

Aspectos Celulares de Folhas de
Xerophyta plicata Spreng.
(Velloziaceae), Durante os Processos de
Dessecação e Revivescência.

VOLUME I

... à revisão final
... e adiciono a)
Estela de Sousa Rossetto
e aprovada pela Comissão Julgadora. *H. Dolder*

Estela de Sousa Rossetto

Tese apresentada como requisito necessário para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

Orientadora: Dra. Mary Anne Heidi Dolder

CAMPINAS
1992.

R735a
v.1
17316/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À minha mãe, Ana Maria, por
todo o carinho e pelo apoio em
todas as situações.

Uma Xícara de Chá*

Nan-in, um mestre japonês, recebeu um professor de universidade que veio indagar a respeito do Zen.

Nan-in serviu chá. Encheu a xícara do visitante, e continuou derramando.

O professor observou a enchente até que não pôde mais se conter. "Ela está cheia. Não cabe mais nada!"

"Como esta xícara", disse Nan-in, "você está cheio - de opiniões e especulações. Como posso lhe mostrar o Zen sem antes você esvaziar a sua xícara?".

* Retirado de Não apresse o rio (ele corre sozinho). Barry Stevens (1970).

Agradecimentos

Em 1988, durante uma aula de Ecologia Vegetal, ouvi falar sobre plantas cujas folhas secavam e voltavam a "funcionar", depois de molhadas. É claro que não acreditei nessa história...

Várias pessoas me ajudaram, direta ou indiretamente, a realizar esse trabalho, a elas os meus agradecimentos. Aqui cito algumas delas.

Agradeço à Heidi, que também não acreditou na tal história. Pela confiança que depositou em mim ao assumir a orientação de uma tese em uma área tão diferente de sua especialidade e nova na UNICAMP, pela força nas horas em que tudo parecia estar dando errado e pela amizade, muito obrigada.

Agradeço ao Carlos Joly, que foi o professor daquela aula de 1988, pelo incentivo, pela ajuda na coleta de material vegetal e na caracterização da área de coleta, pela companhia quando foi necessário ficar no laboratório em fins-de-semana e à noite, pelos palpites e discussões, baseados em seu conhecimento nessa área, pela ajuda na revisão e impressão da tese e, principalmente, pelo companheirismo em todos esses anos.

Outra pessoa muito importante foi o Sérgio Meirelles, com todo o seu conhecimento sobre a ecologia e o metabolismo dessas plantas revivescentes, que renderam produtivas discussões. Agradeço por tanta coisa que me ensinou. Agradeço também ao Sérgio e ao Eduardo Arcoverde pela visita a Araras, para coleta e estudo das plantas in loco.

Aos membros da pré-banca, Dr. Raul D. Machado, Dr. Édson R. Pimentel e Dr. João Semir, pelo cuidado que tiveram ao ler a tese e pela discussão, cada um trazendo dados e sugestões sob o ponto de vista de diferentes áreas da Biologia, agradeço. Essa versão final trás novas informações e deixa de apresentar muitas incorreções presentes na versão inicial, graças ao auxílio de vocês.

À coordenação e aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica do I.B. da UNICAMP, agradeço a cooperação.

Agradeço à Dra. Marina Silveira pelo auxílio na preparação do material para a Microscopia Eletrônica de Varredura e ao Depto. de Físico-Química do I.Q. da UNICAMP pelo uso do microscópio.

Quero agradecer aos meus amigos de muitos anos, Priscila, Paulo, Marinez, Júnia e Fábio, companheiros de curso e prédio, muito queridos. Obrigada pelas horas do cafezinho, pelos almoços comunitários, pelos papos alegres e sérios, pelas discussões políticas, biológicas... por palpitarem nessa tese e pela companhia em todas as horas. Pri, super-obrigada pelo gráfico da tese!

Aos amigos Mônica, Marinez, Priscila, Caio, Denise, Gislene, Rosângela, Eneida, Cristiana, Sílvia, Regina, Dadá, Zezinho, Patrícia, Armando, Donato, Robert, Celso, Cláudio & Isaac, pela convivência durante e depois da graduação, pelo carinho e cumplicidade, pelo M.U.B., obrigada !

Agradeço aos amigos Cidinha*, Lílíam*, Cláudio, Sidney, Chico, Mário, D. Irma, D. Darcy, D. Maria, D. Luiza, pelo cafezinho e o bate-papo que acompanha e por todo apoio e paciência. *Pelos resumos, cartas, formulários... e principalmente pela torcida à favor.

Às meninas da biblioteca, Norma, Zilda e Lavínia, agradeço pela longa convivência e pelo perdão de alguns atrasos...

Aos amigos de bar e de todas as horas, Carmen, Carlos, Bel, Lúcia, Heidi, Mara, Tereza, Helenice, Marco Ski, Urara, Lino, Angelo, obrigada por momentos de muitas risadas.

A Bel e Carmen, agradeço em especial pelo incentivo e apoio.

Aos colegas de sala, laboratório e cursos, Rejane, Lino, Selma, Ana Lúcia, Flávia e Cristiane, pelas risadas e pelos choros, pelo desespero e pelo alívio, pelas ajudas, agradeço.

Meu muito obrigada a Iraní e Sônia*, pelo exemplo, conselhos, conversas, ensinamentos e palpites na tese. *pela super acolhida no Rio de Janeiro.

Agradeço à "turma da Heidi", Iraní, Marília, Sônia, Nazário, Sebaka, Rejane, Lino, Flávia e a própria Heidi, pela super convivência, pela reciclagem e pelas bagunças nos congressos.

Agradeço aos meus ex-orientadores, Wanderley Dias da Silveira, Roberto Vilarta, Maria do Carmo Alberto Rincón, Benedicto de Campos Vidal e Édson Rosa Pimentel, por ajudarem na minha formação como pesquisadora, por servirem de exemplo e por serem sempre amigos.

À Shirlei M. Recco-Pimentel e Laurecir Gomes, professoras do Depto. de Biologia Celular, meu agradecimento pela amizade, apoio e incentivo durante esses anos.

Aos meus pais, Ana Maria e Mário Sérgio, minhas irmãs, Sílvia e Marisa, minhas avós Linita e Anita, minha tia Isa e meu avô Mário, por todo o apoio que deram e dão, obrigada.

À Eliana Molchansky, pela torcida e por toda a ajuda, obrigada.

Aos amigos da UFRJ, em especial a Rosani, Dória, Ricardo, Edilene, Maurá, Narcisa, Ana Cláudia, Cazusa, Técia, Edésio, Flávio e Ricardo L. pela acolhida carinhosa, agradeço.

Agradeço à CAPES (1990) e ao CNPq (1991-92), pelas bolsas de estudos.

ÍNDICE

	Página
Resumo.....	iv
Summary.....	v
Introdução.....	1
Material e Métodos.....	10
Caracterização da área de coleta.....	10
Material vegetal.....	12
Procedimento de esterilização de sementes.....	12
Cultivo das plantas.....	12
Experimentos de tolerância à dessecação.....	13
Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	13
Reação de Imidazol.....	16
Microscopia Eletrônica de Varredura.....	17
Resultados.....	18
Viabilidade das sementes.....	18
Conteúdo relativo de água.....	18
Dessecação.....	18
Revivescência.....	32
Reação de Imidazol.....	45
Microscopia Eletrônica de Varredura.....	47
Discussão.....	49
Fixação.....	49
Dessecação.....	57
Revivescência.....	75
Dessecação e Revivescência em <u>Xerophyta plicata</u>	82
Conclusões.....	88
Referências.....	89
Pranchas de fotografias.....	Vol. II

Resumo

Xerophyta plicata Spreng. (Velloziaceae) é uma Angiosperma brasileira tolerante à dessecação, que ocorre em afloramentos graníticos do RJ ao RN. Embora não perca as folhas nos períodos secos, elas ficam amarelas, encolhidas, dobradas e torcidas. Quando a água volta, as folhas se distendem e voltam a ficar verdes. As células do mesofilo sobrevivem aos ciclos de saída e entrada de água por meio de alterações ultra-estruturais responsáveis pela manutenção da viabilidade celular. Essas alterações parecem processos degradativos limitados, que mantém remanescentes das estruturas vitais. A utilização de solução fixadora não aquosa previne a ocorrência de artefatos de técnica nas folhas secas, que são muito reativas à água. O acompanhamento passo a passo dos nove dias de dessecação, por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão, revelou a permanência do núcleo de maneira intacta e de remanescentes identificáveis de cloroplastos, mesmo em folhas com conteúdo relativo de água (CRA) igual a 0%. As demais organelas desaparecem ou deixam de ser identificáveis nas células secas. Células desseçadas apresentam uma massa citoplasmática central e compacta, quase sem ligação com as paredes celulares, muito dobradas. Durante a re-hidratação alterações físicas de volume e forma (estudadas por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura-SEM) ocorrem paralelamente a alterações morfo-metabólicas de reorganização ultra-estrutural. O acompanhamento detalhado dos dois primeiros dias de re-hidratação por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), com o uso de fixadores aquoso e não aquoso, revelaram uma sequência de eventos celulares: dilatação das organelas, formação de vesículas que resultam na ocupação homogênea de todo o espaço interno da célula, deslocamento do citoplasma para a porção parietal da célula e reorganização da estrutura interna das células. Essa sequência mostrou-se semelhante, porém invertida, à sequência de alterações celulares que ocorrem durante a dessecação dessa mesma espécie.

