore mother cells of *Nicotiana tabacum*. **Protoplasma, 113**:80-84.

RAYMOND, P., CARRE-NEMESIO, A.M. & PRADET, A. 1985 - Metabolism of [^{14}C]-glucose and [^{14}C]-acetate by lettuce embryos during early germination. **Physiol. Plant., 64**:529-534.

_____, NARAYANAN, A. & PRADET, A. 1973 - Evidence for the presence of 3',5'-cyclic AMP in plant tissues. **Biochem. Biophys. Res. Comm., 53**:1115-1121.

REHM, S., ZAYED, E.A. & ESPIG, G. 1978 - Effect of gibberellic acid on the sprouting and growth of secondary buds of *Coffea arabica* stimulated by other growth regulators. **Z. Planzenphysiol., 89**:1-10.

REZNICKOVA, S.A. & DICKINSON, H.G. 1982 - Ultrastructural aspects of storage lipid mobilization in the tapetum of *Lilium hybrida* var. enchantement. **Planta, 155**:400-408.

_____ & WILLEMSE, M.T.M. 1980 - Formation of pollen in the anther of *Lilium*. 2. The function of the surrounding tissues in the formation of pollen and pollen wall. **Acta Bot. Neerl. 29**:141-156.

REYNOLDS, E.S. 1963 - The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol., 17**:208-212.

REYNOLDS, T.L. 1984 - An ultrastructural and stereological analysis of pollen grains of *Hyoscyamus niger* during normal ontogeny and induced embryogenic development. **Amer. J. Bot., 71**:490-504.

_____ & RAGHAVAN, V. 1982 - An autoradiographic study of RNA synthesis during maturation and germination of pollen grains of *Hyoscyamus niger*. **Protoplasma, 111**:117-128.

RHOADES, M.M. 1931.Citado por Mascarenhas, J.P. 1975.

_____ 1933.Citado por Mascarenhas, J.P. 1975.

RIDLEY, S.M. & RIDLEY, J. 1979 - Interaction of chloroplasts with inhibitors. Location of carotenoid synthesis and inhibition during chloroplast development. **Plant Physiol., 63**:392-398.

RILEY, R. & BENNETT, M.D. 1971 - Meiotic DNA synthesis. **Nature, 230**:182-185.

RISUEÑO, M.C., GALAN-CANO, J. & GIMENEZ-MARTIN, G. 1975 - Ultrastructure of the nuclear envelope in the covering tissues of the ovule and anther beginning of meiosis. **Mikroskopie, 31**:5-13.

_____, GIMENEZ-MARTIN, G., LOPEZ-SAEZ, J.F. & R.-GARCIA, M.I. 1969a - Origin and development of sporopollenin bodies. **Protoplasma, 67**:361-374.

_____, _____, _____, _____ 1969b - Connexions between meiocytes in plants. **Cytologia, 34**:262-272.

_____, _____ & RODRIGUEZ-GARCIA, M.I. 1973 - Structural changes in the cell wall of meiocytes. **Cytologia, 38**:177-186.

_____, MEDINA, F.J. & MORENO DIAZ de la ESPINA, S. 1982 - Nucleolar fibrillar centres in plant meristematic cells: ultrastructure, cytochemistry and autoradiography. **J. Cell Sci., 58**:313-329.

_____, _____, _____, RODRIGUEZ-GARCIA, M.I. & FERNANDEZ-GOMEZ, M.E. 1980 - Correlation of nucleolar activity and the nucleolar organizing region (NOR) ultrastructure in plants. **Biol. Cellulaire, 39**:167-170.

RITTSCHER, M. & WIERMANN, R. 1983 - Occurence of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in isolated tapetum cells of *Tulipa* anthers. **Protoplasma, 118**:219-224.

ROBERTSON, B.L. 1984 - Tapetal cell changes and sporoderm development in *Rhigozum trichotomum* (Burch.). **Ann. Bot., 53**:803-810.

ROBINS, R.J. & JUNIPER, B.E. 1980 -The secretory cycle of *Dionaea muscipula* Ellis. III. The mechanism of release of digestive secretion. **New Phytol., 86**:313-327.

ROBISON, G.A., BUTCHER, R.W. & SUTHERLAND, E.W. 1968 - Cyclic AMP. **Ann. Rev. Biochem.,37**:149-174.

RODBELL, M., BIRNBAUMER, L., POHL, S. & KRANS, H.M.J. 1971 - The glucagon-sensitive adenyl cyclase in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanyl nucleotides in glucagon action. **J. Biol. Chem., 246**:1877-1882.

RODRIGUEZ-GARCIA, M.I. 1978 - Electronenmikroskopische Untersuchungen von Tapetum und Meiocyten wahrend der Mikrosporogenesis bei *Scilla non-scripta*. **Pollen et Spores, XX**:467-484.

_____ & GARCIA, A. 1978 - Differentiation of the plastid population during microsporogenesis and the development of the pollen grain in the Liliacaæ. **Biol. Cellulaire, 33**:63-70.

_____, RISUEÑO, M.C. & SANCHEZ-PINA, M.A. 1982 -Estructura y formacion de la exina en el grano de polen de Liliaceas. **Actas del IV Simposio de Palinologia** pag. 141-148. Barcelona, Espanha.

_____ & SIEVERS, A. 1977 - Membrane contacts of the endoplasmic reticulum with plastids and with the plasmelemma in the endothecium of *Scilla non-scripta*. **Cytobiologie, 15**:85-95.

ROGERS, L.J., SHAH, S.P.J. & GOODWIN, T.W. 1966 - Intracellular localization of mevalonate-activating enzymes in plant cells. **Biochem. J., 99**:381-388.

ROHR, R. 1977 - Étude comparée de la formation de l'exine au cours de la microsporogénèse chez une Gymnosperme (*Taxus baccata*) et une Préphanérogame (*Ginkgo biloba*). **Cytologia, 42**:157-167.

ROLAND, F. 1967 - Différenciation du sporoderme chez *Ficaria ranunculoides*. Observation et évolution des "corps d'Ubisch". **Pollen et Spores, IX**:415-425.

_____ 1971 - Characterization and extraction of the polysaccharides of the intine and of the generative cell wall in the pollen grains of some Ranunculaceæ. **Grana, 11**:101-106.

ROLAND, J-C. 1969 - Localisation d'activités enzymatiques au niveau des ultrastructures des collocytes en croissance de *Ballota nigra*. **C. R. Acad. Sc. Paris, 268**:2052-2055.

ROLAND-HEYDACKER, F. 1979 - Aspects ultrastructuraux de l'ontogénie du pollen et du tapis chez *Mahonia aquifolium* Nutt. Berberidacæ. **Pollen et Spores, XXI**:259-278.

ROSEN, W.G. 1968 - Ultrastructure and physiology of pollen. **Ann. Rev. Plant Physiol., 19**:435-462.

ROSENFIELD, C.-L., FANN, C. & LOEWUS, F.A. 1978 -Metabolic studies on intermediates in the myo-inositol oxidation pathway in *Lilium longiflorum* pollen. I. Conversion to hexoses. **Plant Physiol., 61**:89-95.

_____ & LOEWUS, F.A. 1978a - Metabolic studies on intermediates in the myo-inositol oxidation pathway in *Lilium longiflorum* pollen. II. Evidence for the participation of uridine diphosphoxylose and free xylose as intermediates. **Plant Physiol., 61**:96-100.

