ILDA DA CONCEIÇÃO ABREU DE NORONHA

ESTUDO ULTRASTRUTURAL E CITOQUÍMICO DA MICROSPOROGÉNESE EM *CUCUMIS SATIVUS L.*

PORTO
1984

ILDA DA CONCEIÇÃO ABREU DE NORONHA

Instituto de Botânica, Faculdade de Ciências, U.P.

Centro de Citologia Experimental, U.P.

ESTUDO ULTRASTRUTURAL E CITOQUIMICO DA MICROSPOROGENESE EM CUCUMIS SATIVUS L.

P O R T O

1984

I L D A D A C O N C E I Ç Ã O A B R E U D E N O R O N H A
Licenciada em Biologia, Instituto de Botânica da
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

ESTUDO ULTRASTRUTURAL E CITOQUIMICO DA MICROSPOROGENESE EM CUCUMIS SATIVUS L.

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE DOUTOR APRESENTADA À FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO

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

P O R T O
1984

Publicação subsidiada pelo Instituto
Nacional de Investigação Científica
(INIC)

Na elaboração desta Dissertação, de acordo com o apresentado no ponto 2 do Art. 8º do Decreto-Lei 388/70, utilizaram-se dados constantes dos seguintes trabalhos publicados sob o nome I. Abreu:

- Abreu, I. & Dexheimer, J. 1973. Étude des variations présentées pendant la gamétogenèse pra les organites cytoplasmiques de la cellule vegetative des grains de pollen de quelques espèces d'angiospermes. Rev. gén. Bot., 80:245-278.
- 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. 1982. Atypical mitochondria during microsporogenesis in Cucumis sativus L.. J. Submicr. Cytol., 14:367-375.

e das seguintes comunicações:

- Santos, A. & Abreu, I. 1976. Um novo processo de degenerescência das células do tapete durante o desenvolvimento do grão de pólen. XI Reunião Anual da SPME, Lisboa.
- Santos, A. & Abreu, I. 1977. Aspectos ultrastruturais da ontogenia das células to tapete de anteras de Cucumis sativus L.. XII Reunião Anual da SPME, Porto.
- Abreu, I. & Santos, A. 1977. Alterações ultrastruturais das mitocôndrias durante a microsporogénese em Cucumis sativus L..XII Reunião Anual da SPME, Porto.
- Santos, A., Abreu, I. & Salema, R. 1980. Effect of 2,4-dinitrophenol in mitochondria during the microsporogenesis in Cucumis sativus L.. Ciênc. Biol., 5(4):28a (abstract).

- Abreu, I., Santos, A. & Salema, R. 1982. Ultrastructural studies of mitochondria during microsporogenesis in Cucumis sativus L. subjected to various treatment. Ciênc. Biol., 7(1,2):29a (abstract).
- Abreu, I., Santos, A. & Salema, R. 1982. Cytochemical localization of cytochrome oxidase and succinic dehydrogenase in anthers of Cucumis sativus L.. Ciênc. Biol., 7(3):39a(abstract).
- Abreu, I. & Salema R. 1982. Cytochemical localization of phosphatases in Cucumis sativus L.. Ciênc. Biol., 7(4):73a (abstract).
- Abreu, I.& Salema, R. 1982. Mitochondrial behaviour during meiosis in Cucumis sativus L. anthers. Ciênc. Biol., 7(4): 73a (abstract).
- Abreu, I., Sá, C. & Salema, R. 1984. Some morphological characteristics of the pollen grain of Cucumis sativus L.. Ciênc. Biol., 9:60-61 (abstract).
- Abreu, I., Sá, C. & Salema, R. 1984. Anatomic study of the androecium of Cucumis sativus L.. Ciênc. Biol., 9:82-83 (abstract).
- Abreu, I. & Salema, R. 1984. Effects of cytochalasin B in the development of Cucumis sativus L.. Ciênc. Biol., 9:84-85 (abstract).

tendo participado na programação e elaboração das experiências, interpretação e discussão dos resultados e na redacção dos respectivos textos.

A G R A D E C I M E N T O S

Os mais vivos agradecimentos ao Sr. Professor Doutor R. Salema pela superior orientação que deu durante a realização deste trabalho. Foi com ele que realizámos os primeiros trabalhos de microscopia electrónica e a ele devemos o essencial da nossa formação científica. Agradecemos-lhe sinceramente o interesse que sempre manifestou pelas nossas iniciativas, sendo de salientar as suas sugestões e valiosas críticas. A sua grande competência, o seu dinamismo e dedicação são exemplos a seguir quer como Professor quer como Investigador.

Ao Sr. Professor Doutor A. Rozeira, já falecido e antigo Director do Instituto de Botânica "Dr. Gonçalo Sampaio", a nossa gratidão pelo entusiasmo com que nos recebeu e toda a sua boa vontade ao permitir que, embora sendo Investigador daquele Instituto, efectuássemos os nossos trabalhos de investigação no Centro de Microscopia Electrónica. Nesta sequência de ideias, também, ao Sr. Professor Doutor R. Salema, como Presidente da Comissão Directiva do Instituto de Botânica, testemunhamos o nosso agradecimento pelas facilidades e apoio que sempre nos tem concedido para o desenvolvimento do nosso trabalho de investigação. Muito agradecemos todos os esforços dispendidos no sentido de melhorar as nossas condições de trabalho.

Este trabalho foi realizado no Centro de Microscopia Electrónica da Universidade do Porto actualmente incorporado no Centro de Citologia Experimental. À Direcção deste Centro os nossos agradecimentos pelo interesse que sempre dedicou à nossa actividade bem como pelo estímulo e facilidades sempre dadas para a realização dos nossos trabalhos.

Aos Srs. Doutores Isabel Santos e Manuel Teixeira da Silva queremos expressar o nosso agradecimento pelo apoio prestado sempre que a eles recorremos.

Agradecemos a todo o pessoal do Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto e em particular à Srª D. Andréa Costa pela colaboração técnica prestada na elaboração das pro

vas fotográficas e à Sra D. Maria Helena Carvalho pela disponibilidade e interesse que manifestou nos trabalhos de dactilografia.

O nosso agradecimento ao Engº Carlos de Sá do Centro de Metalurgia e Ciência dos Materiais da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto pela realização do trabalho de microscopia electrónica de varrimento e ao Sr. Emanuel Monteiro do Instituto de Ciências Biomédicas "Abel Salazar" pelo valioso auxílio que dispensou na preparação desse material.

Expressamos também os agradecimentos a todos os que directa ou indirectamente contribuiram para a elaboração deste trabalho.

Ao Instituto Nacional de Investigação Científica (INIC) queremos expressar o agradecimento pelos subsídios e concessão de bolsa que nos atribuiu. Graças a esta Instituição foi possível realizar um estágio no Departamento de Botânica da Universidade de Nancy (França), onde tivemos oportunidade de trabalhar com o Professor Doutor J. Dexheimer com quem iniciámos os trabalhos sobre microsporogénese. Ao Professor J. Dexheimer e a todos os que trabalhavam naquele Departamento os nossos agradecimentos.

Í N D I C E

I - INTRODUÇÃO 1

II - MATERIAL E MÉTODOS 13

A - Material 13

B - Métodos 14

III - RESULTADOS 24

1 - Aspectos gerais do androceu 24

2 - Microsporogénese 28

2.1 - Microscopia óptica 28

2.2 - Microscopia electrónica 33

2.2.1 - Célula esporogénica 33

2.2.2 - Célula mãe do grão de pólen 34

2.2.3 - Tétrada 40

2.2.3.1 - Tétrada jovem 40

2.2.3.2 - Tétrada madura 41

2.2.4 - Micrósporo 43

2.2.4.1 - Micrósporo jovem 43

2.2.4.2 - Micrósporo vacuolizado . 44

2.2.4.3 - Micrósporo em divisão nuclear 46

2.2.5 - Grão de pólen 48

2.2.5.1 - Grão de pólen jovem 48

2.2.5.2 - Grão de pólen maduro ... 48

3 - Mitocôndria 53

3.1 - Forma tridimensional 53

3.2 - Análise estereológica 57

4 - Grão de pólen 63

4.1 - Forma do grão de pólen 63

4.2 - Parede do grão de pólen 65

4.2.1 - Terminologia 65

4.2.2 - Composição da parede do grão de pólen 66

4.2.2.1 - Exina 66
4.2.2.2 - Intina 72
4.2.3 - Parede da célula germinativa 72
4.2.4 - Aberturas ou poros 73
4.2.4.1 - Morfologia externa dos poros 73
4.2.4.2 - Morfologia interna dos poros 76
5 - Tapete 78
5.1 - Introdução 78
5.2 - Comportamento das células do tapete durante a microsporogénese 78
5.3 - "Pollenkitt"e trifinas 86
6 - Microsporogénese "in vitro" 88
6.1 - Introdução 88
6.2 - Meio usado na indução da microsporogénese e seu estudo 89
7 - Localização citoquímica a nível ultrastrutural.. 92
7.1 - Enzimas hidrolíticas 92
7.1.1 - Fosfátase ácida 93
7.1.2 - Adenosina trifosfátase 94
7.1.3 - Fosfátase alcalina 94
7.2 - Enzimas respiratórias 95
7.2.1 - Citocromo-oxídase 95
7.2.2 - Desidrogénase succínica 97
8 - Efeitos de agentes físicos na microsporogénese.. 100
8.1 - Luz contínua 100
8.2 - Obscuridade contínua 102
9 - Efeitos de agentes químicos na microsporogénese. 105
9.1 - Cloranfenicol 105
9.2 - Cicloheximida 106
9.3 - Brometo de etídio 111
9.4 - DCMU 115
9.5 - 2,4-dinitrofenol 117
9.6 - Citocalasina B 120

9.7 - Colquicina 125
9.8 - Rotenona 127
9.9 - Campferol 132
9.10- Fontes de carbono 136
9.10.1 - 2-deoxi-D-glucose 137
9.10.2 - Glucose 138

IV - DISCUSSÃO 140
Microsporogénese 140
Parede do grão de pólen 153
Tapete 156
Microsporogénese "in vitro" 162
Localização citoquímica a nível ultrastrutural 164
Efeitos de agentes físicos 173
Efeitos de agentes químicos 175

V - RESUMO GERAL E CONCLUSÕES 196

ABSTRACT 207

BIBLIOGRAFIA 215

I INTRODUÇÃO

Este trabalho estuda a microsporogénese em Cucumis sativus L.. Este estudo é particularmente complicado pelo facto de incluir, durante a formação do grão de pólen, muitos fenómenos que ocorrem, em sequência ou em paralelo, durante um curto período de tempo. Todo este processo biológico é pois complexo não só pela natureza especializada das células intervenientes, como pelos mecanismos citofisiológicos que estão intimamente relacionados com a microsporogénese.

Nas espermatófitas existem formações reprodutoras que constituem os gametófitos, que normalmente são de dimensões extremamente reduzidas e que se encontram alojadas no progenitor (esporófito) e aí se desenvolvem. Dada a associação do gametófito ao esporófito, foi necessário a atribuição de nomes como androceu e gineceu para designar respectivamente os orgãos masculinos e femininos da flor. É incorrecto, em termos científicos, falar em flores masculinas e femininas, pois estas estruturas não têm sexualidade. No entanto, correntemente empregam-se estes termos.

O androceu compreende os estames ou microsporófilos.Tipicamente cada estame é constituido por um filamento tendo na sua extremidade a antera, que vai sofrer uma série de transformações para a formação dos gametas masculinos. Como o tema deste trabalho é a microsporogénese ou a formação do grão de pólen apresentam-se os aspectos gerais deste processo com base, principalmente, nos trabalhos de Ledbetter & Porter (1970), Esau (1980) e Knox (1984).

Do microsporângio ao micrósporo

A antera normalmente é bilobada possuindo portanto dois lóbulos ou tecas cada um com dois lóculos alongados. Estes são os sacos polínicos ou microsporângios. Os dois lóbulos da antera

estão ligados por tecido conectivo, que é estéril.

Na generalidade das Dicotiledoneae, numa antera em formação, cada lóbulo é constituído por uma protoderme e a seguir uma assentada de células que constitui um tecido meristemático, chamado "arquesporium" ou camada arqueosporial. Esta por divisões periclinais vai dar origem, para o interior, ao tecido esporogénico primário e, para o exterior, à camada parietal primária, que por sua vez se divide periclinalmente originando duas camadas parietais secundárias. Destas duas camadas a mais interna pode, ainda em muitos casos, dividir-se periclinalmente, originando a camada mediana. Finalmente, a constituir a parede, temos três camadas parietais que são o endotécio, a camada mediana e o tapete.

Por outro lado, as células do tecido esporogénico também se dividem mitoticamente aumentando posteriormente de volume e dando origem às células mães dos esporos. Inicialmente estas células (microsporócitos) constituem uma massa compacta e estão separadas umas das outras, por paredes primárias celulósicas de cerca de 200 Å de espessura, comunicando entre si pelos plasmodésmios. Seguidamente, a membrana plasmática das células mães separa-se da parede primária e esta zona extracelular fica ocupada por pequenas vesículas, que alguns autores admitem possuirem precursores e possivelmente enzimas que contribuirão para a formação da calose, polímero de glucose em ligações $\beta(1\rightarrow3)$, ficando assim as células mães separadas do tecido que constitui o tapete.

As células envolvidas de calose são células, de grande riqueza citoplasmática, que vão sofrer uma meiose. A deposição da camada de calose tem o seu início no leptóteno-zigóteno, não se formando uma parede rígida mas uma parede gelatinosa. Na fase inicial de deposição de calose os plasmodésmios, existentes entre as células, desaparecem muito possivelmente devido à retracção do plasmalema. No entanto, estas células mães apresentam entre si continuidade citoplasmática, através de pontes intercelulares (canais citomícticos), transformando o conteúdo

dos esporângios em sincícios. Não se sabe se estes canais citomícticos resultaram de alguns plasmodésmios, que faziam parte da parede primária e se desenvolveram quando esta foi destruída, ou se são formações novas. Os canais citomícticos são de grandes dimensões (mais de 1,5 µm) permitindo trocas de organelos de uma célula para a outra, admitindo alguns autores também a possibilidade de repartição de material genético (Heslop-Harrison, 1966). Foi observado, em alguns casos, a passagem de material nuclear de um meiócito para outro através dos canais citomícticos (Stanley & Linskens, 1974) e pensa-se, também, que a continuidade dos microsporócitos sincroniza as divisões meióticas e de algum modo a diferenciação dos esporos. Estes canais, normalmente, desaparecem no fim da meiose II; no entanto, em alguns casos, eles desaparecem no decorrer da meiose I e apesar da ausência aparente destas comunicações estruturais, entre os diversos meiócitos, as fases posteriores da meiose desenvolvem-se de uma maneira bastante sincronizada. Isto leva a admitir que existem outros mecanismos intervenientes para manter a simultaneidade dos fenómenos (Genèves, 1971).

Na maioria das Dicotiledoneae, após a meiose II, dá-se uma citocinese simultânea com a formação do fragmoplasto característico das células vegetais, por fusão de vesículas. Este processo inicia-se no centro da célula e vai progredindo para a periferia, originando tabiques que dividem o citoplasma. Simultâneamente ocorre um outro processo que é o aparecimento de sulcos de estrangulamento na periferia do citoplasma, que vão progredindo para o centro da célula e levam à divisão do citoplasma para formar as quatro células. Os passos associados com todo este processo são análogos aos da formação da placa celular (Waterkeyn, 1962). A formação dos quatro micrósporos faz com que, entre eles, se desenvolvam camadas de calose que não podem ser consideradas como paredes rígidas de celulose mas sim como camadas gelatinosas, altamente hidratadas. Posteriormente, as camadas de calose são digeridas por uma enzima, a calase, ficando os micrósporos livres no lóculo da antera.

Por vezes nas angiospérmicas formam-se associações de grãos de pólen, após dissolução da camada de calose, constituindo tétradas como em algumas espécies de Ericaceae, Droseraceae e Juncaceae, polinîadas como nas mimosas (Acacia) formando conjuntos de 4, 8, 16, 32 ou 64 grãos de pólen, ou ainda constituindo massas de várias formas como em algumas espécies de Orchidaceae.

Parede do microsporângio

O estudo das camadas da parede do microsporângio, nomeadamente o tapete, tem recentemente tomado grande importância devido à sua morfologia e ao seu papel fisiológico na formação do grão de pólen. O tapete tem em muitos casos uma origem mista. Na maior parte das Dicotiledoneae externamente aos microsporócitos situam-se as células do tapete, que são derivadas da camada parietal primária, enquanto que internamente são células que têm origem no tecido conectivo. Em algumas Monocotiledoneae as células do tapete podem resultar da divisão da camada secundária interna.

No início da microsporogénese as células do tapete apresentam um citoplasma denso, sendo por vezes binucleadas ou polinucleadas. Como o tapete é o tecido que está em contacto íntimo com os grãos de pólen, admite-se que tenha um papel nutritivo durante a sua formação pois todos os materiais que entram nas células esporogénicas passam através dele ou são metabolizadas por ele.

As células do tapete durante o seu desenvolvimento perdem as suas paredes adquirindo formas variadas, sendo umas mais alongadas outras mais aguçadas. Nesta fase, externamente ao plasmalema, as células do tapete apresentam um revestimento de polissacarídeos semelhante ao glicocálice que surge nas células animais.

Nas angiospérmicas, geralmente, reconhecem-se duas espécies de tapete (Echlin, 1971a), tipo secretor (glandular ou parietal) e ameb6ide ou plasmodial. Estudos da relação entre a microsporogénese e o tapete foram efectuados ao microscópio elec

trónico. Anteras com tapete secretor foram descritas em várias plantas nomeadamente em Silene pendula e Cannabis sativa (Heslop-Harrison, 1963a), em Lilium sp. (Heslop-Harrison & Dickinson, 1969), em Allium cepa L. (Risueño et al., 1969), em Beta vulgaris (Hoefert, 1971), em Pinus banksiana (Dickinson & Bell, 1972, 1976a, b), em Antirrhinum majus, Pelargonium zonal e Kalanchöe obtusa (Lombardo & Carraro, 1976a, b), em Gentiana acaulis (Carraro & Lombardo, 1976), em algumas Dicotiledoneae (Santos et al., 1979) e em Anona squanosa L. (Periasamy & Kandasamy, 1981). Na grande maioria das angiospérmicas o tapete secretor é mais observado que o tapete amebóide. Após meiose o tapete secretor entra em degenerescência com destruição ("lise") das suas paredes e o citoplasma desintegrado é libertado para o lóculo onde produtos, tais como lípidos e outros, são depositados nos grãos de pólen formando uma camada exterior. No entanto, se o tapete é amebóide as células conservam-se intactas depois da "lise" das suas paredes e ficam a rodear os grãos de pólen. Por vezes dá-se a fusão dos protoplastos, ao longo da periferia do lóculo, formando um periplasmódio (Mepham & Lane, 1969b, Nanda & Gupta, 1977; Roland-Heydacker, 1979) que se conserva associado com os grãos de pólen até à sua maturação e então desidrata-se e deposita os seus restos à superfície dos mesmos.

Para o exterior das células do tapete existe a camada mediana ("middle layer") que normalmente é constituída por uma camada de células. Esta camada degenera cedo, ficando como que esmagada entre o tapete e o endotécio, podendo ser absorvida pelas células adjacentes. O endotécio é uma camada típica da parede das anteras das angiospérmicas, excepto naquelas em que a deiscência se faz por poros. É constituído por uma ou mais camadas de células que se desenvolvem tardiamente atingindo o máximo de maturidade nos passos finais da formação do grão de pólen. Quando as células do tapete degeneram e expulsam os seus produtos para o lóculo da antera, as células do endotécio aumentam de volume e adquirem espessamentos, do lado interno das suas paredes, recebendo muitas vezes a designação de camada fibrosa. Na regi-

ão dos estómios (aberturas da parede dos sacos polínicos) as células do endotécio não apresentam espessamentos nas suas paredes. Os espessamentos da parede têm sido interpretados como sendo lenhificados ou suberificados (Eames, 1961). No entanto, Fossard (1969) em Chenopodium fez vários testes histoquímicos e não detectou lenhina, observando apenas fibrilas orientadas de α-celulose. Este autor sugere que durante algum tempo o endotécio não se desenvolve, pois existe um produto no tapete que o inibe. O seu desenvolvimento só ocorre, portanto, depois da ruptura do tapete. O endotécio é funcionalmente importante, pois participa na deiscência da antera.

Exteriormente ao endotécio, existe uma camada de células que é a epiderme.

Parede do grão de pólen

O grão de pólen maduro possui uma parede com um elevado grau de consistência, organização e desenvolvimento.

Apesar da multiplicidade de estudos que têm sido efectuados sobre a parede do grão de pólen ou esporoderme, não existe ainda uma uniformidade da terminologia utilizada. Neste trabalho utiliza-se a terminologia de Erdtman (1960) que se esquematiza na Fig.56. Neste esquema, apresenta-se uma comparação da terminologia de Faegri (1956) e de Erdtman (1960).

Erdtman (1952) apresentou uma primeira terminologia da parede do grão de pólen e considerou-a essencialmente constituída por exina. Segundo este autor a exina apresenta-se subdividida em sexina (camada exterior) parte esculpida e nexina (camada interior) parte não esculpida. Geralmente a sexina apresenta colunas ou báculas, que são formações cilindricas perpendiculares ao plasmalema. Estas formações normalmente estão unidas superiormente por uma camada formando o tecto, que pode ser uma camada compacta ou perfurada possuindo poros minúsculos que permitem a entrada e saída de macromoléculas. O tecto pode apresentar-se liso ou ornamentado, exibindo picos ou outras saliên-

cias. Contudo, existem grãos de pólen cuja sexina é simples , pois não possuem tecto, observando-se as extremidades das báculas bastante espessadas e em alguns casos muito dilatadas. Geralmente a sexina surge envolvida externamente por uma fina camada pigmentada. O material que constitui esta camada pigmentada compreende o "pollenkitt" e as trifinas. Estes dois termos têm sido usados separadamente, no entanto há autores que preferencialmente usam apenas um deles ou ainda a expressão "pollen coat" que engloba os dois termos. O termo "pollenkitt" tem sido amplamente utilizado para designar carotenóides que se depositam externamente ao grão de pólen , dando-lhe côr (Echlin,1971a), apresentando uma função importante na polinização por insectos. O termo trifinas é mais usado para referir restos das células do tapete, que sofreram degenerescência, e compreendem uma mistura complexa de substâncias hidrofílicas (Echlin, 1971a), que se acumulam entre as báculas e o tecto.

Internamente à sexina surge a nexina que normalmente se subdivide em nexina 1 e nexina 2. Estas camadas podem ser muito espessas, mas em algumas espécies estão muito reduzidas ou ausentes.

A nexina e a sexina constituem a camada de exina. Nesta camada há a distinguir a presença de aberturas que são os locais de germinação do tubo polínico. As zonas onde se formam estas aberturas são determinadas no estado de tétrada, de acordo com a orientação das células. Assim,em algumas espécies no estado de tétrada, nos locais das futuras aberturas surgem perfis de reticulo endoplasmático dispostos paralelamente, impedindo a deposição da primeira camada (primexina) nessas zonas (Godwin, 1968, Heslop-Harrison, 1971a; Vasil, 1973). Enquanto os micrósporos estão rodeados de calose e antes da exina se depositar, forma-se uma camada entre o plasmalema e a calose que é a primexina, constituida por fibrilas de celulose (Echlin & Godwin, 1968b). Esta camada serve de matriz das camadas de exina que se depositam posteriormente.

De uma espécie para outra as aberturas, quando presentes no

grão de pólen, diferem no seu número, posição, forma e ainda pela natureza da camada de exina que lhes deu origem. Assim, têm sido designadas ecto-aberturas se derivam da sexina e endo-aberturas se têm uma origem na nexina. As aberturas como áreas bem definidas derivam da sexina, enquanto que as endo-aberturas se apresentam como áreas difusas.

As aberturas podem ter a forma alongada, circular ou uma combinação das duas formas. As aberturas quando são circulares designam-se por poros, e quando de forma alongada por fendas. Estas são definidas como apresentando um comprimento cerca de duas vezes maior que a largura. O número de aberturas varia conforme a espécie. Normalmente, os grãos de pólen das Monocotiledoneae apresentam uma só abertura (Kress & Stone,1983) e nas Dicotiledoneae podem existir 3, 4, 5 ou mais e podem ser do tipo fenda, poro ou uma combinação de poro e fenda. Por vezes os poros estão recobertos por um opérculo de esporopolenina, o qual é libertado no momento da germinação do tubo polínico.

A exina determina a forma do grão de pólen. De uma maneira geral os grãos de pólen são mais ou menos esféricos ou triangulares, embora possam surgir grãos de pólen alongados em forma de cilindro como em Crossandra, cujo comprimento é 30 vezes maior que a largura (Brummitt et al., 1980). Nas plantas marinhas pertencentes à família das Zoosteraceae, Cymodoceaceae ou Posidoniaceae os grãos de pólen têm a forma filiforme (Ducker et al., 1978). Por vezes a camada da exina surge grandemente reduzida estrutural e funcionalmente ou até totalmente ausente como em algumas espécies marinhas, Amphibolis antarctica e Thalassodendron ciliatum (Ducker et al., 1978).

Normalmente a exina recobre uma única célula ou grão de pólen, exceptuando-se os casos em que os grãos de pólen estão aderentes de modo a formar tetradas, poliníadas ou ainda massas polínicas de várias formas.

Junto à camada de nexina, entre esta e o plasmalema, deposita-se uma camada que é de natureza polissacarídica e que se designa por intina. É uma camada de muita importância e encon-

tra-se presente em todos os tipos de grão de pólen.

A intina contém celulose, hemicelulose e substâncias pécticas, e pode facilmente ser solubilizada por acetólise (Erdtman, 1966). A camada de intina é muito espessada e estruturalmente mais complexa na região dos poros, apresentando vulgarmente uma rede de microvilosidades. Sabe-se que a intina é sintetizada pelo próprio micrósporo durante a fase vacuolizada. Vários autores admitiram que a intina, em alguns grãos de pólen, possuia camadas quimicamente distintas. Recentemente alguns autores a partir do estudo de vários grãos de pólen de Monocotiledoneae mostraram que a intina compreendia duas camadas distintas, sendo uma exterior composta de polissacarídeos acídicos, e uma mais interna contendo polissacarídeos neutros (Kress & Stone, 1982).

Na intina existem também proteínas, localizadas em estruturas tubulares na matriz polissacarídica. Estas proteínas foram detectadas citoquimicamente (Knox & Heslop-Harrison, 1971).

O principal constituinte da exina da parede do grão de pólen é a esporopolenina que é constituída por polímeros de carotenóides e ésteres de carotenóides (Shaw, 1971). A esporopolenina é altamente resistente a agentes químicos, físicos e biológicos. Na preparação de grãos de pólen para estudos palinológicos é habitual remover o material contaminante da exina por acetólise, no entanto a esporopolenina resiste a este tratamento sendo apenas degradada pelo ácido crómico e pelo 2-etanolamina (Rowley & Flynn, 1966), assim como por certas enzimas presentes no estigma, durante a germinação.

Ao tapete tem-se atribuído um papel importante na formação da parede do grão de pólen, pois o tapete secretor possui, exteriormente ao plasmalema e em maior número nas porções das paredes que estão voltadas para o lóculo da antera, grânulos de material com propriedades químicas semelhantes às da esporopolenina. Estes grânulos foram designados por corpos de "Ubisch", mas Heslop-Harrison (1962, 1963b) não considerou este termo apropriado e preferiu o termo placas, enquanto que outros autores (Banerjee, 1967; Rowley & Erdtman, 1967) designaram estas

formações por orbículos.

Do micrósporo ao grão de pólen maduro

Algum tempo após a formação dos quatro micrósporos, dá-se a dissolução da camada de calose. Aqueles aumentam de volume e o citoplasma vacuoliza-se, mostrando um ou vários vacúolos. A expansão do vacúolo é acompanhada pela migração do núcleo para a periferia da célula, restando apenas uma pequena camada de citoplasma a rodear o vacúolo. O núcleo desloca-se sempre, segundo uma direcção preferencial, para um local oposto a um dos poros. Posteriormente, ocorre a divisão do núcleo e do citoplasma originando duas células desiguais. Os produtos desta divisão, ou seja as células vegetativa e germinativa são quantitativa e qualitativamente diferentes. A célula germinativa é mais pequena e, segundo alguns autores, contém menos RNA que a vegetativa. Esta última possui o núcleo vegetativo próximo do centro do grão de pólen, enquanto que a célula germinativa com o seu núcleo permanece próximo da periferia e apresenta-se encurvada constituindo um menisco ligado à intina.

No grão de pólen maduro a célula germinativa destaca-se da intina e move-se para o interior do grão de pólen.Esta célula é precursora de duas células espermáticas, que são libertadas no tubo polínico antes da germinação. Em algumas angiospérmicas esta divisão, em duas células espermáticas, ocorre no grão de pólen antes da germinação e noutras ocorre já no tubo polínico (Sanger & Jackson, 1971c).

O estudo da microsporogénese vem sendo efectuado desde longa data. Assim já em finais do século XIX se sabia que o grão de pólen era formado por duas células desiguais, a vegetativa e a germinativa. Mangin (1886) assinalou no grão de pólen a presença de amido e gotas lipídicas. Trabalhos posteriores confirmaram estes resultados e envolveram numerosas espécies.

A microscopia electrónica veio dar uma nova perspectiva ao desenvolvimento e formação do grão de pólen. Assim, na literatura da especialidade alguns autores dedicaram a sua aten-

ção ao estudo de um só estado de evolução do grão de pólen, ou seja, o grão de pólen maduro ou a germinação, enquanto que outros autores compararam a ultrastrutura do grão de pólen de diversas espécies desde o estado imaturo até à germinação (Larson & Lewis, 1962; Diers, 1963a, b; Sassen, 1964; Dexheimer, 1969, 1970, 1972; Gimenez-Martin et al., 1969; Sanger & Jackson,1971a, b, c; Brighigna et al., 1981). Outros, descreveram toda a ontogenia polínica desde a célula mãe até ao grão de pólen antes da germinação, como Bal & De (1961) e Maruyama (1965, 1968) em Tradescantia paludosa, Echlin & Godwin (1968b, 1969) e Echlin(1972) em Helleborus foetidus, Bidle (1972) em Pisum sativum e Lens culinare e Abreu & Dexheimer (1973) em várias espécies de angiospérmicas, aspectos também focados no trabalho de revisão de Dickinson (1982).

XXX

XXX XXX

O presente trabalho descreve os estudos efectuados em anteras de Cucumis sativus L., com células polínicas em diferentes estados de formação do grão de pólen. Esta planta tem particular interesse pois as mitocôndrias, que ocorrem nas células em determinados estados da microsporogénese, apresentam profundas modificações ultrastruturais. Procedeu-se não só ao estudo destas modificações, procurando apreciar o seu início, evolução e suas possíveis causas, bem como ao estudo do comportamento dos outros organelos citoplasmáticos durante a formação do grão de pólen.

Durante o desenrolar da microsporogénese consideraram-se as seguintes fases:

1 - Estado de células esporogénicas
2 - Estado de meiose (células mães)
3 - Estado de tétrada jovem
4 - Estado de tétrada madura
5 - Estado de micrósporo jovem com início de vacuolização

6 - Estado de micrósporo vacuolizado com um vacúolo muito grande

7 - Estado de grão de pólen jovem em que a célula germinativa, recentemente formada, fica encostada à parede do grão de pólen

8 - Estado de grão de pólen maduro, com a célula germinativa no interior da célula vegetativa.

Dada a importância das células do tapete na formação da parede do grão de pólen, procedeu-se também ao seu estudo ultrastrutural.

II MATERIAL E MÉTODOS

A - Material

Cucumis sativus L. é uma Dicotiledoneae da família das Cucurbitaceae, originária da Índia, bastante utilizada sob o ponto de vista hortense e cultiva-se em Portugal de Junho a Agosto.

É uma planta anual, herbácea, áspera, com folhas simples, cerdosas, pecioladas e sem estípulas. O limbo das folhas é cordiforme e apresenta nervação palmítica com cinco lóbulos denteados. No caule desenvolvem-se gavinhas, cuja parte terminal corresponde a folhas, designadas gavinhas caulinares. As flores são axilares, actinomórficas, de perianto duplo, com cinco pétalas amarelas ligadas até metade do seu comprimento (gamopétalas). É uma espécie monóica, isto é, possui flores unissexuais femininas e masculinas na mesma planta.

O androceu é constituído por cinco estames tridelfos, apresentando-se, por conseguinte, associados em três grupos, sendo dois grupos pares e um ímpar, formado por um só estame. Todos os estames são constituídos por filete e antera apresentando um filete reduzido. As anteras são extrosas, flexuosas, possuindo uma configuração sinuosa em forma de S.

As anteras quando possuem células esporogénicas, células mães ou tétradas apresentam a cor verde, passando a branca quando o lóculo da antera contém micrósporos e amarela quando estes micrósporos evoluiram para grãos de pólen maduros.

B - Métodos

Anteras de Cucumis sativus L., contendo células polínicas em diferentes estados de desenvolvimento, foram preparadas para serem observadas ao microscópio electrónico de transmissão, utilizando as seguintes soluções fixadoras:

- glutaraldeído (GA) 1,25 e 2,5%, seguido de pós-fixação em tetróxido de ósmio a 2%, utilizando diversas soluções tampões (fosfato de Sorensen, cacodilato de sódio ou acetato de veronal) com pH compreendido entre 7,2-7,3 e concentração 0,1 M. Os tempos de fixação foram para o GA cerca de 3 horas e para o tetróxido de ósmio de 2 horas
- permanganato de potássio a 2% em H_2O (Mollenhauer, 1959), durante 2 horas
- paraformaldeído 2% - glutaraldeído 1,25% em tampão fosfato de Sorensen 0,1 M e pH 7,2 durante 2 horas ou o mesmo fixador em tampão cacodilato 0,1 M e pH 7,2.

As peças foram depois desidratadas, usando séries ascendentes de acetona e por último óxido de propileno. A inclusão fez-se em Epon 812 ou resina de baixa viscosidade (Spurr, 1969).

Os cortes foram efectuados num ultramicrótomo LKB Ultrotome III, utilizando facas de vidro ou diamante e foram recolhidos em grelhas sem membrana ou previamente recobertas com uma fina película de colódio ou formvar. Para observação ao microscópio, os cortes foram contrastados em acetato de uranilo (Valentine , 1965) e citrato de chumbo (Reynolds, 1963) As observações foram efectuadas ao microscópio electrónico Siemens, Elmiskop 1A, com aberturas de condensador de 200 µm e de objectiva de 50 µm (folha fina de cobre) e registadas em película fotográfica Agfa Gevaert 23 D 56.

Microsporogénese seguida em meios de cultura

Como meio de cultura utilizou-se o meio MS de Murashige & Skoog (1962), conforme o indicado no quadro 1. O pH do meio foi ajustado para 5,7 com NaOH 0,5N ou HCl 1N, e após adição de 0,6% de agar o meio foi autoclavado a 120°C, durante 25 minutos.Não foram adicionados reguladores de crescimento.

As culturas foram colocadas à temperatura de 27°C e submetidas a períodos alternados de 12 horas em luz artificial e 12 horas em obscuridade.A luz utilizada era produzida por lâmpadas fluorescentes, tipo luz branca ("white light"), fornecendo a intensidade de 800 cd m^{-2} ao nível da cultura.

Tratamentos físicos

Plantas envasadas foram colocadas nas seguintes condições:

- luz contínua durante 2 meses. Utilizou-se nesta experiência um conjunto de lâmpadas fluorescentes, tipo luz branca, fornecendo a intensidade de 1 000 cd m^{-2} ao nível da planta
- obscuridade durante 6 semanas.

Tratamentos químicos

Foram utilizadas as seguintes soluções:

1 - Cloranfenicol em tampão fosfato 0,02 M pH 6,8 nas concentrações de 2,5 mg/ml e 5 mg/ml
2 - Cicloheximida em solução aquosa, nas concentrações de 5 µg/l e 10 µg/l
3 - Brometo de etídio em solução aquosa, nas concentrações de 5 µg/ml, 50 µg/ml e 100 µg/ml
4 - 3-(3,4 - diclorofenil) - 1,1 - dimetilureia (DCMU) em solu

Q U A D R O 1

MACRONUTRIENTES (mg/l)

NH_4NO_3	1 650
KNO_3	1 900
$CaCl_2\ 2H_2O$	440
$MgSO_4\ 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170

MICRONUTRIENTES (mg/l)

H_3BO_3	6,2
$MnSO_4\ 4H_2O$	22,3
$ZnSO_4\ 4H_2O$	8,6
KI	0,83
$Na_2MoO_4\ 2H_2O$	0,25
$CuSO_4\ 5H_2O$	0,025
$CoCl_2\ 6H_2O$	0,025
Na_2EDTA	37,5
$FeSO_4\ 7H_2O$	27,9
Sacarose	30 000

VITAMINAS (mg/l)

Glicina	20
Ácido nicotínico	0,5
Cloridrato de tiamina	0,1
Cloridrato de piridoxina	0,5
Inositol	100

ção aquosa, nas concentrações de 50 mg/ml e 100 mg/ml por dissolução em etanol 0,1%

5 - 2,4 - dinitrofenol em solução aquosa, na concentração de 50 mg/l

6 - Citocalasina B em solução aquosa, nas concentrações de 35 µg/ml e 50 µg/ml. Como este composto orgânico é praticamente insolúvel na água, dissolveu-se primeiramente em pequena quantidade de DMSO de modo que a concentração final do DMSO, na solução usada, não ultrapassasse 0,2%

7 - Colquicina em tampão fosfato 0,2 M pH 6,8 e em solução aquosa, nas concentrações de 5 mg/ml e 10 mg/ml

8 - Rotenona em solução aquosa, na concentração de 5 mg/l por dissolução numa pequena quantidade de etanol de modo que a concentração final do etanol na solução usada, não ultrapassasse 2%

9 - Campferol em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,0 , na concentração de 10 µg/ml. Este composto foi previamente dissolvido em etanol de modo que a concentração final do etanol, na solução utilizada, não fosse superior a 2%

10 - 2-DOG (2-deoxi-D-glucose) em solução aquosa, nas concentrações de 1,64 g/l e de 16,4 g/l

11 - Glucose em solução aquosa, na concentração de 30g/l.

No quadro 2 está indicado o tempo máximo, em horas de tratamento, relativamente às diferentes soluções. As soluções foram fornecidas às anteras quer mergulhando hastes florais directamente nelas (coluna I), quer adicionando-as ao meio MS por filtração, utilizando filtros com membranas Millipore, em condições assépticas (coluna II).

As soluções onde as hastes florais estavam mergulhadas, foram sucessivamente renovadas de 12 em 12 horas.

As soluções 10 e 11 foram utilizadas, pois pretendeu-se observar a acção de diferentes fontes de carbono sobre a microsporogénese. Quando adicionadas ao meio de cultura, este não possuia sacarose.

QUADRO 2

Solução	I(x)	II(xx)
1	48	24
2	96	24
3	72	-
4	48	-
5	72	24
6	72	24
7	72	-
8	96	-
9	72	-
10	48	24
11	48	24

O herbicida DCMU (solução 4) na concentração 0,1%, foi usado também em nebulizações sobre plantas envasadas, duas vezes por dia durante 8 dias consecutivos, tendo as colheitas de material sido efectuadas antes de cada nebulização.

(x) Nas experiências de 48 horas, foram efectuadas observações ao fim de 12,24 e 48 horas de tratamento; nas de 72 horas ao fim de 12,24,48 e 72 horas e finalmente nas de 96 horas ao fim de 12, 24,48,72 e 96 horas de tratamento.

(xx) Em todos os casos foram efectuadas observações ao fim de 1,7 e 24 horas.

Localização citoquímica

O tratamento citoquímico foi efectuado em cortes e em fragmentos de anteras antes ou após a pré-fixação.

1 - Em cortes

Ensaiou-se o método de Thièry (1967) para localização de polissacarídeos neutros e outros carbohidratos. Este método utiliza a presença do grupo glicol na molécula das oses que constituem a cadeia polissacarídica.Estes grupos glicol são substituí-

dos por grupos aldeídos, pela tiocarbohidrazida ou tiossemicarbohidrazida, que são depois marcados pelos sais de prata.Assim, cortes recolhidos em grelhas de ouro,com membrana, foram tratados durante 30 minutos em ácido periódico a 1% e após várias lavagens em água destilada os cortes permaneceram durante 20 horas em tiocarbohidrazida ou tiossemicarbohidrazida a 0,2% preparada em ácido acético a 20%. Seguidamente os cortes foram tratados com ácido acético a 15%, 10%, 5% e água destilada durante 20 minutos cada. Finalmente os cortes permaneceram no proteinato de prata a 1% durante 30 minutos na obscuridade e à temperatura do laboratório.

O ácido fosfotúngstico (PTA) em HCl 1N ensaiou-se, para localização de polissacarídeos ácidos. Cortes recolhidos em grelhas de ouro,com membrana, foram tratados durante 15 minutos em ácido periódico a 1% e seguidamente durante 10 minutos com o PTA a 1% em HCl 1N.

2 - Em fragmentos de anteras

As reacções enzimáticas ensaiadas visaram o estudo do estado metabólico das células,durante o desenrolar da microsporogénese,assim como a confirmação da actividade respiratória das mitocôndrias.

i - Enzimas hidrolíticas

Nestes testes citoquímicos realizou-se uma prévia fixação em glutaraldeído a 1,25% durante 1 hora. Após incubação o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio.

a) Fosfátase ácida (E C.3.1.3.2)-utilizando o meio de Gomori segundo a técnica de Miller & Palade (1964), tendo como substrato o β-glicerofosfato de sódio a pH 5,0 . O meio de incubação foi aquecido a 60°C durante 1 hora,arrefecido à temperatura ambiente e filtrado. A incubação efectuou-se a 37°C durante um tem

po máximo de 4 horas. Duas experiências testemunhas foram realizadas: uma em meio de incubação sem o substrato, outra em meio de incubação total com o fluoreto de sódio 10 mM.

b) Fosfátase alcalina (E C.3.1.3.1) - usando a técnica de Dickson (1978) utilizando o β -glicerofosfato de sódio na presença de $CaCl_2$ a pH 9,0 . Como testemunha usou-se o mesmo meio de incubação sem o substrato . A incubação efectuou-se a 37°C durante um tempo máximo de 4 horas.

c) Adenosina trifosfátase (ATPase) (E C.3.6.1.3)-pelo método de Gomori (Sauter, 1977), usando ATP dissódico como substrato em tampão acetato a pH 5,0 . A incubação realizou-se a 37°C durante um tempo máximo de 4 horas. Como controlo usou-se o meio de incubação sem o substrato, ou o meio completo adicionado de fluoreto de sódio 10 mM.

ii - Enzimas respiratórias

Efectuou-se o estudo citoquímico de duas enzimas respiratórias.

a) Citocromo-oxídase (E C.1.9.3.1)-utilizando o meio de Opik (1975), tendo como substrato o 3,3' - diaminobenzidina (DAB). A incubação efectuou-se na obscuridade a 27°C, durante um tempo máximo de 4 horas. O material foi pré-fixado em GA e, após incubação, foi pós-fixado em tetróxido de ósmio. Para controlo destes ensaios realizaram-se preparações nas quais a incubação se fez em meio sem substrato e meio total adicionado de KCN 0,01 M.

b) Desidrogénase succínica (E C.1.3.99.1)-segundo a técnica de Kerpel-Fronius & Hajós (1968), utilizando o

ferricianeto como aceitador de electrões. Fragmentos pequenos de anteras foram incubados à temperatura ambiente, durante um tempo máximo de 5 horas, num meio tendo como substrato o succinato de sódio. Para controlo realizaram-se preparações adicionando o malonato de sódio (140 mM) ao meio de incubação. Posteriormente o material foi fixado em GA seguido de tetróxido de ósmio.

Técnicas de reconstrução tridimensional e análise estereológica

Procedeu-se à construção de um modelo tridimensional de mitocôndrias que ocorrem no micrósporo vacuolizado, a partir de cortes ultrafinos seriados. As ténias de cortes sucessivos foram colocadas em grelhas de buraco rectangular, recobertas de filme de colódio.

A evolução mitocondrial foi quantificada por análise estereológica segundo método de Weibel e colaboradores (1969) e Williams (1977). Fizeram-se cortes ao acaso de várias células polínicas e fotografaram-se a uma ampliação final de 6 000 X. Volumes mitocondriais (Vv) referentes à mitocôndria total (matriz mais enclaves) e apenas à matriz mitocondrial (V'v), foram determinados por contagem de pontos.

Considerou-se o princípio que a área de um dado componente em secção (Av), obtida de um corpo sólido, é directamente proporcional ao volume desse componente (Vv) no corpo sólido original (princípio de Delesse). Temos que:

$$\frac{Vv}{VT} \simeq \left(\frac{\overline{Av}}{AT}\right)$$

VT e AT representariam, no presente caso, respectivamente o volume total da célula, que contém as mitocôndrias, e a área total da secção correspondente à mesma célula.

Para a contagem de pontos utilizou-se uma malha quadrada de 1 cm de lado e contaram-se o número de intersecções que correspondiam à célula total (n), à mitocôndria total (n1) e somente à matriz mitocondrial (n2). Assim:

$$Vv = \frac{n1 \times 100}{n} \quad e \quad V'v = \frac{n2 \times 100}{n}$$

Os valores médios de Vv e V'v foram comparados usando o teste t de Student.

Para cada estado de formação do grão de pólen foi usada uma série de 40 microfotografias para determinação estereológica.

Microscópio electrónico de varrimento (SEM)

Flores masculinas completas ou seccionadas e grãos de pólen isolados foram preparados para observação ao microscópio electrónico de varrimento (SEM). As amostras foram tratadas pelos fixadores de microscopia electrónica, anteriormente mencionados, ou o fixador usado para microscopia óptica, nomeadamente a solução de Navachine (10 cc de ácido crómico a 1%, 4 cc de formol a 40% e 1 cc de ácido acético). Com a finalidade de obtermos grãos de pólen isolados fizeram-se centrifugações, no fim de cada tratamento, com eliminação do sobrenadante. Após fixação os grãos de pólen isolados foram submetidos a ultra-sons (frequência 40 KHz), durante 2 minutos, para se provocarem fracturas nas suas paredes. Após desidratatação, com álcool absoluto, o material foi seco ao ar e depositado sobre um filme adesivo colocado sobre um suporte metálico. A metalização das amostras efectuou-se pelo método de vaporização de ouro sob vácuo, e os estudos foram realizados no Stereoscan 600 Cambridge.

Microscópio óptico (MO)

Na preparação de material, para observação ao microscópio óptico, utilizaram-se como fixadores as soluções de Navachine

e o Carnoy (3 cc de álcool etílico e 1 cc de ácido acético). Para a desidratação em álcool etílico e inclusão em parafina seguiu-se o método habitual.

Os cortes de 8-10 µm de espessura foram colados em lâminas de vidro previamente molhadas, com uma solução de albumina glicerinada de Mayer, para melhor aderência dos cortes. Seguidamente procedeu-se à desparafinização e coloração pelo azul de toluidina a 1% ou pelo método de Feulgen com hidrólise durante 7 minutos em HCl 1N a 60°C, e a coloração em reagente de Schiff durante 1 hora. As preparações foram depois desidratadas pelo álcool etílico, diafanizadas pelo xilol e montadas em bálsamo do Canadá.

A partir de blocos incluídos em Epon, efectuaram-se ao ultramicrótomo cortes semifinos com cerca de 1 µm que, depois de corados por flutuação numa solução de azul de metileno e azur II (azul de metileno a 1% em bórax a 1% e azul azur II a 1%) ou azul de metileno, azur A e safranina (Warmke & Lee, 1976) sobre placa aquecida (45-60°), foram lavados em água destilada, colados em lâminas de vidro e secos a 60°C.

III RESULTADOS

1 - Aspectos gerais do androceu

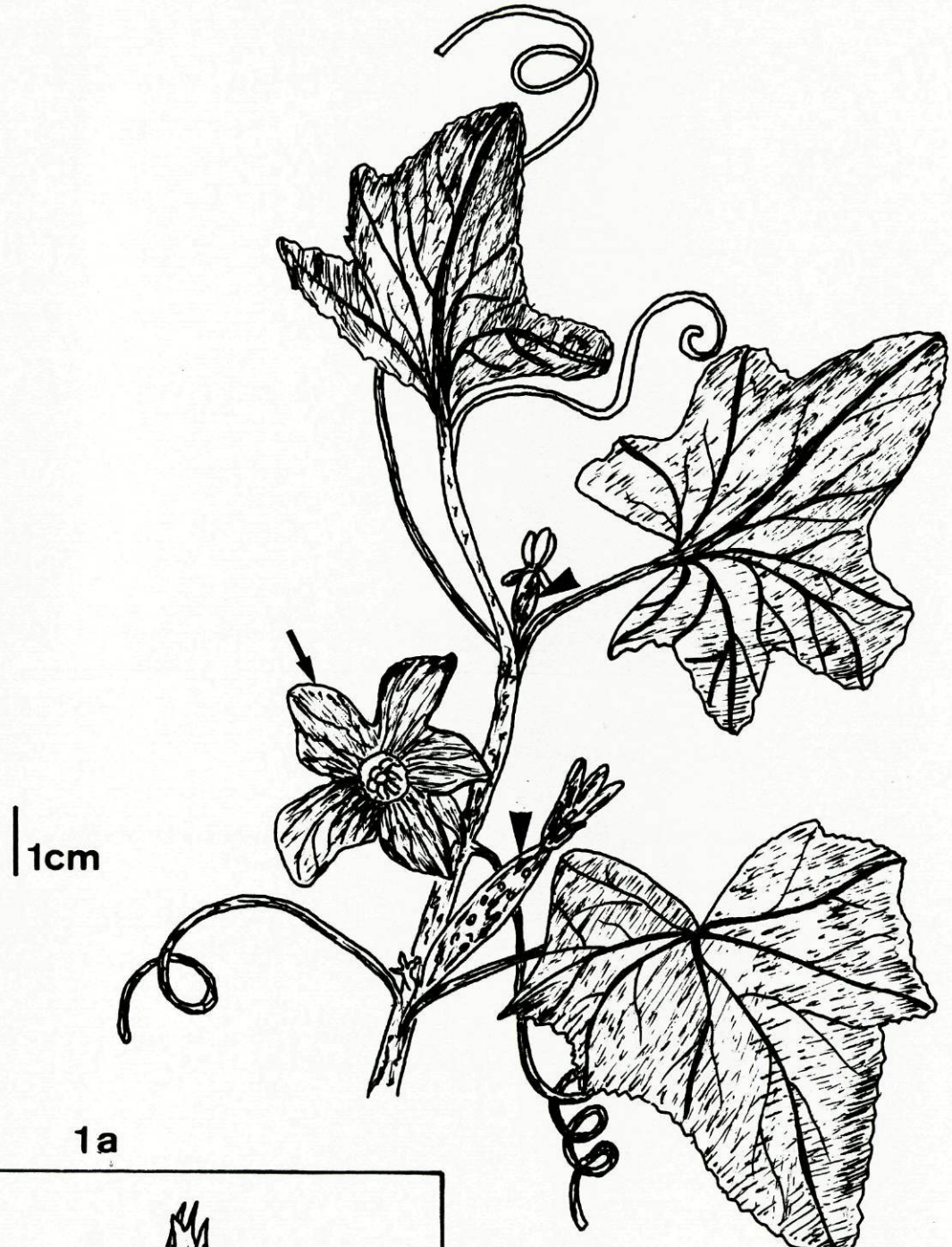
Cucumis sativus L., conhecida vulgarmente por planta do pepino, é como se vê nas Figs. 1a e 1b uma planta monóica pois possui flores unissexuais femininas e masculinas no mesmo ramo.

Como o androceu apresentava pequenas dimensões, procedeu-se ao seu estudo morfológico com o microscópio electrónico de varrimento (SEM) o que permitiu facilmente observar os 5 estames associados em grupos de 2+2+1 (Figs.2 e 3). Cada estame apresentava um filete muito reduzido e uma antera de configuração sinuosa em forma de S (Figs.2 e 4). Nos grupos em que as anteras estavam associadas (grupos pares), dispunham-se simetricamente (Fig.2) e verificou-se que essa associação se efectuava pela face posterior através do conectivo (Fig.5), sendo este apendiculado no cimo.

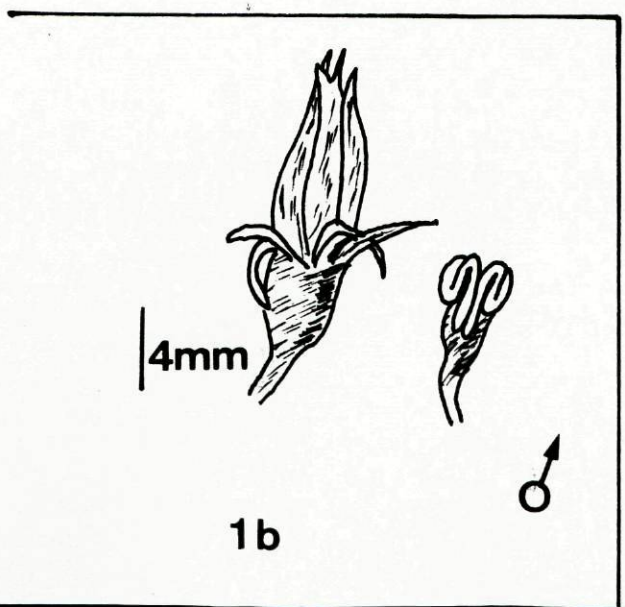
Para estudar o número de tecas,ou lóbulos da antera, executaram-se cortes transversais do androceu a vários níveis. Cortes efectuados perto do cimo do androceu, de modo a seccionar todos os segmentos das anteras, foram preparados para microscopia óptica (Figs.6 e 7) e também para serem observados ao microscópio electrónico de varrimento (Fig.8). Assim, pôde observar-se que cada antera, devido à sua forma em S, fora cortada 3 vezes e cada segmento da antera,em corte transversal, apresentava um lóbulo ou teca com dois microsporângios. Efectuaram-se também cortes transversais perto da base do androceu, de modo a seccionar cada antera uma só vez, e verificou-se mais facilmente a sua constituição (Fig.9).

Fig.1a - Ramo de Cucumis sativus L., com flor (seta) e frutos jovens (ponta de seta).

Fig.1b - Flor masculina completa e flor após dissecção, mostrando os estames.



1a



1b

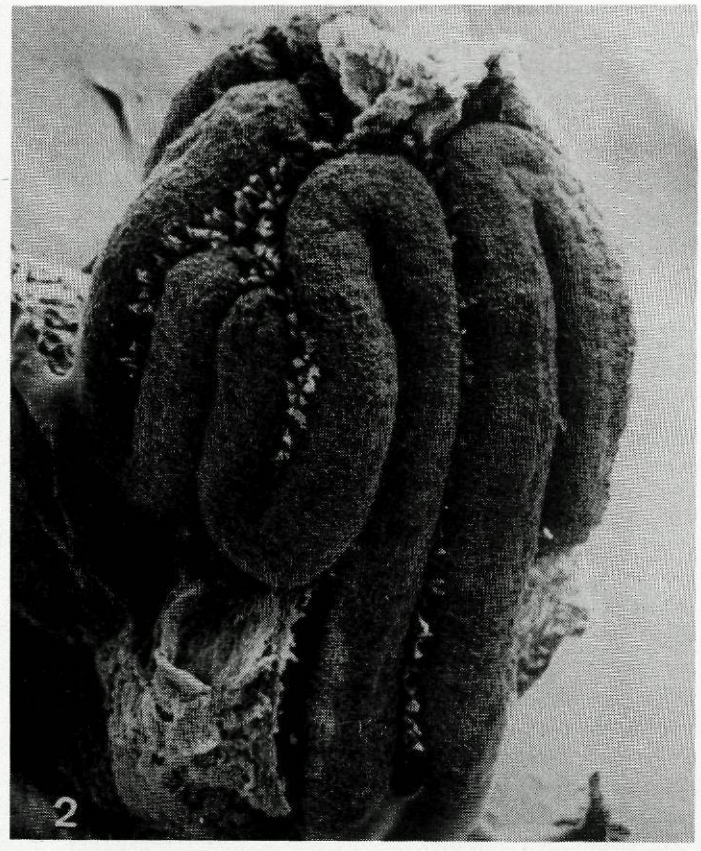
Androceu de Cucumis sativus L. observado ao microscópio electrónico de varrimento (SEM)

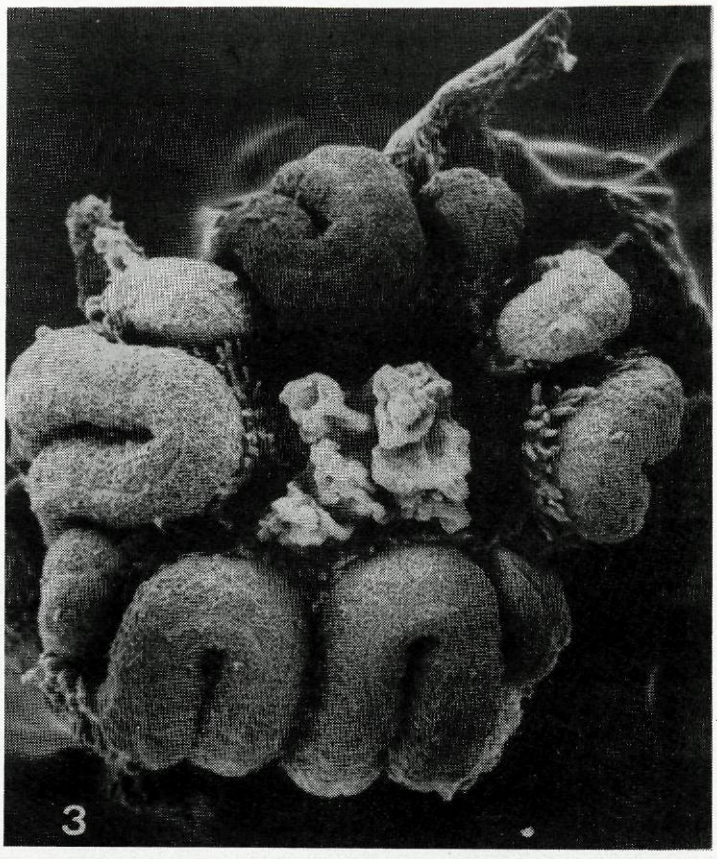
Fig.2 - Androceu visto lateralmente. 53 X.

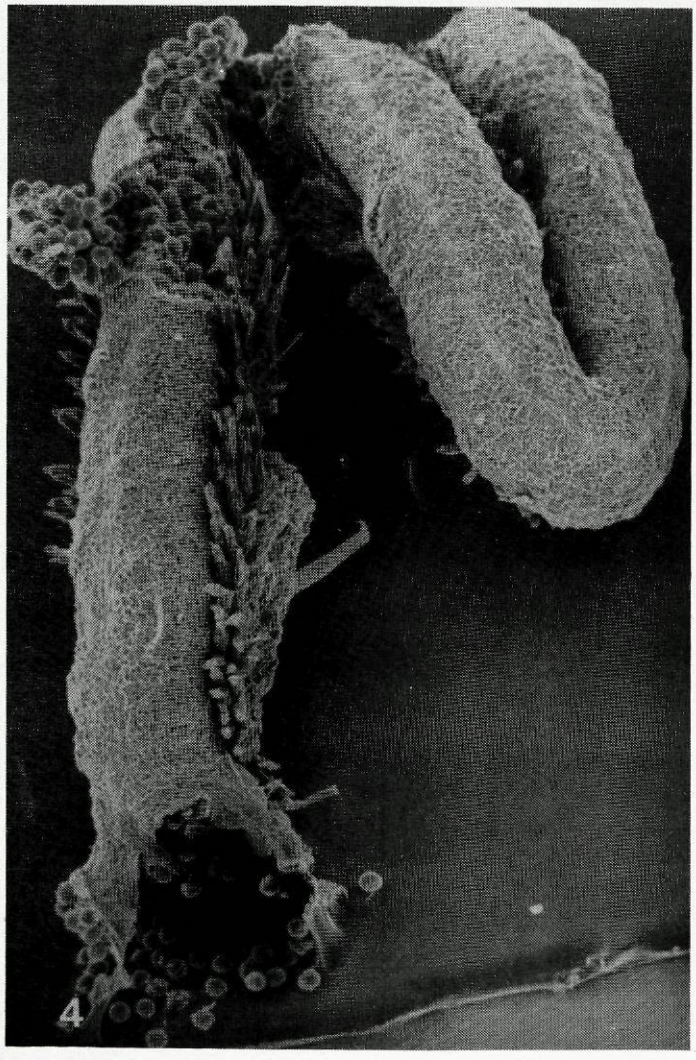
Fig.3 - Androceu constituído por 5 estames, visto de topo. 46 X.

Fig.4 - Antera em forma de S com a sua parede rebentada em dois locais, com libertação dos grãos de pólen. 70 X.

Fig.5 - Face posterior de 2 anteras, observando-se que a associação se efectua através do conectivo (Co). 60 X.


2


3


4

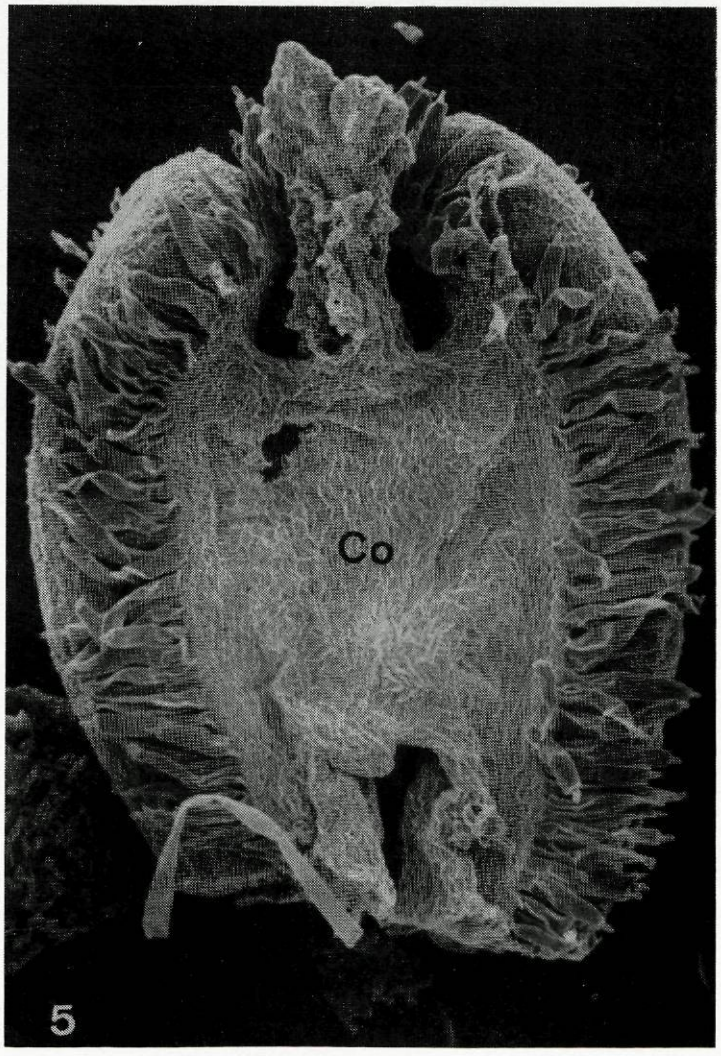
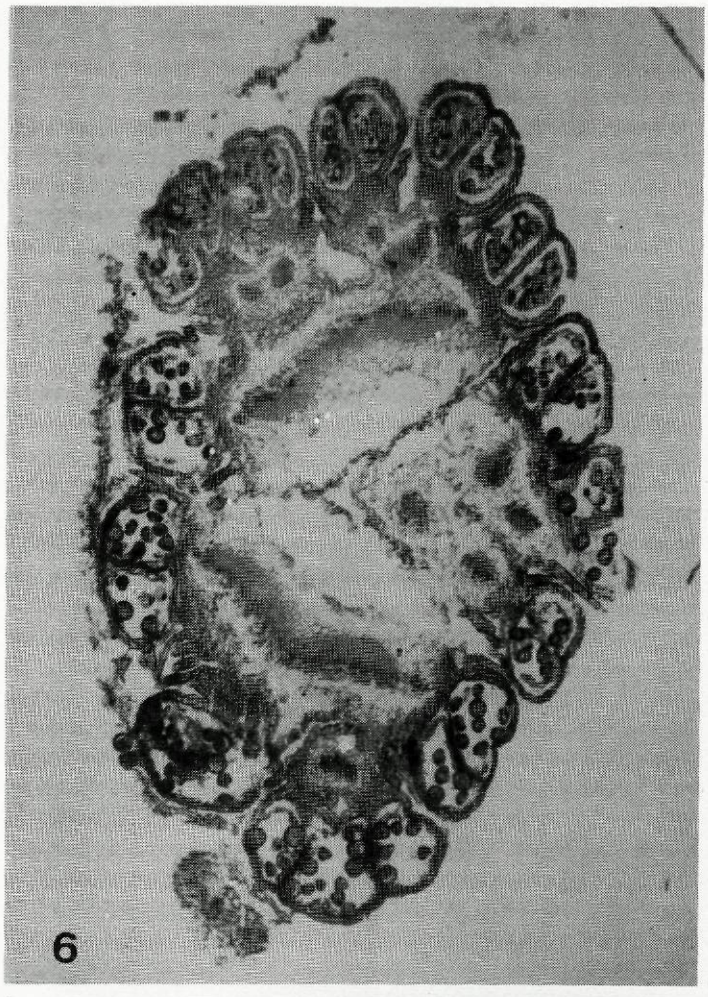
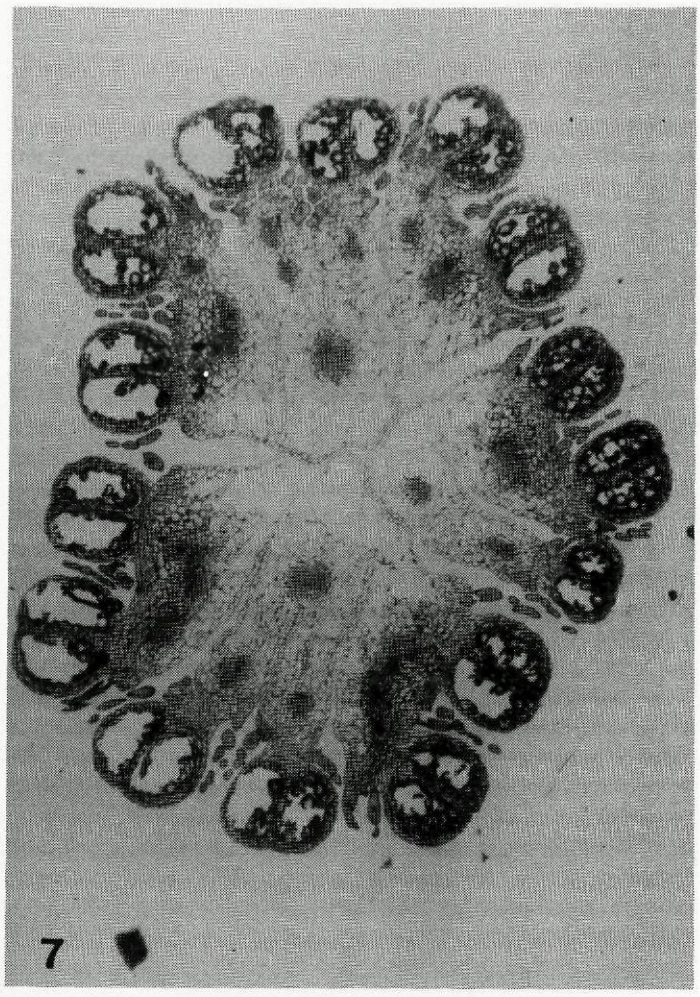
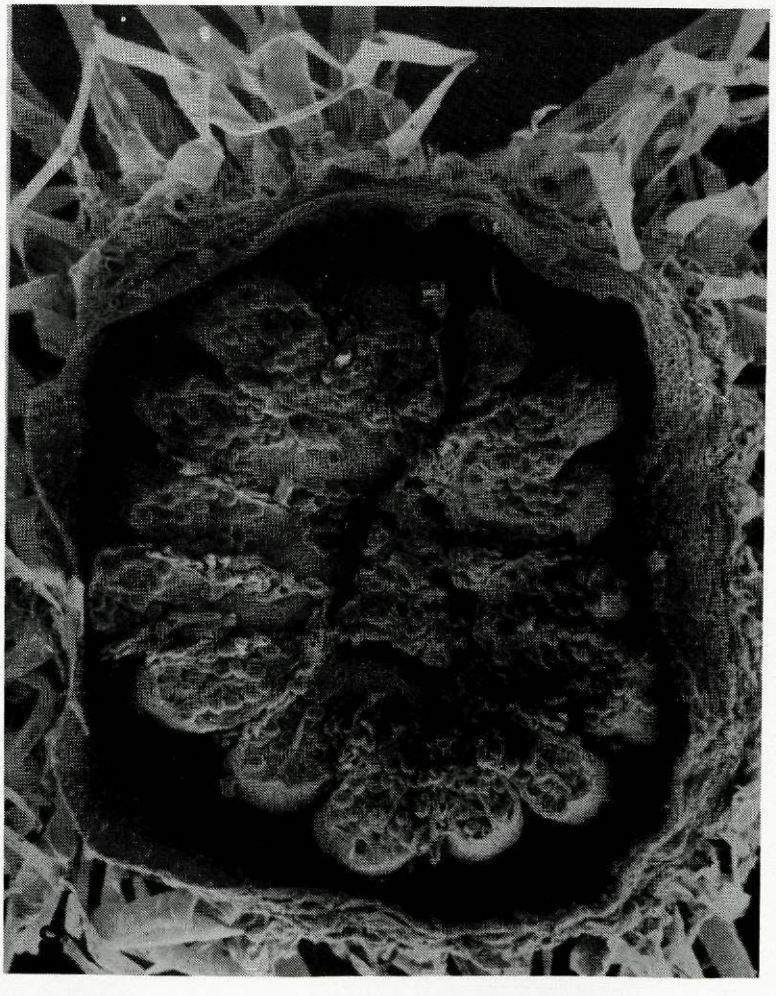

Co
5

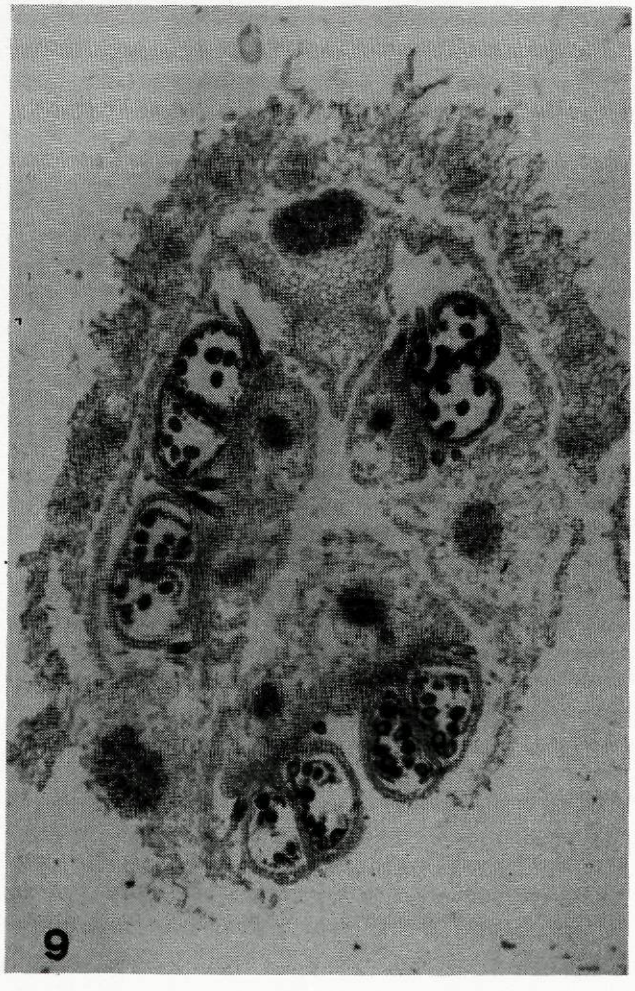
Fig.6, 7 e 8 - Cortes transversais do androceu efectuados na parte superior,de modo a seccionar os três segmentos de cada antera. As figuras 6 e 7 são de microscopia óptica (MO), inclusão em parafina e Epon respectivamente. 50 X. A figura 8 - SEM 60 X.

Fig.9 - Corte transversal do androceu efectuado perto da base. Cada antera é apenas seccionada uma só vez. M O. Inclusão em parafina. 50 X.


6


7




9

2 - Microsporogénese

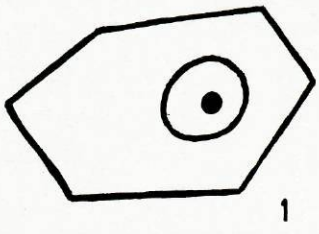
2.1-Microscopia óptica

A microsporogénese, ou formação do grão de pólen, compreende toda uma série de transformações, desde a célula mãe até ao grão de pólen maduro, que se tentou esquematizar na Fig.10. Essas transformações equivalem a estados que foram observados ao microscópio óptico.

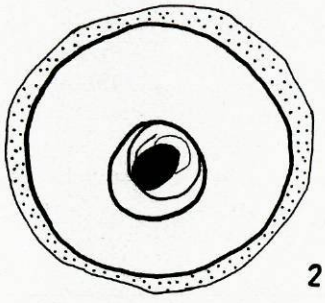
Assim, observou-se que as células mães (Fig.11) se dividiam meioticamente dando origem às tétradas jovens (Fig.12), cujos micrósporos ficavam envolvidos apenas por uma camada de calose. Neste estado não se verificou deposição da parede de natureza exínica, a qual só surgiu à volta de cada micrósporo, entre o plasmalema e a camada de calose, no estado de tétrada madura (Fig. 13). Após dissolução da camada de calose observaram-se os micrósporos dispersos no lóculo da antera, designando-se este estado por micrósporo jovem (Fig.14). Posteriormente teve início um período de vacuolização do citoplasma até se atingir o estado de micrósporo vacuolizado, isto é, micrósporo com um grande vacúolo (Fig.15). Seguidamente assistiu-se à redução do aparelho vacuolar ao mesmo tempo que o núcleo se dividiu dando origem a duas células - a vegetativa e a germinativa. Numa primeira fase a célula germinativa, em forma de lentícula, surgiu encostada à parede do grão de pólen, caracterizando o que se designa por estado de grão de pólen jovem (Fig.16). Depois aquela célula separou-se da parede do grão de pólen, deslocando-se para o interior da célula vegetativa, atingindo assim o estado de grão de pólen maduro.

Através destas imagens de microscopia óptica observou-se, também, que a antera era monotécica ou monolobada e que cada lóbulo possuia dois sacos polínicos . O lóculo da antera, onde se observavam os micrósporos (Figs.14 e 15) ou os grãos de pólen (Fig.16), estava rodeado por camadas de células, que analisadas do inte

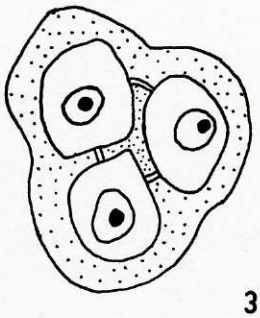
Fig.10 - Esquema dos diferentes estados da microsporogénese. 1 - célula esporogénica; 2 - célula mãe; 3 - tétrada jovem; 4 - tétrada madura; 5 - micrósporo jovem; 6 - micrósporo vacuolizado; 7 - grão de pólen jovem e 8 - grão de pólen maduro.



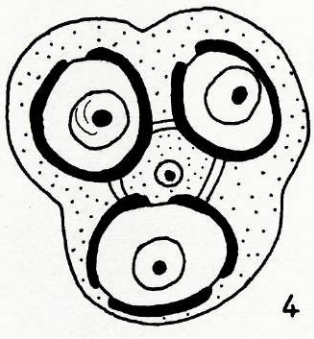
1



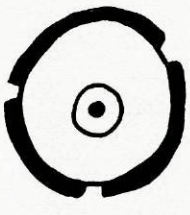
2



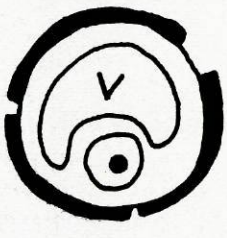
3



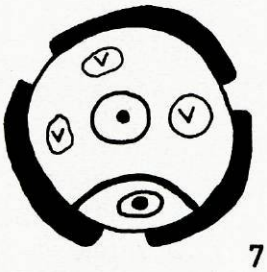
4



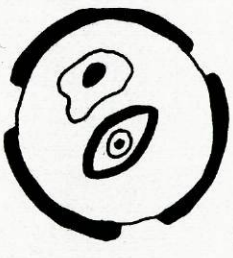
5



6



7



8

Anteras de Cucumis sativus L.
observadas ao microscópio óptico

Fig.11 - Células mães (CM). 110 X.

Fig.12 - Tétradas jovens envolvidas por uma camada de calose(C). 230 X.

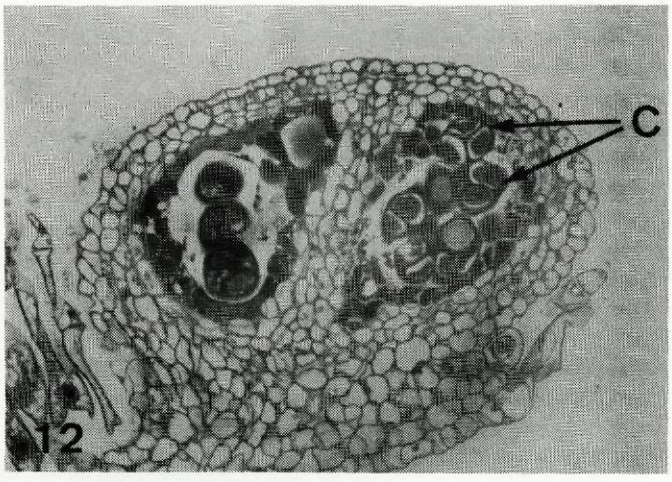
Fig.13 - Tétradas maduras rodeadas por calose (C). Ta-tapete. 210 X.

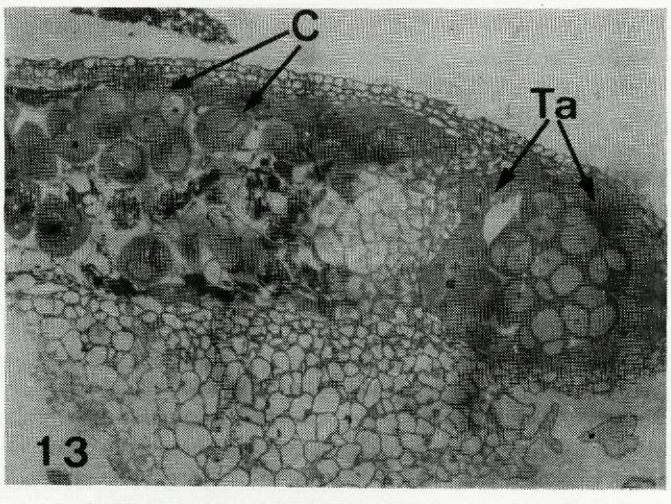
Fig.14 - Micrósporos jovens dispersos no lóculo da antera (L), observando-se as várias camadas que constituem a parede da antera e o tapete (Ta) que compreende a camada mais interna. 300 X.

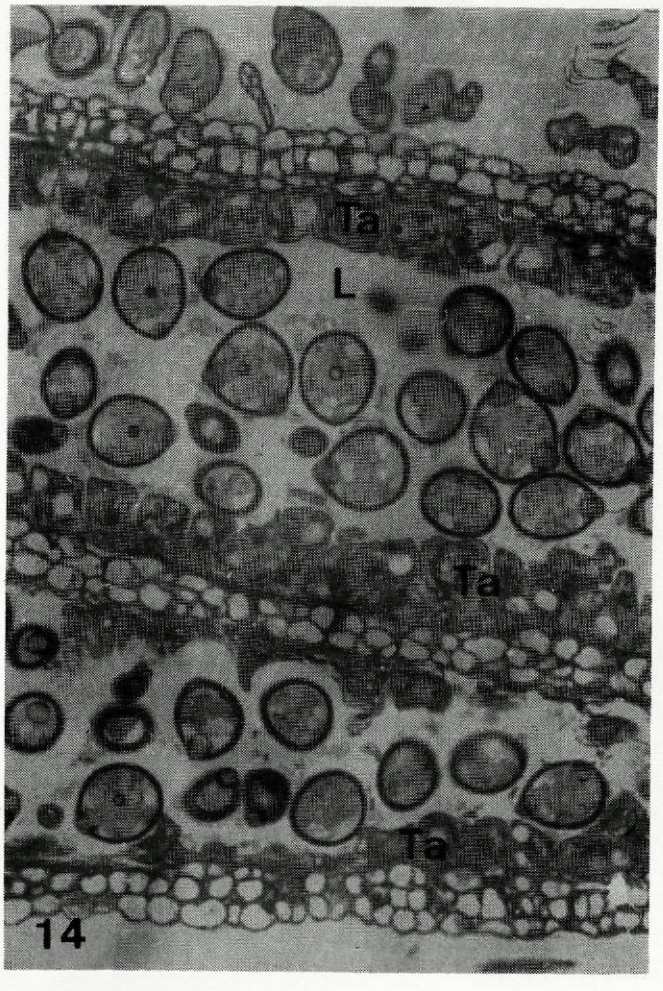
Fig.15 - Micrósporos vacuolizados caracterizados por um grande vacúolo (V). 240 X.

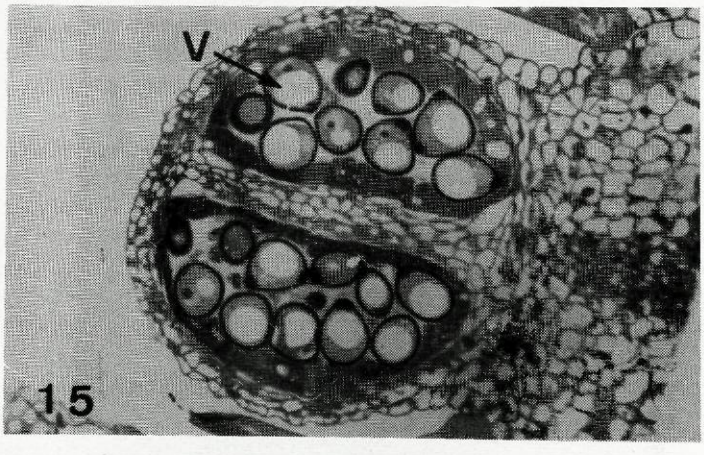
Fig.16 - Grãos de pólen jovem dispersos no lóculo da antera (L), vendo-se o núcleo vegetativo (NV) e núcleo germinativo (NG). Ta-tapete, Cm-camada mediana, E-endotécio, Ep - epiderme. 220 X.

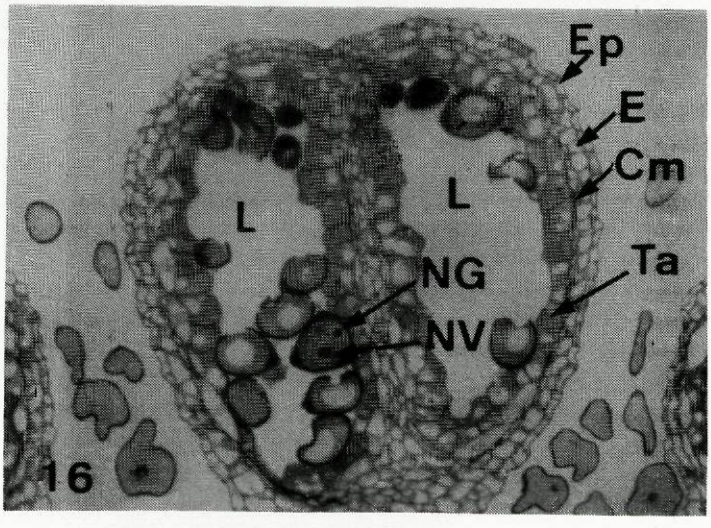

C
M
11


C
12


C
Ta
13


Ta
L
Ta
Ta
14


V
15


Ep
E
Cm
L
L
NG
Ta
NV
16

rior para o exterior se denominam por tapete (Ta), camada mediana (CM), endotécio (E) e epiderme (Ep).

Estudou-se a relação entre o comprimento da antera (L) e o estado de formação do grão de pólen. Devido à forma sinuosa das anteras tornava-se difícil e moroso medir a sua altura total e considerou-se como comprimento da antera a altura máxima (L), que ela exibia na flor (Fig.17), desprezando assim as porções que se apresentavam dobradas.

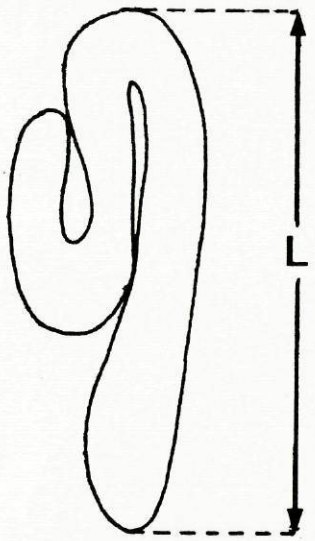


Fig.17 - Desenho esquemático de uma antera.
L - altura da antera.

A partir das medições efectuadas em anteras com células polínicas,nas várias fases de formação do grão de pólen (célula mãe, tétrada, micrósporo jovem, micrósporo vacuolizado, grão de pólen jovem e grão de pólen maduro), elaborou-se o Quadro 3.

	n	L ± SEM (mm)
Célula mãe	70	1,06 ± 0,02
Tétrada	70	1,43 ± 0,04
Micrósporo jovem	100	1,67 ± 0,02
Micrósporo vacuolizado	100	2,00 ± 0,02
Grão de pólen jovem	70	2,60 ± 0,02
Grão de pólen maduro	70	3,50 ± 0,13

Quadro 3 - Comprimento médio (L) das anteras, nas diferentes fases de desenvolvimento.
n-número de amostras; SEM-erro padrão da média com limites de confiança de 95%.
Os valores médios dos comprimentos das anteras foram comparados recorrendo ao teste t de Student tendo-se verificado que para um limite de confiança de 99% as diferenças são significativas.

2.2-Microscopia electrónica

No desenrolar da microsporogénese os organelos citoplasmáticos apresentavam modificações ultrastruturais que caracterizam os diferentes estados de formação do grão de pólen. Neste capítulo não será feita referência ao processo de deposição da exina, durante a microsporogénese, ficando a sua descrição para o capítulo seguinte.

2.2.1-Célula esporogénica

Na fase pré-meiótica verificou-se que o microsporângio era constituído por uma massa central de células esporogénicas. Logo após a sua individualização das células do tapete, normalmente, as células esporogénicas primárias sofrem um mitose originando as células esporogénicas secundárias. No entanto Heimlich (1929) fez um estudo dos meiócitos de Cucumis sativus L. e admitiu que as células esporogénicas primárias funcionavam directamente como células mães do grão de pólen.

Verificou-se que as células esporogénicas (Fig.18) apresentavam núcleos com nucléolo volumoso e o seu citoplasma continha alguns pequenos vacúolos, plastídios geralmente em forma de haltere possuindo estroma denso com grãos de amido e uma ou outra lamela isolada . As mitocôndrias apresentavam matriz pouco densa em electrões e cristas dilatadas embora em número reduzido . O aparelho de Golgi estava representado por numerosos dictiossomas,constituídos por um empilhamento de sáculos achatados,produzindo numerosas e pequenas vesículas que se dispersavam no citoplasma. O retículo endoplasmático,presente neste estado, surgia pouco desenvolvido, formando cisternas de tamanho variável com ribossomas nas suas membranas. Também se observavam ribossomas livres,no citoplasma, bem como alguns glóbulos lipídicos (Fig.19).

Nesta fase pré-meiótica observaram-se,nas paredes das cé

lulas esporogénicas,plasmodésmios que estabelecem continuidade, também,com as células do tapete.

Posteriormente ocorreu um isolamento das células esporogénicas, começando por se observar o afastamento da membrana plasmática relativamente à parede celular. Nesta zona extracelular verificou-se a presença de pequenas vesículas (Fig.20, setas) que se admite possuirem material e possivelmente enzimas que contribuirão para a formação da parede de calose que as irá envolver.