Summary

Xerophyta plicata Spreng. (Velloziaceae) is a Brazilian desiccation tolerant Angiosperm that occurs in granitic rock outcrops from Rio de Janeiro State to Rio Grande do Norte State. Although leaves do not fall during the drought periods, they become yellow, shrunked, folded and twisted. When water is available again, leaves distend and retake the green colour. Mesophyll cells survive the water inlet and outlet cycles by means of ultrastructural changes that are responsible for maintaining their viability. These changes are similar to limited degradative processes in which remnants of the vital structures are preserved. The use of a non-aqueous fixative solution for dry tissues prevent the occurrence of fixation artefacts in these tissues that are very reactive to water. A step by step 9-day study of the desiccation process by Transmission Electron Microscopy (TEM) showed few changes in the nucleus and recognizable modified-chloroplasts even in totally dry leaves (relative water content (RWC) of 0%). Other organelles disappear or are not recognizable. Desiccated cells show a compact and central cytoplasm that maintains contact with the cell walls by a few thread-like projections. Cell walls are very folded. During rehydration, changes in shape and volume (studied by Scanning Electron Microscopy, SEM) occur along with morphological and metabolical changes, in order to reorganize the cell ultrastructure. A step by step study on the first 2 days of rehydration was carried out by TEM with aqueous and non-aqueous fixatives. Resurrection occurs through a sequence of cellular events: swelling of the organelles, vacuolation of the cytoplasm, motion of the cytoplasm to the peripheral portion of the cell and reorganization of the internal structure of the cells. This sequence is similar, but inverted, in relation to that followed during desiccation of the same X. plicata.

Introdução

Plantas que crescem em ambientes áridos normalmente sobrevivem à seca por retardar seus efeitos, armazenando água em seus tecidos de modo a manter seu metabolismo ativo (plantas suculentas) ou diminuindo a transpiração (xerófitas). Se o período de seca for muito longo essas plantas não conseguem suportar a seca e morrem. Outras espécies prosperam em ambientes áridos por evitar a seca. Elas têm ciclos de vida rápidos, onde a germinação ou brotamento, o crescimento e a maturação reprodutiva ocorrem dentro do período em que a água está disponível no ambiente. No período de seca as plantas evitadoras estão presentes no ambiente como formas de resistência, como por exemplo sementes (LEVITT, 1980; BEWLEY & KROCHKO, 1982; SCHWAB et al., 1989). Outro mecanismo de sobrevivência à seca, mais conhecido para algas, líquens e musgos, mas que também ocorre em algumas plantas superiores, é a capacidade de tolerar perdas drásticas de água nos tecidos sem perder a viabilidade. Essas plantas são chamadas de peciloídricas ("poikilohydric"), tolerantes à dessecação ou, popularmente, revivescentes ("resurrection plants") (GAFF & HALLAM, 1974, apud SCHWAB et al., 1989; WALTER, 1955, apud SCHWAB et al., 1989; BEWLEY & KROCHKO, 1982; LEVITT, 1980). As plantas revivescentes permanecem em estado de anabiose, com seu metabolismo interrompido, durante o período em que estão secas (CROWE & COOPER, 1971, apud SCHWAB et al., 1989). Quando a água volta a estar disponível, as plantas re-hidratam e seu funcionamento fisiológico é reativado.

No mecanismo de tolerância à dessecação a planta perde a maior parte de seu conteúdo hídrico sem que haja abscisão foliar (LEVITT, 1980; BEWLEY & KROCHKO, 1982; HSIAO, 1973; MEGURO et al., 1977). O limite de sobrevivência à seca em algumas plantas revivescentes é extremo. Algumas espécies podem resistir a valores de conteúdo relativo de água (BARRS, 1968, apud HALLAM & LUFF, 1980) que variam entre 20% e 0% (equilíbrio com ácido sulfúrico concentrado) em relação ao seu conteúdo de água no estado túrgido (GAFF & HALLAM, 1974, apud HALLAM, 1976).

A organização celular e o funcionamento bioquímico de um organismo, como um todo, dependem da presença de água. A nível molecular, a água determina o rendimento de todas as reações e a termodinâmica de todos os processos biológicos (RUPLEY et al., 1983). Dessa forma, é claro que a perda da água, em qualquer tecido vivo, implicará na ocorrência de alterações a nível celular. Nas plantas tolerantes à dessecação estas alterações não são apenas consequências físicas da perda de água pelos tecidos, mas são promovidas por uma intensa atividade metabólica que ocorre durante a dessecação, em resposta a ela (LEVITT, 1980). Neste processo ocorrem modificações ultra-estruturais e metabólicas reversíveis, que viabilizam a permanência dessas células em estado inativo durante o período de seca, bem como sua rápida reorganização morfo-metabólica tão logo haja disponibilidade de água para a planta (GAFF et al., 1976; HALLAM & GAFF, 1978; SCHWAB et al., 1989).

As alterações celulares que ocorrem durante o processo de dessecação em plantas revivescentes abrangem a desorganização dos polissomos e retículo endoplasmático, fragmentação do vacúolo em vários menores e alterações morfo-metabólicas tardias nas mitocôndrias e nos cloroplastos (HALLAM & LUFF, 1980, HALLAM & GAFF, 1978, BEWLEY, 1979).

No processo de dessecação de Xerophyta villosa Th.Dur. & Shinz. (Velloziaceae) (HALLAM & LUFF, 1980) e de Borja nitida Labill. (Liliaceae) (GAFF et al., 1976), que são plantas revivescentes, as alterações morfológicas nas células do mesofilo começam pela redução do volume celular. Ao longo do processo de dessecação, as organelas vão se modificando. Quando dessecadas, apenas os cloroplastos e as mitocôndrias mantêm-se identificáveis no citoplasma dessas espécies (GAFF et al., 1976; HALLAM & LUFF, 1980).

Embora plantas tolerantes à dessecação de várias famílias possam apresentar processos celulares de resposta à dessecação com uma sequência de eventos bastante semelhante, não é possível falar em uma sequência padrão de alterações celulares responsável pela tolerância à dessecação, uma vez que existem espécies de

plantas revivescentes que apresentam respostas celulares diferentes à perda da água. Essas respostas, no entanto levam ao mesmo estado de anabiose viável no estado seco, passível de reorganização e re-ativação metabólica com a re-hidratação. WELLBURN & WELLBURN (1976) encontraram um exemplo disso em Myrothamnus flabellifolia Welw. (Hamamelideae), que mantém a organização ultra-estrutural de mitocôndrias e plastídios do mesofilo, mesmo no estado dessecado. Essas organelas ficam separadas do resto do citoplasma por bainhas ou membranas. Após a re-hidratação, essas bainhas parecem ser perfuradas, permitindo que ocorra uma reorganização celular e uma reativação metabólica que é considerada a mais rápida entre as plantas revivescentes já estudadas (WELLBURN & WELLBURN, 1976).

Algumas plantas tolerantes à dessecação mantêm a clorofila das folhas no estado dessecado, apresentando-se sempre verdes (homeoclorófilas). Outras, peciloclorófilas, perdem a clorofila durante a dessecação e a sintetizam de novo durante a reorganização dos cloroplastos. Estas últimas mostram folhas de cor marrom-pardo quando secas, que retomam a cor verde no processo de re-hidratação (MEGURO et al., 1977; MEIRELLES, 1990). Como exemplos de plantas revivescentes peciloclorófilas temos Xerophyta villosa Th.Dur. & Schinz. (Velloziaceae) (HALLAM & LUFF, 1980), Xerophyta plicata Spreng (Velloziaceae) (MEGURO et al., 1977), Vellozia nivea e Vellozia compacta Mart. (Velloziaceae) (CASTRO, F.; CASTRO, M.M.S. & ROSSETTO, E.S., não publicado). Como exemplos de espécies revivescentes homeoclorófilas temos Talbotia elegans Balf. (Velloziaceae) (GAFF & HALLAM, 1974, apud HALLAM, 1976), Craterostigma plantagineum Hochst. (Scrophulariaceae), Ramonda mykoni Reichb. (Gesneriaceae), Ceterach officinarum Lam. et DC. (Aspleniaceae) (SCHWAB et al., 1989).

Com relação à catálise das clorofilas em plantas peciloclorófilas, BORTLIK e colaboradores (1987) afirmam que a porcentagem de elementos químicos realocados nesse processo é tão pequena, em comparação com o rendimento da realocação de produtos do catabolismo de proteínas p.e., que chega a ser indiferente, em

termos de economia de recursos, o fato da planta ser homeoclorófila ou peciloclorófila.

As reservas energéticas de carboidratos das folhas de plantas revivescientes também sofrem modificações durante o processo de dessecação. Estudos feitos por meio da Microscopia Eletrônica de Transmissão mostraram que as reservas de amido das folhas diminuem ao longo desse processo (HETHERINGTON et al., 1982). Estudos bioquímicos mostram que o amido é quebrado em açúcares solúveis menores, que teriam, ao menos, três supostas funções: a manutenção da integridade das membranas celulares (plasmática, das mitocôndrias, dos cloroplastos, do núcleo e dos vacúolos), o fornecimento de combustível facilmente utilizável para a produção de energia pela respiração, quando da reorganização celular ao fim do período de seca (HALLAM & LUFF, 1980; SCHWAB & GAFF, 1986; HETHERINGTON et al., 1982; HALLAM & GAFF, 1978; SCHWAB et al., 1989), e o aumento da pressão osmótica, permitindo a retenção de água pelos tecidos, que torna mais lenta a perda de água (LEVITT, 1980).