_____ & LOEWUS, F.A. 1978b - Metabolic studies on intermediates in the myo-inositol oxidation pathway in *Lilium longiflorum* pollen. III.Polysaccharidic origin of labelled glucose. **Plant Physiol., 61**:101-103.

ROSS, R. & BENDITT, E. P. 1964 - Wound healing and collagen formation. IV. Distortion of ribosomal patterns of fibroblasts in scurvy. **J. Cell Biol., 22**:365-389.

ROWLEY, J.R. 1959 - The fine structure of the pollen wall in the Commelinaceæ. **Grana, 2**:3-31.

_____ 1962a - Stranded arrangement of sporopollenin in the exine of microspores of *Poa annua*. **Science, 137**:526-528.
_____ 1962b - Nonhomogenous sporopollenin in microspores of *Poa annua* L. **Grana, 3**:3-19.
_____ 1963 - Ubisch body development in *Poa annua*. **Grana, 4**:25-36.
_____ 1971 - Implications on the nature of sporopollenin based upon pollen development. In "**Sporopollenin**" pag. 174-219. Ed. J. Brooks, P.R. Grant, M. Muir, P. van Gijzel & G. Shaw. Academic Press, London.
_____ 1973 - Formation of pollen exine bacules and microchannels on a glycocalyx. **Grana, 13**:129-138.
_____ 1975 - Germinal apertural formation in pollen. **Taxon, 24**:17-25.
_____ 1976 - Dynamic changes in pollen wall morphology. In "**The evolutionary significance of the exine**" pag. 39-65. Ed. I. K. Ferguson & J. Muller. Academic Press, London.
_____ & DAHL, A.O. 1977 - Pollen development in *Artemisia vulgaris* with special reference to glycocalyx material. **Pollen et Spores, XIX**:169-284.
_____ & _____ 1982 - A similar substructure for tapetal surface and exine "tuft" units. **Pollen et Spores, XXIV**:5-8.
_____ , _____ & SKVARLA, J.J. 1973 - Localization of ATPase activity in pollen grains. **Norwegian J. Bot., 20**:31-50.
_____ & DUNBAR, A. 1967. Citado por Abadie, M. & Hideux, M. 1979a.
_____ & _____ 1970 - Transfer of colloidal iron from sporophyte to gametophyte. **Pollen et Spores, XII**:305-328.
_____ & ERDTMAN, G. 1967 - Sporoderm in *Populus* and *Salix*. **Grana, 7**:517-567.
_____ & PRIJANTO, B. 1977 - Selective destruction of the exine of pollen grains. **Geophytology, 7**:1-23.
_____ & SKVARLA, J.J. 1974a - Plasma membrane-glycocalyx origin of Ubisch body wall. **Pollen et Spores, XVI**:441-448.
_____ & _____ 1974b - Origin of the inner intine in pollen of *Canna*. In "**32nd. Ann. Proc. Electron Microscopy. Soc. Amer.**" pag. 361-362. Ed. C.J. Arceneaux. St. Louis, Missouri.
_____ & SOUTHWORTH, D. 1967 - Deposition of sporopollenin on lamellae of unit membrane dimensions. **Nature, 213**:703-704.
ROY, S.C. 1975 - Effect of colchicine on pollen mother cells of *Zea mays* L. **Ind. I. Exp. Biol., 13**:325-326.
RUBIN, R.W. & FILNER, P. 1973 - Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in *Chlamydomonas reinhardtii*. Influence on flagellar function and regeneration. **J. Cell Biol., 56**:628-635.
RUCKER, W. 1982 - Kombinierter Einfluß von Indolessigsaure, Gibberellin und Benzylaminopurin auf Kallus- und Organdifferenzierung an Blattexplantaten von *Digitalis purpurea*. **Z. Pflanzenphysiol., 107**:141-151.
RUDRAMUNIYAPPA, C.K. 1985 - A histochemical study of developing sporogenous tissue and periplasmodial tapetum in the anther of *Parthenium* (Compositæ). **Cytologia, 50**:891-898.
RYAN, K.G. 1984 - Membranes in the spindle of iris pollen mother cells during the second division of meiosis. **Protoplasma, 122**:56-67.
RYBERG, H., LILJENBERG, C. & SUNDQVIST, C. 1980 - Crystalloid formation in protochlorophyll-accumulating plastids from the inner seed coat of *Cyclanthera explodens*. **Physiol. Plant., 50**:333-339.
SAAD, S.I. 1960 - The sporoderm stratification in the Malvaceæ. **Pollen et Spores, II**:13-41.
_____ 1963a - Sporoderm stratification:the "medine", a distinct third layer in the pollen wall. **Pollen et Spores, V**:17-38.
_____ 1963b - On the terminology of pollen wall stratification. **Pollen et Spores, V**:451-454.
_____ 1964 - Pollen morphology of some Egyptian Cucurbitaceæ. **Pollen et Spores, VI**:113-124.

SABATINI, D.D., BENSCH, K. & BARRNETT, R.J. 1963 - Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. **J. Cell Biol., 17**:19-58.

SALEMA, R. 1969 - Amido - Estudo ultrastructural da sua biogénese em plantas superiores. **Brotéria (C.N.), 38**:1-111.

_____ & BADENHUIZEN, N.P. 1967 - The production of reserve starch granules in the amyloplasts of *Pellionia daveauana* N.E. Br. **J. Ultr. Res., 20**:383-399.

_____ , MESQUITA, J.F. & ABREU, I. 1972 - Particular aspects of the construction of photosynthetic membranes. **J. Submicr. Cytol., 4**:161-169.

_____ & SANTOS, I. 1980 - Effect of colchicine and vinblastine on chloroplast microtubules of cultured green-cell lines from *Sedum telephium*. **Electron Microscopy, 2**:242-243.

SALGADO-LABOURIAU, M.L.1982 - On cavities in spines of Compositæ pollen. **Grana, 21**:97-102.

SALOMON, D. & MASCARENHAS, J.R. 1972 - Auxin and cyclic 3',5'-adenosine monophosphate during the isolation of chromatin from *Avena* coleoptiles : effects on cell free RNA synthesis. **Biochem. Biophys. Res. comm., 47**:134-141.

SALPETER, M.M. & SZABO, M. 1972 - Sensitivity in electron microscope autoradiography. I The effect of radiation dose. **J. Histochem. Cytochem., 20**:425-434.

SAMPAIO, G. 1946 - **Flora Portuguesa**. Ed. Imprensa Moderna, Lda. 2ª edição.

SANCHEZ-PINA, M.A., RODRIGUEZ-GARCIA, M.I. & RISUEÑO, M.C. 1980 - Localization of the acid phosphatasic activity in plant cell nucleoli. **Cell Biol. Int. Rep., 4**:93-104.

SANGDUEN, N., KREITNER, G.L. & SORENSEN, E.L. 1983 - Light and electron microscopy of embryo development in perennial and annual *Medicago* species. **Can. J. Bot., 61**:837-849.

SANGWAN, R.S. & CAMEFORT, H. 1982 - Microsporogenesis in *Datura metel* L. **Rev. Cytol. Biol. vég. Bot., 5**:265-282.

SANKARA RAO, K. 1975 - Citado por Sankara Rao, k. & Chinnappa, C.C. 1983.