Seguidamente, cada célula esporogénica ou célula mãe individual começou a tomar a forma arredondada e a rodear-se de calose. Os plasmodésmios,que existiam entre estas células e as células do tapete,foram desaparecendo, enquanto que entre as próprias células esporogénicas surgiram os canais citomícticos. Estes canais permitem a troca de organelos entre as células e,segundo alguns autores,intervêm na sincronização das divisões meióticas bem como na diferenciação.

2.2.2 - Célula mãe do grão de pólen

Todos os estádios,que constituem a meiose, foram primeiramente identificados quer com a coloração de orceína acética quer pelo método de Feulgen (Material e Métodos). Como os cromossomas eram de pequenas dimensões e reduzida espessura, tornou-se por vezes difícil a sua identificação a nível de microscopia óptica.

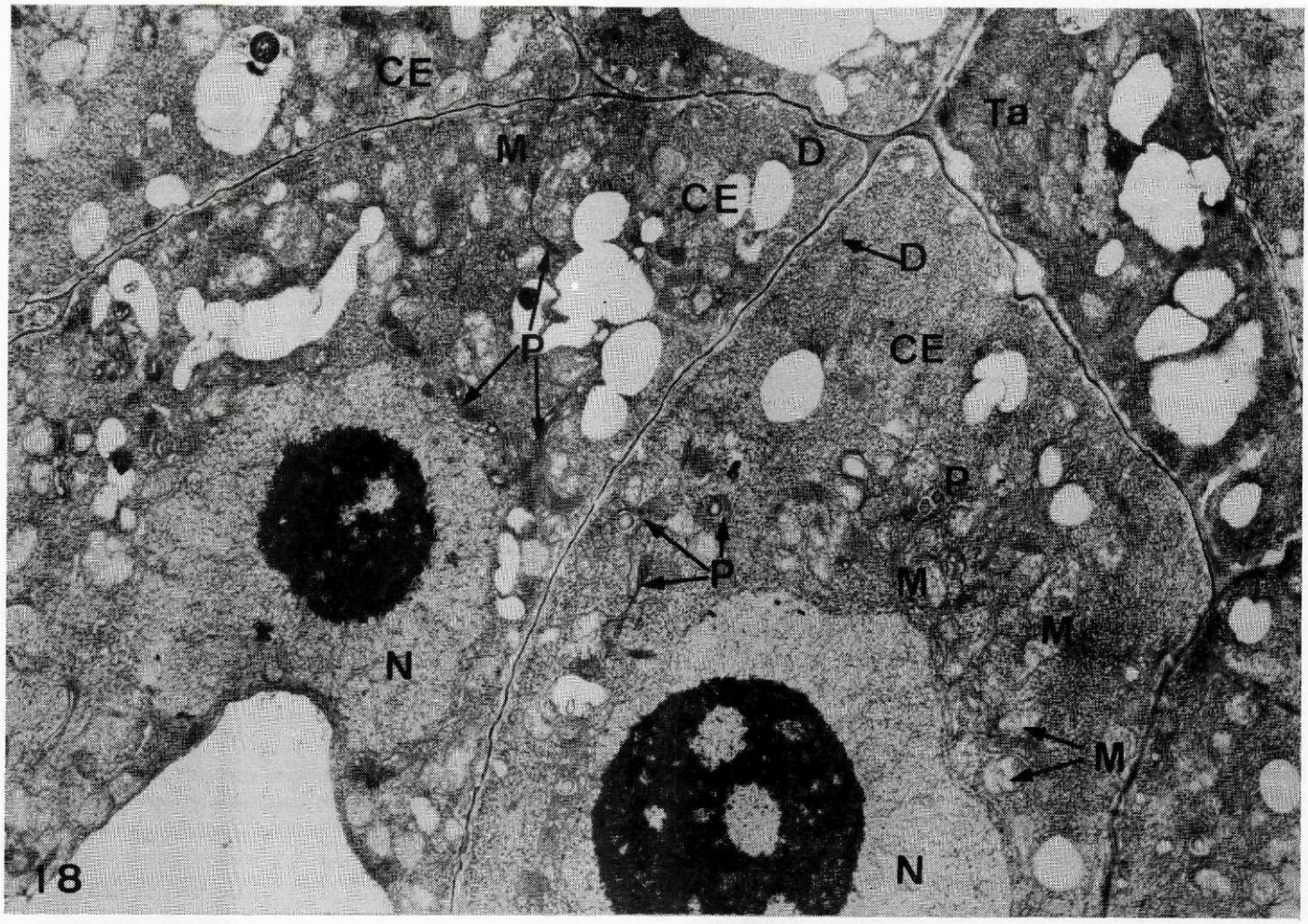
A acompanhar o processo de divisão nuclear (meiose) no citoplasma ocorriam profundas modificações, tendo sido interpretadas como estando associadas com a transição da fase esporófita à fase gametófita.

Em Cucumis sativus L. no início de meiose, estádio de leptóteno-zigóteno (Fig.21), observavam-se as células mães envolvidas por uma pequena camada de calose. O citoplasma apresentava-se bastante denso com numerosos ribossomas livres. As mitocôndrias tinham pequenas dimensões e forma mais ou menos esféri-

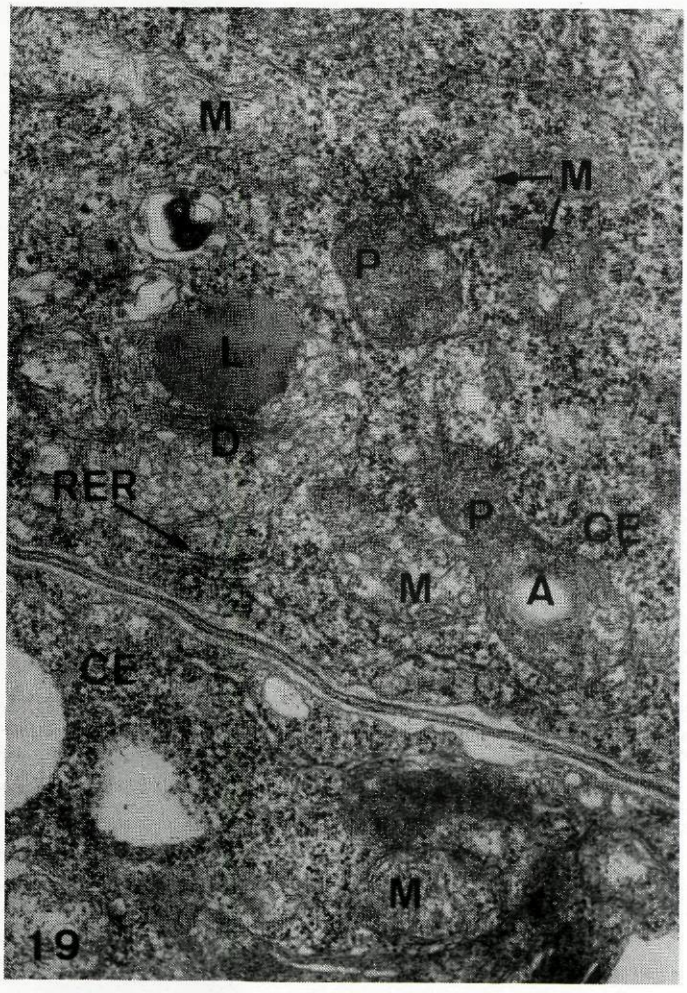
Fig.18 - Região que mostra células esporogénicas (CE) e célula do tapete (Ta), observando-se núcleos volumosos (N) , plastídios (P) com grãos de amido e mitocôndrias (M). 19 200 X.

Fig.19 - Células esporogénicas com grande densidade de ribossomas e organelos citoplasmáticos. P-plastídio, A-amido, M-mitocôndria, D-dictiossoma, L-glóbulo lipídico. 24 500 X.

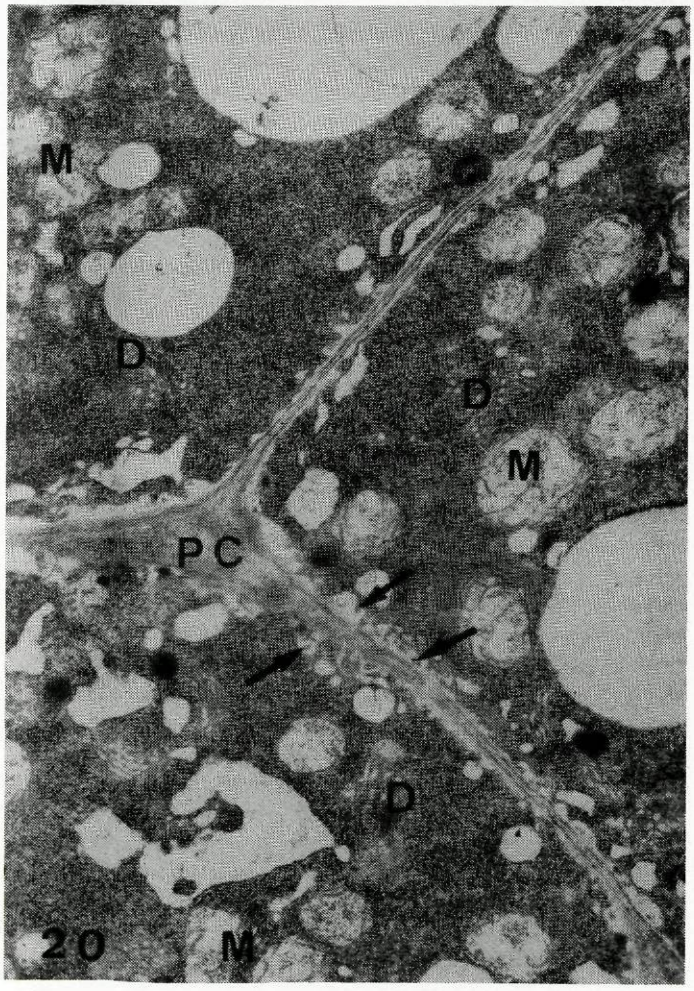
Fig.20 - Células esporogénicas observando-se o afastamento do plasmalema relativamente à parede celular (PC), e a presença de pequenas vesícula (setas). M-mitocôndria, D--dictiossoma. 12 800 X.



18



19



20

ca com matriz pouco densa, e cristas longas em número reduzido. Os plastídios eram de grandes dimensões,comparativamente às mitocôndrias,e apresentavam um estroma mais ou menos homogéneo onde se podiam observar glóbulos osmiofílicos . Os dictiossomas eram formados por sáculos empilhados (máximo de 5), apresentando os seus bordos dilatados e envolvidos por algumas vesículas que se dispersavam no citoplasma.

No estádio de zigo-paquíteno (Fig.22) observaram-se modificações a nível dos organelos celulares. Assim, as mitocôndrias apresentavam-se com formas alongadas, matriz densa com cristas bem visíveis e áreas menos densas em electrões com fibrilas de DNA. Os plastídios eram do tipo proplastídio de estroma mais ou menos homogéneo com algumas lamelas isoladas. . Neste estádio da meiose, estes organelos por vezes confundiam-se com as mitocôndrias. Observaram-se também, perfis de retículo endoplasmático rugoso e ribossomas livres no citoplasma bem como dictiossomas constituídos por cisternas empilhadas em fase de formação não se observando vesículas na sua vizinhança. O núcleo era volumoso contendo complexos sinaptonémicos (Fig.22,seta).

No paquíteno não se notou alteração dos organelos citoplasmáticos vendo-se apenas uma reduzida população de ribossomas livres e um aumento do número de sáculos empilhados e achatados dos dictiossomas.

No diplóteno (Fig.23) observaram-se imagens sugestivas de actividade dos dictiossomas, pois surgiam constituídos por sáculos empilhados e achatados com as suas extremidades dilatadas e envolvidas por numerosas vesículas, cujo tamanho parecia aumentar à medida que se afastavam dos dictiossomas.

No estádio de diacinese (Fig.24), no citoplasma,observavam-se algumas vesículas de tamanho variado provavelmente originadas dos dictiossomas. Os plastídios começavam a acumular amido, observando-se pequenos cristais no estroma. O retículo endoplasmático rugoso estava praticamente ausente, e os dictiossomas apresentavam a forma de sáculos empilhados com pequenas vesículas ao seu redor.

Profase I

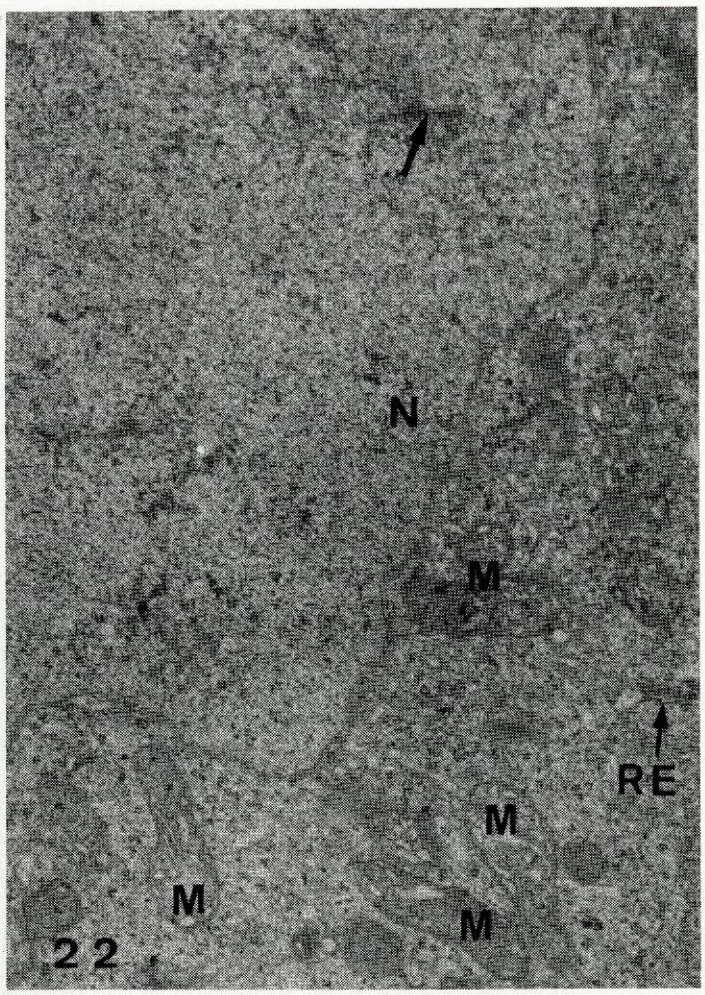
Fig.21 - Célula mãe em leptóteno-zigóteno rodeada de calose (C), observando-se o citoplasma com bastantes ribossomas , dictiossomas (D) e mitocôndrias (M). 24 500 X.

Fig.22 - Célula mãe em zigo-paquíteno possuindo núcleo volumoso (N), observando-se um complexo sinaptonémico (seta) . M-mitocôndria, RE-retículo endoplasmático. 21 000 X.

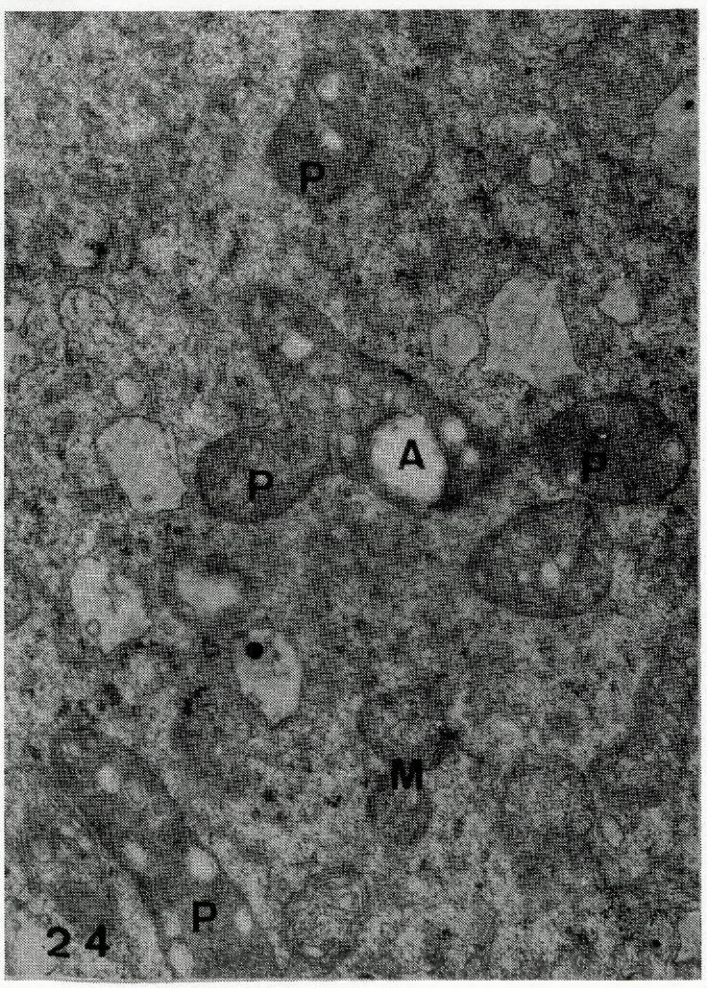
Fig.23 - Célula mãe em diplóteno com um reduzido número de ribossomas no citoplasma. P-plastídio, M-mitocôndria , D-dictiossoma, C-calose. 14 000 X.

Fig.24 - Célula mãe no fim da profase I (diacinese) observando-se a presença de amido (A) nos plastídios (P), e que as mitocôndrias (M) são de pequenas dimensões e arredondadas. 24 000 X.


M
M
D
C
21


N
M
RE
M
M
M
22


M
M
P
D
C
C
C
23


P
A
P
P
M
P
24

Durante a metafase I e anafase I os organelos citoplasmáticos não sofriam alterações na sua forma, apenas se observou a presença de pequenas vesículas no citoplasma.

No estádio de interfase, como se pode ver na Fig.25, as células mães comunicam umas com as outras através dos canais citomícticos. Os organelos citoplasmáticos apresentam-se bastante modificados. As mitocôndrias surgiam em forma de taça, apresentando formas amebóides sendo frequente a presença de algumas formas em haltere que pareciam ser fases iniciais da forma de taça. Nesta fase as mitocôndrias apresentavam-se também encurvadas, parecendo ocorrer um consequente crescimento das extremidades e posterior ligação. Os plastídios continuavam a possuir grãos de amido no estroma. O retículo endoplasmático era pouco abundante, sendo constituído por pequenas extensões tubulares que formavam cisternas de tamanho variável e contornos irregulares, sem ribossomas nas suas membranas (retículo endoplasmático liso). Os dictiossomas surgiam como sáculos achatados e empilhados, não se observando vesículas de secreção na sua vizinhança parecendo, por isso, estarem inactivos. No citoplasma destas células observou-se, frequentemente, a presença de corpos semelhantes a nucléolos, designados correntemente na literatura da especialidade por "nucleolóides". Verificou-se que estes corpos, em estádios posteriores, se desintegravam originando corpos microscopicamente indistintos dos ribossomas.No entanto foi possível observar estes corpos durante a telofase II (Fig.26) e mesmo no estado de tétrada.

A partir da interfase de meiose iniciou-se o restabelecimento da população de ribossomas. Também este estádio de meiose pôde caracterizar-se por uma modificação a nível das mitocôndrias e plastídios.

Na telofase II (Figs.27, 28, 29 e 30) o citoplasma apresentava-se mais rico resultante não só de um aumento em número de ribossomas presentes, mas também de organelos. Para uma melhor observação dos organelos citoplasmáticos a pré-fixação efectuada com o glutaraldeído em tampão cacodilato seguida de pós-fixa

Meiose (continuação)

Fig.25 - Célula mãe em interfase rodeada de calose (C), existindo ainda os canais citomícticos (CC). No citoplasma observam-se os plastídios (P) com pequenos grãos de amido, os dictiossomas e as mitocôndrias (M) de formas amebóides encerrando uma área de citoplasma (setas). 11 200 X.

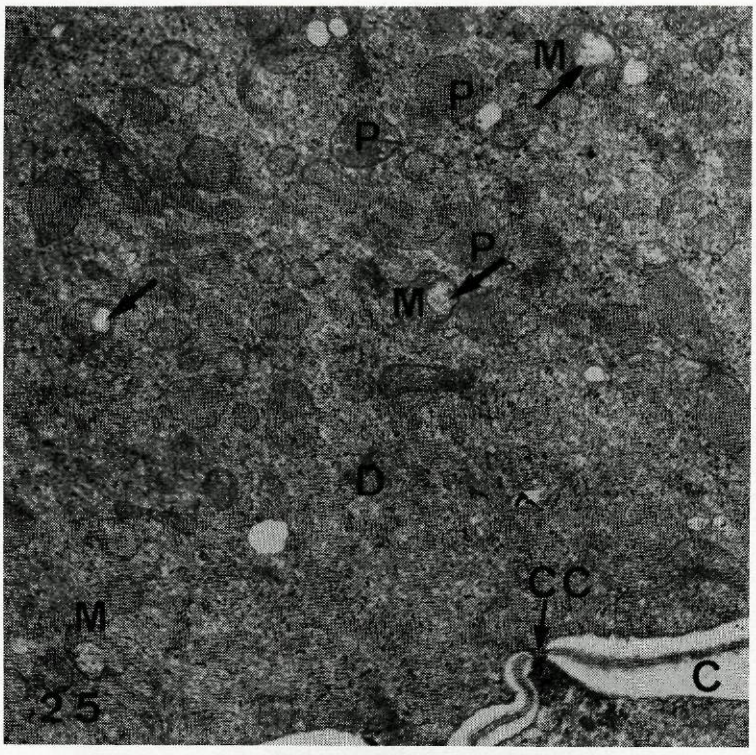
Fig.26 - Célula mãe em telofase II, rodeada de calose (C) observando-se os nucleolóides (n). P-plastídio, M-mitocôndria, D-dictiossoma. 14 000 X.

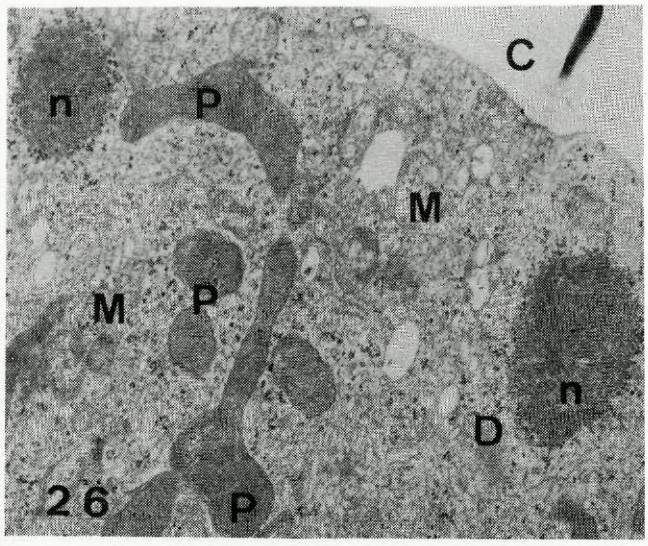
Fig.27 - Célula mãe em telofase II, sendo visíveis 3 núcleos (N). As mitocôndrias (M) têm a forma de taça com um enclave citoplasmático (Ci) menos denso em electrões. C-calose. 4 400 X.

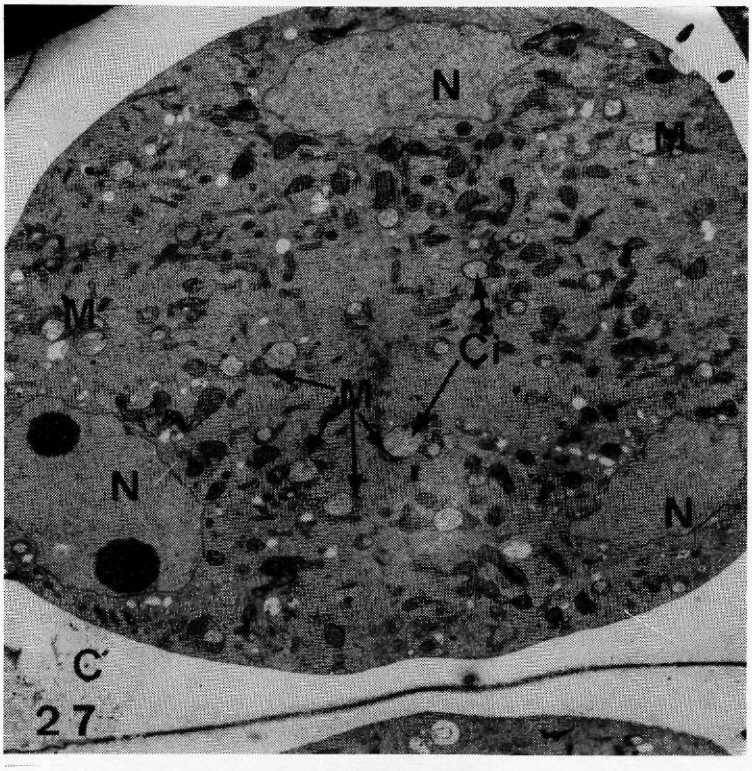
Fig.28 - À superfície da célula mãe o citoplasma invagina-se formando 4 sulcos (setas). No interior da célula observa-se o fragmoplasto em formação . N-núcleo, D-dictiossoma, P-plastídio, M-mitocôndria. 4 500 X.

Fig.29 - Célula mãe no fim da meiose. P-plastídio, RER-retículo endoplasmático rugoso, REL-retículo endoplasmático liso, D-dictiossoma. 16 800 X.

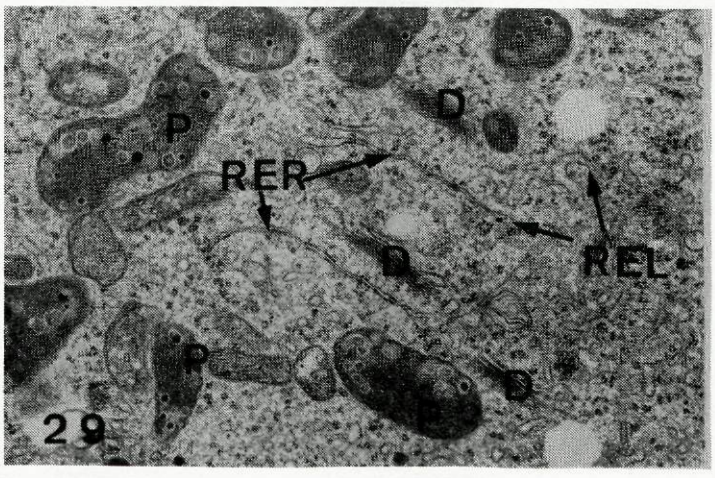
Fig.30 - Pormenor de uma célula no fim da meiose observando-se lamelas anuladas (LA) em continuidade com o retículo endoplasmático. 22 200 X.

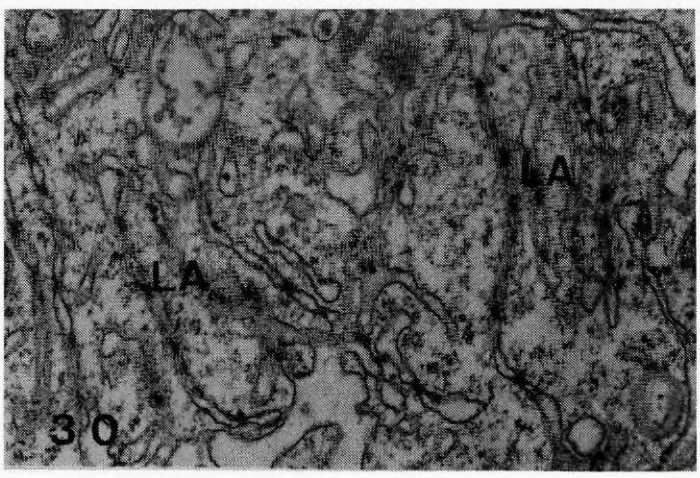

M
P
P
P
M
D
CC
C
M
25


C
n
P
M
M
P
D
n
26
P


N
M
M
Cr
M
N
N
C
27


N
P
P
D
P
P
N
M
P
28


P
D
RER
REL
D
P
D
29


LA
LA
30

ção em tetróxido de ósmio no mesmo tampão pareceu ser a mais indicada (Figs.29 e 30). Assim, observaram-se as membranas do retículo endoplasmático formando cisternas alongadas rugosas e lisas, os dictiossomas com as suas cisternas empilhadas produzindo pequenas vesículas e os plastídios continuando a acumular pequenos grãos de amido. As mitocôndrias foram aumentando de volume, apresentando um sistema de cristas bem desenvolvidas e áreas menos densas em electrões com fibrilas de DNA. As formas das mitocôndrias eram variadas, observando-se não só formas alongadas ou esféricas mas também formas amebóides encerrando uma área de citoplasma menos densa em electrões que o citoplasma exterior (Figs.27 e 28). Também se observaram frequentemente lamelas anuladas (Fig.30) durante a telofase II. No fim da meiose observou-se na célula não só o início de formação do fragmoplasto, que resultou da fusão de pequenas vesículas que migraram para o centro da célula, como a formação de quatro sulcos à periferia da célula (Fig.28). A divisão das células mães ocorreu simultâneamente, pois a célula dividiu-se no fim da meiose, dando origem a quatro células.

Com a chegada ao fim da telofase II pode considerar-se o início de uma nova fase, que irá terminar com a formação do grão de pólen maduro.

2.2.3 - Tétrada

As quatro células resultantes da meiose ficaram envolvidas por uma camada de calose e este estado é denominado tétrada.

2.2.3.1 - Tétrada jovem

O estado de tétrada jovem compreende toda a fase que vai desde o fim da meiose até ao aparecimento de uma camada de exina entre o plasmalema e a calose.

Logo após a meiose, os dictiossomas eram pouco abundantes,

apresentando-se constituídos por 3 a 4 sáculos empilhados,vendo-se na sua proximidade um número reduzido de pequenas vesículas originadas dos sáculos e dispersando-se pelo citoplasma (Figs.31 e 32). O retículo endoplasmático surgia pouco abundante observando-se perfis do tipo liso, com a forma de cisternas um pouco dilatadas e de contornos irregulares, sem ribossomas nas suas membranas (Fig.33). Os plastídios eram pouco abundantes (Fig.31). Como se viu no fim da meiose, os plastídios possuíam numerosos pequenos grãos de amido, que possivelmente foram gastos durante a divisão da célula, observando-se na fase de tétrada proplastídios com ausência ou reduzido número de grãos de amido. A fase lamelar destes organelos era pouco estruturada apresentando apenas algumas lamelas em forma de túbulos. As mitocôndrias aumentavam de volume e adquiriam formas amebóides mais complexas. Assim, observavam-se formas em anel englobando uma e até duas áreas de citoplasma (Fig.31). Nestas zonas o citoplasma era mais claro, podendo possuir retículo endoplasmático e ribossomas quer livres quer na forma de polirribossomas em hélice (Fig.33). Estes polirribossomas também se observavam dispersos no citoplasma (Fig.32). As cristas mitocondriais apresentavam-se mais ou menos bem desenvolvidas e viam-se na matriz áreas menos densas em electrões com fibrilas de DNA.

2.2.3.2 - Tétrada madura

Os micrósporos,embora envolvidos por uma camada de calose , já possuiam parede exínica entre o plasmalema e essa camada (Fig.34).

No estado de tétrada madura os dictiossomas estavam em grande actividade, produzindo numerosas vesículas que se observavam dispersas no citoplasma (Fig.35). O retículo endoplasmático rugoso era mais abundante que no estado anterior, observando-se também alguns perfis de cisternas dilatadas lisas (Fig.35). Neste estado surgiam no citoplasma numerosas vesículas e até pequenos vacúolos em associação com o retículo endoplasmático liso .

Tétrada jovem de Cucumis sativus L.

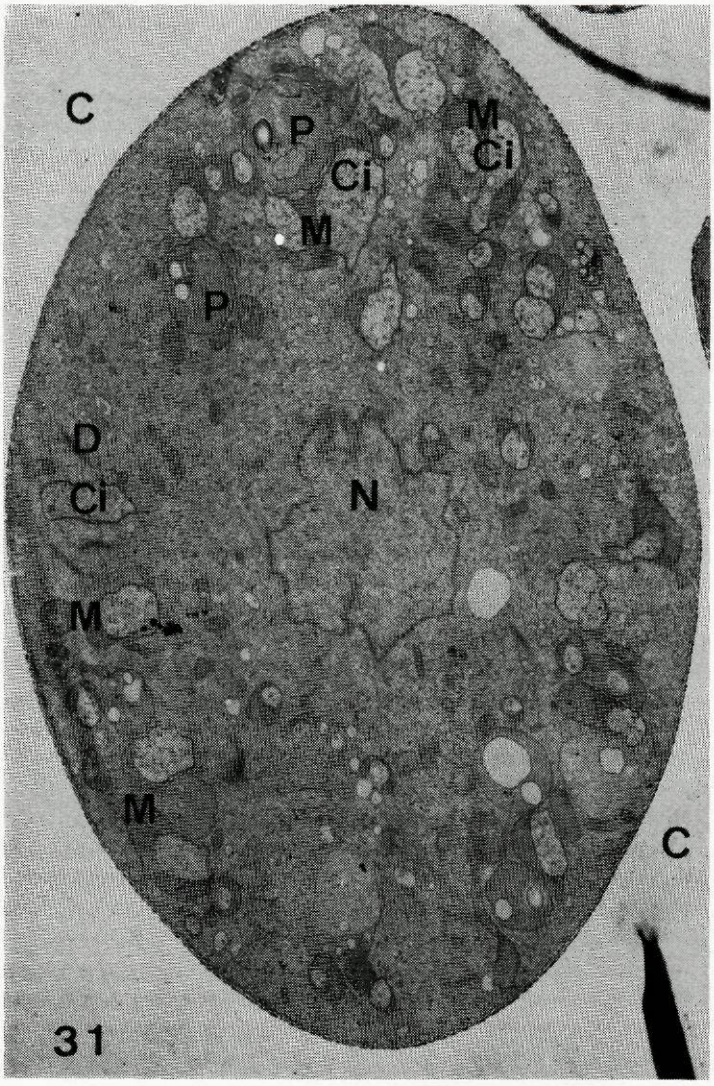
Fig.31 - Micrósporo rodeado de calose (C) mostrando núcleo central (N), plastídios (P), dictiossomas (D) e mitocôndrias (M) com enclave citoplasmático (Ci). 6 600 X.

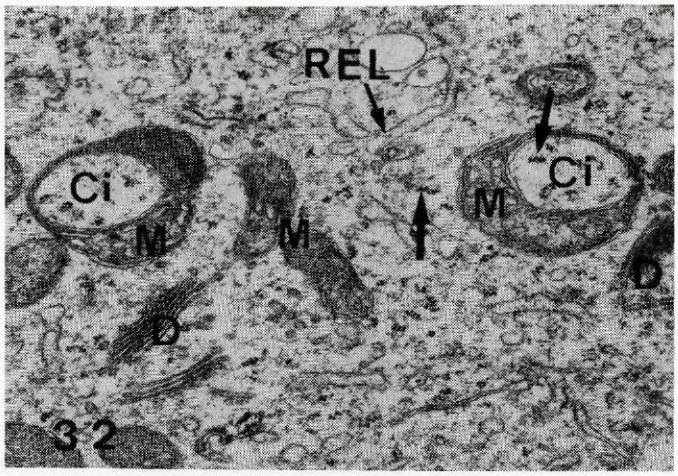
Fig.32 e 33 - Pormenores de células em fase de tétrada jovem observando-se polirribossomas em hélice (setas), retículo endoplasmático liso (REL), dictiossomas (D) e mitocôndrias (M) com enclave citoplasmático (Ci). N-núcleo, L-glóbulo lipídico. 20 800 X e 24 000 X.

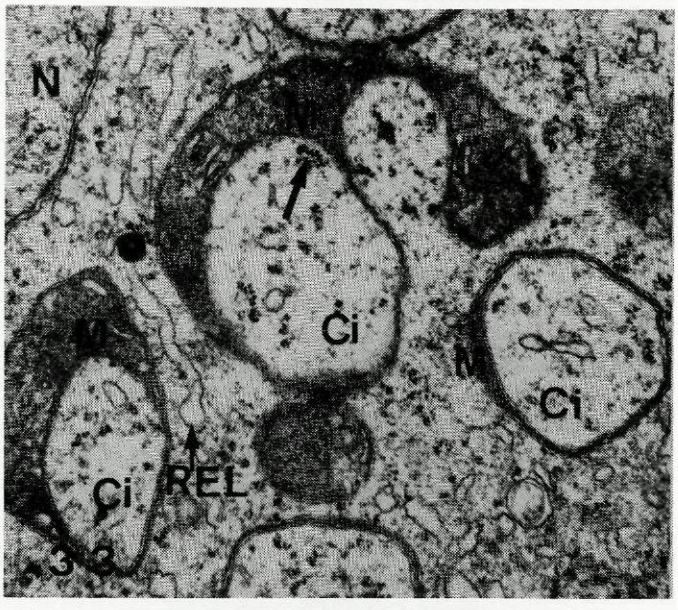
Tétrada madura

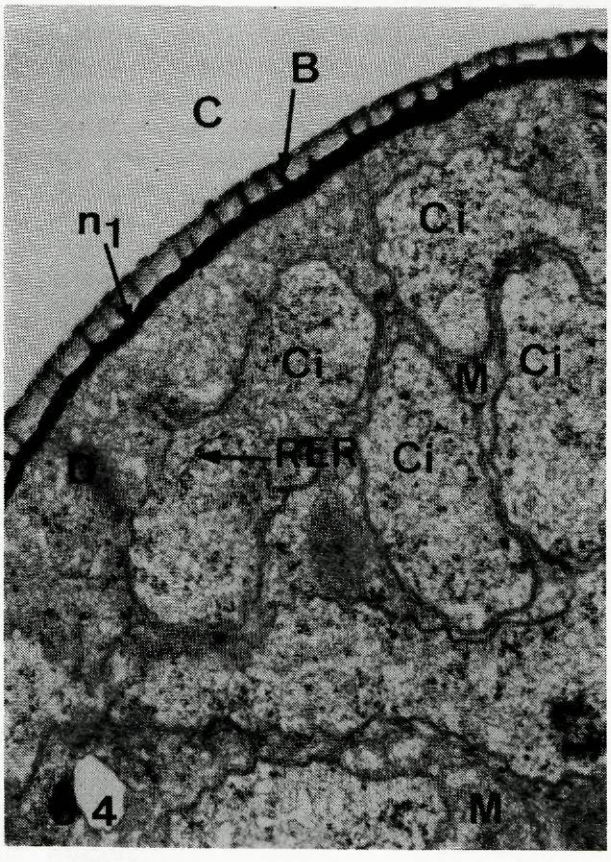
Fig.34 - Porção de micrósporo ainda rodeado de calose (C). As mitocôndrias (M) são de maiores dimensões com enclaves citoplasmáticos (Ci) vendo-se perfis de retículo endoplasmático rugoso (RER). Os dictiossomas (D) produzem pequenas vesículas. B-bácula, n_1-nexina 1. 17 600 X.

Fig.35 - Pormenor de micrósporo no mesmo estado de desenvolvimento. M-mitocôndria, Ci-enclave citoplasmático,D-dictiossoma, RE-retículo endoplasmático, N-núcleo, P-proplastídio. 13 200 X.


C
P
M
Ci
M
P
D
Ci
N
M
M
C
31


REL
Ci
M
M
Ci
M
D
D
32


N
Ci
M
Ci
Ci
REL
33


C
B
n1
Ci
Ci
M
Ci
RER
Ci
D
4
M


P
M
Ci
M
RE
D
Ci
N
3

Os plastídios raramente possuíam amido. Eram proplastídios de forma mais ou menos arredondada, de estroma homogéneo com lamelas isoladas,vendo-se por vezes pequenos glóbulos osmiofílicos.

À medida que a microsporogénese prosseguia as mitocôndrias aumentavam de volume, a sua forma surgia cada vez mais complexa e continham um ou dois grandes enclaves citoplasmáticos.

Foi feita a análise estereológica das mitocôndrias, bem como cortes em série para determinar a sua forma tridimensional. No entanto apresentar-se-ão esses resultados noutro capítulo pois neste apenas iremos tratar da descrição das alterações básicas de citoplasma durante a microsporogénese.

2.2.4 - Micrósporo

2.2.4.1 - Micrósporo jovem

Após a dissolução da camada de calose que envolvia os quatro micrósporos estes libertavam-se, ficando livres no lóculo da antera.

No micrósporo jovem os dictiossomas eram constituídos por alguns sáculos empilhados parecendo não produzirem vesículas (Fig.36). O retículo endoplasmático, embora pouco abundante,estava sempre presente surgindo sob a forma de elementos tubulares finos e flexuosos, quer do tipo rugoso, quer do tipo liso (Fig.36). Algumas cisternas do retículo endoplasmático apresentavam dilatações nas suas extremidades. Neste estado da microsporogénese frequentemente se observou a presença de perfis de retículo endoplasmático de forma circular, englobando uma área de citoplasma que se apresentava menos densa em electrões relativamente ao citoplasma exterior.

Como se pode observar nas Figs.36 e 37, as mitocôndrias apresentavam grandes dimensões, contendo de dois a cinco enclaves citoplasmáticos, o que sugere o crescimento bastante acentuado das várias zonas da mitocôndria. A zona da matriz era bastan

te reduzida, contendo um sistema de cristas mais ou menos desenvolvido e fibrilas de DNA situadas em áreas menos densas em electrões. Os plastídios viam-se sempre sob a forma de proplastídios de estroma mais ou menos homogéneo, observando-se algumas lamelas isoladas e glóbulos osmiofílicos.

A partir do estado de micrósporo jovem assistiu-se a um início de desenvolvimento do sistema vacuolar. Novamente se viam imagens sugestivas da actividade dictiossómica, pois numerosas vesículas surgiam dispersas no citoplasma. Estas vesículas e as originadas a partir do retículo endoplasmático liso, contribuem para a formação do sistema vacuolar. Neste estado da microsporogénese já se observavam pequenos vacúolos no citoplasma (Fig.37).

2.2.4.2 - Micrósporo vacuolizado

O estado de micrósporo culmina com o aparecimento de um grande vacúolo; esta expansão do sistema vacuolar é acompanhada pelo deslocamento do núcleo para a periferia da célula, para um local oposto às zonas dos poros.

No micrósporo vacuolizado, como se pode ver nas Figs.38 e 39, os dictiossomas produziam pequenas vesículas, os plastídios, de estroma simples, possuiam algumas lamelas isoladas assim como glóbulos osmiofílicos. As membranas do retículo endoplasmático formavam cisternas de tamanho variável, observando-se continuidade entre a forma lisa e a forma rugosa. Estes aspectos assemelham-se aos observados no micrósporo jovem. As mitocôndrias apresentavam igualmente grandes dimensões, com vários enclaves citoplasmáticos que por vezes continham perfis de retículo endoplasmático e ribossomas livres ou associados em polirribossomas helicoidais. Nestas mitocôndrias a matriz era muito reduzida, observando-se cristas bem desenvolvidas e fibrilas de DNA em zonas menos densas em electrões.

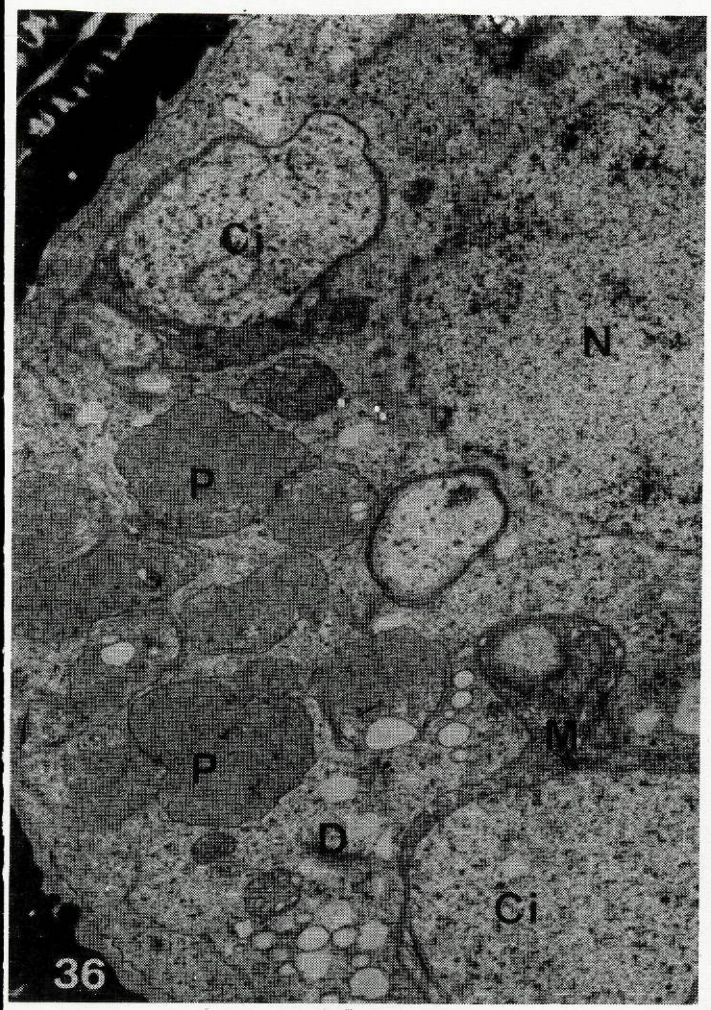
Micrósporo jovem de Cucumis sativus L.

Fig.36 - Micrósporo jovem, após dissolução da camada de calose, vendo-se no citoplasma mitocôndrias de grandes dimensões e formas irregulares, havendo duas mitocôndrias com dois enclaves citoplasmáticos (Ci); os plastídios (P) de estroma homogéneo e os dictiossomas (D). O núcleo (N) é volumoso. 11 200 X.

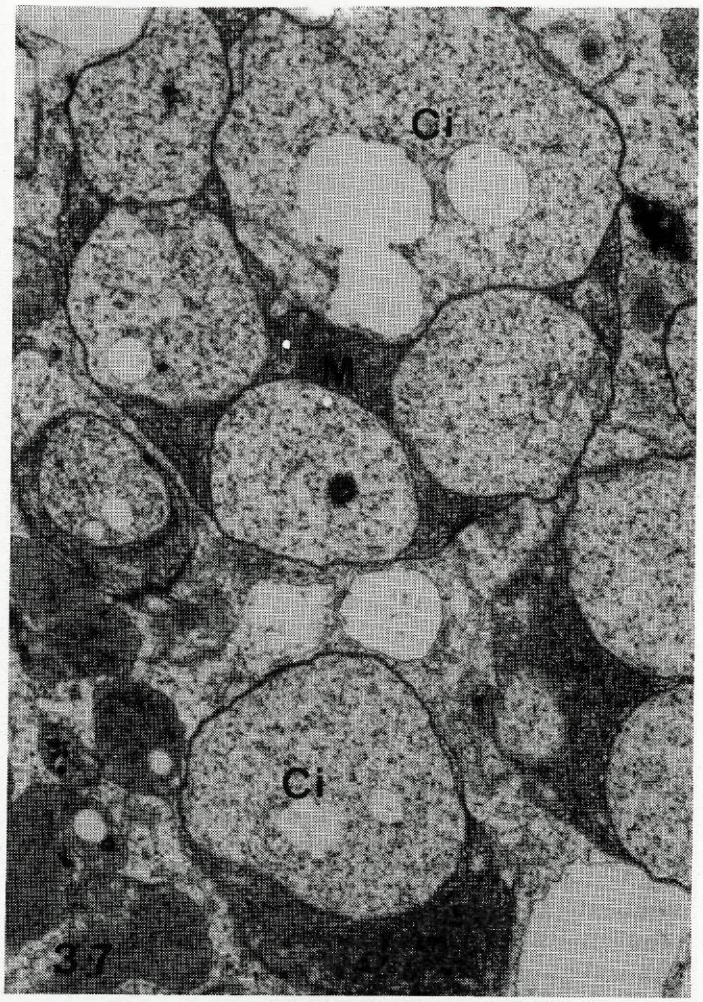
Fig.37 - Pormenor de micrósporo observando-se uma mitocôndria com vários (5) enclaves citoplasmáticos (Ci). 8 400 X.

Micrósporo vacuolizado de Cucumis sativus L.

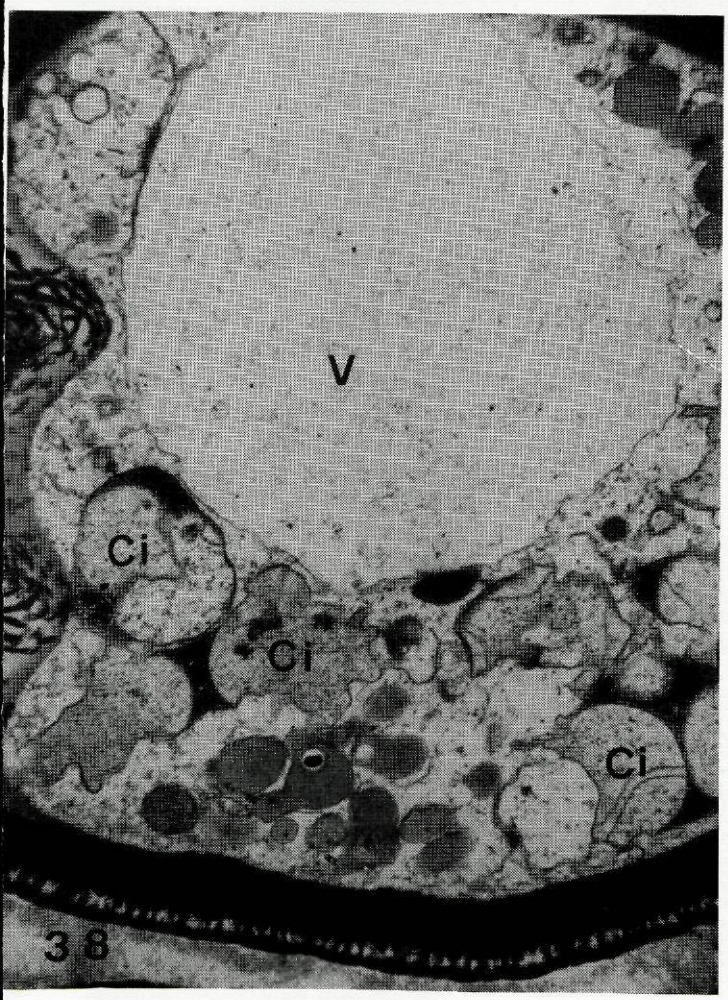
Fig.38 e 39 - Micrósporos contendo um grande vacúolo (V). As mitocôndrias têm formas irregulares e enclaves citoplasmáticas e os plastídios (P) têm estroma homogéneo com pequenos glóbulos osmiofílicos. 5 600 X e 7 000 X.



36



37



38



39

2.2.4.3 - Micrósporo em divisão nuclear

Antes de descrevermos o estado de grão de pólen jovem é de interesse referir um estado em que o núcleo do micrósporo se divide (mitose) para dar origem ao grão de pólen jovem. Simultâneamente, com esta divisão nuclear, ocorre a redução do sistema vacuolar.

Assistiu-se, neste estado, a uma fragmentação do vacúolo principal e a uma retracção do tonoplasto penetrando no interior do vacúolo. Foi possível observar digitações do tonoplasto, de forma e tamanho variadas, que por constrição davam origem a vesículas no interior do próprio vacúolo. Nesta fase tornava-se possível distinguir a área ocupada anteriormente pelo vacúolo, pois apresentava-se menos densa em electrões que o restante citoplasma (Figs.40a e 40b).

Este estado de redução do sistema vacuolar apresenta uma característica particular, pois quase todos os organelos pareciam estar em grande actividade metabólica notando-se a presença de inúmeros polirribossomas em espiral. Os dictiossomas surgiam constituídos por vários sáculos empilhados produzindo vesículas. O retículo endoplasmático apresentava-se bastante desenvolvido, com os seus perfis longos e flexuosos formando conjuntos membranares regularmente alinhados e com ribossomas nas suas membranas (RER), notando-se também a presença de perfis de RER junto ao plasmalema (Fig.42, seta). As mitocôndrias adquiriam formas em bastonete ou formas irregulares e, simultâneamente, observavam-se formas mais ou menos esféricas (Fig.41).

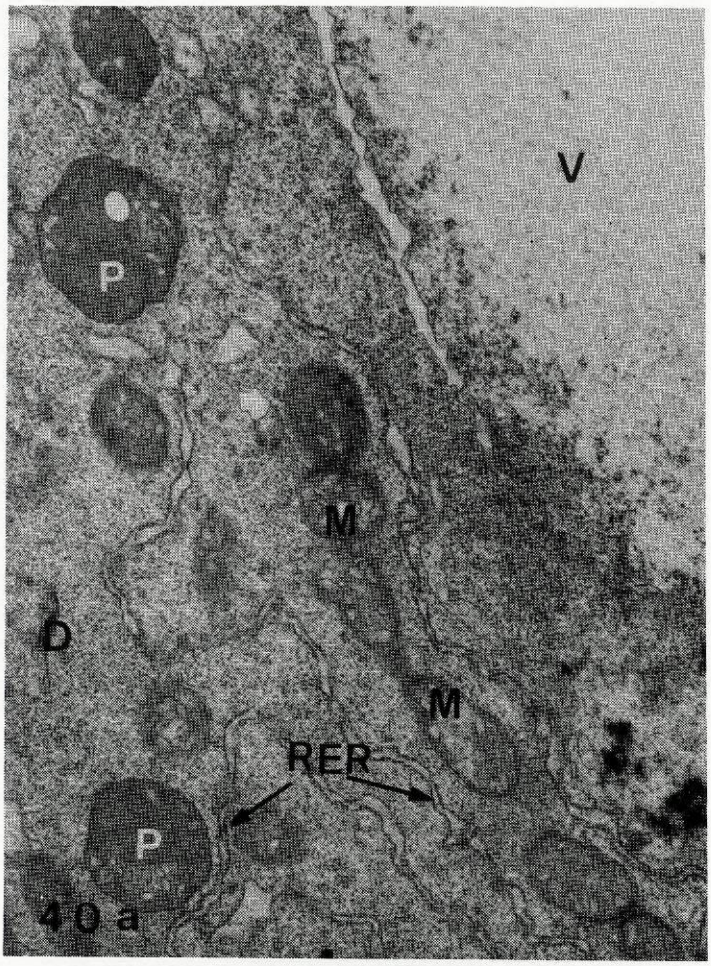
Neste estado da microsporogénese não foram mais observadas as mitocôndrias profundamente modificadas, descritas anteriormente. Porém os plastídios apresentavam forma e estrutura semelhantes aos observados nos estados anteriores.

Micrósporo em divisão nuclear

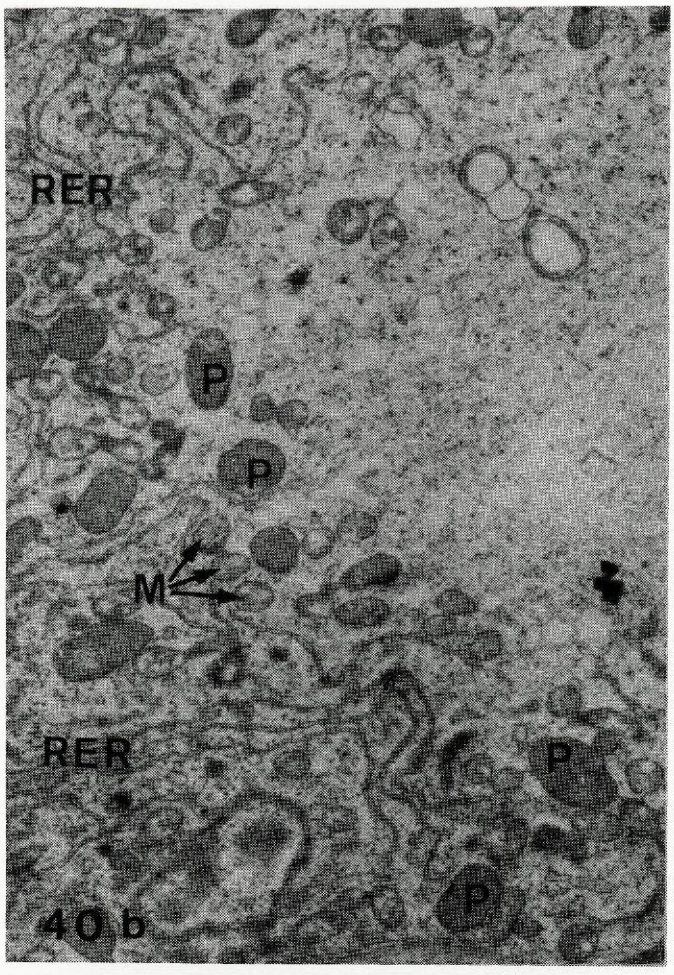
Fig.40a e 40b - Micrósporos cujo vacúolo entrou em regressão. 40a-nota-se a presença de grande vacúolo mas sem tonoplasto. No citoplasma as mitocôndrias (M) são de pequenas dimensões e os plastídios (P) são de estroma mais ou menos homogéneo. 40b-verifica-se que o espaço ocupado pelo vacúolo tem menor densidade que o restante citoplasma e é desprovido de organelos. M-mitocôndria, P-plastídio, RER-retículo endoplasmático rugoso. 16 800 X e 5 600 X.

Fig.41 - Porção de micrósporo em regressão vacuolar observando-se algumas mitocôndrias (M) de pequenas dimensões e arredondadas e outras englobando uma área de citoplasma (Ci). RER-retículo endoplasmático rugoso. 20 000 X.

Fig.42 - Pormenor de micrósporo vacuolizado contendo núcleo (N) volumoso, dictiossomas (D) activos, mitocôndrias (M) de pequenas dimensões e perfis de retículo endoplasmático (seta) nas proximidades do plasmalema. 27 200 X.



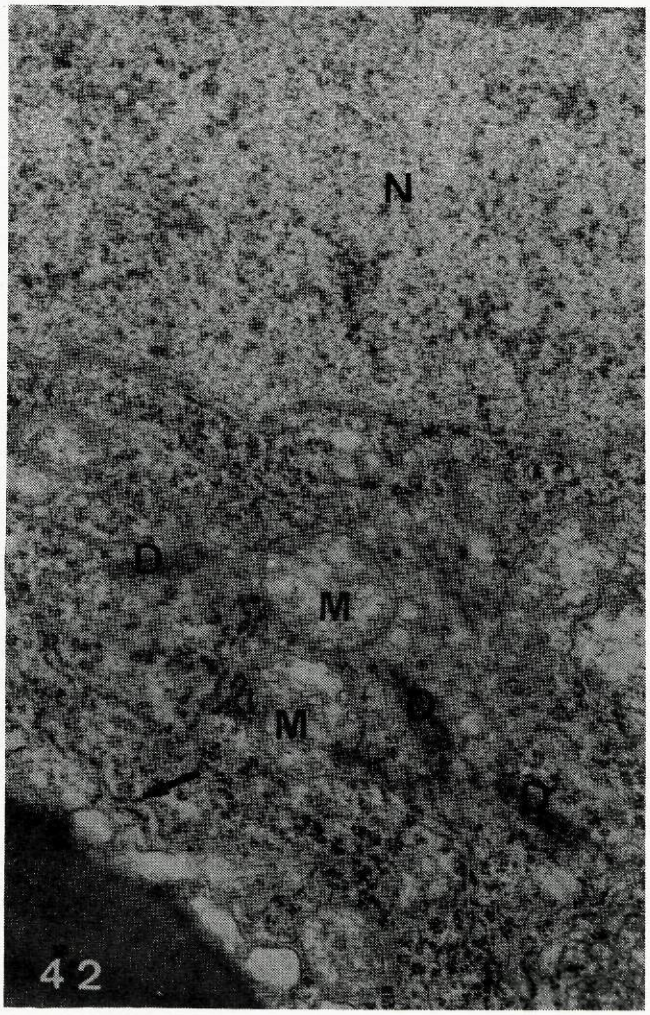
40 a



40 b



41



42

2.2.5-Grão de pólen

2.2.5.1-Grão de pólen jovem

O estado de grão de pólen jovem caracteriza-se pela presença da célula germinativa em forma de lentícula e encostada à parede do grão de pólen (Figs. 43 e 44).

Neste estado da microsporogénese as mitocôndrias, de pequenas dimensões e forma arredondada, exibiam cristas bem desenvolvidas e fibrilas de DNA em áreas menos densas em electrões. Os plastídios começavam novamente a acumular amido, observando-se vários cristais no estroma. Os dictiossomas produziam numerosas vesículas. O retículo endoplasmático rugoso era muito abundante, observando-se a presença de ribossomas e polirribossomas em espiral ou livres ou em associação com as membranas do retículo endoplasmático. O sistema vacuolar, dado que tinha vindo a diminuir progressivamente, observava-se apenas constituído por pequenos vacúolos distribuídos no citoplasma.

Na célula germinativa observavam-se todos os organelos citoplasmáticos descritos, bem como a presença de amido nos plastídios (Fig.43).

2.2.5.2-Grão de pólen maduro

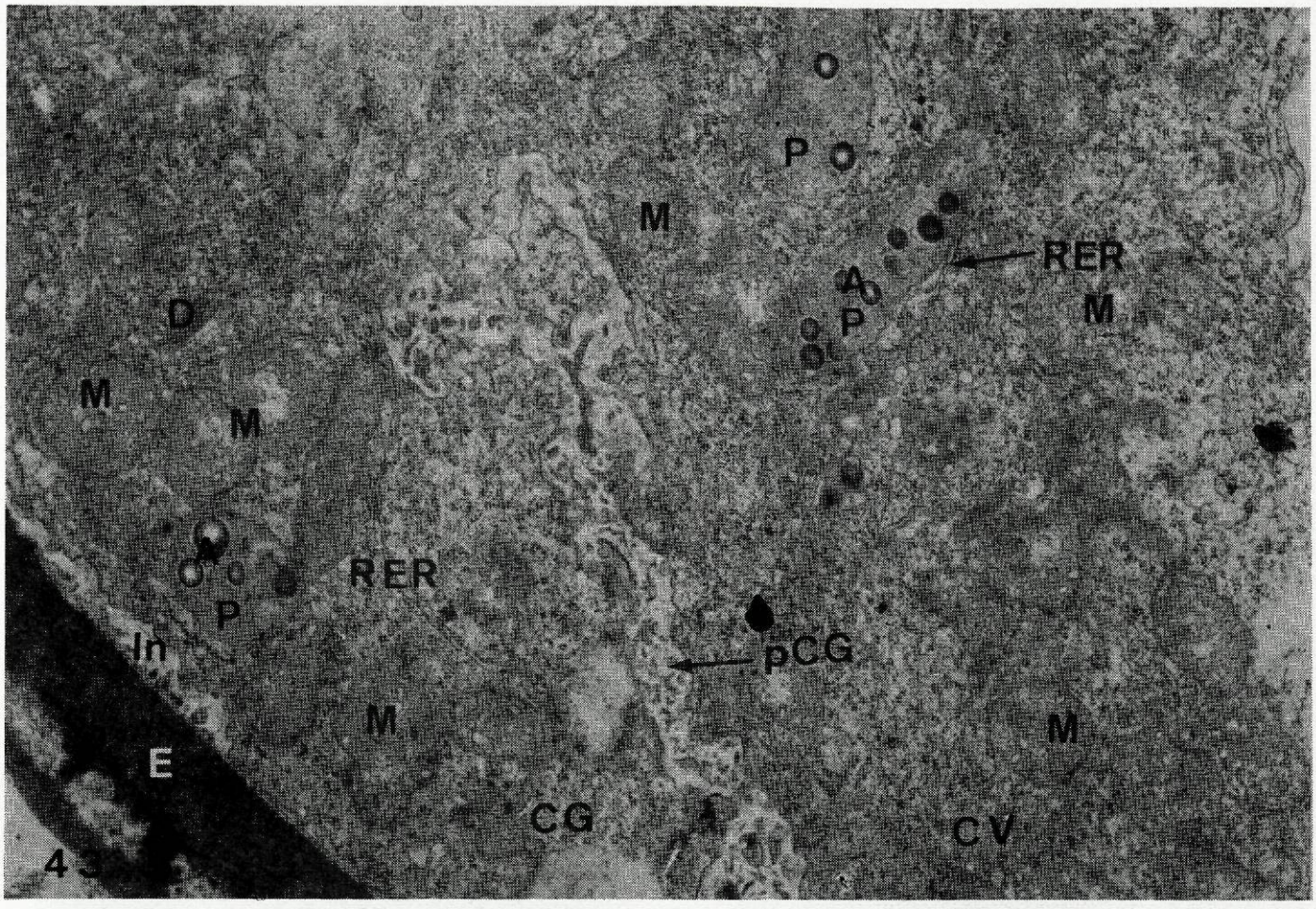
No estado de grão de pólen maduro verifica-se que a célula germinativa se tinha separado da parede do grão de pólen, deslocando-se mais para o interior da célula vegetativa.

O citoplasma apresentava-se bastante rico, observando-se numerosos organelos citoplasmáticos. Assim, os plastídios possuíam grãos de amido ocupando quase todo o estroma, as mitocôndrias surgiam pequenas e arredondadas com cristas bem desenvolvidas e o retículo endoplasmático rugoso era abundante, for-

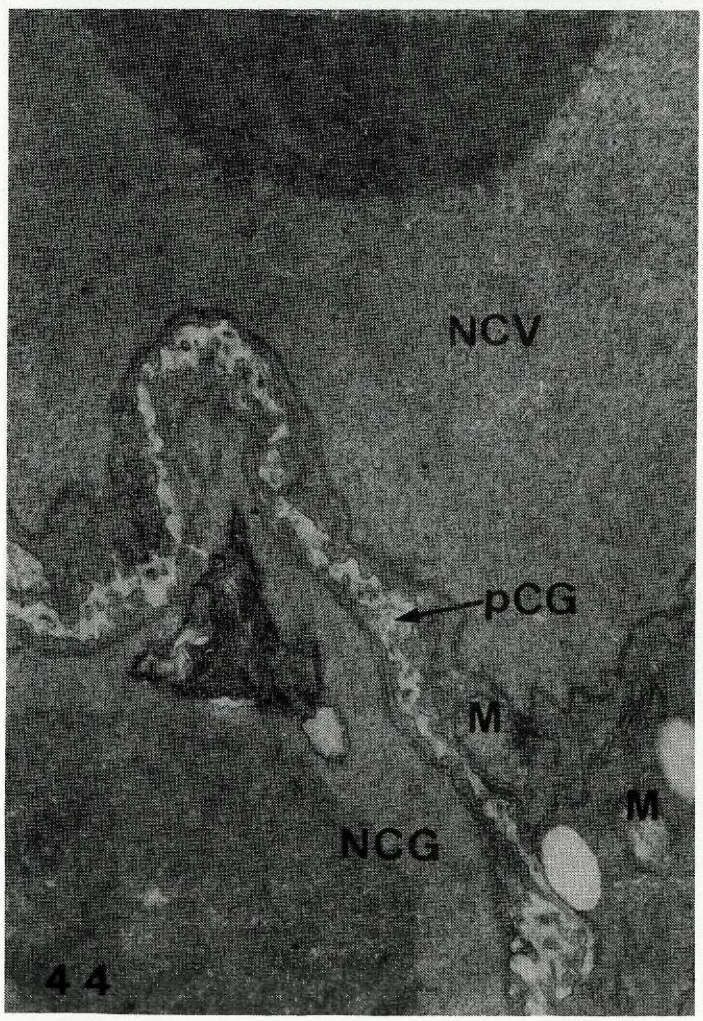
Fig.43 - Grão de pólen jovem mostrando a célula germinativa (CG) encostada à parede exínica (E). Nesta célula observam-se mitocôndrias (M), plastídios (P) com grãos de amido, dictiossomas (D) activos e retículo endoplasmático rugoso (RER). Na célula vegetativa (CV) vêem-se idênticos organelos . In-intina, pCG-parede da célula germinativa. 18 000 X.

Fig.44 - Grão de pólen jovem observando-se o núcleo da célula vegetativa (NCV) e o núcleo da célula germinativa (NCG). As duas células estão separadas pela parede da célula germinativa (pCG) em formação. M-mitocôndria. 16 800 X.

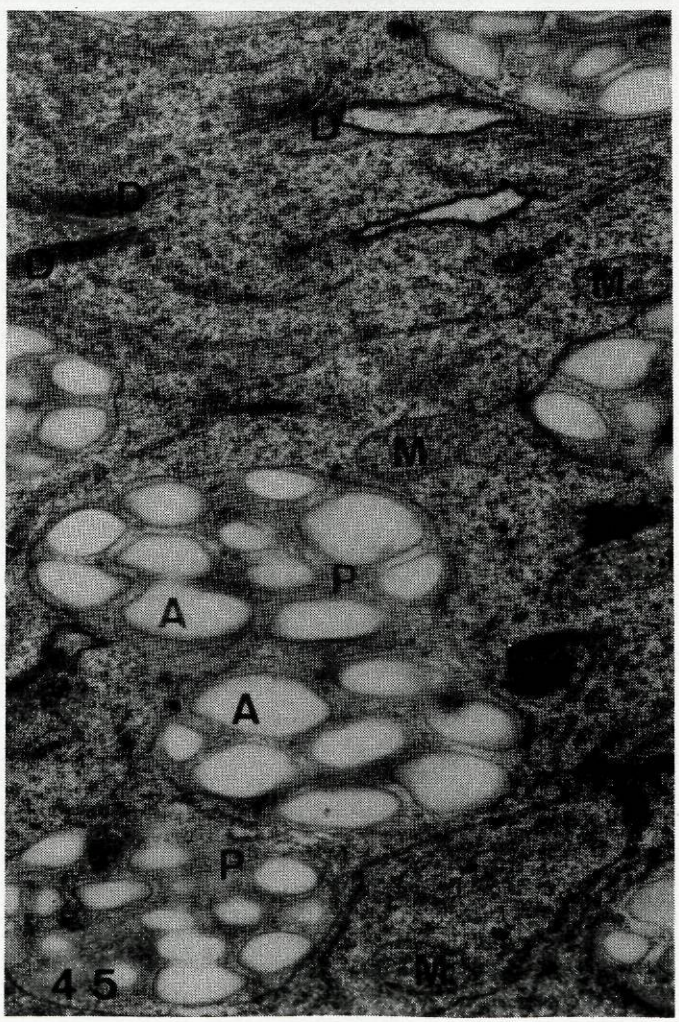
Fig.45 - Porção de grão de pólen maduro observando-se os plastídios (P) com vários grãos de amido (A). As mitocôndrias (M) são de pequenas dimensões e arredondadas. D-dictiossomas. GA-$KMnO_4$. 21 600 X.



43



44

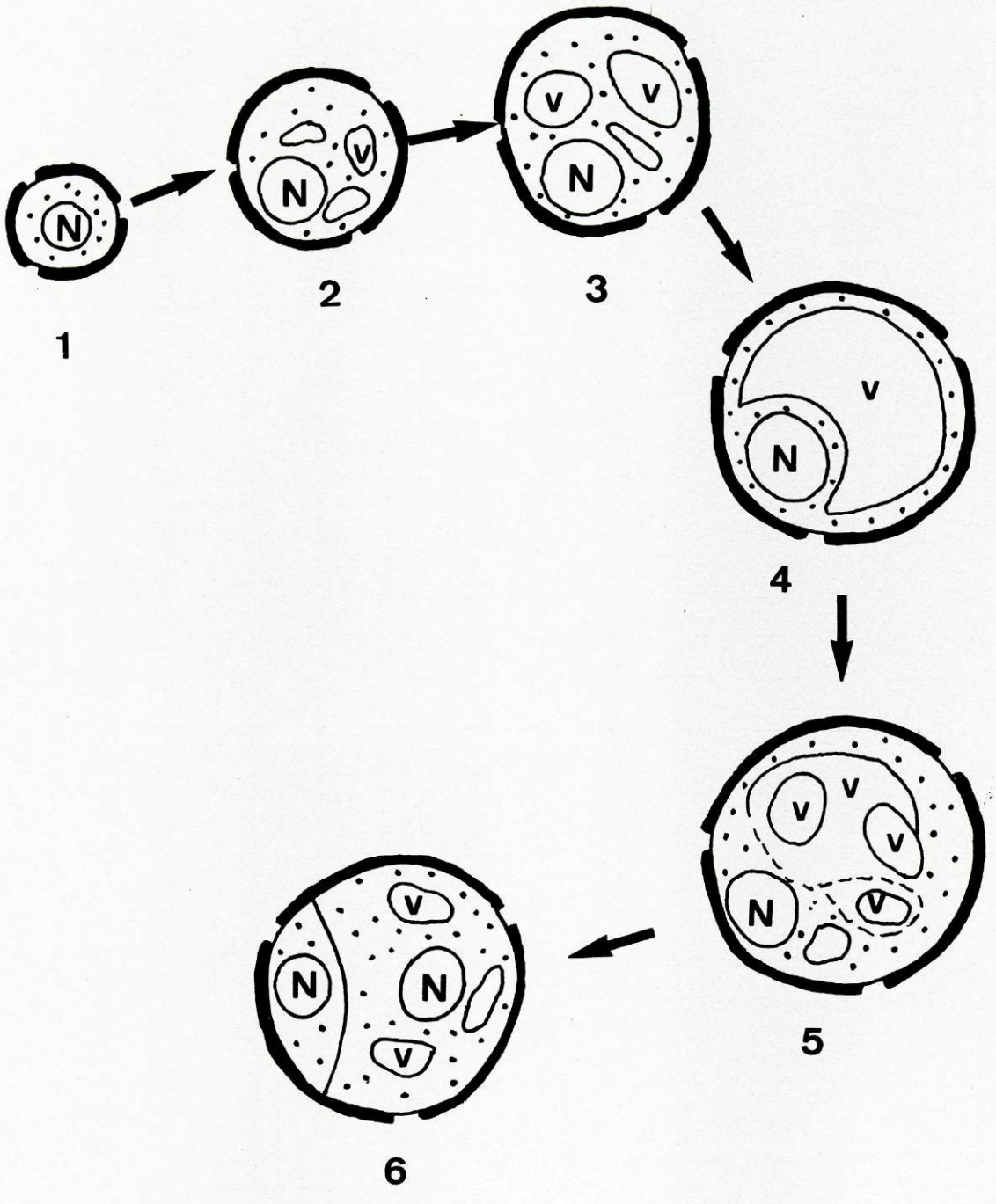


45

Fig.46 - Evolução de dictiossomas, retículo endoplasmático, plastídios e mitocôndrias desde o estado de tétrada ao estado de grão de pólen maduro.

	TÉTRADA		MICRÓSPORO			GRÃO DE PÓLEN	
	Jovem	Madura	Jovem	Vacuolizado	Em Divisão (Mitose)	Jovem	Maduro
Dictiossomas							
Reticulo Endoplasmat.							
Plastídios							
Mitocôndrias							

Fig.47 - Modificações do sistema vacuolar durante a microsporogénese, compreendendo a fase de vacuolização, que vai desde o micrósporo jovem ao micrósporo vacuolizado (1 a 4) e a fase de redução do vacuoma, que vai desde o micrósporo em divisão nuclear até ao grão de pólen jovem (5 e 6).


N
1
N
V
2
V
V
N
3
V
N
4
V
V
V
V
N
V
5
V
N
N
V
6

mando perfis longos e finos. Nas proximidades dos dictiossomas viam-se pequenas vesículas, parecendo resultar da desintegração dos sáculos (Fig.45).

XXX

XXX XXX

A Fig.46 representa esquemáticamente a evolução de dictiossomas, retículo endoplasmático, plastídios e mitocôndrias, desde o estado de tétrada ao de grão de pólen maduro.

Ao longo da descrição da microsporogénese fez-se referência às modificações morfológicas e citológicas do sistema vacuolar, havendo uma primeira fase de vacuolização que vai desde o micrósporo jovem ao micrósporo vacuolizado e uma segunda fase de redução do vacuoma, que vai desde o micrósporo em divisão nuclear ao grão de pólen jovem (Fig.47).

3 - Mitocôndria

3.1 - Forma tridimensional

De todos os organelos citoplasmáticos descritos, durante a formação do grão de pólen, as mitocôndrias eram os organelos que sofriam modificações mais profundas, da sua forma e tamanho, em estados bem precisos da microsporogénese.

Como se referiu atrás , as mitocôndrias começavam a surgir com formas modificadas durante a interfase de meiose, aumentando progressivamente de tamanho e apresentando configurações cada vez mais complexas e irregulares, englobando vários enclaves citoplasmáticos, no micrósporo vacuolizado. Posteriormente, estas mitocôndrias profundamente modificadas começavam a diminuir de tamanho e adquiriam formas menos complexas e em divisão. No grão de pólen jovem apenas se observaram mitocôndrias de pequenas dimensões e de formas mais ou menos esféricas.

As formas modificadas das mitocôndrias não são artefactos da fixação normalmente efectuada com o glutaraldeído e o tetróxido de ósmio pois ensaiaram-se outros fixadores, como o glutaraldeído seguido de permanganato de potássio ou apenas o permanganato de potássio, e essas modificações continuaram a ser observadas.

Uma vez que as mitocôndrias apresentavam formas bizarras e grandes dimensões, efectuaram-se cortes seriados desses organelos que ocorrem no micrósporo vacuolizado (mitocôndrias com vários enclaves citoplasmáticos). Com base em microfotografias, obtidas desses cortes, traçaram-se esquemas que representam a evolução dos perfis de duas mitocôndrias (x e y). Na Fig.48 apresentam-se esquemas, das duas mitocôndrias, retirados de microfotografias seleccionadas de 19 cortes seriados. A título exemplificativo representam-se duas das microfotografias (Figs.49 e 50) que serviram de base à execução dos esquemas 8 e 10 da Fig.48.

Fig. 48 - Representação esquemática da evolução dos perfis de duas mitocôndrias x e y, considerando 15 microfotografias seleccionadas de 19 cortes seriados. As zonas claras representam os enclaves citoplasmáticos e as zonas a pontuado compreendem a matriz e cristas mitocôndriais.

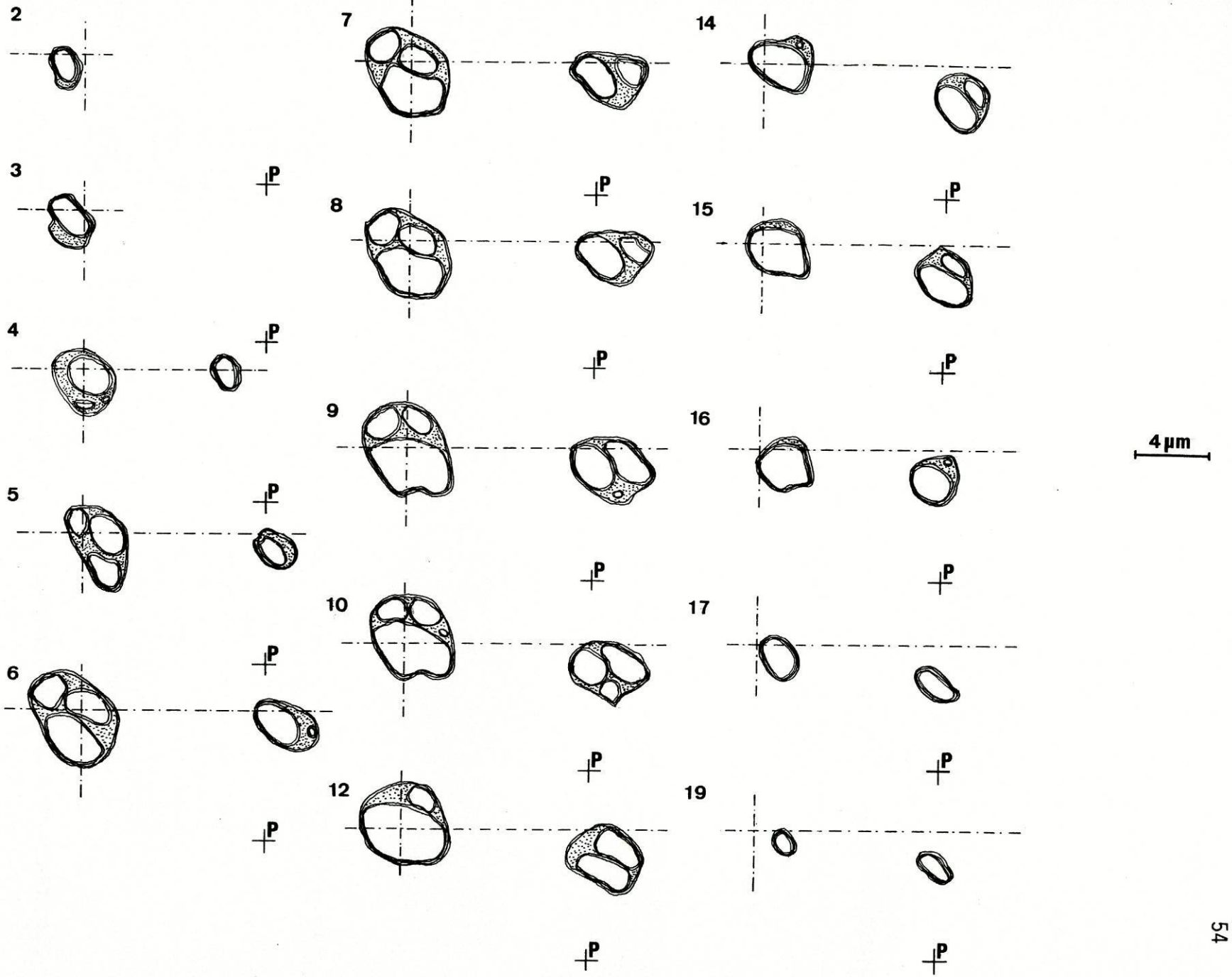
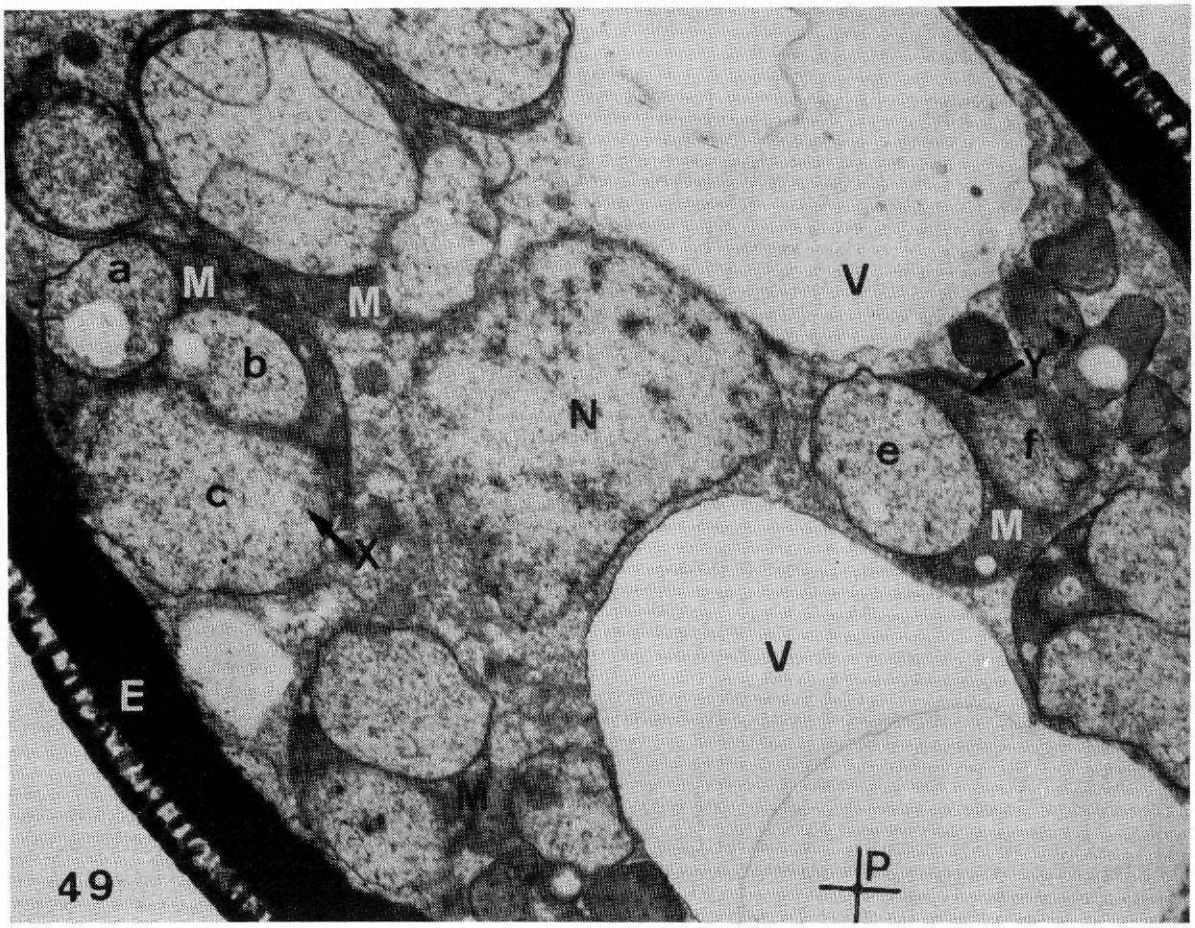
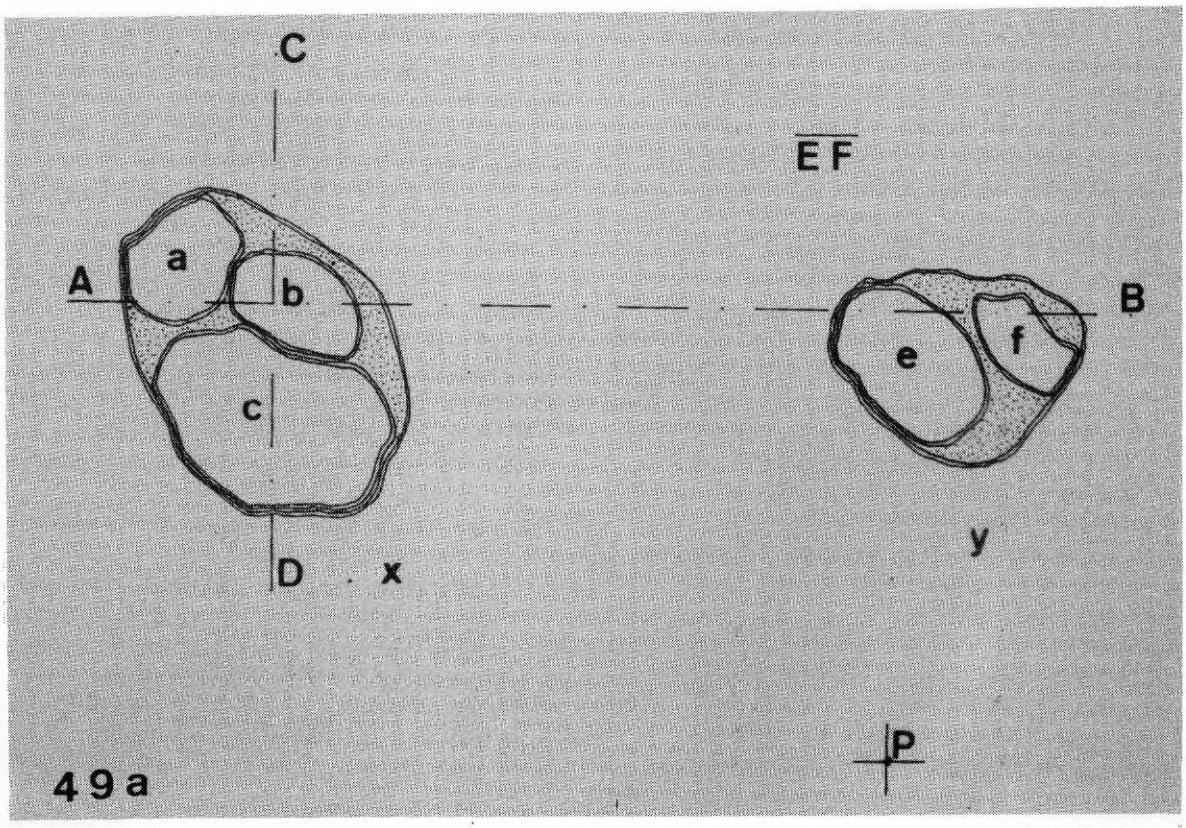

2
3
4
5
6
7
8
9
10
12
14
15
16
17
19
P
4 µm

Fig.49 - Micrósporo vacuolizado, que representa o oitavo corte da série, estando assinaladas as mitocôndrias x e y. A cruz marcada serviu de referência para a orientação e correlação de todos os cortes e o ponto P representa a projecção de uma recta perpendicular ao plano dos cortes e paralela à recta de intercepção do plano AB com o plano CD, como se pode ver no esquema da figura seguinte. V-vacúolo, N-núcleo, E-exina, M-mitocôndria.Os enclaves citoplasmáticos a,b e c são da mitocôndria x e à mitocôndria y pertencem os enclaves e e f. 9 000 X.