Nas espécies sensíveis à dessecação, as folhas comportam-se frente ao déficit hídrico senescendo. O processo de senescência é bastante complexo e, como o processo de tolerância a dessecação, caracteriza-se por alterações celulares a nível ultra-estrutural e metabólico. Na senescência, essas alterações levam à inviabilização celular e geralmente culminam na abscisão foliar. A chamada "síndrome de senescência" (BORTLIK et al., 1987; OLAND, 1963; STODART & THOMAS, 1982; TAMM, 1951), detectável a olho nú pelo amarelecimento das folhas antes da abscisão, envolve o catabolismo das proteínas e das clorofilas e a realocação do nitrogênio, magnésio, fósforo e potássio resultantes para outras partes da planta, possivelmente menos (ou mais tardiamente) lesadas ao longo do período de estresse. Também ocorre durante a senescência uma desorganização das organelas celulares, iniciada pelos polissomos e pelo retículo endoplasmático (liso e rugoso) e finalizada pela desorganização de cloroplastos, mitocôndrias e do núcleo (BISWAL & BISWAL, 1988; WOOLHOUSE, 1982).

A tolerância à dessecação pode ser comparada à formação e germinação de sementes, no sentido em que um tecido originalmente hidratado passa por um processo de dessecação e depois é re-hidratado e reassume um nível normal de atividade metabólica. No caso das plantas revivescentes, no entanto, tratam-se de tecidos compostos por células totalmente diferenciadas que desorganizam e re-organizam sua ultra-estrutura e seu funcionamento fisiológico, o que é um processo bastante mais complexo que em células não diferenciadas do embrião de sementes (HALLAM & GAFF, 1978; HALLAM, 1976).

O estado de inatividade metabólica em que a planta permanece durante o período de máxima dessecação recebe várias denominações: dormência exógena (KEILIN, 1959; apud COTTIGNIES, 1986-87), repouso imposto (HILL & CAMPBELL, 1949; apud COTTIGNIES, 1986-87), dormência obrigatória ou dormência aparente (COME, 1970; apud COTTIGNIES, 1986-87), entre outros. No presente trabalho adotaremos o termo **quiescência**, proposto por MEYER & ANDERSON (1952, apud COTTIGNIES, 1986-87) que significa um tipo especial de dormência, onde o período de interrupção reversível do desenvolvimento fenotípico de um organismo é provocado por um fator externo não sazonal, de natureza química ou física que, uma vez suspenso, implica na volta do crescimento normal do indivíduo ou órgão. No caso deste trabalho o fator determinante da quiescência é a seca. A presença da água implica no início imediato do processo de revivescência. A quiescência difere da dormência propriamente dita, que é um período de interrupção reversível do desenvolvimento fenotípico provocado por um fator externo sazonal e controlada por um fator inibidor de crescimento (hormônio) localizado no próprio órgão. A dormência é um estado endógeno e periódico de incapacidade de crescimento, que pode ser provocado artificialmente pela aplicação local deste inibidor de crescimento endógeno, independentemente das condições ambientais (COTTIGNIES, 1986-87). Durante o estado de dormência, mesmo se a planta for colocada em suas condições ideais de crescimento, não retomará seu crescimento (BONICEL & RAPOSO, 1990).

As modificações morfo-metabólicas celulares que ocorrem durante o processo de dessecação, antes da planta entrar no estado de quiescência em que permanece durante o período seco, viabilizam o rápido retorno à atividade metabólica normal quando a planta é re-hidratada. Este retorno se processa num período de tempo variável após o início da re-hidratação, conforme a espécie vegetal (GAFF et al., 1976)

Com a disponibilidade de água, o complexo enzimático respiratório é o primeiro a ser reativado, poucas horas após o início da re-hidratação, gerando energia para a reorganização do sistema fotossintético, bem como das estruturas morfológicas e dos complexos metabólicos que regem o funcionamento celular como um todo (GAFF et al., 1976).

É possível que as modificações morfo-metabólicas que ocorrem durante a dessecação não estejam preparando a planta apenas para o período de seca, quando permanecem quiescentes, mas principalmente para a rápida ativação metabólica e reestruturação celular, assim que haja disponibilidade de água no ambiente. A urgência na utilização da água vem da irregularidade deste recurso no ambiente rupestre, cujo aproveitamento precisa ser maximizado.

A tolerância à dessecação significa, em última análise, um mecanismo de conservação de recursos, principalmente nitrogênio e cadeias carbônicas, investidos na estrutura foliar (JOLY, C.A., 1988 com. pess.). Tal conservação permite que a água incorporada pela planta seja utilizada na rápida ativação das vias metabólicas de obtenção de energia (GAFF et al., 1976), que é investida no crescimento do indivíduo, com produção de novas folhas e nas estruturas reprodutivas. Isto representa uma vantagem adaptativa e competitiva para as plantas tolerantes à dessecação, que usualmente são pioneiras na colonização de ambientes rupestres, como afloramentos rochosos, onde não há retenção de água (GAFF, 1977).

Existe uma clara diferença entre os processos de dessecação em plantas sensíveis e tolerantes. Enquanto nas plantas sensíveis o processo é independente da velocidade com que ocorre a perda de

água, irreversível e letal (FELLOWS & BOYER, 1978, HSIAO, 1973), nas espécies tolerantes ele é reversível, dependendo da velocidade de perda de água. Um processo rápido de dessecação é letal para algumas espécies tolerantes, por impossibilitar a ocorrência de todo o processo de rearranjo metabólico e estrutural que mantém a viabilidade da folha (HETHERINGTON et al., 1982, FELLOWS & BOYER 1978, BEWLEY, 1979, MEIRELLES, 1990). Para outras espécies, como Myrothamnus flabellifolia, que sobrevive à exposição a nitrogênio líquido por 10 minutos e a 80°C por 2 horas, a dessecação pode ser muito rápida ou muito prolongada, sem prejudicar sua capacidade de reviver (WELLBURN & WELLBURN, 1976).

Com relação às diferenças morfo-metabólicas entre espécies tolerantes e sensíveis à dessecação, de uma mesma família de Angiospermas, não existem dados comparativos publicados até o momento. Os poucos estudos ultra-estruturais e metabólicos com espécies da família Velloziaceae, por exemplo, foram feitos com o objetivo de compreender melhor o mecanismo de tolerância à dessecação (HALLAM & GAFF, 1978; MEGURO et al., 1977), sem haver comparação com espécies sensíveis.

A utilização de técnicas de Microscopia Eletrônica para o estudo de espécies tolerantes à dessecação vem sendo feita há bastante tempo, sempre trazendo novas informações sobre esta estratégia e sempre apresentando novos desafios ao desenvolvimento de metodologias que alterem o mínimo possível a ultra-estrutura celular durante a preparação do material. O acompanhamento das alterações de estruturas sub-celulares, como as membranas (plasmática e das organelas), o núcleo, os cloroplastos, as mitocôndrias, os ribossomos e a parede celular, vem sendo feito por vários autores (anteriormente citados). Os diferentes enfoques desses trabalhos contribuem para o entendimento das complexas alterações morfo-metabólicas que permitem a essas plantas tolerar perdas em até 100% de seu conteúdo hídrico sem perder a viabilidade celular.

A família Velloziaceae (Angiospermae, Monocotyledoneae) é característica de ambientes rupestres, onde o fator limitante

para o estabelecimento de vegetais é a ocorrência de frequentes períodos não sazonais de extrema falta de água (JOLY, 1970). Muitas das espécies dessa família apresentam tolerância à dessecação associada ao amarelecimento das folhas durante a dessecação e reaquisição da cor verde na re-hidratação (peciloclorofilia) (GAFF, 1987; MEGURO et al., 1977; MEIRELES, 1990). A proporção entre as espécies tolerantes e não tolerantes à dessecação, nessa família, ainda não foi determinada, devido à pequena quantidade de trabalhos desenvolvidos com esse objetivo (GAFF, 1987; MEGURO et al., 1977; MEIRELES, 1990). Estudos recentes com espécies da família Velloziaceae realizados no Estado do Rio de Janeiro e na Cadeia do Espinhaço, no Estado de Minas Gerais, indicam que a maior parte das espécies dessa família apresentam tolerância à dessecação (MEIRELES, S.T., 1992, comunicação pessoal).

No Brasil a família Velloziaceae é representada por um grande número de espécies (GIULIETTI et al., 1977), mas a maior parte delas ainda está sendo testada quanto à tolerância à dessecação (MEIRELES, 1990 e comunicação pessoal, 1992). As Velloziaceae brasileiras são encontradas em ambientes rupestres no litoral e no interior do país (JOLY, 1970). Das espécies brasileiras de Velloziaceae, somente Xerophyta plicata foi citada na revisão sobre tolerância à dessecação feita por BEWLEY & KROCHKO (1982), a partir de dados de MEGURO et al. (1977). Cinco anos depois, a revisão de GAFF (1987) sobre plantas sul-americanas tolerantes à dessecação lista 20 espécies da família Velloziaceae, além de umas poucas espécies das famílias Poaceae e Cyperaceae e poucas espécies de pteridófitas. Isso reflete a pouca, porém crescente, quantidade de informação a cerca das espécies brasileiras tolerantes à dessecação.

Acredita-se que a vegetação associada aos ambientes rupestres tenha sido selecionada principalmente pela irregular disponibilidade de água, com períodos de intenso déficit hídrico, que ocorrem devido à incapacidade de retenção de água pelo substrato rochoso. A limitação e a irregularidade do recurso hídrico restringem a instalação de espécies vegetais,

condicionando a formação de uma vegetação característica, composta por plantas que possuem adaptações para evitar, retardar ou tolerar os efeitos da seca (LEVITT, 1980; MEIRELLES, 1990).