_____ 1978 - Citado por Sankara Rao, k. & Chinnappa, C.C. 1983.

_____ & CHINNAPPA, C.C. 1983 - Studies in Gentianaceæ. Microsporangium and pollen. **Can. J. Bot., 61**:324-336.

_____ & NAGARAJ, M. 1982 - Studies in Gentianaceæ. Embryology of *Swertia minor* (Gentianinæ). **Can. J. Bot., 60**:141-151.

SANTOS, A. & ABREU, I. 1975 - Aspecto do retículo endoplasmático nas anteras de *Cucurbita polymorpha* Duch. durante a formação do pólen. X Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Microscopia Electrónica.

_____ & _____ 1977 - Aspectos ultrastructurais da ontogenia das células do tapete de anteras de *Cucumis sativus* L.. XII Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Microscopia Electrónica.

_____ , _____ & SALEMA, R. 1979 - Elaborate system of RER and degenerescence of tapetum during pollen development in some dicotyledons. **J. Submicr. Cytol., 11**:99-107.

_____ & SALEMA, R. 1984 - Ultrastructural alterations induced by gibberellic acid 2- Its effects on callus tissue derived from anthers of *Helianthus annuus*. **Cien. Biol., 9**:58 59 (abstract).

SANTOS, I. 1979 - Microtubulos plastidiais. Estudo ultrastrutural e bioquímico e relações com fotossíntese CAM. Tese de doutoramento.

_____ & SALEMA, R. 1983 - Dilated cisternae of endoplasmic reticulum in two *Rhipsalis* species. **J. Submicr. Cytol., 15**:1095-1099.

SANTOS-DIAS, J.D. & MESQUITA, J.F. 1977 - Comportamento dos microtúbulos das células radiculares de *Colchicum* sp. face ao tratamento com colquicina exógena. XII Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Microscopia Electrónica.

SATO, S. & SATO, M. 1984 - Peculiar behavior of the nucleolus and appearance of cytoplasmic nucleolus-like bodies in the roottip meristems of *Brodiaea uniflora* Engl. grown at low temperature. **Protoplasma, 120**:197-208.

SATO, S-I. 1985 - A cytochemical study of the embryo sac formation in *Hemerocallis middendorffii* var. *esculenta* (Koidz.) Ohwi. **Japn. J. Genet., 60**:53-61.

SAUAIA, H. & MAZIA, D. 1961 - Citado por Deyson, G. 1968.

SAUSSAY, R. & GAUTHERET, R. 1974 - Action de la lumière , de la température et de l'acide gibbérellique sur la production de formations cribrovasculaires par les tissus de rhizomes de Topinambour cultivés in vitro. **C.R. Acad. Sc. Paris, 279**:1871-1876.

SAUTER, J.J. 1971 - Physiology and biochemistry of meiosis in the anther. In"**Pollen : Development and Physiology**" pag. 3-15. Ed. J. Heslop-Harrison. Butterworths, London.

_____ 1977 - Electron microscopical localization of adenosine triphosphatase and ß-glycerophosphatase in sieve cells of *Pinus nigra* Var. *austriaca* (Hoess) Badoux. **Z. Planzenphysiol., 81**:438-458.

SAWADA, K. 1912 - Citado por Crozier, A. 1981.

SAWHNEY, V.K. & GREYSON, R.I. 1979 - Interpretations of determination and canalisation of stamen development in a tomato mutant. **Can. J. Bot., 57**:2471-2477.

_____ & SRIVASTAVA, L.M. 1974 - Gibberellic acid induced elongation of lettuce hypocotyls and its inhibition by colchicine. **Can. J. Bot., 52**:259-264.

SCHAEVERBEKE, J. 1966 - Augmentation de l'activité saccharasique dans les filets staminaux du *Zea mays* L. au moment de l'anthèse. Intervention probable de l'acide gibberellique dans la synthèse d'une saccharase. **C. R. Acad. Sc. Paris, 262**:277-280.

SCHAFER, G . HEBER, U. & HELDT, H.W. 1977 - Glucose transport into spinach chloroplasts. **Plant Physiol., 60**:286-289.

SCHEER, U. & FRANKE, W.W. 1972 - Annulate lamellae in plant cells: formation during microsporogenesis and pollen development in *Canna generalis* Bailey. **Planta, 107**:145-159.

SCHEL, J.H.N., KIEFT, H. & Van LAMMEREN, A.A.M. 1984 - Interactions between embryo and endosperm during early developmental stages of maize caryopses (*Zea mays*). **Can. J. Bot., 62**:2842-2853.

SCHNEIDER, M.M., HAMPP, R. & ZIEGLER, H. 1977 - Envelope permeability to possible precursors of carotenoid biosynthesis during chloroplast-chromoplast transformation. **Plant Physiol., 60**:518-520.

SCHULZ, P. & JENSEN, W.A. 1974 - *Capsella* embryogenesis : the development of the free nuclear endosperm. **Protoplasma, 80**:183-205.

_____ & _____ 1978 - Ultrastructural localization of acid phosphatase during female meiosis in *Capsella*. **J. Cell Biol., 79**:25a.

_____ & _____ 1981 - Pré-fertilization ovule development in *Capsella* : ultrastructure and ultracytochemical localization of acid phosphatase in the meiocyte. **Protoplasma, 107**:27-45.

SCHUMM, D.E. & WEBB, T.E. 1982 - Site of action of colchicine on RNA release from rat liver nuclei. **Biochem. Biophys. Res. Comm., 105**:375-382.

SCHWELITZ, F.D. 1974 - The presence of adenyl cyclase and phosphodiesterase in chloroplasts. **J. Cell Biol., 63**:306a.

SCOLES, G.J. & EVANS, L.E. 1979 - Pollen developmet in male-fertile and cytoplasmic male-sterile rye. **Can. J. Bot., 57**:2782-2790.

SELIGMAN, A. M., KARNOVSKY, M.J., WASSERKRUG, H.L. & HANKER, J.S. 1968 - Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB). **J. Cell Biol., 38**:1-14.

SEN, S.K. 1970 - Nuclear membrane and cytoplasmic lamellae at meiotic prophase of *Lilium* microsporocytes. **Cytologia, 35**:368-377.

SEXTON, R. & HALL, J.L. 1978 - Enzyme cytochemistry. In" **Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells**" pag. 63-147. Ed. J.L. Hall Elsevier/ North-Holland Biomedical Press.

SFAKIOTAKIS, E.M. 1978 - Germination in vitro of carob (*Ceratonia siliqua* L.) pollen. **Z. Planzenphysiol., 89**:443-447.

SHANNON, J.C. & LIU, K-C. 1984 - Glucose and sucrose uptake and conversion to starch by maize endosperm thin slices. **PLant Physiol, Supl., 75**:144.

SHAW, G. 1971 - The chemistry of sporopollenin. In "**Sporopollenin**" pag. 305-348. Ed. J. Brooks, P.R. Grant, M. Muir, P. van Gijzel & G. Shaw. Academic Press, London.

SHAW, J. G. 1966 - Acid phosphatase from tobacco leaves. **Arch. Biochem. Biophys., 117**:1-9.

SHAYKH, M.M. & ROBERTS, L.W. 1974 - A histochemical study of phosphatases in root apical meristems. **Ann. Bot., 38**:165-174.

SHEFFIELD, E. & BELL, P.R. 1979 - Ultrastructural aspects of sporogenesis in a fern, *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. **Ann. Bot., 44**:393-405.

SHELDON, J.M. & DICKINSON, H.G. 1983 - Determination of patterning in the pollen wall of *Lilium henryi*. **J. Cell Sci., 63**:191-208.