Fig.49a - Traçado esquemático das mitocôndrias x e y da Fig.49 e que representa um corte segundo o plano EF (normal a $\overline{AB}$ e $\overline{CD}$).



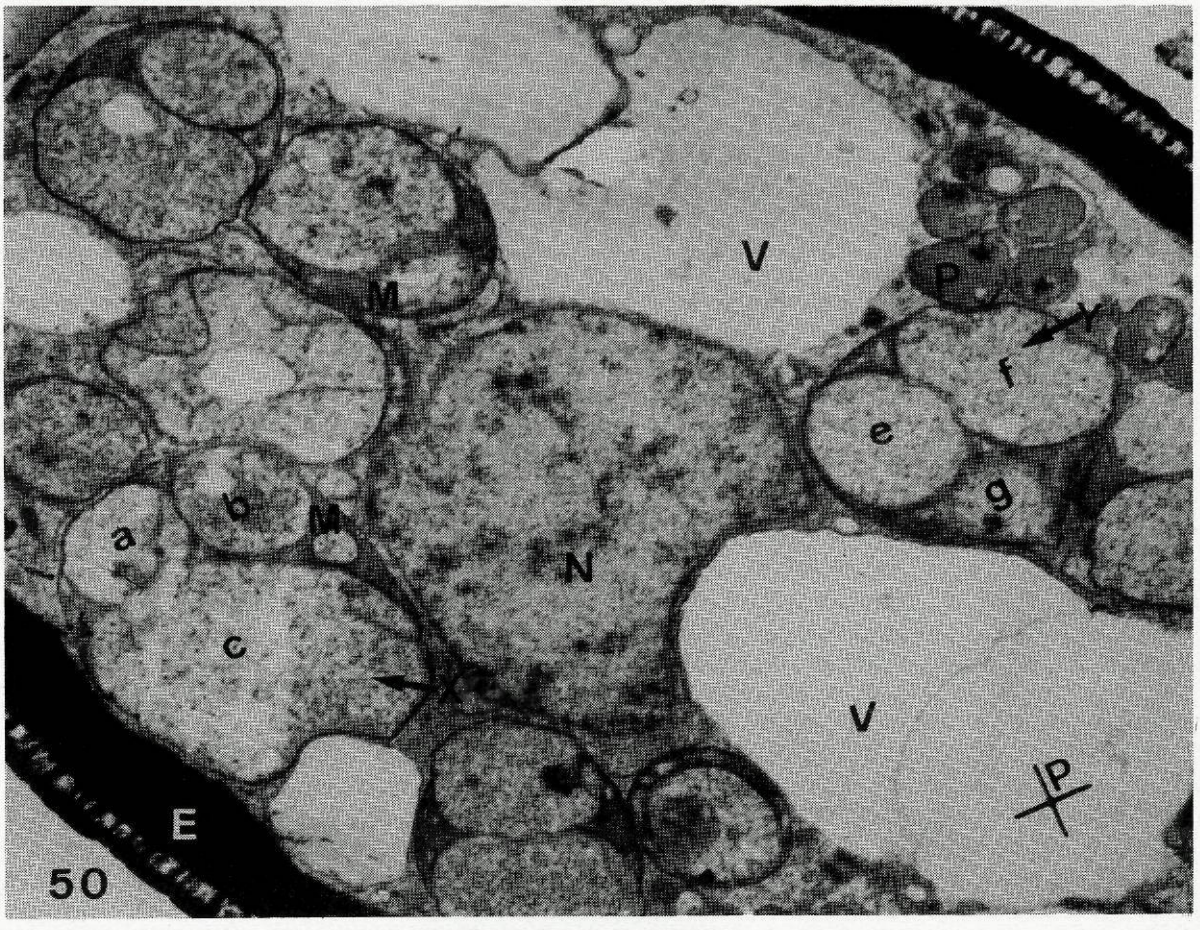
49

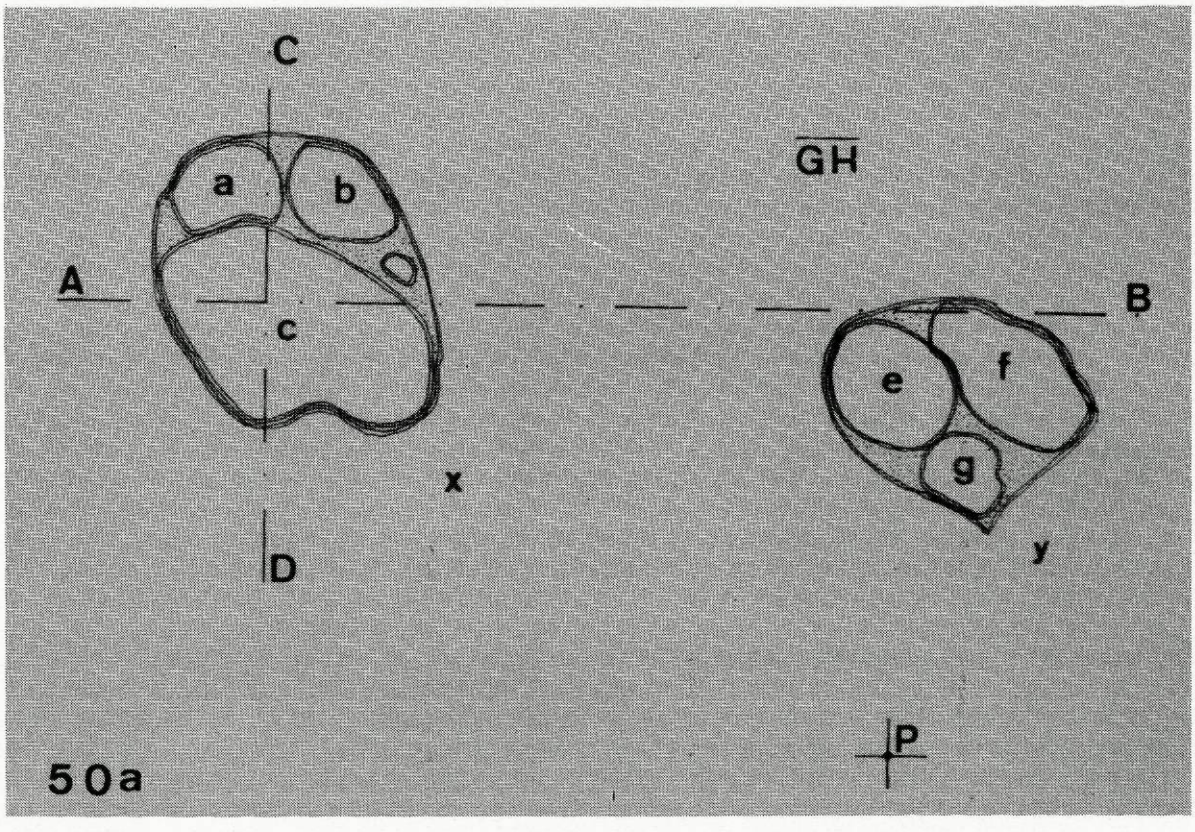


49a

Fig.50 - Micrósporo vacuolizado que representa o décimo corte da série e estando aqui igualmente assinaladas as mitocôndrias (M) x e y, e o ponto P. V-vacúolo, E-exina e P-plastídio. 9 000 X.

Fig.50a - Traçado esquemático das mitocôndrias x e y da Fig.50 e que representa um corte segundo um plano GH (normal a $\overline{AB}$ e $\overline{CD}$).


V
M
P
Y
f
e
g
b
M
a
N
c
V
E
P
50


C
GH
a
b
A
B
c
e
f
g
x
y
D
P
50a

A partir de todas as secções esquemáticas obtidas, tra - çaram-se os perfis dessas duas mitocôndrias segundo um plano AB (Fig.51). A Fig.52 representa um corte da mitocôndria x segundo um plano CD perpendicular ao plano AB. A Fig.49a representa um corte segundo um plano EF (normal a $\overline{AB}$ e $\overline{CD}$) e a Fig.50a representa um corte segundo um plano GH (normal a $\overline{AB}$ e $\overline{CD}$).

Os perfis obtidos revelaram que o invólucro mitocondrial possuia uma geometria extremamente irregular e que, no interior da mitocôndria, os vários enclaves citoplasmáticos apresentavam também forma irregular. Além disso os perfis mitocondriais, observados nas microfotografias, não faziam parte de um retículo mitocondrial visto existirem várias mitocôndrias independentes.

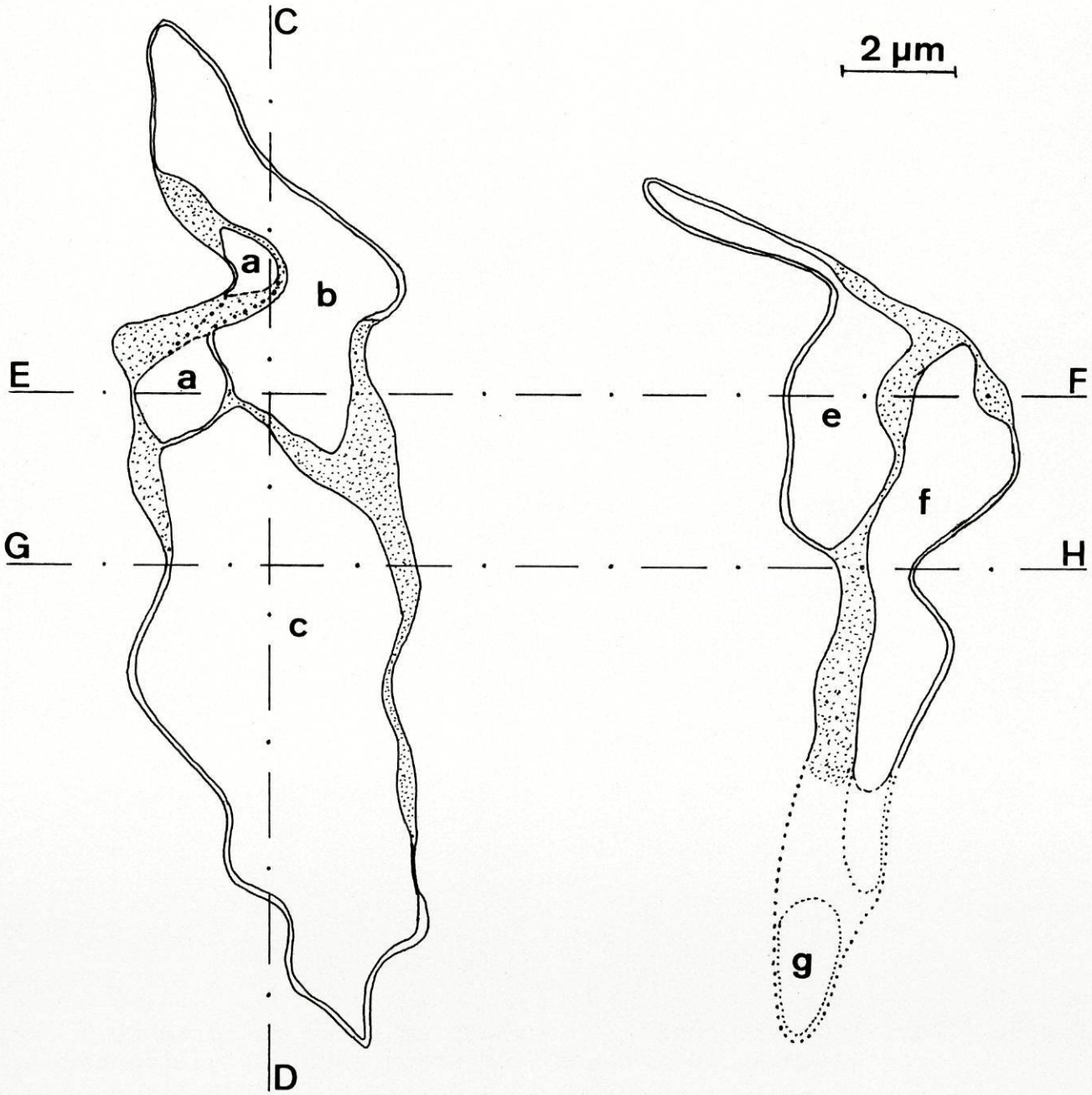
3.2 - Análise estereológica

A análise estereológica de perfis mitocondriais (Quadro 4) mostrou que nas células mães do grão de pólen (telofase II) 16,9% do volume celular total era ocupado por mitocôndrias e que 14,4% daquele volume correspondia à parte ocupada pela matriz dessas mitocôndrias. No estado de tétrada o volume mitocondrial total (Vv) aumentou, correspondendo a cerca de 20,1% do volume celular, contudo o volume da matriz diminuiu para 12,6%. Uma vez que do estado de célula mãe para o de tétrada houve um aumento de Vv ao mesmo tempo que se verificava uma nítida diminuição do número de mitocôndrias por célula (N) isto leva a admitir que houve um aumento do tamanho das mitocôndrias não quantificável, por não existirem dados àcerca do tamanho real das mitocôndrias em qualquer dos estados, devido às suas formas que são sempre muito irregulares . No estado de micrósporo as mitocôndrias eram profundamente

	n	Vv ± SEM (%)	V'v ± SEM (%)	N ± SEM
Célula mãe (Telofase II)	30	16,9±2,5	14,4±2,2	132±3,0
Tétrada	30	20,1±2,1	12,6±1,6	36±1,8
Micrósporo vacuolizado	35	26,9±3,7	10,7±1,2	6±0,5
Grão de pólen jovem	30	11,1±1,2	11,1±1,2	80±2,0

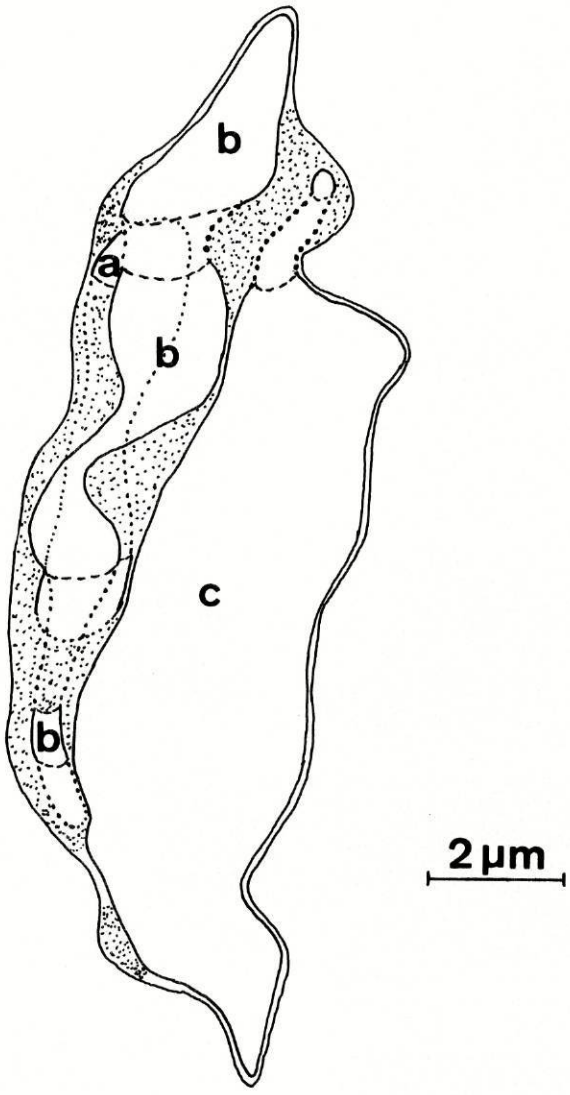
Quadro 4 - Análise estereológica das mitocôndrias pertencentes a vários estados da microsporogénese. Vv e V'v representam respectivamente o volume fraccional da mitocôndria total (matriz mais enclaves) e o volume fraccional ocupado pela matriz e cristas mitocondriais. N - número de mitocôndrias por célula; n - número de amostras de cada população; SEM - erro padrão da média com limites de confiança de 95%. Relativamente às médias de Vv, V'v e N, efectuou-se um estudo comparativo dos seus valores entre estados consecutivos, tendo-se verificado através do teste t de Student que para um limite de confiança de 99% as diferenças são significativas.

Fig.51 - Perfis de duas mitocôndrias (x e y) a partir de cortes seriados e segundo um plano de corte AB. Cada linha traçada no perfil representa o invólucro mitocondrial. As zonas pontuadas compreendem a matriz e cristas mitocondriais e as zonas claras os enclaves citoplasmáticos a,b e c da mitocôndria x e, f e g da mitocôndria y.



51

Fig.52 - Perfil da mitocôndria x segundo um plano de corte CD, perpendicular ao plano AB. As zonas escuras, igualmente como na Fig.51, representam a matriz e cristas mitocondriais e as zonas claras os enclaves citoplasmáticos a,b e c.


b
a
b
c
b
2 µm

modificadas, englobando vários enclaves citoplasmáticos, tal como se pode observar na Fig.51; neste estado da microsporogénese o volume mitocondrial era de 26,9% e o volume da matriz era de 10,7%. Por semelhança com o caso atrás assinalado admite-se que o tamanho das mitocôndrias continuou a aumentar neste estado. Finalmente no estado de grão de pólen, em que as mitocôndrias eram caracterizadas, entre outras, por não conterem enclaves citoplasmáticos (Vv=V'v), a parte do volume celular ocupado por aqueles organelos era de 11,1%. Neste estado verificou-se que, em relação ao estado anterior, houve uma diminuição de Vv ao mesmo tempo que se verificou um aumento nítido do número de mitocôndrias por célula o que leva a admitir que o estado de grão de pólen é também caracterizado por uma diminuição do tamanho das mitocôndrias.

No gráfico 1 pretende-se ilustrar as variações dos valores de Vv, V'v e N obtidas durante o desenrolar da microsporogénese. Para tal recorreu-se aos valores médios presentes no Quadro 4. De estado para estado da microsporogénese verificaram-se variações sensíveis quer no número de mitocôndrias por célula (N), quer no volume mitocondrial total (Vv). Desde o estado de célula mãe até ao de micrósporo vacuolizado verificou-se uma diminuição no número de mitocôndrias por célula ao mesmo tempo que a parte do volume celular ocupado pelas mitocôndrias aumentava. Estas tendências sofreram uma inversão no estado de grão de pólen pois N aumentou ao passo que Vv diminuiu. Ao contrário de Vv e N, V'v apresentou variações pouco sensíveis, mas significativas, durante a formação do grão de pólen.

De referir que, nos cálculos relativos à análise estereológica, sempre que se referem valores da matriz mitocondrial estes também dizem respeito às cristas mitocondriais pois, para aqueles cálculos, utilizaram-se ampliações bastante pequenas que não permitiam o seu tratamento em separado.

Gráfico 1 - Gráfico que traduz as variações de volume (expressos em %) e número de mitocôndrias por célula. Variação do V_V que representa o volume da mitocôndria total (isto é matriz mais enclaves) (x--x), mostrando um aumento até ao estado de micrósporo e depois um decréscimo. Variação do V'_V ou seja volume que a matriz e as cristas ocupam na célula, notando-se um pequeno decréscimo com o desenvolvimento do grão de pólen (*— —*). Variação do número de mitocôndrias (N) por célula, verificando-se uma diminuição até ao estado de micrósporo e um posterior aumento (·—·). CM-célula mãe, T-tétrada, M-micrósporo, GP-grão de pólen.

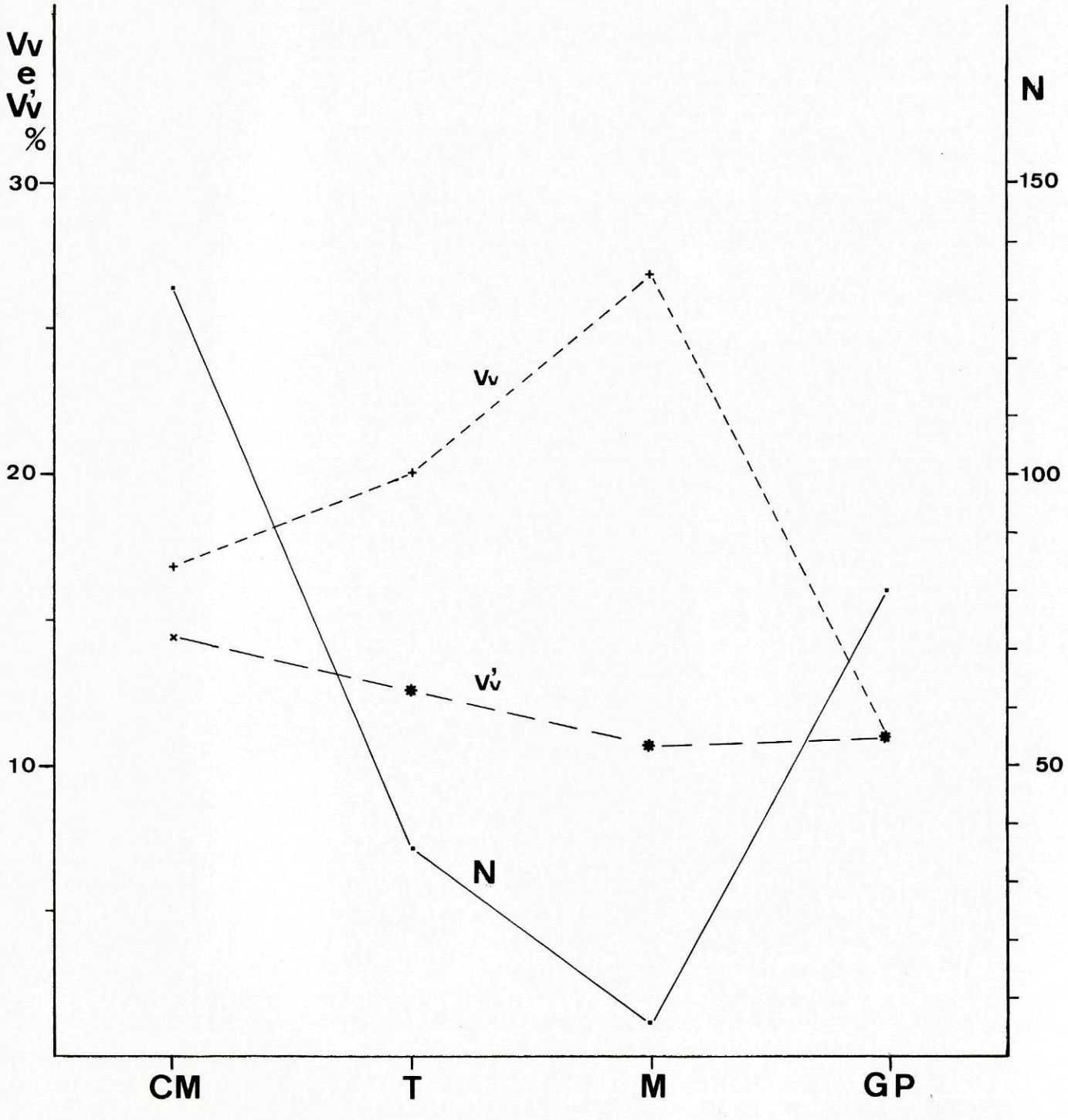


Gráfico 1

4 - Grão de pólen

4.1 - Forma do grão de pólen

Observações da morfologia externa do grão de pólen foram realizadas com o microscópio óptico e microscópio electrónico de varrimento (Figs.53 e 54).

Erdtman (1969), ao referir-se à polaridade dos grãos de pólen, considerou que na fase de tétrada os micrósporos apresentam uma face proximal, face mais próxima do centro da tétrada, e uma face distal em posição oposta. Na sequência destes conceitos o autor definiu como eixo polar do grão de pólen o eixo imaginário que passa pelo ponto central das faces proximal e distal, designados respectivamente por polo proximal e polo distal, e pelo centro da tétrada.

Em Cucumis sativus L., como podemos observar na Fig.13, os micrósporos, que constituem uma tétrada, apresentam em corte uma forma que se aproxima da forma de uma elipse e face às definições apresentadas por Erdtman, que atrás exposemos, o eixo polar desses micrósporos corresponde ao eixo de menor dimensão. Por este motivo elaborou-se um esquema da forma do grão de pólen (Fig.55), em que se considerou o diâmetro polar (P) e o diâmetro equatorial (E).

Ainda, segundo Erdtman (1969) a forma do grão de pólen corresponde à de um elipsóide de rotação cujo eixo é o eixo polar pelo que, em Cucumis sativus L., tal eixo corresponde ao eixo menor da elipse. Nestas circunstâncias o volume do grão de pólen pode ser calculado através da expressão

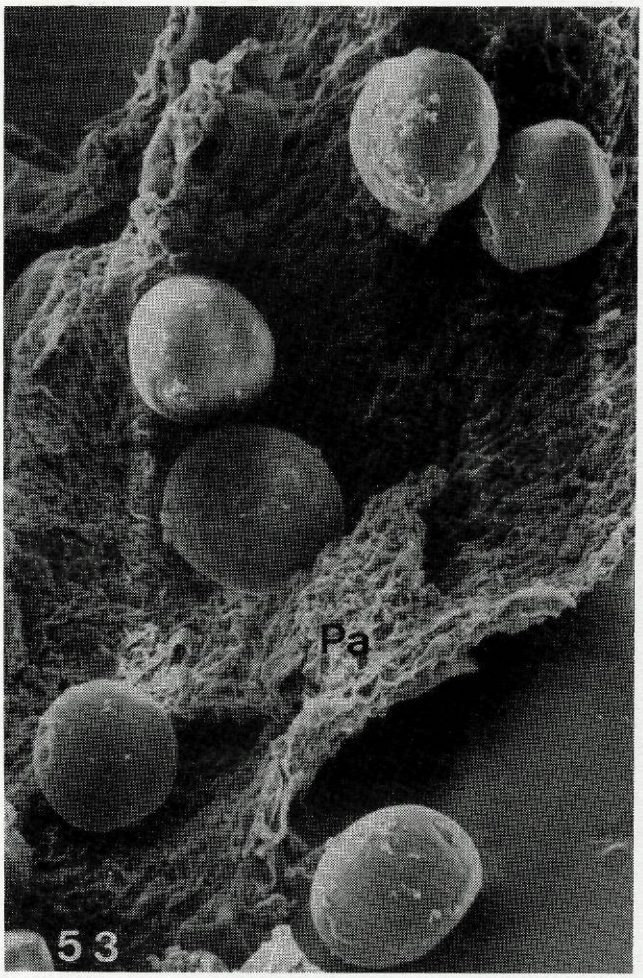
$$V = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{P}{2}\right) \left(\frac{E}{2}\right)^2$$

O grão de pólen maduro de Cucumis sativus L. apresenta como dimensões médias de P e E respectivamente 46 µm e 53 µm. A razão P:E, segundo Erdtman (1969), permite definir a forma do

Fig.53 - Vários grãos de pólen envolvidos por restos de parede da antera (Pa). SEM . 480 X.

Fig.54 - Grão de pólen mostrando dois poros. SEM . 2 600 X.

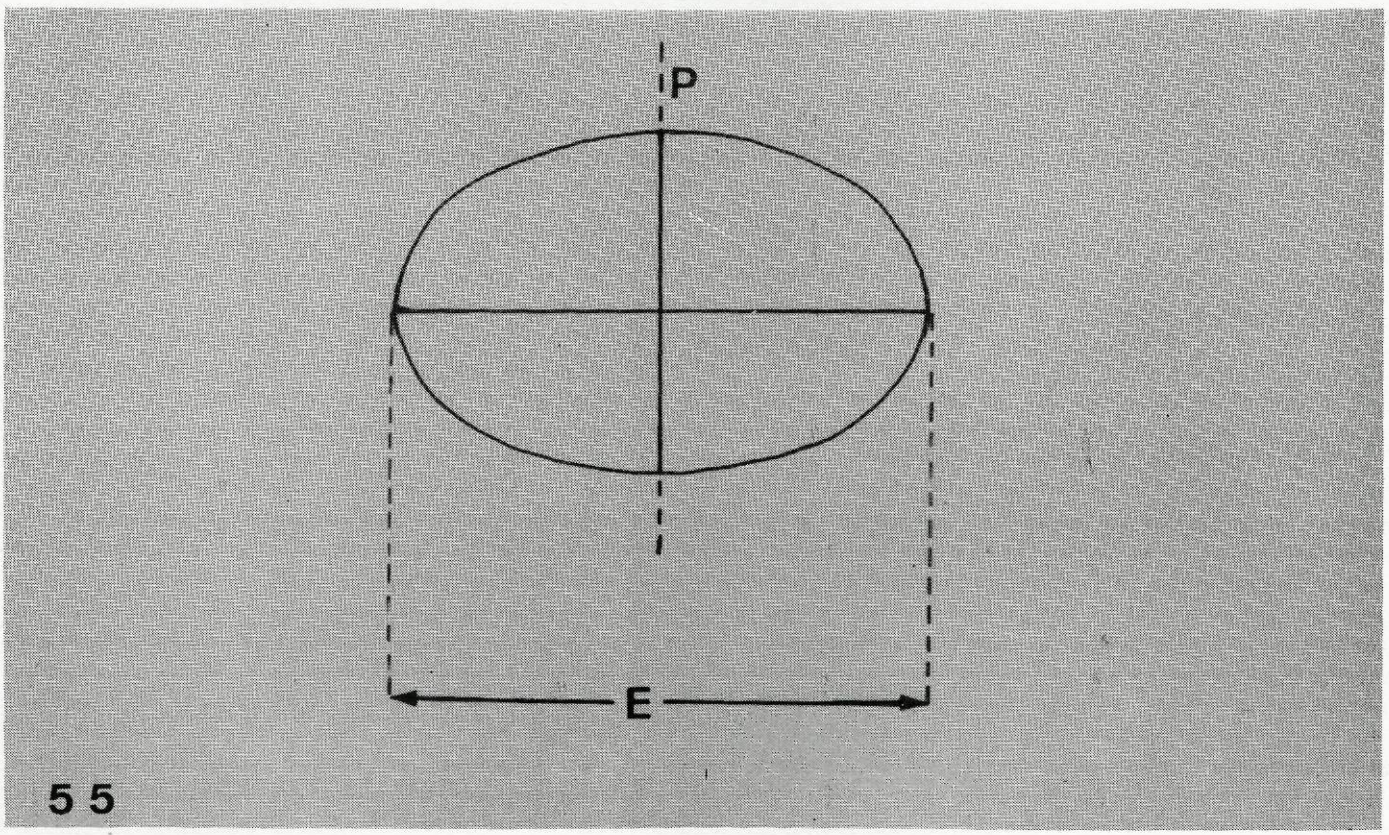
Fig.55 - Esquema da forma do grão de pólen de Cucumis sativus L. mostrando a orientação do eixo de rotação ou eixo polar (P) e o diâmetro equatorial (E), segundo a terminologia de Erdtman (1969).



53



54



55

grão de pólen que varia entre dois casos extremos, a hiperachatada e a hiperalongada . O autor considerou que para valores da razão P:E compreendidos entre 6:8 - 7:8, os grãos de pólen deverão receber a designação de subachatados. Em Cucumis sativus L., face aos valores determinados e relativamente à razão P:E, pode-se classificar a forma do grão de pólen como subachatada.

Medições efectuadas no grão de pólen jovem levaram a valores médios de P e E respectivamente de 30 μm e 39 μm, e para volume médio o de 23 880 μm^3.

4.2 - Parede do grão de pólen

4.2.1 - Terminologia

São várias as terminologias apresentadas para os diferentes estratos que compõem a parede do grão de pólen. Antes da descoberta do microscópio electrónico as observações de material inteiro, ou fraccionado, eram efectuadas ao microscópio óptico e as diferentes camadas, observadas na parede, eram visualizadas principalmente devido a diferentes capacidades de coloração.

Os estudos estruturais foram depois complementados com métodos microquímicos, para caracterizar a diferente composição química dos estratos.

Erdtman (1952) apresentou a sua primeira classificação baseada apenas na morfologia da parede do grão de pólen.Faegri(1956) criou também uma terminologia, mas baseada nas diferentes capacidades de coloração das camadas da parede. Segundo Erdtman a parede do grão de pólen era constituída por duas camadas distintas, a exina e a intina. A exina compreendia uma camada esculpida - a sexina, e uma não esculpida - a nexina. Esta camada, subdivide-se em nexina 1 e nexina 2, correspondendo a tempos de formação diferentes. Posteriormente, Erdtman (1960) apresentou uma outra classificação em que acrescentou uma 3ª camada à ne-

xina, pois em algumas espécies ela era evidente. Na Fig.56 apresentamos um esquema de comparação das terminologias de Erdtman (1960) e Faegri (1956).

Outras terminologias foram apresentadas, tendo em conta o tempo de síntese da exina, e pareceram corresponder aos termos apresentados por Erdtman (1966) e que foram designados respectivamente por exina 1 e exina 2 por Godwin e colaboradores (1967).

Neste trabalho segue-se a classificação de Erdtman (1960) apresentada na Fig.56, pois a parede do grão de pólen poderá ser compreendida em termos de camadas quimicamente distintas ocorrendo variações na espessura relativa dos vários componentes existentes.

4.2.2 - Composição da parede do grão de pólen

Na parede do grão de pólen observam-se duas camadas perfeitamente distintas quimicamente, que são a exina e a intina. Seguidamente descrevem-se estas camadas seguindo a sequência da sua deposição ao longo dos vários estados da microsporogénese.

4.2.2.1 - Exina

Após a meiose, quando os quatro micrósporos estão ainda reunidos e cercados pela camada de calose, o plasmalema dos micrósporos tornou-se ondulado . No espaço entre plasmalema e a camada de calose depositou-se um material de matriz fibrilar, constituído por polissacarídeos, que deu origem,por expansão lateral, a uma camada exterior ao plasmalema designada por primexina,que é precursora da própria exina (Fig.57). Nesta fase de tétrada jovem os locais dos poros estavam bem delimitados pois eram zonas que inicialmente não possuiam primexina.

Após esta primeira fase foi possível distinguir a formação de barras cilíndricas (pró-báculas), atravessando a parede da primexina. As pró-báculas apresentavam textura granular e densi-

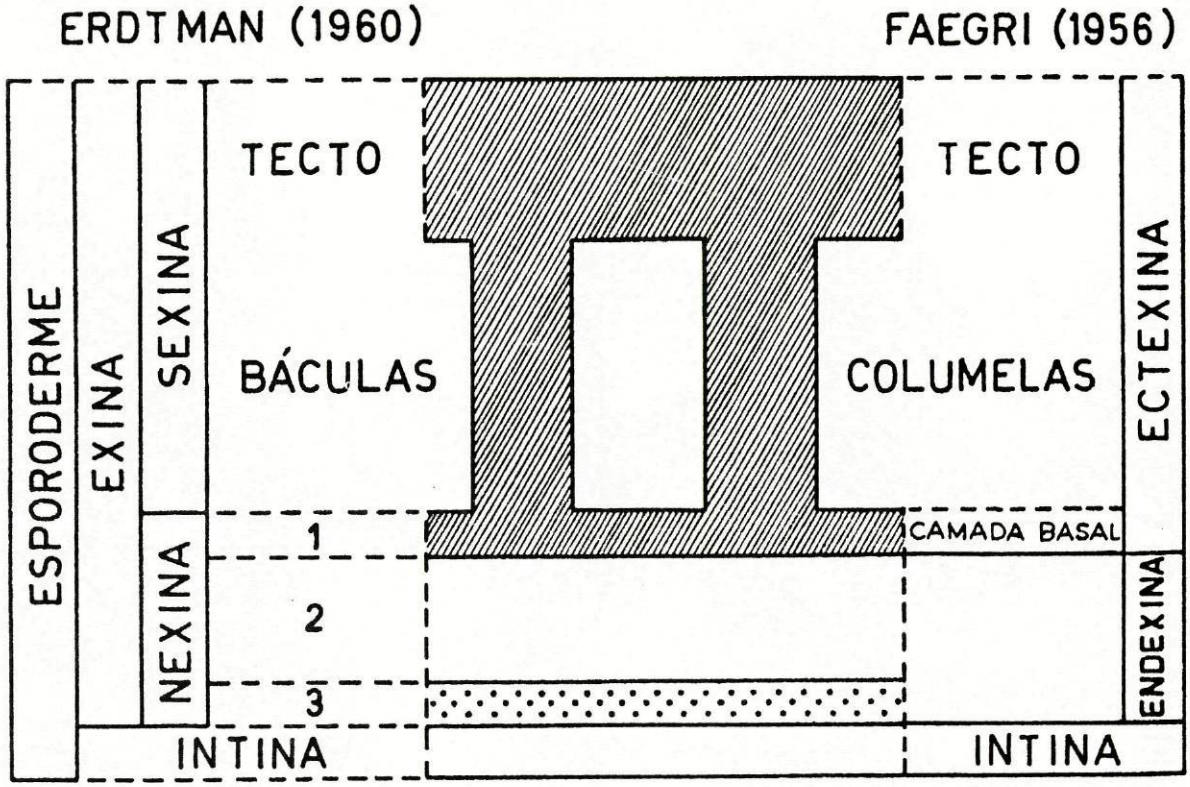


Fig.56 - Terminologias da parede do grão de pólen, baseadas em Erdtman (1960) e Faegri (1956).

dade óptica maior que a matriz de primexina (Fig.58). Nos locais dos poros observou-se uma depressão ao nível do plasmalema,no contorno que anteriormente era circular, sendo o espaço assim criado, entre o plasmalema e a calose, preenchido por um material fibrilar (Fig.59).

Posteriormente as pró-báculas tornaram-se mais compactas,como se pode ver na Fig.60, e, nesta circunstância, são designadas correntemente por báculas.

Seguidamente depositou-se nova camada de esporopolenina,formando uma camada a unir a base inferior das báculas,que se denomina nexina 1 ou camada basal (Fig.60). O material exínico foi-se depositando por aposição de lamelas que posteriormente deram origem a uma camada compacta. Na região do poro ocorreu maior espessamento da parede para o interior da célula, e nessa zona a nexina 1 permaneceu lamelizada (Fig.61).

Simultaneamente com a dissolução da camada de calose,ou um pouco antes ou imediatamente a seguir, depositaram-se duas camadas , uma internamente entre o plasmalema e a nexina 1 denominada nexina 2 e uma outra externamente, de modo a unir o topo das báculas, designada por tecto (Fig.62). Neste estado da microsporogénese o micrósporo, livre no lóculo da antera, aumentou de volume e parece que a nexina 1 sofreu um estiramento diminuindo de espessura. Como vimos, várias camadas estão já formadas compreendendo a sexina (tecto e báculas), a nexina 1 e a nexina 2 (Fig.62).

Na espécie em estudo o tecto apresentava-se como uma camada lisa e descontínua, como se pode ver ao microscópio electrónico de transmissão (Figs.62 e 64) e ao microscópio electrónico de varrimento (Fig.63), apresentando perfurações de forma subarredondada e dimensões variadas, sendo sempre inferiores a 1 µm . As distâncias entre as perfurações são maiores que estas, no entanto sempre inferiores a 1 µm.

Fig.57 - Porção de micrósporo rodeado de calose (C) observando-se entre o plasmalema (p) e a calose uma camada contínua de primexina (pr). M-mitocôndria, Ci-enclave citoplasmático , P-plastídio. 21 600 X.

Fig.58 - Tétrada jovem mostrando duas porções de células rodeadas de calose (C), observando-se um poro (Po), que é uma zona desprovida de primexina. Na camada de primexina (pr) vêem-se barras cilindricas (setas) que a atravessam perpendicularmente. P-plastídio, Ci-enclave citoplasmático na mitocôndria. 21 600 X.

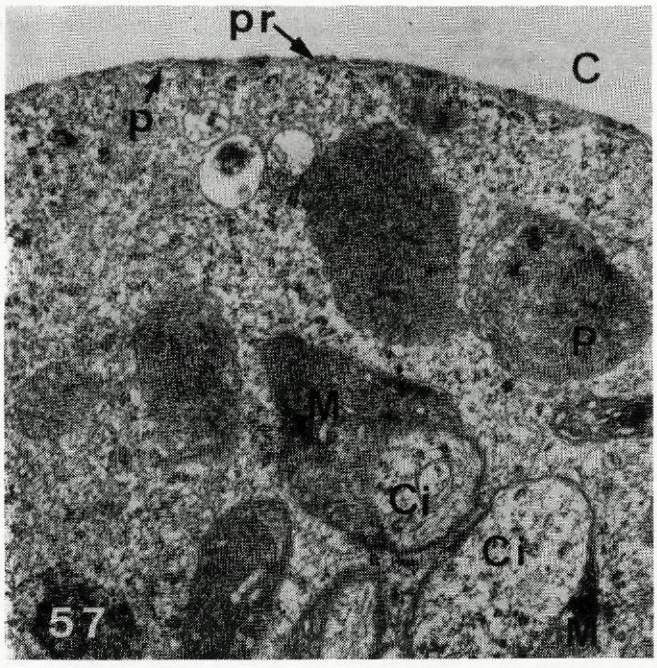
Fig.59 - Tétrada jovem em estado posterior de desenvolvimento relativamente aos anteriores, verificando-se uma depressão ao nível do plasmalema na zona do poro (Po) e ao longo da primexina observam-se as probáculas (setas). D-dictiossoma, C-calose. 27 000 X.

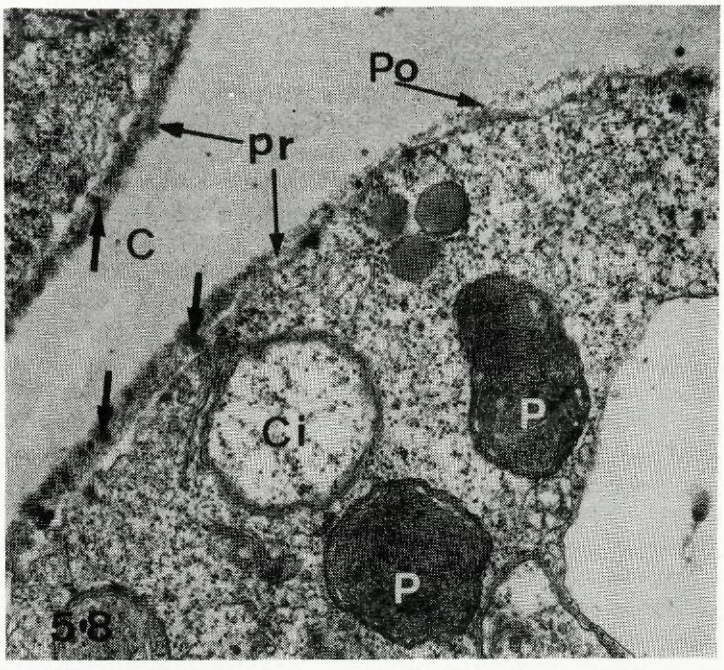
Fig.60 - Tétrada madura observando-se a parede formada com báculas (B) e uma camada contínua a unir a base das báculas designada nexina 1 (n_1). C-calose, M-mitocôndria, P-plastídio, Ci-enclave citoplasmático, pr-primexina. 21 600 X.

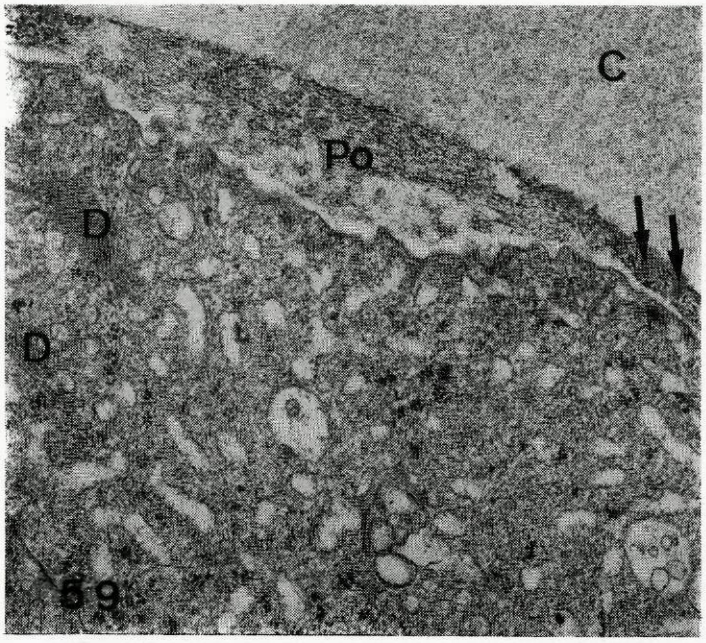
Fig.61 - Tétrada mostrando um poro (Po). 14 400 X.

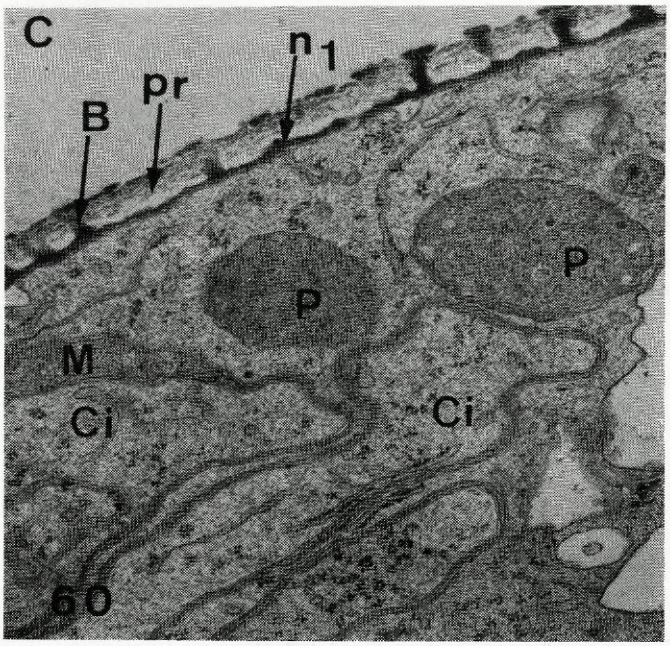
Fig.62 - Micrósporo jovem verificando-se que a parede de exina já possui a sexina que compreende o tecto (Te) e as báculas (B). A nexina está constituída por nexina 1 (n_1) e nexina 2 (n_2). 27 000 X.

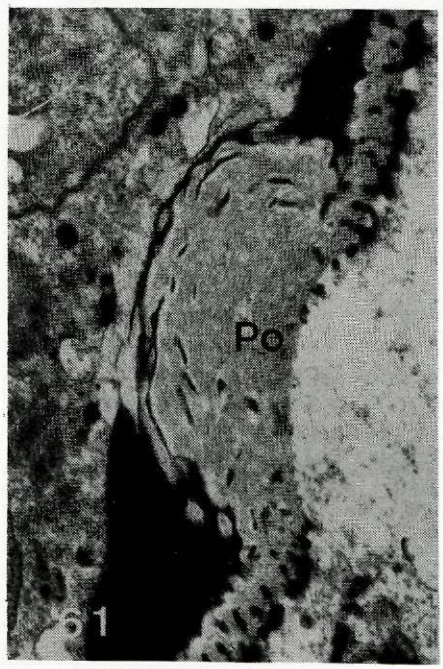
Fig.63 - Superfície exterior do tecto do grão de pólen mostrando as perfurações. SEM. 18 000 X.

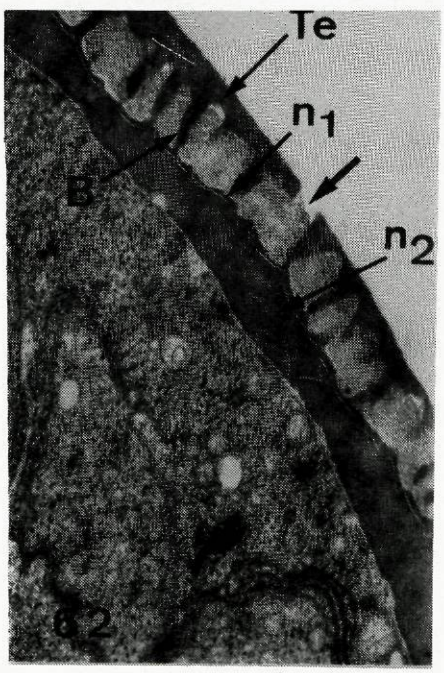

pr
C
P
P
M
Ci
Ci
57

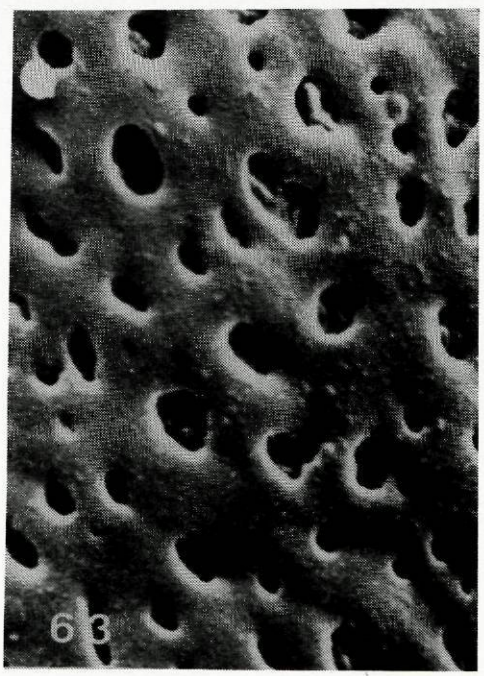

Po
pr
C
Ci
P
P
58


C
Po
D
D
59


C
n1
pr
B
P
P
M
Ci
Ci
60


Po
61


Te
n1
B
n2
62


63

Todas as camadas que se descreveram, que revestiam externamente o micrósporo, eram constituídas por esporopolenina sendo portanto resistentes à degradação física, química e biológica.

À medida que os micrósporos aumentavam gradualmente de volume, o seu sistema vacuolar atingia grandes dimensões de modo a ocupar quase toda a célula (Fig.47). Precisamente nesta fase de crescimento do vacuoma depositou-se uma outra camada entre o plasmalema e a nexina 2, designada por nexina 3. Esta camada, como se pode ver na Fig.64, apresenta uma matriz granular com lamelas de exina. Nas zonas dos poros a camada de nexina 3 surgiu bastante espessada e lamelizada (Fig.65). Com a utilização do método de Thièry, para identificação de polissacarídeos na parede do grão de pólen, verificou-se que a matriz da camada de nexina 3 deu reacção positiva, enquanto que as lamelas, presentes nesta mesma camada, deram reacção negativa assim como toda a exina exterior. Como a exina é constituída por esporopolenina também será de admitir idêntica composição para as lamelas da nexina 3 (Fig.66). Procedeu-se igualmente ao teste para polissacarídeos ácidos (PTA HCl) tendo-se observado que a nexina 3 (matriz e lamelas) e restante exina (nexina 1, 2 e sexina) eram negativas ao teste (Fig.67).

No micrósporo vacuolizado observou-se a parede polínica com a sua exina totalmente formada (Figs.64 e 65).

Como referido, o tecto possuía perfurações, ou seja, zonas de descontinuidade que permitiam a entrada de material do tapete para os espaços compreendidos entre as báculas e o tecto. Este material deu também reacção positiva ao teste de Thièry, assim como a camada bastante fina que se depositou externamente ao tecto (Fig.66).

Observações ao microscópio electrónico de varrimento de grãos de pólen isolados, fixados e com a parede fracturada por ultra-sons, confirmaram a existência das diferentes camadas de exina, tal como se descreveram anteriormente com base em observações de microscopia electrónica de transmissão, ou seja, uma

Fig.64 - Pormenor de micrósporo vacuolizado para mostrar a parede, vendo-se o tecto (Te) com perfurações (seta), as báculas (B), nexina 1 e nexina 2 assinaladas por n(1,2) e a nexina 3 (n_3). 18 900 X.

Fig.65 - Região de um micrósporo vacuolizado onde se vê o poro, (Po) mostrando a ausência, nessa zona, do tecto (Te), báculas (B), sendo também perfeitamente visíveis a nexina 1, nexina 2 e nexina 3 que estão lamelizadas. 8 400 X.

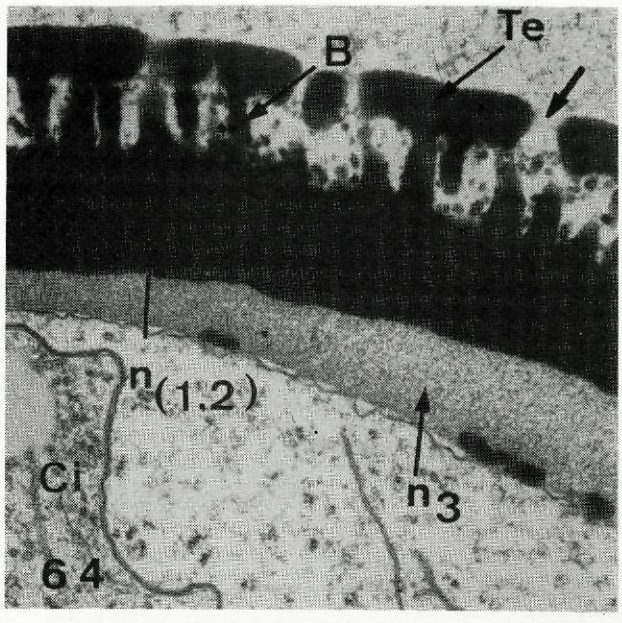
Fig.66 - Parede do grão de pólen após tratamento com o teste de Thièry. Notar a reacção negativa do tecto (Te), báculas (B), nexina 1 (n_1), nexina 2 (n_2) e as lamelas(*) que atravessam a nexina 3 (n_3). A matriz da nexina 3 (n_3) deu reacção positiva bem como a intina (In). 21 000 X.

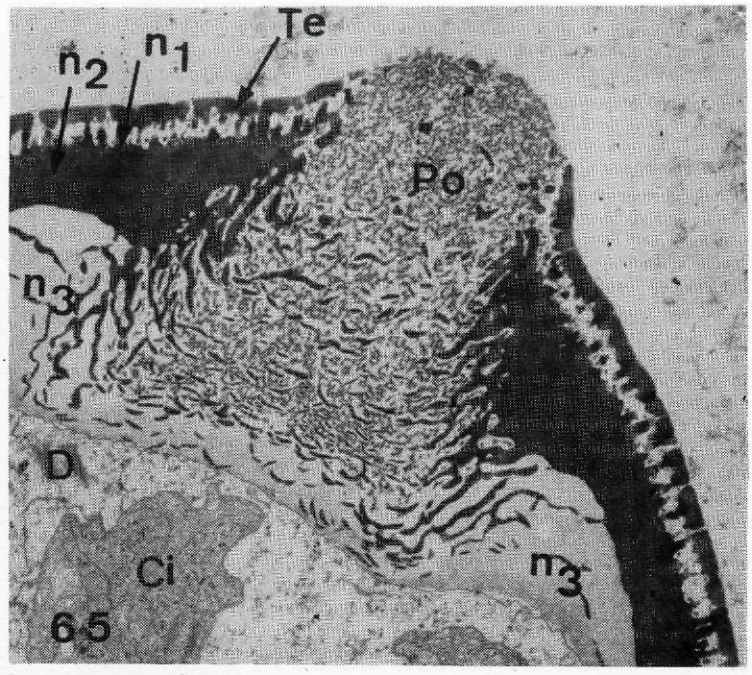
Fig.67 - Parede do grão de pólen próximo do poro, submetida ao teste PTA HCl. Apenas a intina (In) é positiva pois que toda a camada de exina é negativa ao teste. n_2-nexina 2, n_3-nexina 3. 19 200 X.

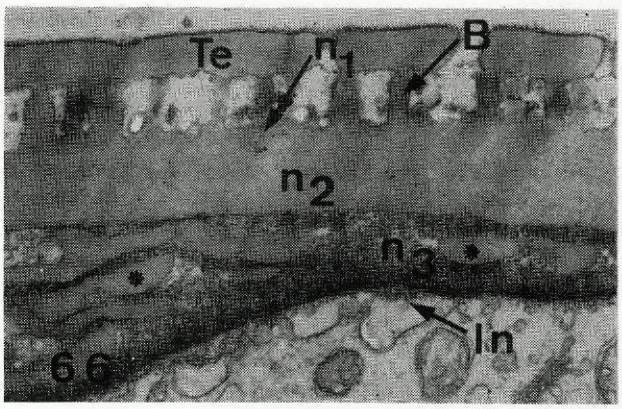
Fig.68 - Grão de pólen com a parede fracturada. SEM.7 000 X.

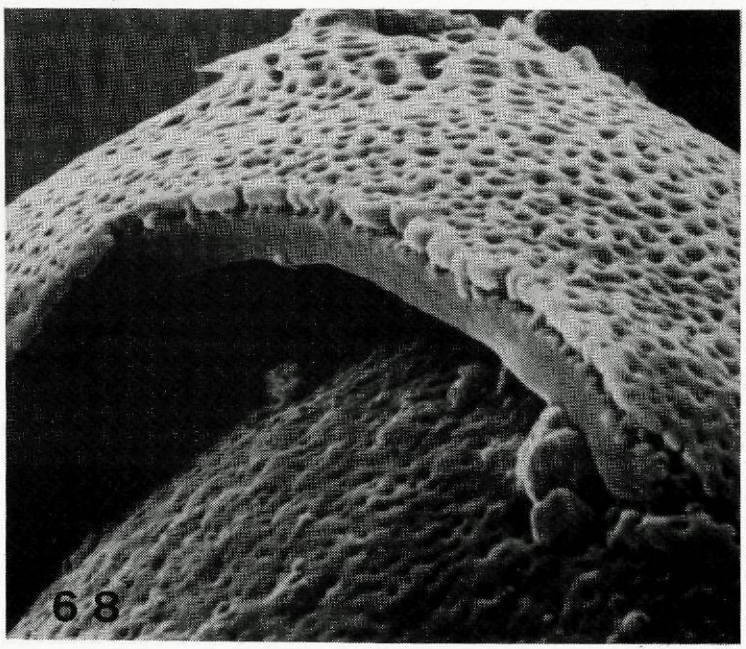
Fig.69 - Micrósporo em divisão nuclear, no estado de deposição da camada de intina, vendo-se o plasmalema com a forma ondulada (ponta de seta). P-plastídio, M-mitocôndria, RER-retículo endoplasmático rugoso. 18 000 X.

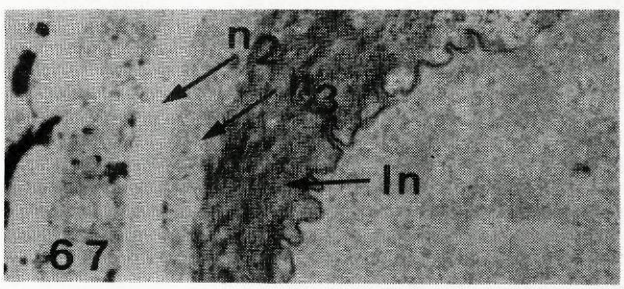
Fig.70 - Micrósporo em divisão nuclear, observando-se a presença de material fibrilar na zona exterior ao plasmalema (seta). Vêem-se numerosos dictiossomas (D) junto ao plasmalema. M-mitocôndria. 21 600 X.

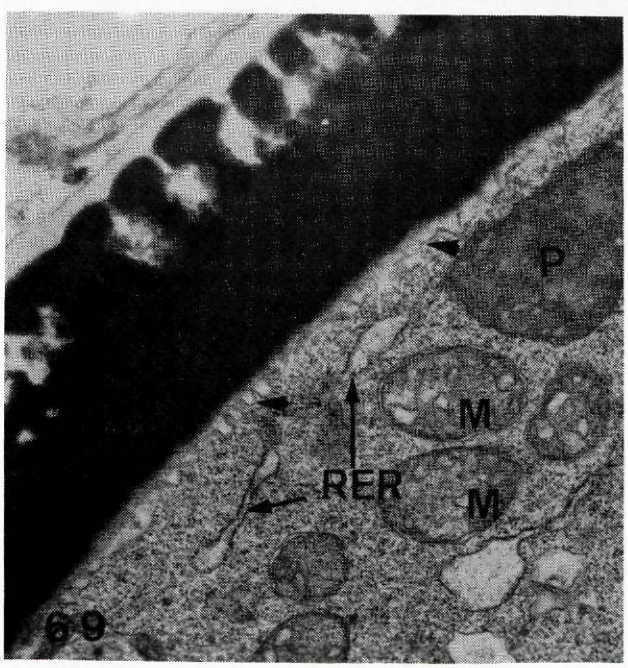

B
Te
n(1,2)
Ci
n3
64

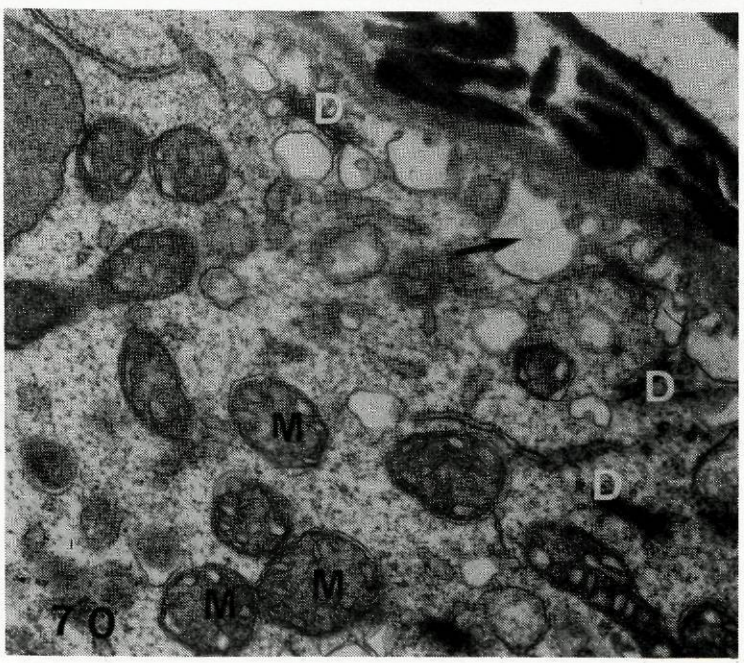

Te
n2
n1
Po
n3
D
Ci
n3
65


Te
n1
B
n2
n3
In
66


68


n2
n3
In
67


P
M
RER
M
69


D
D
M
D
M
M
70

camada de sexina,constituída por báculas e tecto, e uma camada contínua bastante espessada correspondente à nexina (Fig.68).

4.2.2.2 - Intina

Após a deposição da camada de nexina 3, o plasmalema começou por apresentar uma forma ondulada (Figs.69 e 70). Externamente ao plasmalema assistiu-se a uma acumulação de material fibrilar (Fig.70) observando-se com frequência a presença de plasmalemossomas e vesículas dispersas resultantes de evaginações da membrana plasmática (Fig.71). No citoplasma, junto ao plasmalema, começou por se notar a presença de perfis de retículo endoplasmático e dictiossomas com vesículas associadas (Figs.69 e 70), que contribuem para a formação de uma camada contínua denominada intina. De salientar que a intina, constituída por celulose e substâncias pécticas, deu reacção positiva ao teste de Thièry (Figs.71 e 73). Na região dos poros esta camada apresentava-se muito espessada (Fig.77). Cortes seriados de micrósporos vacuolizados mostraram que o material que constituia a intina se começava a depositar na região do poro, estendendo-se lateralmente rodeando externamente o plasmalema. Em todas as imagens de microscopia electrónica de transmissão foi possível observar que a intina na região dos poros apresentava microvilosidades com uma orientação mais ou menos perpendicular ao plasmalema (Figs.72 e 77). Estas microvilosidades resultaram de evaginações do plasmalema.

4.2.3 - Parede da célula germinativa

Após a divisão do núcleo dos micrósporos originaram-se os grãos de pólen com duas células - a vegetativa e a germinativa.

Como atrás se referiu, a célula germinativa conserva-se, durante algum tempo, encostada à parede do grão de pólen formando-se uma parede a separar as duas células. Junto a esta parede,

em formação, observavam-se numerosos perfis de retículo endoplasmático (Fig.73). O material que cconstitui a parede da célula germinativa, tal como a intina, deu reacção positiva ao teste de Thièry (Fig.73) e ao teste PTA HCl (Fig.74).

4.2.4 - Aberturas ou poros

Ao descrever-se a parede do grão de pólen fez-se referência a determinadas zonas da parede do grão de pólen que se denominam aberturas ou poros.

4.2.4.1 - Morfologia externa dos poros

Neste trabalho fez-se um estudo da morfologia externa dos poros da parede do grão de pólen com base no sistema NPC de Erdtman (1969) que considera o número de poros (N), a posição (P) e "character" (C), ou seja a forma dos poros do grão de pólen.

Ao microscópio óptico foi possível observar que, relativamente aos poros, o grão de pólen de Cucumis sativus L. era NPC (344). N (3) porque possuía três aberturas embora se tenham observado quatro, mas muito raramente. P (4) pois quanto à posição dos poros, estes situavam-se na zona equatorial. C (4) porque as aberturas apresentavam forma circular.

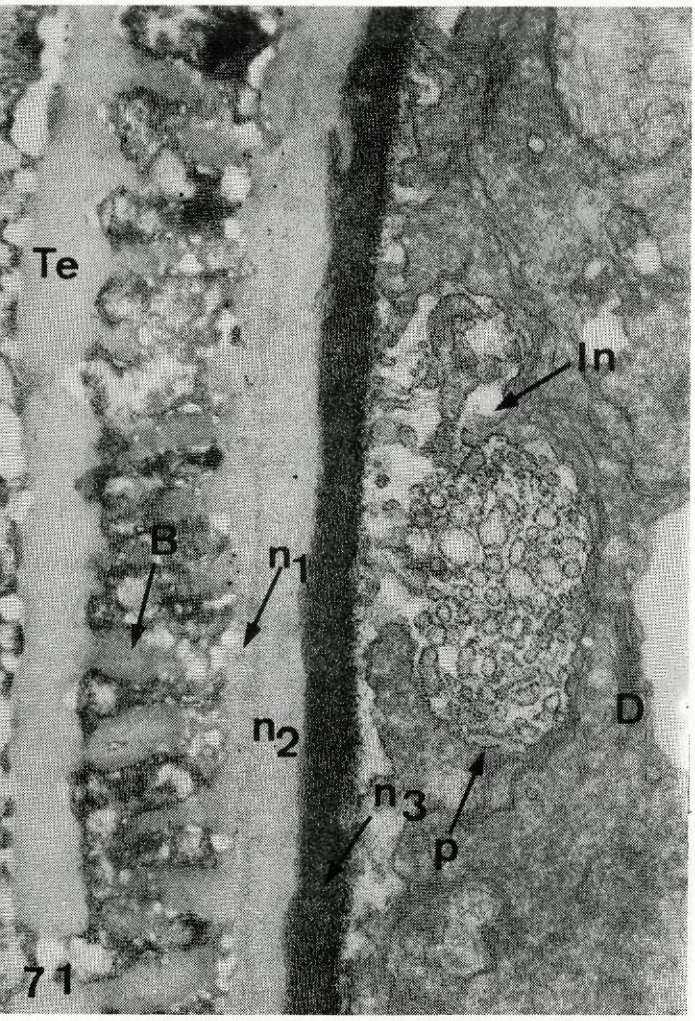
O microscópio electrónico de varrimento (SEM) ofereceu um estudo mais exacto da morfologia externa dos poros, confirmando-se as observações efectuadas ao microscópio óptico de que o grão de pólen possuía mais frequentemente três poros circulares localizados no plano equatorial (Fig.75). A parte central do poro apresentava uma estrutura granular que, como se pode ver na Fig.76, é morfologicamente diferente da restante parede. Os poros apresentavam-se ou salientes para o exterior (Fig.75) ou planos (Fig.76) conforme o estado de maturação do grão de pólen, correspondendo os primeiros ao grão de pólen jovem e os últimos ao grão de pólen em processo de maturação.

Fig.71 - Porção de micrósporo observando-se a parede exinica, totalmente formada, com o tecto (Te), báculas (B), nexina 1 (n_1), nexina 2 (n_2) e nexina 3 (n_3). A camada de intina (In) está a formar-se, observando-se plasmalemossomas na zona exterior ao plasmalema (p). D-dictiossomas. Thièry. 27 000 X.

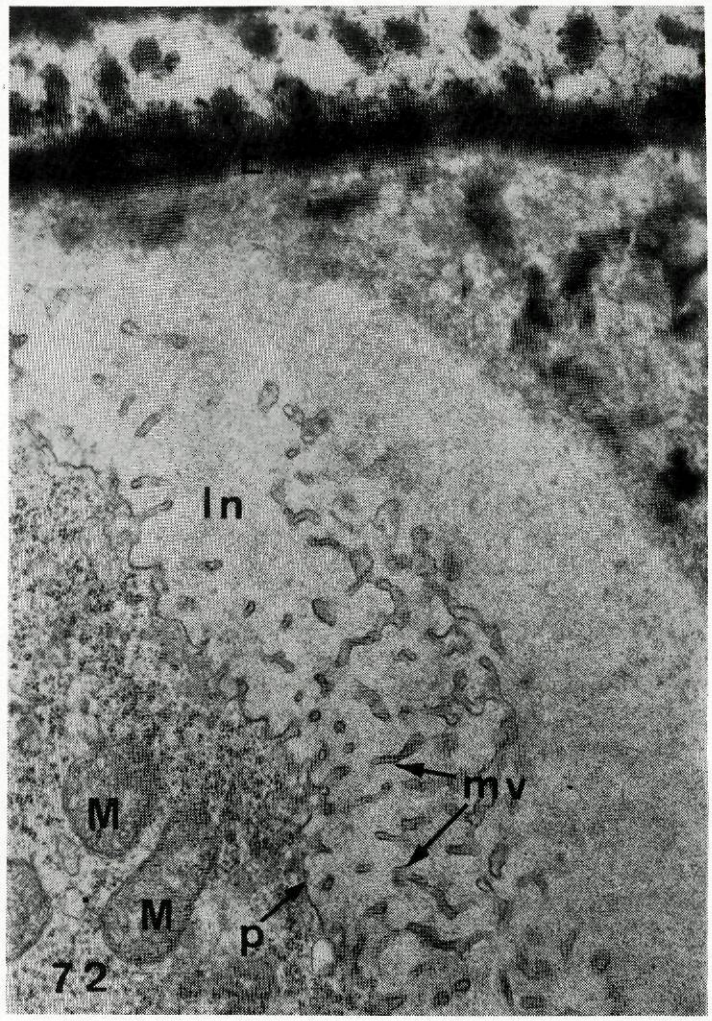
Fig.72 - Região de grão de pólen jovem próximo do poro, mostrando a intina (In) com microvilosidades (mv). p-plasmalema, M-mitocôndria. 18 900 X.

Fig.73 - Porção de grão de pólen jovem, mostrando a célula germinativa rodeada pela parede em formação (pCG) que é positiva ao teste de Thièry, tal como a intina (In). M-mitocôndria, N-núcleo. 18 000 X.

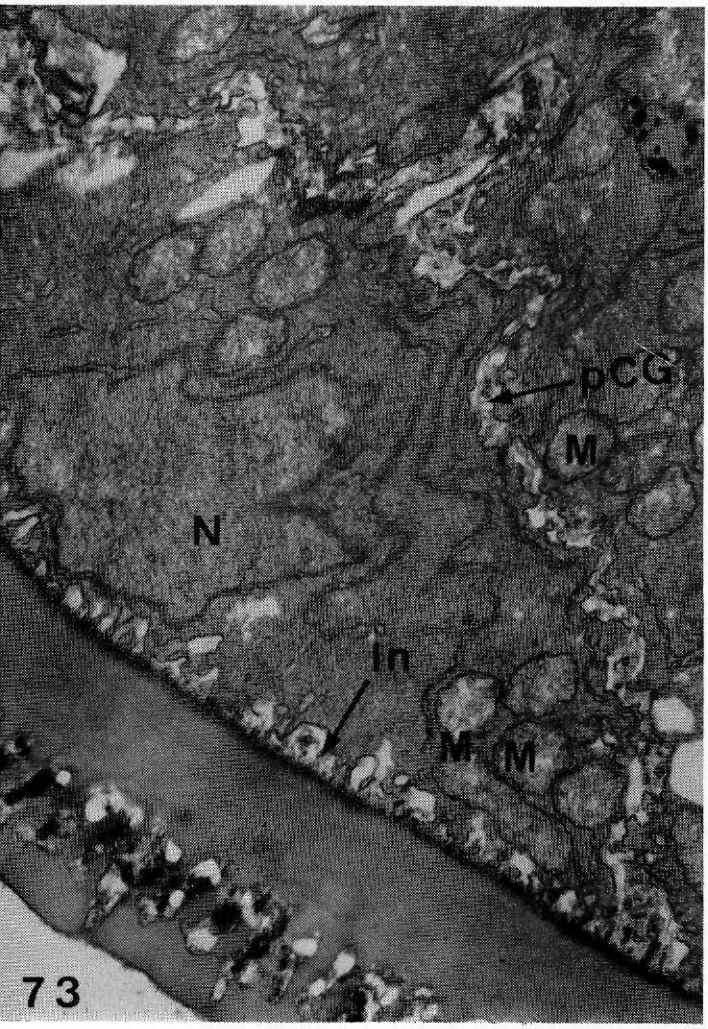
Fig.74 - Imagem da célula germinativa, observando-se a parede (pCG) da célula germinativa em formação, positiva ao teste PTA HCl, tal como a intina (In). CG-célula germinativa, CV-célula vegetativa, Te-tecto. 26 400 X.



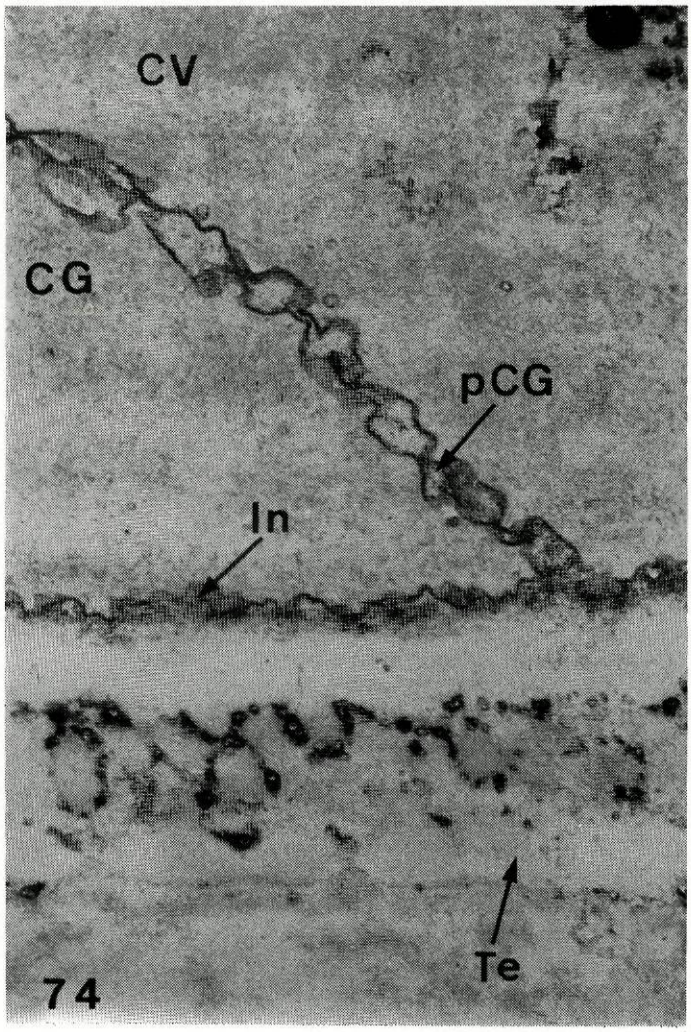
71



72



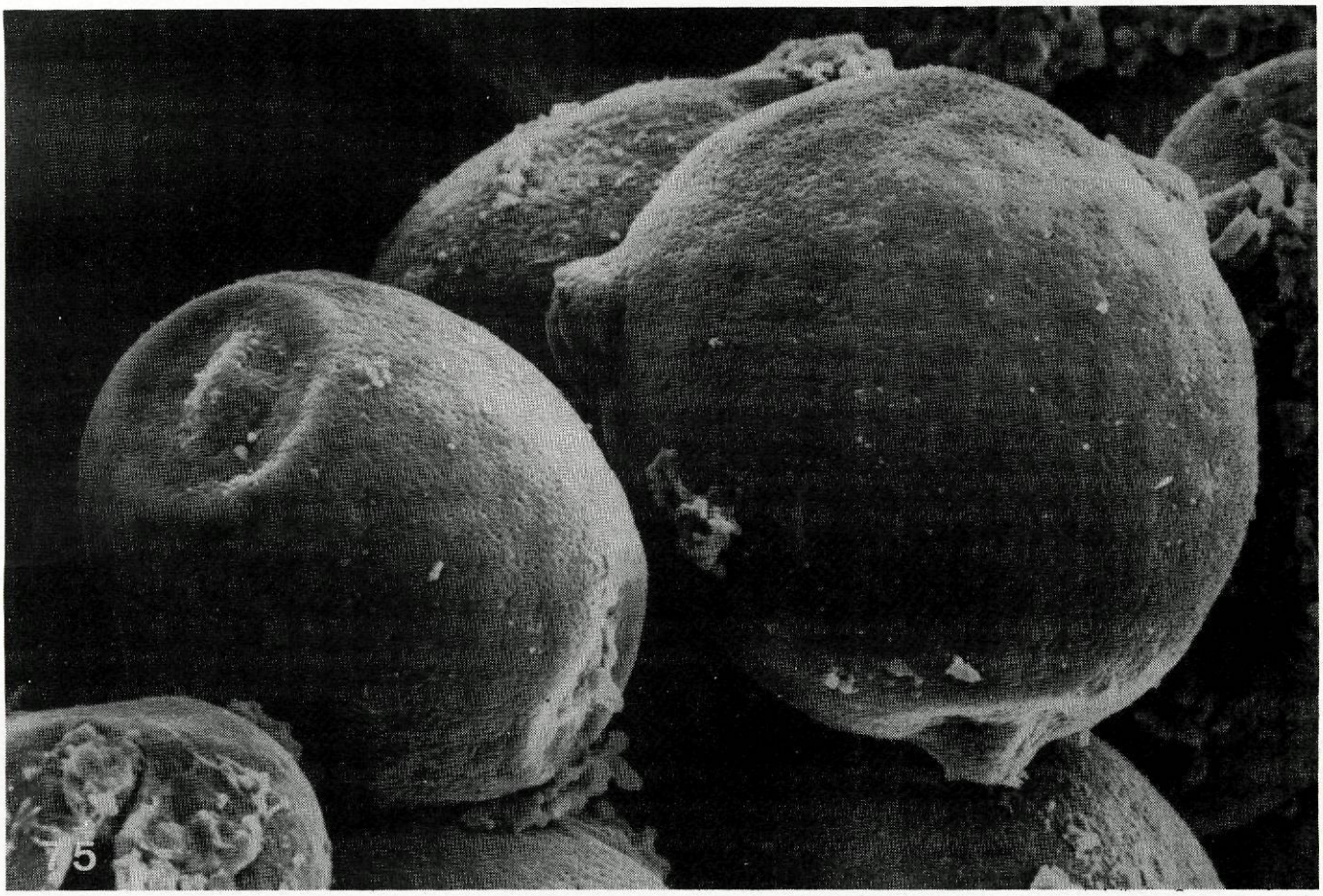
73

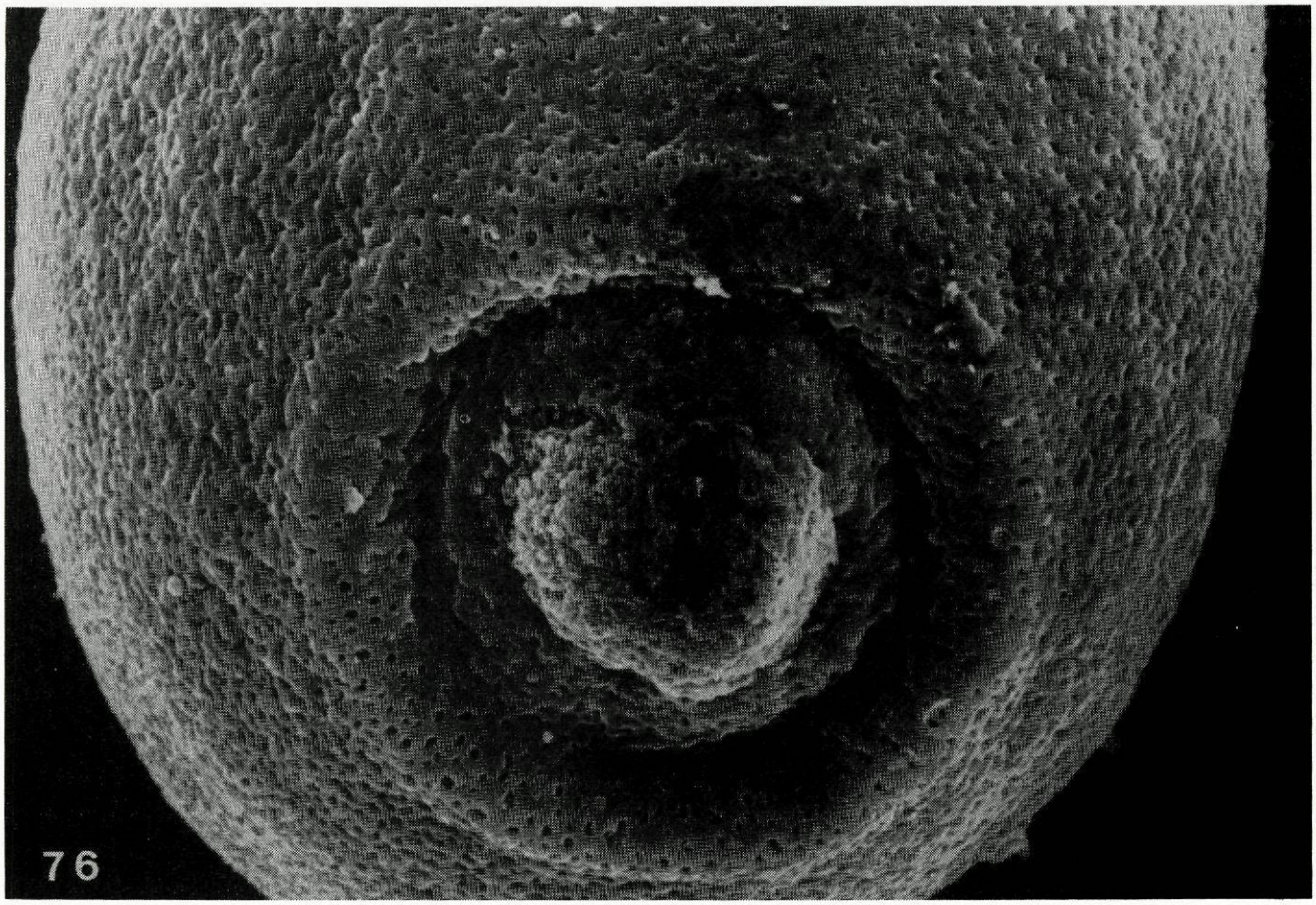


74

Fig.75 - Grãos de pólen observados ao microscópio electrónico de varrimento (SEM) 1 900 X.

Fig.76 - Grande ampliação de um poro do grão de pólen. SEM 5 700 X.


75


76

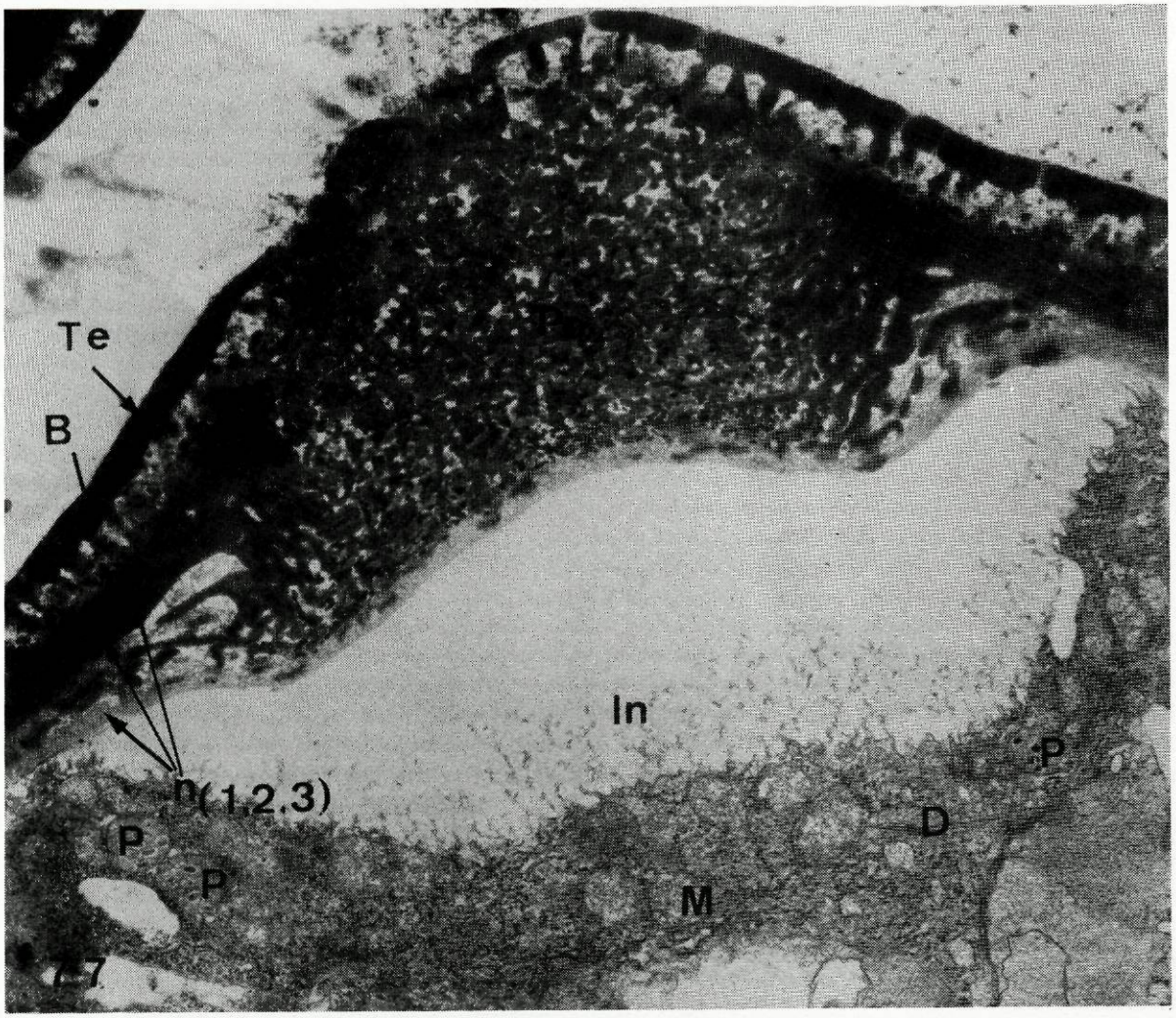
4.2.4.2 - Morfologia interna dos poros

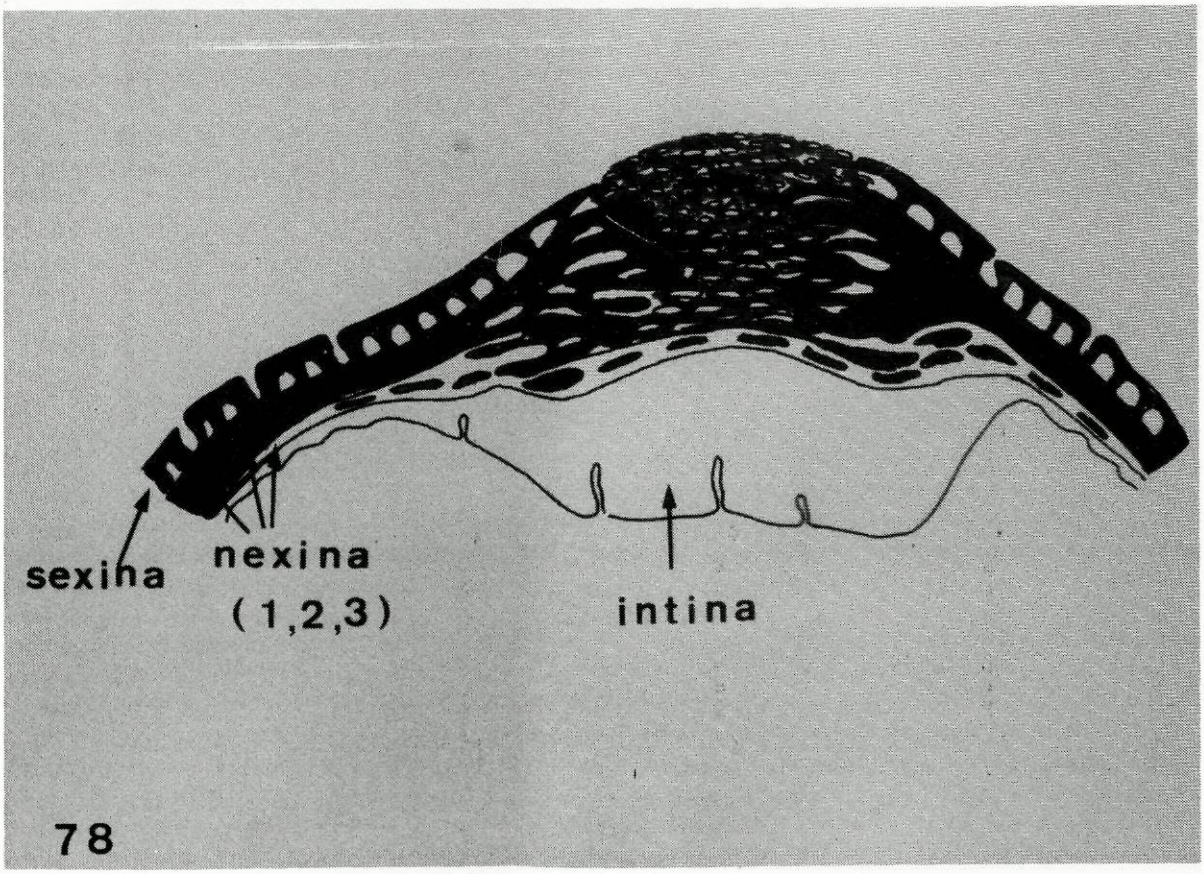
O estudo da morfologia interna dos poros foi efectuado com base em microfotografias de microscópio electrónico de transmissão. Quando se descreveu a parede do grão de pólen fez-se referência à estrutura dos poros tendo-se observado que a formação destes se iniciava no estado de tétrada jovem (Fig.58), completando-se quando o núcleo do micrósporo estava em divisão (Fig.77). No grão de pólen os poros apresentavam-se preenchidos por um material granular, não se observando sexina (tecto e báculas). As camadas de nexina surgiam lamelizadas parecendo as lamelas irradiar das margens em direcção à parte central. A camada correspondente à intina surgia muito espessada, em forma de lentícula, possuindo uma rede de microvilosidades (Fig. 77).