A Velloziaceae brasileira Xerophyta plicata Spreng. é uma Angiosperma tolerante à dessecação que ocorre em afloramentos rochosos graníticos litorâneos. Aspectos de seu comportamento fisiológico frente ao déficit hídrico foram estudados por MEGURO e colaboradores (1977). Estes autores mostraram que a espécie apresenta peciloclorofilia, facilmente detectável pela coloração marrom-parda das folhas no estado dessecado, que retomam a cor verde quando re-hidratadas.

O presente trabalho tem o objetivo de acrescentar informações sobre os processos celulares de dessecação e revivescência de uma Angiosperma brasileira tolerante à dessecação. Para tanto, acompanhamos as alterações ultra-estruturais que ocorrem no mesofilo de Xerophyta plicata Spreng. (Velloziaceae) ao longo dos processos de dessecação e revivescência.

Material e Métodos

Caracterização da Área de Coleta

Xerophyta plicata Spreng. (Velloziaceae, Monocotyledoneae, Angiospermae) é uma espécie brasileira, típica de afloramentos rochosos graníticos litorâneos, encontrada desde o Estado do Rio de Janeiro até o Estado do Rio Grande do Norte.

A população estudada está localizada nas proximidades da Estação Biológica de Araras (Araras - RJ, 22°25'51''S; 43°14'41''W), à cerca de 850 metros acima do mar.

O clima dessa área não apresenta estação seca definida, mas períodos irregulares de ausência de chuvas, ao longo do ano. Dada a incapacidade de retenção de água pelo substrato, nesses períodos a vegetação é submetida a intensos déficits hídricos. A média de temperatura anual fica em torno de 22°C, com mínima de 4°C e máxima de 36°C (MEIRELLES, 1990).

O substrato rochoso é do tipo metamórfico, com predomínio de gnaisses e granitos (MEIRELLES, 1990).

Xerophyta plicata é encontrada em paredões de rocha exposta, em acúmulos de solo raso, que muitas vezes consiste de um particulado grosso desprendido da própria superfície rochosa, sobre fendas e desníveis ou diretamente sobre a rocha nua. A área apresenta inclinações de cerca de 50°, que facilitam o rápido escoamento da água das chuvas, que não se acumula. Os indivíduos, de até 1,60m de altura, são encontrados em "ilhas" de vegetação associados a indivíduos de outras espécies vegetais (Foto 1).



Foto 1: "Ilhas" de Xerophyta plicata sobre rocha granítica. Note a inclinação da rocha, facilitando o escoamento da água. Araras - RJ

Material Vegetal

Sementes de Xerophyta plicata coletadas em dezembro de 1988 em Araras-RJ, por MEIRELLES, S.T., foram mantidas em frasco de vidro, dentro de recipiente com dessecador (sílica gel com indicador de umidade). As plântulas germinadas dessas sementes foram usadas nos experimentos de tolerância à dessecação e para microscopia eletrônica de transmissão e de varredura.

Plantas adultas e plântulas de Xerophyta plicata foram por nós coletadas, em maio de 1991, em Araras-RJ. Elas foram usadas para microscopia eletrônica de varredura.

Procedimento de Esterilização de Sementes

(MEIRELLES, S.T. 1988, comunicação pessoal).

1. Lavagem em detergente Triton X-100 a 1% até as sementes afundarem.

2. Lavagem em solução de HClO_2 (água sanitária) a 0.5% por 30 segundos.

3. Lavagens sucessivas com água destilada, até as sementes perderem o cheiro característico do HClO_2 .

A seguir as sementes foram postas para germinar em placas de Petri sobre gaze de pano ou em placas de xaxim, esterilizadas do mesmo modo.

Cultivo das Plantas

Após a esterilização, as sementes foram postas para germinar sobre placas de xaxim dentro de cubas de vidro e mantidas à temperatura (25 a 27°C) e luminosidade ambiente.

As plântulas foram regadas com solução nutritiva contendo macro e micro nutrientes (HOAGLAND & ARNON, 1938) diluída 10 vezes em água destilada e contendo 0.1 ml/l do fungicida Micostatin (Nistatina) Squibb (anti-micótico de uso médico)

100000 UI/cm³ ou com água, de modo que o substrato permaneceu constantemente úmido durante o período de germinação e até o aparecimento da 3ª folha (\pm 3 meses após a germinação).

Experimentos de Tolerância à Dessecação

Devido ao crescimento lento das plântulas, os experimentos foram efetuados com plantas entre 5 e 12 meses após a germinação, quando estas apresentavam no mínimo três folhas.

A dessecação foi provocada pela suspensão das regas, ocorrendo de forma gradual e não abrupta.

O conteúdo relativo de água (CRA) das plântulas em processo de dessecação e revivescência foi calculado segundo BARRS (1968 apud HALLAM & LUFF, 1980). Para cada medida foi utilizada uma plântula inteira, e não apenas uma folha. Isso foi feito porque a folha é muito pequena (cerca de 1cm x 0,4cm) e, conseqüentemente, leve. Mesmo utilizando toda a plântula, a diferença entre peso fresco (PF), peso túrgido (PT) e peso seco (PS) era obtida na terceira ou quarta casa decimal da balança analítica.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Fixador aquoso

(modificado de GLAUERT, 1975)

Glutaraldeído 3% + paraformaldeído 1,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 6,8, com 3,5% de sacarose e gotas de CaCl₂ (traços). Fixador preparado a partir de solução de glutaraldeído 25%.

Fixador não aquoso

(modificado de HALLAM (1976) e Hallam, N.D., 1990, comunicação pessoal.)

Glutaraldeído 3% + paraformaldeído 1,5% em DMSO (Dimetilsulfóxido) com 3,5% de sacarose e gotas de CaCl_2 (traços). Fixador preparado a partir de solução de glutaraldeído 70%.

Dois lotes de plântulas de tamanhos homogêneos, distribuídas em duas placas de xaxim, foram usados no acompanhamento das etapas de dessecação e re-hidratação. Um lote foi mantido hidratado por cerca de 15 dias e saturado de água nos três dias anteriores ao experimento e o outro permaneceu seco por 15 a 20 dias.

Cada fixação corresponde a uma folha de uma planta diferente, que foi retirada do lote e utilizada para a determinação do conteúdo relativo de água (CRA), como descrito acima.

O acompanhamento do processo de dessecação foi feito durante 9 dias, a partir de plantas no estado túrgido até plantas desseçadas.

As plantas aparentam estar secas a partir do terceiro dia de suspensão das regas, mas, para garantir a seca máxima, foram fixadas plantas nos 6 dias seguintes. No primeiro dia de dessecação, foram feitas 7 fixações, uma a cada 2 horas até 12 horas de dessecação (hD). Foi feita uma fixação com 24 horas de dessecação e em seguida a cada 24 horas até o nono dia.

As plantas de 0 hora a 2 dias de dessecação (dD) foram processadas com fixador aquoso e as plantas de 3 dias a 9 dias de dessecação foram processadas com fixador não aquoso. A escolha do tipo de fixador a ser usado baseou-se em caracteres externos da folha (coloração, rigidez e enrolamento do limbo), uma vez que o CRA (conteúdo relativo de água) só é obtido 3 a 4 dias após a fixação das folhas.

O processo de revivescência foi acompanhado de maneira semelhante ao de dessecação, partindo de plântulas secas há cerca de 15-20 dias.

Após a fixação de folhas correspondentes a 0 hora de re-hidratação (hR), o xaxim foi colocado em um recipiente contendo água, de modo a ficar saturado durante todo o experimento. As plantas foram acompanhadas até o segundo dia de reidratação, quando se mostravam com as folhas desenroladas, distendidas e de cor verde.

As plantas de 0 hora a 6 horas de re-hidratação foram processadas com fixador não aquoso e as plantas de 8 horas a 2 dias de re-hidratação (dR) foram processadas com fixador aquoso. Assim como no caso das plantas em processo de dessecação, o critério utilizado aqui para a escolha do fixador foi baseado nas características externas da folha

Cada folha fixada teve seu conteúdo relativo de água estimado a partir dos valores de peso fresco, peso túrgido e peso seco do resto da plântula (vide Experimentos de Tolerância à dessecação, acima). Em cada etapa, as características morfológicas externas das folhas foram observadas.

Em uma placa de Petri revestida com cêra, cada folha (com cerca de 1cm x 0.4cm) foi mergulhada em uma gota do fixador, cortada em pedaços pequenos (cerca de 0,2cm x 0,4cm) e transferidas para saquinhos (semelhantes a saquinhos de chá, medindo em torno de 1,3cm x 1,3cm x 0,3cm) de tela de fios de aço inoxidável. Os saquinhos foram mergulhados em recipientes contendo fixador em quantidade bastante superior à necessária para cobri-los (10 a 15ml). A fixação foi feita em temperatura ambiente ($\pm 22^{\circ}\text{C}$), por 2 horas.

Em seguida, as folhas processadas em meio aquoso foram lavadas com o tampão veículo do fixador por 1 hora, com 2 trocas, pós-fixadas com tetróxido de ósmio (OsO_4) 2% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,8, lavadas em água destilada, desidratadas em série de concentrações crescentes de álcoois e lavadas em acetona (GLAUERT, 1975). A embebição em resina epoxi ERL-4206 (SPURR, 1969) foi feita em uma solução 1:1 de resina em acetona, que

ficou em frasco destampado por cerca de 20 horas. Em seguida o material foi incluído para cortes transversais.