SHIFRIN, N. & LEVINE, L. 1968 - Cytochemical adenosinetriphosphatase in plant root meristem. **J. Cell Sci., 3**:423-436.

SHIMAKURA, K. 1934 - The capability of continuing divisions of the *Tradescantia* pollen mother cell in saccharose solution. **Cytologia, 5**:363-372.

SHOUP, J.R., OVERTON, J. & RUDDAT, M. 1980 - Ultrastructure and development of the sexine in the pollen wall of *Silene alba* (Caryophyllaceæ). **Bot. Gaz., 141**:379-388.

_____, _____ & _____ 1981 - Ultrastructure and development of the nexine and intine in the pollen wall of *Silene alba* (Caryophyllaceæ). **Amer. J. Bot., 68**:1090-1095.

SHUKLA, T.C. 1954 - Behavior of tapetal cells during microsporogenesis of *Lens esculenta* Moench. **Curr. Sci., 23**:365.

SIMPSON, D.J., BAQAR, M.R. & LEE, T.H. 1975 - Ultrastructure and carotenoid composition of chromoplasts of the sepals of *Strelitzia reginæ* Aiton during floral development. **Ann. Bot., 39**:175-183.

_____, CHICHESTER, C.O. & LEE, T.H. 1974 - Chemical regulation of plastid development. I. Inhibition of chlorophyll biosynthesis in detached pumpkin cotyledons by CPTA. A pigment and ultrastructural study. **Aust. J. Plant Physiol., 1**:119-133.

SINGH, A.P. & MOGENSEN, H.L. 1976 - Fine structure of early endosperm in *Quercus gambelii*. **Cytologia, 41**:345-361.

SINGH, H., OWENS, J.N. & DIETRICH, H.F. 1983 - Ultrastructure and development of the microsporangium of *Pseudostuga menziesii* (Mirb.) Franco. I. Dormant stages. **Amer. J. Bot., 70**:1272-1280.

SINGH, M.B & KNOX, R.B. 1984 - Invertases of *Lilium* pollen. Characterization and activity during in vitro germination. **Plant Physiol., 74**:510-515.

_____, MALIK, C.P. & SOOD, R. 1977 - Soluble and insoluble invertases in the pollen grains of *Pinus roxburghii*. **Z. Pflanzenphysiol., 81**:184-188.

SINGH, R., PEREZ, C.M., PASCUAL, C.G. & JULIANO, B.O. 1978 -Grian size, sucrose level and starch accumulation in developing rice grain. **Phytochemistry, 17**:1869-1874.

SIREVÅG, R. & LEVINE, R.P. 1973 - Transcription and translation for carotenoid synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Planta, 111**:73-84.

SITTE, P. 1953 - Citado por Heslop-Harrison, J. 1971b.

SKVARLA, J.J. 1971 - Dictyosome development during microsporogenesis in *Canna generalis*. In "**Pollen : Development and Physiology**" pag. 62-67. Ed. J. Heslop-Harrison. Butterworth, London.

_____ & LARSON, D.A. 1965 - An electron microscopic study of pollen morphology in the Compositæ with special reference to the Ambrosiinæ. **Grana, 6**:210-269.

_____ & _____ 1966 - Fine structural studies of *Zea mays* pollen. I. Cell membranes and exine ontogeny. **Amer. J. Bot., 53**:1112-1125.

_____ & ROWLEY, J.R. 1970 - The pollen wall of *Canna* and its similarity to the germinal apertures of other pollen. **Amer. J. Bot., 57**:519-529.

_____ & TURNER, B.L. 1969 - Fine structure of Petrobinæ (Compositæ - Helianthæ) pollen walls. **Amer. J. Bot., 56**:418-419.

SMART, M.G. & O'BRIEN, T.P. 1983 - The development of the wheat embryo in relation to the neighbouring tissues. **Protoplasma, 114**:1-13.

SMITH, C.J., BROWN, E.G., NEWTON, R.P., AL-NAJAFI, T. & EDWARDS, M.J. 1977 - Adenylate cyclase activity in higher plants. **Biochem. Soc. Trans., 5**:1351-1353.

SMYTH, D.R. 1982 - Proplastid DNA synthesis at pachytene in pollen mother cells of *Lilium henryi*. **J. Cell Sci., 56**:293-302.

_____ & SHAW, T. 1979 - Cytoplasmic DNA synthesis at meiotic prophase in *Lilium henryi*. **Aust. J. Bot., 27**:273-284.

SOPORY, S.K. 1979 - Effect of sucrose, hormones, and metabolic inhibitors on development of pollen embryoids in anther cultures of dihaploid *Solanum tuberosum*. **Can J. Bot.**, **57**:2691-2694.

SORSA, P. 1976 - Spore wall structure in Mniaceæ and some adjacent bryophytes. In" **The evolutionary significance of the exine**" pag. 211-229. Ed. I. K. Ferguson & J.Muller. Academic Press, London.

SOUTHWORTH, D. 1966 - Ultrastructure of *Gerbera jamesonii* pollen. **Grana, 6**:324-337.

_____ 1971 - Incorporation of radioactive precursors into developing pollen walls. In "**Pollen : Development and Physiology**" pag. 115-120. Ed. J. Heslop-Harrison. Butterworths, London.

_____ 1973 - Cytochemical reactivity of pollen walls. **J. Histochem. Cytochem., 21**:73-80.

_____ 1974 - Solubility of pollen exines. **Amer. J. Bot., 61**:36-44.

_____ 1983 - Exine develoment in *Gerbera jamesonii* (Asteraceæ : Mutisieæ). **Amer. J. Bot., 70**:1038-1047.

_____ 1985a - Pollen exine substructure. I. *Lilium longiflorum*. **Amer. J. Bot., 72**:1274-1283.

_____ 1985b - Pollen exine substructure. II. *Fagus sylvatica*. **Grana, 24**:161-166.

_____ 1986 - Pollen exine substructure. III. *Juniperus communis*. **Can. J. Bot., 64**:983-987.

SOUVRÉ, A. 1971 - Action du froid sur les microsporocytes et le tapis du *Rhoeo discolor* Hance. **Ann. Univ. et A.R.E.R.S., 9**:214-219.

_____ 1974 - Étude autoradiographique de l'action du froid sur les synthèses de DNA et de RNA dans les cellules-mères polliniques et le tapis du *Rhoeo discilor* Hance (Commélinacées). **C.R. Acad. Sc. Paris, 279**:555-558.

_____ 1981 - Étude cytophysiologique et ultrastructurale de l'action du froid sur les microsporocytes et le tapis du *Rhoeo discolor* Hance, par cytochimie, cytophotometrie, autoradiographie et MET. Thèse Docteur d'Etat.

_____ & ALBERTINI, L. 1974 - Cytophotometric study of the influence of cold on DNA synthesis in the staminal tissues of the *Rhoeo discolor* Hance. In" **Fertilization in Higher Plants**" pag. 57-63. Ed. H.F.Linskens. North-Holland Publishing Comp. Amsterdam, The Netherlands.

_____ & _____ 1978 - Étude autoradiographique de l'action du froid sur les synthèses nucléaires du RNA et des protéines dans les microsporocytes et le tapis chez le *Rhoeo discolor* Hance. **Soc. bot. Fr., Actualités botaniques, 1-2**:33-37.