Na Fig.78 está representado um esquema da parede polínica, na zona dos poros.

Fig.77 - Grande ampliação para mostrar a morfologia interna do poro (Po). A parede do grão de pólen compreende a camada de exina constituída por tecto (Te), báculas (B) e nexina 1,2,3, observando-se também a camada de intina (In). M-mitocôndria, P-plastídio, D-dictiossoma 11 600 X.

Fig.78 - Esquema representativo da morfologia interna do poro. A sexina compreende o tecto e as báculas.





78

5 - Tapete

5.1 - Introdução

O tapete compreende um conjunto de células altamente especializadas, cujo desenvolvimento está relacionado com as transformações que ocorrem nas células esporogénicas, e parece desempenhar um papel importante na nutrição do grão de pólen.

Durante a microsporogénese o tapete sofre uma série de modificações, que se iniciam por uma síntese activa de esporopolenina, com posterior degradação dos componentes citoplasmáticos e completa autólise deste tecido (Echlin, 1971a, b). Sabe-se que todas estas alterações na fisiologia das células do tapete se reflectem na formação do grão de pólen, mas desconhece-se se a microsporogénese exerce alguma influência nas células do tapete.

O tapete é a camada mais interna da parede da antera e forra o lóculo da antera, onde inicialmente se localizam as células esporogénicas que vão dar origem aos grãos de pólen.

Nas angiospérmicas há a distinguir duas espécies de tapete, o parietal ou secretor e o plasmodial ou amebóide.

Em Cucumis sativus L. observaram-se dois tipos de células a constituirem o tapete, diferentes não só na sua organização como na ocasião da sua degenerescência, assunto que iremos descrever.

5.2 - Comportamento das células do tapete durante a microsporogénese

Como atrás foi referido, a parede da antera apresenta-se constituída por várias camadas de células que são do exterior para o interior - a epiderme, o endotécio, a camada mediana

e o tapete.

Como se sabe, durante a formação do grão de pólen, as células do tapete estão sujeitas a uma série de modificações e, neste trabalho, deu-se particular atenção a estas células durante as quatro principais fases da microsporogénese, ou seja , célula mãe, tétrada, micrósporo e grão de pólen.

Na fase de célula mãe, em início de meiose, o tapete compreendia uma fiada de células de parede primária muito fina. As células comunicavam umas com as outras através dos plasmodésmios. Nestas células o núcleo apresentava-se volumoso e a cisterna perinuclear surgia muito dilatada. As cisternas dos dictiossomas eram achatadas e empilhadas, distendidas ou encurvadas. No bordo das membranas, que delimitavam as cisternas dos dictiossomas, observavam-se algumas vesículas. O citoplasma apresentava ribossomas abundantes e as membranas do retículo endoplasmático rugoso formavam cisternas bastante dilatadas e de contornos irregulares. As mitocôndrias tinham formas mais ou menos esféricas, apresentando matriz de densidade electrónica média com cristas em forma de túbulos e áreas menos densas em electrões, com fibrilas de DNA. Os plastídios eram proplastídios, de estroma mais ou menos homogéneo. Também se observavam, nestas células, alguns glóbulos lipídicos no citoplasma (Fig. 79).

À medida que a meiose se desenrolava o plasmalema destas células afastava-se da parede, observando-se um periplasma granulo-fibrilar, e simultâneamente progredia a dissolução da parede celular.

Durante a meiose diferenciavam-se no tapete dois tipos de células (Figs.80 e 83) que frequentemente se observavam lado a lado (Fig.81). Estas células possuiam um citoplasma bastante denso, rico em ribossomas e mesmo polirribossomas. As mitocôndrias eram de pequenas dimensões, de forma arredondada ou elíptica e matriz pouco electronodensa com cristas mais ou menos bem desenvolvidas e áreas claras onde se observavam fibrilas de

O tapete

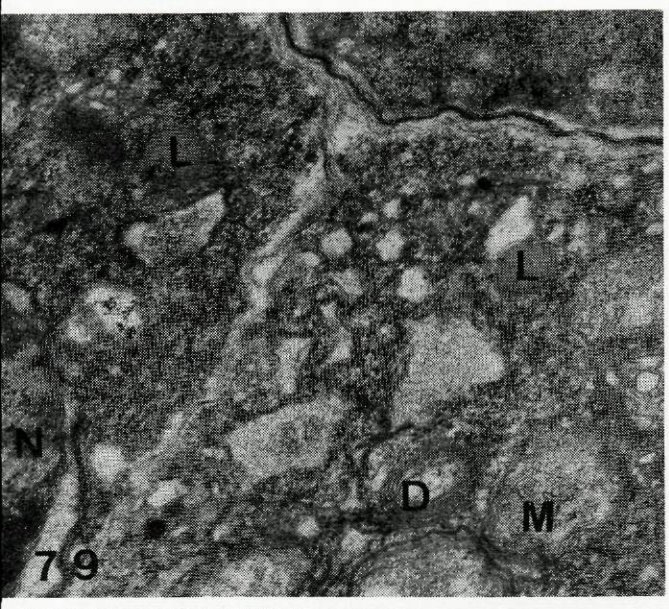
Fig.79 - Células do tapete no início da meiose observando-se núcleo (N) com a cisterna perinuclear dilatada, mitocôndrias (M), dictiossomas (D) e esferossomas (L). 14 000 X.

Fig.80 - Células do tapete durante a meiose onde se vêem perfis longos de retículo endoplasmático rugoso (RER), mitocôndrias (M) arredondadas e plastídios (P) de grandes dimensões possuindo no estroma uma estrutura complexa de túbulos, semelhante ao corpo prolamelar. 20 400 X.

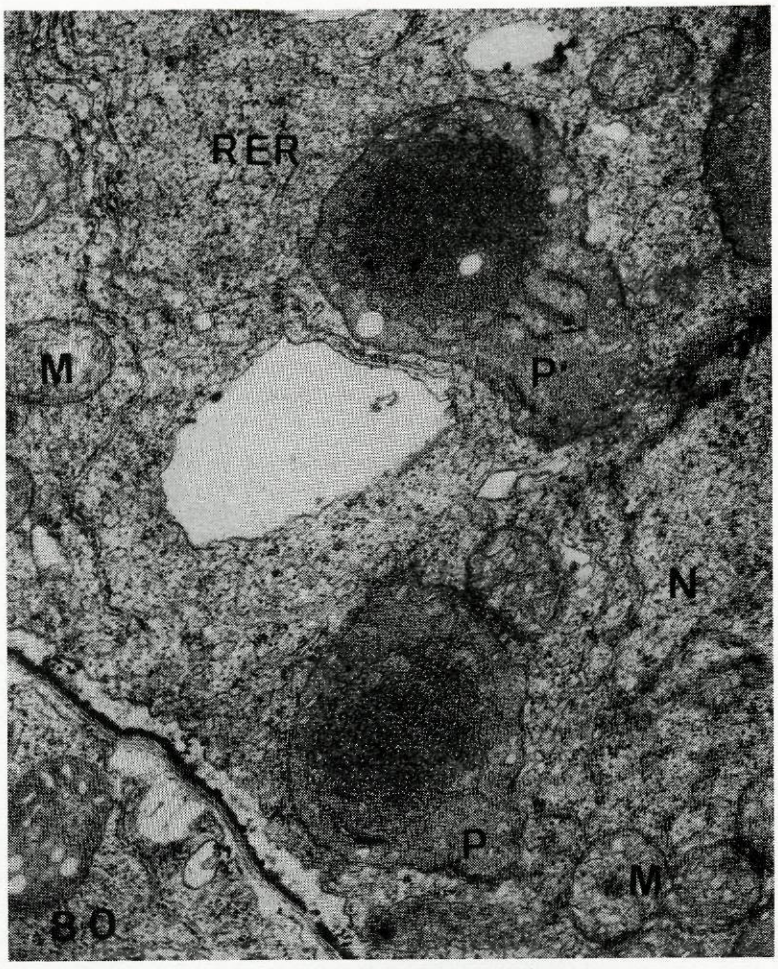
Fig.81 - Dois tipos de células que compõem o tapete (Ta) separados pela parede celular (PC). M-mitocôndria, RER-retículo endoplasmático rugoso, D-dictiossoma, ri-ribossomas. 20 000 X.

Fig.82 - Plastídio (P) de uma célula do tapete mostrando a estrutura complexa de túbulos. $KMnO_4$. 28 000 X.

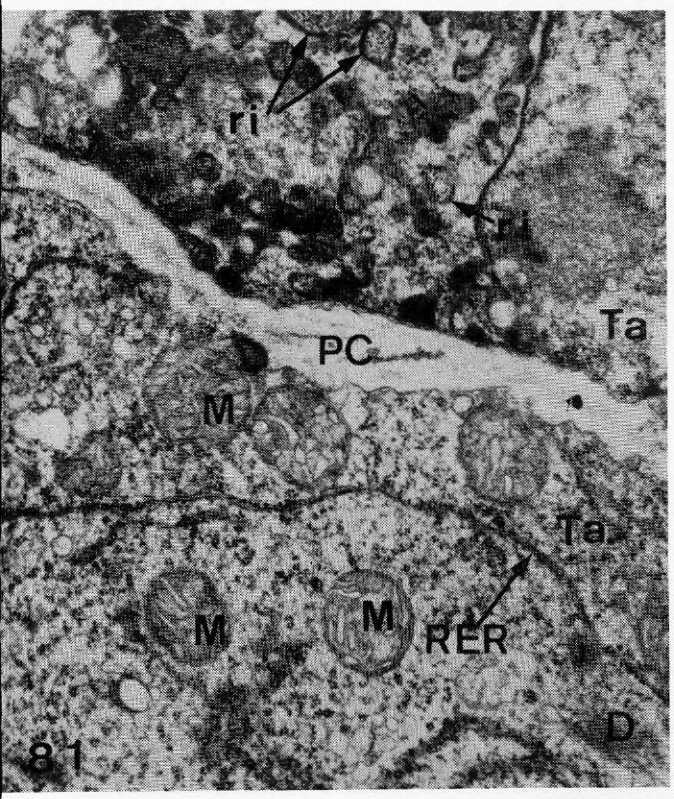
Fig.83 - Célula do tapete possuindo o sistema elaborado de retículo endoplasmático. 83a-Maior ampliação mostrando continuidade do retículo endoplasmático (ponta de seta) com o sistema elaborado, bem como invaginação da membrana do retículo (seta) para dar origem às vesículas no interior da cisterna. D-dictiossoma, L-esferossoma, N-núcleo, M-mitocôndria, P-plastídio. 12 000 X e 24 000 X.



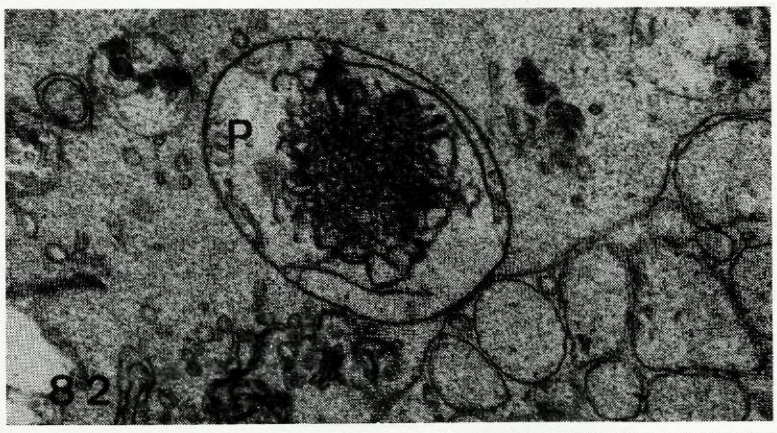
7 9



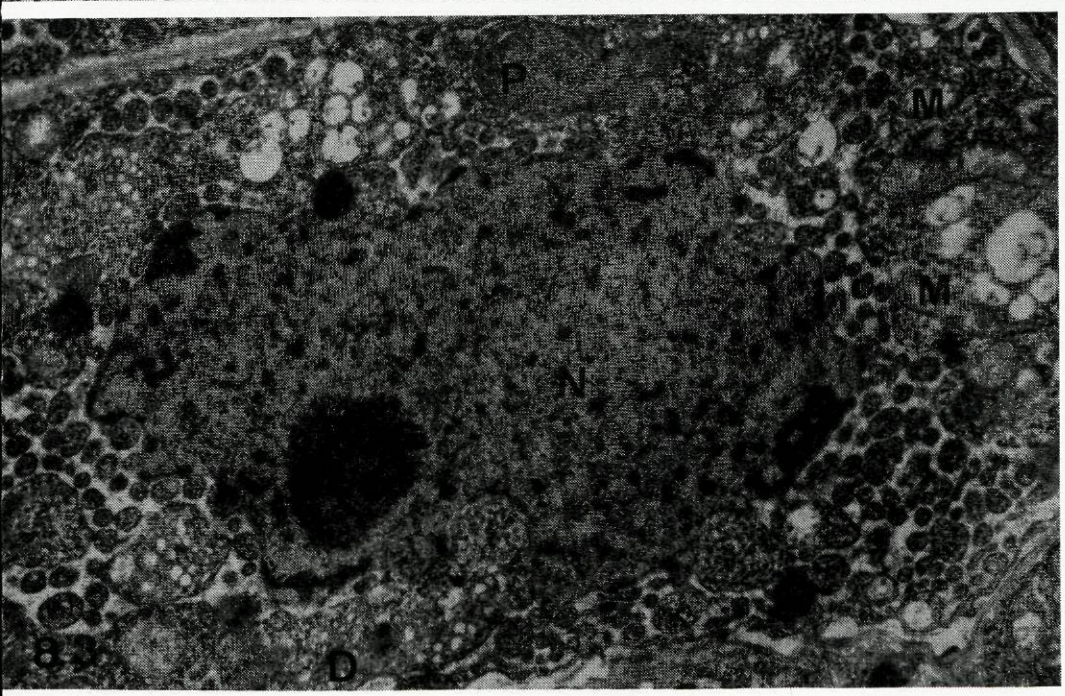
8 0



8 1



8 2



8 3



8 4

DNA.

As células que constituem o tapete possuiam um tipo especial de plastídios de forma elíptica ou arredondada. No estroma destes organelos viam-se algumas lamelas isoladas e uma estrutura complexa de túbulos, em disposição regular, semelhante ao corpo prolamelar dos estioplastos (Fig.80). A fixação pelo permanganato de potássio preservou bem esta estrutura, como se pode ver na Fig.82. Cortes transversais e longitudinais dos túbulos, que formam esta estrutura, permitiram verificar que o seu diâmetro era cerca de 45 nm (a membrana apresentava 10 nm de espessura e a região central, mais clara, media cerca de 25 nm).

Como se disse atrás, o tapete em Cucumis sativus L. era constituído por dois tipos de células. Assim, umas células (Fig.80) possuiam o retículo endoplasmático bem desenvolvido, formando perfis longos e finos, com as suas cisternas alongadas e flexuosas. Frequentemente observou-se continuidade entre a forma lisa e a forma rugosa do retículo endoplasmático. O outro tipo de células, que formava o tapete (Fig.83), apresentava um sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso. Este sistema elaborado compreendia cisternas dilatadas de retículo endoplasmático rugoso, tendo no seu interior numerosas vesículas de várias formas e tamanhos. Estas vesículas eram rodeadas por uma membrana, apresentando na sua face interior ribossomas. A formação destas vesículas parece ser devida a invaginações da membrana do retículo endoplasmático rugoso (Fig.83a, seta), englobando áreas de citoplasma de diferentes dimensões. Estas áreas, por vezes, continham organelos tais como mitocôndrias, plastídios e/ou dictiossomas. Como se pode ver na Fig. 83, observou-se continuidade do sistema elaborado do retículo endoplasmático rugoso com a membrana externa do invólucro nuclear e com o plasmalema. No citoplasma merecem referência, pela sua abundância, glóbulos que se assemelham a lípidos com elevada densidade electrónica.

No início do estado de tétrada o citoplasma das células do tapete apresentava uma densidade ribossómica elevada e um grande número de organelos citoplasmáticos. Era frequente observar-se a presença de dois núcleos na mesma célula (Fig.84), pois estas células sofrem mitoses no início da microsporogénese sem ocorrer a citocinese. Ao nível do periplasma notava-se a presença de glóbulos e corpos alongados osmiofílicos (Fig.84, setas).

À medida que a microsporogénese se desenrolava, observava-se um aumento do número de corpos electronodensos presentes no citoplasma das células do tapete, mas apenas nas células que possuíam o sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso. Verificou-se nestas células que os corpos esféricos escuros se transformavam em orbículos de maior densidade electrónica apresentando forma arredondada e maiores dimensões. Estes corpos encontravam-se dispersos no citoplasma, no interior das cisternas de retículo endoplasmático rugoso, no invólucro nuclear e mesmo no interior do núcleo (Fig.85). Observaram-se cortes não contrastados e os orbículos permaneciam muito electronodensos, sendo esta densidade electrónica aparentemente idêntica à da parede exínica dos grãos de pólen. Neste estado da microsporogénese o citoplasma, das células do tapete que não possuíam o sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso, continuava a apresentar as características do de uma célula metabolicamente activa (Fig.86) dado que o retículo endoplasmático se apresentava bastante desenvolvido, formando perfis de cisternas longas, com ribossomas nas suas membranas e até polirribossomas. O aparelho de Golgi era constituído por várias dictiossomas, rodeados por numerosas vesículas. As mitocôndrias tinham pe

Fig.84 - Célula do tapete possuindo dois núcleos (N) observando-se ainda, na zona exterior ao plasmalema, alguns corpos escuros (setas). Nu-nucleolo. 19 800 X.

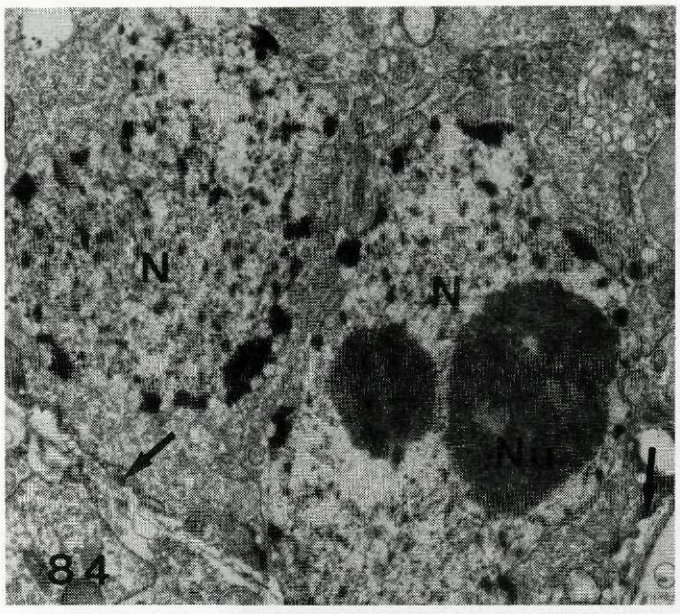
Fig.85 - Células do tapete (Ta) notando-se a presença de orbículos (ep) dispersos no citoplasma, no invólucro nuclear e no interior das cisternas do retículo endoplasmático rugoso. PC-parede celular. 19 800 X.

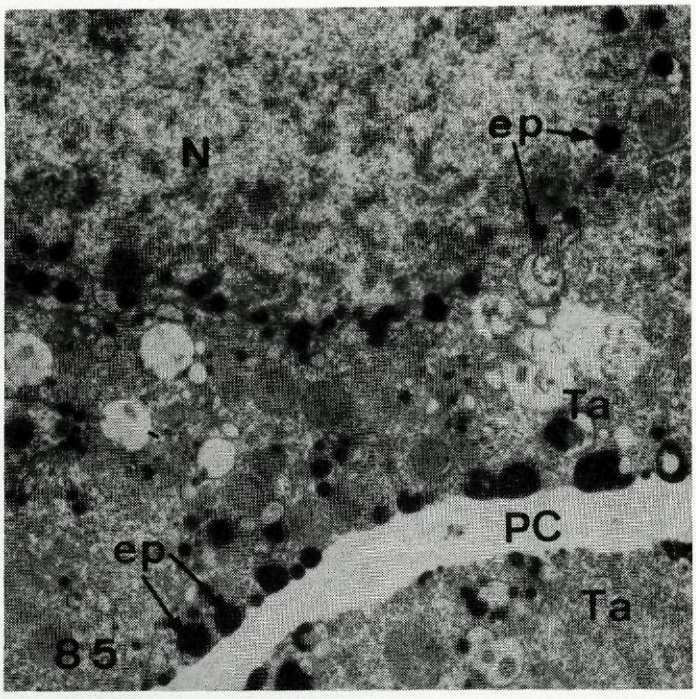
Fig.86 - Célula do tapete que não possui o sistema elaborado de retículo endoplasmático. M-mitocôndria, P-plastídio, N-núcleo. 19 000 X.

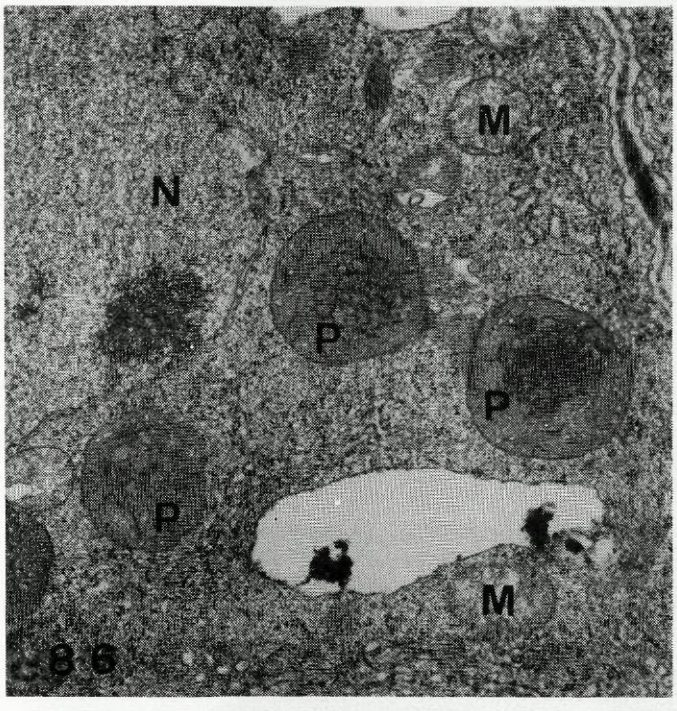
Fig.87 - Micrósporo vacuolizado rodeado externamente por tapete (Ta), em estado de degenerescência avançado. E-exina, M-mitocôndria, Ci-enclave citoplasmático. 4 600 X.

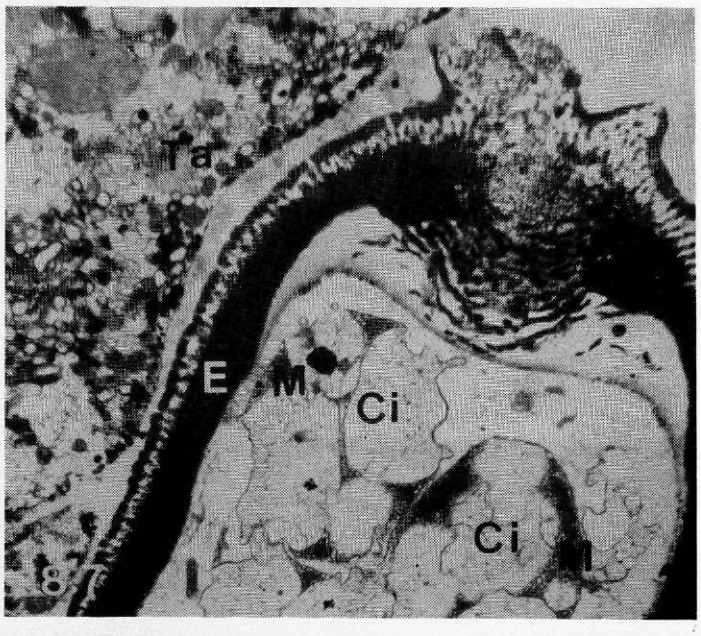
Fig.88 - Grão de pólen envolvido por células do tapete intactas, que não possuem o sistema elaborado de retículo endoplasmático. Próximo da exina (E) observam-se os orbículos (setas) produzidos pelas células do tapete (Ta). P-plastídio, D-dictiossoma, M-mitocôndria. 9 200 X.

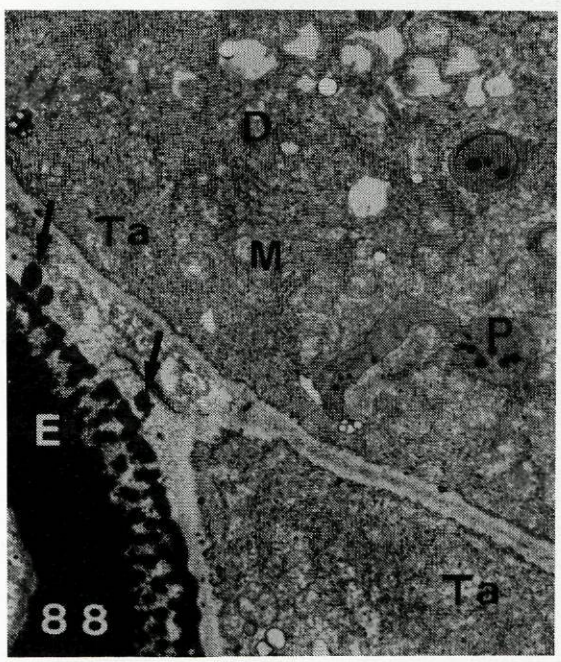
Fig.89 - Célula do tapete cujo retículo endoplasmático se dispõe em perfis longos e finos. O núcleo (N) é volumoso, as mitocôndrias (M) são de pequenas dimensões e arredondadas e os plastídios (P) possuem um sistema membranoso em disposição paralela e concêntrica a rodear a estrutura complexa de túbulos ondulados. Notar o invólucro mitocondrial de cisterna dilatada (setas) bem como as cisternas do sistema membranoso (*), em continuidade com os vacúolos (V). D-dictiossoma. 9 200 X.

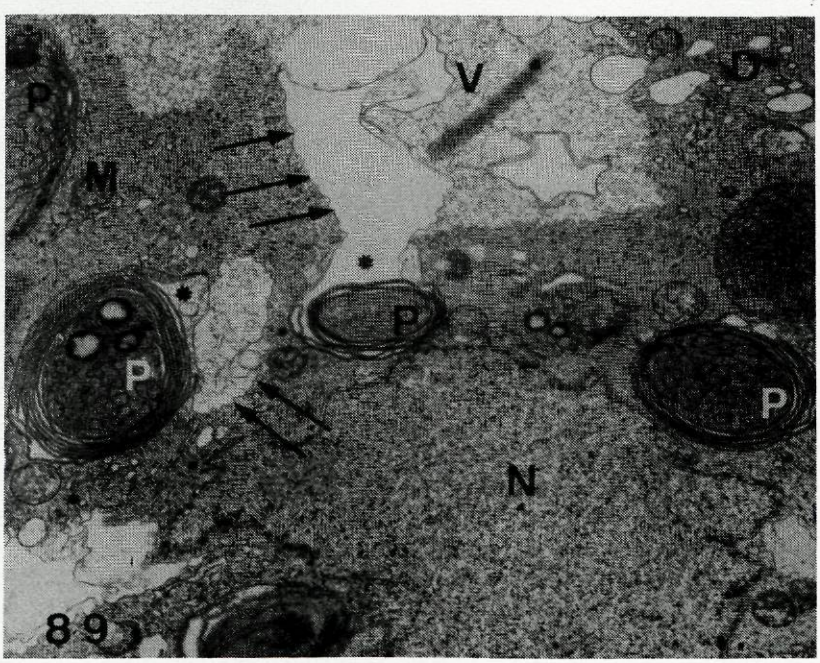

N
N
N
84


N
ep
Ta
PC
ep
Ta
85


M
N
P
P
P
M
86


Ta
E
M
Ci
Ci
8


D
Ta
M
P
E
Ta
88


V
D
P
M
P
P
P
N
89

quenas dimensões, forma circular ou elíptica e cristas em forma de túbulos. O núcleo destas células surgia volumoso e os plastídios apresentavam grandes dimensões relativamente às mitocôndrias, possuindo no estroma a estrutura complexa de túbulos descrita. Além da presença desta estrutura, semelhante ao corpo prolamelar, observavam-se lamelas isoladas, por vezes em forma de vesículas (Fig.86). Adjacente a estas células observaram-se outras que diferiam não só na forma do retículo endoplasmático, que se apresentava na forma de um sistema elaborado, mas também pela presença de orbículos no interior do citoplasma e junto ao plasmalema. (Fig.85).

À medida que a microsporogénese se desenrolou as células do tapete, que continham o sistema elaborado do retículo endoplasmático rugoso, foram apresentando um estado de degenerescência bastante acentuado como se pode observar na Fig.87.

Quando o micrósporo estava em divisão nuclear predominavam as células do tapete, que possuiam o retículo endoplasmático sob a forma de cisternas alongadas, observando-se numerosos polirribossomas, mitocôndrias de pequenas dimensões e forma arredondada ou elíptica, contendo algumas cristas tubulares e áreas menos densas em electrões, com fibrilas de DNA. Os plastídios apresentavam, no estroma, um conjunto de membranas onduladas e organizadas em arranjos regulares, e a rodear este complexo observavam-se algumas lamelas paralelas . No estroma dos plastídios eram visíveis alguns glóbulos osmiofílicos.

No estado de grão de pólen as células do tapete descritas continuavam metabolicamente activas e frequentemente observavam-se a rodear o lóculo da antera nas proximidades dos grãos de pólen (Fig.88). Como se pode ver nesta microfotografia o retículo endoplasmático rugoso era abundante com as suas cisternas alongadas e finas observando-se em continuidade com cisternas dilatadas de retículo endoplasmático liso. As mitocôndrias apresentavam matriz pouco densa em electrões, cristas pouco desenvolvidas e áreas menos densas em electrões com fibrilas de DNA. Os dictiossomas eram formados por quatro a cinco cisternas empilhadas,

em cujas extremidades se observavam numerosas pequenas vesículas. O tamanho destas parecia crescer à medida que se afastavam dos dictiossomas. Além destas vesículas observavam-se também pequenos vacúolos no citoplasma. Neste estado da microsporogénese, os plastídios iniciavam um estado de degenerescência caracterizado pela perda da inicial regularidade da disposição dos túbulos na estrutura presente no estroma destes organelos. A observação desta estrutura, segundo vários ângulos de corte, permite admitir que os túbulos eram ondulados, pois obtiveram-se figuras em forma de oito e em anel, como se pode ver nas Figs. 89 e 90a. Na periferia deste agregado tubular observaram-se glóbulos osmiofílicos e a rodear todo este conjunto notou-se a presença de um sistema membranoso constituído por lamelas paralelas e em disposição concêntrica. Em várias imagens pôde observar-se continuidade entre as lamelas da estrutura tubular e as membranas que a envolviam.

O sistema lamelar, presente no estroma dos plastídios, era bastante compacto enquanto que por vezes possuía cisternas dilatadas observando-se alguns plastídios em comunicação com vacúolos levando a admitir que, possivelmente, estes se formaram a partir da cisterna dilatada do invólucro plastidial bem como das cisternas, do sistema membranoso descrito, que surgiam dilatadas (Fig.89).

No estado de grão de pólen não se observavam as células do tapete, que possuíam o sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso, visualizando-se apenas restos destas células como resultado da sua degenerescência (Fig.90b). As células, que constituíam o tapete neste estado de grão de pólen, assemelhavam-se às células do tapete amebóide pois as suas paredes, em alguns locais, viam-se perto do grão de pólen (Fig.88). Entre o plasmalema destas células do tapete e a parede observavam-se corpos densos em electrões, semelhantes aos orbículos descritos nas células do tapete no início da microsporogénese e que eram os precursores da esporopolenina.

5.3-"Pollenkitt" e trifinas

A rodear externamente a parede do grão de pólen observaram-se alguns glóbulos osmiofílicos, que se tem admitido serem carotenóides que são libertados no lóculo da antera no estado de grão de pólen. Estes corpos mais ou menos esféricos, semelhantes aos orbículos, mas de maiores dimensões, foram observados ao microscópio electrónico de transmissão (Fig.90a) e ao microscópio electrónico de varrimento (Fig.91). Dada a sua morfologia parecem corresponder às formações descritas por Heslop-Harrison (1968c,d) e Heslop-Harrison & Dickinson (1969) que são constituídas por substâncias lipídicas contendo carotenóides e que aqueles autores designaram por "pollenkitt".

Além destes corpos esféricos observaram-se, também, restos das células do tapete (Figs.91 e 92) que se depositaram ao redor dos grãos de pólen. Nas cavidades da sexina, ou seja, no espaço compreendido entre as báculas e o tecto acumulou-se uma substância homogénea,provavelmente derivada das células do tapete, durante a fase de maturação do grão de pólen (Fig.92). Este material bem como uma fina camada,que se depositou na superfície exterior do tecto, parecem ser polissacarídeos pois deram reacção positiva ao teste de Thièry (Fig.93). Ambos os produtos resultaram das células do tapete que sofreram autólise sendo frequentemente designados por trifinas, contendo polissacarídeos e lípidos.

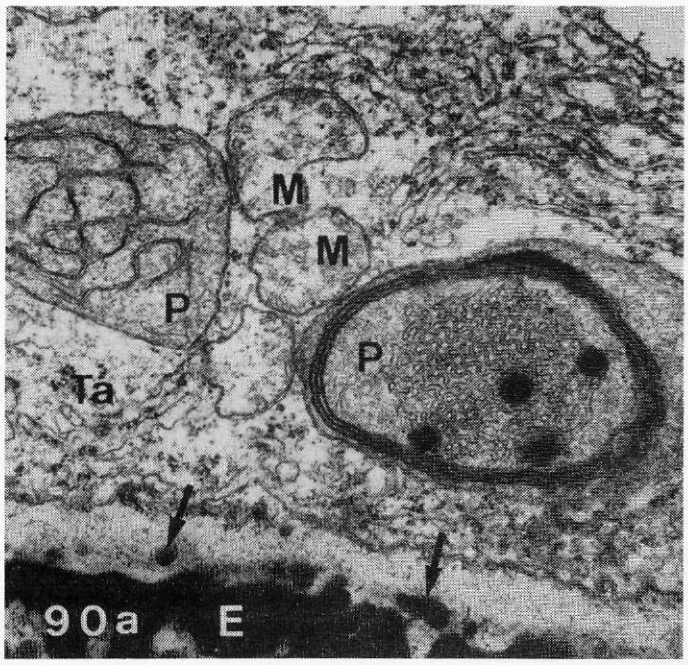
Fig.90a- Célula do tapete (Ta) com plastídios (P) e no estroma observando-se túbulos ondulados e também em forma de oito ou anel. Notar a presença de corpos escuros (setas), junto à exina. M-mitocôndria. 24 000 X.

Fig.90b- A rodear o grão de pólen observam-se os dois tipos de células do tapete (Ta). 10 000 X.

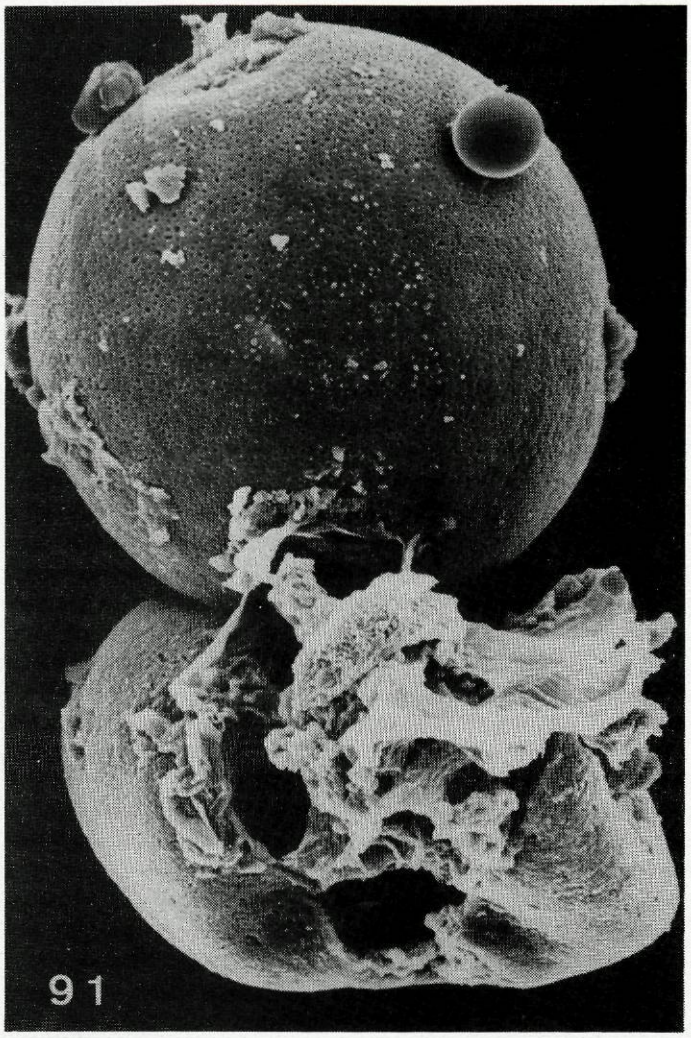
Fig.91 - Grão de pólen observado ao SEM vendo-se, ao redor da sua parede, restos das células do tapete e um corpo esferoidal. 1 700 X.

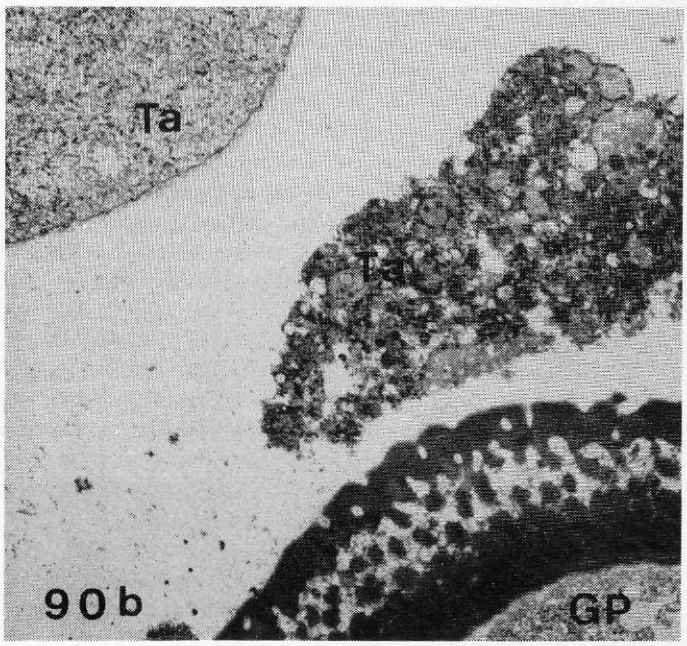
Fig.92 - Restos das células do tapete são visíveis à volta do grão de pólen e nas cavidades da sexina (setas). E-exina, Te-tecto. 24 000 X.

Fig.93 - Reacção positiva ao teste de Thièry ao nível de uma camada fina exterior ao tecto (Te) e em todo o material que se depositou nas cavidades da sexina (setas). In--intina, M-mitocôndria. 18 000 X.

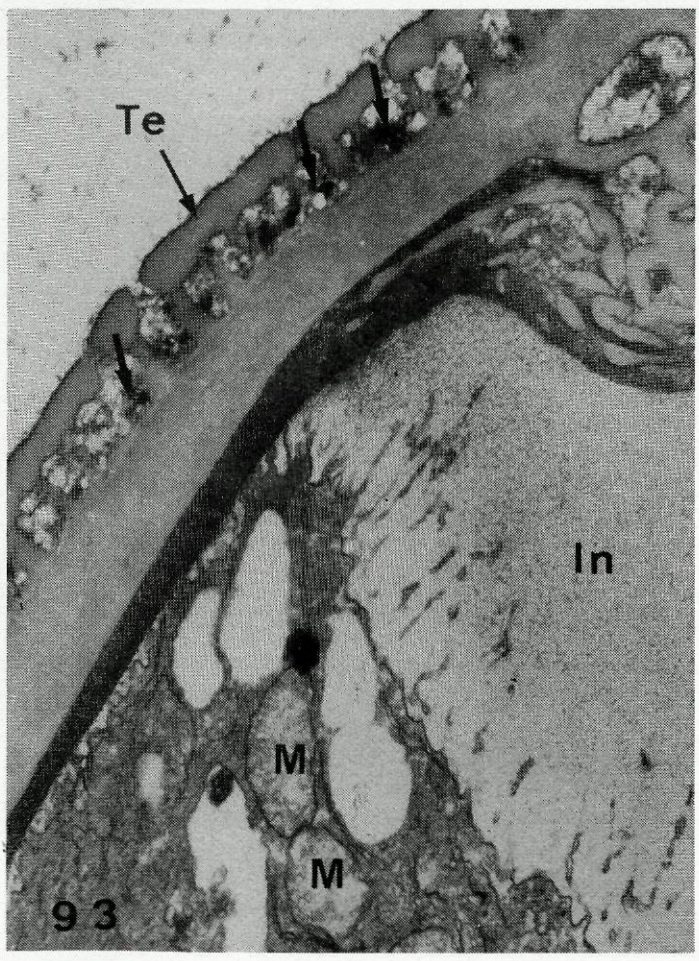


90a

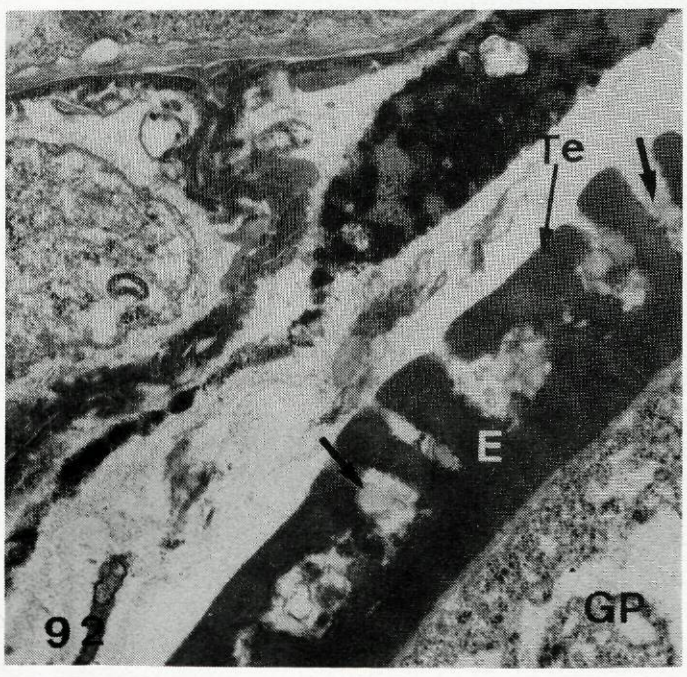

91



90b



93



92

6 - Microsporogénese "in vitro"

6.1 - Introdução

A microsporogénese "in vitro" não está descrita na literatura da especialidade. Há muito tempo que a cultura de células mães tem vindo a ser experimentada (Shimakura, 1934; Yasui,1952; Garot et al. 1968). Alguns destes autores verificaram que a solução de sacarose era mais eficiente, para a cultura de meiócitos, que um meio completo constituído por vários sais. Shimakura (1934) além da sacarose ensaiou o meio de Ringer e não conseguiu com este meio obter a continuação da meiose. Este autor verificou que as soluções de sacarose, mais ou menos isotónicas relativamente às células mães, permitiam o desenrolar da meiose em algumas espécies. Outros autores fizeram o estudo da meiose "in vitro" desde a profase I até à telofase II (Ito & Stern, 1967), utilizando o meio modificado de White (1963). Ryan (1980) seguiu também a meiose "in vitro" utilizando meiócitos de Iris spuria L., Allium triquetrum L. e Tradescantia flumenensis Vell.. Este autor experimentou o meio de White mas obteve melhores resultados com soluções de sacarose, no entanto admitiu que podem existir espécies que não sobrevivem na solução de sacarose e que necessitem de meio definida mais complexo para que se realize a meiose.

Takegami e colaboradores (1981) isolaram e inocularam microsporócitos de algumas espécies de Liliaceae durante a fase pré-meiótica e seguiram a meiose "in vitro". O meio que utilizaram era constituído por vários sais inorgânicos, vitaminas e aminoácidos.

Neste trabalho ensaiou-se a microsporogénese "in vitro" de Cucumis sativus L., a partir de células no fim da meiose. Entendeu-se que se a técnica tivesse êxito seria de interesse, pois iria facilitar o estudo da acção de diferentes agentes químicos

na microsporogénese uma vez que estas células, quando em cultura, ficam em contacto íntimo com o composto a estudar. Aliás, desde longa data se sabe que a técnica de cultura de órgãos, tecidos ou de células de plantas, permite estudar problemas de fisiologia que de outro modo seriam de abordagem praticamente impossível.

6.2 - Meio usado na indução da microsporogénese e seu estudo

Flores de Cucumis sativus L. foram dissecadas, as anteras removidas e colocadas em caixas de petri que continham o meio nutriente solidificado com agar. No presente trabalho utilizou-se o meio de Murashige & Skoog (1962), sem reguladores de crescimento, como indicado no Quadro 1 do capítulo de Material e Métodos.

As anteras foram cultivadas em regime de 12 horas luz/ 12 horas obscuridade e à temperatura de 27°C.

Após 24 horas as células, que tinham sido inoculadas no fim da meiose, estavam em fase de tétrada (Fig.94). Os organelos citoplasmáticos apresentavam formas e modificações idênticas às do estado de tétrada de uma microsporogénese na planta intacta. Assim as mitocôndrias tinham aumentado de dimensões e apresentavam formas irregulares, com enclaves citoplasmáticos. Os organelos presentes, nas células do tapete, também não haviam sofrido modificações, produzindo os orbículos (precursores da esporopolenina), sendo de notar, igualmente, o aparecimento nos plastídios da estrutura complexa de túbulos semelhante ao corpo prolamelar dos estioplastos. O processo de síntese da parede do grão de pólen não sofria alteração, iniciando-se no estado de tétrada.

Após 48 horas de inoculação as tétradas, anteriormente referidas, evoluiam para micrósporos ficando estes sem camada de calose a envolvê-los. Estes micrósporos apresentavam o va-

cuoma bastante desenvolvido e a parede de exina totalmente sintetizada (Fig.95). No citoplasma observavam-se mitocôndrias de grandes dimensões englobando vários enclaves citoplasmáticos, onde se podiam ver ribossomas livres ou associados em hélice (Fig.95), perfis de retículo endoplasmático rugoso e glóbulos lipídicos ou esferossomas. Os plastídios eram proplastídios, apresentando algumas lamelas isoladas. No citoplasma também se observavam perfis de retículo endoplasmático rugoso e dictiossomas, constituídos por vários sáculos empilhados e rodeados por algumas pequenas vesículas dispersas.

Ao fim de 72 horas (última amostra colhida) os micrósporos surgiam em divisão nuclear e em fase de redução do vacuoma, observando-se no citoplasma mitocôndrias de grandes dimensões e formas bizarras e concomitantemente formas em divisão, pelo que eram comuns e abundantes perfis arredondados e de pequenas dimensões (Fig.96). A camada de intina também se depositava tendo-se observado perfis de retículo endoplasmático rugoso e dictiossomas, nas proximidades do plasmalema. Os organelos das células do tapete apresentavam modificações ultrastruturais características deste estado da microsporogénese.

A rodear externamente a parede do grão de pólen, totalmente formada, visualizaram-se corpos esferoidais, electronicamente densos ("pollenkitt"), e restos de células do tapete (Fig. 97, setas).

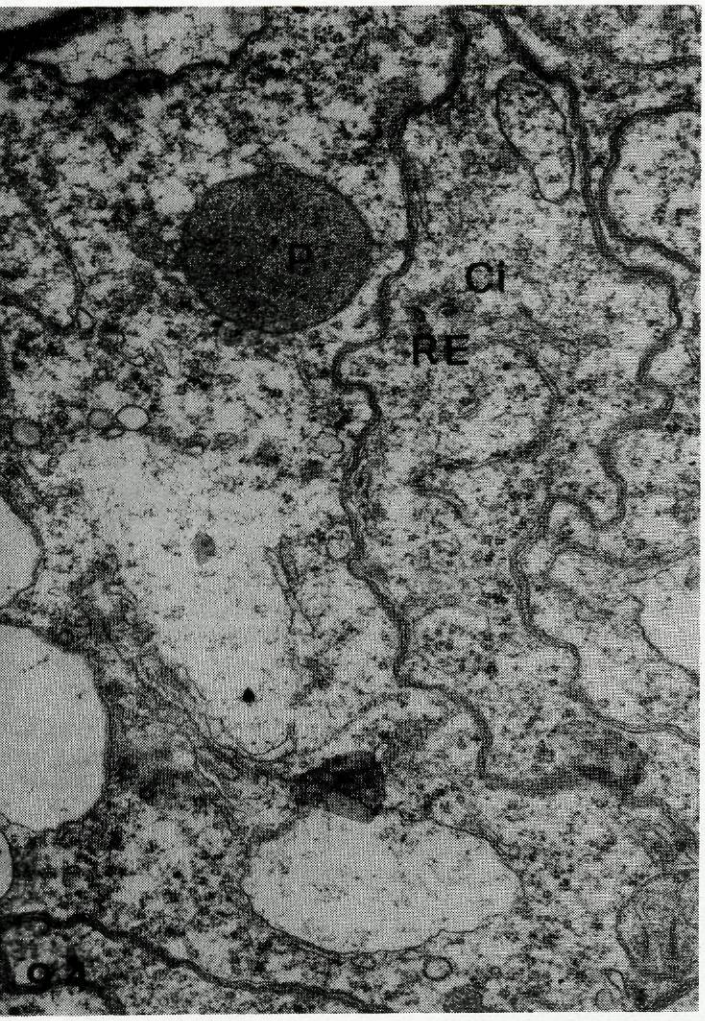
Microsporogénese de Cucumis sativus L. "in vitro"

Fig.94 - Tétrada jovem obtida de célula mãe após 24 horas em meio de cultura. P-plastídio, Ci-enclave citoplasmático, RE-retículo endoplasmático. 24 000 X.

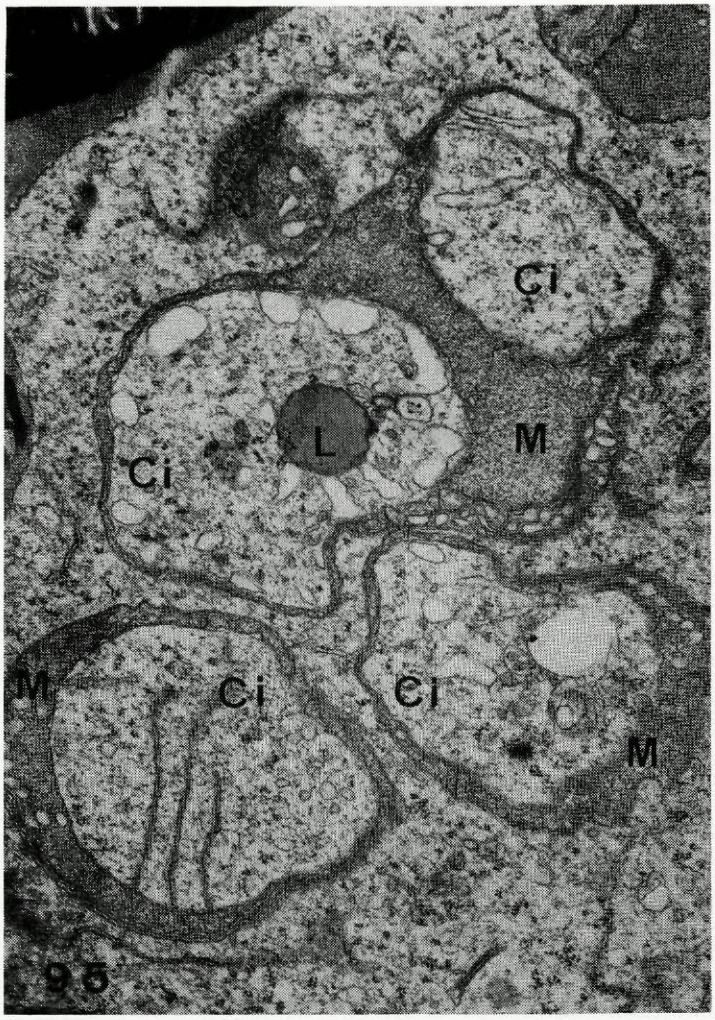
Fig.95 - Micrósporo vacuolizado 48 horas após as anteras serem colocadas em meio de cultura. M-mitocôndria, Ci-enclave citoplasmático, L-esferossoma. 21 000 X.

Fig.96 - Micrósporo em regressão do sistema vacuolar, após 72 horas de permanência no meio de cultura, observando-se a divisão das mitocôndrias (M) e dictiossomas muito activos. P-plastídio, Ci-enclave citoplasmático, RE-retículo endoplasmático. 24 000 X.

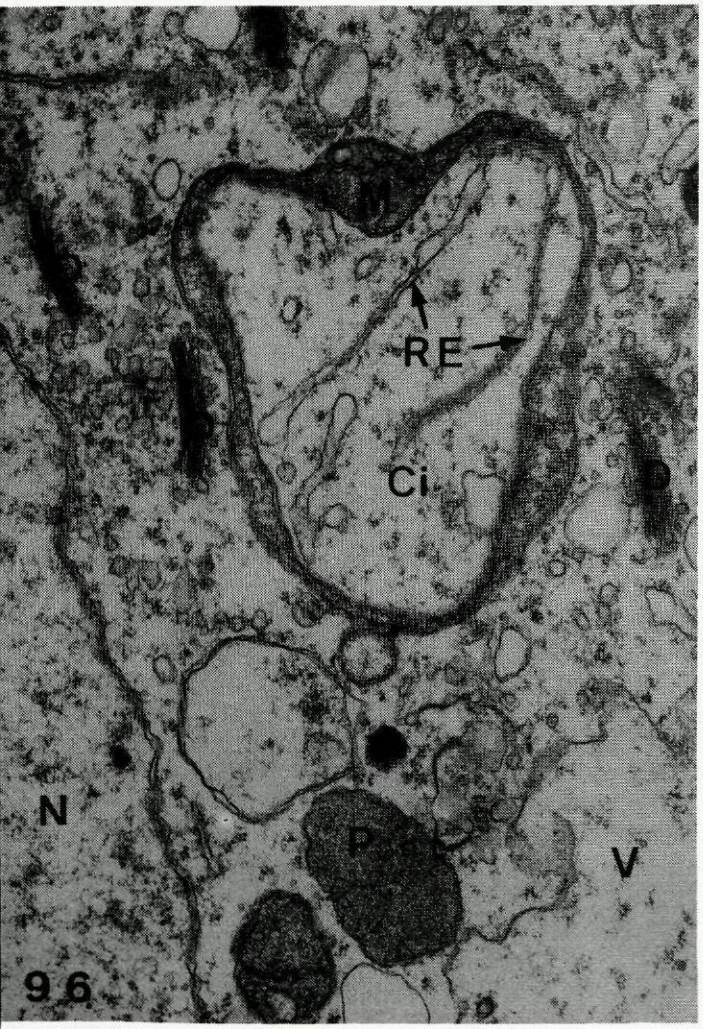
Fig.97 - No canto superior direito vê-se porção de um micrósporo em redução do sistema vacuolar, rodeado de células do tapete observando-se corpos escuros esferoidais e restos das células do tapete (setas). M-mitocôndria,P--plastídio. 14 000 X.



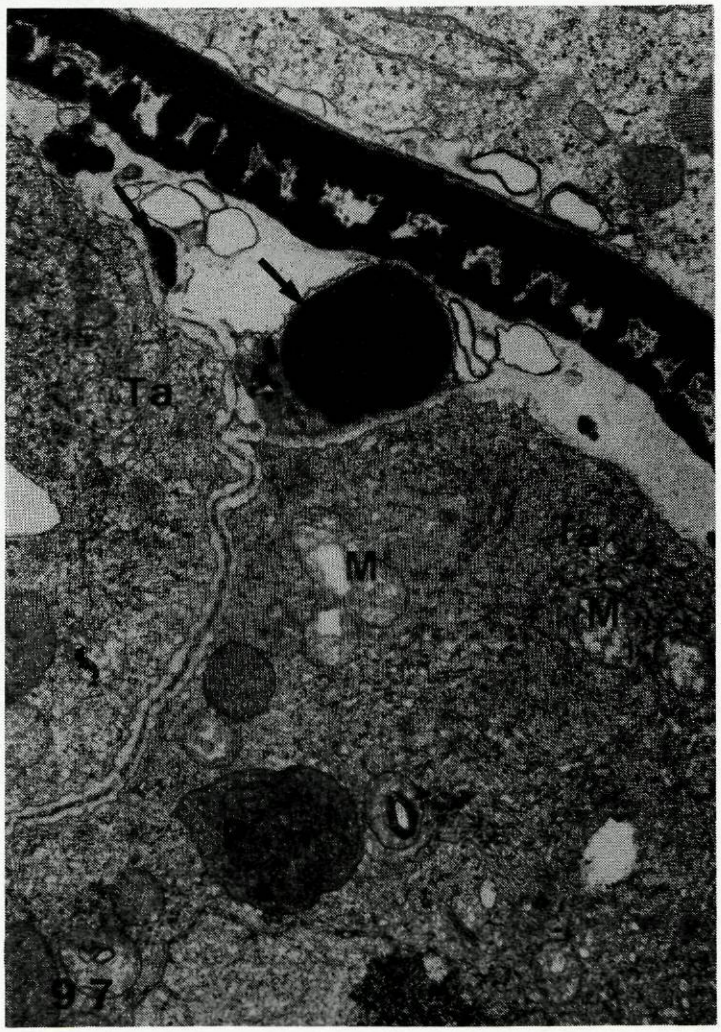
94



95



96



97

7 - Localização citoquímica a nível ultrastrutural

Para execução de trabalhos de citoquímica procurou-se saber, em primeiro lugar, se se devia fazer um pré-fixação antes da incubação. No caso do fixador não inactivar a enzima foi necessário ter em consideração vários factores nomeadamente o tipo de fixador e sua concentração, tempo e temperatura de fixação. O material a incubar teve de ser de pequenas dimensões, para que a enzima penetrasse rapidamente.

7.1 - Enzimas hidrolíticas

As observações ultrastruturais da microsporogénese apontavam para uma diferenciação do sistema vacuolar durante o estado de micrósporo, após dissolução da camada de calose. Os vacúolos aumentavam progessivamente de volume até se atingir o estado de micrósporo vacuolizado, caracterizado por possuir um grande vacúolo, ficando o citoplasma reduzido a uma pequena camada junto à parede do grão de pólen. Após esta fase, assistiu-se a uma redução do sistema vacuolar e ao aparecimento de elevado número de organelos citoplasmáticos.

Com a finalidade de se estudar a actividade metabólica, presente nos micrósporos, foram ensaiadas técnicas para localização citoquímica a nível ultrastrutural de algumas enzimas hidrolíticas, seleccionadas pela sua possível interveniência nesse mecanismo, como a fosfátase ácida (EC 3.1.3.2), a adenosina trifosfátase (EC 3.6.1.3) e a fosfátase alcalina (EC 3.1.3.1).

O estudo foi realizado em pequenos fragmentos de anteras, que foram pré-fixados pelo glutaraldeído durante 1 hora, visto saber-se que estas enzimas não eram inactivadas por este fixador. O material foi mantido nos meios de incubação durante 2 a 4 horas, sendo posteriormente pós-fixado em tetróxido de ósmio.

As experiências testemunhas foram realizadas usando o meio de incubação sem substrato ou o meio completo adicionado de um inibidor, o fluoreto de sódio 10 mM.

7.1.1 - Fosfátase ácida

Pelo facto de existirem dados referentes à localização da actividade de fosfátase ácida no grão de pólen (Horvat, 1969 ; Knox & Heslop-Harrison, 1971 ; Ahokas, 1975; Vithanage & Knox , 1976 ; Nakamura, 1979) pensou-se ensaiar a localização desta enzima por via citoquímica, procurando assim estudar a sua possível presença durante a microsporogénese de Cucumis sativus L. .

A localização da actividade de fosfátase ácida foi efectuada pelo método de Gomori, modificado por Miller & Palade (1964), utilizando como substrato o β -glicerofosfato de sódio a pH 5,0. Este composto é hidrolizado por uma enzima a pH 5,0 e os iões fosfato libertados são capturados pelos iões de chumbo, presentes no meio de incubação, produzindo o fosfato de chumbo, que é insolúvel.

A localização ultrastrutural foi ensaiada em anteras a partir do estado de tétrada.

Observações ultrastruturais do material incubado mostraram, no estado de tétrada, a existência de produtos de reacção electronicamente densos na parede em formação, nos dictiossomas e vesículas de secreção (Fig.98). No estado de micrósporo, a tornar-se vacuolizado, os depósitos negros aumentavam em número surgindo na intina junto ao plasmalema, nos dictiossomas e suas vesículas (Fig.99).

Nas células do tapete apenas os dictiossomas e vacúolos apresentavam depósitos electronodensos (Fig.100).

No estado de grão de pólen, assim como nas preparações testemunhas (Fig.101), não foram detectados produtos de reacção.

7.1.2 - Adenosina trifosfátase (ATPase)

Na literatura da especialidade destacam-se os trabalhos de Rowley e colaboradores (1973) sobre a localização ultrastrutural da adenosina trifosfátase, admitindo que os grãos de pólen recebem iões do lóculo da antera e os acumulam no vacuoma por transporte activo.

A localização citoquímica da actividade da adenosina trifosfátase, foi efectuada pelo método de Gomori (Sauter, 1977) usando como substrato o ATP dissódico em tampão acetato a pH 5,0 .

Observações ultrastruturais, de micrósporos incubados, mostravam produtos de reacção densos em electrões depositados ao longo do plasmalema e no interior dos vacúolos (Fig.102).

As células do tapete apresentavam os produtos de reacção localizados também no interior dos vacúolos.

No material que serviu de testemunho, não se detectou marcação positiva (Fig.103).

7.1.3 - Fosfátase alcalina

No decorrer do estudo citoquímico de algumas hidrólases efectuou-se a localização da actividade da fosfátase alcalina, que é uma glicoproteína de alto peso molecular que hidrolisa metabolitos fosforilados do mesmo modo que a fosfátase ácida somente a pH alcalino.

Esta enzima tem sido frequentemente referida como ausente no grão de pólen. No entanto, alguns autores (Palumbo , 1953;

Lewis et al., 1967; Martin, 1968) admitiram a existência de baixos níveis de actividade de fosfátase alcalina no grão de pólen, homogeneamente distribuidos através de todo o citoplasma (Górska-Brylass, 1965).

Para o presente estudo realizou-se uma incubação de fragmentos de anteras num meio contendo β-glicerofosfato de sódio, na presença de $CaCl_2$ a pH 9,0, segundo a técnica de Dickson (1978).

No material incubado observou-se marcação positiva em todas as membranas dos organelos citoplasmáticos. No plasmalema das células, quer do estado de tétrada (Fig.104) quer do micrósporo em desenvolvimento (Fig.105), não se observou marcação positiva. Nas células do tapete também se verificou a presença de depósitos electronodensos ao nível das membranas dos invólucros dos organelos e também nas cisternas dos dictiossomas (Fig.106).

No material incubado com NaF (testemunho), não se observaram depósitos negros resultantes de reacção enzimática (Fig.107).

7.2 - Enzimas respiratórias

Devido ao facto de as mitocôndrias apresentarem a sua morfologia profundamente modificada, em alguns estados da microsporogénese, pensou-se que isso poderia levar a alterações da sua actividade metabólica.

Assim, pareceu de interesse proceder à localização citoquímica, a nível ultrastrutural, de enzimas respiratórias como a citocromo-oxídase (EC 1.9.3.1) e a desidrogénase succínica (EC 1.3.99.1).

7.2.1 - Citocromo-oxídase

A localização citoquímica a nível ultrastrutural da actividade da citocromo-oxídase fez-se pelo método de Opik (1975), utilizando como substrato o 3,3'-diaminobenzidina(DAB).

Localização citoquímica de enzimas hidrolíticas

Fig.98 - Fosfátase ácida. Célula em estado de tétrada observando-se depósitos densos sobre os pequenos vacúolos e dictiossomas (D). Ci-enclave citoplasmático, P-plastídio, C-calose. 20 700 X.

Fig.99 - Fosfátase ácida. Célula de micrósporo jovem vendo-se depósitos negros no plasmalema (p), na intina (In) e nos dictiossomas (D). Po-poro. 16 800 X.

Fig.100- Fosfátase ácida. Célula do tapete mostrando depósitos densos, localizados nos vacúolos (V). M-mitocôndria. 16 000 X.

Fig.101- Aspecto de micrósporo jovem, de material testemunha das observações representadas nas Figs. 98, 99 e 100, obtido por inactivação da actividade enzimática por adição do inibidor (NaF) ao meio de incubação. Na imagem não se observam depósitos densos, comparáveis aos obtidos nas experiências de localização enzimática. M-mitocôndria, D-dictiossoma. 13 800 X.

Fig.102- ATPase. Micrósporo vacuolizado observando-se depósitos negros sobre o plasmalema e vacúolos (V). E-exina. 12 000 X.

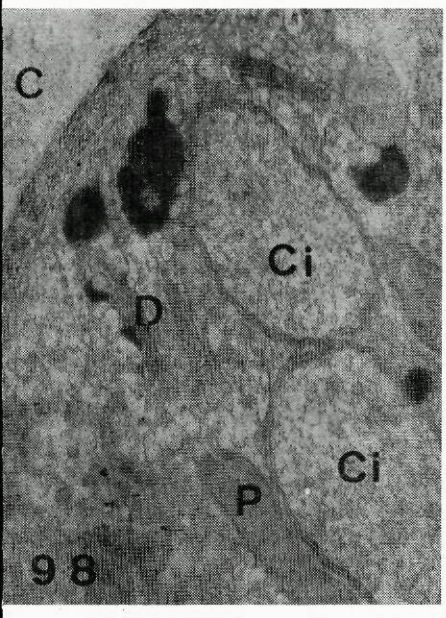
Fig.103- Porção de micrósporo vacuolizado, de material testemunha da actividade de ATPase. A inibição foi obtida por adição de NaF. Na imagem não se observam depósitos negros como os obtidos na Fig.102. 14 400 X.

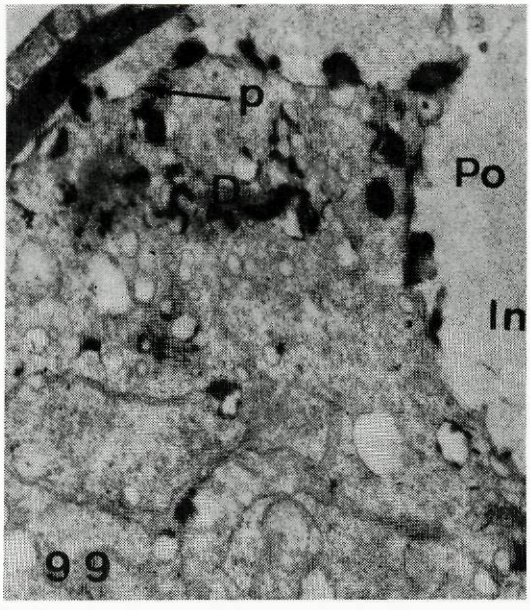
Fig.104- Fosfátase alcalina. Célula no estado de tétrada jovem observando-se depósitos densos no retículo endoplasmático, mitocôndrias (M) e plastídios (P). 21 600 X.

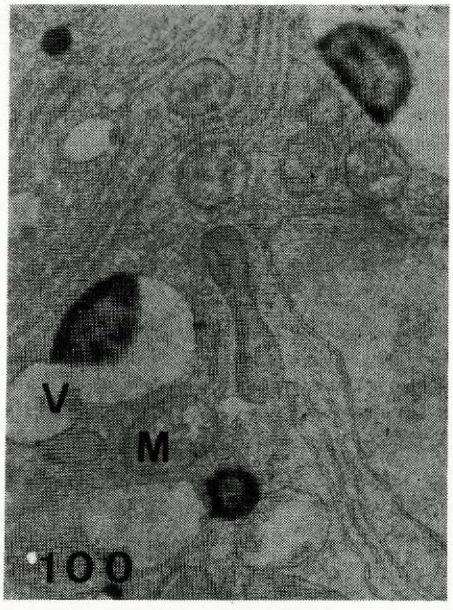
Fig.105- Fosfátase alcalina. Porção de micrósporo jovem observando-se igualmente depósitos nos vários organelos citoplasmáticos.M-mitocôndria,P-plastídio. 12 000 X.

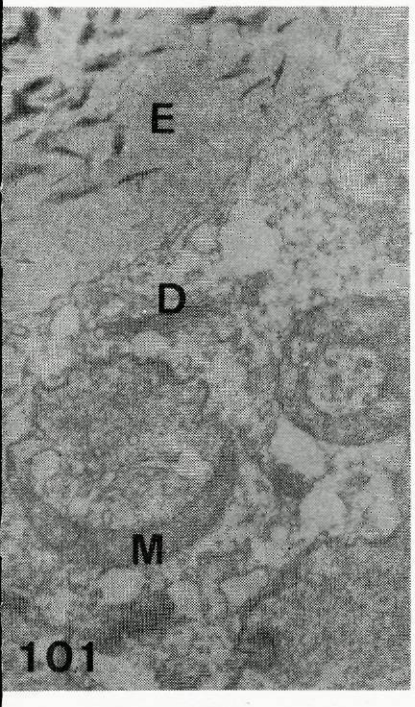
Fig.106- Fosfátase alcalina. Célula do tapete onde se vêem depósitos negros sobre as mitocôndrias (M), retículo endoplasmático (RE) e invólucro nuclear. N-núcleo.14 400 X.

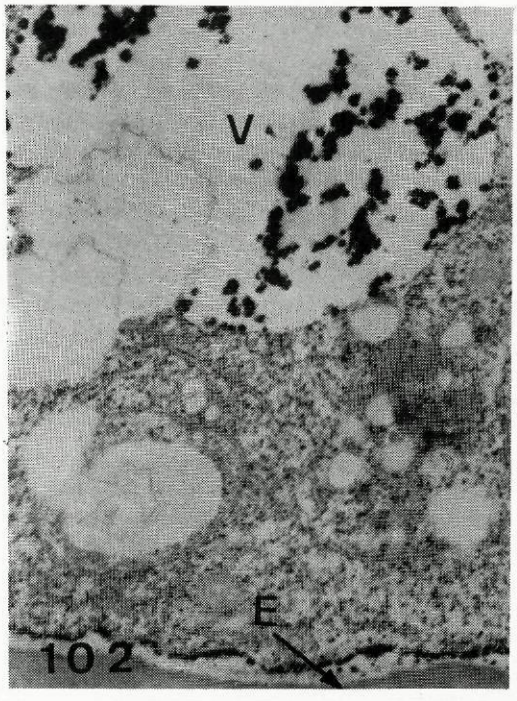
Fig.107- Aspecto de micrósporo jovem, de material testemunha das observações representadas nas Figs. 104, 105 e 106. Na imagem não se observam depósitos negros como nas experiências de localização enzimática.M-mitocôndria. 24 000 X.

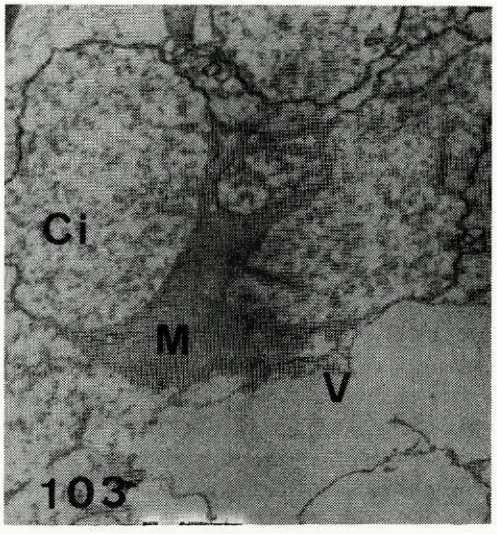

C
Ci
D
Ci
P
98

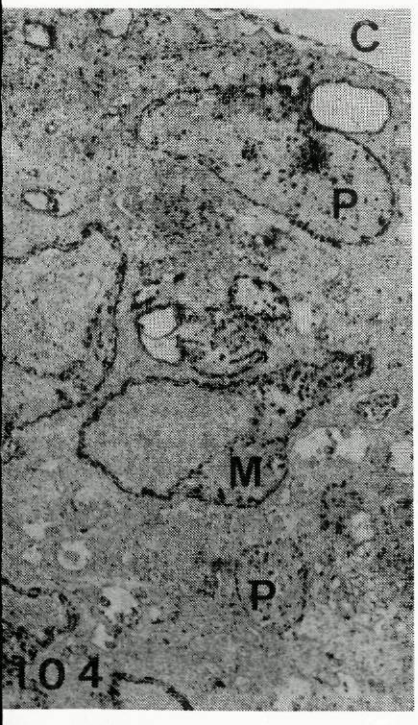

P
Po
In
99

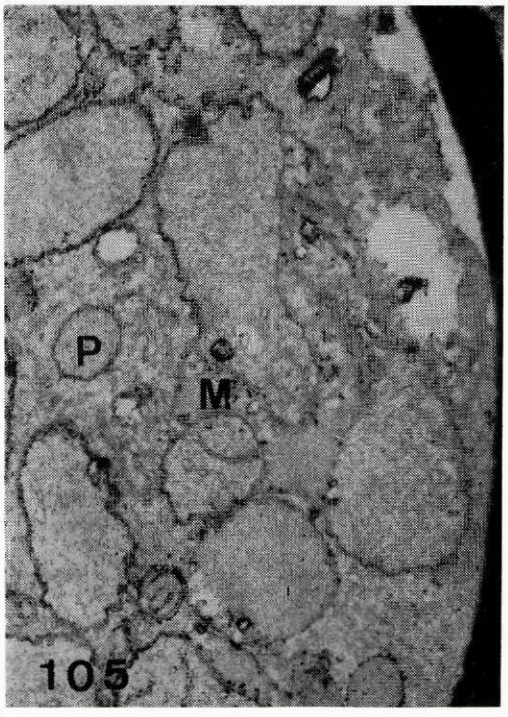

V
M
100

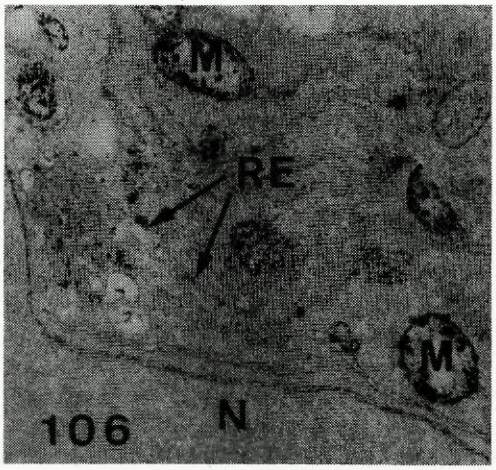

E
D
M
101

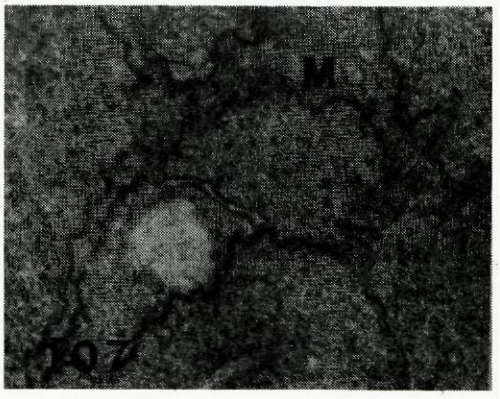

V
E
102


Ci
M
V
103


C
P
M
P
104


P
M
105


M
RE
M
106
N


M
107

Este estudo foi realizado em material pré-fixado em glutaraldeído, dada a tolerância da enzima a este fixador. A incubação efectuou-se na obscuridade e a 27°C, durante 2 a 4 horas. O material foi posteriormente pós-fixado em tetróxido de ósmio. Paralelamente procedeu-se à realização dos testemunhos utilizando dois meios, um sem o substrato (DAB) e outro em que se adicionou ao meio completo o cianeto de potássio 0,01 M (Chesnoy, 1974).

As observações ultrastruturais incidiram nos estados da microsporogénese em que normalmente se observavam as mitocôndrias com formas bizarras, ou seja, o estado de tétrada e o estado de micrósporo em desenvolvimento. Nestes estados formaram-se depósitos electronicamente densos nas mitocôndrias, mais precisamente nas cristas e no invólucro mitocondrial (Figs.108 e 109). Como se pode ver nas microfotografias não se observaram depósitos negros, como produtos de reacção, nas membranas mitocondriais que rodeiam o enclave citoplasmático.

Nas mitocôndrias das células do tapete também se formaram depósitos electronicamente densos (Fig.110).

No material em que se adicionou o cianeto de potássio não se detectaram depósitos como produtos de reacção (Fig.111), avaliando-se assim a sensibilidade da citocromo-oxídase ao cianeto.

Todas as observações foram efectuadas em cortes não contrastados.

7.2.2 - Desidrogénase succínica

O estudo da localização citoquímica da actividade da desidrogénase succínica realizou-se em material não fixado, visto saber-se que tanto o glutaraldeído como o formaldeído inibem actividade desta enzima.

O meio de incubação foi preparado de acordo com Kerpel-Fronius & Hajós (1968) utilizando, como aceitador de electrões, o

ferricianeto. Este composto é reduzido originando um produto insolúvel e opaco aos electrões, o ferrocianeto de cobre (Cu^{3+}) -castanho de Hatchett, $Cu_2Fe\ (CN)_6\ .\ 7\ H_2O$.

A incubação processou-se à temperatura ambiente, no tempo máximo de 5 horas. Posteriormente o material foi fixado em glutaraldeído e pós-fixado em tetróxido de ósmio.

Os testemunhos foram obtidos incubando pequenos fragmentos de anteras no meio sem substrato ou adicionando ao meio completo o inibidor desta enzima, o malonato de sódio na concentração de 140 mM (Ekés, 1970).

Para uma melhor visualização dos depósitos electronicamente densos, resultantes da reacção positiva, os cortes foram observados sem contraste pelo acetato de uranilo e citrato de chumbo.

As observações ultrastruturais de material incubado mostravam a presença de depósitos electronodensos nas cristas assim como no invólucro mitocondrial (Fig.112). As mitocôndrias presentes nas células do tapete também possuíam depósitos negros, resultantes da reacção positiva (Fig.113).

No material incubado com o malonato de sódio não se observavam depósitos electronodensos resultantes da reacção enzimática.

Localização citoquímica da citocromo-oxídase
(Cortes não contrastados)

Fig.108 - Tétrada jovem tendo-se efectuado a incubação após pré fixação com glutaraldeído. Os depósitos densos localizam-se exclusivamente nas cristas e invólucros mitocondriais. M-mitocôndria, Ci-enclave citoplasmático, C-calose. 16 800 X.

Fig.109 - Célula em estado de micrósporo jovem e igualmente se vêem depósitos densos nos invólucros e cristas mitocondriais. M-mitocôndria, Ci-enclave citoplasmático, V-vacúolo, E-exina. 10 000 X.

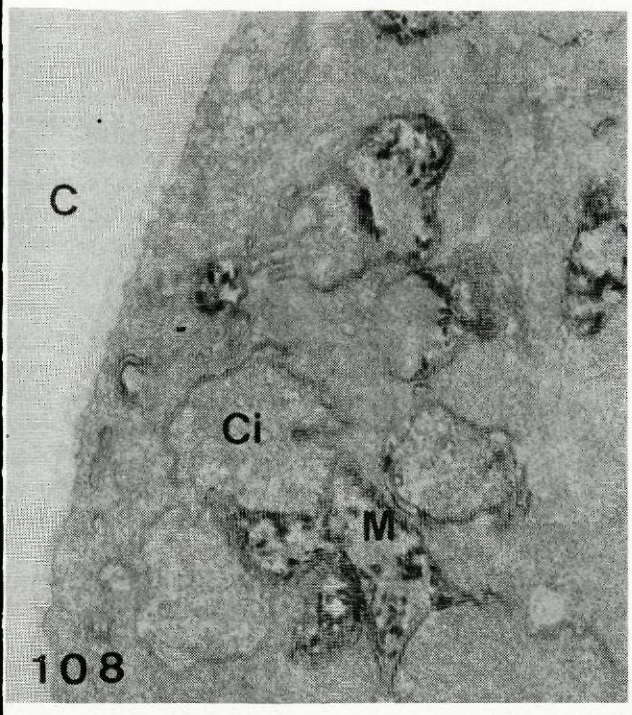
Fig.110 - Células do tapete observando-se apenas as mitocôndrias (M) com reacção positiva. 12 000 X.

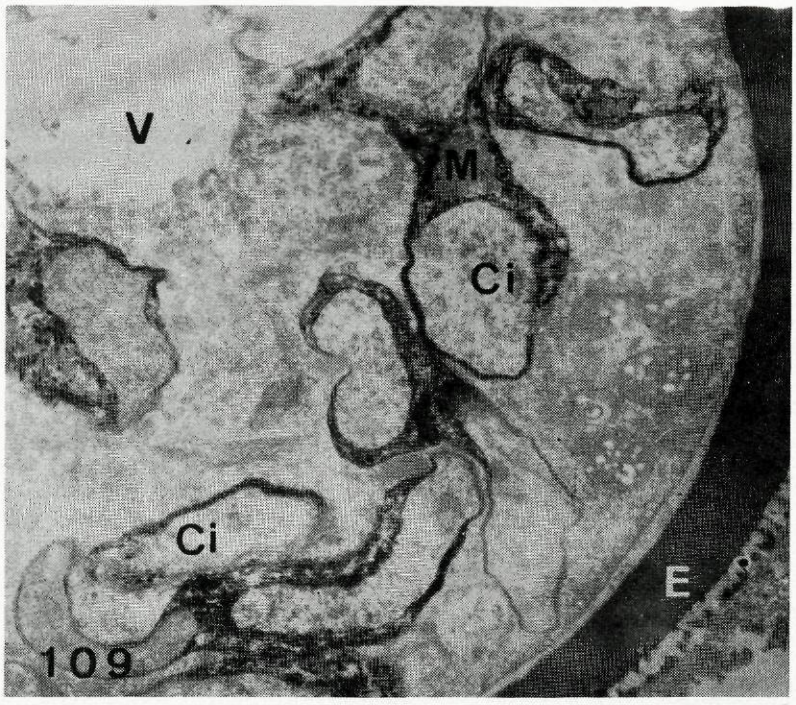
Fig.111 - Micrósporo jovem, de material testemunha, obtido por inactivação da actividade enzimática com o KCN. Na imagem não se observam depósitos densos, comparáveis aos obtidos nas experiências de localização enzimática. M-mitocôndria, E-exina. 19 200 X.

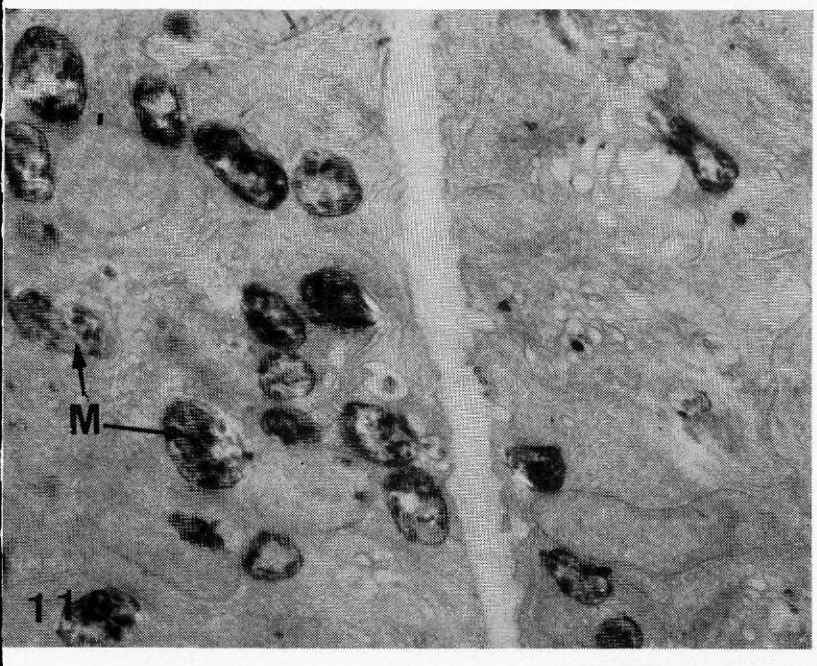
Localização citoquímica da desidrogénase succínica
(Cortes não contrastados)

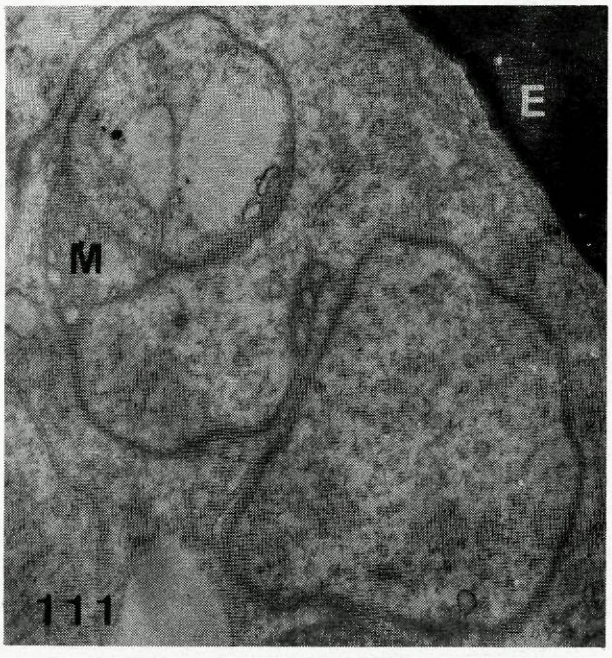
Fig.112 - Micrósporo jovem mostrando depósitos densos nas cristas e invólucro das mitocôndrias. A localização citoquímica desta enzima foi efectuada em material sem préfixação. M-mitocôndria, Ci-enclave citoplasmático. 28 800 X.