Folhas processadas em meio não aquoso foram lavadas em DMSO por 30 minutos, em solução 1:1 de DMSO e clorofórmio por 10 minutos, em clorofórmio puro por 10 minutos, em solução 1:1 de clorofórmio e álcool etílico 100% por 10 minutos e em álcool etílico 100% por 10 minutos. As folhas foram re-hidratadas em série decrescente de álcoois até água destilada, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 2% em água e processadas como descrito acima, para folhas fixadas em meio aquoso.

Cortes semi-finos ($0.5 \mu\text{m}$) foram obtidos com navalhas de vidro, em ultramicrotomo LKB Ultratome III, montados em lâminas histológicas de vidro e corados com Azul de Toluidina 1% em Na_2CO_3 a 0.5% para observação ao microscópio de luz.

Cortes ultra-finos, dourado-claros (cerca de 300 \AA) foram efetuados no mesmo aparelho, coletados em telinhas de cobre e corados com acetato de uranila a 2% em água destilada por 30 minutos e citrato de chumbo 0.2% em solução 1N de NaOH por 5 minutos (VENABLE & COGGESHALL, 1965). As observações foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss S-09.

Reação de Imidazol (SOARES, 1989)

Essa técnica permite confirmar a natureza lipídica de estruturas observadas ao microscópio eletrônico de transmissão, por aumentar a quantidade de sítios para a reação com o tetróxido de ósmio, que confere a elétron-densidade ao material ao se precipitar na forma de dióxido de ósmio (KIERNAN, 1981).

Folhas hidratadas (CRA = 83%) e secas (CRA = 9%) foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 6,9, contendo 3,5% de sacarose, por 2 horas à temperatura ambiente. Foram lavadas uma vez no mesmo tampão por 10 minutos e uma vez em tampão imidazol 0,1M pH 7,5 por 10 minutos. As folhas foram colocadas em frascos de vidro encapados com papel de alumínio (de modo a ficarem no escuro), contendo 1 ml de tampão imidazol. Sob agitação, foi gotejado 1 ml de solução de tetróxido

de ósmio a 4% em água. Os frascos de vidro ficaram à temperatura ambiente por 30 minutos. As folhas controle ficaram em frascos de vidro com tetróxido de ósmio em tampão fosfato 0,1M pH 6,4 por 30 minutos. As folhas foram lavadas em tampão imidazol em dois banhos de 10 minutos, desidratadas em série crescente de alcoois, lavadas em acetona e incluídas em resina epoxy ERL-4206. Os cortes ultra-finos (dourado-claros) obtidos com navalhas de vidro em ultramicrotomo LKB Ultratome III foram observados ao Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss S-09 sem contrastação.

Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

Com o objetivo de comparar as características da superfície das folhas de X. plicata nos estados hidratado e dessecado, secções de folhas de plantas adultas hidratadas fixadas e de folhas de plantas adultas secas, fixadas e não fixadas, foram observadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura.

Secções com cerca 0,5 cm de comprimento de folhas hidratadas e secas foram fixadas em glutaraldeído 4%, paraformaldeído 0,1% e ácido pícrico 0,01% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 6,8 (HALLAM & LUFF, 1980), por 1 hora no vácuo. Estas folhas foram desidratadas em série crescente de álcoois.

Todas as secções de folhas (fixadas ou não) foram embebidas em acetato de amila e secas em CO₂ líquido em aparelho de ponto crítico.

As folhas secas pelo aparelho de ponto crítico foram cobertas com ouro evaporado, que é o responsável pela emissão de elétrons nas áreas atingidas pelo feixe de elétrons, formando a imagem. A cobertura de ouro também evita danos ao espécime, devidos ao aquecimento excessivo pelo feixe de elétrons e aberrações na imagem obtida, devidas ao acúmulo de cargas na superfície do mesmo.

Esse material foi observado em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol JSM-T300.

Resultados

Viabilidade das sementes

Embora não tenha sido feito nenhum estudo específico sobre este assunto, observamos que sementes recém coletadas e sementes estocadas em recipiente com dessecador, apresentam germinação de 100%. A partir de um ano e meio de estoque a porcentagem de germinação vai diminuindo até que em sementes estocadas há dois anos a germinação é praticamente nula.

Conteúdo Relativo de Água

O gráfico 1 mostra o conteúdo relativo de água (CRA) nas folhas de X. plicata durante os processos de dessecação e re-hidratação.

O processo de dessecação é descontínuo. Nele ocorre uma redução abrupta no conteúdo relativo de água (de 60% para 15%) entre 24 e 48 horas.

A re-hidratação apresenta-se mais contínua e gradual que a dessecação.

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Dessecação

0hD - CRA = 99,22% - Fixação Aquosa - (Pranchas 1 e 2)

Folhas de plântulas hidratadas de Xerophyta plicata apresentam-se distendidas, com a lâmina foliar plana, sem dobras ou enrolamento e de cor verde.

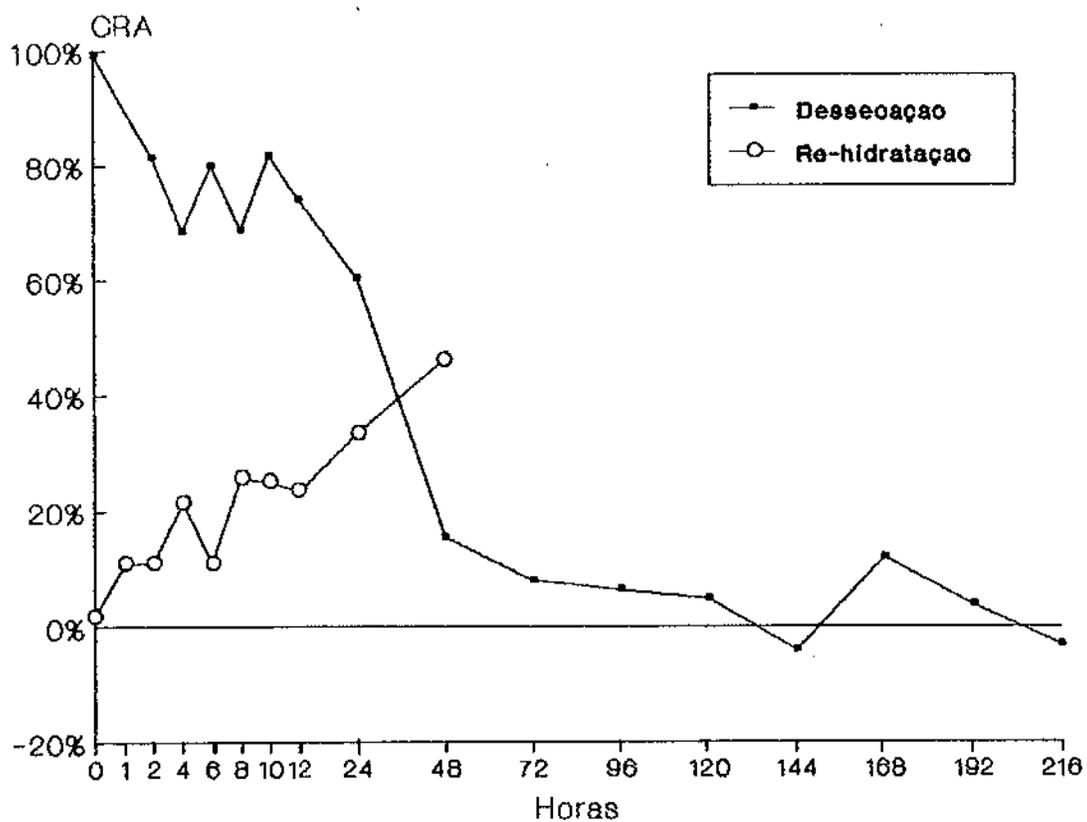


Gráfico 1 - Conteúdo relativo de água em plântulas de Xerophyta plicata durante os processos de dessecação e re-hidratação.

Cortes semi-finos (Fig. 1A) mostram que folhas de plântulas de Xerophyta plicata no estado hidratado apresentam superfície plana, sem dobras. As células do mesofilo apresentam espaços variáveis entre si e apresentam as paredes distendidas. Os cloroplastos são evidentes, mesmo em microscopia fotônica (Fig. 1A). As células da epiderme apresentam paredes celulares espessadas em alguns trechos, onde também ocorrem fibras sub-epidérmicas. Na maioria das vezes estas estruturas de reforço são coincidentes nas faces adaxial e abaxial da lâmina foliar e coincidem com a presença de feixes vasculares. As áreas de epiderme espessada são mais extensas na face adaxial que na face abaxial. Essa espécie caracteriza-se por apresentar estômatos nas duas faces da folha.

Ao microscópio eletrônico de transmissão podem-se observar as paredes celulares distendidas, com poucas ondulações (Fig. 1A, 1B, 1C e 2A). Notam-se plasmodesmas entre células adjacentes (Fig. 1C).

O citoplasma das células do mesofilo é parietal e muito estreito, de onde se destacam os cloroplastos e o núcleo (Fig. 1B).

Os cloroplastos são bastante evidentes dentro das células do mesofilo. Quando observados ao microscópio eletrônico de transmissão (MET), observam-se vários grãos de amido (até 4 por organela vista em corte, Fig. 1B, seta). Grãos de amido em grande quantidade e de tamanho grande são encontrados em cloroplastos de forma irregular (Figs. 1B, 1D e 2A), ao passo que pequenos grãos de amido são observados em cloroplastos lentiformes (Figs. 1B e 2A). Os grãos de amido maiores apresentam manchas alongadas, verticais, horizontais ou entrecruzadas, quando observados ao MET (Fig. 1C).

Os grana são de difícil observação nesses cloroplastos (Fig. 1D) e poucos plastoglóbulos são vistos (Figs 1C e 2A; as micrografias 1D e 2B mostram imagens negativas dos plastoglóbulos devido a terem sido extraídos durante a preparação do material, provavelmente por serem células superficiais no fragmento de folha).