_____ & _____ 1982 - Étude des modifications de l'ultrastructure du tapis plasmodial du *Rhoeo discolor* Hance au cours du développement de l'anthère, en rélation avec les données cytochimiques et autoradiographiques. **Rev. Cytol. Biol. végét.- Bot., 5**:151-169.

SPITZER, N.C. 1970 - Low resistance connections between cells in the developing anther of the lily. **J. Cell Biol., 45**:565-575.

SPORNE, K.R. 1973 - A note on the evolutionary status of tapetal types in Dicotyledons. **New Phytol., 72**:1173-1174.

SPREY, B. 1976 - Intrathylakoidal occurrence of ribulose 1,5-diphosphate carboxylase in spinach chloroplasts. **Z. Pflanzenphysiol., 78**:85-89.

_____ 1977 - Lamellae-bound inclusions in isolated spinach chloroplasts. I. Ultrastructure and isolation. **Z. Pflanzenphysiol., 83**:159-179.

_____ & LAMBERT, C. 1977 - Lamellae-bound inclusions in isolated spinach chloroplasts. II. Identification and composition. **Z. Pflanzenphysiol., 83**:227-248.

SRINIVASAN, A.R. 1941 - Citado por Sankara Rao, K. & Chinnappa, C.C. 1983.

SRIVASTAVA, L.M. 1966 - On the fine structure of the cambium of *Fraxinus americana* L. **J. Cell Biol., 31**:79-93.

_____, SAWHNEY, V.K. & BONETTEMAKER, M. 1977 - Cell growth, wall deposition, and correlated fine structure of colchicine-treated lettuce hypocotyl cells. **Can. J. Bot., 55**:902-917.

STADLER, J. & FRANKE, W.W. 1974 - Characterization of the colchicine binding of membrane fractions from rat and mouse liver. **J. Cell Biol., 60**:297-303.

STANLEY, R.G. 1971 - Pollen chemistry and tube growth. In "**Pollen : Development and Physiology**" pag. 131-155. Ed. J. Heslop-Harrison. Butterworths, London.

STANLEY, R.G. & LINSKENS, H.F. 1974 - **Pollen : Biology, Biochemistry, Management**. Springer-Verlag, Berlin and New York.

STEBBINS, G.L., SHAH, S.S., JAMIN, D. & JURA, P. 1967 - Changed orientation of the mitotic spindle of stomatal guard cell divisions in *Hordeum vulgare*. **Amer. J. Bot., 54**:71-80.

STEER, M.W. 1977a - Differentiation of the tapetum in *Avena*. I. The cell surface. **J.Cell Sci., 25**:125-138.

_____ 1977b - Differentiation of the tapetum in *Avena*. II. The endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. **J. Cell Sci., 28**:71-86.

STEFFEN, K. & LANDMANN, W. 1958a Citado por Vasil, I.K. 1967.

_____ & _____ 1958b - Citado por Sankara Rao, K. & Chinnappa, C.C. 1983.

STEINKAMP, M.P. & DOYLE, W.T. 1979 - Spore wall ultrastructure in four species of the liverwort *Riccia*. **Amer. J. Bot., 66**:546-556.

STERN, H. 1961 - Citado por Stanley, R.G. & Linskens, H.F. 1974.

_____ & HOTTA, Y. 1968 - Citado por Stanley, R.G. & Linskens, H.F. 1974.

STETLER, D.A. & LAETSCH, W.M. 1969 - Chloroplast development in *Nicotiana tabacum* "Maryland Mammoth". **Amer. J. Bot., 56**:260-270.

STEVENS, V.A.M. & MURRAY, B.G. 1981 - Studies on heteromorphic self-incompatibility systems: the cytochemistry and ultrastructure of the tapetum of *Primula obconica*. **J. Cell Sci., 50**:419-431.

STIEGLITZ, H.B. 1973 - Interaction of meiotic and somatic cells at the termination of meiosis in anther of *Lilium*. **J. Cell Biol., 59**:337a.

_____ 1977 - Role of ß-1,3-glucanase in postmeiotic microspore release. **Dev. Biol., 57**:87-97.

STONE, D.E., SELLERS, S.C. & KRESS, W. J. 1979 - Ontogeny of exineless pollen in *Heliconia*, a banana relative. **Ann. Missouri Bot. Gard., 66**:701-730.

_____, _____ & _____ 1981 - Ontogenetic and evolutionary implications of a neotenous exine in *Tapeinochilos* (Zingiberales : Costaceæ) pollen. **Amer. J. Bot., 68**:49-63.

STRAIN, H.H., COPE, B.T. & SVEC, W.A. 1971 - Analytical procedures for the isolation, identification, estimation, and investigation of the chlorophylls. In "**Methods in Enzymology, Vol. 23 Part A**" pag. 452-476. Ed. A. San Pietro. Academic Press.

SUAREZ-CERVERA, M. & SEOANE-CAMBA, A. 1986 - Ontogenèse des grains de pollen de *Lavandula dentata* L. et évolution des cellules tapétales. **Pollen et Spores, XXVIII**:5-28.

SUBBARAYAN, C., KUSHWAHA, S.C., SUZUE, G. & PORTER, J.W. 1970 -Enzymatic conversion of isopentenyl pyrophosphate-4-^{14}C and phytoene-^{14}C to acyclic carotenes by an ammonium sulfate-precipitated spinach enzyme system. **Arch. Biochem. Biophys., 137**:547-557.

SUNDERLAND, N. & ROBERTS, M. 1977 - New approach to pollen culture. **Nature, 270**:236-238.

SUNDQVIST, C. & RYBERG, H. 1979 - Structure of protochlorophyll-containing plastids in the inner seed coat of pumpkin seeds (*Cucurbita pepo*). **Physiol. Plant. 47**:124-128.

SUTFELD, R. & WIERMANN, R. 1980 - Chalcone synthesis with enzyme extracts from tulip anther tapetum using a biphasic enzyme assay. **Arch. Biochem. Biophys. 201**:64-72.

SUTHERLAND, E.W., RALL, T.W. & MENON, T. 1962 - Adenyl cyclase. I. Distribution, preparation, and properties. **J. Biol. Chem., 237**:1220-1227.

SUZUKI, S. 1978 - Crystalline inclusion in epidermal and vascular plastids of the mature *Amaranthus* leaf. **J. Elect. Microsc., 27**:141-143.

TAKATS, S.T. 1962 - An attempt to detect utilization of DNA breakdown products from the tapetum for DNA synthesis in the microspores of *Lilium longiflorum*. **Amer. J. Bot., 49**:748-758.

TAYLOR, E.W. 1965 - The mechanism of colchicine inhibition of mitosis. I. Kinetics of inhibition and the binding of H^3-colchicine. **J. Cell Biol., 25**:145-160.

THIERY, J-P. 1967 - Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie éelectronique. **J. Microscopie, 6**:987-1018.

THOMAS, S.M. & AP REES, T. 1972 - Gluconeogenesis during the germination of *Cucurbita pepo*. **Phytochemistry, 11**:2177-2185.

THOMOPOULOS, G.N. & KASTRITSIS, C.D. 1983 - Activities of the nuclear envelope in the salivary glands of *Drosophila*. **Cell Tissue Res., 228**:497-509.

THORNE, J.H. 1982 - Characterization of the active sucrose transport system of immature soybean embryos. **Plant Physiol., 70**:953-958.