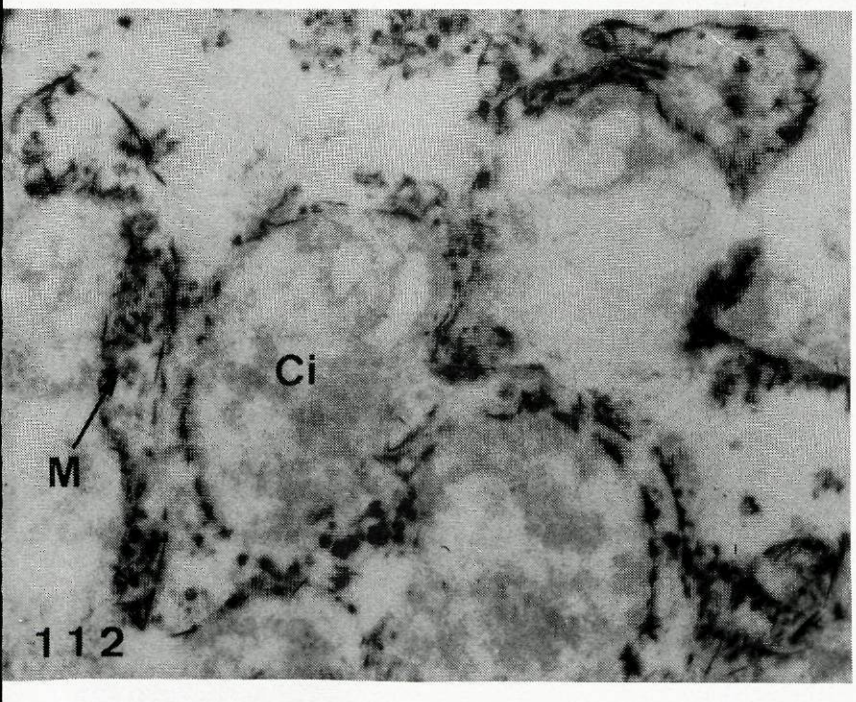
Fig.113 - Célula do tapete verificando-se igualmente depósitos escuros sobre as cristas e invólucros das mitocôndrias. M-mitocôndria. 20 800 X.


C
Ci
M
108


V
M
Ci
Ci
E
109


M
11


E
M
111


Ci
M
112


M
113

8 - Efeitos de agentes físicos na microsporogénese

Estudou-se o desenrolar da microsporogénese em condições de luz contínua e obscuridade. Pensou-se que estas condições pudessem afectar a formação e o desenvolvimento do grão de pólen e deu-se particular atenção às mitocôndrias, a fim de verificar se estes organelos reagiam a estes tratamentos.

8.1 - Luz contínua

A fim de estudar o efeito da luz contínua na microsporogénese colocaram-se plantas envasadas numa câmara à temperatura ambiente e sob luz contínua. Esta luz foi fornecida por uma bateria de lâmpadas de luz fluorescente "branca" que fornecia, ao nível da planta, cerca de 1 000 cd m^{-2}.

Colheram-se amostras ao fim de 2, 5, 9, 30 e 60 dias, para observação ao microscópio electrónico de transmissão.

Sob a acção da luz contínua a microsporogénese desenrolou-se normalmente. Contudo, os dictiossomas, tanto no estado de tétrada madura como no de micrósporo jovem (Fig.114), apresentavam-se em grande actividade, como parece poder inferir-se, devido ao aumento do número de vesículas a envolvê-los.

O ciclo mitocondrial processou-se normalmente, embora o sistema de cristas não fosse tão desenvolvido como na microsporogénese realizada em regime de luz e obscuridade. O núcleo do micrósporo dividiu-se, formando-se o grão de pólen jovem, e as mitocôndrias surgiam de pequenas dimensões e de forma mais ou menos arredondada. Os plastídios começavam a armazenar amido (Fig. 115).

Apreciou-se também o comportamento das células do tapete, durante a exposição das flores a diferentes períodos de luz contínua, e igualmente foram observados os dois tipos de células que constituem o tapete nestas anteras. Verificou-se que, nestas cé-

Tratamentos com luz contínua

Fig.114 - Micrósporo jovem mostrando dictiossomas (D) a produzirem bastantes vesículas (V). M-mitocôndria, Ci-enclave citoplasmático, P-plastídio, N-núcleo. 16 800 X.

Fig.115 - Grão de pólen jovem observando-se amido (A) nos plastídios (P). M-mitocôndria. 25 000 X.

Fig.116 - Célula do tapete onde se vê um plastídio (P) com vários sistemas de túbulos dispersos, em corte transversal (setas) e longitudinal (ponta de seta). M-mitocôndria, D-dictiossoma, N-núcleo. 42 000 X.

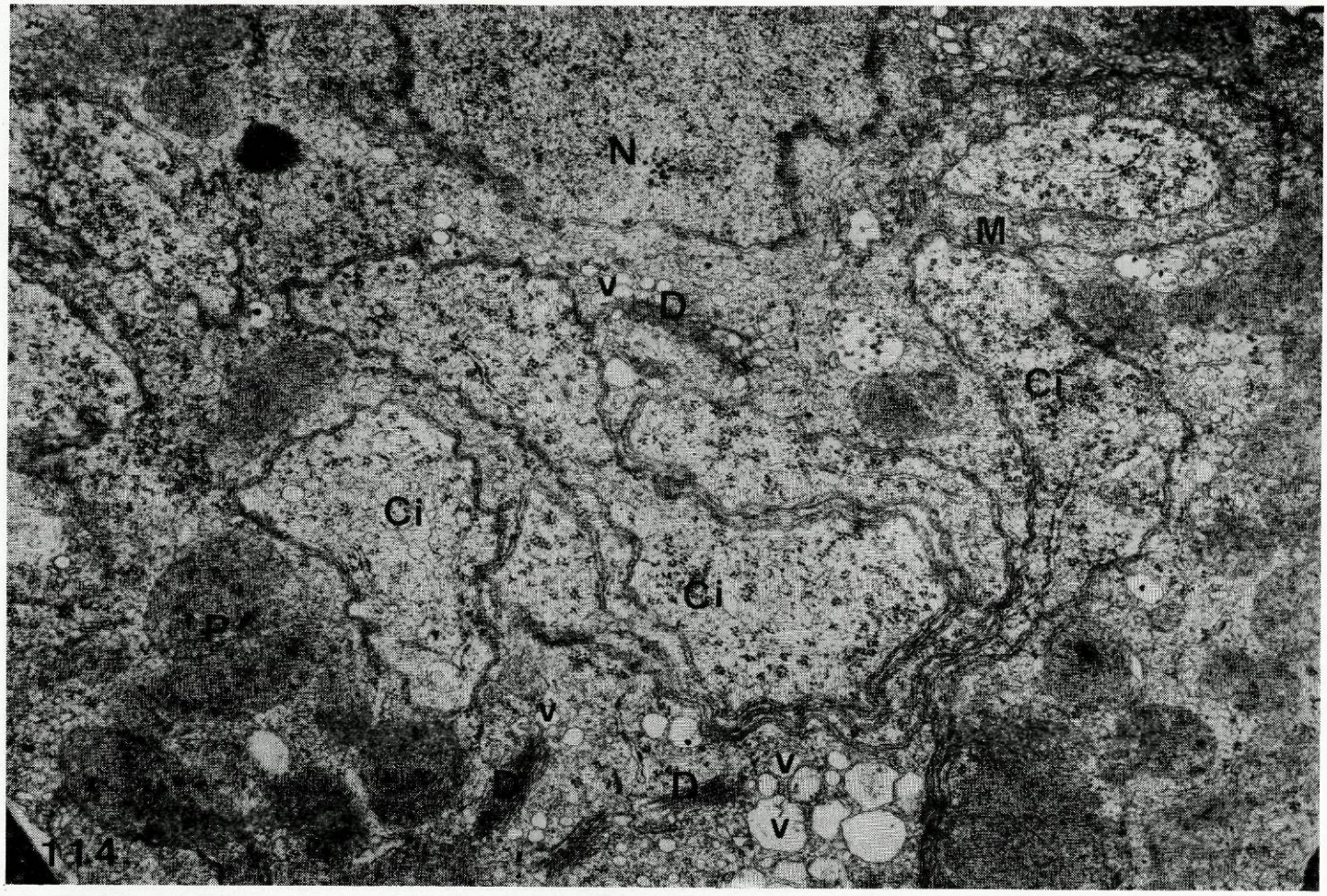


Fig. 14

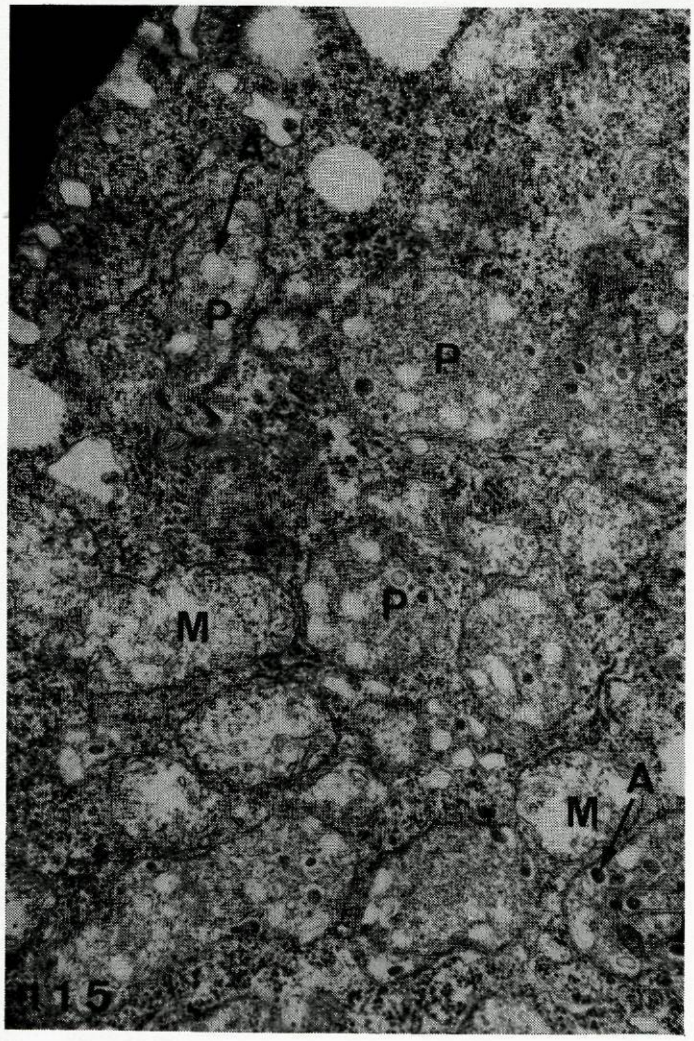


Fig. 15

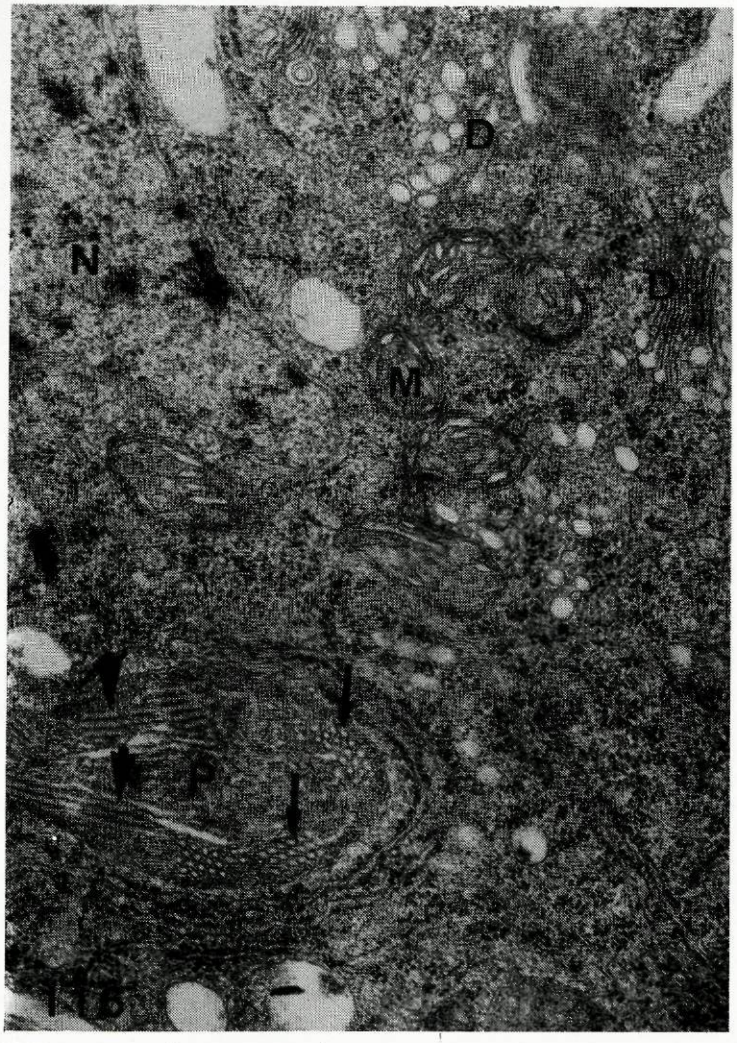


Fig. 16

lulas, o núcleo tinha a forma lobada e os plastídios não possuiam a estrutura complexa de túbulos organizados, pois observaram-se vários sistemas de túbulos no estroma, como se pode ver em corte transversal e longitudinal na Fig. 116. As mitocôndrias pareciam normais na forma e estrutura da matriz. Os dictiossomas eram constituídos por várias cisternas empilhadas e possuiam um número bastante elevado de vesículas nas suas proximidades.

8.2 - Obscuridade contínua

Com a finalidade de estudar o efeito da ausência de luz, na microsporogénese, plantas envasadas foram colocadas numa câmara escura à temperatura ambiente e durante um tempo máximo de 6 semanas, pois a partir desse tempo as plantas começaram a mostrar sintomas de senescência. Colheu-se material de 8 em 8 dias.

Ao fim dos primeiros 8 dias de tratamento, no micrósporo jovem (Fig.117) observaram-se mitocôndrias de matriz condensada com raras cristas e áreas menos densas em electrões com fibrilas de DNA. Estes organelos apresentavam as formas bizarras habituais, contendo enclaves citoplasmáticos. O retículo endoplasmático surgia nas proximidades do invólucro mitocondrial, e os seus perfis membranosos eram alongados e em disposição paralela. Verificou-se que apenas as membranas externas destes conjuntos paralelos possuíam ribossomas, observando-se estes perfeitamente alinhados.

No estado de grão de pólen tanto as células do tapete como as células polínicas possuíam cisternas dilatadas de retículo endoplasmático, com material escuro no interior (Fig.118).

Ao fim de seis semanas de tratamento, as alterações acentuaram-se ao nível da matriz mitocondrial e retículo endoplasmático.

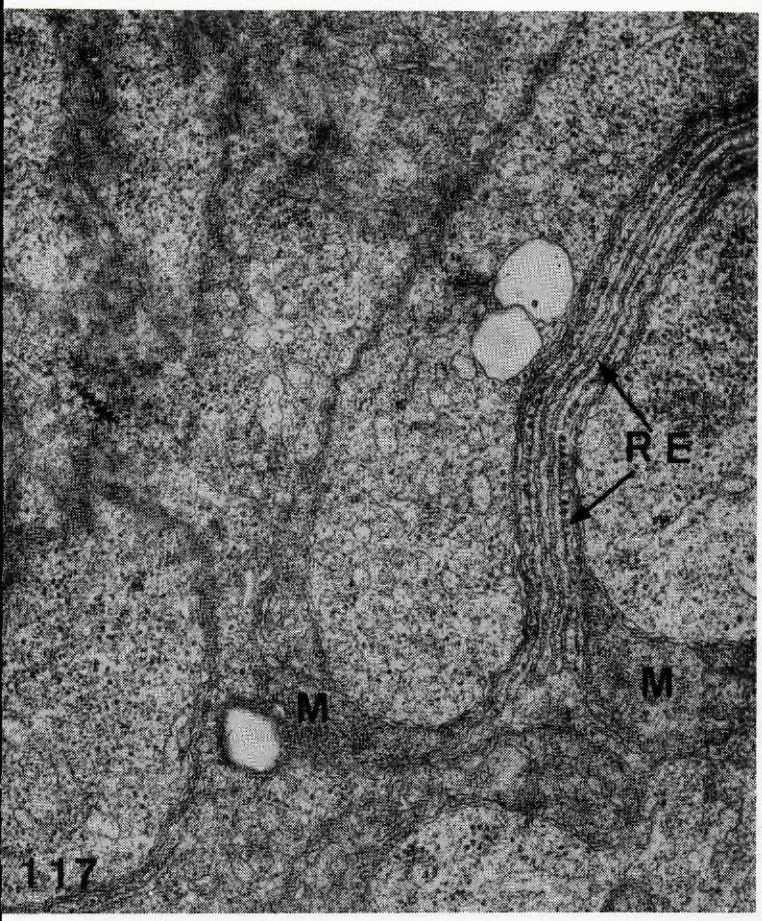
Tratamentos com obscuridade contínua

Fig.117 - Micrósporo jovem após 8 dias de obscuridade contínua. A matriz das mitocôndrias (M) é densa e o retículo endoplasmático (RE) observa-se nas proximidades do invólucro mitocondrial, surgindo em perfis membranosos alongados e dispostos paralelamente. 33 000 X.

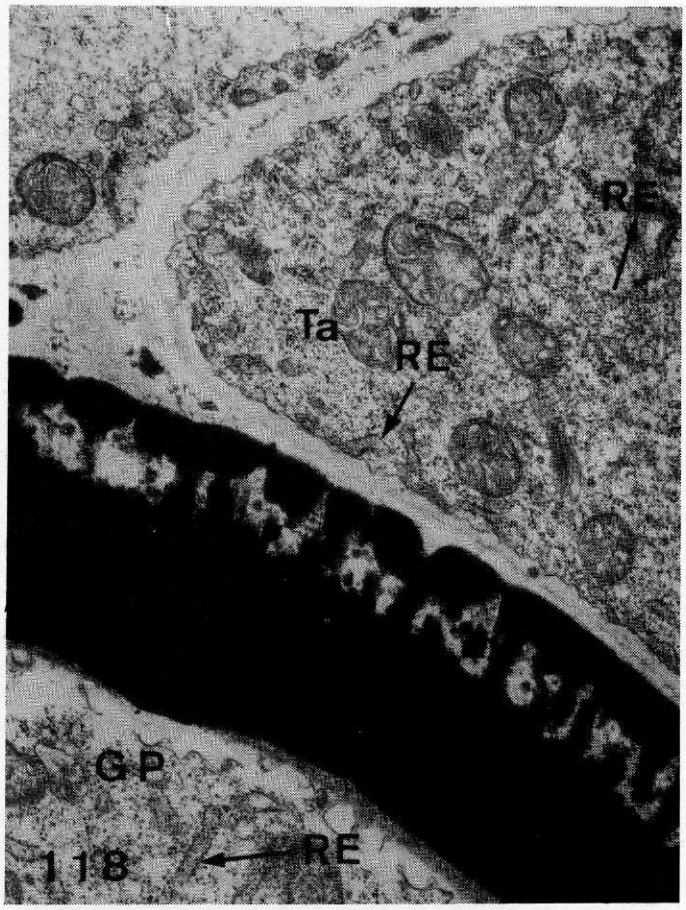
Fig.118 - Grão de pólen jovem (GP) rodeado por células do tapete (Ta), observando-se o retículo endoplasmático (RE) de cisternas dilatadas, contendo material denso. 16 800 X.

Fig.119 - Micrósporo ao fim de 6 semanas de tratamento, observando-se, também aqui, perfis de retículo endoplasmático (RE) nas proximidades do invólucro mitocondrial. M-mitocôndria. 21 600 X.

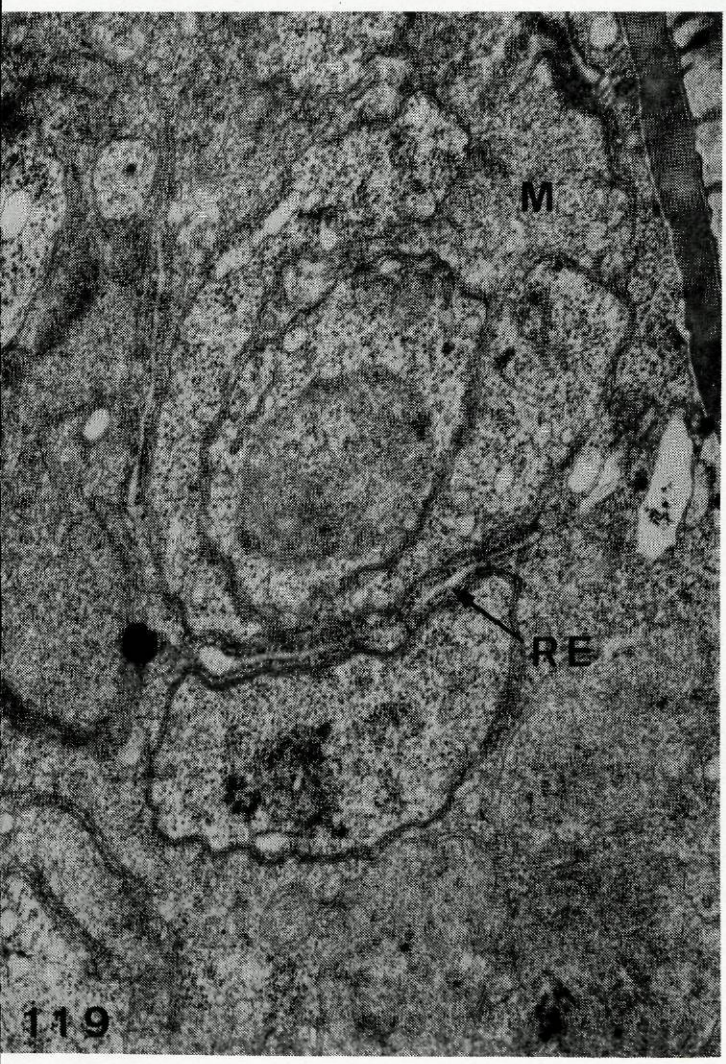
Fig.120 - Porção de micrósporo com regressão do sistema vacuolar, observando-se mitocôndrias de pequenas dimensões (M) e "nebenkerns" de retículo endoplasmático (RE). 16 000 X.



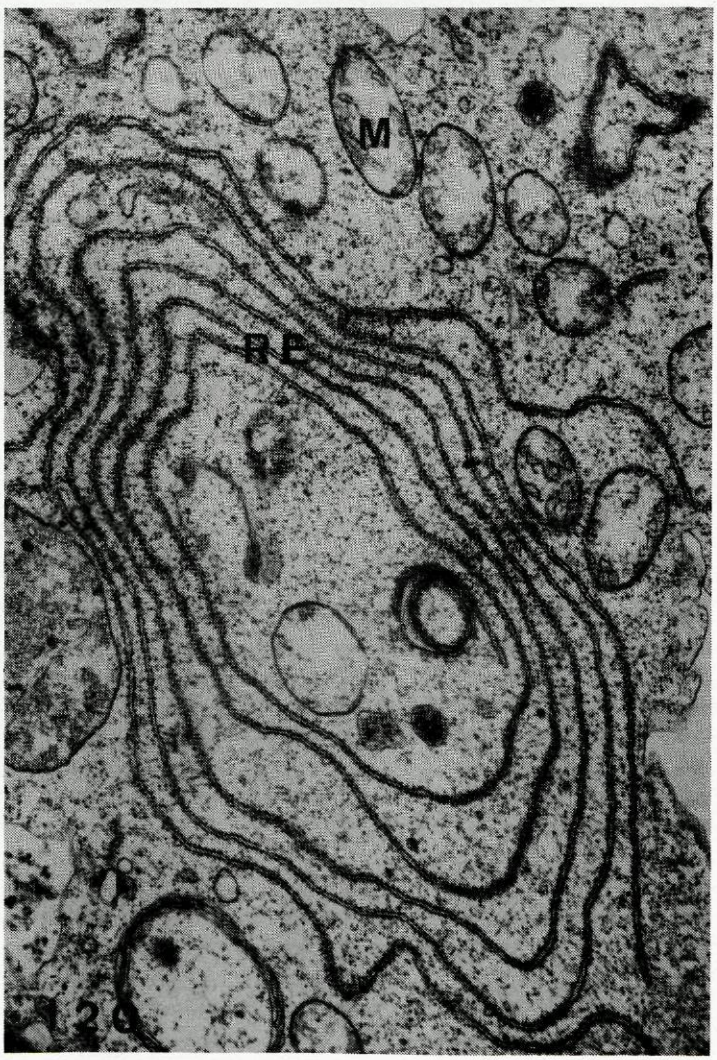
117



118



119



120

Assim, o retículo endoplasmático além de se observar em perfis dispersos também se observava nas proximidades do invólucro mitocondrial. Simultâneamente surgiam alguns perfis membranosos de cisternas alongadas e um pouco dilatadas com ribossomas colocados linearmente ao longo das membranas (Fig.119). As mitocôndrias apresentavam formas bizarras com matriz pouco electronodensa e um número reduzido de cristas. Ao fim deste mesmo tempo de tratamento as células polínicas, em estado de micrósporo com redução do sistema vacuolar, apresentavam mitocôndrias de pequenas dimensões, matriz também pouco electronodensa e cristas de tamanho reduzido. O retículo endoplasmático surgia em perfis finos e longos dispostos em camadas paralelas e concêntricas tipo "nebenkern" (Fig.120).

Nas células do tapete não se observaram alterações acentuadas ao nível dos vários organelos citoplasmáticos, a não ser o retículo endoplasmático que apresentava cisternas dilatadas com material no interior.

9 - Efeitos de agentes químicos na microsporogénese

9.1 - Cloranfenicol

O cloranfenicol inibe a síntese proteica actuando nos ribossomas tipo procariótico, ou seja, nos ribossomas 70S presentes nas bactérias, cianófitas e organelos citoplasmáticos tais como plastídios e mitocôndrias.

O cloranfenicol inibe a actividade da peptidil transferase na subunidade 50S dos ribossomas.

Um dos primeiros efeitos deste antibiótico parece ser a perda das cristas mitocondriais, como resultado do desaparecimento de uma série de enzimas mitocondriais (Sowers & Hackenbrock.1981).

Além dos efeitos resultantes da inibição proteica mitocondrial, outros efeitos indirectos podem ser considerados, estando possivelmente relacionados com o estado fisiológico das células ou com o efeito directo deste antibiótico na cadeia respiratória, tendo como consequência a formação de algumas modificações estruturais. Assim, têm sido descritos a formação de mitocôndrias gigantes (Newmann & Parthier, 1973; Blank & Arnold, 1981) e o aparecimento de cristas ondulantes ou de cristas "rígidas" na matriz mitocondrial (Adoutte et al., 1972).

Tendo como finalidade o estudo da acção do cloranfenicol, na microsporogénese, colocaram-se hastes florais em soluções cujas concentrações e tempos de tratamento estão indicados no capítulo de Material e Métodos.

A análise dos resultados obtidos com estas experiências mostrou que o cloranfenicol, na concentração máxima usada (5mg/ml), começava por afectar as mitocôndrias . Nestas a matriz tornava-se bastante condensada surgindo uma desorganização das cristas, observando-se formas em anel ou vesiculares (Fig.121).

Verificou-se que, com tempos longos de tratamento (48 horas) como se pode observar na Fig.122, o citoplasma apresentava-se

bastante alterado vendo-se mitocôndrias com contornos irregulares, matriz menos electronodensa e cristas reduzidas, algumas em forma de anel (Fig.122, setas). O citoplasma encerrado nas mitocôndrias tinha maior densidade, com ribossomas. O núcleo apresentava-se também bastante alterado e ao nível da parede do grão de pólen verificou-se que não tinha havido formação da camada de intina. O retículo endoplasmático surgia bastante fragmentado e os dictiossomas não se observavam em actividade, como parece inferir-se da ausência de vesículas nas proximidades dos sáculos.

Anteras, com células em estados iniciais da microsporogénese, foram sujeitas à acção do cloranfenicol adicionado ao meio de cultura. Após 24 horas de tratamento verificou-se que as células mães se haviam dividido observando-se tétradas jovens que possuíam mitocôndrias de grandes dimensões, de forma profundamente modificada e a matriz com pequeno número de cristas (Fig.123). Nas células do tapete as mitocôndrias de matriz mais ou menos homogénea exibiam cristas reduzidas e os plastídios apresentavam um sistema complexo de túbulos bastante desorganizado.

As anteras que possuiam células polínicas no estado de tétrada jovem, após 24 horas de tratamento, continham micrósporos sem a camada de calose a envolvê-los tendo-se observado deposição de esporopolenina, embora de modo irregular. Assim, nestes micrósporos verificou-se que tinha ocorrido a síntese de nexina 1, 2 e 3, mas não se haviam formado báculas nem a camada de exina a constituir o tecto (Fig.124).

9.2 - Cicloheximida

A cicloheximida é um inibidor da síntese proteica realizada com intervenção dos ribossomas tipo eucariótico. A cicloheximida inibe a actividade da peptidil transferase na subunidade 60S dos ribossomas. Siegel & Sisler (1963) realizaram ensaios "in vitro" e verificaram que a cicloheximida inibia a síntese proteica nos ribossomas citoplasmáticos. Este inibidor tem ainda uma acção sobre o metabolismo dos polirribossomas, tendo-

-se verificado que impede o movimento dos ribossomas ao longo do mRNA (Gale et al., 1972).

Vários estudos foram efectuados no sentido de verificar o papel da síntese proteica nos diferentes processos biológicos, tais como diferenciação, e têm sido descritos os vários efeitos produzidos por este antibiótico. Assim, há vários autores que consideram que a cicloheximida actua sobre as membranas e sistemas de transporte (Reilly et al., 1970 ; Läuchli et al., 1973), na síntese de RNA (McMahon,1975) e de DNA (Brown et al., 1970), no metabolismo dos aminoácidos (Wheatley & Oaks,1968) e dos triglicerídeos e lípidos (Bar-On et al., 1972; Garcia-Sáinz et al., 1975). Admite-se que a cicloheximida interfira também com a respiração (MacDonald & Ellis, 1969; Dheidah & Black, 1976). As alterações nestas funções celulares resultam,por vezes, em efeitos secundários na morfologia dos cromossomas e núcleo, ocorrendo assim modificações no ciclo nuclear (Baszczynski et al., 1980).

A acção da cicloheximida foi ensaiada quer mergulhando extremidades de hastes florais na solução quer inoculando anteras,contendo células polínicas em estados iniciais da microsporogénese,em meios de cultura adicionados do inibidor.

A partir de hastes florais , cujas extremidades estiveram mergulhadas durante 24 horas em solução de cicloheximida,retiraram-se anteras contendo micrósporos em fase de vacuolização. Nestes micrósporos as mitocôndrias apresentavam matriz electronodensa e reduzido número de cristas (Fig.125).

Após 48 horas de tratamento os micrósporos apresentavam mitocôndrias de matriz bastante electronodensa com cristas de pequenas dimensões,tipo vesiculares, e o citoplasma encerrado no enclave tinha densidade electrónica semelhante ao citoplasma exterior (Fig.126).

Ao fim de 72 horas de tratamento os micrósporos possuíam citoplasma pouco electronodenso com reduzido número de ribossomas. As mitocôndrias apresentavam matriz electronicamente densa e cristas pequenas algumas muito dilatadas(Fig.128).O cito-

Tratamentos com cloranfenicol (CAM) e cicloheximida (CH)

Fig.121 - Micrósporo sob a acção do CAM mostrando a matriz das mitocôndrias (M) bastante condensada, com cristas desorganizadas em forma de anel (seta). D-dictiossoma, Ci-enclave citoplasmático. 24 700 X.

Fig.122 - Porção de micrósporo, 48 horas após tratamento com o CAM, observando-se mitocôndrias (M) profundamente alteradas, contendo cristas em anel (setas) e o enclave citoplasmático (Ci) apresenta-se muito denso. 11 400 X.

Fig.123 - Tétrada jovem, obtida em meio de cultura com adição de CAM, mostrando mitocôndrias (M) com reduzido número de cristas. N-núcleo, Ci-enclave citoplasmático.23 000 X.

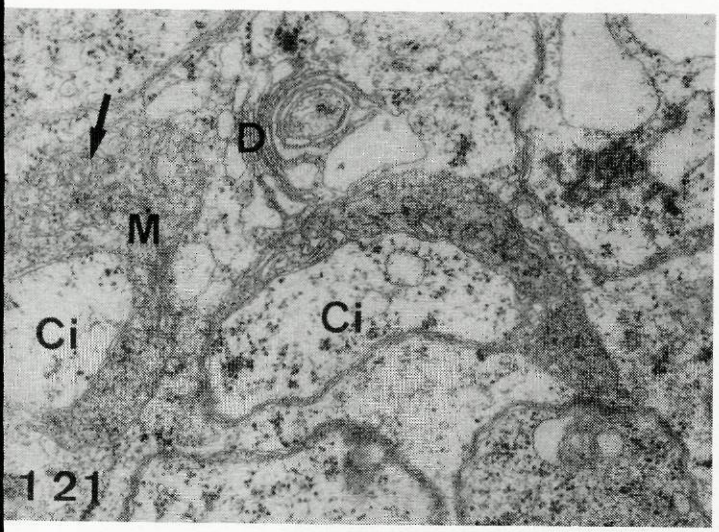
Fig.124 - Micrósporo obtido em meio de cultura com o CAM, verificando-se uma deposição irregular da esporopolenina (E). Não se observam báculas nem tecto. P-plastídio, M-mitocôndria, Ci-enclave citoplasmático. 17 100 X.

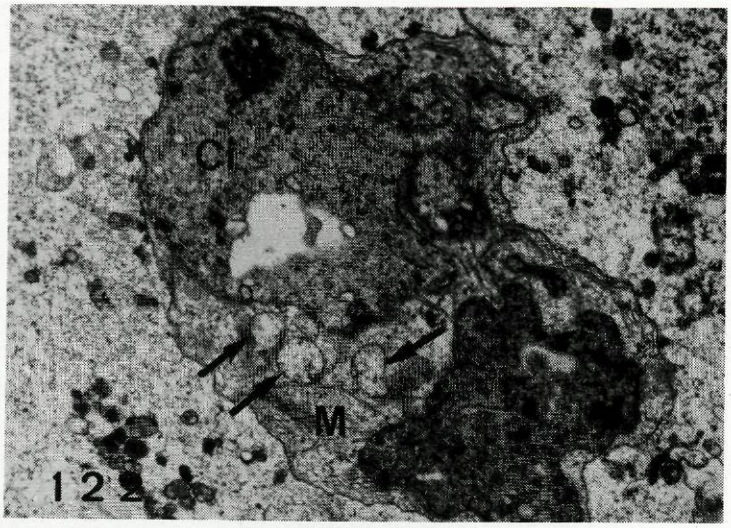
Fig.125 - Micrósporo em vacuolização 24 horas após tratamento com a CH, observando-se mitocôndrias (M) de matriz densa e reduzido número de cristas. V-vacúolo, E-exina. 3 800 X.

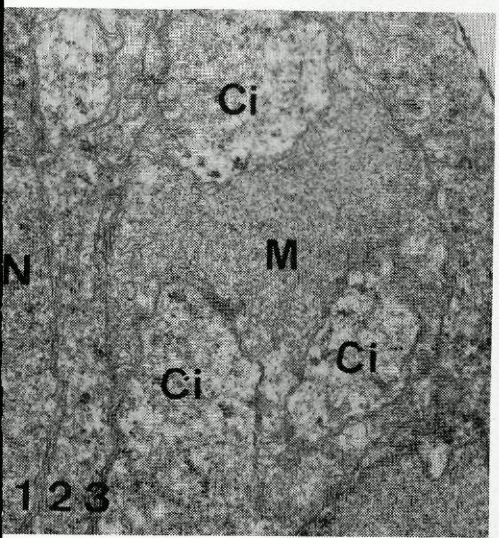
Fig.126 - Micrósporo ao fim de 48 horas de tratamento com a CH. Notam-se mitocôndrias (M) de matriz densa e cristas vesiculares. Ci-enclave citoplasmático. 17 100 X.

Fig.127 - Célula do tapete após 48 horas de tratamento com CH, observando-se um plastídio (P) contendo no estroma a estrutura complexa de túbulos. N-núcleo. 16 000 X.

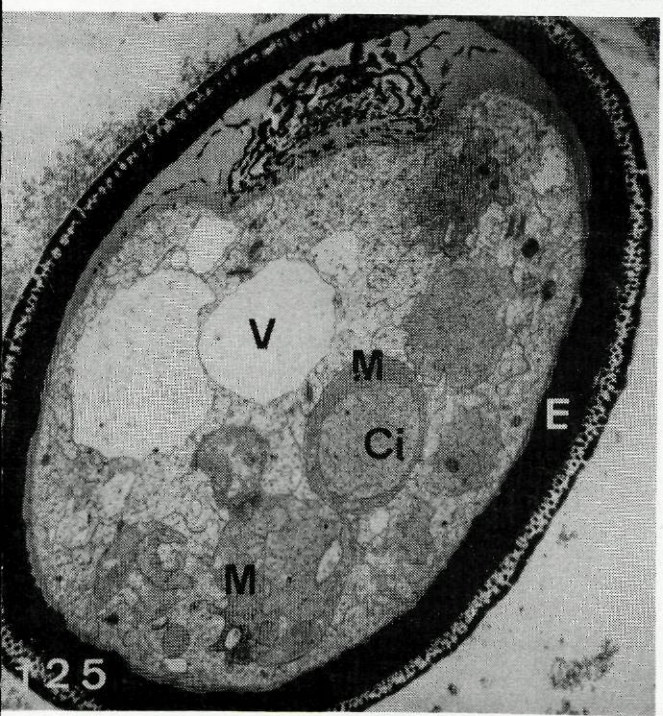
Fig.128 - Micrósporo ao fim de 72 horas de tratamento com a CH, vendo-se mitocôndrias de matriz bastante densa e algumas cristas dilatadas. O enclave citoplasmático (Ci) também se apresenta denso. P-plastídio. 12 000 X.

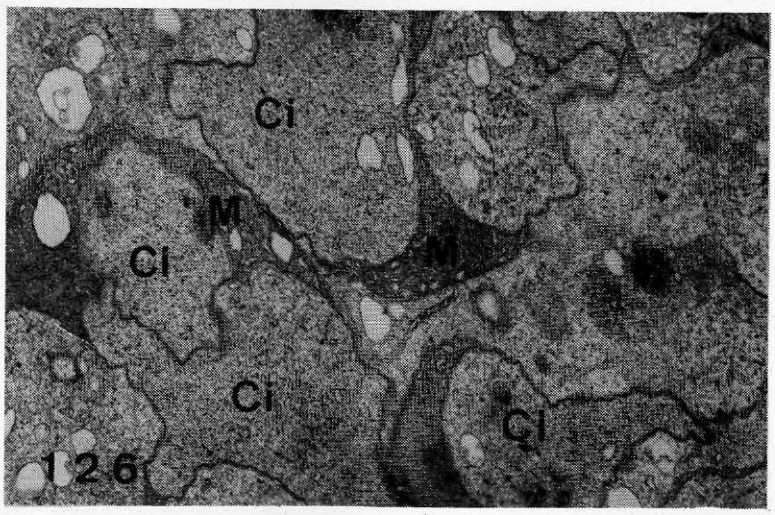

D
M
Ci
Ci
121

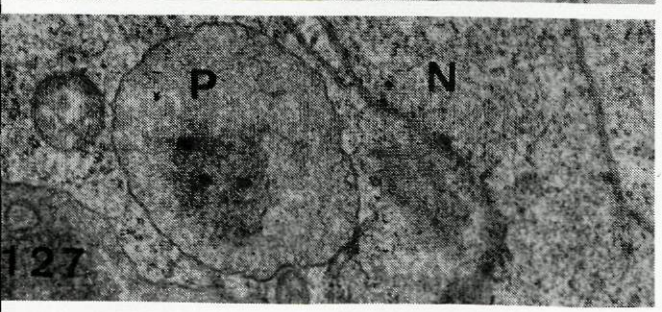

Ci
M
122


Ci
N
M
Ci
Ci
123


E
M
Ci
P
P
124


V
M
Ci
E
M
125


Ci
M
Ci
M
Ci
Ci
126


P
N
127


Ci
P
Ci
Ci
128

plasma aprisionado na mitocôndria surgia muito escuro com bastantes ribossomas livres. O retículo endoplasmático era pouco abundante e os dictiossomas eram formados por conjuntos de cisternas empilhadas que aparentemente não produziam vesículas.

Após 24 horas de tratamento a cicloheximida não exerceu qualquer acção sobre a estrutura complexa de túbulos que normalmente se observava nos plastídios das células do tapete (Fig. 127), embora após 96 horas de tratamento se verificasse que todo o citoplasma estava em estado de degenerescência.

Como já referido anteriormente, cultivaram-se anteras em meios de cultura ao qual se havia adicionado cicloheximida. Ao fim de 7 horas observaram-se alterações na parede da antera. Assim, nas células da parede, que estão para o exterior do tapete, observou-se a presença de grandes grãos de amido preenchendo quase completamente o estroma dos plastídios (Fig.129). No estado de tétrada os plastídios das células do tapete possuiam um sistema complexo de túbulos semelhante ao corpo prolamelar dos estioplastos e possuiam uma grande formação de amido de contorno irregular, podendo o estroma conter também um sistema bastante desenvolvido de membranas em arranjos paralelos (Fig. 130). No estado de micrósporo os plastídios das células do tapete apresentavam o estroma claro, com membranas longas e isoladas, havendo a assinalar a presença da estrutura complexa, semelhante ao corpo prolamelar, bastante desorganizada (Fig.131). As formações de amido, quando visíveis, surgiam com dimensões reduzidas. As mitocôndrias destas células apresentavam contornos irregulares e cristas mais ou menos desenvolvidas.

Após 24 horas de tratamento com a cicloheximida, adicionada ao meio de cultura, verificou-se que as células polínicas estavam em estado de tétrada tendo ocorrido citocinese, no entanto a primexina iniciou a sua deposição de modo a contornar as quatro células ficando, por conseguinte, unidas pela camada de primexina. A Fig.132 mostra duas células ligadas pela primexina.

Curiosamente constatou-se que as células, que foram inoculadas em estado de micrósporo, não prosseguiram o seu desenvol

Cicloheximida adicionada aos meios de cultura

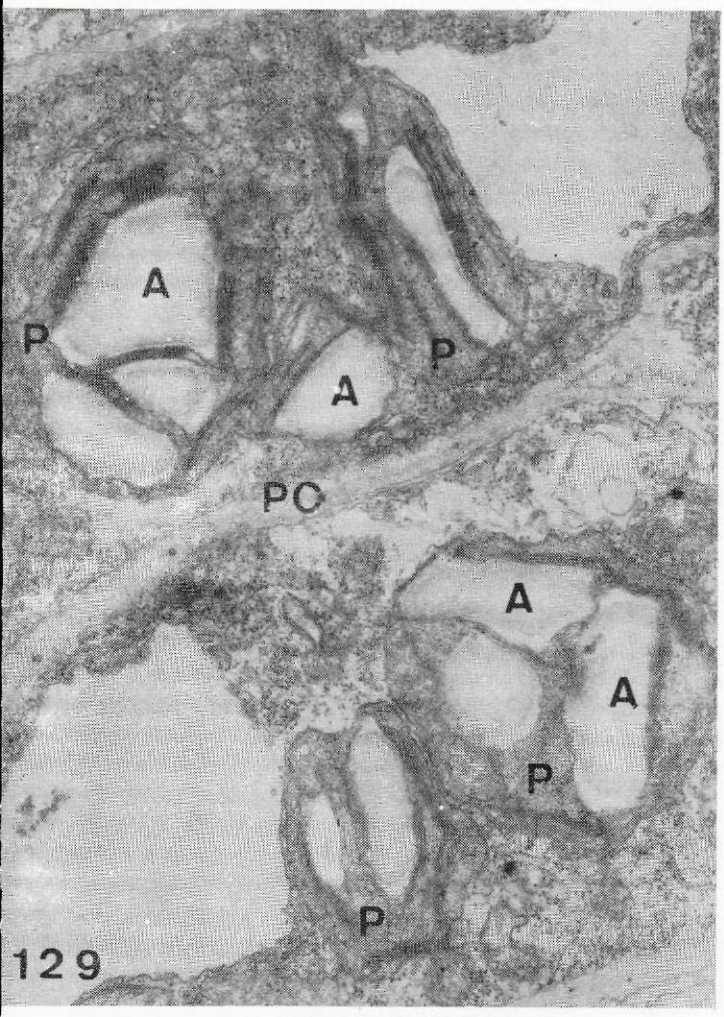
Fig.129 - Células da parede da antera observando-se plastídios (P) com grãos de amido (A). PC-parede celular. 22 000 X.

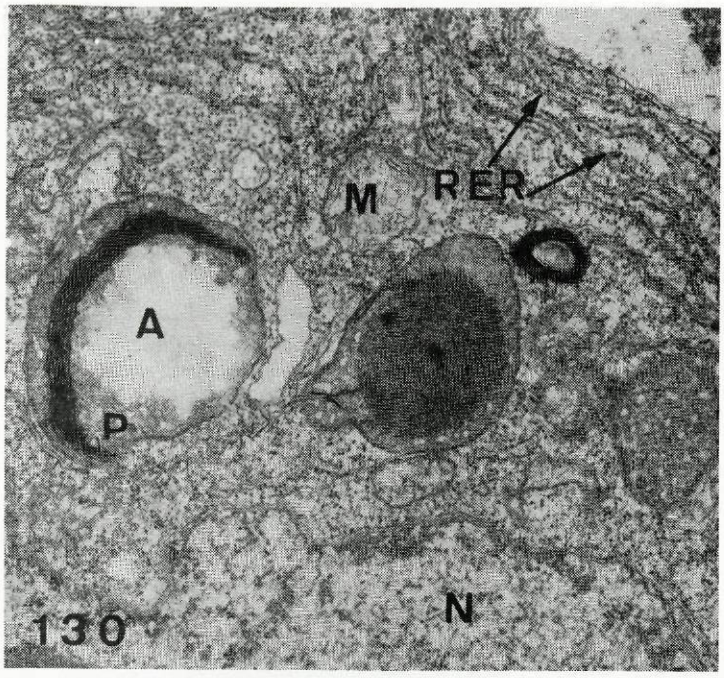
Fig.130 - Célula do tapete mostrando plastídios (P) com o sistema de túbulos e grão de amido (A). M-mitocôndria, RER-retículo endoplasmático rugoso, N-núcleo.19 800 X.

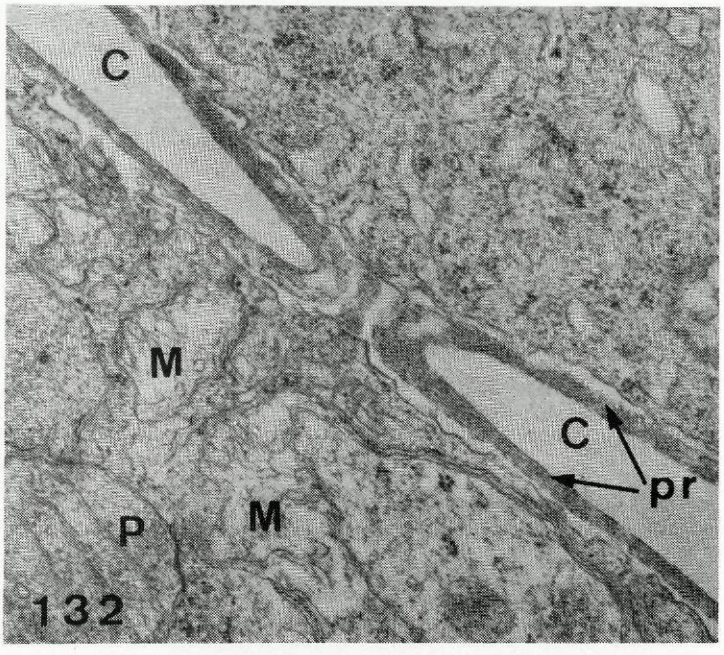
Fig.131 - Célula do tapete 24 horas após tratamento, observando-se os plastídios (P), com o sistema de túbulos bastante desorganizado. M-mitocôndria. 22 000 X.

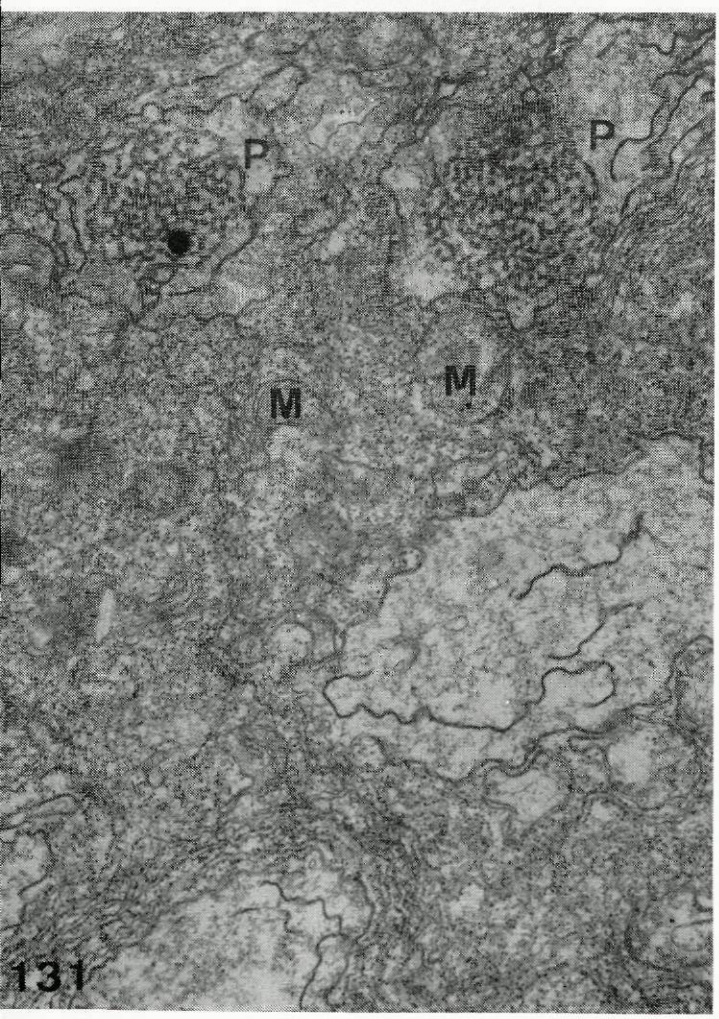
Fig.132 - Tétrada, observando-se 2 células ligadas pela primexina (pr). P-plastídio, C-calose, M-mitocôndria. 30 800 X.

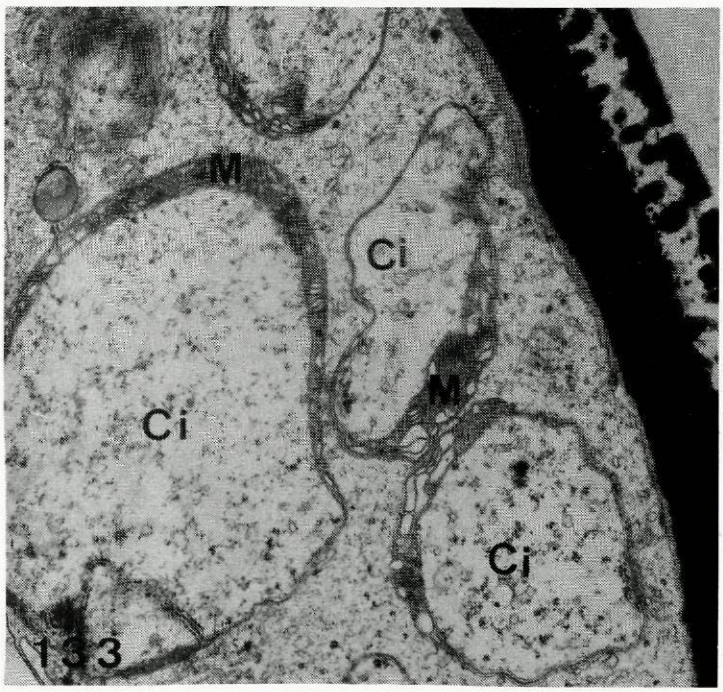
Fig.133 - Micrósporo cujo desenvolvimento foi interrompido apresentando mitocôndrias (M) de matriz condensada e cristas dilatadas. Ci-enclave citoplasmático. 16 000 X.


A
P
A
P
PC
A
A
P
P
129


M
RER
A
P
130
N


C
M
C
pr
P
M
132


P
P
M
M
131


M
Ci
M
Ci
Ci
133

vimento observando-se o citoplasma bastante claro e as mitocôndrias apresentavam matriz condensada e cristas dilatadas (Fig. 133).

A cicloheximida parece inibir o processamento da microsporogénese provocando uma degenerescência dos plastídios que ocorrem nas células do tapete. Nos micrósporos ocorria, por acção daquele antibiótico, uma condensação da matriz mitocondrial e uma dilatação das cristas sem que, porém, se verificasse uma interferência na forma dessas mesmas mitocôndrias. No citoplasma dos micrósporos assistia-se a uma diminuição na densidade dos ribossomas.

9.3 - Brometo de etídio

A actividade biológica do brometo de etídio parece estar relacionado com a sua capacidade de se intercalar entre os pares de bases do DNA pelo que este composto tem sido amplamente usado na análise de moléculas de DNA circular.

O brometo de etídio parece interferir com o papel do DNA na replicação e transcrição, directamente reagindo com ele para formar um composto ou indirectamente provocando alterações estruturais.

Nas células eucarióticas o brometo de etídio tem mostrado uma acção selectiva para as mitocôndrias quer inibindo a síntese de rRNA mitocondrial bloqueando a replicação e transcrição devido a ligar-se covalentemente com o DNA, quer ainda suprimindo a síntese proteica mitocondrial (Lenk & Penman, 1971). Também se tem verificado que este composto inibe selectivamente a actividade da polimérase do DNA mitocondrial impedindo a síntese do DNA mitocondrial (Meyer & Simpson, 1969; Horwitz & Holt, 1971).

Um dos efeitos secundários do brometo de etídio surge ao nível das membranas mitocondriais, provavelmente, devido à diminuição dos ribossomas destes organelos nos quais algumas proteínas das cristas são sintetizadas (Rubin & Tzagoloff, 1973). Vários autores mostraram que o brometo de etídio apresentava uma acção diversa, dependendo da concentração ensaiada. Assim, o brometo de etídio, na concentração de 1-5 µg/ml, provocava aberrações no arranjo das cristas mitocondriais assim como redução do seu número (Nass & Ben-Shaul, 1973), enquanto que em concentração mais elevada, cerca de 25 µg/ml, o brometo de etídio induzia dilatação das cisternas das cristas mitocondriais (Heilporn & Limbosch, 1971).

O brometo de etídio, em alguns casos, tem induzido mutações citoplasmáticas (Cottrell, 1979), mutações geneticamente estáveis (Klietmann et al., 1973b) ou reversíveis em certas condições (Perlman & Mahler, 1971).

Admite-se que o brometo de etídio provoque inicialmente uma diminuição, ou mesmo perda dos citocromos $a+a_3$ e citocromo b, acompanhada por modificações estruturais nas mitocôndrias (Soslau & Nass, 1971 ; King et al., 1972).

Em certos casos, associado à inibição do desenvolvimento normal das mitocôndrias, surgiam na matriz complexos de material electronodenso quer em células animais (McGill et al.,1973, 1976) quer em células vegetais (Lord, 1974 ; Risueño et al. , 1975).

Além do papel do brometo de etídio nas mitocôndrias, como seja inibição de síntese, transcrição e replicação do DNA, e síntese de RNA, também se têm verificado alterações na ultrastrutura nuclear (Nass, 1972; Risueño et al., 1972 ; Flickinger, 1973) como resultado da interacção do brometo de etídio com o DNA nuclear.

Submeteram-se hastes florais à acção do brometo de etídio nas concentrações e tempos indicados no capítulo de Material e Métodos.

Após 12 horas de tratamento, começou por se notar uma diminuição no número de cristas mitocondriais e um aumento no número de dictiossomas por célula.

As células polínicas no estado de tétrada, após 48 horas de tratamento, possuiam mitocôndrias cuja densidade electrónica da matriz diminuira notando-se poucas cristas e grandes áreas pouco densas com fibrilas de DNA. Na observação das microfotografias evidenciam-se os ribossomas citoplasmáticos situados no interior dos enclaves citoplasmáticos aprisionados nas mitocôndrias (Fig.134).

O micrósporo em redução do sistema vacuolar, após 48 horas de tratamento, apresentava mitocôndrias pequenas e arredondadas de matriz pouco electronodensa, com reduzido número de cristas e áreas claras com fibrilas de DNA (Fig.135). Os plastídios apresentavam sempre estroma electronodenso mais ou menos homogéneo. Observaram-se pequenas granulações, entre a nexina 3 e o plasmalema, com densidade electrónica semelhante ao material contido nas cisternas do retículo endoplasmático. Este organelo era pouco abundante notando-se pequenos perfis no citoplasma. O núcleo também apresentava alterações, observando-se frequentemente a presença de ribossomas na membrana nuclear externa do lado citoplasmático, e verificou-se que a cisterna perinuclear estava preenchida por material de densidade electrónica semelhante ao contido nas cisternas do retículo endoplasmático. Os dictiossomas surgiam em pequeno número produzindo poucas vesículas.

O brometo de etídio não alterou a divisão das mitocôndrias, mas impediu a divisão nuclear e, como não se formou o grão de pólen, também não se observaram pontos de amido nos plastídios.

Nas células do tapete, após 24 horas de tratamento com o brometo de etídio, os plastídios apresentavam grandes dimensões e no estroma não se observava o sistema complexo de

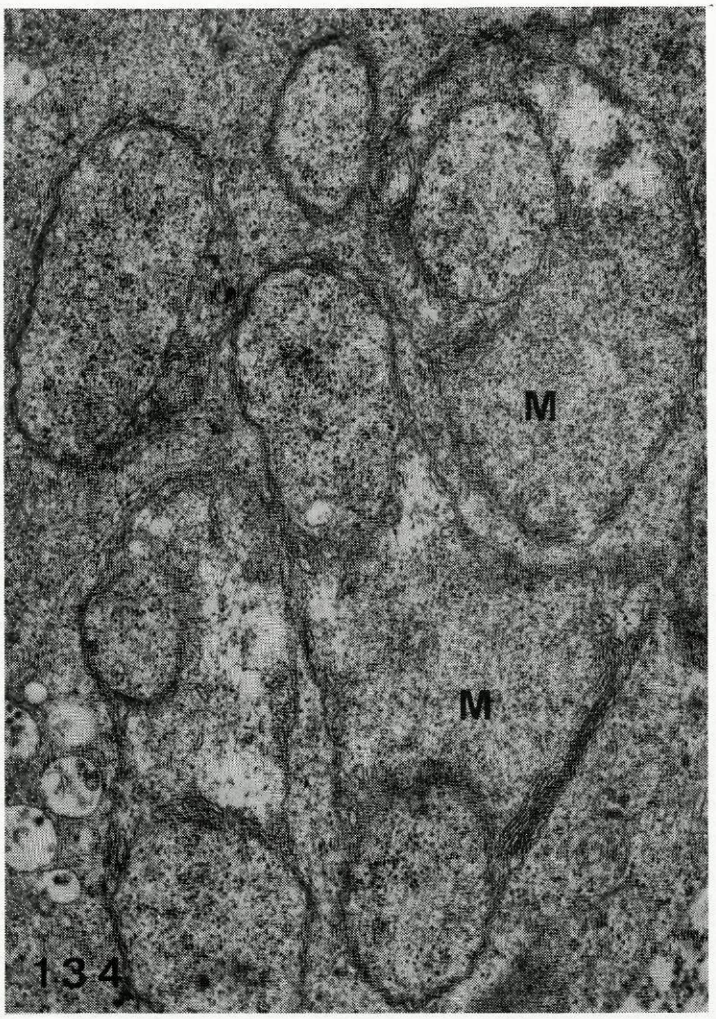
Tratamentos com brometo de etídio

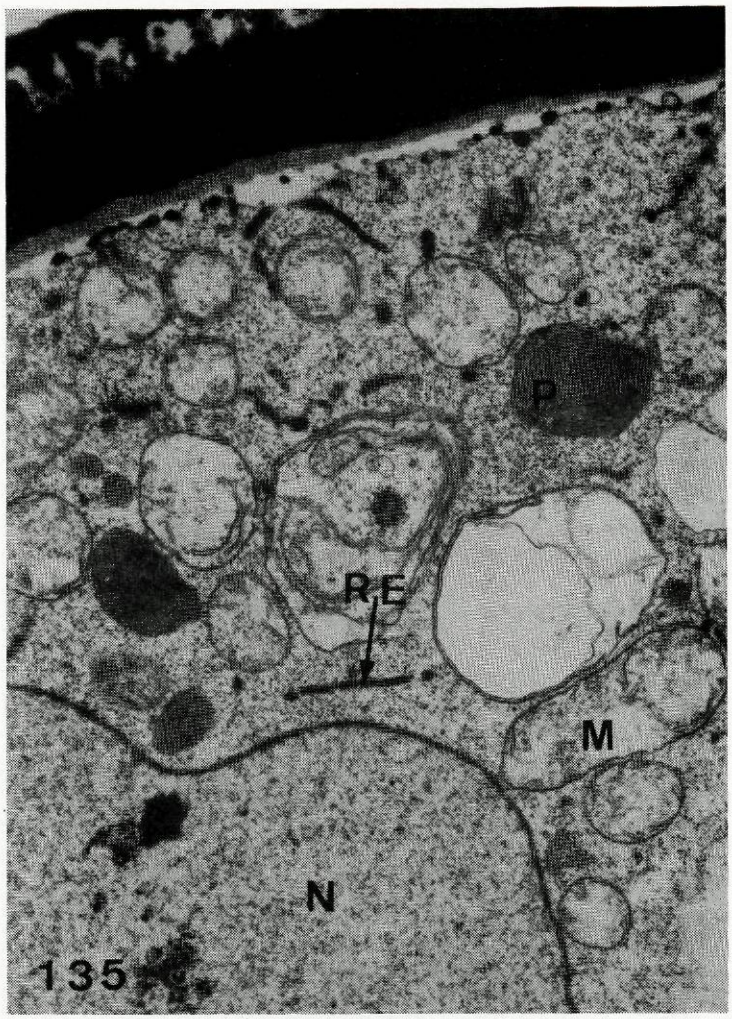
Fig.134 - Tétrada madura, 48 horas após tratamento, notando-se mitocôndrias (M) com matriz pouco densa e reduzido número de cristas. 20 800 X.

Fig.135 - Micrósporo em redução do sistema vacuolar, 48 horas após tratamento, apresentando mitocôndrias (M) de pequenas dimensões e plastídios (P) de estroma homogéneo. O retículo endoplasmático (RE) contem material denso nas suas cisternas. N-núcleo. 14 400 X.

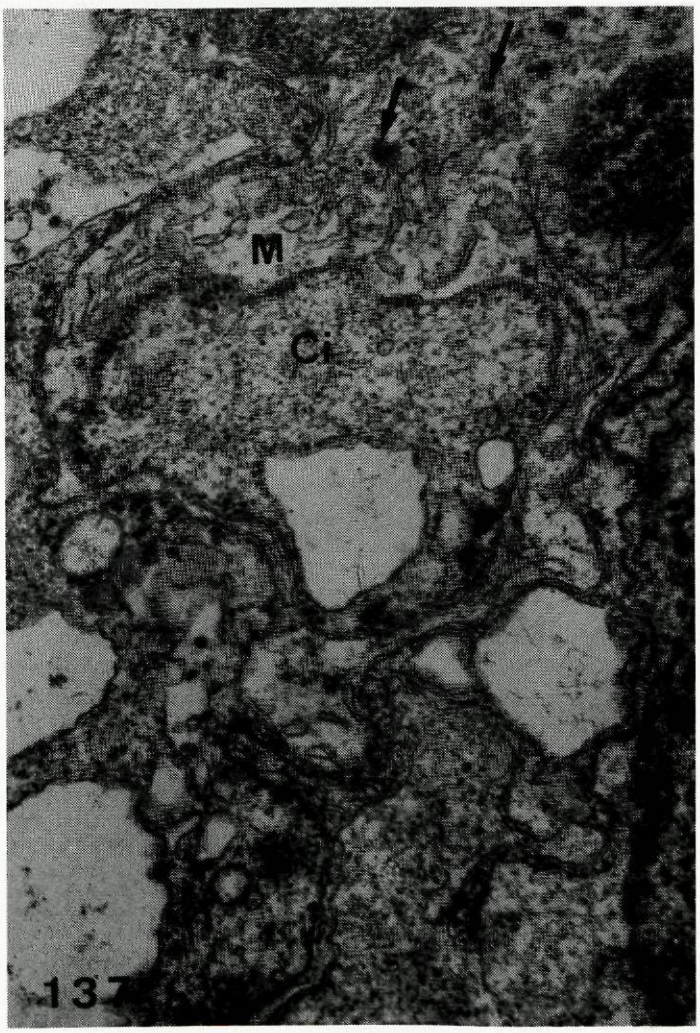
Fig.136 - Células de tapete observando-se os plastídios (P) com vários arranjos de sistema de túbulos em corte longitudinal e transversal. N-núcleo. 21 000 X.

Fig.137 - Micrósporo após tratamento com o brometo de etídio (100 µg/ml, concentração mais elevada que nas figuras anteriores) vendo-se as mitocôndrias (M) de contornos mal definidos e na matriz observam-se complexos densos (setas). Ci-enclave citoplasmático. 31 000 X.


M
M
134


P
RE
M
N
135


N
P
P
P


M
Ci
137

túbulos apenas alguns túbulos dispostos em vários arranjos, como se pode ver em corte longitudinal e transversal na Fig. 136. As mitocôndrias possuiam matriz condensada e cristas dilatadas. O núcleo apresentava sinais de alteração.

Após 24 horas de tratamento com o brometo de etídio, mas em maior concentração (100 µg/ml) que a anteriormente utilizada, os micrósporos apresentavam mitocôndrias de matriz menos electronodensa que no controlo, cristas de configuração irregular e dimensões reduzidas, e ainda a presença de complexos electronicamente densos na matriz mitocondrial (Fig.137, setas).

9.4 - DCMU—3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilureia

O DCMU, também conhecido pelo nome de diuron, é um herbicida do grupo da fenilurea. Grande número de herbicidas são utilizados para indirectamente protegerem plantas de interesse agrícola.

O principal local de acção do DCMU é nos cloroplastos (Corbett, 1974; Dodge, 1975), admitindo-se que o local onde actua é um componente proteínico das membranas dos tilacóides, provocando interrupção na cadeia de electrões entre a coenzima Q e a plastoquinona levando à inibição da fixação de CO_2. Vários autores mostraram a acção do DCMU na fotossíntese e admitiram que o seu efeito está dependente da concentração utilizada. Assim, em baixas concentrações o DCMU inibe a transferência de electrões no fotossistema I enquanto que em altas concentra-

ções o fotossistema II é o mais afectado (Bomsel, 1966 ; Halldal & Holmen, 1979).

Para além dos efeitos na fotossíntese o DCMU actua também na respiração, inibindo o fluxo de electrões da cadeia respiratória mitocondrial, actuando entre os citocromos b e c_1 uma vez que bloqueia a oxidação do citocromo b e a redução do citocromo c_1 (Colson et al., 1977).

Como efeitos secundários, induzidos pelo DCMU, há a apontar a diminuição de níveis de ATP, NADPH e oxigénio molecular (Sumida et al., 1975), síntese de clorofila (Pallet & Dodge, 1980), síntese de ácidos gordos e galactolípidos (Sumida & Ueda, 1973 ; Sumida et al., 1975), fotorrespiração e síntese de aminoácidos (Halldal & Holmen, 1979).

Neste trabalho utilizou-se o DCMU, mergulhando hastes florais em soluções aquosas nas concentrações de 50 e 100 mg/ml permanecendo aí durante 12, 24 e 48 horas.

Hastes florais de plantas envasadas foram submetidas a nebulizações com DCMU a 0,1%, duas vezes por dia e durante um tempo máximo de oito dias. Em todas as experiências para se preparar a solução de DCMU foi necessário dissolvê-lo previamente numa pequena quantidade de álcool de modo a que a concentração final do álcool, na solução de tratamento, não ultrapassasse 0,1%.

Verificou-se que os organelos das células polínicas, em estado de tétrada madura, que apresentavam mais alterações eram as mitocôndrias. Estas embora surgissem com formas amebóides a matriz era pouco electronodensa e as cristas reduzidas observando-se por vezes estas cristas em perfis circulares. Na matriz notavam-se também formações electronodensas (Fig.138).

Tempos mais longos de tratamento (48 horas) produziram alterações mais acentuadas, pois os organelos eram dificilmente reconhecíveis.

O DCMU utilizado em nebulizações não provocou alterações tão drásticas. Assim, após 24 horas (duas nebulizações) observou-se um desenvolvimento acentuado das cristas mitocondriais, dispondo-se paralelamente ao invólucro mitocondrial (Fig.139).

Após 72 horas de tratamento, no estado de micrósporo (Fig. 140), observavam-se mitocôndrias de pequenas dimensões e extensos perfis membranosos encerrando áreas de citoplasma. Estes perfis são de mitocôndrias gigantes e o citoplasma aprisionado está em degenerescência. A síntese da parede do micrósporo efectuou-se, tendo-se formado as camadas que compreendem a exina e a camada de intina.

Nos estados seguintes da microsporogénese observavam-se alterações ao nível das mitocôndrias, visualizando-se alguns perfis de pequenas dimensões, matriz condensada, cristas pequenas e dilatadas; ao mesmo tempo viam-se mitocôndrias de grandes dimensões, matriz clara e raras cristas. Os plastídios apresentavam grandes dimensões, contendo lamelas vesiculares. Nestas células observou-se uma abundância de pequenas cisternas dilatadas de retículo endoplasmático. Como o núcleo não se dividiu, não se observaram grãos de pólen.

Nas células do tapete o DCMU levou ao aumento de dimensão dos plastídios apresentando estroma homogéneo, pouco denso em electrões, com lamelas muito dilatadas semelhantes a pequenos vacúolos e um sistema de túbulos bastante desorganizado (Fig. 141).

9.5 - 2,4-dinitrofenol

O 2,4-dinitrofenol é um agente químico dissociador da cadeia respiratória das mitocôndrias. O transporte de electrões de um substrato para o oxigénio, em certos casos, pode efectuar-se sem a habitual formação de ligações ricas em energia. Um dos agentes que podem provocar esta inibição é o dinitrofenol, actuando simultâneamente em três locais de fosforilação da cadeia de transporte de electrões, impedindo a formação de ATP.

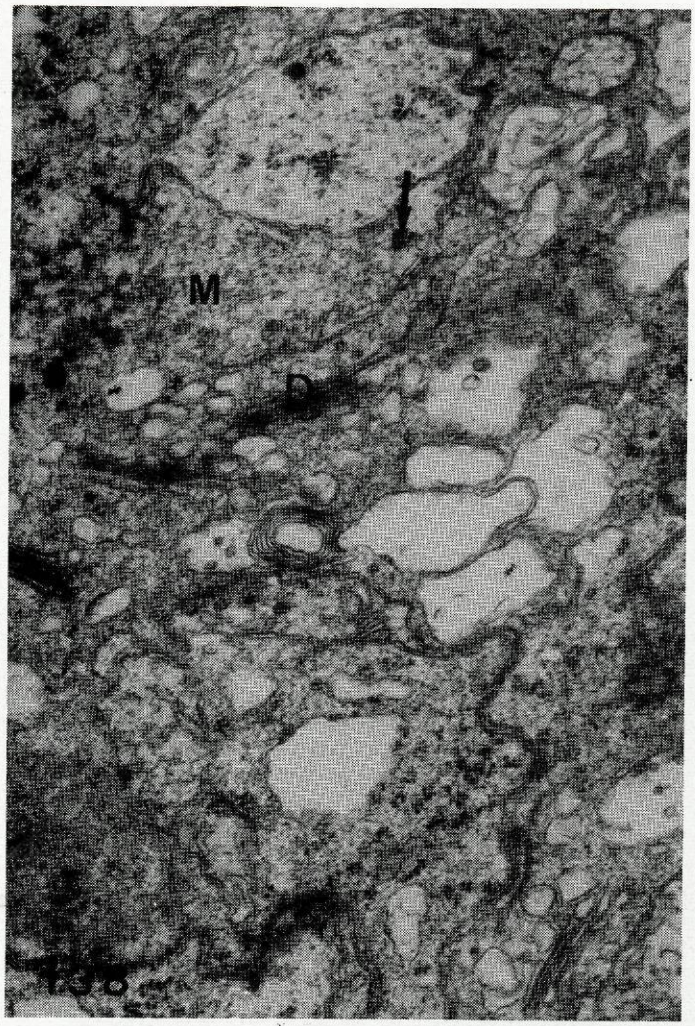
Tratamentos com DCMU

Fig.138 - Tétrada madura mostrando mitocôndrias (M) de matriz clara e formações densas (seta). D-dictiossoma. 29 000 X.

Fig.139 - Micrósporo após duas pulverizações com o DCMU verificando-se um desenvolvimento acentuado das cristas mitocondriais, que se dispõem paralelamente ao invólucro mitocondrial (setas). M-mitocôndria. 13 800 X.

Fig.140 - Micrósporo 72 horas após tratamento, observando-se mitocôndrias (M) pequenas e extensos perfis membranosos, encerrando áreas de citoplasma. Ci-enclave citoplasmático. 27 000 X.

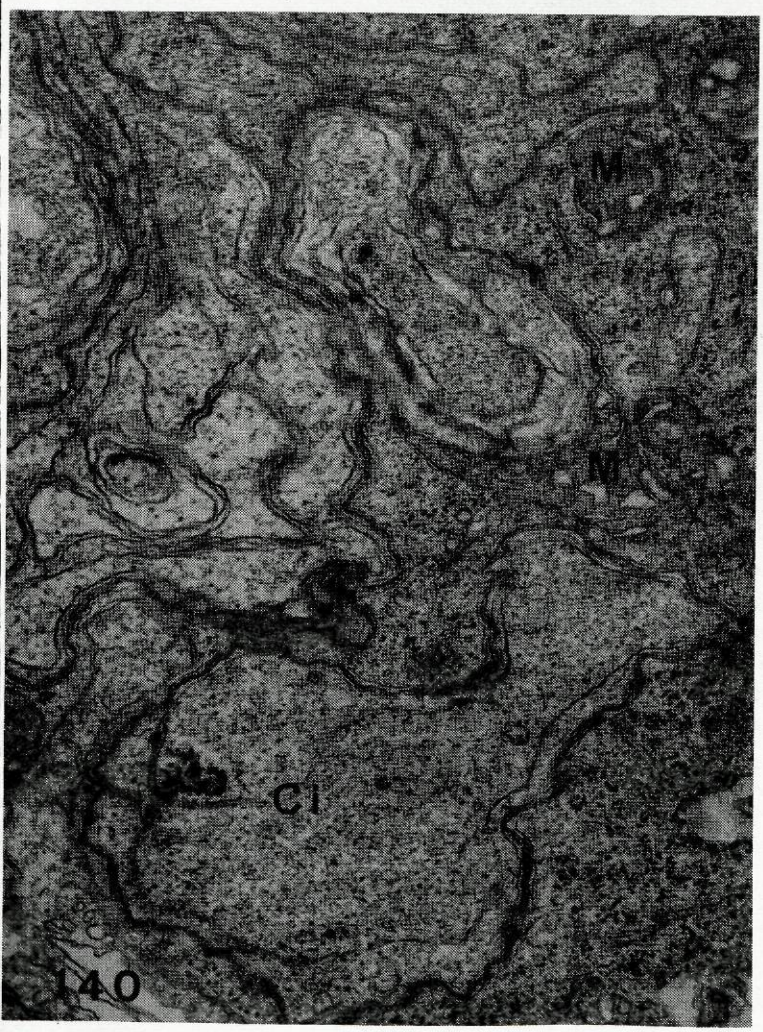
Fig.141 - Célula do tapete vendo-se plastídios (P) de estroma mais ou menos homogéneo pouco denso e o sistema complexo de túbulos bastante desorganizado. N-núcleo. 19 000 X.



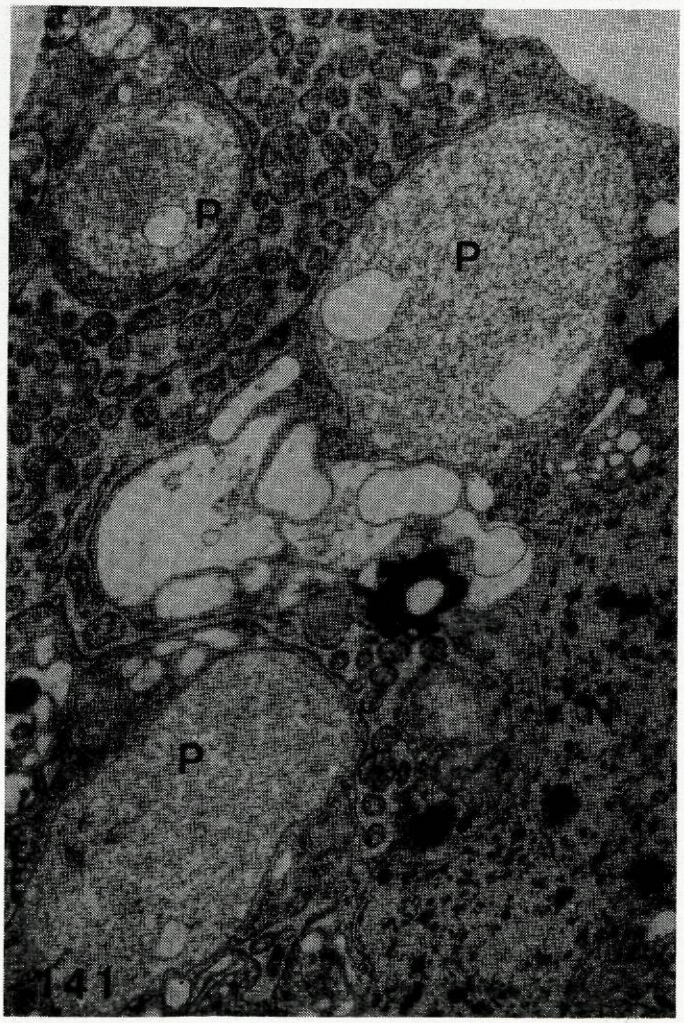
138



139



140



141

As mitocôndrias, normalmente, têm pequena actividade ATPase admitindo-se que a acção do dinitrofenol esteja ligada a um possível aumento de actividade de ATPase, enzima que catalisa a hidrólise de ATP (Lehninger, 1977).

A principal acção do dinitrofenol tem sido descrita em mitocôndrias isoladas provocando variações estruturais, dependentes da actividade metabólica, relacionadas com os ciclos respiratórios (Hackenbrock, 1968 ; Muscattello et al., 1972,1975, 1978). Em mitocôndrias "in toto" a adição de dissociadores também provoca alterações que envolvem morfologia da mitocôndria (forma e dimensão), densidade da matriz e organização das cristas, quer em células animais (Weinbach & Garbus, 1968; Smith & Ord, 1979; Ganote et al., 1980 ; Turturro & Shafiq, 1981), quer em células vegetais (Morisset, 1974 ; Podbielkowska et al., 1975).

Extremidades de hastes florais foram mergulhadas numa solução de dinitrofenol, na concentração de 50 mg/l. Igualmente se adicionou este dissociador a meios de cultura, nos quais se inocularam as anteras contendo células polínicas em diferentes estados de formação do grão de pólen.

Após 2 horas de tratamento, efectuado em hastes florais, nos micrósporos em desenvolvimento (Fig.142) observaram-se mitocôndrias de matriz condensada com cristas de cisternas dilatadas e plastídios, de estroma mais ou menos homogéneo, de pequenas dimensões.

No micrósporo, cujo sistema vacuolar estava em redução , após 48 horas de tratamento observaram-se proplastídios de grandes dimensões, com o estroma mais ou menos homogéneo, e as mitocôndrias, como já se haviam dividido, eram de pequenas dimensões, forma arredondada com matriz clara e cristas em número reduzido. O retículo endoplasmático surgiu abundante apresentando perfis paralelos e dispostos concentricamente, tipo "nebenkern" (Fig.143).

No material colocado em meios de cultura as alterações acentuaram-se pois, logo após 4 horas de tratamento, nas células em

estado de tétrada jovem observou-se uma grande vesiculação do citoplasma. As mitocôndrias apresentavam matriz pouco densa em electrões e pequenas cristas. Os plastídios surgiam com o estroma claro e mais ou menos homogéneo, confundindo-se com as mitocôndrias. No estado de micrósporo as mitocôndrias exibiam perfis irregulares e todo o citoplasma parecia estar em degenerescência observando-se numerosas e pequenas vesículas, possivelmente derivadas do retículo endoplasmático. Após 7 horas de tratamento, em meios de cultura, os micrósporos (Fig.144) possuiam mitocôndrias de grandes dimensões, de contornos irregulares, com matriz pouco electronodensa e cristas vesiculares. No estroma dos plastídios observavam-se acumulações electronicamente densas (Fig.144, seta).

Em anteras que foram inoculadas quando possuiam células polínicas em estados iniciais da microsporogénese, ao fim de 24 horas de tratamento, tal como em anteras tratadas pela ciclohexi mida a microsporogénese não se desenrolou ocorrendo degenerescência dos organelos e do citoplasma. No entanto, as células do tapete não apresentavam alterações tão acentuadas embora o citoplasma mostrasse uma maior vacuolização. Os plastídios não possuiam a estrutura complexa de túbulos descrita, contendo apenas alguns pequenos agregados de túbulos, como se pode observar na Fig.145 (seta). O retículo endoplasmático rugoso surgia em perfis longos e finos dispostos em arranjos paralelos ao longo da célula, e as mitocôndrias apresentavam matriz clara e cristas mais ou menos desenvolvidas.

9.6 - Citocalasina B

Citocalasina B é um metabolito derivado do fungo Helminthosporium dematioidem .

Vários processos celulares são dependentes dos microfilamentos relacionados com a actina, mas cuja natureza molecular exacta não é bem conhecida. Estas actividades são inibidas ,

Tratamentos com 2,4-dinitrofenol

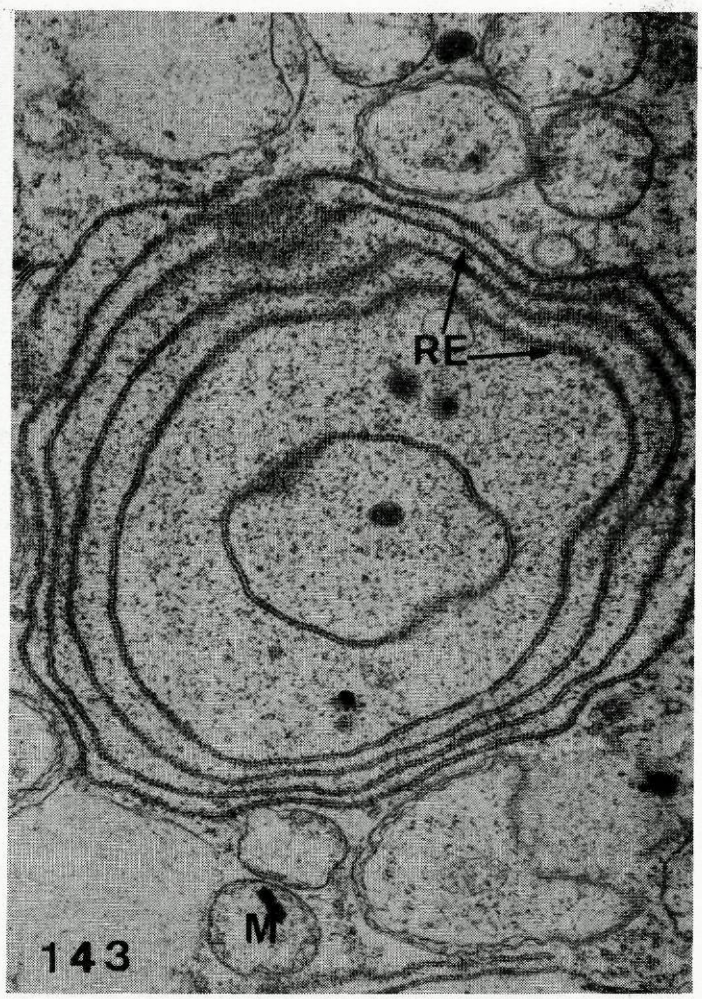
Fig.142 - Micrósporo ao fim de 2 horas de tratamento. As mitocôndrias (M) apresentam cristas bem desenvolvidas e dilatadas. 20 800 X.

Fig.143 - Micrósporo em divisão nuclear, após 48 horas de tratamento. O retículo endoplasmático (RE) surge em perfis paralelos e dispostos concêntricamente (nebenkern). M-mitocôndria 16 200 X.

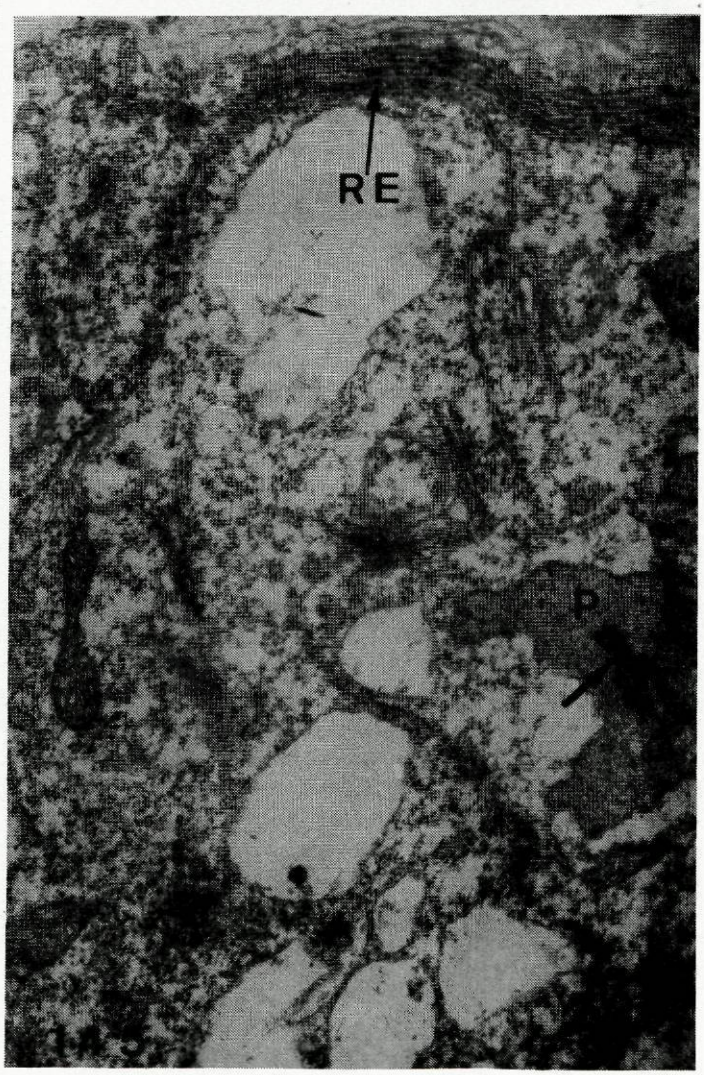
Fig.144 - Micrósporo desenvolvido em meios de cultura com o 2,4-D. As mitocôndrias (M) possuem contornos irregulares, com matriz clara e cristas vesiculares, e os plastídios (P) apresentam acumulações densas (seta). 18 900 X.