As mitocôndrias são alongadas e dispõem-se sobre os cloroplastos (Fig. 1D). Em alguns cortes elas são observadas com o contorno circular, ao lado dos cloroplastos (Figs. 1C e 2A). As invaginações da membrana interna das mitocôndrias são chamadas de cristas. Nessa espécie elas são tubulares dilatadas. Em cortes elas são frequentemente observadas como pequenas vesículas dispostas irregularmente no espaço interno da organela (Figs. 1D e 2A).

O núcleo dessas células bem hidratadas apresenta-se delimitado por duas membranas (envoltório nuclear) e a cromatina está descondensada, com pequenas regiões de maior compactação na periferia (Figs. 2A e 2B).

Alguns glóbulos bastante elétron-densos, de tamanho variável, mas sempre menores que os cloroplastos, aparecem no citoplasma (Figs. 1B, 1C e 1D).

No citoplasma podem ser vistos muitos ribossomos, associados ao retículo endoplasmático, formando o retículo endoplasmático rugoso (RER), associados à membrana externa do núcleo ou livres no citoplasma (Figs. 1D e 2B). Os ribossomos, livres ou associados ao retículo aparecem tanto na porção mais parietal do citoplasma (Fig. 1C), quanto na porção mais interna, próximos ao vacúolo, rodeando os cloroplastos e principalmente o núcleo (Figs. 1D e 2B).

Raramente são vistos dictiossomos (Figs. 2A e 2B), indicando que sejam em pequeno número nas células do mesofilo dessa espécie. Eles aparecem na porção parietal do citoplasma, abaixo do cloroplasto ou do núcleo e são muito pequenos, formados por 3 ou 4 sáculos.

Várias células apresentam vesículas delimitadas por membranas (Fig. 2B). Essas vesículas não parecem ter relação com os plasmodesmas, podendo estar perto deles ou não.

O vacúolo, único, central e grande, apresenta-se quase sem inclusões particuladas (Figs. 1B e 1D) ou contendo grande quantidade delas (Fig. 2A). Células com vacúolos dos dois tipos acima descritos podem aparecer lado a lado (Figs. 1B e 2A).

2hD - CRA = 81,39% - Fixação Aquosa - (Prancha 3)

Folhas nessa etapa da dessecação não diferem de folhas totalmente hidratadas, na morfologia externa.

Cortes semi-finos transversais mostram células distendidas, mas com uma pequena redução dos espaços intercelulares devido a algumas ondulações das paredes celulares (Fig. 3A). Células buliformes são observadas na face abaxial da folha (Fig. 3A).

O citoplasma é parietal, mas já se pode perceber uma pequena retração em relação à parede celular (Figs. 3B e 3C), onde são observadas pequenas vesículas (Figs. 3B e 3E) sem aparente conteúdo.

Os cloroplastos apresentam um maior número de plastoglóbulos (Fig. 3D) em relação aos cloroplastos das folhas mais hidratadas. Os tilacóides estão melhor definidos nessa fase (Fig. 3E) e os grana podem ser distinguidos em alguns cloroplastos (Fig. 3E).

O núcleo, com forma irregular, apresenta cromatina descondensada, mas sua porção periférica apresenta-se mais densa que a central (Figs. 3B e 3D). Junto ao núcleo observa-se uma estrutura de forma arredondada e de elétron-densidade bastante homogênea, que não pôde ser identificada (N1).

No citoplasma são vistos poucos ribossomos e túbulos do retículo endoplasmático.

10hD - CRA = 81,86% - Fixação Aquosa - (Prancha 4)

A observação da morfologia externa dessas folhas indica pouca alteração em relação a folhas totalmente hidratadas. Nessa fase a lâmina foliar é plana, mas o verde das folhas está ligeiramente pálido.

As células do mesofilo apresentam-se mais próximas umas das outras que as de células com 2hD. Vários espaços intercelulares estão bem reduzidos, mas a folha não apresenta dobras, quando observada em cortes transversais (Fig. 4A).

O citoplasma é parietal, mas apresenta retrações em relação à parede celular (Figs. 4B e 4D), onde se encontram vesículas e

corpos multivesiculares (Fig. 4D), não sendo observada uma relação entre eles e os plasmodesmas presentes.

No interior do citoplasma também são vistas vesículas (Figs. 4B e 4D) partindo para o vacúolo, onde já são vistas várias vesículas pequenas (Fig. 4B), sem aparente conteúdo.

Os cloroplastos estão bem heterogêneos, mesmo dentro de uma mesma célula (Fig. 4D). Dois tipos morfológicos de cloroplastos são descritos nessa fase, para efeito de evidenciar o processo de transformação ultra-estrutural dessa organela durante a perda de água. Atente que eles são cloroplastos em diferentes etapas de transformação em resposta à seca e não "tipos" diferentes de cloroplastos. Alguns cloroplastos (C1) conservam a aparência descrita para células bem hidratadas, são alongados ou lentiformes, com grana pouco visíveis, poucos plastoglóbulos e grãos de amido de tamanho e quantidade variáveis. Outros cloroplastos (C2) são redondos como se estivessem inchados, apresentam grãos de amido de tamanho variável, em geral pequenos e com poucas manchas e seus grana são mais visíveis, na forma de manchas elétron-densas no estroma (Fig. 4e).

Mitocôndrias podem ser vistas próximas aos cloroplastos (Figs. 4C e 4E). As mitocôndrias são redondas ou alongadas e justapostas aos cloroplastos (Fig. 4B), elas têm estrutura interna frouxa, com as invaginações da membrana interna na forma de túbulos dilatados, parecendo pequenas vesículas alongadas, quando vistas em cortes. Ao lado dos cloroplastos observam-se organelas de contorno circular com elétron-densidade homogênea, que provavelmente são peroxissomos (Figs. 4C e 4E).

Nesse núcleo as membranas do envoltório invaginaram-se no ponto adjacente ao nucléolo (Fig. 4B). A cromatina está um pouco densa (Fig. 4B).

Os glóbulos elétron-densos são pouco observados no citoplasma (Figs. 4B e 4C).

Dictiossomos, ainda que raros, podem ser observados (Figs. 4B e 4B "inset"). Os ribossomos são observados em quantidade bem menor que nas células mais hidratadas, associados ao retículo endoplasmático, formando o retículo endoplasmático rugoso (RER)

(Figs. 4C e 4D).

O vacúolo apresenta conteúdo bastante homogêneo, com pouco material particulado (Figs. 4B e 4E), além das vesículas acima citadas.

24hD - CRA = 60,3% - Fixação Aquosa (Prancha 5)

A lâmina foliar não está completamente distendida nessa fase, ela apresenta faixas estreitas longitudinais que estão um pouco retaiadas. A coloração dessas folhas é verde-amarelada, estando amarelas na ponta.

Folhas dessa fase apresentam paredes celulares mais quebradiças.

O mesofilo apresenta espaços intercelulares diminuídos, delimitados por paredes celulares onduladas (Figs. 5A e 5B).

O citoplasma é parietal (Fig. 5A), mas apresenta projeções para o interior da célula (Fig. 5D). O citoplasma, na maior parte, é mais estreito que a parede celular, mas nele se destacam os cloroplastos (Figs. 5B e 5D).

No citoplasma (Fig. 5C) e no vacúolo (Figs. 5B e 5E) aparecem poucos e grandes glóbulos elétron-densos, que chegam a ter o tamanho do cloroplasto (Fig. 5B).

A estrutura em destaque nesta fase é o cloroplasto. Ele é redondo (Figs. 5B e 5D), com pequenas reservas de amido e mais plastoglóbulos que nas fases anteriores (Figs. 5C, 5D e 5E). Os grana não são visíveis e os tilacóides aparecem um pouco frouxos, afastados uns dos outros, chegando a formar espaços entre grupos de tilacóides (Figs. 5C e 5D).

Na figura 5E observa-se um cloroplasto com estrutura bastante diferente das já descritas. Esse cloroplasto tem forma alongada, mas não lentiforme. Os tilacóides estão dispostos aleatoriamente, em todas as direções, formando pequenas vesículas aparentemente sem conteúdo. Esse cloroplasto parietal apresenta grande quantidade de plastoglóbulos, na maioria agrupados.

Na figura 5F temos um detalhe de um cloroplasto redondo, mostrando um espaço formado pelo afastamento dos tilacóides, que

contém uma estrutura membranosa concêntrica, chamada de figura mielínica (f).

As poucas mitocôndrias detectáveis são pequenas e redondas, com cristas pouco visíveis (Fig. 5C e 5D).

A porção parietal do citoplasma contém retículo endoplasmático rugoso (Fig. 5D). Muito poucos ribossomos livres são vistos.

Uma estrutura vesiculada não identificada (N2, Fig. 5E) vista na periferia do citoplasma, para dentro do vacúolo aparenta ter derivado de um grande glóbulo elétron-denso que se vesiculou, ou ser um glóbulo elétron-denso formando vesículas. Esta estrutura é bastante elétron-densa e contém pequenas vesículas com material particulado semelhante ao do vacúolo (Fig. 5E).

Corpos multivesiculares são formados na periferia do citoplasma, em direção ao vacúolo (Figs. 5B, 5C e 5D). Também para dentro do vacúolo são formadas vesículas simples ou contendo apenas uma ou duas outras vesículas em seu interior (Fig. 5B e 5D).