THORNTON, R.N. The fine structure of *Phycomyces*. I. Autophagic vesicles. **J. Ultr. Res., 21**:269-280.

TICE, L.W. 1969 - Lead-adenosine triphosphatase complexes in adenosine triphosphatase histochemistry. **J. Histochem. Cytochem., 17**:85-94.

TILNEY, L.G. 1968 - Studies on the microtubules in Heliozoa. IV. The effect of colchicine on the formation and maintenance of the axopodia and the redevelopment of pattern in *Actinosphaerium nucleofilum* (Barrett). **J. Cell Sci., 3**:549-562.

_____ & PORTER, K.R. 1967 - Studies on the microtubules in Heliozoa. II. The effect of low temperatures on these structures in the formation and maintenance of the axopodia. **J. Cell Biol., 34**:327-343.

TIWARI, S.C. & GUNNING, B.E.S. 1986a - Development of tapetum and microspores in *Canna* L.: an example of an invasive but non-syncytial tapetum. **Ann. Bot. 57**:557-563.

_____ & _____ 1986 b - Cytoskeleton, cell surface and the development of invasive plasmodial tapetum in *Tradescantia virginiana* L. **Protoplasma, 133**:89-99.

_____ & _____ 1986 c - An ultrastructural, cytochemical and immunofluorescence study of postmeiotic development of plasmodial tapetum in *Tradescantia virginiana* L. and its relevance to the pathway of sporopollenin secretion. **Protoplasma, 133**:100-114.

_____ & _____ 1986 d - Colchicine inhibits plasmodium formation and disrupts pathways of sporopollenin secretion in the anther tapetum of *Tradescantia virginiana* L. **Protoplasma, 133**:115-128.

_____ & _____ 1986 e - Development and cell surface of a non-syncytial invasive tapetum in *Canna*: ultrastructure, freeze-substitution, cytochemical and immunofluorescence study. **Protoplasma, 134**:1-16.

TIZIO, R., SAUSSAY, R. & GAUTHERET, R. 1970 - Action de quelques gibberellines sur la rhizogenèse de fragments de rhizomes de Topinambour cultivés *in vitro*. **C. R. Acad. Sc. Paris, 270**:2088-2092.

TOLEDO, L.A., BENNETT, M.D. & STERN, H. 1979 - Cytological investigations of the effect of colchicine on meiosis in *Lilium* hybrid cv. "Black Beauty" microsporocytes. **Chromosoma (Berl.), 72**:157-173.

TOMB, A.S., LARSSON, D.A. & SKVARLA, J.J. 1974 - Pollen morphology and detailed structure of family Compositæ, tribe Cichorieæ. I. Subtribe Stephanomeriinæ. **Amer. J. Bot., 61**:486-498.

TOTH, R. & KUIJT, J. 1976 - Anatomy and ultrastructure of the young haustorial gland in *Comandra* (Santalaceæ). **Can. J. Bot., 54**:2315-2327.

_____ & _____ 1977 - Cytochemical localization of acid phosphatase in endophyte cells of the semiparasitic angiosperm *Comandra umbellata* (Santalaceæ). **Can. J. Bot., 55**:470-475.

TOURTE, Y. 1970 - Nature, origine et évolution d'enclaves cytoplasmiques particulières au cours de l'oogénèse chez le *Pteridium aquilinum* L. **Rev. Cytol. et Biol vég., 33**:311-324.

_____ 1975 - Étude infrastructurale de l'oogénèse chez une Ptéridophyte. II - Évolution des mitochondries et des plastes. **J. Microsc. Biol. Cell., 23**:301-316.

TRAVIS, R.L. & BOOZ, M. L. 1979 - Partial characterization of a potassium-stimulated adenosine triphosphatase from the plasma membrane of meristematic and mature soybean root tissue. **Plant Physiol., 63**:573-577.

TREHARNE, K.J., MERCER, E.I. & GOODWIN, T.W. 1966 - Incorporation of [^{14}C] carbon dioxide and [2- ^{14}C] mevalonic acid into terpenoids of higher plants during chloroplast development. **Biochem. J., 99**:239-245.

TRIVEDI, B.S. & KHER, U. 1977 - Effect of gibberellic acid on the ultrastructural morphology of the cells of *Lygodium flexuosum* (L.) Sw. gametophyte. **Curr. Sci., 46**:85-86.

TU, J.C. 1979 - Biochemical and histochemical investigation of diurnal variation in cAMP concentration and adenylate cyclase activity in white dutch clover. **Protoplasma, 99**:139-146.

TURALA, K. 1958 - Citado por Franceschi, V.R. & Horner, H.T. Jr., 1979.

_____ 1963 - Citado por Franceschi, V.R. & Horner, H.T. Jr., 1979.

TZARVULKOVA-DENKOVA, R., STANEVA, L., BOYADJIEVA-MICHAILOVA, A. & HADJIOLOFF, A.I. 1982 - Electron microscopic cytochemistry of adenylate cyclase in the ovarian compartments of ground squirrel during the annual cycle. **Acta histochem., 70**:115-121.

UNZELMAN, J.M. & HEALEY, P.L. 1974 - Development, structure, and occurrence of secretory trichomes of *Pharbitis* **Protoplasma, 80**:285-303.

VALENTINE, R.C. 1966 - Citado por Salema, R. 1969.

Van Der PIJL, L. 1964 - Citado por Dickinson, H.G. 1973.

Van HASSELT, P.R. & STRIKWERDA, J.T. 1976 - Pigment degradation in discs of the thermophilic *Cucumis sativus* as affected by light, temperature, sugar application and inhibitors. **Physiol. Plant., 37**:253-257.

Van STEVENINCK, R.F.M. 1979 - The verification of cytochemical tests for ATPase activity in plant cells using X-ray microanalysis. **Protoplasma, 99**:211-220.

VASIL, I.K. 1957 - Effect of kinetin and gibberellic acid on excised anthers of *Allium cepa* **Phytomorphology, 7**:138-149.

_____ 1959 - Citado por Stanley, R.G. & Linskens, H.F. 1974.

_____ 1967 - Physiology and cytology of anther development. **Biol. Rev., 42**:327-373.

_____ 1973 - The new biology of pollen. **Naturwissenschaften, 60**:247-253.

_____ 1978 - The ultrastructure of pollen development in gymnosperms. **Bull. Soc. bot. Fr., Actualités Botaniques, 125**:115-120.

_____ & ALDRICH, H.C. 1970 - A histochemical and ultrastructural study of the ontogeny and differentiation of pollen in *Podocarpus macrophyllus* D. Don. **Protoplasma, 71**:1-37

_____ & _____ 1971 - Histochemistry and ultrastructure of pollen development in *Podocarpus macrophyllus* D.Don. In "**Pollen: Development and Physiology**" pag. 70-74. Ed. J.Heslop-Harrison. Butterworths, London.

VAUGHN, K.C. 1982 - Cytochemical demonstration of DNAse in pollen **Histochemistry, 73**:487-491.

_____, KIMPEL, D.L. & WILSON, K.G. 1980 a - Investigations of the plastome of *Chlorophytum*. **J. Heredity, 71**:154-157.

_____ & WILSON, K.G. 1980 - A dominant plastome mutation in *Hosta* **J. Heredity, 71**:203-206.

_____, _____ & REIBACH, P.H. 1980 b - Ultrastructure and biochemistry of two mutants in *Hosta* (Liliaceæ). **Cytobios, 27**:71-80.