Fig.145 - Célula do tapete após 24 horas em meio de cultura, observando-se plastídios (P) com pequenos agregados de túbulos, em corte longitudinal (seta). O retículo endoplasmático (RE) vê-se em perfis membranosos em arranjos paralelos. 21 600 X.


M
M
142


RE
M
143


P
M
144


RE
P
145

ou apenas influenciadas com baixas concentrações de citocalasina B. Com altas concentrações são vários os processos celulares sensíveis a esta droga, como sejam a fagocitose, pinocitose, exocitose, citocinese e ainda vários tipos de movimento celular e dos organelos, bem como alguns processos de transporte através das membranas. A citocalasina B desorganiza ou destrói os microfilamentos e afecta os processos contrácteis (Estensen et al., 1971). Microfilamentos e microtúbulos têm sido relacionados com a forma e movimento da célula (Wessels et al., 1971 ; Perdue, 1973).Além da inibição dos movimentos celulares, a citocalasina B parece impedir também o transporte da glucose através do plasmalema (Lin & Spudich, 1974 ; Jung & Rampal, 1977).

Vários trabalhos têm sido efectuados com a finalidade de se compreender o mecanismo de acção da citocalasina B.

Estudos realizados, por diversos autores, levaram ao conhecimento de que a citocalasina B interfere com os microfilamentos responsáveis também no transporte de vesículas para a membrana plasmática (Mollenhauer & Morré, 1976), assim como na divisão mitocondrial (Kuroiwa & Kuroiwa, 1980).

Com o fim de estudar os efeitos da citocalasina B sobre os organelos citoplasmáticos, no desenrolar da microsporogénese, hastes florais foram colocadas em soluções desta droga nas concentrações 35 e 50 µg /ml, permanecendo aí durante 24, 48 e 72 horas. Como a citocalasina B é pouco solúvel na água, dissolveu-se previamente em DMSO 0,2% como referido no capítulo de Material e Métodos.

Após 24 horas de tratamento as células do estado de tétrada possuíam mitocôndrias de pequenas dimensões e forma mais ou menos arredondada (Fig.146), contrariamente ao que se observou nas tétradas de controlo onde praticamente todas as mitocôndrias surgiam com enclaves citoplasmáticos. Pareceu, portanto, que a citocalasina retardava o aparecimento das formas mitocondriais modificadas. No entanto, no micrósporo já as mi-

tocôndrias apresentavam formas bizarras.

Após 48 horas de tratamento, nos estados da microsporogénese em que se viam imagens sugestivas de grande actividade dos dictiossomas, a citocalasina parecia provocar um aumento no número de vesículas acumuladas ao redor das cisternas desses organelos (Fig.147).

Após 72 horas de tratamento o retículo endoplasmático surgia bastante bem desenvolvido formando perfis finos e longos de cisternas alongadas, dispostos paralelamente e em configuração concêntrica, tipo "nebenkern", observando-se também estes perfis paralelos nas proximidades das mitocôndrias (Fig. 148).

No micrósporo em redução do sistema vacuolar as mitocôndrias eram pequenas e arredondadas, vendo-se assim que a citocalasina não interferiu com a divisão mitocondrial (Fig.149). Nestas células não se observou divisão nuclear. A deposição de material para a formação da parede do grão de pólen não foi afectada.

O sistema complexo de túbulos, que se observava normalmente nos plastídios das células do tapete, apresentava-se muito alterado notando-se apenas algumas lamelas isoladas no estroma (Fig. 150).

A citocalasina B foi adicionada aos meios de cultura, nos quais se inocularam anteras contendo células polínicas no estado de telofase II, de tétrada e de micrósporo jovem, para se estudar a acção da droga na microsporogénese "in vitro".

Tal como se referiu anteriormente para outras drogas também a citocalasina B, quando utilizada em meios de cultura, apresentava um efeito drástico impedindo que a microsporogénese se desenrolasse. Assim, as células inoculadas em estado de tétrada, após 24 horas de tratamento, permaneciam no mesmo estado. Nestas células observavam-se mitocôndrias de matriz condensada, com cristas longas e dilatadas (Fig.151), proplastídios de estroma mais ou menos homogéneo e retículo endoplasmático em perfis membranosos, apresentando cisternas dilatadas lisas ou rugosas.

Tratamentos com citocalasina B

Fig.146 - Tétrada jovem,observando-se mitocôndrias (M) pequenas e arredondadas. Os plastídios (P) são proplastídios,de estroma homogéneo. C-calose. 23 400 X.

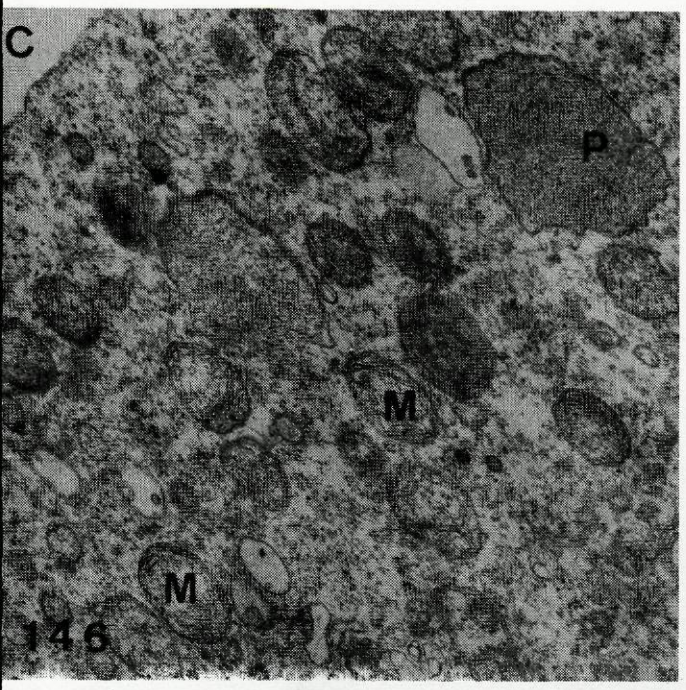
Fig.147 - Micrósporo ao fim de 48 horas de tratamento. Observam-se numerosas vesículas (v) a rodear os dictiossomas (D). 23 200 X.

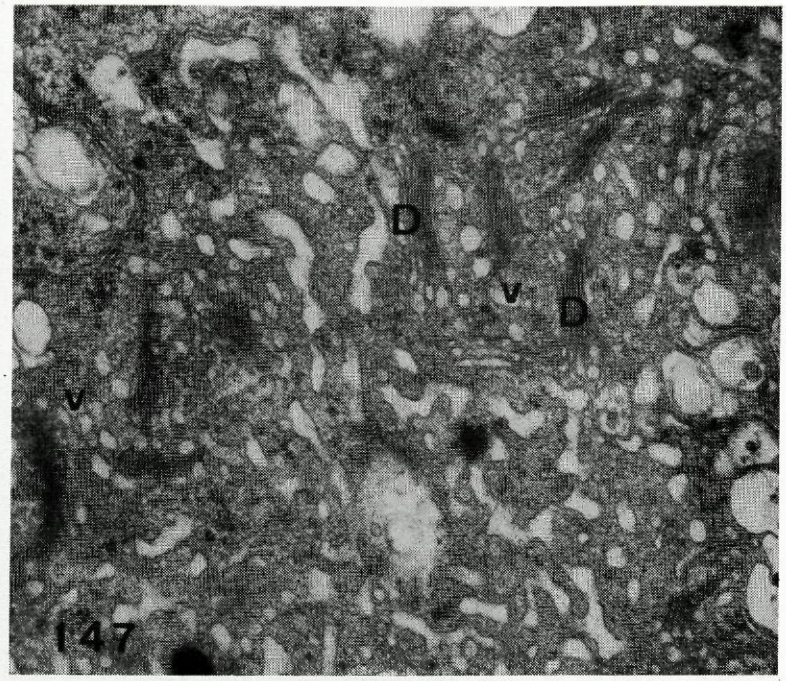
Fig.148 - Micrósporo após 72 horas de tratamento,observando-se perfis de retículo endoplasmático (RE) em conjuntos paralelos,a rodear as mitocôndrias (M). 17 100 X.

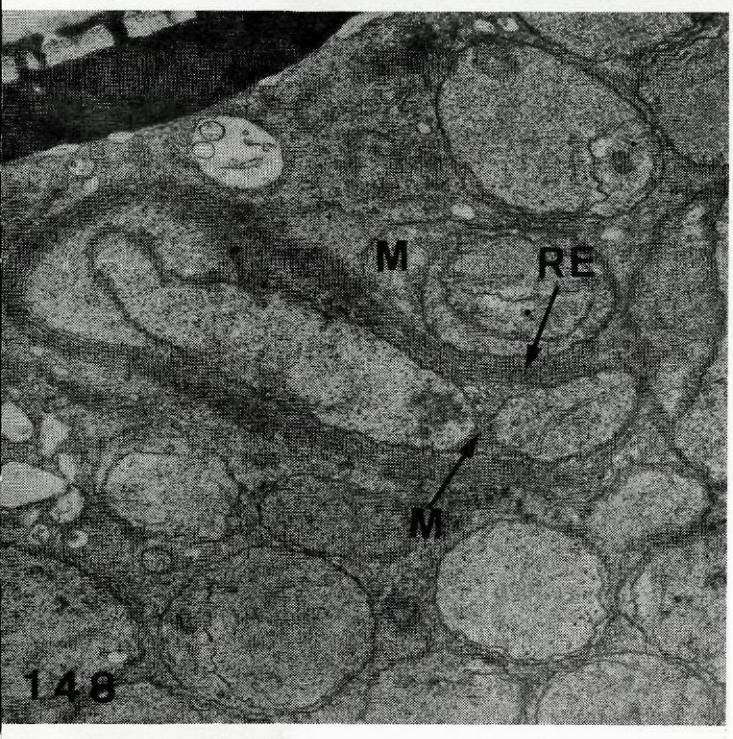
Fig.149 - Micrósporo em regressão do sistema vacuolar. As mitocôndrias (M) são pequenas e arredondadas. P-plastídio. 9 000 X.

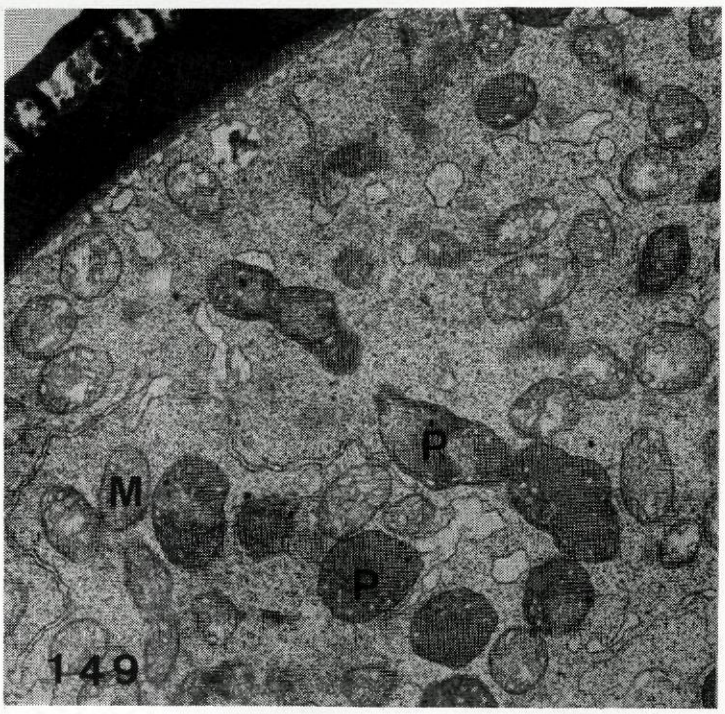
Fig.150 - Porção de uma célula de tapete mostrando um plastídio (P), com desagregação do sistema complexo de túbulos. 23 400 X.

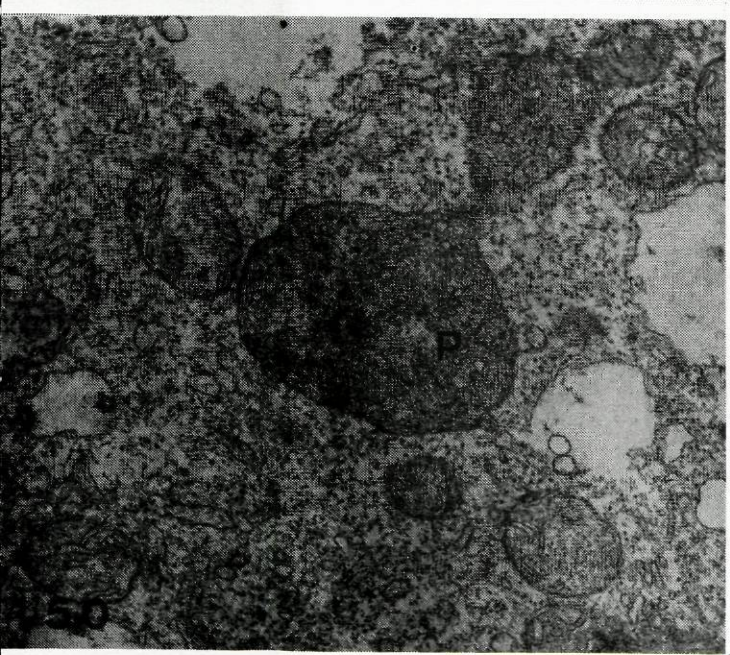
Fig.151 - Tétrada ao fim de 24 horas de permanência no meio de cultura. As mitocôndrias (M) possuem matriz densa e cristas longas e dilatadas. 20 800 X.

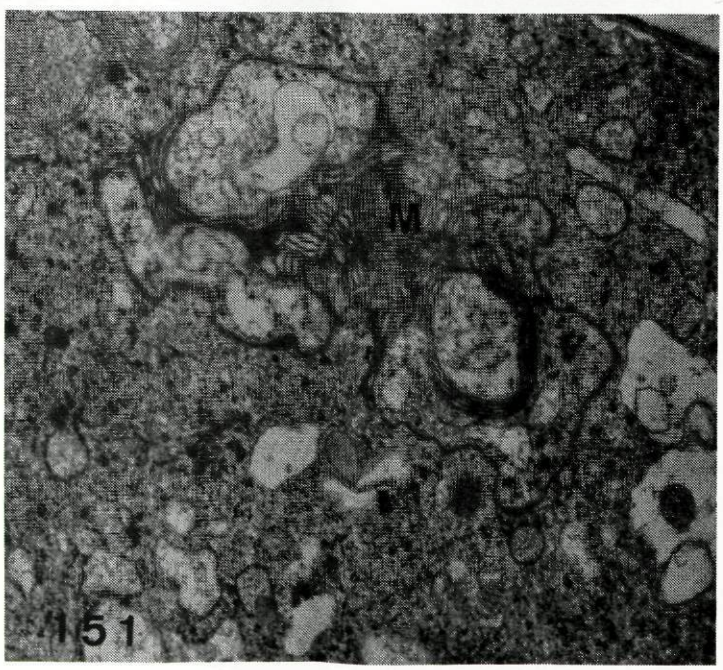

C
P
M
M
146


D
V
D
V
147


M
RE
M
148


P
M
P
149


P
150


M
151

9.7 - Colquicina

A colquicina é um alcalóide extraído de sementes e bolbos de Colchium autumnale L. (Liliaceae). A acção inibitória deste alcalóide sobre a mitose é conhecida desde há vários anos,tem sido usada na produção de poliplóides,e deve-se ao facto de a colquicina se ligar às subunidades de tubulina, evitando assim a sua polimerização para a formação dos microtúbulos do fuso mitótico. A meiose, que ocorre nas células mães do grão de pólen, também é afectada pela acção da colquicina tal como a mitose (Shepard et al.,1974; Roy, 1975 ; Bennett et al.,1979).

Os estudos da acção da colquicina foram efectuados, tanto em células animais como vegetais,tendo-se admitido que são necessárias concentrações relativamente altas para a despolimerização dos microtúbulos citoplasmáticos das células vegetais. Nestes casos, dado que são doses muito elevadas, a colquicina parece afectar várias actividades celulares através de mecanismos,provavelmente, não relacionados com a sua acção directa nos microtúbulos (Hart & Sabnis, 1976).

Numerosos estudos têm descrito a acção da colquicina nos vários aspectos do metabolismo, como seja a respiração e níveis de ATP (Deysson, 1968), síntese de macromoléculas celulares (Kuzmich & Zimmerman, 1972), formação de complexos com o DNA (Ilan & Quastel, 1966) e transporte de material, dado que os microtúbulos estão envolvidos na translocação intracelular de vacúolos de secreção (Moskalewski et al., 1975).

Muitas das alterações induzidas pela colquicina reflectem-se a nível ultrastrutural nomeadamente nas mitocôndrias e retículo endoplasmático (Dexheimer, 1966b ; Mesquita, 1966) e no aparelho de Golgi (Moskalewski et al.,1975).

Tem sido referido que a colquicina induz a formação de feixes de fibrilas no citoplasma e nucleoplasma (Bennett & Smith, 1979b ; Santos, 1979) e até formações cristalinas (Bennett &

Smith, 1979a).

Quando se utiliza a colquicina, experimentalmente, têm de se ter em conta várias situações, que podem interferir com a sua actividade, como sejam: tornar-se inactiva na presença de tampão Tris (Margulis et al., 1969), ter um efeito reversível na presença de mesoinositol (Eigsti & Dustin, 1955) e até apresentar um efeito contrário ao descrito, na presença de vitaminas do complexo B mesmo em baixas concentrações (Deysson, 1968).

O interesse em ensaiar a colquicina, nas anteras de Cucumis sativus L., foi no sentido de estudar o comportamento das mitocôndrias e do núcleo durante o desenrolar da microsporogénese.

Assim, hastes florais foram mergulhadas em soluções de colquicina preparadas quer em água quer em tampão fosfato 0,2 M e pH 6,8. As concentrações utilizadas estão indicadas no capítulo de Material e Métodos.

Estes tratamentos foram efectuados de modo que as soluções de colquicina estivessem em completa obscuridade, pois na literatura existem referências àcerca da fototransformação da colquicina com a formação de um produto, a lumicolquicina (Margulis, 1973), que inibe a acção da colquicina nos microtúbulos.

Ensaiando a colquicina em tampão fosfato verificou-se que as alterações eram mais profundas após menos tempo de tratamento (cerca de 5 horas). Quando se utilizou a colquicina em solução aquosa, ao fim de 24 horas de tratamento, nos micrósporos (Fig.152) observou-se a presença de abundantes dictiossomas constituídos por numerosos sáculos empilhados, parecendo em fraca actividade. As mitocôndrias apresentavam matriz electronodensa, com cristas em número e tamanho reduzido, o retículo endoplasmático surgia muito abundante, quer na forma lisa quer rugosa, e os plastídios eram proplastídios de estroma mais ou menos homogéneo.

Após 48 horas de tratamento os micrósporos (Fig.153) apresentavam o retículo endoplasmático bastante modificado surgindo muito abundante em perfis finos e longos de cisternas empilhadas

e em disposição concêntrica, tipo "nebenkern".

As células do tapete apresentavam no estroma dos plastídios a estrutura complexa de túbulos, observando-se no interior deste sistema a presença de depósitos escuros (Fig.154).

Após 72 horas de tratamento, no micrósporo em fase de redução do sistema vacuolar, verificou-se que a colquicina não inibia a divisão das mitocôndrias (Fig.155) e não se observava divisão nuclear. O retículo endoplasmático surgia também em perfis concêntricos.

Curiosamente verificou-se que tempos superiores a 72 horas (96 horas) induziam uma alteração geral de todo o citoplasma (Fig.156) bem como uma deposição anormal das várias camadas que compõem a parede do grão de pólen. Na Fig.156 pode ver-se, ainda, que a nexina 2 se depositava irregularmente, observando-se zonas só de nexina 1. A nexina 3 e a intina não se tinham formado.

9.8 - Rotenona

A rotenona é um alcalóide extraído de Lonchocarpus nicou (Aubl) D. C. (Leguminosae), tendo sido isolada por Geffroy em 1895. Este alcalóide é correntemente utilizado como insecticida.

A rotenona é quimicamente um composto heterocíclico (constituído por 5 anéis), possuindo substituições metoxi (OCH_3) no sistema em anel do hidrocarboneto aromático (benzóico). É amplamente usada como inibidor específico da respiração mitocondrial, pois bloqueia o transporte de electrões entre a flavoproteína e o citocromo b. Não há, portanto, produção de ATP na respiração aeróbia e admite-se que os responsáveis por essa inibição são os grupos metoxi que entram na composição da rotenona (Burgos & Redfearn, 1965).

A rotenona intervem na divisão das células eucarióti-

Tratamentos com colquicina

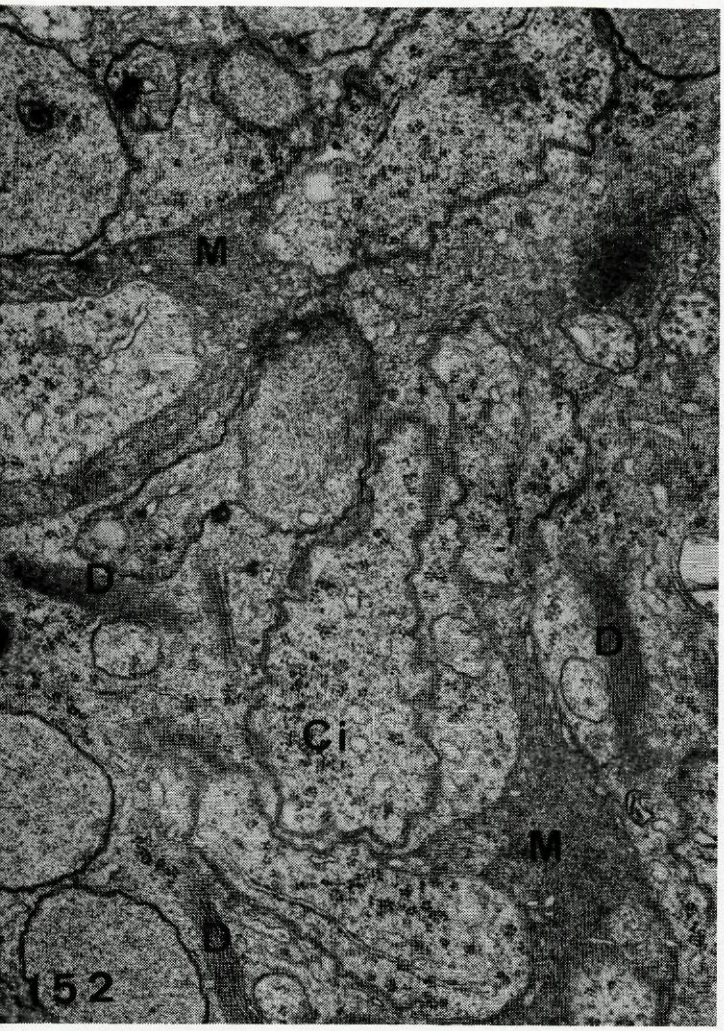
Fig.152 - Micrósporo jovem, após 24 horas de tratamento, observando-se vários dictiossomas (D) e mitocôndrias (M) de grandes dimensões, com enclaves citoplasmáticos (Ci). 22 500 X.

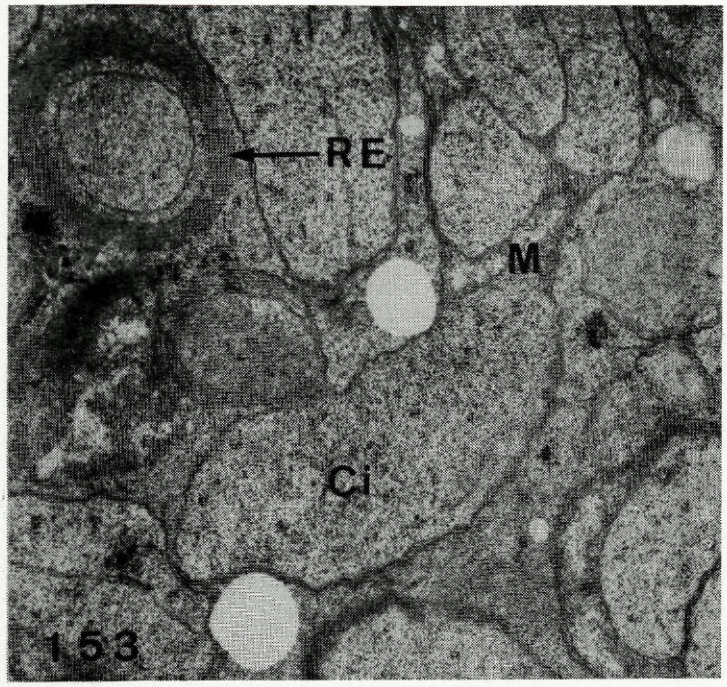
Fig.153 - Micrósporo vacuolizado, após 48 horas de tratamento. O retículo endoplasmático (RE) mostra configuração "nebenkern". M-mitocôndria, Ci-enclave citoplasmático. 15 000 X.

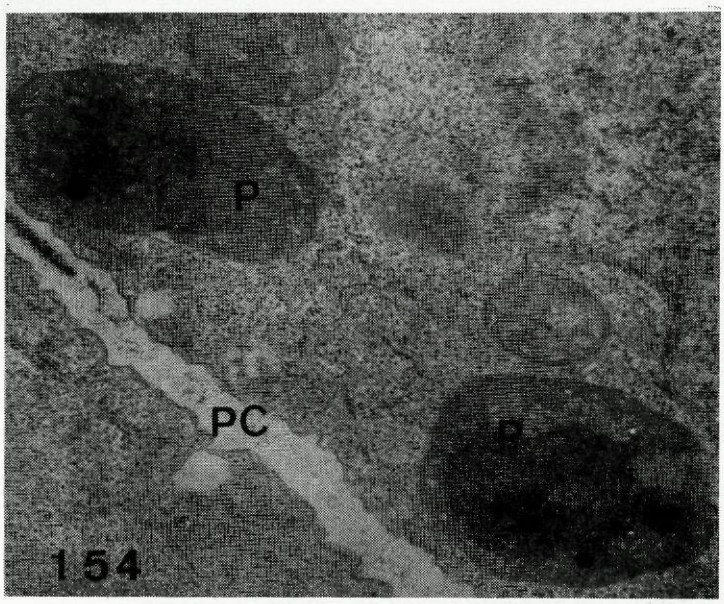
Fig.154 - Células do tapete com 48 horas de tratamento, vendo-se nos plastídios (P) a estrutura complexa de túbulos e a presença de depósitos densos. PC-parede celular. 20 000 X.

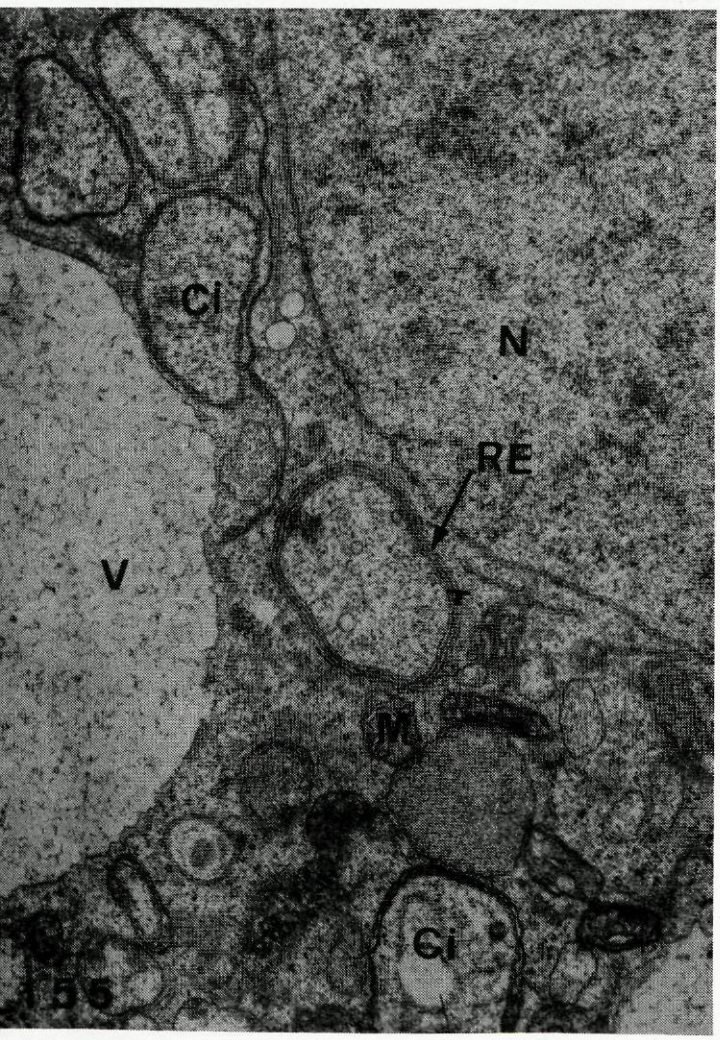
Fig.155 - Micrósporo em regressão do sistema vacuolar, após 72 horas de tratamento. As mitocôndrias (M) estão em divisão e o retículo endoplasmático (RE) observa-se em perfis concêntricos. Ci-enclave citoplasmático, N-núcleo, V-vacúolo. 15 000 X.

Fig.156 - Micrósporo após 96 horas de tratamento, observando-se alteração de todo o citoplasma. O retículo endoplasmático (RE) surge em perfis paralelos e a parede do grão de pólen apresenta uma nexina 2 (n_2) irregular, não se observando nexina 3, nem intina. M-mitocôndria. 22 000 X.


M
D
D
Ci
M
D
152


RE
M
Ci
153


P
PC
P
154


Ci
N
RE
V
M
Ci
155


n2
M
M
RE
156

cas, actuando como inibidor da mitose ao nível da metafase. Desconhece-se se a paragem da mitose será devida a uma inibição directa num estado específico que necessite de energia (Tobey et al., 1969) ou se a rotenona se liga a subunidades proteicas impedindo a construção do fuso mitótico (Meisner & Sorensen, 1966; Brinkley et al., 1974; Barham & Brinkley, 1976a, b). De uma maneira geral a rotenona parece exercer a sua acção sobre as mitocôndrias e microtúbulos.

Ensaiou-se a acção da rotenona mergulhando hastes florais em soluções desse alcalóide na concentração de 5 mg/l, durante períodos de 12, 24, 48, 72 e 96 horas. Como a rotenona é pouco solúvel na água, dissolveu-se previamente em pequeno volume de etanol de modo que a concentração final do etanol na solução usada não ultrapassasse 2%.

Ao fim de 24 e 48 horas de tratamento não se verificaram alterações nítidas. Apenas com 72 horas começaram a surgir várias modificações. Assim, na tétrada jovem (Fig.157) as células apresentavam mitocôndrias de formas amebóides com matriz condensada e cristas dilatadas. O retículo endoplasmático, que normalmente neste estado era pouco abundante, pela acção da rotenona surgia modificado formando perfis longos de cisternas dilatadas, observando-se frequentemente sob a forma circular com citoplasma no interior desse enclave. As células do tapete, correspondentes a este estado da microsporogénese, apresentavam mitocôndrias de pequenas dimensões com cristas dilatadas e plastídios de grandes dimensões contendo no estroma o sistema complexo de túbulos.

No micrósporo em vacuolização (Fig.158) as mitocôndrias possuíam vários enclaves citoplasmáticos e apresentavam matriz clara com cristas muito pouco desenvolvidas tendo a forma de pequenas vesículas. Neste estado de micrósporo a alteração mais visível consistia na modificação das membranas de algumas cristas mitocondriais, observando-se sistemas lamelares, em arranjos paralelos, cujas lamelas eram muito electronodensas medindo entre 6,6-9,0 nm de espessura e as cisternas entre

11,0-13,0 nm. As cristas, assim formadas, tinham o aspecto de uma estrutura aparentemente rígida de lados paralelos. Estas estruturas surgiam nuns casos em disposição rectilínia através da matriz mitocondrial enquanto que noutros casos eram encurvadas, encurvamento esse possivelmente relacionado com as mudanças da forma da mitocôndria. Numa maior ampliação (Fig.159) podem observar-se quatro cristas, aparentemente rígidas, e o interior de cada está preenchido por uma estrutura em arranjo periódico, notando-se também a presença de estrias a ligarem as duas membranas limitantes da crista e fazendo um ângulo de 45°. Na Fig. 158a observam-se as membranas das cristas regularmente onduladas, sendo evidentes as estrias que ligam as duas membranas da crista mitocondrial.

Como se pode observar na Fig.158, as cristas mitocondriais surgem por vezes isoladas ou formando conjuntos de várias cristas subparalelas. Além disso, verificou-se que uma mitocôndria podia possuir vários arranjos de cristas com diferentes orientações, não obedecendo pois ao mesmo alinhamento.

Um corte oblíquo das cristas aparentemente rígidas mostrou uma estrutura cruzada. Nas várias microfotografias (Figs.158 e 159) pode observar-se continuidade destas estruturas aparentemente rígidas com as cristas mitocondriais vulgarmente descritas.

Nas células polínicas, no mesmo estado de desenvolvimento, o retículo endoplasmático liso surgia desenvolvido, observando-se perfis pouco longos de cisternas dilatadas. O retículo endoplasmático rugoso era também abundante, sendo constituído por perfis finos e longos em arranjos paralelos e concêntricos, tipo "nebenkern" (Fig.160).

No micrósporo em fase de redução do sistema vacuolar (Fig. 161) observavam-se mitocôndrias de pequenas dimensões, cujas formas pareciam resultar das mitocôndrias grandes que continham os enclaves citoplasmáticos. A matriz das mitocôndrias apresentava-se pouco condensada e as cristas eram vesiculares.

Tratamentos com rotenona

Fig.157 - Tétrada jovem 72 horas após tratamento. As mitocôndrias (M) são amebóides, com enclaves citoplasmáticos. 21 000 X.

Fig.158 - Micrósporo 72 horas após tratamento. As mitocôndrias (M) apresentam cristas aparentemente rígidas sob a forma de arranjos lamelares e paralelos (setas). D- dictiossoma . 18.900 X. 158a-Grande ampliação para mostrar uma estrutura aparentemente rígida, ligeiramente encurvada. 146 400 X.

Fig.159 - Grande ampliação de uma zona da Fig.158. As cristas mitocondriais apresentam-se modificadas e o interior de cada crista está preenchido por uma estrutura com arranjo periódico. 100 800 X.

Fig.160 - Micrósporo apresentando retículo endoplasmático (RE) muito desenvolvido, em perfis paralelos e concêntricos. 32 400 X.

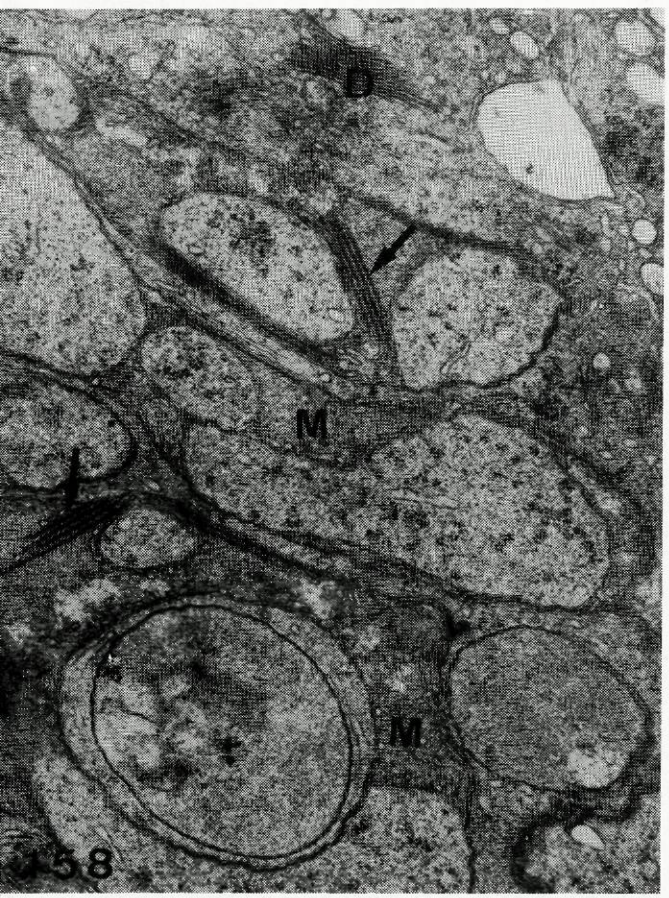
Fig.161 - Micrósporo em regressão do sistema vacuolar, observando-se mitocôndrias (M) de pequenas dimensões e plastídios de estroma mais ou menos homogéneo. 20 700 X.



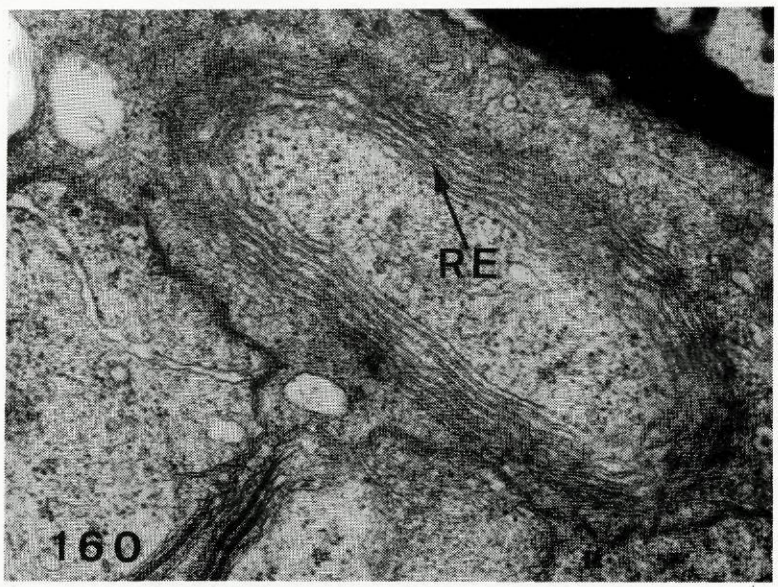
157



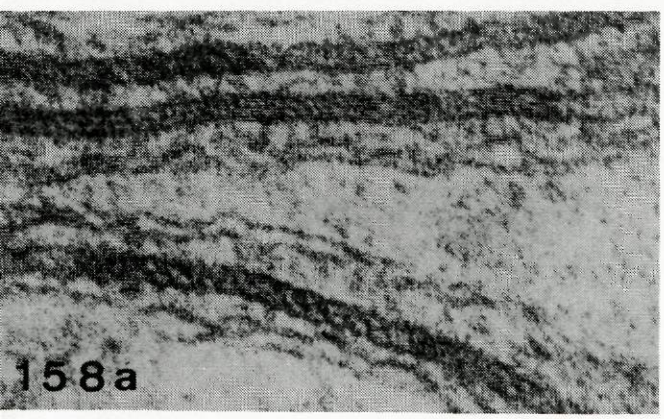
159



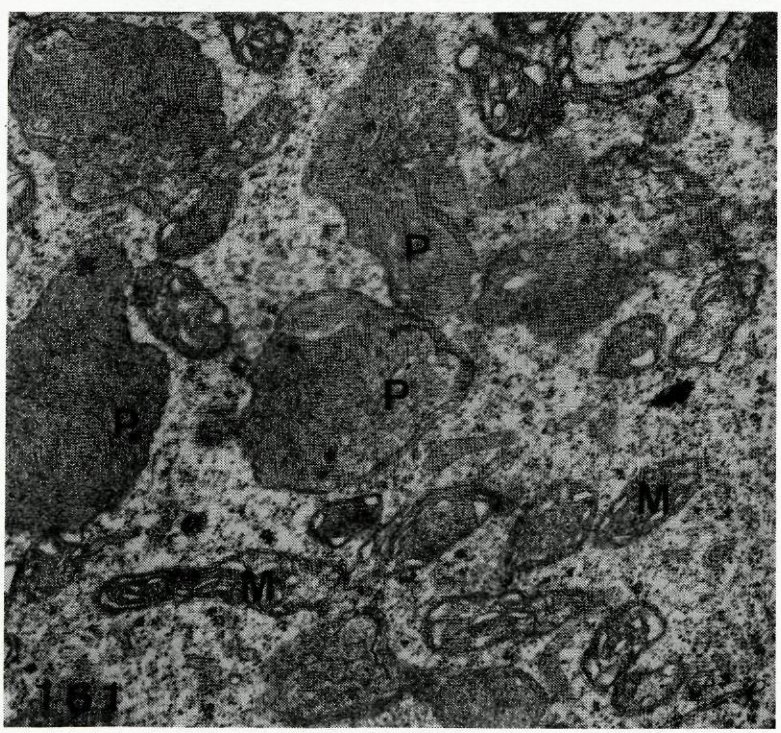
158



160



158a



161

Observaram-se vários micrósporos em fase de redução do sistema vacuolar e apresentavam sempre mitocôndrias de pequenas dimensões, formas arredondadas, matriz mais ou menos condensada e cristas dilatadas. Os plastídios eram proplastídios de grandes dimensões,com estroma mais ou menos homogéneo sem grãos de amido.

A rotenona pareceu inibir a divisão nuclear, neste estado da microsporogénese, pois não se observaram grãos de pólen .

Nas células do tapete os plastídios apresentavam,no estroma,o sistema complexo de túbulos, algumas lamelas isoladas e glóbulos osmiofílicos.

9.9 - Campferol

O campferol foi isolado pela primeira vez de Kaempferia galanga. Presentemente é extraído de algumas Leguminosae e Ranunculaceae ou obtido laboratorialmente por hidrólise do Campferitrósido, que se obtem de folhas de Indigosfera arrecta Benth. .

O campferol é quimicamente um derivado flavónico do grupo das agliconas e exerce a sua acção inibindo algumas reacções que levam à formação de ATP, segundo um efeito dissociador, ou por inibição de uma actividade ATPase mitocondrial.

Koeppe & Miller (1974) estudaram a acção do campferol como inibidor da fosforilação oxidativa.

Têm sido poucos os estudos efectuados sobre o efeito dos flavonóides exógenos nos processos fisiológicos, que se realizam no interior das células. Sedgley (1975) estudou a acção dos flavonóides no grão de pólen e sua influência na germinação do tubo polínico. Este autor, ensaiando várias concentrações de campferol, verificou que altas concentrações (480 mg/l) tinham um efeito inibidor enquanto que baixas concentrações (4,8mg/l) estimulavam a germinação do tubo polínico. Porém, algumas experiências realizadas por outros autores mostraram que o camp-

ferol já na concentração de 14,3 mg/l tinha um efeito inibidor nos movimentos citoplasmáticos e na concentração de 1,43 mg/l estimulava esses movimentos. A inibição era devida a uma paralização dos movimentos citoplasmáticos, pois estes movimentos realizam-se devido à presença de proteínas contrácteis com actividade ATPase. Além disso, a energia necessária para esses movimentos provem do ATP produzido na célula. Uma vez que estas actividades eram inibidas o citoplasma tornava-se mais viscoso parando os movimentos de ciclose e, simultâneamente, ocorriam também alterações secundárias sobre todo o metabolismo celular (Popovici & Reznik, 1976).

Utilizou-se o campferol na concentração de 10 mg/l que se sabia estimular a germinação do grão de pólen. Pensou-se ensaiar este composto nesta concentração, para se estudar as modificações nos organelos citoplasmáticos.

As experiências, que se realizaram, foram efectuadas mergulhando hastes florais numa solução de campferol preparada em tampão fosfato 0,1 M, tendo-se previamente dissolvido numa pequena quantidade de álcool de modo que a concentração final do álcool na solução do tratamento não fosse superior a 2%.

Após 24 horas de tratamento o campferol induzia alterações variadas. Assim, como se pode observar na Fig.162, o micrósporo possuia retículo endoplasmático abundante com os seus perfis longos e finos e os dictiossomas eram constituídos por numerosos sáculos empilhados, aparentemente sem actividade secretora pois não se observaram vesículas nas suas proximidades. Também as mitocôndrias surgiam alteradas, pois embora apresentassem formas bizarras características deste estado da microsporogénese, a sua matriz era condensada com cristas pouco extensas mas dilatadas. No citoplasma destes micrósporos observaram-se abundantes polirribossomas, como se pode ver na Fig. 162 (setas) e em maior ampliação no encaixe da mesma figura.

As células do tapete, correspondentes a esta experiência, não apresentavam sintomas de alteração, observando-se os plastídios com estrutura complexa de túbulos não modificada (Fig.

163).

Ao fim de 48 horas de tratamento, o campferol induzia nos micrósporos a aproximação das membranas do retículo endoplasmático rugoso com o invólucro mitocondrial (Fig.164). Notavam-se também perfis longos de retículo endoplasmático a contornar as mitocôndrias, por vezes numa grande extensão(Fig. 164, setas). Nos enclaves citoplasmáticos das mitocôndrias observou-se a presença de perfis de retículo endoplasmático e igualmente estes perfis apresentavam um localização semelhante aos que se situavam no citoplasma exterior, pois notavam-se em disposição paralela ao invólucro mitocondrial (Fig.164, seta). No encaixe da Fig.164 pode observar-se, em grande ampliação , que a associação retículo endoplasmático-mitocôndria não é do tipo junção pois apenas se vê aproximação das membranas destes dois organelos.

No micrósporo em fase de redução do sistema vacuolar, após 72 horas de tratamento, já não se observavam as associações entre as membranas do retículo endoplasmático e invólucro mitocondrial. O campferol, assim como todos os outros agentes químicos ensaiados, não afectava a divisão das mitocôndrias pois neste estado da microsporogénese observaram-se mitocôndrias de pequenas dimensões e forma mais ou menos arredondada (Fig.165). Ao lado destas mitocôndrias surgiam outras de matriz mais clara e cristas em número reduzido. Os dictiossomas eram formados por numerosos sáculos e pareciam em pequena actividade, dado que, aparentemente, não se observaram vesículas nas suas proximidades.

Num estado mais avançado da microsporogénese os micrósporos apresentavam retículo endoplasmático bastante abundante formando perfis longos e finos em disposição paralela (Fig.166) e as mitocôndrias eram de pequenas dimensões.

Durante a síntese da camada de intina o retículo endoplasmático surgia com cisternas muito dilatadas com material fibrilar no interior (Fig.167).

Nas células do tapete após 72 horas de tratamento observa

Tratamentos com campferol

Fig.162 - Micrósporo após 24 horas de tratamento. As mitocôndrias (M) apresentam matriz densa e cristas de pequenas dimensões, com cisternas dilatadas. Nota-se a presença de polirribossomas (setas) no citoplasma. D-dictiossoma. 13.800 X. No encaixe observam-se os polirribossomas com maior ampliação. 57 000 X.

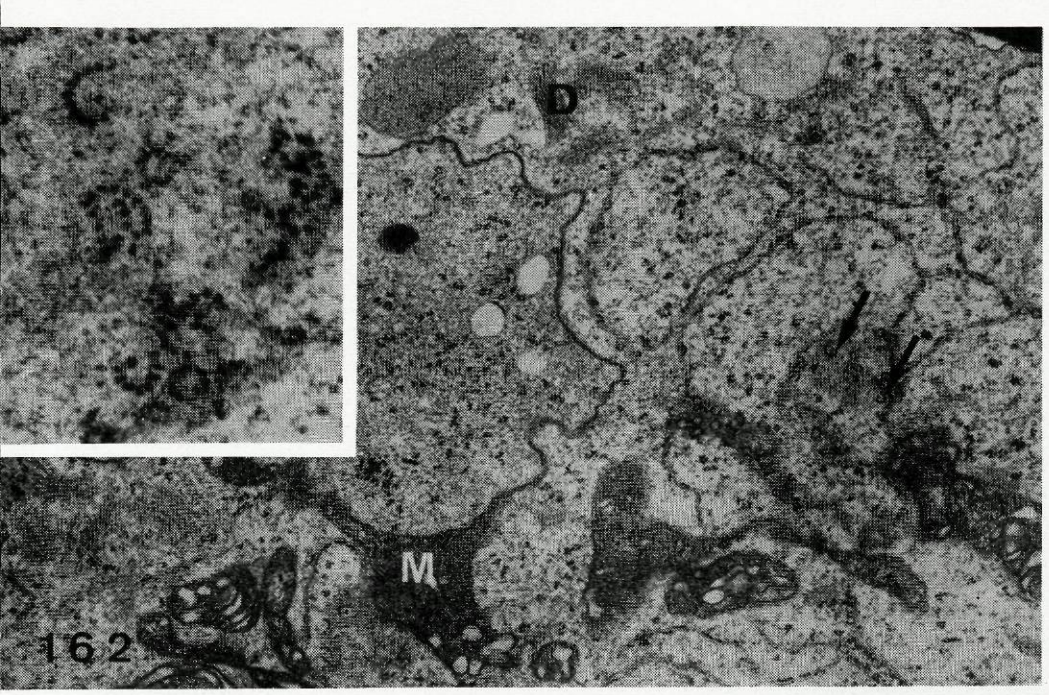
Fig.163 - Porção de célula do tapete, para mostrar o plastídio (P) com a estrutura complexa de túbulos. 12 000 X.

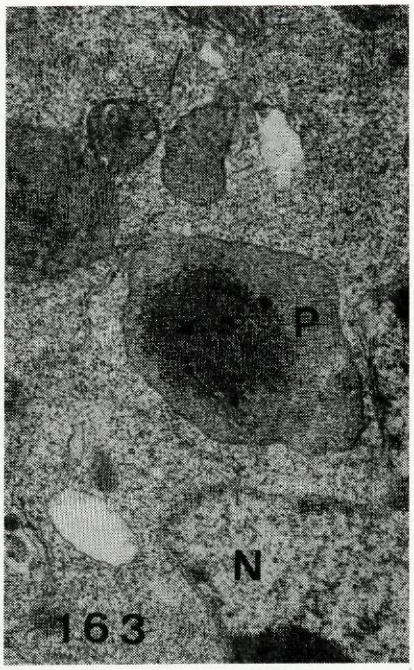
Fig.164 - Micrósporo após 48 horas de tratamento, observando-se perfis de retículo endoplasmático nas proximidades do invólucro mitocondrial, quer do lado exterior (setas), quer no interior do enclave citoplasmático (seta). Ci-enclave citoplasmático, M-mitocôndria, N-núcleo. 18.000 X. No encaixe vê-se em maior ampliação a aproximação do retículo endoplasmático (seta) com o invólucro mitocondrial. Ci-enclave citoplasmático . 79 200 X.

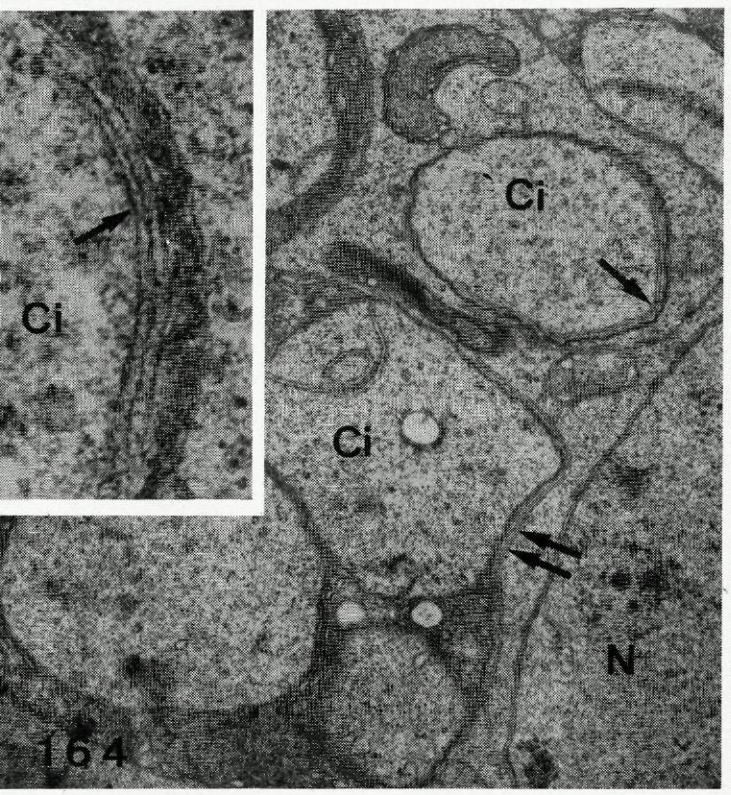
Fig.165 - Micrósporo em redução do sistema vacuolar, ao fim de 72 horas de tratamento. As mitocôndrias (M) apresentam-se com cristas muito dilatadas. P-plastídio, D-dictiossoma. 20 800 X.

Fig.166 - Micrósporo em estado mais avançado de desenvolvimento, observando-se mitocôndrias (M) de pequenas dimensões , plastídios (P) de estroma homogéneo e retículo endoplasmático abundante, em perfis paralelos (RER). 21 600 X.

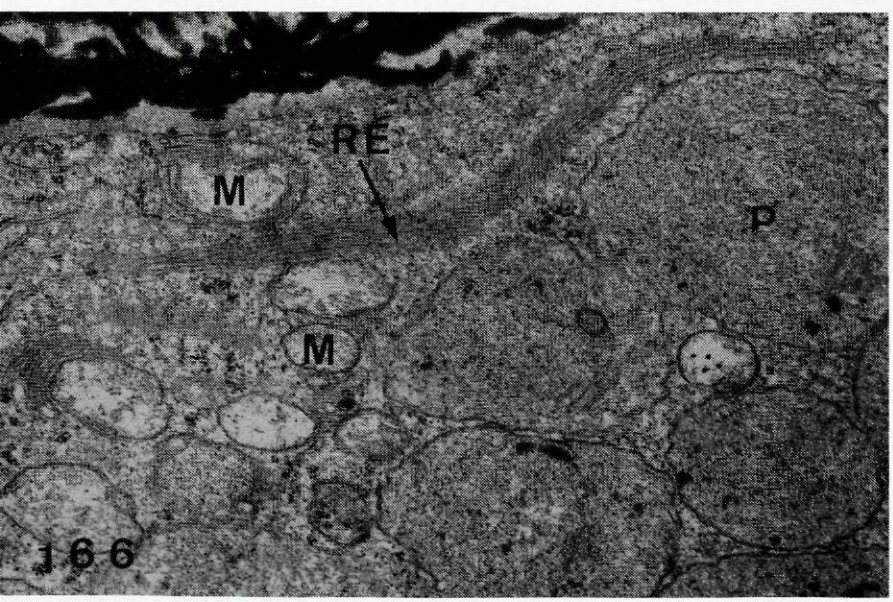
Fig.167 - Micrósporo durante a síntese da camada de intina, observando-se o retículo endoplasmático (RE), com as suas cisternas dilatadas. 31 200 X.


D
M
162


P
N
163


Ci
Ci
Ci
N
164


D
M
M
P
165


RE
M
P
M
166


RE
M
167

ram-se dictiossomas também em fraca actividade, retículo endoplasmático abundante em perfis longos e disposição paralela.As mitocòndrias surgiam com matriz clara e os plastídios possuiam a estrutura complexa de túbulos, semelhante ao corpo prolamelar, quase completamente destruída.

9.10 - Fontes de carbono

Sabe-se que é possível induzir a fosforilação oxidativa,em mitocôndrias isoladas, pela adição de ADP (adenosina difosfato) ao meio (Hackenbrock, 1966). Em células intactas esta adição não tem sido possível dado que as células não são permeáveis ao ADP. No entanto este composto intracelular poderá indirectamente ser produzido, fornecendo monossacarídeos às células. O ADP intracelular produzido será rapidamente refosforilado nas mitocôndrias produzindo ATP.

A fosforilação induzida pela adição da 2-deoxi-D-glucose provoca uma diminuição do Pi intracelular. Devido ao efeito da 2--deoxi-D-glucose na fosforilação oxidativa foram descritas transformações ultrastruturais como o aparecimento de formas condensadas das mitocôndrias (Hackenbrock et al., 1971).

A glucose de igual modo parece ser transportada através das membranas,para o interior da célula,por um processo que simultâneamente fosforila a glucose para glucose-6-fosfato que é a forma como ela aparece no interior da célula.

Têm sido referidos os efeitos de vários compostos carbonados nas células como sendo modificações estruturais das mitocôndrias (Lefort, 1964) e da taxa respiratória (Sharpless & Butow , 1970).

Calvayrac (1970) cultivou células de Euglena gracilis em meios de cultura adicionados de vários compostos carbonados,como o DL-ácido láctico e os ácidos L-glutâmico e DL-málico, e admitiu que estes substratos carbonados afectavam também o condrioma e a taxa respiratória. As células cultivadas em DL-ácido láctico

apresentavam mitocôndrias de formas profundamente alteradas com bastantes ramificações.

Neste trabalho ensaiaram-se dois substratos carbonados com a finalidade de se estudarem os seus efeitos no desenrolar da microsporogénese e ciclo mitocondrial.

9.10.1 - 2-deoxi-D-glucose

Extremidades de hastes florais foram mergulhadas em soluções aquosas de 2-deoxi-D-glucose, nas concentrações de 1,64 g/l e 16,4 g/l durante um período máximo de 48 horas.

Após 24 horas de tratamento observaram-se nos micrósporos mitocôndrias de formas modificadas, semelhantes ao controlo, surgindo com matriz pouco electronodensa e cristas reduzidas.

Após 48 horas de tratamento as mitocôndrias, pertencentes ao grão de pólen jovem (Fig.168), apresentavam forma mais ou menos arredondada e matriz pouco densa em electrões com pequenas cristas. O retículo endoplasmático surgia em perfis pouco longos com cisternas bastante dilatadas e ribossomas nas suas membranas. Normalmente neste estado da microsporogénese surgia amido acumulado nos plastídios no entanto nas experiências com a 2-deoxi-D-glucose não foi observada essa acumulação. Assim, os plastídios apresentavam estroma mais ou menos homogéneo, tipo proplastídio. De salientar a presença de grandes glóbulos semelhantes a lípidos no citoplasma.

A 2-deoxi-D-glucose não interferia com a divisão nuclear, tendo-se formado o grão de pólen jovem possuindo a célula vegetativa e a célula germinativa (Fig.169).

As células do tapete apresentavam alterações dos seus organelos citoplasmáticos idênticas às observadas nas células dos micrósporos e grãos de pólen.

Ensaiou-se a 2-deoxi-D-glucose em culturas de anteras, como indicado no capítulo de Material e Métodos, tendo-se observado que a microsporogénese se desenrolava normalmente não havendo interferência deste composto no ciclo mitocondrial caracterísi

co desta planta.

9.10.2 - Glucose

Hastes florais foram mergulhadas em soluções aquosas de glucose na concentração de 30g/l, durante vários períodos de tempo até um máximo de 48 horas.

Os resultados obtidos não diferiram dos descritos para a 2--deoxi-D-glucose. Igualmente a microsporogénese se desenrolou tendo-se formado o grão de pólen. As mitocôndrias, que ao fim de 24 horas de tratamento eram de grandes dimensões e de formas bizarras, posteriormente deram origem a mitocôndrias de pequenas dimensões e formas mais ou menos arredondadas (Fig.170). No grão de pólen a acumulação de amido nos plastídios não ocorreu e no citoplasma observavam-se grandes glóbulos lipídicos.

As células do tapete possuíam retículo endoplasmático rugoso de cisternas dilatadas, com material no interior (Fig.171). Os plastídios destas células continham o sistema complexo de túbulos em arranjo regular. No estroma destes plastídios observavam-se glóbulos osmiofílicos e algumas lamelas isoladas.

Ensaiou-se a glucose em meios de cultura e verificou-se que ao fim de 7 horas de tratamento as mitocôndrias, presentes nas células em fase de tétrada, eram amebóides e de matriz condensada (Fig.172). Após 24 horas de tratamento os micrósporos possuiam a parede exínica totalmente formada e no seu interior observavam--se plastídios com formações escuras no estroma e todo o citoplasma parecia estar em degenerescência (Fig.173).

As alterações profundas observadas nas anteras, cultivadas em meios de cultura, devem ter sido provocadas pela utilização de uma concentração elevada de glucose.

Tratamentos com 2-deoxi-D-glucose e glucose

Fig.168 - Grão de pólen jovem 48 horas após tratamento com a 2-deoxi-D-glucose. M-mitocôndria, P-plastídio, L-glóbulo lipídico. 12 000 X.

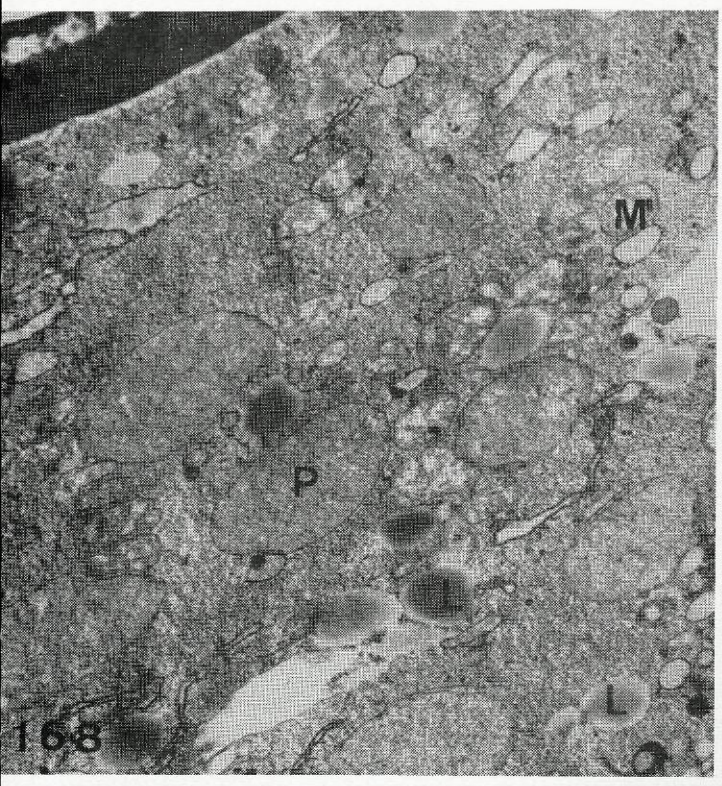
Fig.169 - Idêntico ao anterior, vendo-se a célula germinativa (CG) separada da célula vegetativa (CV) pela parede (pCG) em formação. N-núcleo, L-glóbulo lipídico, P--plastídio, M-mitocôndria. 14 400 X.

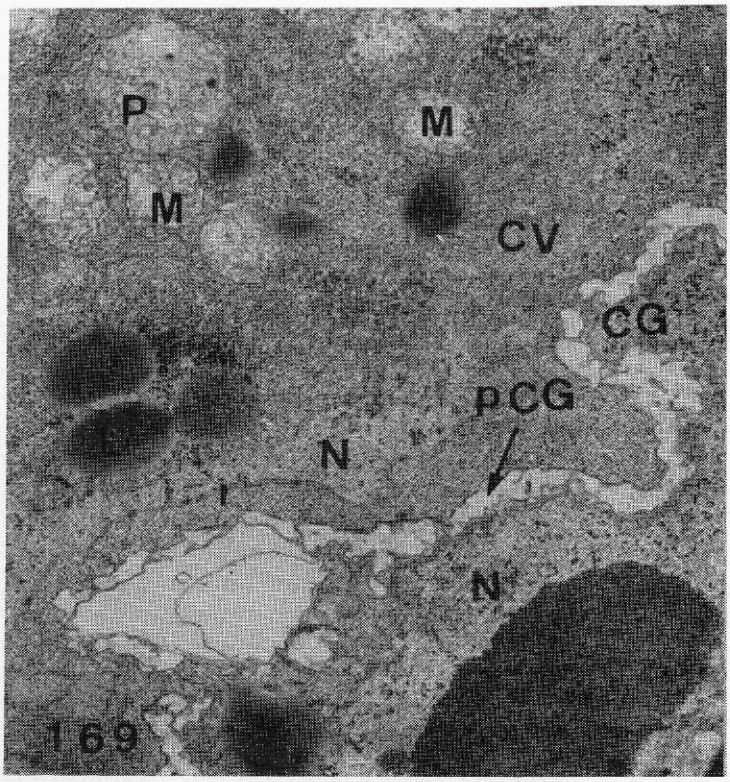
Fig.170 - Grão de pólen jovem ao fim de 48 horas de tratamento com a glucose. N-núcleo, M-mitocôndria, P-plastídio, L-glóbulo lipídico. 23 400 X.

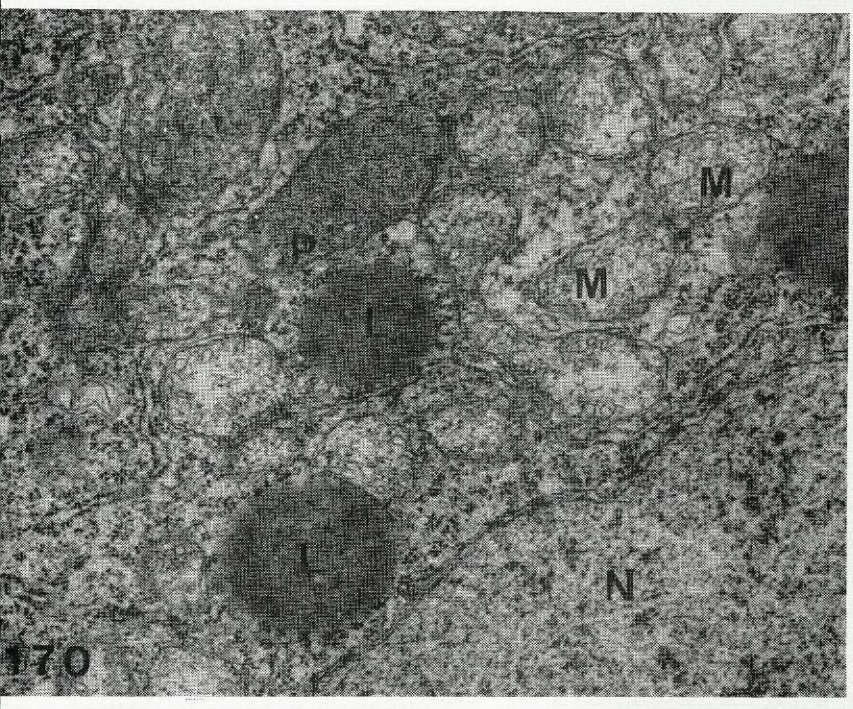
Fig.171 - Porção de uma célula do tapete observando-se a parede celular (PC) e perfis de retículo endoplasmático (RE), com formações densas no interior das cisternas. L-glóbulo lipídico. 25 200 X.

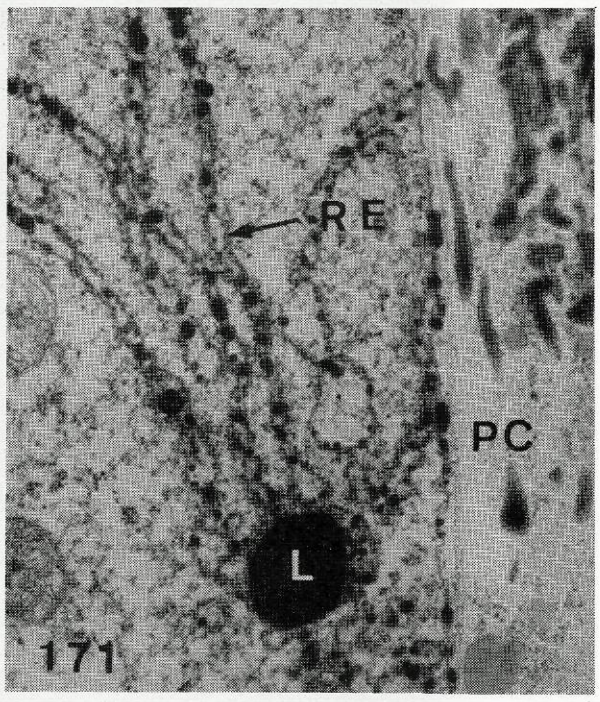
Fig.172 - Tétrada mantida durante 7 horas em meio de cultura adicionado de glucose mostrando mitocôndrias (M), com formas menos irregulares que no controlo. 14 700 X.

Fig.173 - Micrósporos fixados após 24 horas de permanência em meio de cultura adicionado de glucose. O citoplasma está bastante alterado, observando-se formações densas (seta) no estroma dos plastídios (P). D-dictiossoma, M-mitocôndria, N-núcleo. 12 600 X.

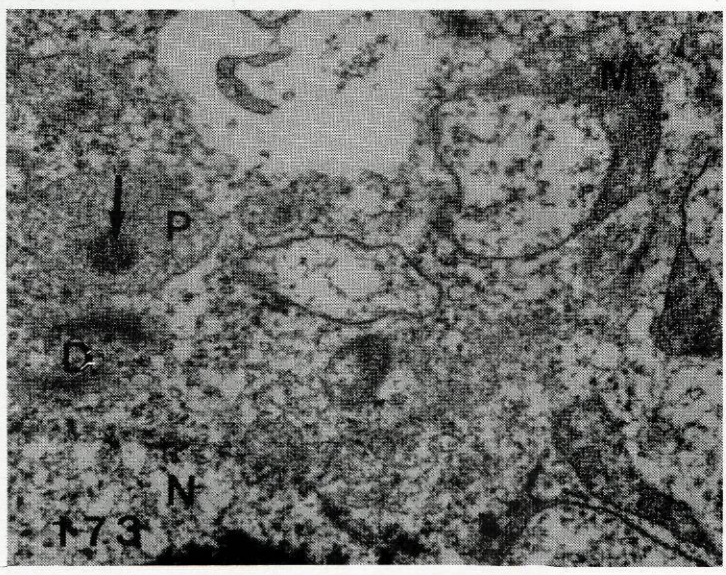

M
P
L
168


P
M
M
CV
CG
PCG
N
N
169


M
P
M
L
N
170


RE
PC
L
171


M
M
172


M
P
D
N
173

IV DISCUSSÃO

Microsporogénese

O estudo, ao microscópio electrónico de varrimento, da anatomia do androceu de Cucumis sativus L. permitiu confirmar que é constituído por estames tridelfos cujas anteras apresentam morfologia externa e interna que diferem dos esquemas normalmente apresentados para a maioria das angiospérmicas. As anteras possuem forma de S, são monotécicas ou monolobadas e o lóbulo é constituído por dois microsporângios ou sacos polínicos.

Este trabalho descreve os estudos efectuados durante o desenrolar da microsporogénese, desde os meiócitos até ao grão de pólen maduro.

Sabe-se que durante a meiose ocorrem modificações no citoplasma e desde há muito que estes fenómenos têm vindo a ser estudados. Guillermond (1920) referiu-se à presença e modificações de um condrioma que, segundo este autor, era constituído por um conjunto de plastídios e mitocôndrias, com um ciclo de agregação e dispersão destes organelos em meiócitos de Lilium. Wagner (1927) considerou uma descontinuidade na presença destes organelos, admitindo que novas gerações de condriossomas se formaram a partir do citoplasma, durante o desenvolvimento dos meiócitos.

Py (1932) realizou estudos intensivos em meiócitos de várias espécies de angiospérmicas (Monocotiledoneae e Dicotiledoneae) e verificou que os organelos que constituiam o "condrioma" aumentavam em número na fase pré-meiótica e no início da meiose entravam na "fase granular" até ao fim da telofase II. Durante esta fase, estes organelos eram pequenos e desdiferenciados e não havia amido nos plastídios. No fim desta "fase granular" ocorriam no citoplasma grandes modificações, tais como multiplicação dos organelos e síntese de amido nos plastídios.

O microscópio electrónico tornou possível o estudo das modificações estruturais dos organelos durante a meiose e permitiu verificar que a "fase granular", apresentada por Py (1932),

correspondia a uma desdiferenciação das mitocôndrias e plastídios havendo sempre uma continuidade destes organelos, contrariamente ao admitido por Wagner (1927). Estudos ultrastruturais revelaram também que muitas das modificações do condrioma, apresentadas por Guillermond, eram resultantes de um ciclo de agregação e dispersão na população dos glóbulos lipídicos que surgiam nos meiócitos (Heslop-Harrison & Dickinson, 1967).

As primeiras observações em microscopia electrónica foram realizadas em Tradescantia, por Bal & De (1961), e mostraram que, durante a profase I, as mitocôndrias eram de pequenas dimensões, de formas esféricas e sem cristas e os plastídios eram eliminados durante esta fase reaparecendo, como corpos pleomórficos, no fim da meiose.

Vários autores (Maruyama, 1968; Dickinson & Heslop-Harrison, 1970b; Luck & Jordan, 1980; Dickinson, 1981; Rashid et al., 1982) mostraram que as mitocôndrias e os plastídios existiam durante todo o ciclo meiótico, embora sofressem uma desdiferenciação e rediferenciação fenómenos esses relacionados com as modificações nucleares. Bird e colaboradores (1983) estudaram o comportamento dos organelos citoplasmáticos, durante a meiose em Lilium, e concluíram que o ciclo de desdiferenciação e rediferenciação observado era independente do controlo nuclear. Luck & Jordan (1980) admitiram que as variações na forma e volume das mitocôndrias, durante a meiose, reflectiam variações na respiração, possivelmente, fosforilação oxidativa e outras modificações metabólicas. Além do ciclo de transformações, referentes às mitocôndrias e plastídios, vários investigadores a nível de microscopia electrónica verificaram que durante a profase I se assistia, no citoplasma dos meiócitos, a uma perda de afinidade para os corantes básicos (Py, 1932). Painter (1943) admitiu que este facto era devido provavelmente a uma redução de RNA. Posteriormente, observações efectuadas ao microscópio electrónico (Mackenzie et al., 1967; Dickinson & Heslop-Harrison, 1970a) mostraram uma eliminação de RNA citoplasmático durante a profase I e um posterior restabelecimento da população de ribosso-

mas na metafase I.

Durante a megasporogénese também têm sido descritos,na literatura da especialidade, fenómenos de desdiferenciação e rediferenciação dos organelos citoplasmáticos, característicos dos meiócitos (Dickinson & Potter, 1978 ; Medina et al.,1981).

Nos meiócitos de Cucumis sativus L. assistiu-se a modificações estruturais dos plastídios e mitocôndrias e a uma diminuição da população de ribossomas no citoplasma.

Os resultados obtidos durante a meiose foram concordantes com os descritos, referentes à diminuição dos ribossomas durante a profase I. Em Cucumis sativus L., durante a diacinese,observou-se uma reduzida população de ribossomas e na meiose II assistiu-se a um início de restabelecimento dessa população.

No estádio de interfase observaram-se no citoplasma uns corpos de grandes dimensões, semelhantes a nucléolos. Também Heimlich (1929) verificou,nos meiócitos binucleados de Cucumis sativus L.,a presença de nucléolos extranucleares. Estes corpos têm sido designados nucleoloides (Dickinson & Heslop-Harrison, 1970a). Segundo certos autores, estes corpos tendem a desintegrar-se,posteriormente,para originarem os ribossomas (Dickinson & Heslop-Harrison, 1970a; Williams et al., 1973 ; Bird et al., 1983). Nas gimnospérmicas, a origem dos ribossomas tem sido atribuída a modificações especializadas do invólucro nuclear (Dickinson & Bell, 1970 ; Dickinson & Potter, 1975).

Em Cucumis sativus L. , como se referiu atrás, a partir da interfase observou-se o início do restabelecimento da população de ribossomas, surgindo livres ou associados em hélice ou espiral. A presença de ribossomas em arranjos helicoidais foi descrita por Echlin (1965), em meiócitos de Ipomoea purpurea (L.) Roth, que admitiu tratar-se de um processo de grande produção de proteínas que estas células necessitam para a sua divisão e diferenciação. Ribossomas em hélice foram descritos em células em desenvolvimento (Behnke, 1963 ; Waddington & Perry,1963) e em células maduras (Wooding, 1968).

No início da meiose os plastídios surgiam em estado desdiferenciado, observando-se proplastídios de estroma homogéneo. Porém, durante a diacinese começavam a sintetizar amido e, embora algum fosse degradado durante a metafase I, os proplastídios conservavam a sua natureza amiloplástica até ao fim da meiose II. Estes nossos resultados foram semelhantes aos apresentados por Maruyama (1968) que observou, nos meiócitos de Tradescantia, uma desdiferenciação dos plastídios durante a profase I, começando a sintetizar amido nos passos finais desta fase (diacinese) e conservando a sua natureza amiloplástica até ao fim da meiose. Outros autores como Dickinson & Heslop-Harrison (1970b) e Luck & Jordan (1980), nos meiócitos de Lilium longiflorum e Hyacinthoides non scripta respectivamente não observaram amido durante a meiose, observando-o apenas a partir do estado de micrósporo jovem.

Na espécie em estudo, as mitocôndrias apresentavam modificações profundas da forma e volume durante a microsporogénese. A interfase de meiose surgia como um estádio muito importante, dado que começavam a aparecer modificações na forma das mitocôndrias. Durante a meiose I estes organelos possuiam pequenas dimensões e formas mais ou menos esféricas, e a partir da interfase de meiose começavam a aumentar de volume e a adquirir formas amebóides. As mitocôndrias apresentavam-se encurvadas, parecendo ocorrer um crescimento das extremidades que posteriormente se uniam. A partir deste estádio assistiu-se a um progressivo aumento de volume das mitocôndrias, adquirindo formas bastante irregulares e englobando várias áreas de citoplasma.

Não existem na literatura estudos ultrastruturais da microsporogénese em Cucumis sativus L. . Apenas Heimlich (1929), com o microscópio óptico, estudou os meiócitos de Cucumis sativus L. e observou mitocôndrias de grandes dimensões nos meiócitos binucleados, apresentando dimensões máximas na telofase II. Aquele autor não observou fases posteriores da microsporogénese pois senão teria certamente verificado que as mitocôndrias

atingiam as suas maiores dimensões no estado de micrósporo vacuolizado.

Durante a telofase II, além das mitocôndrias modificadas e da acumulação de amido nos plastídios, surgiam dictiossomas muito activos e abundantes perfis de retículo endoplasmático rugoso. Além disso, observavam-se perfis de membranas morfologicamente semelhantes a estruturas denominadas lamelas anuladas. Perfis semelhantes foram também observados no estado de tétrada em Lilium longiflorum (Dickinson, 1971a) e na meiose e estado de tétrada em Canna generalis (Scheer & Franke, 1972). Estes autores admitiram que tais estruturas desempenham importante papel em vários processos de síntese para o crescimento do gametófito.

No estado de tétrada observou-se o início de deposição de material exínico ao redor dos micrósporos, entre o plasmalema e a camada de calose. Porém, para a delimitação do local dos poros, não observamos a presença de retículo endoplasmático rugoso junto ao plasmalema, tal como foi referido por Heslop-Harrison (1963b) e Godwin (1968).

À medida que a microsporogénese se desenrolou o retículo endoplasmático foi gradualmente aumentando e no grão de pólen surgiu muito abundante com polirribossomas nas suas membranas. A partir das nossas observações e também das várias funções que têm sido atribuídas ao retículo endoplasmático, parece poder afirmar-se que, durante a microsporogénese, o RE exerce três funções fundamentais:

- formação do sistema vacuolar
- transporte de material para a formação da camada de intina de natureza polissacarídica
- produção de proteínas necessárias ao crescimento do tubo polínico.

Os plastídios, após a meiose, surgiam num estado desdiferenciado, sendo proplastídios de estroma mais ou menos homogéneo apresentando algumas lamelas isoladas e plastoglóbulos. No grão

de pólen jovem a amilogénese processou-se de novo, sendo de assinalar a presença de plastídios com grãos de amido na célula vegetativa e na célula germinativa.

Estes resultados foram ligeiramente diferentes dos que existem na literatura da especialidade acerca do período de síntese de amido. Hoefert (1969) em Beta vulgaris observou amido apenas até ao micrósporo vacuolizado. Maruyama (1968) em Tradescantia verificou a presença de amido durante a microsporogénese, excepto na célula germinativa do grão de pólen. Dupuis (1974) em Impatiens e Sangwan & Camefort (1982) em Datura observaram acumulação de amido somente a partir do grão de pólen. Os resultados apresentados por estes autores diferem dos obtidos em Cucumis sativus L. pois nas espécies que estudaram a célula germinativa ia perdendo os seus plastídios que não sintetizavam amido. No presente estudo, pelo contrário, observou-se amido nos plastídios da célula vegetativa e da célula germinativa.

O aparelho de Golgi, formado por numerosos dictiossomas após a meiose, apresentava uma variação na actividade metabólica parecendo coincidir com as fases de formação da parede do grão de pólen. Durante a vacuolização do micrósporo os dictiossomas produziam numerosas vesículas que pareciam aumentar de volume à medida que se afastavam das cisternas. Provavelmente estas vesículas terão também um papel importante na formação do sistema vacuolar tal como o retículo endoplasmático. No micrósporo em fase de divisão nuclear observaram-se numerosos dictiossomas, junto ao plasmalema, provavelmente intervindo na formação de uma camada de polissacarídeos que se deposita entre a nexina 3 e o plasmalema, denominada intina.

No grão de pólen o citoplasma era muito rico em organelos pois as mitocôndrias observavam-se em maior número, embora de pequenas dimensões, o retículo endoplasmático era muito abundante, os dictiossomas produziam numerosas vesículas e os plastídios começavam a acumular amido. No grão de pólen maduro parecia ocorrer uma desintegração dos elementos que constituíam

os dictiossomas. Este fenómeno possivelmente corresponde a um estado de desidratação que ocorre no pólen maduro. No pólen binucleado o retículo endoplasmático surgia muito abundante com numerosos polirribossomas e este facto corresponde certamente à necessidade de produção de proteínas necessárias ao crescimento do tubo polínico.

Durante o desenrolar da microsporogénese, no período compreendido entre a dissolução da camada de calose até à formação do grão de pólen jovem, o sistema vacuolar sofreu modificações distinguindo-se duas fases sucessivas - a de vacuolização e a de redução do sistema vacuolar.

Vacuolização

Têm sido extensos os estudos no sentido de compreender o processo de vacuolização nas células vegetais mas no essencial têm-se desenvolvido duas correntes quanto à sua origem.Uma que defende que os vacúolos derivam de uma hipertrofia do retículo endoplasmático (Whaley et al., 1960; Buvat, 1963; Poux , 1961, 1962; Mesquita, 1969 ; Risueño et al., 1970), e uma outra em que os vacúolos se originam a partir dos dictiossomas (Marinos, 1963).

Mühlethaler (1958) observou células fixadas pelo permanganato de potássio e admitiu que os vacúolos se formavam pela separação,no seio do citoplasma,de uma fase aquosa que inicialmente estaria rodeada por uma membrana e rejeitou todo a relação entre o sistema vacuolar e o retículo endoplasmático admitindo uma origem citoplasmática.Esta corrente não tem sido seguida.Silverberg & Sawa (1974) ao estudarem a vacuolização em Nitella flexilis sugeriram que o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi podiam intervir no processo de vacuolização. Estes resultados são concordantes com os que se obtiveram no presente estudo, admitindo-se também que o retículo endoplasmático e os dictiossomas desempenham um papel na origem dos vacúolos.

Tem-se atribuído aos vacúolos um papel preponderante nopro

cesso de crescimento celular dado que as células meristemáticas primárias possuem pequenos vacúolos que no decorrer da diferenciação celular se vão hiperatrofiando e posteriormente confluem originando um grande vacúolo, reduzindo o citoplasma a uma camada periférica, tal como acontece no micrósporo vacuolizado. São ainda os vacúolos que concorrem activamente na renovação do citoplasma, sequestrando regiões ou organelos destinados a serem destruídos.

Os vacúolos observados nos micrósporos apresentavam, como se verificou pela localização citoquímica, a actividade da fosfátase ácida e de ATPase.

Redução do sistema vacuolar

Após a formação de um grande vacúolo assistiu-se à sua fragmentação em pequenos vacúolos, notando-se frequentemente uma retracção do tonoplasto penetrando no interior do vacúolo. Observaram-se invaginações da própria membrana, de tamanho e formas variadas, que por constrição originaram vesículas no interior do próprio vacúolo.

São escassas as referências acerca dos mecanismos que presidem à redução do vacuoma dos micrósporos. Abreu & Dexheimer (1973) admitiram uma explicação para este processo que se assemelha à descrita por Camefort (1971) na célula central e oosfera de Cryptomeria japonica (Taxodiaceae) . Segundo aqueles autores, a diminuição do volume do vacuoma era devido a uma retracção centrípeta do tonoplasto e o espaço deixado livre era invadido por citoplasma. Audran (1979), em Ceratozamia mexicana (Cycadaceae), admitiu uma fragmentação do tonoplasto e uma posterior invasão das vesículas provenientes do tonoplasto, e não do citoplasma, para a cavidade vacuolar principal. Em Cucumis sativus L. as vesículas observadas no interior do vacúolo principal, provavelmente, derivaram de fragmentações do tonoplasto. No entanto, como ocorreram também invaginações do próprio tonoplasto, as áreas anteriormente ocupadas pelo vacúolo, antes da retracção do tonoplasto, foram invadidas pelo citoplasma.

Durante a microsporogénese, em Cucumis sativus L., ocorreu um facto a salientar que foi o aparecimento de mitocôndrias bizarras, atingindo dimensões muito grandes e formas bastante irregulares.

Como se referiu atrás, as mitocôndrias começavam o seu ciclo de transformações no estado de meiose II observando-se formas amebóides e formas encurvadas em taça que encerravam uma área de citoplasma. Na área do citoplasma aprisionado observavam-se ribossomas livres ou ligados a membranas do retículo endoplasmático e ainda polirribossomas helicoidais. Estas formas de polirribossomas começaram a surgir no citoplasma durante a interfase de meiose e observaram-se até ao estado de micrósporo vacuolizado.

À medida que a microsporogénese se desenrolava, as mitocôndrias aumentavam enormemente de volume e adquiriam formas bizarras englobando várias áreas de citoplasma. A partir do momento da divisão nuclear, que ocorria nos micrósporos, as mitocôndrias iam entretanto adquirindo formas menos complexas, aparentemente preparatórias da divisão por constrição, originando-se mitocôndrias de pequenas dimensões e formas mais ou menos arredondadas.

A partir de cortes seriados traçaram-se perfis de mitocôndrias, apresentando-se os resultados relativos a duas mitocôndrias cujos perfis foram traçados considerando-se várias secções de corte. Pelos perfis obtidos concluí-se que estes organelos, pertencentes ao micrósporo vacuolizado, são de grandes dimensões englobando vários enclaves citoplasmáticos de formas irregulares. Verificou-se que estes enclaves não estão em ligação com o citoplasma exterior.

A análise estereológica das mitocôndrias, pertencentes a células no estado de célula mãe, tétrada, micrósporo e grão de pólen, mostrou que o volume mitocondrial total (matriz mais enclaves) em relação ao volume celular total aumentou atingindo um

máximo no micrósporo vacuolizado. No grão de pólen o valor de Vv (mitocôndria total) e o valor de V'v (matriz mitocondrial) eram iguais o que significa que, neste estado, as mitocôndrias não possuiam enclaves citoplasmáticos.

Bendich & Gauriloff (1984) apresentaram também uma análise morfométrica das mitocôndrias, pertencentes a células de diferentes tecidos em várias espécies de Cucurbitaceae, tendo verificado que as mitocôndrias presentes nas células dos cotilédones, folhas e hipocótilos apresentavam forma ovóide e pequenas dimensões mas surgiam em número muito grande, po exemplo cerca de 2 000 em Citrullus vulgaris. Nas células do meristema apical observaram apenas 7 ou 8 mitocôndrias por célula, porém de grandes dimensões, apresentando a forma de retículo mitocondrial muito ramificado. Tal como estes autores verificaram, também durante o desenrolar da microsporogénese se assistiu a uma grande variação no número de mitocôndrias observadas. Assim, em Cucumis sativus L., o número destes organelos pertencentes a células em telofase II era cerca de 132, diminuindo para 36 no estado de tétrada e para 6 no estado de micrósporo vacuolizado; posteriormente esse número aumentou tendo-se obtido cerca de 80 mitocôndrias nas células em estado de grão de pólen jovem.

O presente estudo revelou-se de interesse pois no desenrolar da microsporogénese nas outras espécies de angiospérmicas, ao contrário do que acontece em Cucumis sativus L., as mitocôndrias descritas são sempre organelos de pequenas dimensões com cristas mais ou menos desenvolvidas embora adquiram formas amebóides e alongadas no estado de micrósporo vacuolizado, dando origem por divisão a mitocôndrias pequenas e com cristas bem desenvolvidas (Abreu & Dexheimer, 1973).