O vacúolo, ocupando quase todo o espaço intracelular, apresenta um conteúdo heterogêneo: muito material particulado (Fig. 5D), corpos multivesiculares (Fig. 5C), vesículas simples (Fig. 5B), vesículas com conteúdo semelhante ao do vacúolo (Fig. 5B), vesículas irregulares contendo material elétron-denso homogêneo (Fig. 5B) e grandes glóbulos elétron-densos (Fig. 5B).

2dD - CRA = 15,5% - Fixação Aquosa (Prancha 6)

Folhas de plântulas observadas nessa fase apresentam cor amarela-esverdeada. A lâmina foliar apresenta-se retraída em largura, com faixas longitudinais de retração mais evidentes que em 24hD.

Corte transversal de uma folha, observado ao microscópio fotônico, mostra que a retração da lâmina foliar ocorre em regiões onde as células da epiderme não têm paredes espessadas e onde não há fibras sub-epidérmicas (Fig. 6A). As células do mesofilo estão bem próximas umas das outras, com espaços

intercelulares bastante reduzidos e paredes celulares muito deformadas nas regiões entre epidermes não espessadas. Nas regiões do mesofilo cujas epidermes adaxial e abaxial têm paredes espessadas e apresentam fibras sub-epidérmicas, as paredes celulares das células do mesofilo estão um pouco onduladas e os espaços intercelulares ainda são vistos, mas são menores que nas folhas hidratadas (Fig. 6A). O interior das células do mesofilo está totalmente ocupado por porções globulares de citoplasma e vesículas (Fig. 6A).

Observadas ao MET, as células do mesofilo estão com as paredes celulares onduladas e com dobras (Figs. 6B e 6C). O citoplasma encontra-se deslocado em direção ao centro da célula, afastado da parede celular, mas preso a ela em alguns pontos. Nesses locais de ligação não foi possível observar nenhuma relação entre citoplasma e plasmodesmas ou com o citoplasma das células vizinhas, não havendo indicação que os locais onde porções ou fios de citoplasma permaneceram ligados à parede celular sejam pré-estabelecidos ou mesmo fixos (Fig. 6B).

Em certos locais onde as paredes estão dobradas, é possível encontrar porções do citoplasma confinadas em espaços muito pequenos (Fig. 6C), onde o citoplasma apresenta pequenas vesículas e pequenos glóbulos elétron-densos.

O aspecto globular e vacuolado do citoplasma observado ao microscópio fotônico é confirmado por observações ao MET. Esse aspecto é devido a muitos pequenos vacúolos, sem aparente conteúdo, pequenas vesículas contendo um material constituído de partículas finas e pequenas e a mitocôndrias e cloroplastos, que já apresentam morfologia bastante modificada em relação ao estado hidratado, mas ainda identificáveis (Fig. 6D).

Os cloroplastos são grandes e redondos, têm um estroma finamente particulado, não apresentam tilacóides, apresentam muitos plastoglóbulos e pequenas vesículas, contendo material particulado fino, menos denso que o do estroma (Figs. 6D). A membrana delimitante externa do cloroplasto mantém-se praticamente intacta, mas a membrana interna apresenta-se descontínua.

Algumas das vesículas que aparecem no citoplasma são mitocôndrias em processo de desorganização de suas cristas, elas têm forma redonda e apresentam poucas cristas curtas (Fig. 6D).

No citoplasma aparecem glóbulos elétron-densos de vários tamanhos, reforçando o aspecto multi-vesiculado da célula (Figs. 6B, 6C e 6D). Esses glóbulos elétron-densos têm tamanhos variados, mas geralmente não ultrapassam $1,4\mu\text{m}$, que corresponde a menos da metade do tamanho dos cloroplastos, $3,5$ a $4,6\mu\text{m}$ (Fig. 6D).

Outras organelas não foram identificadas no citoplasma e o núcleo não foi observado nesses cortes.

3dD - CRA = 7,9% - Fixação Não Aquosa (Prancha 7)

Folhas dessa fase de dessecação apresentam cor amarela escura e a lâmina bem retraída na largura.

O aspecto de folha já bem retraída pode ser notado no corte semi-fino transversal (Fig. 7A). Nessa fase a folha apresenta retrações em determinadas regiões, onde a epiderme não é espessada e não há fibras sub-epidérmicas e mantém-se distendida nas faixas longitudinais onde há o espessamento de paredes das células epidérmicas e as fibras sub-epidérmicas. As regiões reforçadas geralmente são mais extensas na face adaxial que na face abaxial, direcionando o enrolamento da folha, que ocorre de forma a deixar exposta a face adaxial. Nas áreas menos deformadas encontram-se os feixes vasculares.

Ao nível de resolução do microscópio fotônico é possível observar uma alteração na estrutura do citoplasma dessa fase de dessecação. Ele aparece compacto e distanciado da parede celular (Fig. 7A), em contraste com a imagem obtida para 2dD, onde o citoplasma ocupava quase todo o espaço intracelular disponível. Em 3dD ele passa a ocupar a porção central da célula, mas mantém-se ligado à parede celular por meio de porções estreitas ou fios citoplasmáticos (Fig. 7B).

As paredes das células que estão nas regiões de retração da folha ficam sinuosas e dobradas (Figs. 7B e 7D). Apesar de

dobradas, as paredes de células adjacentes mantêm-se justapostas e não se rompem (Fig. 7D), elas só se afastam nos locais onde haviam espaços inter-celulares quando a célula estava hidratada (Fig. 7D). Os poucos espaços intercelulares que ainda aparecem nessa fase são bem reduzidos e delimitados por paredes onduladas ou dobradas (Fig. 7D).

O espaço formado entre o citoplasma e a parede apresenta granulações finas em maior ou menor quantidade (Figs. 7B, 7C e 7D).

Nas regiões da folha onde o mesofilo sofreu menor alteração mecânica, as paredes dessas células apresentam-se onduladas, mas com bem poucas dobras. Os espaços intercelulares estão reduzidos (Fig. 7A).

Alguns plasmodesmas podem ser observados nas paredes celulares, mas não foi detectada a presença de material citoplasmático em trânsito através deles (Fig. 7C).

O citoplasma está muito retraído em relação à parede, tanto nas células das regiões de dobramentos das folhas, quanto nas células das regiões em que a folha está menos deformada. Ao MET observa-se o citoplasma compacto na área central e mais frouxo na periferia, por onde se prende à parede em certos pontos (Fig. 7B). Essa compactação do material citoplasmático (Figs. 7C e 7D) contrasta com a vesiculação observada em 2dD (Figs. 6C e 6D).

Porções estreitas do citoplasma projetam-se da porção central, mais compacta, para a parede celular, como fios (Fig. 6b) ou como porções vesiculadas (Fig. 7B). O ponto de ligação do citoplasma à parede celular corresponde a uma justaposição dessas duas porções, sem estruturas especiais, como invaginações ou dobras que identifiquem o local de contato como específico ou fixo (Figs. 7C e 7D).

Somente a porção periférica do citoplasma apresenta vesículas. Elas contêm uma granulação extremamente fina ou não apresentam conteúdo detectável pelas técnicas rotineiras de contrastação para o MET. A delimitação dessas vesículas periféricas não é feita por membranas típicas, mas por uma espessa camada de citoplasma, delimitada internamente por uma

camada mais densa (comparar a figura 7B dessa fase com a figura 6B, de 2dD, onde se observa membrana típica).

A parte mais condensada do citoplasma aparenta, à microscopia fotônica e em baixos aumentos da MET, aspecto de uma massa desorganizada e composta por material com densidade heterogênea nas diferentes regiões (Figs. 7A e 7B). As membranas plasmáticas dessas células, não são detectadas como estruturas elétron-densas, mesmo quando observadas em aumentos maiores (Fig. 7D).

Dada a maior compactação do citoplasma nessa fase, a identificação das organelas é difícil. As estruturas remanescentes das organelas aparecem como massas arredondadas de material citoplasmático, individualizadas pela diferença de densidade e por estreitos espaços elétron-lúcidos, não contínuos em toda a volta dos remanescentes de organelas. Essas delimitações elétron-lúcidas podem ser membranas contrastadas negativamente ou serem o resultado da retração das organelas no processo de dessecação (Figs. 7C e 7D). Deve-se notar que o desaparecimento das membranas como estruturas elétron-negativas coincidiu com a mudança do tipo de fixador utilizado, do aquoso para o não aquoso.

Os cloroplastos (Fig. 7C) dessa fase apresentam morfologia pouco alterada em relação aos de 2dD, mas apresentam-se em imagem negativa (i.e., as estruturas que apareciam em preto, até então, agora aparecem em branco) quando comparados aos cloroplastos da fase de 2dD (Fig. 6D).

Pode-se sugerir a presença do núcleo, como uma estrutura mais homogênea e coesa entre as outras estruturas do citoplasma, delimitado por uma estreita faixa elétron-lúcida não contínua. Em seu interior, o nucléolo aparece como uma mancha mais elétron-densa (Fig. 7C).

Glóbulos elétron-densos não foram observados em células do mesofilo dessa fase de dessecação. Na periferia do citoplasma aparecem pequenas granulações elétron-densas (Figs. 7C e 7D).

Com exceção dessa granulação periférica, o contraste do citoplasma, como um todo, é baixo nesta fase, a elétron-densidade

é mais homogênea que nas fases anteriores.

4dD (CRA = 6,4%), 5dD (CRA = 4,9%) e 6dD (CRA = 0%) -
Fixação Não Aquosa (Prancha 8)

Plântulas com 4, 5 e 6dD apresentam morfologia externa semelhante. Estão muito retraídas na largura e enroladas no sentido do eixo maior da folha. A cor dessas folhas é marrom-pardo-azulado.