VAZART, B. 1970 - Morphogénèse du sporoderme et participation des mitochondries à la mise en place de la primexine dans le pollen de *Linum usitatissimum* L. **C.R. Acad. Sc. Paris, 270**:3210-3212.

VENABLE, J.H. & COGGESHALL, R. 1965 - A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. **J. Cell Biol. 25**:407-408.

VENOT, C., JORDAN, G. & STAHL, A. 1979 - Étude ultrastructurale de l'organisateur nulcéolaire au cours de la prophase méiotique de la cellule mère de la microspore chez *Tradescantia virginiana* L. **C.R.Acad. Sc. Paris, 288**:391-393.

VERCHER, Y., MOLOWNY, A., LOPEZ, C., GARCIA-MARTINEZ, J.L. & CARBONELL, J. 1984 Structural changes in the ovary of *Pisum sativum* L. induced by pollination and gibberellic acid **Plant Sci. Letters, 36**:87-91.

VIGIL, E.L. 1970 - Cytochemical and developmental changes in microbodies (glyoxysomes) and related organelles of castor bean endosperm. **J. Cell Biol., 46**:435-454.

_____ & RUDDAT, M. 1973 - Effect of gibberellic acid and actinomycin D on the formation and distribution of rough endoplasmic reticulum in barley aleurone cells. **Plant Physiol., 51**:549-558.

VIJAYARAGHAVAN, M.R. & PADMANABHAN, U. 1969 - Citado por Sankara Rao, K. & Chinnappa C.C. 1983.

_____ & RATNAPARKHI, S. 1973 - Dual origin and dimorphism of the anther tapetum in *Alectra thomsoni* Hook. **Ann. Bot., 37**:355-259.

_____ & SHUKLA, A.K. 1976 - The nature of covering around the aggregate of microspores in *Pergularia daemia* (Forsk.) McC. & Blat. **Ann. Bot., 40**:417-421.

_____ & _____ 1977 - Absence of callose around the microspore tetrad and poorly developed exine in *Pergularia daemia*. **Ann. Bot., 41**:923-926.

VITHANAGE, H.I.M.V. & KNOX, R.B. 1976 - Pollen-wall proteins : quantitative cytochemistry of the origins of intine and exine enzymes in *Brassica oleracea*. **J. Cell Sci., 21**:423-435.

_____ & _____ 1979 - Pollen development and quantitative cytochemistry of exine and intine enzymes in sunflower, *Helianthus annuus* L. **Ann. Bot., 44**:95-106.

_____ & _____ 1980 - Periodicity of pollen development and quantitative cytochemistry of exine and intine enzymes in the grasses *Lolium perenne* L. and *Phalaris tuberosa* L. **Ann. Bot., 45**:131-141.

VORBRODT, A.W., SZUMANSKA, G. & BOBROGOWSKA, D.H. 1984 - Cytochemical studies of adenylate cyclase in the choroid plexus and brain vessels of rat and mouse. **J. Histochem. Cytochem., 32**:275-284.

WACHSTEIN, M.& MEISEL, E. 1956 - Citado por Leskes, A., Sievers, P. & Palade, G.E. 1971.

_____ & _____ 1957 - Citado por Rowley, J.R., Dahl, A.O. & Skvarla, J.J. 1973.

WAGNER, R.C. & BITENSKY, M.W. 1973 - Adenylate cyclase. In "**Electron Microscopy of Enzymes. Principles and Methods. Vol.2**" pag. 110-131. Ed. M.A. Hayat. Van Nostrand Reinhold Comp., London and New York.

WALKER, D.A. 1976 - Plastids and intracellular transport. In "**Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Vol. 3**" pag.85-136. Ed. C.R.Stocking & U. Heber. Springer Verlag, New York.

WALKER, G.W.R. 1957 - The effects of colchicine on microsporogenesis in cultured anthers of *Tradescantia paludosa*. **Amer. J. Bot., 44**:690-696.

WALKER, P.R. & WHITFIELD, J.F. 1985 - Cytoplasmic microtubules are essential for the formation of membrane-bound polyribosomes. **J. Biol. Chem., 260**:765-770.

WANG, C-T. & NOBEL, P.S. 1971 - Permeability of pea chloroplasts to alcohols and aldoses as measured by reflection coefficients. **Biochim. Biophys. Acta, 241**:200-212.

WARMKE, H.E. & LEE, S-L. J. 1977 - Mitochondrial degeneration in Texas cytoplasmic male-sterile corn anthers. **J. Heredity, 68**:213-222.

WARREN, R.H. 1968 - The effect of colchicine on myogenesis *in vivo* in *Rana pipiens* and *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). **J. Cell Biol., 39**:544-555.

WASHITANI, I. & SATO, S. 1977 - Studies on the formation of proplastids in the metabolism of *in vitro* -cultured cells. IV. Gluconeogenetic pathway. **Plant & Cell Physiol., 18**:1243-1251.

WASSERMANN, D. 1976 - Multiple rough endoplasmic cisternae in "C" cells. **Cell Tissue Res., 170**:89-94.

WATERKEYN, L. 1962 - Les parois microsporocytaires de nature callosique chez *Helleborus* et *Tradescantia*. **Cellule, 62**:225-255.

_____ 1964 - Callose microsporocytaire et callose pollinique. In "**Pollen : Physiology and Fertilization**" pag. 52-58. Ed. H.F. Linskens. North Holland Publishing Comp., Amsterdam.

_____ & BIENFAIT, A. 1968 - La paroi spéciale callosique et les premiers dépôts de l'exine chez *Ipomoea purpurea* (L.) Roth. **C. R. Acad. Sc. Paris, 267**:56-58.

_____ & _____ 1970 - On a possible function of the special callosic wall in *Ipomoea purpurea* (L.) Roth. **Grana, 10**:13-20.

WATSON, R. & HALPERIN, W. 1981 - Reinvestigation of the effects of hormones and sugars on xylogenesis in cultured Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) tuber slices, with particular emphasis on the effects of different methods of media preparation and time analysis. **Z. Pflanzenphysiol., 101**:145-158.

WEIBEL, E.R. & PALADE, G.E. 1964 - New cytoplasmic components in arterial endothelia. **J. Cell Biol., 23**:101-112.

WEILING, F. 1962a - Uber Pinocytose-Mechanismen im Verlauf der Meiose bei *Lycopersicum* und *Cucurbita* unter Berucksichtigung ihrer Bedeutung sowie der Literatur uber Pinocytose bei Tier und Mensch. I. Die Verhaltnisse bei Tomate und Kurbis. **Protoplasma, 55**:372-405.

WEILING, F. 1962b - Uber Pinocytose-Mechanismen im Verlauf der Meiose bei *Lycopersicum* und *Cucurbita* unter Berucksichtigung ihrer Bedeutung sowie der Literatur uber Pinocytose bei Tier und Mensch. II. Kritische Besprechung und Ausdeutung der Beobachtungen. **Protoplasma, 55**:452-496.

WEINSTOCK, S.B., KOPITO, R.R., ENDERMANN, G., TOMERA, J.F., MARINIER, E., MURRAY, D.M. & BRUNENGRABER, H. 1984 - The shunt pathway of mevalonate metabolism in the isolated perfused rat liver. **J. Biol. Chem., 259**:8939-8944.

WELLBURN, A.R., ASHBY, J.P. & WELLBURN, F.A.M. 1973 - Occurrence and biosynthesis of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in isolated *Avena* etioplasts. **Biochim. Biophys. Acta, 320**:363-371.