Mitocôndrias semelhantes às observadas em Cucumis sativus L. foram descritas tanto em células animais como vegetais. Em células animais foram descritas no fígado de rato (Stephens

& Bills, 1965) e em oócitos de bovinos (Senger & Saacke, 1970). Em células vegetais, em condições normais, foram referidas durante o desenvolvimento da oosfera em Pteridium aquilinum (Bell & Mühlethaler, 1964 ; Tourte, 1975), em células esporogénicas de alguns musgos (Eymé & Suire, 1969) e durante a embriogénese de Pinus silvestris (Thomas, 1973). Mitocôndrias de formas semelhantes foram também referidas em células quando submetidas a determinados factores externos, nomeadamente em meristema radicular de Allium cepa após tratamento com a colquicina (Mesquita, 1966); células HeLa após tratamento com o brometo de etídio (Klietmann et al., 1973a); meristema radicular de Allium cepa (Risueño et al., 1975) e no tecido caloso de culturas de Streptanthus tortuosus quando submetidos a várias condições de temperatura (Endress & Sjolund, 1976). Estes autores relacionaram as alterações observadas nas mitocôndrias com as condições anormais em que se desenvolviam as células. Assim, Stephens & Bills (1965) sugerem uma relação directa entre a superfície da mitocôndria e o citoplasma aprisionado, facilitando a troca de produtos metabólicos; Mesquita (1966) admite uma possível mobilização de ATP pela colquicina e consequente perturbação da cadeia respiratória, produzindo assim alterações nas mitocôndrias; Tourte (1975) sugere que estas formas traduzem um estado transitório devido a anoxia e Endress & Sjolund (1976) referem que as alterações, produzidas nas mitocôndrias, são devidas a condições de stress e senescência provocadas pelas variações de temperatura a que estiveram sujeitas as células em cultura.

Existem na literatura imagens, de microscopia electrónica, de perfis mitocondriais bastante sinuosos e a análise tridimensional efectuada, a partir de cortes seriados, revelou que esses perfis pertenciam apenas a uma ou um número muito reduzido de mitocôndrias profundamente ramificadas. Este facto levou vários investigadores a designar todo o conjunto por retículo mitocondrial. Situações como estas foram descritas em Euglena (Pellegrini & Pellegrini, 1976 ; Pellegrini, 1978, 1980),

em algas verdes (Atkinson et al., 1974 ; McFadden & Wetherbee, 1982), em leveduras (Hoffman & Avers, 1973 ; Stevens, 1977),em Polytomella (Burton & Moore, 1974), em Trypanosomatids (Paulin, 1975), em raízes de Oryza e Cucurbita pepo (Vartapetian et al., 1977) e em culturas de tecidos de Ginkgo (Rohr, 1978).

O comportamento do retículo mitocondrial foi seguido durante todo o ciclo celular e os resultados descritos apontam para a sua presença apenas durante o crescimento da célula, fraccionando-se durante a divisão nuclear dando origem a pequenas e numerosas mitocôndrias de forma esférica. Entre outros trabalhos temos a salientar os estudos efectuados em Chlamydomonas (Osafune et al., 1972 a , b, 1975a, 1976; Grobe & Arnold, 1977; Blank & Arnold, 1980 ; Blank et al., 1980); em Euglena (Ledoigt et al., 1972; Osafune, 1973; Calvayrac et al., 1974; Osafune et al., 1975b, c , d ; Ledoigt & Calvayrac, 1979) e em Polytoma papillatum (Gaffal & Kreutzer,1977 ; Gaffal et al., 1982). A presença do retículo mitocondrial seria devida a uma diminuição no consumo de oxigénio durante o crescimento da célula (Osafune et al., 1975b).

Vartapetian e colaboradores (1977) verificaram que o retículo mitocondrial era devido a uma fusão das mitocôndrias quando submetidas a condições de anoxia.

Em Cucumis sativus L. não se assistiu à presença de um retículo mitocondrial pois que, nesta espécie, os perfis observados pertenciam a diferentes mitocôndrias.No entanto observou-se, durante o desenrolar da microsporogénese, um ciclo mitocondrial comparável aos resultados dos diferentes autores atrás citados, pois que, as mitocôndrias surgiam de grandes dimensões e profundamente modificadas no período de crescimento do micrósporo e, posteriormente, durante a divisão nuclear dividiam-se aumentando em número e diminuindo de dimensões.

As modificações observadas nas mitocôndrias levam a admitir que elas estão relacionadas com o estado metabólico das células.

O aumento da superfície mitocondrial resulta numa mais íntima e extensa relação das mitocôndrias com o citoplasma, de modo a facilitar as trocas recíprocas de substâncias.

Parede do grão de pólen

A nível ultrastrutural não são do nosso conhecimento estudos da parede do grão de pólen de Cucumis sativus L.. Apenas existem os trabalhos de Marticorena (1963) e Saad (1964), que estudaram a parede dos grãos de pólen de algumas espécies de Cucurbitaceae mas a nível de microscopia óptica.

Neste trabalho descreve -se a parede do grão de pólen de Cucumis sativus L., com base na terminologia de Erdtman (1960).

No estado de tétrada jovem observou-se a deposição de uma camada de primexina,entre o plasmalema e a calose, formando-se depois as báculas e uma camada contínua na base das báculas, a nexina 1. Durante a dissolução da camada de calose depositaram-se mais duas camadas,sendo uma a unir o topo das báculas formando o tecto e uma outra denominada por nexina 2,formando uma camada contínua entre o plasmalema e a nexina 1. Frequentemente em microfotografias observou-se uma linha clara a separar as duas camadas de nexina (nexina 1 e nexina 2). Esta linha marca, provavelmente,tempos diferentes de deposição. A origem possível do material destas camadas estará no tapete, uma vez que a sua composição é esporopolenina apresentando densidade electrónica semelhante aos orbículos das células do tapete. Posteriormente formou-se uma 3ª camada,entre o plasmalema e a nexina 2 , apresentando estrutura diferente relativamente às outras camadas de nexina. A deposição desta camada, denominada nexina 3 , parece ter coincidido com uma fase de grande actividade dos dictiossomas e com a presença de longos perfis de retículo endoplasmático, junto ao plasmalema. Isto leva a admitir que uma possível origem desta camada de nexina estará no próprio micrósporo. Deste modo a camada de nexina 3 terá, possivelmente, uma origem a partir do tapete e do micrósporo pois ela apresenta-se como uma camada contínua de matriz de natureza polissacarídica cuja origem estará no micrósporo e as lamelas que a atravessam, como

são lamelas de esporopolenina , terão a sua origem provavelmente no tapete. A camada que designamos por nexina 3 parece corresponder à camada que Saad (1964) denominou por medina em Cucumis sativus L., a partir de observações efectuadas ao microscópio óptico. Saad (1963) definiu esta camada como sendo:

- contínua e mais espessada nos poros
- menos densa em electrões que a exina, sendo hialina e lamelada
- de natureza péctica e não exínica

No micrósporo vacuolizado, entre a nexina 3 e o plasmalema, depositou-se uma camada contínua de natureza polissacarídica , designada intina. A sua deposição envolveu também uma grande actividade dos dictiossomas (Heslop-Harrison, 1968a). Durante a formação desta camada, além dos dictiossomas observaram-se perfis de retículo endoplasmático rugoso junto do plasmalema. A deposição da intina teve início na região dos poros onde esta camada adquiriu maior espessura, estendendo-se depois a toda a volta do grão de pólen. Na intina, na região dos poros, observaram-se microvilosidades que eram evaginações do plasmalema. Segundo alguns autores a orientação e direcção destes túbulos, na intina, desempenham um papel bastante importante na germinação da tubo polínico (Horner & Lernsten, 1971).

A intina, como se verificou, apresentava uma composição polissacarídica, sendo positiva aos testes de Thièry e PTA HCl. Além disso, continha actividade de fosfátase ácida como revelada pela localização citoquímica. Estes resultados são concordantes com os apresentados por Knox & Heslop-Harrison (1969). Roland (1971) e vários outros autores admitiram também que a parede da célula germinativa é de natureza polissacarídica.

Observações efectuadas, ao microscópio óptico e ao microscópio electrónico de varrimento, mostraram que o grão de pólen de Cucumis sativus L. possuía a forma subachatada. Segundo a nomenclatura de Erdtman (1969) a morfologia externa dos poros do grão de pólen apresentava NPC (344). O sistema NPC foi criado

com base no número (N), posição (P) e forma (C) das aberturas ou poros do grão de pólen. Nesta espécie, o grão de pólen possuia três poros dispostos na zona equatorial e cada poro apresentava a forma circular. A camada exterior, que revestia a parede do grão de pólen designada tecto, era uma camada lisa possuindo pontos de descontinuidade que se denominam perfurações. As dimensões destas, bem como as distâncias entre elas, eram sempre inferiores a 1 μm, o que nos levou a classificar o tecto como densamente perfurado. Praglowski & Punt (1973) definiram como tecto perfurado, aquele cujas dimensões das perfurações são inferiores a 1 μm e as distâncias entre elas superiores a 1 μm.

Tapete

A camada de células que surge a rodear o lóculo da antera constitui o tapete e tem uma função de nutrição para o grão de pólen em formação. Durante o desenrolar da microsporogénese o tapete sofre uma série de modificações observando-se inicialmente uma síntese activa de esporopolenina e posteriormente desorganização dos componentes celulares, com degenerescência das células. Estas modificações foram descritas, a nível ultrastrutural, por vários autores (Rowley et al., 1959; Heslop-Harrison, 1963a; Echlin & Godwin, 1968a; Mepham & Lane, 1968, 1969a; Heslop-Harrison & Dickinson, 1969; Risueño et al., 1969; Hoefert, 1971; Dickinson & Bell, 1972, 1976 a, b; Carraro & Lombardo , 1976 ; Lombardo & Carraro , 1976 a ,b).

Em Cucumis sativus L. o tapete era constituído por dois tipos de células que diferiam um do outro pela organização do retículo endoplasmático. Assim, enquanto umas células apresentavam perfis longos e finos de retículo endoplasmático rugoso(RER) com cisternas pouco dilatadas, isto é, uma configuração típica do retículo endoplasmático rugoso; o outro tipo de células possuia um sistema elaborado de RER, ou seja, um conjunto de cisternas dilatadas contendo no seu interior numerosas vesículas de várias formas e tamanho rodeadas por uma única membrana que apresentava ribossomas na face interior . Frequentemente observaram-se invaginações da membrana do retículo endoplasmático para o interior da cisterna, processo que explica a presença de ribossomas na face interior da membrana limitante destas vesículas. As invaginações por vezes eram de grandes dimensões contendo no seu interior organelos citoplasmáticos. O sistema elaborado de RER observou-se em continuidade com o invólucro nuclear e até com o plasmalema . As células,com o sistema elaborado de RER , apresentavam uma actividade secretora muito intensa, no início da microsporogénese, enquanto que as outras células só posteriormente iniciavam essa actividade.

O sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso, com cisternas dilatadas, foi referido como presente em células animais nomeadamente nas células endócrinas do rato adulto (Wassermann, 1976) e em células vegetais (Unzelman & Healey , 1974 ; Schultz & Jensen, 1974; Mares et al., 1976; Toth & Knight,1976; Kristen, 1976 ; Meier & Reid, 1977).O sistema elaborado de RER observado em Cucumis sativus L. parece morfologicamente semelhante ao descrito por Lombardo & Carraro (1976a), em células do tapete de Antirrhinum majus, e designado por corpos esféricos. Estes estariam em ligação com o retículo endoplasmático rugoso e foram considerados, por aqueles autores, como alterações transitórias de RER. Estes resultados diferem dos agora descritos pois, em Cucumis sativus L., aquelas formações persistiram até que as células sofreram degenerescência. Assim, admite-se que o sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso esteja relacionado com a actividade sintética das células e com o transporte de material para a superfície celular.

As estruturas vesiculares observadas e resultantes das cisternas dilatadas de RER eram morfologicamente semelhantes a micoplasmas descritos em diferentes tecidos. No entanto, elas diferiam dos micoplasmas porque os ribossomas, contidos nas vesículas, eram de dimensões semelhantes às dos ribossomas citoplasmáticos e não foram observadas fibrilas de DNA no interior das vesículas. Tais estruturas, por serem muito semelhantes a micoplasmas, foram descritas em células vegetais como microrganismos (Lombardo et al., 1970; Pellegrini & Gerola, 1970 ; Amici & Favali, 1972). Florance & Cameron (1974) e Esau e colaboradores (1976) consideraram estas formações idênticas a micoplasmas e relacionaram-nas com processos autofágicos que levam à degenerescência celular. Esta mesma hipótese foi admitida por Schultz & Jensen (1974) ; Toth & Knight (1976).

Em Cucumis sativus L. verificou-se que o sistema elaborado de RER sequestrava áreas bastante grandes de citoplasma e até organelos celulares, que posteriormente eram degradados, sugerindo um possível comportamento autofágico destas formações.A repeti

ção deste processo estendeu-se a toda a célula levando à sua degenerescência.

As células do tapete, que não possuiam o sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso, conservavam-se intactas durante a microsporogénese e nos estados finais deste processo, viam-se nas proximidades dos grãos de pólen.

Corpos negros foram observados no interior do sistema elaborado de RER, no interior do núcleo e na superfície exterior do plasmalema, em maior abundância nas zonas adjacentes ao lóculo da antera. Corpos negros, como estes, têm sido frequentemente referidos como corpos de "Ubisch", no entanto tal terminologia não tem sido unânimemente aceite pelo que têm sido, também, designados por orbículos (Banerjee, 1967 ; Rowley & Erdtman, 1967) ou placas (Heslop-Harrison & Dickinson, 1969). No presente estudo utilizou-se o termo orbículos, uma vez que foi feita a opção de seguir a nomenclatura de Erdtman. Vários estudos foram realizados, no sentido de verificação da semelhança química entre os orbículos do tapete e a esporopolenina que constitui a parede do grão de pólen (Rowley, 1962, 1963 ; Heslop-Harrison, 1962, 1963 a, b; Skvarla & Larson, 1966; Rowley & Erdtman, 1967; Roland, 1967 ; Risueño et al., 1969).

Em Cucumis sativus L. os orbículos surgiam sempre como corpos esferoidais negros e apresentavam sempre a mesma densidade electrónica, quer no interior do retículo endoplasmático quer no exterior do plasmalema. Os nossos resultados diferiram dos apresentados por Heslop-Harrison (1963 a, b) em Cannabis sativa e Silene pendula pois este autor descreveu os orbículos, em Silene, como sendo placas em que cada uma possuia várias cavidades de forma esférica, e em Cannabis como sendo corpos esféricos ou esferoidais que adquiriam camadas negras de localização assimétrica.

Os orbículos em Cucumis sativus L. parecem ter origem no retículo endoplasmático, tal como é admitido pela maioria dos autores (Rowley & Erdtman, 1967; Echlin & Godwin, 1968a; Risueño et al., 1969; Dickinson, 1971b; Dickinson & Bell, 1972, 1976a,b).

No entanto as mitocôndrias, em alguns casos, estão envolvidas na formação da esporopolenina (Heslop-Harrison, 1963a) o mesmo acontecendo com os plastídios (Dickinson, 1973). Em Cucumis sativus L. não se observou qualquer relação das mitocôndrias e dos plastídios com a síntese de esporopolenina ou dos precursores.

Nesta espécie os corpos negros que se observaram, nas cisternas do retículo endoplasmático, representam os corpos esferoidais, designados orbículos, que posteriormente são expulsos para o espaço entre o plasmalema e a parede em dissolução . Observou-se também a presença destes corpos negros no interior do núcleo, parecendo indicar que, possivelmente, este organelo intervem na síntese de esporopolenina, ou dos seus precursores. Lombardo & Carraro (1976 a, b) ao estudarem as modificações ultrastruturais das células do tapete, durante a formação do grão de pólen, observaram na cisterna perinuclear, no retículo endoplasmático e no plasmalema, corpos semelhantes aos que se observaram em Cucumis sativus. Com base naquelas observações, os autores admitiram que tais formações proliferavam a partir do núcleo e desempenhavam um papel nas trocas entre o núcleo e o citoplasma. Existem alguns estudos em células animais sobre a presença de corpos aparentemente semelhantes na cisterna perinuclear (Hadek & Swift, 1962; Kessel & Beams, 1963 ; Szollosi, 1965). Particularmente Hadek & Swift (1962) observaram a presença de corpos escuros na cisterna perinuclear a qual está em continuidade com cisternas do retículo endoplasmático, e interpretaram estas formações como sendo extrusões nucleolares que provavelmente transferiam ribonucleoproteínas ou RNA do núcleo para o citoplasma.

Além da existência de um sistema elaborado do retículo endoplasmático, em determinadas células do tapete de Cucumis sativus L., observaram-se plastídios que apresentavam no seu estroma uma estrutura complexa de túbulos em arranjo regular, assemelhando-se ao corpo prolamelar dos estioplastos. Tal tipo de plastídios encontra-se apenas referido nas células do tapete pe

riplasmodial em Tradescantia bracteata por Mepham & Lane (1969b).

Na espécie aqui estudada as estruturas, semelhantes aos corpos prolamelares, não originavam tilacóides apresentando certas semelhanças estruturais e de funcionamento com as descritas nas células do suspensor, durante o desenvolvimento embrionário de Ipomoea purpurea Roth (Ponzi & Pizzolongo, 1973). Tal como nas células do suspensor também nestas células do tapete os plastídios, à medida que a microsporogénese se desenrolava, iam sofrendo uma gradual degenerescência com formação de um sistema de lamelas em arranjos paralelos e concêntricos, cujas cisternas exteriores se dilatavam dando origem a vacúolos.

Durante a microsporogénese observavam-se os dictiossomas, pertencentes às células do tapete, aparentemente em actividade pois numerosas vesículas eram visíveis junto aos sáculos. Durante a meiose pensa-se que os dictiossomas das células do tapete desempenham uma função na formação da camada de calose (Echlin & Godwin, 1968b ; Lombardo & Carraro, 1976a , b) e posteriormente produzem uma enzima relacionada com a "lise" que ocorre nestas células (Mepham & Lane, 1969b). Provavelmente devido a este facto, os dictiossomas eram mais activos nas células que apresentavam o sistema elaborado de RER e que sofriam desagregação mais precoce.

Dado que o tapete em Cucumis sativus L. apresentava dois tipos de células de comportamento diferente admitiu-se que se estava em presença de um tapete misto constituído por umas células que sofriam a degenerescência nos estados iniciais da microsporogénese com "lise" total dos seus componentes celulares e outras células que não sofriam degenerescência numa fase tão inicial. Logo após a meiose as primeiras células produziam os orbículos contribuindo para a formação da parede do grão de pólen e, posteriormente, as outras células, que ficavam a formar o tapete, produziam macrorbículos que se iam depositando à superfície da parede do grão de pólen constituindo o "pollenkitt".

Com os microscópios electrónicos de transmissão e de varrimento, observaram-se grandes glóbulos osmiofílicos e restos de células do tapete junto da parede do grão de pólen e por vezes aderentes à sua superfície. Como estas substâncias foram observadas em várias espécies polinizadas por insectos, caso de Cucumis sativus L., este facto levou vários autores a admitir que a presença destas formações facilitasse a atracção daqueles animais. No entanto a sua função permanece obscura. Alguns investigadores consideraram, também, que estas substâncias pudessem servir de protecção à acção danificante das radiações ultravioletas, ou funcionassem como substâncias derivadas da fase esporófita e envolvidas nos sistemas de incompatibilidade entre o pólen e o estigma (Heslop-Harrison, 1968b).

Quando os grãos de pólen atingiram a maturação, nas cavidades da sexina depositou-se um material de natureza hidrofílica resultante da desintegração das células do tapete. Para alguns autores (Audran & Batcho, 1981) estas formações, assim como as que surgiram exteriormente ao grão de pólen, eram designadas indistintamente por "pollenkitt" ou trifinas. Em Cucumis sativus L. os dois tipos de substâncias, que se observaram na superfície externa do grão de pólen, eram diferentes na sua natureza química pois enquanto umas deram reacção negativa ao teste de Thièry outras reagiram positivamente, correspondendo muito provavelmente ao "pollenkitt" e às trifinas respectivamente.

O termo "pollenkitt" tem sido aplicado para referir lípidos hidrofóbicos e carotenóides que normalmente se depositam na parte exterior da parede dos grãos de pólen (Heslop-Harrison, 1968c, d ; Heslop-Harrison & Dickinson, 1969) e cuja origem se atribui às células do tapete. Heslop-Harrison (1968d, e) mostrou que os carotenóides ocorriam somente na maturação do grão de pólen, com a finalidade de lhe dar côr. A hipótese de que a síntese dos carotenóides estaria relacionada com a síntese de esporopolenina (Brooks & Shaw, 1968) não foi totalmente aceite por Heslop-Harrison (1968d , e). O termo trifinas tem sido mais utilizado para designar os restos das células do tapete, após a sua degenerescência.

Microsporogénese "in vitro"

A possibilidade de desenvolver condições que permitissem a realização da microsporogénese "in vitro" pareceu assunto de interesse porque,o facto de ser viável efectuá-la com êxito, viria permitir estudar mais facilmente o comportamento deste fenómeno e, além disso, traria novas perspectivas para o estudo das modificações dos organelos citoplasmáticos, quando submetidas as anteras à acção de certas drogas introduzidas no meio de cultura.

Desde há muito que nas angiospérmicas se obteve a germinação do grão de pólen "in vitro", isto é, a formação e desenvolvimento do tubo polínico em meios de cultura. Esta técnica tem permitido a pesquisa de substâncias químicas necessárias a todo o crescimento, nomeadamente à divisão nuclear e expansão da parede celular no tubo polínico (Stanley, 1971). Foi efectuado o estudo de germinação do grão de pólen "in vitro" de algumas espécies de Cucurbitaceae (Vasil , 1960).Porém, na literatura não se conhecem quaisquer referências à obtenção de microsporogénese em material mantido em meios de cultura. Apenas existem trabalhos de culturas de anteras durante o estado de meiócitos, de modo a ser estudada a meiose "in vitro". São de realçar os trabalhos de Ryan (1980) em que o autor seguiu a meiose "in vitro" em Iris spuria L., Allium triquetrum L. e Tradescantia flumenensis Vell., utilizando um meio de cultura constituído por sacarose.

Para o estabelecimento de culturas de anteras de Cucumis sativus L., com a finalidade de seguir o desenrolar da microsporogénese, utilizou-se o meio nutriente de Murashige & Skoog (1962), o qual se sabe fornecer bons resultados para a cultura de haplóides de uma grande variedade de anteras. Como o nosso objectivo era estudar a microsporogénese não se adicionaram reguladores de crescimento ao meio de cultura. Durante este estudo as culturas foram mantidas em regime alternado de luz e obscuridade e a 27°C.

As anteras, que possuíam células polínicas em telofase II,

foram inoculadas e acompanhou-se todo o processo evolutivo até ao micrósporo em fase de redução do sistema vacuolar. Estas fases eram as que interessavam para este trabalho, dado que se sabia que era durante este período que as mitocôndrias aumentavam de volume e finalmente regressavam às suas formas habituais, ou seja, mitocôndrias de pequenas dimensões e formas mais ou menos arredondadas.

Nos meios de cultura a microsporogénese desenrolava-se durante 72 horas e os organelos citoplasmáticos sofriam alterações ultrastruturais idênticas às observadas durante a microsporogénese que ocorre nas anteras de plantas em condições normais de desenvolvimento.

Localização citoquímica a nível ultrastrutural

São várias as enzimas que têm sido referidas no grão de pólen, apresentando variações com as espécies e estado de desenvolvimento. Durante a microsporogénese, segundo alguns autores, as enzimas mais activas são as associadas com a replicação do DNA e síntese de RNA e com a formação da parede do grão de pólen (exina e intina) (Stanley & Linskens, 1974).

Durante o desenrolar da microsporogénese sucedem-se vários estados de diferente actividade metabólica. Assim, no estado de tétrada inicia-se a deposição de algumas camadas da parede do grão de pólen e no micrósporo assiste-se à sua completa formação. Simultâneamente no citoplasma ocorre o desenvolvimento do vacuoma e sua posterior redução. Estes mecanismos levam a modificações profundas dos organelos, assistindo-se ao aumento na actividade dos dictiossomas e a várias modificações estruturais do retículo endoplasmático. O estado de micrósporo tem sido considerado o mais importante na ontogenia polínica, pois corresponde a uma fase de preparação dos organelos para a germinação do tubo polínico.

Durante o desenrolar da microsporogénese, excepto no momento de dissolução da camada de calose, os dictiossomas são bastante activos. Como se sabe, as vesículas resultantes da actividade dictiossómica parecem ser os vectores de enzimas de grande importância (hidrólases) que são transportadas para diferentes locais da célula.

Nas células em diferenciação considera-se o sistema vacuolar como um aparelho que, entre outras, possui funções verdadeiramente mecânicas responsáveis pelos processos de turgescência e crescimento celular. Os vacúolos são os locais de reserva não só de acumulação de constituintes celulares que devem ser renovados no decorrer da diferenciação mas também de material que deve ser modificado antes de ser utilizado. Além disto, sabe-

-se que os vacúolos apresentam também um papel de secreção como demonstrado pela presença de enzimas hidrolíticas. Estes factos sugeriram, no presente trabalho, o estudo da localização citoquímica de algumas fosfátases.

Knox & Heslop-Harrison (1970) descreveram alguns métodos citoquímicos, a nível de microscopia óptica, para a detecção e localização de várias enzimas na parede do grão de pólen de 50 espécies de angiospérmicas e mostraram que a actividade de fosfátase ácida está associada com a intina celulósica, especialmente na região dos poros. Estes autores usaram reagentes osmiofílicos e, como a esporopolenina que constitui a exina reagia com o tetróxido de ósmio, dificilmente distinguiram a exina da intina ao microscópio óptico. Assim, a microscopia electrónica permitiu obter melhores resultados na identificação de enzimas na parede do grão de pólen. A nível ultrastrutural a actividade de fosfátase ácida (EC 3.1.3.2) foi referida como presente nos micrósporos em desenvolvimento de várias espécies (Horvart, 1969; Knox & Heslop-Harrison, 1971; Ahokas, 1975; Vithanage & Knox, 1976, 1980; Nakamura, 1979 ; Shoup et al., 1981). Estes autores admitiram que a presença desta enzima estava relacionada com os estados jovens de diferenciação celular sendo responsável pela iniciação de formação do poro e deposição da camada de intina.

Os resultados obtidos mostraram que no estado de tétrada surgiam depósitos densos em electrões na primexina, nos dictiossomas e em pequenos vacúolos presentes na célula. No micrósporo observou-se a presença de depósitos electronodensos na intina, nos poros, nos dictiossomas e vesículas derivadas destes, sendo os depósitos mais abundantes na intina. Nos dois testemunhos ensaiados (sem substrato ou meio completo e NaF) não se observaram indícios de reacção enzimática.

Pela análise dos resultados obtidos sobre a presença da fosfátase ácida parece poder admitir-se que esta enzima estará relacionada com a formação da camada de intina de natureza polissacarídica. As vesículas derivadas dos dicitiossomas pro

vavelmente estarão envolvidas no transporte de polissacarídeos para o exterior do plasmalema, dando origem à intina. Dado que, neste estado da microsporogénese, o sistema vacuolar continuava a desenvolver-se parece plausível admitir-se que estas vesículas, com actividade de fosfátase ácida, têm também um papel na degradação de material citoplasmático para a formação do vacúolo.

Nas células do tapete observaram-se depósitos electronicamente densos localizados em alguns vacúolos. Estas células não sofreram autólise no início da microsporogénese, e por conseguinte a presença da actividade da fosfátase ácida nos vacúolos não poderá ser indicativa, pelo menos naquele momento, de um processo degradativo que estivesse a ocorrer no citoplasma.

Durante o desenrolar da microsporogénese em Cucumis sativus L. não se observou a presença de actividade de fosfátase ácida nas cisternas do retículo endoplasmático nem no interior do núcleo. Vários autores descreveram a presença desta enzima quer no retículo endoplasmático de células de tecidos condutores (Catesson & Czaninski, 1969), quer no núcleo de micrósporos e grãos de pólen de Allium cepa (Sánchez-Pina et al., 1980). Boucaud & Suire (1978) em células em diferenciação obtiveram precipitados negros resultantes da reacção enzimática no retículo endoplasmático, invólucro nuclear e vacúolos. Cronshaw & Bentwood (1977) verificaram a presença desta enzima nos dictiossomas e retículo endoplasmático. Estes autores admitiram uma ligação do sistema membranoso celular com actividade fosfatásica ácida e que os dictiossomas estariam envolvidos na digestão de material, levando à diferenciação dos vacúolos. Charvat & Esau (1975) em células do xilema de Phaseolus vulgaris obtiveram depósitos negros de fosfátase ácida apenas nos dictiossomas e parede celular.

Numerosos estudos têm sido realizados no sentido de determinar os locais de actividade de ATPase nas plantas superiores. Esta actividade tem sido observada nos vacúolos, retículo endoplasmático, mitocôndrias e dictiossomas (Poux, 1966, 1967). Foi encontrada, também, a presença de actividade de ATPase no retículo en-

doplasmático, núcleo e membranas dos vacúolos nas células do floema de Pisum sativum (Bentwood & Cronshaw, 1978). Hall(1969, 1971) observou a presença desta enzima no plasmalema, admitindo que estava relacionada com os processos de transporte de iões.

O grão de pólen recebe iões do lóculo da antera e acumula-os no vacuoma, possivelmente por transporte activo. A íntima relação entre o transporte de iões através das membranas e a actividade de ATPase ligada a essas membranas tem sido muito estudada, principalmente em células animais.

Rowley e colaboradores (1973), motivados pelo interesse na verificação da translocação de material da fase esporófita (tapete) para a fase gametófita (grão de pólen), estudaram a localização citoquímica de actividade ATPase em grãos de pólen de várias espécies.

Ensaiou-se, no presente estudo, a localização ultrastrutural da actividade de ATPase (EC 3.6.1.3) e os resultados obtidos foram idênticos aos apresentados por Rowley e colaboradores (1973), pois observou-se a presença de depósitos electronodensos no plasmalema e no interior dos vacúolos. Nas vesículas e pequenos vacúolos não se formaram depósitos de reacção enzimática. Nas células do tapete também os vacúolos apresentaram reacção positiva a esta enzima. No material incubado no meio sem substrato não se observaram depósitos electronicamente densos. A adição do inibidor ao meio de incubação deu também resultados idênticos aos obtidos com o meio sem substrato, o que indica a origem enzimática dos depósitos negros que surgem no material em estudo (Gilder & Cronshaw, 1973, 1974).

De entre o grupo das hidrólases estudou-se também a fosfátase alcalina (EC 3.1.3.1), através da localização citoquímica ultrastrutural. Esta enzima permite que as células obtenham os

ortofosfatos necessários a partir de fosfatos orgânicos.

A actividade de fosfátase alcalina tem sido frequentemente referida como ausente no grão de pólen (Ahokas, 1975). Contudo, alguns autores como Palumbo (1953),Lewis e colaboradores (1967) e Martin (1968) admitiram baixos níveis de actividade de fosfátase alcalina no grão de pólen. Gorska-Brylass (1965) verificou também a presença desta enzima no grão de pólen com uma distribuição homogénea em todo o citoplasma. A actividade desta enzima foi de igual modo observada por Knox & Heslop-Harrison (1969) ao estudarem a localização de várias enzimas no grão de pólen de algumas espécies. Estes autores afirmaram não terem observado a actividade de fosfátase alcalina na parede do grão de pólen apenas notaram a sua presença no interior do grão de pólen.

Contudo são escassas as referências da presença de actividade de fosfátase alcalina nas células vegetais. Em células animais, os investigadores relacionaram a presença desta enzima com intensos processos metabólicos associados à diferenciação celular (Banerjee et al., 1976; Dickson, 1978 ; Quiviger et al., 1980).

Os resultados obtidos, referentes a esta enzima,nas anteras de Cucumis sativus L. mostraram a presença de depósitos densos em electrões localizados nos invólucros das mitocôndrias, dos plastídios e do núcleo bem como no interior das vesículas derivadas dos dictiossomas e nas cisternas do retículo endoplasmático. Não se detectaram depósitos negros ao nível do plasmalema, contrariamente às observações efectuadas em células animais. Nas células do tapete a sua localização foi idêntica tendo-se observado também marcação positiva, de actividade de fosfátase alcalina, ao nível dos túbulos que formam a estrutura complexa, semelhante ao corpo prolamelar dos estioplastos, presente nos plastídios destas células. No material incubado sem substrato não se observaram depósitos electronicamente densos.

A análise dos resultados obtidos nas experiências com estas três fosfátases, levou a admitir que os micrósporos são células metabolicamente activas não só na formação da parede polínica, que os envolve, como na formação do sistema vacuolar. A presença de hidrólases nas células é de grande importância, dado o seu papel na conversão de material inactivo em activo, pois estas enzimas estão directamente associadas a processos de autofagia e heterofagia que levam ao renovamento do citoplasma, à diferenciação e à regulação da actividade celular.

As profundas modificações estruturais das mitocôndrias, observadas em Cucumis sativus L., podiam traduzir alterações da sua actividade metabólica, no entanto as fases da microsporogénese, que apresentam tais mitocôndrias, são metabolicamente activas como foi confirmado pela presença de enzimas hidrolíticas.

Como a transformação da estrutura das mitocôndrias pudesse reflectir modificações da sua actividade metabólica efectuou-se a localização citoquímica a nível ultrastrutural da actividade de duas enzimas da cadeia de transporte de electrões, como a citocromo-oxídase (EC 1.9.3.1) e a desidrogénase succínica (EC 1.3.99.1).

Para a localização citoquímica da actividade da citocromo-oxídase utilizou-se o DAB (diamino benzidina), como reagente citoquímico a nível ultrastrutural, pois pode ser oxidado pelos sistemas celulares originando um produto insolúvel que espontâneamente polimeriza formando um composto que reage com o tetróxido de ósmio para dar origem ao designado "negro de ósmio" (Seligman et al., 1968).

Sabe-se que os depósitos electronicamente densos surgem nos locais do citocromo c e da sua oxídase, estando localizados nas membranas das cristas e na membrana interna do invólucro mitocondrial.

Em anteras de Cucumis sativus L. tratadas com o DAB observou-se a presença de numerosos depósitos electronicamente densos nas cristas e no invólucro mitocondrial. Curiosamente verificou-se que , nas mitocôndrias que se apresentavam profunda

mente modificadas nas zonas que não possuíam matriz e em que portanto se observava só o invólucro, não se formaram depósitos negros de reacção enzimática. Nas células do tapete as mitocôndrias apresentaram também reacção enzimática ao nível das cristas e do invólucro. Nas experiências testemunhas, usando quer o meio de incubação sem o DAB quer o meio completo adicionado de cianeto de potássio, as mitocôndrias apresentaram-se isentas de depósitos electronicamente densos.

A incubação das anteras no meio com o DAB efectuou-se na obscuridade, pois este substrato por acção da luz fotoxída-se dando origem à formação de produtos electronicamente densos nos tilacóides (Porat et al., 1978 ; Wrischer, 1978).

Surgiram várias dificuldades na utilização da técnica de localização citoquímica da citocromo-oxídase pois com tempos muito curtos de incubação não se verificaram depósitos de reacção positiva. Por outro lado com tempos demasiado longos ocorreu oxidação e precipitação do DAB no meio de incubação produzindo depósitos demasiado grandes e negros, estendendo-se a toda a matriz mitocondrial; este fenómeno tem sido designado por sobrecoloração (Opik, 1975). Ajustou-se para o nosso material um tempo exacto de incubação , tendo-se verificado uma uniformidade nos resultados, isto é, apenas as cristas e os invólucros mitocondriais surgiram com depósitos electronodensos.

Dado que o cianeto de potássio inibiu a reacção admite-se que os produtos de reacção do DAB são devidos à actividade da citocromo-oxídase, de acordo com os resultados descritos por Chesnoy,(1974)e Opik,(1975). Porém, certos autores admitem que a reacção positiva é devida, de um modo geral, aos citocromos (Lumsden et al., 1969); ao citocromo c (Marty, 1970); ou ainda que a reacção que ocorre nas cristas é devida provavelmente ao citocromo c e no invólucro ao citocromo b_5 (Novikoff & Goldfischer, 1969).

Os resultados observados não provam completamente que as mitocôndrias estavam a funcionar plenamente sendo capazes de executar a fosforilação oxidativa, mas indicam que estes orga

nelos são capazes de realizar reacções de oxidação. As mitocôndrias possuem unidades funcionais, com uma série de enzimas capazes de fornecer a energia necessária a toda a célula, sob a forma de ATP. Embora esta seja a principal função das mitocôndrias elas têm também uma considerável capacidade sintética.

A desidrogénase succínica, uma flavoproteína fortemente ligada à membrana mitocondrial interna (Lehninger, 1977), é uma das enzimas principais do ciclo dos ácidos tricarboxílicos assim como da cadeia de transporte de electrões.

Foi detectada a presença da actividade da desidrogénase succínica, a nível ultrastrutural, nas mitocôndrias por redução dos sais tetrazólios em produtos que se combinam com o chumbo ou o ósmio, para produzirem corpos electronicamente densos (Sedar et al., 1962; Banerjee et al., 1976 ; Athanassious et al., 1980). Esta técnica foi realizada em mitocôndrias de células animais, contudo o método ferricianeto (Kerpel-Fronius & Hajós, 1968) provou ser mais eficiente em células vegetais e com resultados dignos de confiança (Ekés, 1970).

Precisamente os produtos densos em electrões, provenientes das reacções, surgiram exclusivamente nas mitocôndrias. O precipitado preencheu as cisternas das cristas e o invólucro mitocondrial. As mitocôndrias das células do tapete também apresentaram reacção positiva. A presença de depósitos negros apenas foi observada no material em que a incubação se efectuou sem prévia fixação, pois no material em que se realizou pré-fixação, quer com o glutaraldeído quer com o formaldeído, não se verificaram resultados positivos, indicando que nestes casos os fixadores inibiram a acção desta enzima.

Efectuaram-se dois tipos de experiência testemunha, um em que se ensaiou o meio sem o substrato (succinato) e um outro em que se adicionou o malonato de sódio ao meio completo.No primeiro caso alguns depósitos negros surgiram nas mitocôndrias,provavelmente devido à existência de succinato endógeno.Por outro lado no segundo caso, em que se utilizou o meio de incubação mais

o inibidor, não foram detectados locais de actividade de desidrogénase succínica. Assim, os resultados positivos obtidos parecem merecer confiança. Alguns autores obtiveram depósitos negros desta enzima nos invólucros nucleares (Bell, 1979) e nos invólucros dos plastídios (Ekés, 1981), no entanto nas anteras de Cucumis sativus L. apenas se observaram nas mitocôndrias.

Os resultados obtidos, com estas duas enzimas respiratórias, levam a admitir que as modificações ocorridas nas mitocôndrias afectam profundamente a sua forma enquanto que a actividade enzimática não parece afectada, pelo menos drasticamente, como parece poder concluir-se da existência de considerável actividade em duas enzimas básicas, factos que apontam para uma funcionalidade do processo respiratório.

Efeitos de agentes físicos

Estudou-se o desenrolar da microsporogénese em diferentes condições de luz e obscuridade e para isso colocaram-se plantas à luz ou na obscuridade contínua.

Nas plantas colocadas à luz contínua, a microsporogénese desenrolou-se normalmente, tendo-se observado um reduzido número de cristas mitocondriais e numerosas vesículas possivelmente devidas à actividade dos dictiossomas. Durante a microsporogénese os plastídios apresentavam sempre estroma mais ou menos homogéneo e no estado de grão de pólen jovem observava-se acumulação de amido. Verificou-se que os plastídios das células do tapete possuíam a estrutura complexa de túbulos semelhante ao corpo prolamelar dos estioplastos.

A luz contínua provoca alterações profundas em espécies que não se adaptam a tais condições (Costes et al., 1973; Descomps & Deroche, 1973), sendo essas modificações verificadas ao nível dos cloroplastos.

Valanne (1977) verifica que no protonemata de Ceratodon purpurea, o crescimento e diferenciação eram muito mais rápidos quando submetidos à luz contínua.

A espécie em estudo comportou-se como uma planta cuja microsporogénese era insensível à luz contínua pois todo o processo de formação do grão de pólen, observado a nível ultrastrutural, se assemelhou aproximadamente ao que se obteve em períodos normais de luz/obscuridade.

Nas plantas colocadas na obscuridade contínua, durante seis semanas, embora a microsporogénese se efectuasse, os organelos citoplasmáticos apresentavam algumas alterações ultrastruturais. Assim, no micrósporo as mitocôndrias de forma bizarra e irregular continham matriz pouco electronodensa e um número reduzido de cristas. O retículo endoplasmático surgia em perfis pouco longos de cisternas dilatadas com material no interior. Neste mes-

mo estado da microsporogénese observavam-se perfis de retículo endoplasmático em arranjos paralelos e com uma disposição regular dos ribossomas ao longo das suas membranas, verificando-se frequentemente uma aproximação do retículo endoplasmático com o invólucro das mitocôndrias. Também se observavam configurações tipo "nebenkern" de retículo endoplasmático, quer nos micrósporos em desenvolvimento quer nas células do tapete. Os plastídios foram sempre observados sob a forma de proplastídios.

Lefort (1964) admitiu que tratamentos prolongados na obscuridade provocavam em Euglena modificações profundas das mitocôndrias e um desaparecimento dos plastídios. As mitocôndrias aumentavam de dimensões e apresentavam cristas numerosas, frequentemente agregadas em feixe e em disposição concêntrica a limitar áreas da matriz menos densas em electrões.Lefort concluiu das suas observações que a obscuridade provocava um aumento das reacçoes de fosforilação oxidativa na ausência da fotossíntese.

As alterações observadas, no retículo endoplasmático dos micrósporos de Cucumis sativus L., possivelmente reflectem alterações no metabolismo da célula. O ciclo mitocondrial, que se observou durante a microsporogénese normal, processou-se do mesmo modo quando as plantas foram submetidas à luz ou à obscuridade contínua. Igualmente todo o desenrolar normal da microsporogénese não foi alterado.

Os factos observados levam a concluir que quer o desenrolar da microsporogénese quer as modificações que ocorrem nas mitocôndrias são independentes da ausência ou da presença de luz contínua.

Efeitos de agentes químicos

Quando se submeteram as anteras à acção do cloranfenicol e cicloheximida, conhecidos inibidores da síntese proteica, os resultados obtidos, ao fim de 24 horas de tratamento, não diferiram muito de uma droga para outra.

Inicialmente, pela acção daquelas drogas, as mitocôndrias surgiam com matriz electronodensa e desorganização das cristas. No entanto, enquanto que a cicloheximida, posteriormente, provocava uma condensação da matriz, redução do tamanho das cristas e dilatação das suas cisternas, o cloranfenicol induzia a formação de mitocôndrias de perfis irregulares, matriz clara e algumas cristas em forma de anel. Os dictiossomas surgiam com fraca actividade e o retículo endoplasmático estava muito fragmentado, não havendo alterações na população dos ribossomas.

Quando se usava a cicloheximida a população ribossomal do citoplasma surgia bastante reduzida, os dictiossomas eram menos activos e o retículo endoplasmático era pouco abundante.

A estrutura complexa de túbulos, presente no estroma dos plastídios das células do tapete, apresentava-se profundamente desorganizada pela acção do cloranfenicol e da cicloheximida no entanto a alteração verificou-se mais rapidamente com o cloranfenicol. Esta alteração, provavelmente, será devida a uma utilização mais rápida do material acumulado nesses complexos tubulares.

O cloranfenicol é um inibidor da síntese proteica que ocorre nos ribossomas das mitocôndrias e plastídios e a cicloheximida é um inibidor da síntese proteica que ocorre nos ribossomas citoplasmáticos.

Embora as mitocôndrias e os plastídios contenham DNA , RNA e possuam todos os componentes necessários à síntese dos ácidos nucleicos e proteínas, existem certas proteínas destes organelos que são sintetizadas no citoplasma.

Segundo Smith e colaboradores (1970), as mitocôndrias por acção do cloranfenicol surgem em configuração condensada, resultante da inibição da síntese proteica mitocondrial, não havendo contudo alterações na respiração nem fosforilação oxidativa. O efeito primário deste antibiótico tem sido descrito como seja a perda das cristas mitocondriais, no entanto efeitos secundários têm sido descritos como sejam a formação de mitocôndrias gigantes ou a redução em número e alterações na orientação das cristas, surgindo em arranjos circulares (Adoutte et al., 1972; Smith-Johannsen & Gibbs, 1972; Kislev et al., 1973; Lunger & Clark, 1979). Em Cucumis sativus L., pela acção do cloranfenicol, observou-se primeiramente uma densificação da matriz e desorganização das cristas, e com tempos prolongados de permanência neste inibidor assistiu-se a uma redução na opacidade electrónica da matriz e uma desorganização das cristas observando-se frequentemente formas em anel. Estas modificações estruturais parecem ser consequência de uma inibição da síntese proteica e na cadeia respiratória. O facto de a forma da mitocôndria não se alterar, pela acção do cloranfenicol, e apenas surgirem modificações ao nível das cristas, deve ser devido ao facto de a membrana exterior do invólucro mitocondrial poder ser formada na ausência da síntese proteica específica da mitocôndria, enquanto que a membrana interna se comporta diferentemente. O cloranfenicol, possivelmente, inibe a síntese de proteínas necessárias ao arranjo das cristas e daí a sua redução e por vezes o seu completo desaparecimento.

O cloranfenicol, em meios de cultura, não inibiu o desenrolar da microsporogénese havendo apenas a salientar a deposição irregular da esporopolenina à volta dos micrósporos, surgindo uma parede exínica modificada sem tecto e sem báculas. Esta deposição irregular da parede do grão de pólen surgiu provavelmente devido a um efeito secundário resultante da inibição da respiração e consequente diminuição de energia necessária.

As alterações observadas nas células polínicas das anteras inoculadas em meios de cultura eram idênticas às observadas nas células polínicas de anteras retiradas das hastes florais cujas extremidades estavam mergulhadas na solução de cloranfenicol. Assim, as mitocôndrias dividiam-se, pois surgiam formas mais ou menos esféricas. No entanto, verificava-se que o núcleo não se havia dividido corroborando os resultados obtidos por Smith-Johannsen & Gibbs (1972). Com tempos mais longos de tratamento assistia-se a uma degenerescência dos organelos citoplasmáticos.

Quando se fizeram actuar estes inibidores em culturas de anteras obtiveram-se maiores alterações com a cicloheximida, tendo-se assistido a uma paragem no desenrolar da microsporogénese. Inocularam-se anteras contendo células polínicas em telofase II e verificou-se que ocorria a citocinese incompleta tendo havido simultaneamente a deposição da primexina de tal modo que se observaram os quatro micrósporos, resultantes da meiose, rodeados por esta camada polissacarídica.

Curioso também, foi o aparecimento de grãos de amido nos plastídios das células da parede da antera incluindo as células do tapete. Este facto não pode ser devido à presença de sacarose nos meios de cultura, pois este meio foi ensaiado com outros inibidores adicionados e nunca ocorreu acumulação de amido. No entanto com períodos mais longos de tratamento (7 horas de incubação das anteras em meios de cultura) já não se observou amido nos plastídios dessas células. Dadas as condições em que ocorreu essa acumulação de amido é difícil explicar a formação deste hidrato de carbono nas células da parede pois, provavelmente, terá sido devida, indirectamente, à presença da cicloheximida.

Existem outras acções da cicloheximida não relacionadas com o seu efeito primário na síntese das proteínas, actuando nos ribossomas citoplasmáticos.

Segundo alguns autores a cicloheximida parece alterar o consumo do oxigénio em vários tecidos vegetais, assistindo-se a uma marcada especificidade na toxidade em várias espécies vegetais

(Smillie et al., 1967). A cicloheximida nos tecidos vegetais pode interferir com a transferência de energia (Garber et al., 1973). Estes autores verificaram ainda que baixas concentrações podiam numas espécies diminuir a respiração e noutras estimulá-la.

A cicloheximida inibe a síntese proteica nos ribossomas citoplasmáticos e existem numerosas proteínas mitocondriais que são sintetizadas no citoplasma, podendo-se assim explicar as alterações observadas nas mitocôndrias. Em Cucumis sativus L. verificou-se não só uma condensação da matriz mitocondrial e redução do tamanho das cristas com dilatação das suas cisternas mas também uma diminuição da população dos ribossomas citoplasmáticos.

O brometo de etídio tem sido muito utilizado, pela sua acção na síntese do DNA e RNA mitocondrial, devido às suas moléculas se intercalarem entre os pares de bases do DNA e assim modificar a sua estrutura (Leibowitz, 1971 ; Nass, 1972).

Consequentemente, o brometo de etídio produz variações nas propriedades bioquímicas e fisiológicas das mitocôndrias (Kellerman et al., 1969), incluindo a inibição da síntese de proteínas mitocondriais (Lenk & Penman, 1971). Admite-se que estes efeitos são os responsáveis pelas alterações observadas na ultrastrutura da mitocôndria (Soslau & Nass, 1971; King et al., 1972; Meyer et al., 1972; Risueño et al., 1975; McGill et al., 1976 ; Lunger & Clark, 1979). Também têm sido detectadas alterações na estrutura nuclear, provavelmente, como resultado da interacção do brometo de etídio com o DNA nuclear (Risueño et al., 1972; Nass, 1972; Flickinger, 1973 ; Lord & Lafontaine, 1973) ou como efeito secundário resultante da alteração do metabolismo mitocondrial. Smith-Johannsen e colaboradores (1980) verificaram que o brometo de etídio não inibia a divisão celular apenas provocava uma diminuição do rRNA mitocondrial e do número de cristas.

Ao estudar-se a acção do brometo de etídio, nos organelos citoplasmáticos durante a microsporogénese, observou-se que quan-

do se ensaiaram concentrações baixas (50 µg/ml), as alterações não foram muito evidentes, embora não se observasse divisão nuclear. No entanto, ao fim de 24 horas de tratamento utilizando concentrações cerca de 100 µg/ml, as mitocôndrias apresentavam contornos irregulares , matriz clara e cristas irregulares com dimensões reduzidas. Além disso, observou-se a presença de complexos densos na matriz mitocondrial, parecendo corresponderem aos descritos por McGill e colaboradores (1973, 1976), Lord (1974), Risueño e colaboradores (1975) e Lunger & Clark (1979). Segundo estes autores, estes complexos ocorrem como resultado de inibição mitocondrial e representam uma acumulação de macromoléculas, incluindo brometo de etídio, DNA mitocondrial e proteínas.

Os diversos autores, que estudaram a acção do brometo de etídio, sugerem que este inibidor tem a capacidade de provocar o alargamento da mitocôndria, diminuição das cristas além da formação de corpos electronicamente densos na matriz mitocondrial. A redução das cristas mitocondriais parece ser devida à redução ou perda dos citocromos $a+a_3$ e b (Soslau & Nass, 1971).

Curiosamente, no nosso material as mitocôndrias, que se observaram no micrósporo, surgiam profundamente modificadas tendo o brometo de etídio apenas provocado o aparecimento de mitocôndrias de perfis irregulares, matriz clara e cristas muito reduzidas, com acumulação de complexos escuros na matriz.

Os plastídios das células do tapete, apresentavam a estrutura complexa de túbulos muito alterada.

Ensaiou-se o DCMU, para se verificar o desenrolar da microsporogénese, e observou-se que quando aplicado em estados iniciais da microsporogénese provocava alteração no metabolismo das células polínicas.

Este inibidor foi ensaiado quer mergulhando extremidades de hastes florais directamente na solução quer através de nebulizações sobre plantas envasadas. No primeiro caso verificou-se que, após 24 horas de tratamento, as mitocôndrias presentes nas células polínicas, embora de grandes dimensões , apresentavam sempre matriz bastante clara com algumas formações elec -

tronicamente densas e cristas bastante reduzidas em arranjos circulares. Com tempos longos de tratamento as modificações ultraestruturais acentuaram-se, estendendo-se também aos plastídios.

Quando se usou o DCMU em nebulizações, ao fim de 24 horas, observou-se um desenvolvimento acentuado das cristas mitocondriais dispondo-se paralelamente ao invólucro mitocondrial. Por outro lado, ao fim de 72 horas, surgiam no citoplasma grandes perfis membranares dispostos em arranjos paralelos, que se assemelhavam a perfis mitocondriais em degenerescência. Na mesma célula ocorriam mitocôndrias de pequenas dimensões com um sistema de cristas bem desenvolvido. Os plastídios das células do tapete eram proplastídios cuja estrutura complexa, semelhante ao corpo prolamelar, surgia bastante desorganizada. Além disso, possuiam lamelas isoladas em número reduzido mas com cisternas muito dilatadas.

À medida que prosseguiram as nebulizações observou-se que no micrósporo em fase de redução vacuolar não ocorria a divisão nuclear, embora se efectuasse a divisão das mitocôndrias e diminuição do volume dos vacúolos. Efectivamente observavam-se mitocôndrias de forma mais ou menos arredondada e de pequenas dimensões. Como não se formou o grão de pólen não se observou amido nos plastídios.

As alterações induzidas pelo DCMU nas mitocôndrias, têm sido atribuídas à sua acção na respiração provavelmente pela inibição da oxidação do citocromo b (Colson et al., 1977).

Calvayrac e colaboradores (1979), quando submeteram culturas de Euglena gracilis à acção do DCMU, obtiveram resultados idênticos aos que se descreveram em Cucumis sativus L., pois estes autores igualmente verificaram alterações nas mitocôndrias e nos plastídios.

Como se observou, as mitocôndrias começavam a exibir extensas cristas e uma intensificação do seu sistema lamelar em arranjos paralelos, resultados estes já citados na literatura (Morisset, 1974; Bomsel & Calvayrac, 1978; Cossentini, 1978). Esta dispo

sição das cristas em arranjos paralelos, segundo estes autores, traduz uma adaptação funcional a uma diminuição na actividade respiratória. Os plastídios apresentavam tilacóides muito vesiculares; estas alterações, ao nível dos cloroplastos, observadas por Calvayrac e colaboradores parecem estar relacionadas com a acção do DCMU no transporte de electrões e na síntese de clorofilas, ácidos gordos e galactolípidos presentes nas membranas dos cloroplastos.

As alterações observadas nas mitocôndrias provavelmente são devidas a outros efeitos indirectos do DCMU, além da inibição directa na cadeia de transporte de electrões, que afectam também o metabolismo geral das células e consequente crescimento.

O interesse em ensaiar o 2,4-dinitrofenol foi devido ao conhecimento do facto de que certos agentes químicos afectam o funcionamento das mitocôndrias por dissociação da oxidação e fosforilação induzindo assim modificações estruturais nestes organelos.

Em Cucumis sativus L. ensaiou-se o 2,4-dinitrofenol quer mergulhando extremidades de hastes florais na solução com a droga quer inoculando as anteras em meios de cultura que continham o 2,4-dinitrofenol.

Os ensaios efectuados permitiram verificar que as alterações observadas nas anteras em meios de cultura eram mais pronunciadas pois a microsporogénese não se processava, tendo-se observado ao fim de 4 horas de tratamento uma grande vesiculação no citoplasma cujas vesículas derivaram provavelmente do retículo endoplasmático rugoso e liso. As mitocôndrias apresentavam perfis irregulares, matriz clara e cristas vesiculares. Nas células do tapete observou-se um grande desenvolvimento do retículo endoplasmático rugoso surgindo em arranjos paralelos. Ao fim de 24 horas de tratamento os organelos apresentavam sinais de degenerescência progressiva.

O tratamento efectuado em hastes florais provocava altera-

ções muito semelhantes às descritas na literatura (Morisset, 1974; Ganote et al., 1980 ; Turturro & Shafiq, 1981). Essas modificações envolviam a total morfologia da mitocôndria, sua forma, dimensão, densidade da matriz e configuração das cristas.

No micrósporo as mitocôndrias, embora de grandes dimensões, possuiam matriz condensada, cristas muito desenvolvidas e dilatadas.

No micrósporo em fase de redução vacuolar as mitocôndrias dividiram-se surgindo em maior número e de pequenas dimensões e, curiosamente, as mitocôndrias resultantes da divisão apresentavam matriz pouco densa e raras cristas. No entanto,não ocorria divisão nuclear o que levou a admitir que o 2,4-dinitrofenol impediu a divisão nuclear (Sawada & Rebhun, 1969).

Como o 2,4-dinitrofenol interferiu com o aspecto geral da mitocôndria, a configuração condensada que se observou pensa-se ser devida possivelmente ao seu efeito dissociador da cadeia respiratória (Muscatello et al., 1972, 1975 , 1978).

Nos micrósporos em desenvolvimento, também se observaram "nebenkerns" de retículo endoplasmático rugoso ; resultado coincidente com o obtido por Podbielkowska e colaboradores (1975) após tratamento com 2,4-dinitrofenol.

A citocalasina B actua como inibidor específico da função dos microfilamentos pela sua interacção com as proteínas contrácteis (Wessells et al., 1971).

Sabe-se que tratamentos efectuados com citocalasina B afectam o estado ou organização dos microfilamentos nas células e tecidos, resultando numa alteração das várias funções associadas com esses microfilamentos. A actividade metabólica e o mecanismo molecular,que envolvem as alterações ocorridas na ultrastrutura e mobilidade dos organelos citoplasmáticos, não estão ainda perfeitamente reconhecidas, embora grande número de experiências tenham sido realizadas, utilizando a citocalasina B. Além desta droga afectar a forma da célula, formação da pa-

rede celular e sua ligação a locais da membrana impedindo o transporte de glucose para o interior da célula (Lin & Spudich, 1974 ; Jung & Rampal, 1977), sabe-se também que actua principalmente como inibidor de alguns processos móveis tais como, movimentos citoplasmáticos (Mascarenhas & Lafountain, 1972), movimentos de organelos, como cloroplastos (Wagner et al., 1972) e mitocôndrias (Kuroiwa & Takahashi, 1980 ; Lockhausen & Kristen, 1983), e migração de vesículas de Golgi (Mollenhauer & Morré, 1976; Picton & Steer, 1981 ; Lockhausen & Kristen, 1983).

As mitocôndrias estão sujeitas a alterações na sua acividade respiratória e fosforilativa que se traduzem em modificações na sua forma e volume e admite-se que essas alterações sejam devidas à presença, nas mitocôndrias, de proteínas contrácteis (Arcos et al., 1967).

Kuroiwa & Kuroiwa (1980) ensaiaram a acção da citocalasina B durante a divisão mitocondrial que ocorre normalmente em Physarum. Estes autores mostraram que este inibidor metabólico impedia a divisão das mitocôndrias, com a ausência de formas amebóides, e admitiram que esta inibição era devida a uma destruição da função das proteínas contrácteis presentes nas mitocôndrias.

Ensaiou-se a acção da citocalasina B mergulhando hastes florais directamente na solução ou inoculando as anteras, contendo células polínicas em estados iniciais da microsporogénese, nos meios de cultura com o inibidor.

As nossas observações de material tratado com a citocalasina B mostraram que, 24 horas após tratamento, as mitocôndrias presentes nas células em fase de tétrada, eram de pequenas dimensões e forma mais ou menos arredondada. Este facto levou a acreditar que a citocalasina tivesse impedido a formação de mitocôndrias gigantes modificadas. No entanto, ao fim de 48 horas de tratamento, as mitocôndrias surgiram modificadas, apresentando formas gigantes e com vários enclaves citoplasmáticos. Nestas células observou-se uma acentuada actividade dos dictiossomas, com a formação de numerosas vesículas a rodear os sáculos. Parece, des

te modo poder admitir-se que a citocalasina B inibe o movimento das vesículas Golgianas, pois observavam-se nas proximidades dos sáculos.

Após 72 horas de tratamento com este inibidor não se observou actividade dos dictiossomas e nas mesmas células apenas o retículo endoplasmático se apresentava alterado, formando perfis paralelos e concêntricos tipo "nebenkern".

Observaram-se também perfis finos e longos de cisternas de retículo endoplasmático em arranjos paralelos e nas proximidades das mitocôndrias, não havendo a assinalar a presença de zonas de contacto entre as membranas do retículo endoplasmático e a membrana externa do invólucro mitocondrial.

Os micrósporos em fase de redução do sistema vacuolar apresentavam mitocôndrias de pequenas dimensões e de forma mais ou menos arredondada, o que contradiz os resultados descritos por Kuroiwa & Kuroiwa (1980) que a citocalasina B inibia a divisão mitocondrial.

Os fenómenos que presidem à formação da parede do grão de pólen não foram afectados.

Nos micrósporos de Cucumis sativus L. a citocalasina B apenas provocou uma inibição da migração das vesículas, derivadas dos dictiossomas, para outros locais da célula e um aumento de perfis de retículo endoplasmático.

Curiosamente, a citocalasina B usada em meios de cultura parece ter efeitos tóxicos nas células, provavelmente derivados de uma elevada concentração utilizada. As tétradas, após 24 horas de permanência em meio de cultura, apresentavam mitocôndrias de matriz condensada, cristas longas e dilatadas e o retículo endoplasmático liso e rugoso surgia com as cisternas também bastante dilatadas. Posteriormente, assistiu-se a uma paragem no desenrolar da microsporogénese e as células políticas mostravam sinais de degenerescência.

A colquicina é um alcalóide, inibidor específico dos microtúbulos devido à ligação directa destes com as subunidades proteicas.

Nas células vegetais a colquicina tem sido bastante ensai-

ada com o fim de explicar a interacção dos microtúbulos com certos aspectos do desenvolvimento celular. Os microtúbulos das células vegetais podem desempenhar funções relacionadas com o movimento das células, movimento intracelular dos vários organelos citoplasmáticos, formação da parede celular, manutenção da forma da célula, divisão celular e vários aspectos da diferenciação celular (Newcomb, 1969; O'Brien, 1972; Olmsted & Borisy, 1973 ; Hepler & Palevitz, 1974).

Sabe-se que para despolimerizar os microtúbulos das células vegetais são necessárias concentrações relativamente altas deste alcalóide, que por sua vez poderão afectar a actividade celular, através de mecanismos provavelmente não relacionados com a sua acção directa nos microtúbulos (Hart & Sabnis, 1976). Deste modo os resultados obtidos, por vezes, são difíceis de interpretar devido às altas concentrações que se devem usar nas células vegetais.

Ensaiou-se a colquicina quer em solução aquosa quer em tampão fosfato e neste caso, a colquicina provocava alterações mais profundas ao fim de relativamente pouco tempo de tratamento (cerca de 5 horas). Parece pois poder admitir-se que o tampão fosfato teve influência na actividade da colquicina. Pelo contrário, Margulis e colaboradores (1969) admitiram que o tampão Tris tornava a colquicina inactiva.

Assim, usando a colquicina em solução aquosa, as alterações foram ocorrendo mais lentamente. Após 24 horas de tratamento observaram-se, nos micrósporos, abundantes dictiossomas com numerosas cisternas empilhadas parecendo em fraca actividade, devido à ausência de vesículas de secreção. As mitocôndrias não surgiam com modificações na sua forma e dimensão, apenas exibiam matriz densa em electrões e número reduzido de cristas de pequenas dimensões. Contudo, o retículo endoplasmático apresentava-se muito abundante pois, após 48 e 72 horas de tratamento, observaram-se configurações paralelas e concêntricas tipo "nebenkern". Os plastídios, presentes nas células do tapete, apresentavam a estrutura complexa de tú

bulos mais compacta, com deposição de material electronodenso no seu interior.

A colquicina não impediu a divisão das mitocôndrias tendo-se assistido, no microscópio em fase de redução do sistema vacuolar, à presença de numerosas mitocôndrias de pequenas dimensões e forma mais ou menos arredondada.

Com tempos de tratamento superiores a 72 horas observaram-se alterações mais acentuadas. Assim, o retículo endoplasmático surgia mais abundante em perfis paralelos e/ou concêntricos; a deposição da parede do grão de pólen ocorria irregularmente, afectando a nexina 2 e inibindo a formação da nexina 3 e intina. A camada que constitui a nexina 2 depositava-se irregularmente, observando-se zonas em que não ocorria a sua deposição.

Moskalewski e colaboradores (1975) mostraram que a colquicina provocava a dissociação dos dictiossomas com redução do número de sáculos. Os nossos resultados diferiram dos apresentados por estes autores, dado que os dictiossomas apareciam formados por um grande número de cisternas embora em fraca actividade secretora.

As modificações observadas ao nível do retículo endoplasmático são idênticas às descritas para células tratadas também com a colquicina (Dexheimer, 1966a ; Mesquita, 1966).

As alterações, observadas nas células polínicas, não parecem ser resultantes da acção directa da colquicina mas sim de efeitos secundários. Sabe-se que a colquicina estimula a síntese de ácidos nucleicos o que provoca uma utilização muito rápida de ATP e portanto uma diminuição de energia, que por sua vez pode provocar perturbações mais ou menos acentuadas nos processos metabólicos. Estas alterações podem explicar as observadas ao nível do retículo endoplasmático e dos dictiossomas e também a formação irregular e incompleta da parede do grão de pólen.

A maior parte dos inibidores da respiração mitocondrial e fosforilação, assim como agentes dissociadores, têm sido acusa

dos de atrasar, ou até inibir, a mitose em células animais. Desconhece-se o mecanismo que envolve esta inibição, mas, presumivelmente, será devido à produção de baixos níveis de ATP que são inferiores aos exigidos para desencadear a divisão nuclear.

Estudos realizados com a rotenona, um inibidor respiratório, levaram à conclusão que este alcalóide também inibe a mitose e que a paragem de divisão nuclear se realiza segundo um mecanismo semelhante ao provocado pela colquicina, ou seja, provoca uma incapacidade de associação dos microtúbulos para formarem o fuso acromático.

Dado que a rotenona é um inibidor da respiração, bloqueando o transporte de electrões entre a flavoproteína e o citocromo b, as células submetidas à sua acção, provavelmente, ficam sujeitas a baixos níveis de ATP. Com a finalidade de saber se a microsporogénese se realiza com baixos níveis de ATP, ensaiou-se a acção da rotenona na concentração de 5 mg/l uma vez que Barham & Brinkley (1976a, b) utilizaram esta concentração em células animais tendo obtido resultados positivos.

Em Cucumis sativus L. verificou-se que a rotenona, na concentração ensaiada, necessitava de tempos longos de tratamento para as células reagirem à sua acção. Após 72 horas de tratamento as células, em fase de tétrada, possuiam mitocôndrias de matriz condensada e cristas dilatadas. O retículo endoplasmático, predominando o tipo liso, surgia em perfis longos com cisternas dilatadas por vezes, observando-se em disposição circular, envolvendo algum citoplasma.

No micrósporo as mitocôndrias tinham formas e dimensões semelhantes ao controlo e apresentavam vários enclaves citoplasmáticos. No entanto, a matriz era pouco electronodensa e as cristas, em configuração normal, eram pouco desenvolvidas. Curiosamente, nestas mesmas mitocôndrias observaram-se também algumas cristas bastante modificadas. Estas cristas eram constituídas por duas lamelas paralelas de 6,6 a 9 nm de espessura medindo as cisternas de 11 a 13 nm. As lamelas formavam uma es

trutura aparentemente rígida e observações em grande ampliação permitiram verificar que as membranas,que as constituíam, eram onduladas e se apresentavam ligadas entre si por estrias, que se dispunham com uma periodicidade constante, que com elas faziam um ângulo de 45°. As estruturas rígidas assim formadas ora se dispunham rectilineamente através da matriz ora se apresentavam encurvadas e neste caso o encurvamento seria possivelmente provocado pela adaptação das estruturas às variações da forma das mitocôndrias. De salientar que nas mitocôndrias surgiam, por vezes, conjuntos constituídos por várias cristas modificadas associadas entre si em arranjos paralelos; casos se observaram em que uma mesma mitocôndria exibia vários arranjos com diferentes orientações.

Nos micrósporos vacuolizados o retículo endoplasmático era bastante abundante apresentando cisternas dilatadas. Simultaneamente observavam-se agrupamentos de retículo endoplasmático rugoso em estruturas paralelas e concêntricas tipo "nebenkern".

Nos micrósporos em fase de redução do sistema vacuolar observava-se grande número de mitocôndrias, de pequenas dimensões e forma mais ou menos arredondada, resultantes da divisão das mitocôndrias gigantes que existiam no estado anterior da microsporogénese. A matriz daquelas mitocôndrias era condensada e as cristas dilatadas. Nestes micrósporos não se observou divisão nuclear.

A rotenona não alterou a morfologia da estrutura complexa de túbulos presente nos plastídios das células do tapete, embora se observassem algumas lamelas de cisternas dilatadas bem como a presença de glóbulos osmiofílicos.

A inibição da divisão nuclear e o aparecimento do retículo endoplasmático liso com cisternas bastante dilatadas foram também observados por Barham & Brinkley (1976a, b).

A presença de "nebenkerns" de retículo endoplasmático rugo

so surgia frequentemente nestas células da microsporogénese, quando submetidas a condições que se sabe alterarem o metabolismo. Além da rotenona, também a obscuridade, o 2,4-dinitrofenol, a citocalasina B e a colquicina levavam ao aparecimento destas configurações de retículo endoplasmático. Vários autores admitiram que estas formações podem ser devidas à anaerobiose provacada (Gavaudan et al., 1960 ; Morisset, 1973), à adição de antibióticos (Dexheimer, 1966a), à inibição respiratória provocada pela adição de 2,4-dinitrofenol (Podbielkowska et al., 1975 ; Morisset, 1983), à acção de agentes mitoclásicos (Dexheimer, 1966b ; Mesquita, 1966 , 1968), à adição de uma solução salina ao meio de crescimento (Cossentini, 1978) e ainda sob condições de frio (Kimball & Salisbury, 1973). Semelhantes aspectos foram também observados em células vegetais em condições normais de desenvolvimento (Nougarede, 1963; Hebant, 1969; Esau & Gill, 1971; Dereuddre, 1972; Abreu & Dexheimer, 1973; Kristen, 1977). O seu significado tem sido muito controverso mas, na maioria dos casos, o aparecimento destes "nebenkerns" de retículo endoplasmático é transitório e traduz, possivelmente, uma modificação passageira do seu metabolismo (Abreu & Dexheimer, 1973) ou grande actividade secretora (Esau & Gill, 1971; Kristen, 1977).

Em alguns casos as formações de retículo endoplasmático, tipo "nebenkern", surgiam nas células quando o nível de produtos derivados da respiração, provavelmente ATP, era limitado ou mesmo nulo. Estes casos ocorriam em condições de anaerobiose ou devido à acção de inibidores que afectavam a respiração, ou mesmo quando as células apresentavam uma exaustão de produtos após uma grande actividade metabólica.

Para certos autores a reorganização do retículo endoplasmático, tomando a configuração de "nebenkern ", pode significar um processo de adaptação e protecção das células a condições que lhes são adversas.

Pela acção da rotenona surgiam modificações nas cristas mitocondriais quando as mitocôndrias se apresentavam modificadas, pois nos outros estados da microsporogénese apenas se observaram mitocôndrias de matriz condensada e cristas dilatadas.

Como se descreveu surgiam, no interior das mitocôndrias, algumas cristas aparentemente rígidas e cristas de configuração normal, observando-se frequentemente em continuidade.

Alguns investigadores descreveram formações lamelares em arranjos paralelos no interior das mitocôndrias e sugerem que estas formações derivam das cristas (Jézéquel, 1959 ; Watrach, 1964). Na literatura existem várias descrições sobre o aparecimento de arranjos membranares paralelos no interior das mitocôndrias e segundo alguns autores representam uma resposta a condições anormais, provocadas por adição do cloranfenicol, tratamentos hormonais, envenenamento pelo chumbo, intoxicação com o cobre ou sais de amónio ou ainda dietas deficientes em proteínas (Jézéquel, 1959; Watrach, 1964; Adoutte et al., 1972; Tuchweber et al., 1972).

Estruturas semelhantes às que observamos nas mitocôndrias dos micrósporos de Cucumis sativus L., sob a acção da rotenona, foram descritas em várias células ocorrendo ocasionalmente sem tratamento, quer em células vegetais como raízes de feijão (Newcomb et al., 1968) quer em diversas células animais (Tani et al., 1971; Hall & Crane, 1971 ; Witaliński & Goniakowska-Witalińska, 1981). Para estes autores, estas estruturas não significam uma resposta a qualquer agente estranho, apenas se podem incluir em tantas outras modificações que ocorrem ocasionalmente nas mitocôndrias e que são provavelmente devidas a condições adversas.

São curiosos os resultados apresentados por Nathaniel (1980) pois, este autor, refere a presença de arranjos paracristalinos das cristas mitocôndriais nas células da tiróide de ratos normais e ratos submetidos a gonadactomia. Este autor relacionou a presença destas estruturas com o estado de divisão das mitocôndrias e admitiu um possível papel destas estruturas na respiração e estado funcional da mitocôndria. Será portanto de ex-

cluir a hipótese de se tratar de um processo degenerativo, tal como referem alguns autores (Jézéquel, 1959; Watrach, 1964).

A presença das cristas, aparentemente rígidas, tem sido relacionada com a configuração do estado ortodoxo do ciclo de energia durante a divisão mitocondrial. Provavelmente, será um processo de a mitocôndria poder utilizar a energia de acordo com a exigência funcional do meio. Este fenómeno de adaptação poderá ter um papel importante no restabelecimento e na função normal da célula. Estes argumentos poderão servir para explicar a presença das cristas aparentemente rígidas nas mitocôndrias, pertencentes aos micrósporos de Cucumis sativus L., uma vez que estes organelos estão em fase de divisão.

Adoutte e colaboradores (1972) obtiveram estruturas idênticas em material submetido ao cloranfenicol e admitiram serem devidas a um efeito secundário deste inibidor. No nosso material estas estruturas não são observadas quando as anteras foram submetidas ao cloranfenicol ou a qualquer outro inibidor metabólico.

A presença das cristas aparentemente rígidas, em material submetido à acção da rotenona, poderá ser consequência de uma interferência deste inibidor com algumas das actividades enzimáticas das mitocôndrias. Tal como admitiu Nathaniel (1980) será pois um processo de a mitocôndria poder utilizar a energia necessária para a sua divisão pois no estado seguinte da microsporogénese, após divisão das mitocôndrias, não foram observados tais arranjos das cristas, surgindo mitocôndrias de matriz condensada e cristas dilatadas como resposta à rotenona.

Dos estudos efectuados sobre a acção do campferol na germinação dos tubos polínicos, sabe-se que este flavonóide tem uma acção estimulante ou inibidora conforme a concentração utilizada. A sua acção inibidora verifica-se ao nível de algumas reacções, provocando a produção de baixos níveis de ATP segundo um efeito dissociador.

Ensaiou-se o campferol utilizando uma concentração muito próxima da indicada por Sedgley(1975) e que este autor considerou como sendo a mais apropriada para estimular a germinação do tubo polínico.

O campferol não provocou alterações no ciclo que as mitocôndrias normalmente apresentam durante o desenrolar da microsporogénese em Cucumis sativus L.. O retículo endoplasmático surgia em perfis finos e longos por vezes em disposição paralela e observou-se grande número de polirribossomas no citoplasma dos micrósporos. Visualizaram-se também aproximações das membranas do retículo endoplasmático com a membrana exterior do invólucro mitocondrial e é curioso referir que nos enclaves citoplasmáticos surgiam situações semelhantes.

No micrósporo em fase de redução do sistema vacuolar as mitocôndrias dividiram-se. Nesta fase as células apresentavam metabolismo elevado, tendo-se observado o núcleo em divisão, grande número de mitocôndrias e dictiossomas aparentemente muito activos. O retículo endoplasmático surgia em perfis pouco longos com cisternas muito dilatadas contendo material fibrilar no interior e observaram-se abundantes perfis de retículo endoplasmático junto ao plasmalema, provavelmente desempenhando um papel activo na formação da camada de intina. Neste estado da microsporogénese observaram-se também bastantes polirribossomas em espiral.

Em todos os outros estados da microsporogénese observados, o campferol levou à formação de dictiossomas constituídos por numerosos sáculos empilhados não havendo, aparentemente, produção de vesículas.

Não se observaram estados posteriores da microsporogénese mas, dado o grande número de organelos citoplasmáticos e a presença de abundantes polirribossomas, é razoável admitir-se que o campferol, na concentração utilizada, estimulou o metabolismo

em todos os estados da microsporogénese.

O campferol induziu a aproximação das membranas do retículo endoplasmático com o invólucro mitocondrial. Estas observações foram também verificadas nas células polínicas quando a microsporogénese se desenrolou na obscuridade ou quando as hastes florais foram mergulhadas na solução de citocalasina B. Em todos estes casos, a aproximação dos perfis de retículo endoplasmático com as mitocôndrias não pareceu ser do tipo junção pois não se observou fusão das suas membranas.

Vartapetian e colaboradores (1977) admitiram que estas associações podiam ser explicadas segundo o conceito de bioenergética da célula (teoria quimiosmótica da transformação de energia nos sistemas biológicos). De acordo com esta teoria, na célula viva ocorrem transformações recíprocas de formas químicas (ATP) e físicas (potencial) de energia. A energia física pode, fácil e rapidamente, ser transportada ao longo da membrana para uma distância relativamente grande onde pode regressar à forma de energia química para ser utilizada pela célula. Assim, a aproximação do invólucro mitocondrial com o retículo endoplasmático pode significar um transporte de energia sob a forma potencial ao longo das membranas para os locais de síntese proteica onde essa energia potencial, que entrou, pode passar novamente à forma de energia química que é prontamente utilizada pela célula.

Alguns autores admitiram que a associação retículo endoplasmático-mitocôndrias era apenas o resultado de uma actividade fisiológica. Szöllösi & Hunter (1973) atribuíram ao complexo retículo endoplasmático-mitocôndria o papel de utilização de energia para reacções de síntese e Damsky (1976) sugeriu que o retículo endoplasmático em Saccharomyces carlsbergensis podia estar envolvido na síntese e transporte de polipeptídeos mitocôndriais. Spacek & Lieberman (1980) admitiram que a membrana externa do invólucro mitocondrial compreendia uma porção especializada do retículo endoplasmático liso.

O desenrolar da microsporogénese foi também apreciado submetendo as anteras à acção de substratos carbonados nomeadamente a 2-deoxi-D-glucose (2-DOG) e a glucose.

Certos substratos carbonados são capazes de induzir modificações consideráveis no condrioma (Lefort, 1964) e na taxa respiratória (Sharpless & Butow, 1970).

As nossas observações em material tratado com a 2-deoxi-D--glucose ou a glucose mostraram que o desenrolar da microsporogénese não foi alterado, tendo-se observado grãos de pólen binucleados. Nos estados iniciais da microsporogénese não se assistiu a uma modificação na estrutura dos organelos citoplasmáticos. Assim, as mitocôndrias surgiram com formas bizarras não havendo alterações na sua morfologia, na opacidade da matriz nem na configuração das cristas. Estes organelos igualmente se dividiram,dando origem a formas mais ou menos arredondadas e de pequenas dimensões.

Facto a assinalar foi a ausência de pontos de amido nos plastídios,pertencentes ao grão de pólen jovem,e o aparecimento de grandes glóbulos lipídicos na célula vegetativa.

Quando se adicionou a glucose ao meio de cultura e se inocularam anteras, com células polínicas em estados iniciais da microsporogénese, observou-se uma paragem no seu desenvolvimento. Com tempos prolongados de tratamento assistiu-se a uma progressiva alteração dos organelos citoplasmáticos e sua completa degenerescência. Este facto ocorreu também com outras soluções referidas anteriormente (cicloheximida, 2,4-dinitrofenol e citocalasina B) e a análise dos resultados obtidos leva a concluir que estas drogas devem ser usadas em concentrações inferiores às utilizadas para tratamentos das hastes florais, uma vez que as anteras ficam mais intimamente em contacto com o meio de cultura e por conseguinte com o composto a estudar.

Schäfer e colaboradores (1977) verificaram o transporte da glucose e outros açucares para o interior dos cloroplastos realizado através da membrana interna do invólucro plastidial

por um transportador específico.

No nosso material a adição dos compostos carbonados parece ter inibido a acumulação de amido pois neste estado da microsporogénese (grão de pólen jovem) em condições normais ocorre a amilogénese. Contudo, torna-se difícil explicar a eventual interferência destes compostos carbonados na acumulação de amido. Sabe-se que existem proteínas que estão envolvidas na amilogénese e vários antibióticos, como a actinomicina D e o cloranfenicol, são capazes de impedir a síntese do amido sem afectarem a organização dos plastídios (Salema, 1969).

No grão de pólen jovem de Cucumis sativus L., após tratamento com estes dois substratos carbonados, observou-se no citoplasma a presença de corpos que se assemelham a lípidos mas provavelmente este facto não está directamente relacionado com a inibição da acumulação de amido. Nos animais superiores,como é difícil armazenar polissacarídeos, sabe-se que a glucose quando ingerida, entra no ciclo da glicólise, é transformada em piruvato e depois em acetilcoenzima A a partir do qual os ácidos gordos são sintetizados.

V RESUMO GERAL E CONCLUSÕES

Este trabalho descreve os estudos efectuados em anteras de Cucumis sativus L. com células polínicas em diferentes estados de formação do grão de pólen. Um dos principais interesses deste estudo foi a observação, em alguns estados da microsporogénese, de mitocôndrias de forma e dimensões profundamente modificadas. Tal ocorrência foi descrita pela primeira vez por Abreu & Santos (1977) e Abreu e colaboradores(1982), não existindo na literatura da especialidade observações semelhantes em outras espécies.

Determinou-se o estado da microsporogénese em que as mitocôndrias começam a surgir modificadas assim como o estado em que, posteriormente, estes organelos regressam às formas iniciais com pequenas dimensões. Fez-se também um estudo do comportamento dos vários organelos citoplasmáticos durante a formação do grão de pólen assim como a localização citoquímica, a nível ultrastrutural, da actividade de algumas enzimas hidrolíticas e respiratórias. Procurou-se relacionar a acção de determinados agentes físicos e químicos sobre o desenrolar da microsporogénese e observaram-se os seus efeitos nos vários organelos citoplasmáticos.

1

Observações feitas ao microscópio electrónico de varrimento permitiram uma imagem do pormenor do androceu de Cucumis sativus L.. Assim, verificou-se que o androceu é constituído por 5 estames tridelfos (2+2+1) e as anteras têm a forma de S alongado. Estas são monolobadas ou monotécicas e o lóbulo apresenta dois sacos polínicos ou microsporângios.

2

Procedeu-se ao estudo, em microscopia óptica e electrónica de transmissão, da microsporogénese em Cucumis sativus L. desde as células esporogénicas até ao grão de pólen maduro.

A - Durante a meiose I assistiu-se a uma diminuição do número de ribossomas e a uma desdiferenciação das mitocôndrias e plastídios. No estádio de interfase surgiram no citoplasma formações designadas nucleoloides, tendo-se verificado o início do restabelecimento da população de ribossomas.

B - Canais citomícticos entre os meiócitos observaram-se quase até ao fim da meiose.

C - No desenrolar da microsporogénese verificaram-se dois períodos de amilogénese. Um primeiro durante a diacinese em que se observou a presença de pontos de amido nos plastídios até ao fim da meiose e, esporadicamente, no estado de micrósporo jovem. Um segundo período durante o estado de grão de pólen jovem, continuando no estado de grão de pólen maduro, em que a presença de amido se observou na célula vegetativa e germinativa.

D - Deu-se particular atenção às modificações apresentadas pelas mitocôndrias. Durante a meiose I, as mitocôndrias eram de pequenas dimensões e apresentavam formas mais ou menos arredondadas. A partir da interfase de meiose começavam a aumentar de volume e a adquirir formas amebóides. Com o desenrolar da microsporogénese assistia-se a um progressivo aumento do volume das mitocôndrias, que mostravam formas bastante irregulares e que durante o estado de micrósporo vacuolizado englobavam vários enclaves citoplasmáticos. Contudo no micrósporo, em divisão nuclear, as mitocôndrias apresentavam formas menos complexas,

aparentemente preparatórias da divisão por constrição. No grão de pólen as mitocôndrias eram mais ou menos arredondadas e de pequenas dimensões.

E - No fim da meiose (telofase II) observavam-se no citoplasma lamelas anuladas, que provavelmente desempenham um importante papel na produção de metabolitos necessários ao crescimento do gametófito.

F - Com o desenrolar da microsporogénese o retículo endoplasmático ia gradualmente aumentando e no micrósporo, em fase de redução do sistema vacuolar, observavam-se perfis finos e longos com ribossomas e polirribossomas associados às suas membranas. Este organelo parece desempenhar funções importantes, nomeadamente, na formação do sistema vacuolar, no transporte de material para a formação da intina e, como tem sido admitido, apresenta também uma função na produção de proteínas necessárias ao crescimento do tubo polínico.

G - O aparelho de Golgi, formado por numerosos dictiossomas, apresentava uma acentuada variação na actividade metabólica, parecendo coincidente com as fases de formação da parede do grão de pólen. No grão de pólen maduro os sáculos, constituintes dos dictiossomas, desintegravam-se originando pequenas vesículas.

H - Durante o desenrolar da microsporogénese, no período compreendido entre a ocasião em que se dá a dissolução da camada de calose e aquela em que se atinge a fase de grão de pólen jovem, observavam-se modificações no sistema vacuolar assistindo-se inicialmente a uma fase de vacuolização e posteriormente a uma fase de redução do vacuoma.

I - O grão de pólen parece possuir um metabolismo intenso, tendo-se observado grande abundância de organelos citoplasmáticos aparentemente em actividade.

3

A forma das mitocôndrias, pertencentes ao micrósporo vacuolizado, foi analizada através de cortes seriados, apresentando-se os resultados relativos a duas mitocôndrias, cujos perfis foram traçados considerando-se várias secções de corte.Pelos perfis obtidos verificou-se que estes organelos eram de grandes dimensões e de formas bizarras, contendo enclaves citoplasmáticos. Estes enclaves apresentavam formas também irregulares e não mostravam continuidade entre si.

Efectuou-se a análise estereológica das mitocôndrias pertencentes a células no estado de célula mãe (telofase II), tétrada, micrósporo vacuolizado e grão de pólen jovem, e verificou-se que aumentava o volume mitocondrial total (mitocôndria mais enclaves) em relação ao volume celular total, atingindo um valor máximo no estado de micrósporo vacuolizado e assistindo-se no estado seguinte (grão de pólen jovem) a uma acentuada diminuição. Neste último estado, não se observavam enclaves citoplasmáticos aprisionados nas mitocôndrias.

Nos quatro estados da microsporogénese,estudados na análise esteorológica, observou-se uma variação bastante grande do número de mitocôndrias por célula. Assim na telofase II o número médio de mitocôndrias era de 132, no estado de tétrada de 36, no estado de micrósporo vacuolizado de 6 e no grão de pólen jovem esse número aumentou para 80.

As modificações que se observavam nas mitocôndrias durante

a microsporogénese, parecem ser consequência de uma relação com o estado metabólico destas células. O aumento da superfície mitocondrial, proporcionará uma mais íntima e extensa relação das mitocôndrias com o citoplasma, de modo a facilitar as trocas recíprocas de substâncias.

4

A parede do grão de pólen, observada aos microscópios electrónicos de transmissão e de varrimento, mostrava-se constituída por uma sexina com báculas evidentes e um tecto liso densamente perfurado. A nexina era formada por três camadas, compreendendo a nexina 1, 2 e 3. As camadas de nexina 1 e 2 eram constituidas por esporopolenina e a nexina 3, devido aos resultados obtidos com a aplicação do teste de Thièry e PTA HCl, pareceu ser uma camada cuja matriz era de natureza péctica possuindo lamelas de esporopolenina.

Nas zonas dos poros não se observou a presença de sexina e a nexina era bastante espessada e lamelizada. A camada de intina, de natureza polissacarídica, surgia como uma camada fina a envolver os grãos de pólen, situando-se entre o plasmalema e a camada de nexina 3. Na região dos poros a camada de intina aparecia também muito espessada, possuindo evaginações do plasmalema.

O grão de pólen, observado ao microscópio electrónico de varrimento, tinha forma subachatada e possuia três poros circulares. Segundo a nomenclatura de Erdtman (1969), o grão de pólen de Cucumis sativus L. é NPC (344).

5

Deu-se particular importância à camada de células que envolve o lóculo da antera e que constitui o tapete. Em Cucumis sativus L. verificou-se que este tecido é constituído por dois tipos de células, que diferem um do outro pela organização do retículo endoplasmático. Umas células possuiam perfis longos de retículo

endoplasmático rugoso e outras continham um sistema elaborado de retículo endoplamático rugoso caracterizado por um conjunto de cisternas bastante dilatadas contendo numerosas vesículas, de várias formas e tamanho, rodeadas por uma membrana com ribossomas na face interior. Nestas vesículas observavam-se, frequentemente, organelos citoplasmáticos que posteriormente eram degradados o que sugere um possível comportamento autofágico destas formações.