_____ & HAMPP, R. 1976 - Uptake of mevalonate and acetate during plastids development. **Biochem. J., 158**:231-233.

WHELAN, E.D.P. 1974 - Discontinuities in the callose wall, intermeiocyte connections, and cytomixis in angiosperm meiocytes. **Can. J. Bot., 52**:1219-1224.

_____, HAGGIS, G.H. & FORD, E.J. 1974 - Scanning electron microscopy of the callose wall and intermeiocyte connections in angiosperms. **Can. J. Bot., 54**:1215-1218.

WHIPPLE, A.P. & MASCARENHAS, J.P. 1978 - Lipid synthesis in germinating *Tradescantia* pollen. **Phytochemistry, 17**:1273-1274.

WIERMANN, R. 1970 - Die Synthese von Phenylpropanen wahrend der Pollenentwicklung. **Planta, 95**:133-145.

_____ 1979 - Stage-specific phenylpropanoid metabolism during pollen development. In "**Regulation of Secondary Product and Plant Hormone Metabolism**" pag. 231-299. Ed. M. Luckner & L. Schreiber. Pergamon Press, Oxford-New York.

_____ 1981 - Secondary plant products and cell and tissue differentiation. In "**The Biochemistry of Plants, Vol 7: Secondary Plant Products**" pag. 85-116. Ed. P.K. Stumpf & E.E. Conn. Academic Press, New York-London.

_____ & VIETH, K. 1983 - Outer pollen wall, an important accumulation site for flavonoids. **Protoplasma, 118**:230-233.

WILLEMSE, M.T.M. 1971a - Morphological and fluorescence microscopical investigation on sporopollenin formation at *Pinus sylvestris* and *Gasteria verrucosa*. In "**Sporopollenin**" pag. 68-107. Ed. J. Brooks, P.R. Grant, M. Muir, P. van Gijzel & G. Shaw. Academic Press.

_____ 1971b - Morphological changes in the tapetal cell during microsporogenesis of *Pinus sylvestris* (L.). **Acta Bot. Neerl., 20**:611-623.

_____ 1971c - Morphological and quantitative changes in the population of cell organelles during microsporogenesis of *Pinus sylvestris* L. I. Morphological changes from zygotene until prometaphase I. **Acta Bot. Neerl., 20**:261-274.

_____ 1971d - Morphological and quantitative changes in the population of cell organelles during microsporogenesis of *Pinus sylvestris* L. II. Morphological changes from prometaphase I until the tetrad stage. **Acta Bot. Neerl., 20**:411-427.

_____ 1971e - Morphological and quantitative changes in the population of cell organelles during microsporogenesis of *Pinus sylvestris* L. III. Morphological changes during the tetrad stage and in the young microspore. A quantitative approach to the changes in the population of cell organelles. **Acta Bot. Neerl., 20**:498-521.

_____ 1972 - Morphological and quantitative changes in the population of cell organelles during microsporogenesis of *Gasteria verrucosa*. **Acta Bot. Neerl., 21**:17-31.

_____ & REZNICKOVA, S.A. 1980 - Formation of pollen in the anther of *Lilium*. I. Development of the pollen wall. **Acta Bot. Neerl., 29**:127-140.

WILLIAMS, E. & HESLOP-HARRISON, J. 1975 - Membrane-bounded cisternae associated with the chromosomes at first meiotic metaphase in microsporocytes of *Rhoeo spathacea*. **Protoplasma, 86**:285-289.

_____, _____ & DICKINSON, H.G. 1973 - The activity of the nucleolus organising region and the origin of cytoplasmic nucleoloids of *Lilium*. **Protoplasma, 77**:79-93.

WILSON, L. & MEZA, I. 1973 - The mechanism of action of colchicine. Colchicine binding properties of sea urchin sperm tail outer doublet tubulin. **J. Cell Biol., 58**:709-719.

WINTER-SLUITER, E., LAUCHLI, A. & KRAMER, D. 1977 - Cytochemical localization of K^+-stimulated adenosine triphosphatase activity in xylem parenchyma cells of barley roots. **Plant Physiol., 60**:923-927.

WIRKUS, E.R. & MEENAKSHI, G. 1968 - Ultrastructural study of the cytological effects of colchicine on the meristematic cells of the root tip of *Allium cepa*. **J. Cell Biol.,**

39:182a.
WISCHNITZER, S. 1970 - The annulate lamellae. **Int. Rev. Cytol., 27**:65-100.
WOLLENWEBER, E. & WIERMANN, R. 1979 - On the pigmentation of the pollen of *Nothofagus antarctica* (Forst.) Oerst. (Fagaceæ). **Z. Naturforsch., 34c**: 1289-1291.
WOLNIAK, S.M. 1976 - Organelle distribution and apportionment during meiosis in the microsporocyte of *Ginkgo biloba* L. **Amer. J. Bot., 63**:251-258.
WOOD, A. & PALEG, L.G. 1974 - Alteration of liposomal membrane fluidity by gibberellic acid. **Aust. J. Plant Physiol., 1**:31-40.
WOODCOCK, C.L.F. & BELL, P.R. 1968 - Features of the ultrastructure of the female gametophyte of *Myosurus minimus*. **J. Ultr. Res., 22**:546-563.
WRIGLEY, A. & LORD, J.M. 1977 -The effects of gibberellic acid on organelle biogenesis in the endosperm of germinating castor bean seeds. **J. Exp. Bot., 28**:345-353.
WRISCHER, M. 1977 - Ultrastructural localization of photosystem I in plastids of senescent spinach leaves. **Acta Bot. Croat., 36**:57-61.
_____ 1978a -Ultrastructural changes in plastids of detached spinach leaves. **Z. Pflanzenphysiol., 86**:95-106.
_____ 1978b - Ultrastructural localization of diaminobenzidine photo-oxidation in ethiochloroplasts. **Protoplasma, 97**:85-92.
WUNDERLICH, F., MULLER, R. & SPETH, V. 1973 - Direct evidence for a colchicine-induced impairment in the mobility of membrane components. **Science, 182**:1136-1138.
YABUTA, T. 1935 -Citado por Crozier, A. 1981.
YEUNG, E.C. 1983 - Developmental changes in the branched parenchyma cells of bean-seeds coat. **Protoplasma, 118**:225-229.
YOUNT, R.G., BABCOCK, D., BALLANTYNE, W. & OJALA, D. 1971 - Adenylyl imidodiphosphate, an adenosine triphosphate analog containing a P-N-P linkage. **Biochemistry, 10**:2484-2489.
ZAVADA, M.S. 1983 - Pollen wall development of *Zamia floridana* . **Pollen et Spores, XXV**:287-304.
ZETZSCHE, F. 1932 - Citado por Heslop-Harrison, J. 1968b.
_____ & HUGGLER, L. 1928 - Citado por Heslop-Harrison, J. 1968b.
_____, KALT, P., LIECHTI, J. & ZIEGLER, E. 1937 - Citado por Heslop-Harrison, J. 1968b.
_____ & VICARI, H. 1931 - Citado por Heslop-Harrison, J. 1968b.
ZINK, M.W. 1980 - Acid phosphatases of *Ipomoea* sp. cultured *in vitro* . 2. Influence of gibberellic acid on the formation of phosphatases. **Can. J. Bot., 58**:2171-2180.