O sistema elaborado de retículo endoplasmático observou-se em continuidade com o invólucro nuclear e com o plasmalema. Nestas células produziam-se orbículos no estado de tétrada jovem tendo-se observado, a presença destes corpos negros, no espaço perinuclear, no sistema elaborado de retículo endoplasmático rugoso e exteriormente à célula junto ao plasmalema. As células do tapete, que possuiam o sistema elaborado de retículo endoplasmático, degeneravam precocemente.

As células do tapete, que possuiam perfis longos de retículo endoplasmático, comportavam-se como um tapete amebóide pois observavam-se a rodear o lóculo da antera nas proximidades dos grãos de pólen e possuiam as suas células intactas. Verificou-se também a produção de macrorbículos, nestas células do tapete, ficando estes corpos esféricos junto à parede do grão de pólen, constituindo o "pollenkitt". Igualmente observaram-se restos das células do tapete, que haviam sofrido degenerescência, aderentes à superficie externa dos grãos de pólen assim como preenchendo as cavidades entre as báculas e o tecto da parede do grão de pólen.

Os plastídios das células do tapete apresentavam no estroma um conjunto de túbulos em arranjo regular semelhante ao corpo prolamelar dos estioplastos. No estado de grão de pólen estas estruturas, presentes no estroma dos plastídios das células do tapete, surgiam rodeadas por várias membranas, em disposição paralela e concêntrica, e o conjunto de túbulos adquiria a forma em anel ou em oito.

6

Foi possível obter a microsporogénese "in vitro" utilizando o meio de Murashige & Skoog (1962), sem reguladores de crescimento, em culturas mantidas em regime alternado de luz e obscuridade e a 27ºC. Cultivaram-se anteras, que possuiam células polínicas a partir do estado de telofase II, tendo-se acompanhado todo o processo evolutivo até à fase de micrósporo em redução do sistema vacuolar, ou seja,em divisão nuclear. Verificou-se que os estados da microsporogénese considerados ocorriam num período de aproximadamente 72 horas e que os organelos citoplasmáticos apresentavam modificações ultrastruturais semelhantes às observadas durante a microsporogénese que ocorre nas anteras das plantas em condições normais de desenvolvimento.

7

Efectuou-se a localização citoquímica da actividade de enzimas hidrolíticas (fosfátase ácida, ATPase e fosfátase alcalina).

A actividade da fosfátase ácida surgia localizada nos dictiossomas e vesículas derivadas e ainda na camada de intina em formação,mostrando-se mais intensa na região dos poros. Esta enzima parece estar relacionada com a formação da intina. A actividade da ATPase observou-se no plasmalema e nos vacúolos pertencentes a células no estado de tétrada e micrósporo em desenvolvimento. A actividade da fosfátase alcalina surgia localizada nas membranas dos vários organelos citoplasmáticos, não se tendo observado a actividade desta enzima nem no plasmalema nem na parede exínica dos micrósporos.

Foram também estudadas duas enzimas respiratórias, citocromo-oxídase e desidrogénase succiníca, tendo-se encontrado actividade destas enzimas nas cristas e invólucros das mitocôndrias. Este facto leva a admitir que as modificações que ocorri-

am nas mitocôndrias afectavam sobretudo a sua forma, uma vez que a actividade enzimática não estava tão drasticamente afectada. A existência de actividade destas duas enzimas aponta para a funcionalidade do processo respiratório.

8

Efectuaram-se experiências com agentes físicos e químicos para estudar o comportanmento dos organelos citoplasmáticos durante o desenrolar da microsporogénese.

Pela acção da luz contínua Cucumis sativus L. comporta-se como uma planta insensível à luz, pois todo o processo de formação e desenvolvimento do grão de pólen se assemelha ao realizado em períodos normais de luz e obscuridade.

No entanto, pela acção da obscuridade notaram-se alterações a nível das mitocôndrias e retículo endoplasmático. As mitocôndrias apresentavam matriz pouco electronodensa e cristas em número reduzido. O retículo endoplasmático surgia com os seus perfis em arranjos paralelos na vizinhança das mitocôndrias, tendo-se verificado a presença de configurações em "nebenkern" do retículo endoplasmático.

Vários agentes químicos foram ensaiados e enquanto uns funcionaram como agentes inibidores outros comportaram-se como estimulantes da microsporogénese.

Assim o cloranfenicol levou à formação de perfis mitocondriais bastante irregulares, matriz clara e um número reduzido de cristas sendo algumas em forma de anel. Tudo isto se deve, provavelmente, a um efeito secundário resultante da inibição da síntese proteica que ocorre nos ribossomas mitocondriais.

A cicloheximida conduziu a uma diminuição do número de ribossomas do citoplasma, a uma fraca actividade dos dictiossomas e também a uma redução no número e dimensão de perfis de retículo endoplasmático. As mitocôndrias apresentavam matriz condensada, redução do tamanho das cristas com dilatação das suas cisternas. Estes factos sugerem que a cicloheximida tem um papel de inibição da síntese proteica que ocorre nos ribos-

somas citoplasmáticos, levando a uma redução de proteínas mitocondriais que são sintetizadas nesses ribossomas.

O brometo de etídio levou à formação de perfis mitocondriais de contornos bastante irregulares, com matriz clara e cristas de dimensões reduzidas. Também na matriz mitocondrial era observável a presença de complexos densos que, provavelmente, representam macromoléculas de brometo de etídio, DNA mitocondrial e proteínas.

O DCMU provocou alterações nas mitocôndrias e plastídios, após várias nebulizações das flores de plantas envasadas. Pela acção deste herbicida as mitocôndrias apresentavam um acentuado desenvolvimento das cristas, em disposição paralela ao invólucro mitocondrial, tendo-se notado ao fim de 72 horas de tratamento o aparecimento, no citoplasma, de grandes perfis membranares dispostos em arranjos mais ou menos paralelos, assemelhando-se a perfis mitocondriais em degenerescência. Os plastídios surgiam com algumas lamelas isoladas de cisternas dilatadas.

O 2,4-dinitrofenol conduziu à formação de perfis mitocondriais de matriz condensada e cristas desenvolvidas e muito dilatadas. O retículo endoplasmático surgia em perfis paralelos e concêntricos tipo "nebenkern".

A citocalasina B actuou nos dictiossomas levando à produção de numerosas vesículas Golgianas e impedindo o movimento dessas vesículas para outros locais da célula dado que permaneciam na proximidade dos sáculos. Este facto parece ser devido à interferência da citocalasina B com as proteínas contrácteis que alguns autores admitem terem uma intervenção no movimento das vesículas. Nos micrósporos também se observou a presença de "nebenkerns" de retículo endoplasmático, bem como aproximação deste organelo com o invólucro mitocondrial. Porém, não foram observadas alterações da forma e da dimensão das mitocôndrias.

Tratamentos com a colquicina provocaram nas mitocôndrias a densificação da matriz e redução do número de cristas. O retículo endoplasmático apresentava-se muito abundante, observando-se perfis concêntricos. Verificou-se que se havia dado uma depo

sição anormal das camadas da parede do grão de pólen. Assim, a camada de nexina 2 formou-se irregularmente e não se deu nem a deposição da camada de nexina 3 nem a de intina. As modificações induzidas pela colquicina nos processos metabólicos parecem ser devidas a uma diminuição de energia que ocorre nas células.

Pela acção da rotenona ocorria alteração ao nível das cristas mitocondriais verificando-se a formação de cristas aparentemente rígidas, em continuidade com as cristas mitocondriais de forma normal. As mitocôndrias apresentavam um conjunto ou mesmo vários conjuntos formados por várias cristas modificadas, por vezes com orientações diferentes. Contudo, não se pode atribuir um papel degenerativo à presença destas estruturas nas mitocôndrias, sendo mais aceitável a hipótese de se tratar de um processo pelo qual a mitocôndria pode utilizar a energia de acordo com a exigência funcional do meio. Uma vez que a rotenona é um inibidor respiratório o aparecimento destas cristas, aparentemente rígidas, será consequência da interferência do inibidor com algumas das actividades respiratórias das mitocôndrias. Possivelmente, tal como alguns autores admitem, a presença destas cristas modificadas facilita a utilização da energia necessária à divisão que ocorre nas mitocôndrias, pois quando se formam mitocôndrias pequenas e de forma mais ou menos arredondada essas cristas não são observadas. As células polínicas, pela acção da rotenona, apresentam "nebenkerns" de retículo endoplasmático.

O campferol usou-se na concentração que, segundo alguns autores, estimula a germinação do grão de pólen. Nas células polínicas o campferol não inibiu a divisão nuclear, tal como sucedeu com os inibidores químicos ensaiados. Verificou-se que as células se mostravam metabolicamente activas, observando-se grande número de polirribossomas. Além disso, o campferol levava também à aproximação das membranas do retículo endoplasmático com o invólucro mitocondrial. Esta aproximação não é do tipo junção e, segundo alguns autores, aproximações deste tipo desempenham um papel no processo de transporte de energia, ao longo das membranas, para os locais de síntese. A aproximação entre o retículo endoplasmático e as mitocôndrias foi também obtida pela acção da obscuridade e citocalasina B.

A 2-deoxi-D-glucose e a glucose não impediram o desenrolar da microsporogénese, tendo-se porém verificado a ausência de acumulação de amido nos plastídios durante o estado de grão de pólen. Pelo contrário,no citoplasma observou-se uma abundância de formações que se assemelham a lípidos.

Nenhum dos compostos ensaiados impediu a formação de mitocôndrias atípicas nem a sua divisão, pois no estado de grão de pólen jovem observavam-se,apenas, mitocôndrias de pequenas dimensões e formas mais ou menos arredondadas.

Algumas,das substâncias descritas, foram também utilizadas em experiências com anteras mantidas em meios de cultura, tendo sido adicionadas aos respectivos meios.Os seus efeitos eram diferentes dos obtidos, após tratamento com hastes florais, nomeadamente no referente à cicloheximida, citocalasina B e glucose, pois provocavam a paragem da microsporogénese, tendo-se observado aspectos de degenerescência dos organelos citoplasmáticos.

A B S T R A C T

The present work presents the events associated with pollen grain development in anthers of Cucumis sativus L..

Surprisingly during the development of pollen grains huge mitochondria, with a strange amoeboid shape, were found (Abreu et al., 1977, 1982). Data on cytochemical and physiogical experiments are also presented.

The structure of the mitochondria has been carefully investigated as well as the changes in the fine structure of cytoplasmic organelles during microsporogenesis.

Male flowers (androecium) of the Cucumis sativus L. were studied using the scanning electron microscope. The androecium is composed by 5 monolobed stamens with a long sinuous S shape. The stamens are triadelphous, which means they form 3 groups (2+2+1). SEM images of a transversely broken androecium show that anthers are monolobed with two pollen sac locules.

The cytoplasm of pollen mother cells during meiotic division was studied as well as during the pollen development. Ribosome numbers decrease significantly in early meiosis I and are later (interphase) replenished, a process most likely involving the newly arising cytoplasmic nucleoloids.

Cytomictic channels are seen at the beginning of meiosis and persist up to the end of meiosis. Stacks of annulate lamellae occur in pollen mother cells (telophase II).

The endoplasmic reticulum and dictyossomes show some functional differences which are characteristic for pollen development. They participate in the vacuolation of the microspore, which presents a first stage of formation and finally the vacuoles are reduced.

The plastids and the mitochondria show a cycle of de- and reddiferentiation.

The plastids accumulate starch from diakinesis of prophase I to tetrad formation. One second phase of starch storage occurs

in the bicellular pollen grain. A considerable starch reserve is stored in the plastids of the vegetative and generative cells.

Alterations in the shape of mitochondria were seen during the initial stages of the ontogenic development of pollen grains of Cucumis sativus L.. During meiosis I the mitochondria were observed more or less spherical and generally small. Later, in interphase, the mitochondria appeared dumb-bell and cup-shaped. These alterations progressed and, at the free microspore stage, mitochondria were gigantic and amœboid, showing profiles with various cytoplasmic enclaves. In such areas of cytoplasm, free ribosomes and endoplasmic reticulum can be seen as well as helical-type polysomes which are rare in other cytoplasmic areas. The mitotic division, which produces binucleated pollen grains, was accompained by division of mitochondria, which progressively resumed normal shape and dimensions.

The mitochondria shape in the vacuolate microspore was studied by three dimensional analyses based on ultrathin serial sections and serial profiles of these organelles were drawn for study. Quantitative analyses of serial micrographs of the mitochondria during the pollen mother cells, tetrad, microspore and pollen grain stages were done to give specific details of mitochondrial volumes in those cells. Thus, the volume of these mitochondria was significantly increased attaining the maximum during the vacuolate microspore stage and at the binucleate pollen grain stage their volume diminished greatly. Calculations also showed that, in the four stages examined, the number of mitochondria was smaller in the vacuolate microspore stage. A particular metabolic situation can certainly be ascribed to the modifications of mitochondria during microsporogenesis. The enormous increase in mitochondrial membrane surface will produce a large and intimate relationship between them and the ground cytoplasm , facilitating exchange of substances.

Based on observations done with both tranmission (TEM) and scanning electron microscope (SEM) the general shape of the pollen grains of Cucumis sativus L. is seen as suboblate, having

3 circular pores equidistantly placed at the surface of the grains — NPC 344.

The sporodermis when seen in transection or when fractured shows the exine and the intine. The former comprising the external sexine and the internally located nexine. In the sexine, which is absent in the porus region, bacula supporting a heavily perforated tectum can be seen. The nexine is formed by three layers. The two outerlayers are more or less homogeneous and the third shows a lamellar structure of sporopollenin with in a polysaccharidic matrix. The nexine 3 increases in thickness under apertures. The cellulosic intine appears as a thin layer surrounding the pollen grain being thicker in the porus region.

Tapetal cells have long been recognized as physiologically important to pollen development. In anthers of Cucumis sativus L. the tapetum presents two different types of cells.Some tapetal cells have, in the cytoplasm, a pronounced accumulation of rough endoplasmic reticulum and in other cells the rough endoplasmic reticulum (RER) appears as a complex system of dilated cisternae, containing numerous vesicle-like structures limited by a single membrane, formed through invagination of the RER membrane, a process producing the engulfment of cytoplasm and even organelles, and leading to the appearance of ribosomes lining the inner face of the vesicles bounding membranes. The same process of vesicles formation through membrane invagination occurs at the outer membrane of the nuclear envelope;this envelope is very often in continuity with RER, which in turn is frequently seen fusing with the plasmalemma. The formation of vesicles by RER membranes increases throughout microsporogenesis, thus sequestering progressively more cytoplasm and organelles, which later went through a degenerative process, pointing to a possible autophagic activity of the vesicles.

Sporopollenin containing bodies were observed in the nucleus, in the nuclear cisterna and in various places along the huge cisternae of RER. By the end of microsporogenesis they

appear mostly located outside the cytoplasmic membrane. These cells are of the secretory type. The other type of cells progressively looses their distal cell walls and in more advanced stages of microsporogenesis the protoplasm directly contact the pollen wall, in this way forming a plasmodial-like tapetum.

Pollenkitt and tryphine (debris of the tapetal cells) were deposited on the pollen wall surface. In the tapetal cells the plastids are of the etioplast-type showing structures in the stroma formed by interconnected tubules in periodic and regular arrangements (prolamellar bodies) and also irregularly bent tubules dispersed throughout the organelle. At the binucleated pollen grain stage the prolamellar bodies are seen as being surrounded by bundles of large parallel tubules without interconnections.

Meiotic pollen mother cells (telophase II) of Cucumis sativus L. were successfully cultured "in vitro" using Murashige-Skoog's medium with the addition of 3% saccharose and 0.6% agar with no growth substances. The cultures were kept at 27°C in artificial light (day-light fluorescent tubes producing 12 hours light and 12 hours darkness, at an illuminating intensity of about 800 cd m^{-2}). The results showed that anthers of Cucumis sativus L. can be cultured from telophase II to vacuolate microspore stage over a 72 hours period presenting the same modifications of the cytoplasmic organelles as found "in vivo".

Cells involved in microsporogenesis display morphologic and physiologic changes namely increased activity of various enzymes related to anabolic and catabolic processes. Thus phosphatase activity was observed in tetrad and microspore stages. The results showed that acid phosphatase was possibly involved in pore formation and intine deposition; ATPase activity appeared associated with vacuolar and plasma membranes and the alkaline phosphatase activity was high with widespread distribution in mitochondria and plastid envelopes as well as endoplasmic reticulum and dictyosomes.These results revealed cellular sites related to the high metabolic activity of the microspores.

Cytochrome oxidase (DAB) and succinic dehydrogenase activities were also investigated by ultrastructural localization during microsporogenesis. Those enzyme activities are preferentially located in the inner mitochondrial membrane. These results showed that the modifications in the shape of mitochondria are not produced for a disturbed respiratory chain.

Several treatments using physical and chemical agents were done seeking a relationship between the referred mitochondrial modifications and their function.

The results showed that the continuous light has no influence on the microsporogenesis. However the dark treatment revealed changes in the mitochondria which showed reduced cristae and electron translucent matrix. The endoplasmic reticulum was extensive and was usually arranged in "nebenkern" configurations. Such effects were also observed in microspore cells treated with 2,4-dinitrophenol, colchicine, cytochalasin B and rotenone. Also cytochalasin B, kaempferol and dark treatment produced associations between mitochondrial envelopes and endoplasmic reticulum profiles. This fact may be regarded as an adaptative development to the transport of energy along mitochondrial membranes to the sites of protein synthesis.

The antibiotics chloramphenicol and cycloheximide, known inhibitors of protein synthesis, were also essayed. Chloramphenicol produced irregular mitochondrial profiles with the electron translucent matrix . The cristae decreased in number and appeared to be smaller than in controls. At some places rod-like cristae were seen. Cycloheximide affected appreciably the cytoplasmic ribosomes. Also we can see a decrease in number and length of the endoplasmic reticulum profiles. The mitochondria had a high electron dense matrix with a decrease in size of the cristae but with dilated cisternae. These results suggest that most of the new mitochondrial proteins were originally synthesized in the cytoplasm.

Ultrastructural changes in microspore cells treated with ethidium bromide occurred predominantly in the mitochondria.

These organelles presented an electron transparent matrix with a decrease in number of the cristae and also the presence of electron dense mitochondrial complexes containing probably ethidium bromide, mitochondrial DNA and protein.

Floral shoots were sprayed with aqueous solutions of DCMU and it seems that this herbicide induced morphological changes in the mitochondria and plastids. Rearrangements of the cristae in the matrix of the mitochondria were produced and images of cristae stacked parallel to the envelope of the mitochondria were seen. The plastids showed some lamellae with dilated cisternae.

After 2,4-dinitrophenol treatment the mitochondrial matrix was dense and there was great and numerous vesicular swellings of the cristae. Also "nebenkern" configurations of rough endoplasmic reticulum were seen as well as deep cytoplasmic vacuolization.

Cytochalasin B (CB) known as a specific inhibitor for the function of microfilaments, was found to have only a retardation effect on the formation of giant amoeboid mitochondria, not interfering with their division and subsequent evolution. Golgi vesicles were seen around dictyosomes and this is likely the result of a direct action of CB on the microfilaments related to the displacement of those vesicles. The endoplasmic reticulum seemed somewhat more abundant than the control and frequently assumed a concentric stacked configuration (nebenkern-like) around mitochondria. The increase of endoplasmic reticulum might be the result of anoxy or of a rapid and stimulated transport between endoplasmic reticulum and the close adpressed mitochondria.

Colchicine treatment induced an electron dense mitochondrial matrix with a decrease in number of cristae. Colchicine caused a anormal deposition of the pollen wall. Thus the nexine 3 and intine layers were not produced. These results suggest that colchicine presumably acts by preventing the utilization of ATP by the cells, or involves lowered ATP production.

Mitochondria with atypical cristae were observed after rotenone treatment.These formations are composed of parallel lamellae and we can see continuity between these formations and the cristae and also a frequent diminution in the number of cristae. Some mitochondria contain one or more parallel atypical cristae. The presence of these inclusions has been interpreted as an indication of a nonspecific degenerative phenomen but we can't support this view because we didn't detect any morphological mitochondrial abnormalities and after division of the mitochondria they return to normal configurations. Thus we may assume that this atypical mitochondria are involved in a physiological activity of the cell and it seems to point to a functional activity of these organelles.

Kaempferol is a flavonoid compound and it has been reported that at the appropriate concentration has a stimulating effect on pollen germination. Kaempferol used in these experiments had also a stimulating action in the microsporogenesis. Polysomes were abundant and most of them were bound to the endoplasmic reticulum. All the other chemical agents used inhibited the nuclear division but not kaempferol. Besides the kaempferol produced association between the envelopes of the mitochondria and endoplasmic reticulum profiles either in the cytoplasm or in the cytoplasmic enclaves.

Some carbon sources were essayed such as 2-deoxy-D-glucose and glucose. Pollen cells of anthers subjected to these carbon source treatments showed no deviation from the normal sequence of the microsporogenesis. The only deviation was the substitution of starch accumulation in plastids for cytoplasmic lipid bodies during bicellular pollen stage.

None of the chemical agents studied inhibited the formation of giant amoeboid mitochondria, and they didn't interfer with their division and subsequent evolution.

Some of these chemical agents were added to the culture medium to study their influence on the microsporogenesis "in

vitro". Their effects were different from those obtained after immersion of floral shoots in solutions of them , mainly in what concerns cytochalasin B, cycloheximide and glucose because the microsporogenesis process was hampered, a situation giving raise to the observed aspects of degeneration of cell organelles.

B I B L I O G R A F I A

ABREU, I. & 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. 1977. Alterações ultrastruturais das mitocôndrias durante a microsporogénese em Cucumis sativus L.. XII Reunião Anual Soc. Port. Microscopia Electrónica.

——, —— & SALEMA, R. 1982. Atypical mitochondria during microsporogenesis in Cucumis sativus L..J. Submicr. Cytol., 14:369-375.

ADOUTTE, A., BALMEFRÉZOL, M., BEISSON, J. & ANDRÉ, J. 1972. The effects of erythromycin and chloramphenicol on the ultrastructure of mitochondria in sensitive and resistant strains of Paramecium. J. Cell Biol., 54:8-19.

AHOKAS, H. 1975. Male sterile mutants of barley. II. Cytochemistry of non-mutant and msg 6cf microspores and pollen. Hereditas, 81:33-46.

AMICI, A. & FAVALI, M. A. 1972. Thymidine-^{3}H labelling of micoplasma-like bodies disease. Protoplasma, 75:37-43.

ARCOS, J. C., STACEY, R. E., MATHISON, J. B. & ARGUS, M. F.1967. Kinetic parameters of mitochondrial swelling. Effect of animal age. Tissue distribution of the mitochondrial"contractile protein". Exp. Cell Res., 48:448-460.

ATHANASSIOUS, R., KLYNE, M. A. & ALI, M.-A. 1980. Subcellular localization of succinate dehydrogenase in the photoreceptor ellipsoids of the brook trout (Salvelinus fontinalis Mitchill). Mikroskopie, 36:175-190.

ATKINSON, A. W., JOHN, P. C. L. & GUNNING, B. E. S. 1974. The growth and division of the single mitochondrion and other organelles during the cell cycle of Chlorella, studied by quantitative stereology and three dimensional reconstruction.Protoplasma, 81:77-109.

AUDRAN, J. C. 1979. Activité tonoplastique et fragmentation de la vacuole dans la microspore de Ceratozamia mexicana (Cycadaceae,Préspermaphyte).Rev. Cytol. Biol. végét.-Bot., 2:7-11.

AUDRAN, J. C. & BATCHO, M, 1981. Cytochemical and infrastructural aspects of pollen and tapetum ontogeny in Silene dioica (Caryophyllaceae). Grana Palynologica, 20:65-80.

BAL, A. K. & DE, D. N. 1961. Developmental changes in the submicroscopic morphology of cytoplasmic components during microsporogenesis in Tradescantia. Dev. Biol., 3:241-254.

BANERJEE, T. K., AGARWAL, S. K., RAI, A. K. & MITTAL, A. K.1976. Histochemical localization of alkaline phosphatase, acid phosphatase, and succinic dehydrogenase activities in the epidermis of the freshwater teleost, Amphipnous cuchia (Hamilton)(Symbranchiformes, Pisces).Mikroskopie, 32:294-300.

BANERJEE, U. C. 1967. Ultrastructure of the tapetal membranes in grasses. Grana Palynologica, 7:365-377.

BARHAM, S. S. & BRINKLEY, B. R. 1976a. Action of rotenone and related respiratory inhibitors on mammalian cell division. 1-Cell kinetics and biochemical aspects. Cytobios,15:85-96.

—— & —— 1976b. Action of rotenone and related respiratory inhibitors on mammalian cell division. 2-Ultrastructural studies. Cytobios, 15:97-109.

BAR-ON, H., STEIN, O. & STEIN, Y. 1972. Multiple effects of cycloheximide on the metabolism of triglycerides in the liver of male and female rats. Biochim.Biophys.Acta,270:444-452.

BASZCZYNSKI, C. L., WALDEN, D. B. & ATKINSON, B. G. 1980. Cycloheximide-induced nuclear alterations in maize root tips. Can. J. Genet. Cytol., 22:319-331.

BEHNKE, O. 1963. Helical arrangement of ribosomes in the cytoplasm of differenting cells of the small intestine of rat foetus. Exp. Cell Res., 30:597-598.

BELL, P. R. 1979. Demonstration of succinic dehydrogenase in mitochondria of fern egg cells at electron microscope level. Histochemistry, 62:85-91.

—— & MÜHLETHALER, K. 1964. The degeneration and reappearance of mitochondria in the egg cells of a plant. J. Cell Biol., 20:235-248.

BENDICH, A. J. & GAURILOFF, L. P. 1984. Morphometric analysis of Cucurbit mitochondria: The relationship between chondriome volume and DNA content. Protoplasma, 119:1-7.

BENNETT, M. D. & SMITH, J. B. 1979a. Colchicine induced paracrystals in the tapetum of wheat anthers. J.Cell Sci., 38: 23-48.

—— & —— 1979b. The effect of colchicine on fibrillar material in wheat meiocytes. J. Cell Sci., 38:49-60.

—— , TOLEDO, L. A. & STERN, H. 1979. The effect of colchicine on meiosis in Lilium speciosum cv. "Rosemede". Chromosome 72:175-189.

BENTWOOD, B. J. & CRONSHAW, J. 1978. Cytochemical localization of adenosine triphosphatase in the phloem of Pisum sativum and its relation to the function of transfer cells. Planta, 140:111-120.

BIDLE, J. A. 1972. Anther and pollen development in garden pea and cultivated lentil. Can. J. Bot., 57:1883-1900.

BIRD, J., PORTER, E. K. & DICKINSON, H. G. 1983. Events in the cytoplasm during male meiosis in Lilium. J. Cell Sci., 59: 27-42.

BLANK, R. & ARNOLD, C.-G. 1980. Variety of mitochondrial shapes, sizes and volumes in Chlamydomonas reinhardii. Protoplasma, 104:187-191.

—— & —— 1981. Structural changes of mitochondria in Chlamydomonas reinhardii after chloramphenicol treatment. Eur. J. Cell Biol., 24:244-251.

——, HAUPTMANN, E. & ARNOLD, C.-G. 1980. Variability of mitochondrial population in Chlamydomonas reinhardii. Planta, 150:236-241.

BOMSEL, J.-L. 1966. Étude in vivo de la photophosphorylation cyclique dans les feuilles de Blé. C. R. Acad. Sci. Paris, 262:1706-1709.

—— & CALVAYRAC, R. 1978. Light stimulated cyanide-insensitive oxygen uptake in Euglena gracilis Z. . In "Plant Mitochondria". Eds. G. Ducet & C. Lance. Elsevier/North-Holland. Biomedical Press.

BOUCAUD, M.-T. & SUIRE, C. 1978. Localisation ultrastructurale de l'activité β-glycérophosphatasique au niveau des ébauches caulinaires néoformées d'une culture de tissus organogène de Nicotiana tabacum L. var. P.19. Cytobiologie, 18: 281-293.

BRIGHIGNA, L., CECCHI-FIORDI, A. & PALANDRI, M. R. 1981. Ultrastructural investigations on the two-nucleate pollen grain of Tillandsia caput-medusae Moor. (Bromeliaceae). Amer. J. Bot., 68:1033-1041.

BRINKLEY, B. R., BARHAM, S. S., BARRANCO, S. C. & FULLER, G. M. 1974. Rotenone inhibition of spindle microtubule assembly in mammalian cells. Exp. Cell Res., 85:41-46.

BROOKS, J. & SHAW, G. 1968. Chemical structure of the exine of pollen grains and a new function for carotenoids in nature. Nature, 219:532-533.

BROWN, R. F., UMEDA, T., TAKAI, S. & LIEBERMAN, I. 1970. Effect of inhibitors of protein synthesis on DNA formation in liver. Biochim. Biophys. Acta, 209:49-53.

BRUMMITT, R. K., FERGUSON, I. K. & POOLE, M. M. 1980. A unique and extraordinary pollen type in the genus Crossandra (Acanthaceae). Pollen et Spores, 22:11-16.

BURGOS, J. & REDFEARN, E. 1965. The inhibition of mitochondrial reduced nicotinamide-adenine dinucleotide oxidation by rotenoids. Biochim. Biophys. Acta, 110:475-483.

BURTON, M. D. & MOORE, J. 1974. The mitochondrion of the flagellate Polytomella agilis. J. Ultrastruct. Res., 48:414-419.

BUVAT, R. 1963. Electron microscopy of plant protoplasm. Int.Rev. Cytol., 14:141-155.

CALVAYRAC, R. 1970. Relation entre les substrats, la respiration et la structure mitochondriale chez Euglena gracilis Z . Arch. Microbiol., 73:308-314.

——— , BERTAUX, O., LEFORT-TRAN, M. & VALENCIA, R. 1974. Généralisation du cycle mitochondrial chez Euglena gracilis Z. en cultures synchrones, hétérotrophe et phototrophe. Protoplasma, 80:355-370.

——— , BOMSEL, J.-L. & LAVAL-MARTIN, D. 1979. Analysis and characterization of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) - resistant Euglena. Plant Physiol., 63:857-865.

CAMEFORT, H. 1971. Sur l'évolution de l'appareil vacuolaire dans la cellule centrale et l'oosphere du Cryptomeria Japonica D. Don (Taxodiacees). Ann. Univ. A.R.E.R.S., 9:16-21.

CARRARO, L. & LOMBARDO, G. 1976. Tapetal ultrastructural changes during pollen development. III.Studies on Gentiana acaulis. Caryologia, 29:345-349.

CATESSON, A. M. & CZANINSKI, Y. 1969. Mise en évidence d'une activitée phosphatasique ácide dans le réticulum endoplasmique des tissus conducteurs de robinier et de sycomore. J. Microscopie, 6:509-514.

CHARVAT, I. & ESAU, K. 1975. An ultrastructural study of acid phosphatase localization in Phaseolus vulgaris xylem by the use of an aso-dye method. J. Cell Sci., 19:543-561.

CHESNOY, L. 1974. Évolution de l'activitée respiratoire des mitochondries au cours de la maturation du gamète femelle du Biota orientalis (Cupressacées). C. R. Acad. Sci. Paris , 278:727-730.

COLSON, A.-M., THE VAN, L., CONVENT, B., BRIQUET, M. & GOFFEAU, A. 1977. Mitochondrial heredity of resistance to 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, an inhibitor of cytochrome b oxidation, in Saccharomyces cerevisiae. Eur. J. Biochem., 74:521-526.

CORBETT, J. R. 1974. Herbicides interfering with photosynthesis. In "The biochemical mode of action of pesticides", pp 54-104. Academic Press. London.

COSSENTINI, W. C-. 1978. Modifications ultrastructurales et cytoenzymologiques de l'appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique et des mitochondries dans les cellules de l'apex radiculaire de jeunes plantes de Medicago sativa L.(cultivar gabès), traitées par une solution saline. Ann. Sci. Nat.Bot. (Paris), 19:95-124.

COSTES, C., BAZIER, R. & EVRARD, C. 1973. Recherches sur la stabilité des chloroplastes sous la lumière artificielle:effets de l'éclairement sur les pigments et sur les lipides. Physiol. Vég., 11:301-326.

COTTRELL, S. F. 1979. Efficiency of ethidium bromide mutagenesis as a function of different stages in the cell cycle of Saccharomyces cerevisiae. Exp. Cell Res., 118:398-401.

CRONSHAW, J. & BENTWOOD, B. J. 1977. Cytochemical localization of β-glycerophosphatase in the xylem of Nicotiana tabacum and Pisum sativum. Biol. Cellulaire, 28:65-74.

DAMSKY, C. H. 1976. Environmentally induced changes in mitochondria and endoplasmic reticulum of Saccharomyces carlsbergensis yeast. J. Cell Biol., 71:123-135.

DEREUDDRE, J. 1972. Sur l'organisation, en hiver, du réticulum endoplasmique rugueux dans les ébauches foliaires de diverses espèces ligneuses, et sur son évolution au cours de l'entrée en vie active. C. R. Acad. Sci. Paris , 275: 2343-2346.

DESCOMPS, S. & DEROCHE, M.-E. 1973. Action de l'éclairement continu sur l'appareil photosynthétique de la tomate. Physiol. Vég., 11:615-631.

DEXHEIMER, J. 1966a. Sur les modifications du réticulum endoplasmique des grains de pollen de Lobelia erinus L. traités par le chloramphénicol. C. R. Acad. Sci. Paris , 262:853-855.

—— 1966b. Sur les modifications sous l'action de diverses substances, du reticulum endoplasmique des tubes polliniques de Lobelia erinum L.. C. R. Acad. Sci. Paris , 263:1703-1705.

—— 1969. Sur l'étude comparée des ultrastructures des grains de pollen des angiospermes, des gymnospermes et des préphanérogames. Rev. Cytol. Biol. végét., 32:129-140.

—— 1970. Recherches cytophysiologiques sur les grains de pollen. Rev. Cytol. Biol. végét., 33:169-234.

—— 1972. Étude expérimentale des grains de pollen des angiospermes. Rev. Cytol. Biol. végét., 35:17-40.

DEYSSON, G. 1968. Antimitotic substances. Int. Rev. Cytol., 24: 99-148.

DHEIDAH, M. & BLACK, M. 1976. The inhibitory action of cycloheximide on respiration of coleoptiles is relieved by light. Physiol. Plant., 37:83-88.

DICKINSON, H. G. 1971a. Nucleo-cytoplasmic interaction following meiosis in the young microspores of Lilium longiflorum , events at the nuclear envelope. Grana Palynologica, 11:117 - -127.

—— 1971b. The role played by sporopollenin in the development of pollen in Pinus banksiana. In "Sporopollenin". Eds. J. Brooks, P. R. Grant, M. Muir, P. Van Gijzel & G. Shaw, pp 31-67. Academic Press. London. New York.

—— 1973. The role of plastids in the formation of pollen grain coatings. Cytobios, 8:25-40.

—— 1981. The structure and chemistry of plastid differentiation during male meiosis in Lilium henryi. J. Cell Sci., 52: 223-241.

—— 1982. The development of pollen. Rev. Cytol. Biol. végét.- -Bot., 5:5-19.

—— & BELL, P. R. 1970. Nucleocytoplasmic interaction at the nuclear envelope in post-meiotic microspores of Pinus banksiana. J. Ultrastruct. Res., 33:356-360.

—— & —— 1972. The role of the tapetum in the formation of sporopollenin-containing structures during microsporogenesis in Pinus banksiana. Planta, 107:205-215.

—— & —— 1976a. Development of the tapetum in Pinus banksiana preceding sporogenesis. Ann. Bot., 40:103-113.

—— & —— 1976b. The changes in the tapetum of Pinus banksiana accompanying formation and maturation of the pollen. Ann. Bot., 40:1101-1109.

—— & HESLOP-HARRISON, J. 1970a. The ribosome cycle, nucleoli and cytoplasmic nucleoloids in the meiocytes of Lilium . Protoplasma, 69:187-200.

—— & —— 1970b. The behaviour of plastids during meiosis in the microsporocytes of Lilium longiflorum Thunb. . Cytobios, 6:103-118.

—— & POTTER, U. 1975. Post-meiotic nucleo-cytoplasmic interaction in Pinus banksiana: the secretion of RNA by the nucleus. Planta, 122:99-104.

DICKINSON, H. G. & POTTER, U. 1978. Cytoplasmic changes accompanying the female meiosis in Lilium longiflorum Thunb. . J. Cell Sci., 29:147-169.

DICKSON, G. R. 1978. Ultrastructural localization of alkaline phosphatase in the hypertrophic chondrocyte of the frog. Histochemistry, 57:343-347.

DIERS, L. 1963a. Elektronmikroskopische beobachtungen an der generativen zelle von Oenothera hookeri Torr. et Gray. Z. Naturforsch., 18:562-566.

——— 1963b. Elektronenmikroskopische beobachtungen an der vegetativen zelle im auskeimenden pollenkorn von Oenothera hookeri Torr. et Gray. Z. Naturforsch., 18:1092-1097.

DODGE, A. D. 1975. Some mechanisms of herbicide action. Sci. Prog., Oxf., 62:447-466.

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 (Cymodoceaceae). Aust. J. Bot., 26:265-285.

DUPUIS, F. 1974. Evolution of the plastidial system during the microsporogenesis in Impatiens balsamina L.. In " Fertilization in higher plants".Ed. H. Linskens,pp 65-71.North-Holland Publishing Co., Amsterdam.

EAMES, A. J. 1961. Morphology of angiosperms. New York,McGraw-Hill.

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.

——— 1971a. The role of the tapetum during microsporogenesis of angiosperms. In " Pollen development and physiology".Ed. J. Heslop-Harrison,pp 41-61.London Butterworths.

——— 1971b. Production of sporopollenin by the tapetum. In "Sporopollenin".Eds. J. Brooks, P. R. Grant, M. Muir, P. Van Gijzel & G. Shaw, pp 220-248. Academic Press. London. New York.

——— 1972. The ultrastructure and ontogeny of pollen in Helleborus foetidus L.. IV. Pollen grain maturation. J. Cell Sci., 11:111-129.

——— & GODWIN, H. 1968a. 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.

ECHLIN, P. & GODWIN, H. 1968b. The ultrastructure and ontogeny of pollen in Helleborus foetidus L..II.Pollen grain development through the callose special wall stage. J. Cell Sci., 3:175-182.

—— & —— 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.

EIGSTI, O. J. & DUSTIN, P. 1955. Citado por Margulis, L., Banerjee, S. & White, T. 1969.

EKÉS, M. 1970. Electron-microscopic histochemical demonstration of succinic-dehydrogenase activity in root cells of yellow lupine. Planta, 94:37-46.

—— 1981. Ultrastructural demonstration of ferricyanide reductase (diaphorase) activity in the envelopes of the plastids of etiolated barley (Hordeum vulgare L.) leaves. Planta , 151:439-446.

ENDRESS, A. G. & SJOLUND, R. D. 1976. Ultrastructural cytology of callus cultures of Streptanthus tortuosus as affected by temperature. Amer. J. Bot., 63:1213-1224.

ERDTMAN, G. 1952. Pollen morphology and plant taxonomy. Angiosperms (An introduction to palynology I) Chronica Botanica Co., Alqmvist et Wiksell. Stockholm.

—— 1960. Pollen walls and angiosperm phylogeny. Bot. Notiser, 113:41-45.

—— 1966. A propos de la strafication de l'exine. Pollen et Spores, 8:5-7.

—— 1969. Handbook of palynology (Morphology-Taxonomy-Ecology). Munksgaard, Copenhagen, Denmark.

ESAU, K. 1980. Anatomy of seed plants (2nd. edition) pp 403-415. New York. London.

—— & GILL R. H. 1971. Aggregation of endoplasmic reticulum and its relation to the nucleus in a differentiating sieve element. J. Ultrastruct. Res., 34:144-158.

—— , MAGYAROSY, A. C. & BREAZEALE, V. 1976. Studies on the mycoplasma-like organism (MLO) in spinach leaves affected by

the aster yellows disease. Protoplasma, 90:189-203.

ESTENSEN, R. D., ROSENBERG, M. & SHERIDAN, J. D. 1971. Cytochalasin : microfilaments and "contractile" processes. Science, 173:356-358.

EYMÉ, J. & SUIRE, C. 1969. Ultrastructure des cellules sporogènes des mousses : observations sur le plastidome et le chondriome. C. R. Acad. Sci. Paris, 268:290-297.

FAEGRI, K. 1956. Recent trends in palynology. Bot. Rev., 22: 639-664.

FLICKINGER, C. J. 1973. Nuclear and mitochondrial alterations in amebae exposed to ethidium bromide. Exp. Cell Res., 81: 293-300.

FLORANCE, E. R. & CAMERON, H. R. 1974. Vesicles in expanded endoplasmic reticulum cisternae structures that resemble mycoplasma-like bodies. Protoplasma, 79:337-348.

FOSSARD, R. A. De. 1969. Development and histochemistry of the endothecium in the anthers of in vitro grown Chenopodium rubrum L.. Bot. Gaz., 130:10-22.

GAFFAL, K. P., GAFFAL, S. I. & SCHENEIDER, G. J. 1982. Morphometric analysis of several intracellular events occurring during the vegetative life cycle of the unicellular alga Polytoma papillatum. Protoplasma, 110:185-195.

—— & KREUTZER, D. 1977. The mitochondria of Polytoma papillatum at two different stages of the vegetative cell cycle. Protoplasma, 91:167-177.

GALE, E. F., CUNDLIFFE, E., REYNOLDS, P. E., RICHMOND, M. H. & WARING, M. J. 1972. The molecular basis of antibiotic action. John Wiley & Sons. London. New York. Toronto.

GANOTE, C. E., McGARR, J., LIU, S. Y. & KALTENBACH, J. P. 1980. Oxygen induced enzyme release. Assessment of mitochondrial function in anoxic myocardial injury and effects of the mitochondrial uncoupling agent 2,4-dinitrophenol(DNP). J. Mol. Cell Cardiol., 12:387-408.

GARBER, A. J., JOMAIN-BAUM, M., SALGANICOFF, L., FARBER, E. & HANSON, R. W. 1973. The effects of cycloheximide on energy

transfer in rat and guinea pig liver mitochondria. J. Biol. Chem., 248:1530-1535.

GARCÍA-SÁINZ, J. A., AMADOR, A. G., PIÑA, E. & SÁNCHEZ, V. C. De. 1975. Lipogenic action of cycloheximide on the rat epididymal fat pad. Biochem. Pharmacol., 24:891-897.

GAROT, G., LEBRUN-PEREMANS, J., MOREAU, L. & GILLIES, A. 1968. Effets des microirradiations sur les microsporocytes et microspores de Tradescantia paludosa. 1.La méiose dans les microsporocytes in vitro. Can. J. Genet. Cytol., 10:44-49.

GAVAUDAN, P., POUSSEL, H. & GUYOT, M. 1960. Production expérimentale dans la cellule végétale anoxique de "nebenkerns" ergastoplasmiques. C. R. Acad. Sci. Paris, 250:4029-4031.

GENEVES, L. 1971. Phénomènes ultrastructuraux au cours de la méiose staminale chez Ribes rubrum L. (Grossulariacées). Bull. Soc. bot. Fr., 118:481-524.

GILDER, J. & CRONSHAW, J. 1973. Adenosine triphosphatase in the phloem of Cucurbita. Planta, 110:189-204.

—— & —— 1974. A biochemical and cytochemical study of adenosine triphosphatase activity in the phloem of Nicotiana tabacum. J. Cell Biol., 60:221-235.

GIMENEZ-MARTIN, G., RISUEÑO, M. C. & LOPEZ-SAEZ, J. F. 1969. Generative cell envelope in pollen grains as a secretion system . A postulate. Protoplasma, 67:223-235.

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. Palaeobotan. Palynol., 3:181-195.

GÓRSKA-BRYLASS, A. 1965. Citado por Stanley, R. G. & Linskens , H. F. 1974.

GROBE, B. & ARNOLD, C.-G. 1977. The behaviour of mitochondria in the zygote of Chlamydomonas reinhardii. Protoplasma, 93: 357-361.

GUILLIERMOND, A. 1920. Sur l'évolution du chondriome pendant la formation des grains de pollen de Lilium candidum. C. R.

Acad. Sci. Paris, 170:1003-1006.

HACKENBROCK, C. R. 1966. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria I.Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. J. Cell Biol., 30:269-297.

—— 1968. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria II.Electron transport-linked ultrastructural transformations in mitochondria. J. Cell Biol., 37:345-369.

—— , REHN, T. G., WEINBACH, E. C. & LEMASTERS, J. J. 1971.Oxidative phosphorylation and ultrastructural transformation in mitochondria in the intact ascites tumor cell. J. Cell Biol., 51:123-137.

HADEK, R. & SWIFT, H. 1962. Nuclear extrusion and intracisternal inclusions in the rabbit blastocyst. J. Cell Biol., 13: 445-451.

HALL, J. L. 1969. A histochemical study of adenosine triphosphatase and other nucleotide phosphatases in young root tips. Planta, 89:254-265.

—— 1971. Cytochemical localization of ATPase activity in plant root cells. J. Microscopy, 93:219-225.

HALL, J. D. & CRANE, F. L. 1971. Intracristal rods. A new structure in beef heart mitochondria. J. Cell Biol., 48:420-425.

HALLDAL, P. & HOLMEN, A. T. 1979. The effect of DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) on photosynthesis, glycolate excretion ("photorespiration") and amino acid metabolism in the blue-green alga Anacystis. Physiol. Plant. 47:195-199.

HART, J. W. & SABNIS, D. D. 1976. Colchicine and plant microtubules: a critical evaluation. Curr. Adv. Plant Sci., 26:1095--1104.

HEBANT, C. 1969. Nouvelles observations sur le leptome de la tige feuillée des Polytrichum. C. R. Acad. Sci. Paris, 269: 2530-2533.

HEILPORN, V. & LIMBOSCH, S. 1971. Les effets du bromure d'éthidium sur Acetabularia mediterranea. Biochim. Biophys. Acta, 240:94-108.

HEIMLICH, L. F. 1929. Microsporogenesis in Cucumis sativus L.. La Cellule, 39:7-20.

HEPLER, P. K. & PALEVITZ, B. A. 1974. Microtubules and microfilaments. Ann. Rev. Plant Physiol., 25:309-362.

HESLOP-HARRISON, J. 1962. Origin of exine. Nature, 195:1069-1071.

—— 1963a. Ultrastructural aspects of differentiation in sporogenous tissue. Symp. Soc. exp. Biol., 17:315-340.

—— 1963b. An ultrastructural study of pollen wall ontogeny in Silene pendula. Grana Palynologica, 4:7-24.

—— 1966. Cytoplasmic connexions between angiosperm meiocytes. Ann. Bot., 30:221-230.

—— 1968a. Some fine structural features of intine growth in the young microspores of Lilium henryi. Port. Acta Biol., 10:235-240.

—— 1968b. Ribosome sites and S gene action. Nature, 218:90 - 91.

—— 1968c. Anther carotenoids and the synthesis of sporopollenin. Nature, 220:605.

—— 1968d. Tapetal origin of pollen coat substances in Lilium. New Phytol., 67:779-786.

—— 1968e. Wall development within the microspore tetrad of Lilium longiflorum. Can. J. Bot., 46:1185-1192.

—— 1971a. The cytoplasm and its organelles during meiosis. In "Pollen development and physiology".Ed. J. Heslop-Harrison, pp 16-31. London Butterworths.

—— 1971b. The pollen wall: Structure and development. In "Pollen developent and physiology". Ed. J. Heslop-Harrison, pp 75-98. London Butterworths.

—— & DICKINSON, H.G. 1967. A cycle of sphaerosome aggregation and disaggregation correlated with the meiotic divisions in

Lilium. Phytomorphology, 17:195-199.

HESLOP-HARRISON, J. & DICKINSON, H. G. 1969. Time relationships of sporopollenin synthesis associated with tapetum and microspores in Lilium. Planta, 84:199-214.

HOEFERT, L. L. 1969. Ultrastructure of Beta pollen I. Cytoplasmic constituents. Amer. J. Bot., 56:363-368.

—— 1971. Ultrastructure of tapetal cell ontogeny in Beta . Protoplasma, 73:397-406.

HOFFMANN, H. P. & AVERS, C.J. 1973. Mitochondrion of yeast: ultrastructural for one giant, branched organnelle per cell. Science, 181:749-751.

HORNER, H. T. & LERSTEN, N. R. 1971. Microsporogenesis in Citrus lemon(Rutaceae). Amer. J. Bot., 58:72-79.

HORVAT, F. 1969. Localisation en microscopie électronique de la phosphatase acide dans l'intine de la microspore, chez Tradescantia paludosa A. et W.. Grana Palynologica, 9:1-3.

HORWITZ, H. B. & HOLT, C. E. 1971. Specific inhibition by ethidium bromide of mitochondrial DNA synthesis in Physarum polycephalum. J. Cell Biol., 49:546-553.

ILAN, J. & QUASTEL, J. H. 1966. Effects of colchicine on nuclei acid metabolism during metamorphosis of Tenebrio molitor L. and in some mammalian tissues. Biochem. J.,100:448-457.

ITO, M. & STERN, H. 1967. Studies of meiosis in vitro I. In vitro culture of meiotic cells. Dev. Biol.,16:36-53.

JÉZÉQUEL, A. M. 1959. Dégénerescence myélinique des mitochondries de foie humain dans un épithélioma du cholédoque et un ictère viral. Étude au microscope electronique. J. Ultrastruct. Res., 3:210-215.

JUNG, C. Y. & RAMPAL, A. L. 1977. Cytochalasin B binding sites and glucose transport carrier in human erythrocyte ghosts. J. Biol. Chem., 252:5456-5463.

KELLERMAN, G. M., BIGGS, D. R. & LINNANE, A. W. 1969. Biogenesis of mitochondria XI. A comparison of the effects of growth-limiting oxygen tension, intercalating agents, and antibiotics on the obligate aerobe Candida parapsilosis. J. Cell Biol., 42:378-391.

KERPEL-FRONIUS, S. & HAJÓS, F. 1968. The use of ferricyanide for the light and electron microscopic demonstration of succi - nic dehydrogenase activity. Histochemie, 14:343-351.

KESSEL, R. B. & BEAMS, H. W. 1963. Nucleolar extrusion in oocyte of Thyone briareus. Exp. Cell Res., 32:612 -615.

KIMBALL, S. L. & SALISBURY, F. B. 1973. Ultrastructural changes of plants exposed to low temperature. Amer. J. Bot., 60: 1028-1033.

KING, M. E., GODMAN, G. C. & KING, D. W. 1972. Respiratory en - zymes and mitochondrial morphology of HeLa and L cells trea ted with choramphenicol and ethidium bromide. J. Cell Biol., 53:127-142.

KISLEV, N., SPOLSKY, C. M. & EISENSTADT, J. M. 1973. Effect of choramphenicol on the ultrastructure of mitochondria in sensitive and resistant strains of HeLa. J. Cell Biol., 57:571-579.

KLIETMANN, W., KATO, K., GABARA, B., KOPROWSKI, H. & SATO, N. 1973a. Stable alterations in HeLa cell mitochondria following ethidium bromide treatment. Exp. Cell Res., 78:47-58.

——— , SATO, N. & NASS, M. M. K. 1973b. Establishment and cha - racterization of ethidium bromide resistance in Simian virus 40-transformed hamster cells. Effects on mitochondria in vivo. J. Cell Biol., 58:11-26.

KNOX, R. B. 1984. Pollen-pistil interactions.In "Encyclopedia of plant physiology" New series Vol. 17.Ed. H. F. Linskens & J. Heslop-Harrison,pp 508-608. Springer Verlag-Berlin- Heidelberg-New York.

——— & HESLOP-HARRISON, J. 1969. Cytochemical localiza - tion 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. Pollen wall proteins: electron microscopic localization of acid phosphatase in the intine of Crocus vernus. J. Cell Sci., 8:727-733.

KOEPPE, D. E. & MILLER, R. J. 1974. Kaempferol inhibitions of corn mitochondrial phosphorylation. Plant Physiol., 54:374- -378.

KRESS, W. J. & STONE, D. E. 1983. Nature of the sporoderm in Monocotyledons, with special reference to the pollen grains of Canna and Heliconia. Grana Palynologica, 21:129-148.

KRISTEN, U. 1976. Die morphologie der schleimsekretion im fruchtknoten von Aptenia cordifolia. Protoplasma, 89:221-233.

——— , 1977. Unusual ER-configurations in plant glands secreting a slime containing polysaccharides and proteins. Planta, 133:161-167.

KUROIWA, T. & KUROIWA, H. 1980. Inhibition of Physarum mitochondrial division by cytochalasin B. Experientia, 36:193-194.

——— & TAKAHASHI, K. 1980. Studies of mitochondrial migration in Physarum polycephalum. I.Reversible induction of mitochondrial migration and its inhibition by cytochalasin B. Plant Cell Physiol., 21:65-74.

KUZMICH, M. J. & ZIMMERMAN, A. M. 1972. Colcemid action on the division shedule of synchronised Tetrahymena. Exp. Cell Res., 72:441-452.

LARSON, D. A. & LEWIS, C. W. 1962. Cytoplasm in mature non-germinating and germinated pollen. Fifth Int. Cong. Elec. Mic., Sidney, S. Breese, édit.,2.

LÄUCHLI, A., LÜTTGE, U. & PITMAN, M. G. 1973. Ion uptake and transport through barley seedlings: differential effect of cycloheximide. Z. Naturforsch., 28:431-434.

LEDBETTER, M. C. & PORTER, K. R. 1970. Introduction to the fine structure of plant cells. Pp 157-168. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York.

LEDOIGT, G. & CALVAYRAC, R. 1979. Phénomènes périodiques, métaboliques et structuraux chez un protiste, Euglena gracilis. J. Protozool., 26:632-643.

——— , ——— , ORCIVAL-LAFONT, A. M. & PINEAU, B. 1972. Comparaison, à la lumière et à l'obscurité, des synthèses spécifiques d'ARN chez Euglena gracilis Z. en cultures synchrones sur milieu lactate et étude du chondriome. Planta, 103:254-262.

LEFORT, M. 1964. Modifications du chondriome dans les cellules étiolées de l'Euglena gracilis (Klebs). C. R. Acad. Sci. Paris, 258:4318-4321.

LEHNINGER, A. L. 1977. Biochemistry. Worth Publishers, Inc.New York.

LEIBOWITZ, R. D. 1971. The effect of ethidium bromide on mitochondrial DNA synthesis and mitochondrial DNA structure in HeLa cells. J. Cell Biol., 51:116-122.

LENK, R. & PENMAN, S. 1971. Morphological studies of cells grown in the absence of mitochondrial-specific protein synthesis. J. Cell Biol., 49:541-546.

LEWIS, D., BURRAGE, S. & WALLS, D. 1967. Citado por Stanley, R. G. & Linskens, H. F. 1974.

LIN, S. & SPUDICH, J. A. 1974. Biochemical studies on the mode of action of cytochalasin B. J. Biol. Chem., 249:5778-5783.

LOCKHAUSEN, J. & KRISTEN, U. 1983. Effects of cytochalasin B on the mitochondria and the golgi apparatus in ovary gland cells of Aptenia cordifolia. Z. Pflanzenphysiol.,110:191-199.

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. 1976a. Tapetal ultrastructural changes during pollen development. I.Studies on Antirrhinum maius. Caryologia, 29:113-125.

—— & —— 1976b. Tapetal ultrastructural changes during pollen development. II.Studies on Pelargonium zonale and Kalanchoë obtusa. Caryologia, 29:339-344.

LORD, A. 1974. Observations on Raphanus sativus meristematic cells treated with ethidium bromide. J. Ultrastruct. Res., 46:117-130.

—— & LAFONTAINE, J. G. 1973. An ultrastructural and radioautographic study of the effect of ethidium bromide on the interphase nucleus of meristematic plant cells. J. Cell Sci., 13:97-119.

LUCK, B. T. & JORDAN, E. G. 1980. The mitochondria and plastids during microsporogenesis in Hyacinthoides non-scripta (L.) Chouard. Ann. Bot., 45:511-514.

LUMSDEN, R. D., OAKS, J. A. & MILLS, R. R. 1969. Mitochondrial oxidation of diaminobenzidine and its relationship to the

cytochemical localization of tapeworm peroxidase. J. Parasit., 55:1119-1133.

LUNGER, P. D. & CLARK, H. F. 1979. Morphological effects of prolonged chloramphenicol and ethidium bromide exposure on viper spleen mitochondria. J. Submicr. Cytol., 11:1-12.

MacDONALD, I. R. & ELLIS, R. J. 1969. Does cycloheximide inhibit protein synthesis specifically in plant tissues? Nature, 222:791-792.

MACKENZIE, A., HESLOP-HARRISON, J. & DICKINSON, H. G. 1967. Elimination of ribosomes during meiotic prophase. Nature, 215: 997-999.

MANGIN, L. 1886. Recherches sur le pollen. Bull Soc. bot. Fr., 33:337-512.

MARES, D., JEFFREY, C. & NORSTOG, K. 1976. The differentiation of the modified aleurone of wheat endosperm; nuclear membrane-mediated endoplasmic reticulum development. Plant Sci. Lett., 7:305-311.

MARGULIS, L. 1973. Colchicine sensitive microtubules. Int. Rev. Cytol., 34:333-361.

——, BANERJEE, S. & WHITE, T. 1969. Colchicine-inhibited cilia regeneration: explanation for lack of effect in Tris buffer medium. Science, 164:1177-1178.

MARINOS, N. G. 1963. Vacuolation in plant cells. J. Ultrastruct. Res., 9:177-185.

MARTICORENA, C. 1963. Material para una monografia de la morfologia del polen de Cucurbitaceae. Grana Palynologica, 4:78--91.

MARTIN, F. W. 1968. Citado por Stanley, R. G. & Linskens, H. F. 1974.

MARTY, F. 1970. Les peroxysomes (microbodies) des laticifères d'Euphorbia characias L. . J. Microscopie, 9:923-948.

MARUYAMA, K. 1965. Cyclic changes of the golgi body during microsporogenesis in Tradescantia paludosa. Cytologia, 30: 354-374.

—— 1968. Electron microscopic observation of plastids and mi-

tochondria during pollen development in Tradescantia paludosa. Cytologia, 33:482-497.

MASCARENHAS, J. P. & LAFOUNTAIN, J. 1972. Protoplasmic streaming, cytochalasin B, and growth of the pollen tube. Tissue Cell, 4:11-14.

McFADDEN, G. I. & WETHERBEE, R. 1982. Serial reconstruction of the mitochondrial reticulum in the flagellate, Pyramimonas gelidicola (Prasinophyceae Chlorophyta). Protoplasma, 111: 79-82.

McGILL, M., BAUR, P. S. & HSU, T. C. 1976. Ultrastructure and microchemical composition of ethidium bromide-induced intra mitochondrial complexes. Exp. Cell Res., 99:7-14.

—— , HSU, T. C. & BRINKLEY, B. R. 1973. Electron-dense structures in mitochondria induced by short-term ethidium bromide treatment. J. Cell Biol., 59:260-265.

McMAHON, D. 1975. Cycloheximide is not a specific inhibitor of protein synthesis in vivo. Plant Physiol., 55:815-821.

MEDINA, F. J., RISUEÑO, M. C. & RODRIGUEZ-GARCIA, M. I. 1981. Evolution of the cytoplasmic organelles during female meiosis in Pisum sativum L.. Planta, 151:215-225.

MEIER, H. & REID, J. S. G. 1977. Morphological aspects of the galactomannan formation in the endosperm of Trigonella foenum-graecum L. (Leguminosae). Planta, 133:243-248.

MEISNER, H. M. & SORENSEN, L. 1966. Metaphase arrest of chinese hamster cells with rotenone. Exp. Cell Res., 42:291-295.

MEPHAM, R. H. & LANE, G. R. 1968. Exine and the role of the tapetum in pollen development. Nature, 219:961-962.

—— & —— 1969a. Role of the tapetum in the development of Tradescantia pollen. Nature, 221:282-284.

—— & —— 1969b. Formation and development of the tapetal periplasmodium in Tradescantia bracteata. Protoplasma, 68 : 175-192.

MESQUITA, J. F. 1966. Sur les modifications du reticulum endoplasmique et des mitochondries dnas les racines d'Allium cepa L. traitées par la colchicine. C. R. Acad. Sci.Paris, 263:1827-1929.

MESQUITA, J. F. 1968. Sur les modifications ultrastructurales produits par le phényluréthane dans les cellules meristematiques des racines d'Allium cepa L.. C. R. Acad. Sci.Paris, 267:303-305.

____ 1969. Electron microscope study of the origin and development of the vacuoles in root-tip cells of Lupinus albus L. J. Ultrastruct. Res., 26:242-250.

MEYER, R. R., BOYD, C. R., REIN, D. C. & KELLER, S. J. 1972. Effects of ethidium bromide on growth and morphology of Tetrahymena pyriformis. Exp. Cell Res, 70:233- 237.

—— & SIMPSON, M. V. 1969. DNA biosynthesis in mitochondria: differential inhibition of mitochondrial and nuclear DNA polymerases by the mutagenic dyes ethidium bromide and acriflavin. Biochem. Biophys. Res. Commun., 34:238-244.

MILLER, F. & PALADE, G. E. 1964. Lytic activities in renal protein absorption droplets. An electron microscopical cyto - chemical study. J. Cell Biol., 23:519-552.

MOLLENHAUER, H. H. 1959. Permanganate fixation of plant cells. J. Biophys. Biochem. Cytol., 6:431-436.

—— & MORRÉ, D. J. 1976. Cytochalasin B, but not colchicine, inhibits migration of secretory vesicles in root tips of maize. Protoplasma, 87:39-48.

MORISSET, C. 1973. Comportement des racines isolées de Lycopersicum esculentum L. cultivées in vitro et soumise à l'anoxie. C. R. Acad. Sci. Paris, 276:311-314.

—— 1974. Variations ultrastructurales comparées des mitochondries dans des racines de Lycopersicum esculentum Mill (Solanacées), isolées cultivées in vitro, et soumises à divers traitements, anoxie prolongée, agent découplant, plasmolyse. C. R. Acad. Sci. Paris, 279:1257-1260.

—— 1983. Effects of energetic shortage upon the ultrastructure of some organelles, in excised roots of Lycopersicum esculentum cultivated in vitro.1.Reversible structural modifications of the endoplasmic reticulum.Cytologia, 48:349-362.

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. Exp. Cell Res., 95:440-454.

MÜHLETHALER, K. 1958. Citado por Risueño, M. C., Sogo, J. M., Gimenez-Martín, G. & Rodriguez-García, M. I. 1970.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15:473-497.

MUSCATELLO, U., GUARRIERA-BOBYLEVA, V. & BUFFA, P. 1972. Configurational changes in isolated rat liver mitochondria as revealed by negative staining. II.Modifications caused by changes in respiratory states. J. Ultrastruct. Res., 40: 235-260.

——— , ——— , PASQUALI-RONCHETTI, I. & BALLOTTI-RICCI, A. M. 1975. Configurational changes in isolated rat liver mitochondria as revealed by negative staining. III.Modifications caused by uncoupling agents. J. Ultrastruct. Res., 52:2-12.

——— , PASQUALI-RONCHETTI, I. & GUARRIERA-BOBYLEVA, V. 1978. Conformational changes of mitochondrial inner membrane associated to uncoupling of respiration from phosphorylation. J. Submicr. Cytol., 10:39-51.

NAKAMURA, S. 1979. Development of the pollen grain wall in Lilium longiflorum. J. Electron Microsc., 28:275-284.

NANDA, K. & GUPTA, S. C. 1977. Development of tapetal periplasmodium in Rhoeo spathacea. Phytomorphology, 27:350-358.

NASS, M. M. K. 1972. Differential effects of ethidium bromide on mitochondrial and nuclear DNA synthesis in vivo in cultured mammalian cells. Exp. Cell Res., 72:211-222.

——— & BEN-SHAUL, Y. 1973. Effects of ethidium bromide on growth chlorophyll synthesis, ultrastructure and mitochondrial DNA in green and bleached mutant Euglena gracilis. J. Cell Sci., 13:567-590.

NATHANIEL, D. R. 1980. Paracrystalline arrays in atypical cristae and mitochondrial division. J. Cell Sci., 42:23-32.

NEWCOMB, E. H. 1969. Plant microtubules. Ann. Rev. Plant Physiol., 20: 253-288.

NEWCOMB, E. E., STEER, M. W. , HEPLER, P. K. & WERGIN, W. P. 1968. An atypical crista resembling a "tight junction" in bean root mitochondria. J. Cell Biol., 39:35-42.

NEWMANN, D. & PARTHIER, B. 1973. Effects of nalidixic acid, chloramphenicol, cycloheximide, and anisomycin on structure and development of plastids and mitochondria in greening Euglena gracilis. Exp. Cell Res., 81:255-268.

NOUGAREDE, A. 1963. Premières observations sur l'infrastructure et sur l'évolution des cellules des jeunes ébauches foliaires embryonnaires du Tropaeolum majus L.. Cytologie de l'hydratation germinative et des premières étapes de la germination. C. R. Acad. Sci. Paris, 257:1495-1497.

NOVIKOFF, A. B. & GOLDFISCHER, S. 1969. Visualization of peroxisomes (microbodies) and mitochondria with diaminobenzidine. J. Histochem. Cytochem., 17:675-680.

O'BRIEN, T. P. 1972. Cytology of cell wall formation. Bot. Rev., 38:87-118.

OLMSTED, J. B. & BORISY, G. G. 1973. Microtubules. Annu. Rev. Biochem., 42:507-540.

OPIK, H. 1975. The reaction of mitochondria in the coleoptiles of rice (Oriza sativa L.) with diaminobenzidine. J. Cell Sci., 17:43-55.

OSAFUNE, T. 1973. Three-dimensional structures of giant mitochondria, dictyosomes and "concentric lamellar bodies" formed during the cell cycle of Euglena gracilis (Z.) in synchronous culture. J. Electron Microsc., 22:51-61.

——, MIHARA, S., HASE, E. & OHKURO, I. 1972a. Electron microscope studies on the vegetative cellular life cycle of Chlamydomonas reinhardii Dangeard in synchronous culture. I.Some characteristics of changes in subcellular structures during the cell cycle, especially in formation of giant mitochondria. Plant Cell Physiol., 13:211-227.

——, ——, —— & —— 1972b. Electron microscope studies on the vegetative cellular life cycle of Chlamydomonas reinhardii Dangeard in synchronous culture. II.Association of mito

chondria and the chloroplasts at an early developmental stage. Plant Cell Physiol., 13:981-989.

OSAFUNE, T., MIHARA, S., HASE, E. & OHKURO, I. 1975a. Electron microscope studies of the vegetative cellular life cycle of Chlamydomonas reinhardii Dangeard in synchronous culture. III. Three-dimensional structures of mitochondria in the cells at intermediate stages of the growth phase of the cell cycle. J. Electron Microsc., 24:241-252.

——, ——, —— & —— 1975b. Formation and division of giant mitochondria during the cell cycle of Euglena gracilis Z. in synchronous culture. I. Some characteristics of changes in the morphology of mitochondria and oxygen-uptake activity of cells. Plant Cell Physiol., 16:313-326.

——, ——, —— & —— 1975c. Formation and division of giant mitochondria during the cell cycle of Euglena gracilis Z. in synchronous culture. II. Modes of division of giant mitochondria. J. Electron Microsc., 24:33-39.

——, ——, —— & —— 1975d. Formation and division of giant mitochondria during the cell cycle of Euglena gracilis Z. in synchronous culture. III. Three-dimensional structures of mitochondria after division of giant forms. J. Electron Microsc., 24:283-286.

——, ——, —— & —— 1976. Electron microscope studies of the vegetative cellular life cycle of Chlamydomonas reinhardii Dangeard in synchronous culture. IV. Mitochondria in dividing cells. J. Electron Microsc., 25:261-269.

PAINTER, T. S. 1943. Cell growth and nucleic acid in the pollen of Rhoeo discolor. Bot. Gaz., 105:58-68.

PALLETT, K. E. & DODGE, A. D. 1980. Modifications of chloroplasts pf flax cotyledons treated with monuron: myelinoid figures formed under low light conditions. Plant Cell Environment, 3:183-188.

PALUMBO, R. F. 1953. Citado por Stanley, R. G. & Linskens, H. F. 1974.

PAULIN, J. J. 1975. The chondriome of selected trypanosomatids. J. Cell Biol., 66:404-413.

PELLEGRINI, M. 1978. The giant mitochondria of Euglena gracilis Z. Qualitative and quantitative in photoautotrophic,photo-heterotrophyc and heterotrophyc synchronous cultures. In "Plant mitochondria". Eds. G. Ducet & C. Lance, pp.59-60.Elsevier/North-Holand. Biomedical Press.

—— 1980. Three-dimensional reconstruction of organelles in Euglena gracilis Z. I.Qualitative and quantitative changes of chloroplasts and mitochondrial reticulum in synchronous photoautotrophic culture. J. Cell Sci., 43:137-166.

—— & PELLEGRINI, L. 1976. Continuité mitochondriale et discontinuité plastidiale chez l'Euglena gracilis Z.. C. R. Acad. Sci. Paris, 282:357-360.

PELLEGRINI, S. & GEROLA, F. M. 1970. Mycoplasma-like bodies in phloem cells of Oriza sativa. Electron microscope observations. Caryologia, 23:639-646.

PERDUE, J. F. 1973. The distribution, ultrastructure and chemistry of microfilaments in cultured chick embryo fibroblasts. J. Cell Biol., 58:265-283.

PERIASAMY, K. & KANDASAMY, M. K. 1981. Development of the anther of Annona squamosa L..Ann. Bot., 48:885-893.

PERLMAN, P. S. & MAHLER, H. R. 1971. A permutational state induced in yeast by ethidium bromide. Biochem. Biophys. Res. Commun., 44:261-267.

PICTON, J. M. & STEER, M. W. 1981. Determination of secretory vesicle production rates by dictyosomes in pollen tubes of Tradescantia using cytochalasin D..J. Cell Sci., 49:261-272.

PODBIELKOWSKA, M., ZARSKA-MACIEJEWSKA, B. & KACPERSKA-PALACZ, A. 1975. Morphology of protoplast as affected by an inhibition of respiration. Protoplasma, 83:201-208.

PONZI, R. & PIZZOLONGO, P. 1973. Ultrastructure of plastids in the suspensor cells of Ipomoea purpurea Roth.. J. Submicr. Cytol., 5:257-263.

POPOVICI, G. & REZNIK, H. 1976. The effect of some flavonoids on the protoplasmic streaming in oat (Avena sativa) root hairs. Z. Pflanzenphysiol., 80:417-425.

PORAT, N., BEN-HAYYIM, G. & FRIEDBERG, I. 1978. Localization of oxidized 3,3'-diaminobenzidine deposits in chloroplasts. Protoplasma, 93:397-403.

POUX, N. 1961. Observations sur les rapports des vacuoles avec les structures réticulaires du cytoplasme. C. R. Acad. Sci. Paris, 253:2395-2397.

—— 1962. Nouvelles observations sur la nature et l'origine de la membrane vacuolaire des cellules végétales. J. Microscopie, 1:55-66.

—— 1966. Localisation d'activités phosphatasique à pH 7,0 dans les cellules du méristème radiculaire de Cucumis sativus L. 6th Int. Cong. Electron Microscopy, pp 95-96. Tokyo.

—— 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.

PRAGLOWSKI, J. & PUNT, W. 1973. An elucidation of the microreticulate structure of the exine. Grana Palynologica, 13:45-50.

PY, G. 1932. Recherches cytologiques sur l'assise nourricière des microspores et les microspores des plantes vasculaires. Rev. Gen. Bot. 44:450-462.

QUIVIGER, B., BENICHOU, J.-C. & RYTER, A. 1980. Comparative cytochemical localization of alkaline and acid phosphatases during starvation and differentiation of Dictyostelium discoideum. Biol. Cellulaire, 37:241-250.

RASHID, A., SIDDIQUI, A. W. & REINERT, J. 1982. Subcellular aspects of differentiation of microspore mother cells of Nicotiana tabacum. Protoplasma, 113:80-84.

REILLY, C., FUHRMANN, G. & ROTHSTEIN; A. 1970. The inhibition of K^+ and phosphate uptake in yeast by cycloheximide. Biochim. Biophys. Acta, 203:583-585.

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.

RISUEÑO, M. C., De La TORRE, C. & GIMÉNEZ-MARTÍN, G. 1975. Cytochemical and quantitative study of the structural changes induced by ethidium bromide in plant mitochondria. J. Ultrastruct. Res., 51:204-217.

——, FERNANDEZ-GÓMEZ, M. E., De La TORRE, C. & GIMÉNEZ-MARTÍN, G. 1972. Effect of ethidium bromide on the fine structure of the nucleolus in plant cells. J. Ultrastruct. Res., 39: 163-172.

—— ,GIMÉNEZ-MARTÍN, G., LÓPEZ-SÁEZ, J. F. & RODRIGUEZ-GARCIA, M. I. 1969. Origin and development of sporopollenin bodies. Protoplasma, 67:361-374.

——, SOGO, J. M., GIMÉNEZ-MARTÍN, G. & RODRIGUEZ-GARCÍA, M. I. 1970. Vacuolation in the cytoplasm of plant cells. Cytologia, 35:609-621.

ROHR, R. 1978. Existence d'un réticulum mitochondriale dans les cellules d'une culture de tissue haploide d'une plante vasculaire. Biol. Cellulaire, 33:89-92.

ROLAND, F. 1967. Différenciation du sporoderme chez Ficaria ranunculoides Moench. . Observation et évolution de corps d'Ubisch. Pollen et Spores, 9:415-425.

—— 1971. Characterization and extraction of the polysaccharides of the intine and of the generative cell wall in the pollen grains of some Ranunculaceae. Grana Palynologica,11: 101-106.

ROLAND- HEYDACKER, F. 1979. Aspects ultrastructuraux de l'ontogenie du pollen et du tapis chez Mahonia aquifolium Nutt. Berberidaceae. Pollen et Spores, 21:259-278.

ROWLEY, J. R. 1962. Nonhomogeneous sporopollenin in microspores of Poa annua. Grana Palynologica, 3:3-19.

—— 1963. Ubisch body development in Poa annua. Grana Palynologica, 4:25-36.

ROWLEY, J. R., DAHL, A. O. & SKVARLA, J. J. 1973. Localization of ATPase activity in pollen grains. Norwegian J. Bot., 20: 31-50.

—— & ERDTMAN, G. 1967. Sporoderm in Populus and Salix. Grana Palynologica, 7:518-556.

—— & FLYNN, J. J. 1966. Single-stage carbon replicas of micros pores. Stain Technol., 41:287-290.

——, MÜHLETHALER, K. & FREY-WYSSLING, A. 1959. A route for the transfer of materials through the pollen grain wall. J. Biophys. Biochem. Cytol., 6:537-538.

ROY, S. C. 1975. Effect of colchicine on pollen mother cells of Zea mays L.. Ind. J. Exp. Biol., 13:325-326.

RUBIN, M. S. & TZAGOLOFF, A. 1973. Assembly of the mitochondrial membrane system. X.Mitochondrial synthesis of three of the subunit proteins of yeast cytochrome oxidase. J. Biol. Chem., 248:4275-4279.

RYAN, K. G. 1980. The culture and correlative electron microscopy of pollen mother cells in meiosis: development of techniques and some observations on selected topics. Ph. D. Thesis University of Wellington. New Zealand.

SAAD, S. I. 1963. Sporoderm stratification: the "medine" a distinct third layer in the pollen wall. Pollen et Spores, 5: 17-38.

—— 1964. Pollen morphology of some egyptian Cucurbitaceae. Pollen et Spores, 6:113-124.

SALEMA, R. 1969. Amido. Estudo ultrastrutural da sua biogénese em plantas superiores. Brotéria (C.N.), 38:1-111.

SÁNCHEZ-PINA, M. A., RODRIGUEZ-GARCÍA, M. I. & RISUEÑO, M. C. 1980. Localization of the acid phosphatasic activity in plant cell nucleoli. Cell Biol. Int. Rep., 4:93-104.

SANGER, J. M. & JACKSON, W. T. 1971a. Fine structure study of pollen development in Haemanthus Katherinae B.. I.Formation of vegetative and generative cells. J. Cell Sci., 8:289-301.

—— & —— 1971b. Fine structure study of pollen develoment in Haemanthus Katherinae B..II.Microtubules and elongation of the generative cell. J. Cell Sci., 8:303-315.

SANGER , J. M. & JACKSON, W. T. 1971c. Fine structure study of pollen in Haemanthus Katherinae B..III.Changes in organelles during development of the vegetative cell. J. Cell Sci.,8: 317-329.

SANGWAN, R. S. & CAMEFORT, H. 1982. Microsporogenesis in Datura metel L..Rev. Cytol. Biol.végét.-Bot., 5:265-282.

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.

SANTOS, I. 1979. Microtubulos plastidiais. Estudo ultrastrutural e bioquímico e relações com fotossíntese CAM.Tese de doutoramento. Universidade do Porto.

SASSEN, M. M. A. 1964. Fine structure of Petunia pollen grain and pollen tube. Acta Bot. Neer., 13:175-181.

SAUTER, J. J. 1977. Electron microscopical localization of adenosine triphosphatase and β-glycerophosphatase in sieve cells of Pinus nigra var.austriaca (Hoess) Badoux.. Z.Pflanzenphysiol., 81:438-458.

SAWADA, N. & REBHUN, L. I. 1969. The effect of dinitrophenol and other phosphorylation uncouplers on the birefrigence of the mitotic apparatus of marine eggs. Exp. Cell Res., 55:33-38.

SCHÄFER, G., HELDT, H. W. & HEBER, U. 1977. Glucose transport in to 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.

SCHULTZ,P. & JENSEN, W. A. 1974. Capsella embryogenesis: the development of the free nuclear endosperm. Protoplasma, 80 : 183-205.

SEDAR, A. W., ROSA, C. G. & TSOU, K.-C. 1962. Tetranitro blue tetrazolium and the histochemistry of succinic dehydrogenase. J. Histochem. Cytochem., 10:506-508.

SEDGLEY, M. 1975. Flavonoids in pollen and stigma of Brassica oleracea and their effects on pollen germination in vitro. Ann. Bot., 39:1091-1095

SELIGMAN, A. M., KARNOVSKY, M. J., WASSERKRUG, H. & HANKER, J. S. 1968. Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB). J. Cell Biol., 38:1-14.

SENGER, P. L. & SAAKE, R. G. 1970.Unusual mitochondria of the bovine oocyte. J. Cell Biol., 46:405-408.

SHARPLESS, T. K. & BUTOW, R. A. 1970. Phosphorylating sites, cytochrome complement, and alternate pathways of coupled electron transport in Euglena gracilis mitochondria. J. Biol. Chem., 245:50-57.

SHAW, G. 1971. The chemistry of sporopollenin. In "Sporopollenin" Eds. J. Brooks, P. R. Grant, M. P. van Gijzel & G. Shaw, pp 305-348. Academic Press. London.

SHEPARD, J., BOOTHROYD, E. R. & STERN, H. 1974. The effect of colchicine on synapsis and chiasma formation in microsporocytes of Lilium. Chromosoma, 44:423-437.

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. 1981. Ultrastructure and development of the nexine and intine in the pollen wall of Silene alba (Caryophyllaceae). Amer. J. Bot., 68:1090-1095.

SIEGEL, M. R. & SISLER, H. D. 1963. Inhibition of protein synthesis in vitro by cycloheximide. Nature, 200:675-676.

SILVERBERG, B. A. & SAWA, T. 1974. Vacuolation in Nitella flexilis (Characeae). J. Exp. Bot., 25:230-243.

SKVARLA, J. J. & LARSON, D. A. 1966. Fine structural studies of Zea mays pollen. I.Cell membranes and exine ontogeny. Amer. J. Bot., 53:1112-1125.

SMILLIE, R. M., GRAHAM, D., DWYER, M. R., GRIEVE, A. & TOBIN, N. F. 1967. Citado por Garber, A. J., Jomain-Baum, M., Salganicoff, L., Farber, E. & Hanson, R. W. 1973.

SMITH, R. A. & ORD, M. J. 1979. Morphological alterations in the mitochondria of Amoeba proteus induced by uncoupling agents. J. Cell Sci., 37:217-229.

SMITH, U., SMITH, D. S. & YUNIS, A. A. 1970. Chloramphenicol-related changes mitochondrial ultrastructure. J. Cell Sci., 7: 501-521.

SMITH- JOHANNSEN, H., FROMSON, D. & GIBBS, S. P. 1980. The effects of spectinomycin and ethidium bromide on the synthesis of organelle rRNA and on ultrastructure in Ochromonas danica. J. Cell Sci., 43:119-136.

—— & GIBBS, S. P. 1972. Effects of chloramphenicol on chloroplast and mitochondrial ultrastructure in Ochromonas danica. J. Cell Biol., 52:598-614.

SOSLAU, G. & NASS, M. M. K. 1971. Effects of ethidium bromide on the cytochrome content and ultrastructure of L cell mitochondria. J. Cell Biol., 51:514-524.

SOWERS, A. E. & HACKENBROCK, C. R. 1981. Alterations in density and size distribution of intramembrane particles in the inner membrane of mitochondria from chloramphenicol-fed mice. Eur. J. Cell Biol., 24:101-107.

SPACEK, J. & LIEBERMAN, A. R. 1980. Relationships between mitochondrial outer membranes and agranular reticulum in nervous tissues: ultrastructural observations and a new interpretation. J. Cell Sci., 46:129-147.

SPURR, A. R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res., 26:31-43.

STANLEY, R. G. 1971. Pollen chemistry and tube growth. In "Pollen: development and physiology". Ed. J. Heslop-Harrison, pp 131--155. Butterworths. London.

—— & LINSKENS, H. F. 1974. Pollen. Biology, Biochemistry Management. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York.

STEPHENS, R. J. & BILS, R. F. 1965. An atypical mitochondrial form in normal rat liver. J. Cell Biol., 24:500-504.

STEVENS, B. J. 1977. Variation du nombre de mitochondries et du volume du chondriome de la levure selon les conditions de

croissance. J. Microscopie, 20:90a-91a.

SUMIDA, S. & UEDA, M. 1973. Studies of pesticides effects on Chlorella metabolism. I.Effect of herbicides on complex lipid biosynthesis. Plant Cell Physiol., 14:781-785.

——, YOSHIDA, R. & UEDA, M. 1975. Studies of pesticides effects on Chlorella metabolism. II.Effect of DCMU on galactolipid metabolism. Plant Cell Physiol., 16:257-264.

SZOLLOSI, D. 1965. Extrusion of nucleoli from pronuclei of the rat. J. Cell Biol., 25:545-562.

—— & HUNTER, R. 1973. A special attachment complex between the rough endoplasmic reticulum and mitochondria in porcine oocytes. J. Microscopie, 16:105-110.

TAKEGAMI, M H., YOSHIOKA, M., TANAKA, I. & ITO, M. 1981. Characteristics of isolated microsporocytes from Liliaceous plants for studies of the meiotic cell cycle in vitro. Plant Cell Physiol., 22:1-10.

TANI, E., AMETANI, T., HIGASHI, N. & FUJIHARA, E. 1971. Atypical cristae in mitochondria of human glioblastoma multiforme cells. J. Ultrastruct., 36:211-221.

THIÉRY, J. P. 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. J. Microscopie, 6: 987-1018.

THOMAS, M. J. 1973. Étude cytologique de l'embryogenèse du Pinus silvestris L.. I. Du proembryon cellulaire au clivage embryonnaire. Rev. Cytol. Biol. végét., 36:165-252.

TOBEY, R. A., PETERSEN, D. F. & ANDERSON, E. C. 1969. Citado por Barham, S. S. & Brinkley, B. R. 1976a.

TOTH, R. & KNIGHT,J. 1976. Anatomy and ultrastructure of the young hastorial gland in Comandra (Santalaceae). Can. J. Bot., 54:2315-2327.

TOURTE, Y. 1975. Étude infrastructurale de l'oogénèse chez une ptéridophyte. II. Évolution des mitochondries et des plastes. J. Microscopie Biol. Cell., 23:301-316.

TUCHWEBER, B., KOVACS, K., KHANDEKAR, J. D. & GARG, B. D. 1972. Intramitochondrial lamellar formations induced by pregneno

lone-α-carbonitrile in the hepatocytes of pregnant rats. J. Ultrastruct. Res., 39:456-464.

TURTURRO, A. & SHAFIQ, S. A. 1981. Freeze-fracture analysis of the effects of age and 2,4-dinitrophenol on the morphology of flight muscle mitochondria of Musca domestica L..Mechanism. Ageing Develop., 16:191-204.

UNZELMAN, J. M. & HEALEY, P. L. 1974. Development, structure and occurrence of secretory trichomes of Pharbitis. Protoplasma, 80:285-303.

VALANNE, N. 1977. Effect of continuous light on CO_2 fixation , chlorophyll content, growth and chloroplast structure in Ceratodon purpureus. Z. Pflanzenphysiol., 81:347-357.

VALENTINE, R. C. 1965. Citado por Salema, R. 1969.

VARTAPETIAN, B. B., ANDREEVA, I. N., KOZLOVA, G. I. & AGAPOVA, L. P. 1977. Mitochondrial ultrastructure in roots of mesophyte and hydrophyte at anoxia and after glucose feeding. Protoplasma, 91:243-256.

VASIL, I. K. 1960. Studies on pollen germination of certain Cucurbitaceae. Amer. J. Bot., 47:239-247.

—— 1973. The new biology of pollen. Naturwissenschaften, 60: 247-253..

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.

—— & —— 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.

WADDINGTON, C. H. & PERRY, M. M. 1963. Helical arrangement of ribosomes in differentiating muscle cells. Exp. Cell Res., 30: 599-602.

WAGNER, G., HAUPT, W. & LAUX, A. 1972. Reversible inhibition of chloroplast movement by cytochalasin B in the green alga Mougeotia. Science, 176:808-809.

WAGNER, N. 1927. Évolution du chondriome pendant la formation des grains de pollen des angiospermes. Biol. Gen., 3:15-66.

WARMKE, H. E. & LEE, S.-L. J. 1976. Improved staining procedures for semithin epoxy sections of plant tissues. Stain Technol., 51:179-185.

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. La Cellule, 62: 225-255.

WATRACH, A. M. 1964. Degeneration of mitochondria in lead poisoning. J. Ultrastruct. Res., 10:177-181.

WEIBEL, E. R., STAUBLI, W., GNÄGI, H. R. & HESS, F. A. 1969. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. J. Cell Biol., 42:68-91.

WEINBACH, E. C. & GARBUS, J. 1968. Structural changes in mitochondria induced by uncoupling reagents. The response to proteolytic enzymes. Biochem. J. 106:711-717.

WESSELLS, N. K., SPOONER, B. S., ASH, J.F., BRADLEY, M. O., LUDUENA, M. A., TAYLOR, E. L., WRENN, J. T. & YAMADA, K. M. 1971. Microfilaments in cellular and developmental processes. Science, 171:135-143.

WHALEY, W. G., MOLLENHAUER, H. H. & LEECH, J. H. 1960. The ultrastructure of the meristematic cell. Amer. J. Bot., 47: 401-420.

WHEATLEY, W. G. & OAKS, A. 1978. The effect of cycloheximide and cycloheximide analogues on protein, asparagine and glutamine synthesis in corn root tips. Can. J. Bot.,56:2873-2877.

WHITE, P. R. 1963. Citado por Ito, M. & Stern, H. 1967.

WILLIAMS, E., HESLOP-HARRISON, J. & DICKINSON, H. G. 1973. The activity of the nucleolus organizing region and origin of cytoplasmic nucleoloids in meiocytes of Lilium. Protoplasma, 77:79-93.

WILLIAMS, M. A. 1977. Stereological techniques.In " Practical methods in electron microscopy". Vol.6. Ed. A. M. Ghauert. North-Holland. Amsterdam.

WITALIŃSKI, W. & GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA, L. 1981. Atypical mitochondria in the lung of newts, Triturus alpestris Laur. J. Ultrastruct. Res., 77:223-231.

WOODING, F. B. P. 1968. Ribosome helices in mature cells. J. Ultrastruct. Res., 24:157-164.

WRISCHER, M. 1978. Ultrastructural localization of diaminobenzidine photoxidation in etiochloroplasts. Protoplasma, 97: 85-92.

YASUI, K. 1952. Citado por Ryan, K. G. 1980.