A nível de microscopia fotônica, não se notam diferenças entre folhas com 4, 5 e 6 dias de dessecação (Figs. 8A, 8C e 8D, respectivamente). Elas estão deformadas, mantendo mais distendidas as porções correspondentes a células epidérmicas com paredes espessadas e com fibras sub-epidérmicas, enquanto as porções correspondentes a células epidérmicas com paredes não espessadas estão bastante retraídas (Figs. 8A, 8C e 8D).

Células do mesofilo de X. plicata com 4, 5 e 6 dias de dessecação não apresentam diferenças, quando observadas ao MET.

As paredes destas células estão deformadas e dobradas e é possível observar material citoplasmático nos pequenos espaços entre as dobras (Fig. 8B, que corresponde a 4dD).

O citoplasma está afastado da parede celular, retraído para o interior da célula e possui uma região central mais compacta e uma região periférica menos densa, por onde se mantém ligado à parede (Figs. 8A, 8C e 8D). Ele é composto por material heterogêneo, com porções mais e menos elétron-densas. Na periferia, são observadas vesículas pequenas, delimitadas por um material mais elétron-denso, que não pôde ser identificado sem dúvidas como sendo membrana típica e contínua (Fig. 8B).

7dD (CRA = 12,1%), 8dD (CRA = 3,7%) e 9dD (CRA = 0%) -
Fixação Não Aquosa (Prancha 9)

Em termos de morfologia externa, essas folhas não diferem das folhas com 4, 5 e 6dD.

O aspecto das células do mesofilo com 7, 8 e 9 dias de dessecação (Figs. 9A, 9C e 9E, respectivamente), observadas ao microscópio fotônico é semelhante ao de células com 4, 5 e 6dD.

Ao MET, observa-se que aos 7dD o citoplasma é formado por porções de material que se mantém coesas, mas distintas umas das outras, formando estruturas de contorno arredondado, com elétrondensidades semelhantes (Fig. 9B). Essas estruturas são remanescentes das organelas, que estão separadas por faixas elétron-lúcidas descontínuas, que podem ter se originado de retrações entre as organelas ou serem membranas vistas em imagem negativa (Fig. 9B).

No espaço entre o citoplasma retraído e a parede celular, em 8dD (Fig. 9D), observam-se vesículas, aparentemente vazias, que são delimitadas por membranas elétron-densas. Só nestas estruturas puderam ser vistas membranas elétron-densas, no resto do citoplasma as estruturas individualizam-se por faixas elétron-lúcidas descontínuas (Fig. 9D).

Nessa célula de 7dD são observados espaços elípticos e elétron-lúcidos dentro de porções citoplasmáticas de contorno circular (Fig. 9B), essa morfologia sugere que sejam os locais onde haviam grãos de amido. As regiões citoplasmáticas de contorno circular, onde são vistos os grãos de amido, são remanescentes de cloroplastos, numa fase avançada do processo de alteração ultra-estrutural dessa organela em resposta à dessecação (acompanhe o processo pela seguinte sequência de eletromicrografias: Figs. 1D, 4D, 5D, 6D, 9B, 9D e 9F). Em 8dD os remanescentes de cloroplastos são semelhantes aos encontrados em 7dD, mas apresentam plastoglóbulos (Fig. 9D).

Nos remanescentes de cloroplastos de 9dD não são observadas estruturas com a forma de grãos de amido, mas sim pequenas vesículas elétron-lúcidas (Fig. 9F) que se assemelham às observadas em 2dD (fig. 6D).

Em 8dD foi observado um núcleo, mas não foi possível observar suas membranas delimitantes (Fig. 9D). Ele está com a cromatina homogeneamente descondensada.

Nas células com 8dD (Fig. 9D) são vistos glóbulos elétron-densos, não observados em células de 7dD e 9dD (Figs. 9B e 9F, respectivamente). Os glóbulos elétron-densos têm tamanho variado, mas são pequenos em relação aos observados em 24hD (Fig. 5D) e 2dD (Fig. 6D), não ultrapassando cerca de $0,82\mu\text{m}$, o que corresponde a cerca de 1/3 do tamanho dos remanescentes dos cloroplastos, que têm aproximadamente $2,82\mu\text{m}$ (Fig. 9D).

O citoplasma de células do mesofilo com 9dD (Fig. 9F) apresenta-se ainda mais desorganizado. Como em 7dD, não são observados glóbulos elétron-densos. Remanescentes de cloroplastos são estruturas grandes, de contorno circular (Fig. 9F). Em 9dD não são observadas membranas em contraste positivo, nem na periferia do citoplasma (Fig. 9F), como puderam ser observadas em 8dD (Fig. 9D).

Revivescência

0hR - CRA = 1,7% - Fixação Não Aquosa (Pranchas 10 e 11)

Folhas viáveis de Xerophyta plicata, dessecadas há cerca de 15 dias, apresentam-se estreitas, enroladas no sentido longitudinal e de cor marrom azulada.

Em cortes semi-finos notam-se regiões onde as células epidérmicas têm paredes espessadas e fibras sub-epidérmicas. Entre elas observam-se porções do mesofilo onde as células têm paredes celulares deformadas ou dobradas e espaços intercelulares reduzidos em relação a folhas hidratadas (Fig. 10A). Regiões intercaladas com as acima citadas, apresentam epiderme não espessada e correspondem às porções mais retraídas da folha, onde as células do mesofilo têm paredes celulares muito deformadas e dobradas e são vistos poucos e pequenos espaços intercelulares (Fig. 10A).

As paredes celulares estão bastante deformadas e dobradas (Figs. 10B e 10D). Elas estão quebradiças, rompendo-se facilmente quando o material é seccionado para a observação ao MET. Nelas

podem ser vistos plasmodesmas, inclusive com material denso ao longo da estrutura (Fig. 11B).

O citoplasma das células do mesofilo (em toda a extensão da folha) apresenta-se retraído da parede celular e condensado na porção central da célula, mantendo-se ligado à parede por porções menos condensadas de citoplasma (Figs. 10A e 10B).

O espaço ocupado pelo citoplasma dentro dos limites da célula é pequeno. Ele se compõe de uma parte mais condensada central e projeções periféricas estreitas, como fios, ou mais largas, frouxas e vesiculadas, que mantêm o citoplasma em contato com a parede celular (Fig. 10B, 10C, 10D e 11A).

Na porção central do citoplasma, mais condensada, aparecem estruturas elétron-densas pequenas, semelhantes a plastoglóbulos, que se distribuem em estruturas citoplasmáticas redondas, individualizadas por faixas elétron-densas não contínuas, que são provavelmente os remanescentes dos cloroplastos (Fig. 10D). Em alguns dos remanescentes de cloroplastos, puderam ser observadas estruturas elétron-lúcidas com a forma de grãos de amido muito pequenos (Fig. 10D). A esse nível de dessecação, as estruturas citoplasmáticas estão muito pouco definidas.

Nessas células aparecem faixas elétron-lúcidas estreitas separando porções do citoplasma (Fig. 10D). A delimitação é ainda menos nítida que nas células de 3dD, onde a fixação também foi não aquosa (Fig. 7D).

Mitocôndrias e outras estruturas sub-celulares não mencionadas não puderam ser identificadas nessa fase, onde o citoplasma está ainda mais condensado e menos diferenciado que em 9dD.

O núcleo pode ser identificado como uma estrutura arredondada, de contorno bastante irregular e de elétron-densidade mais homogênea que o resto do citoplasma (Figs. 10C e 10D). Ele é identificado como uma região mais homogênea no citoplasma, onde se destaca apenas o nucléolo, por ter elétron-densidade um pouco maior que a do citoplasma, porém mais fraca que a dos glóbulos elétron-densos (Fig. 10C). A delimitação do núcleo é dada por uma faixa elétron-lúcida bastante descontínua e

pela ausência de plastoglóbulos, presentes nas outras partes do citoplasma (Fig. 10C e 10D).

Na periferia do citoplasma são observados glóbulos elétrondensos, de contorno arredondado ou alongado, que têm a porção central mais elétrondensa que a periférica (Figs 10D e 11C).

Como em 3dD, em 0hR a porção periférica do citoplasma que é vesiculada não apresenta membranas típicas delimitando as vesículas, mas faixas de material citoplasmático que os circundam (Figs. 10C e 11C). Essas faixas citoplasmáticas podem ser pouco densas e pouco diferenciadas do resto de citoplasma ou mais densas que o resto do citoplasma (Fig. 11C).

O interior das vesículas apresenta pouco material particulado, que, visto em aumento um pouco maior, aparece como vesículas menores (Fig. 11C) que são formadas nas margens internas das vesículas que as contém.

1hR - CRA = 10,7% - Fixação Não Aquosa (Prancha 12)

O aspecto morfológico externo dessas folhas é semelhante ao de folhas com 0hR, descritos acima.

Cortes transversais das folhas, observados ao microscópio fotônico têm aspecto bastante semelhante ao de folhas totalmente dessecadas (comparar Figs. 12A e 10A). As regiões do mesofilo correspondentes a epidermes não espessadas estão bastante retraídas, e as células têm paredes bem deformadas e dobradas. Os espaços inter-celulares (Fig. 12A) são menores que os do mesofilo de plântulas hidratadas. Nas regiões onde a epiderme é espessada, o mesofilo se apresenta menos deformado.

As paredes celulares apresentam-se pouco rompidas, contínuas e onduladas ou dobradas (Fig. 12D), como em 0hR (Figs. 10A e 10B). No espaço formado entre a parede celular e o citoplasma pode haver material particulado (Fig. 12C) ou não (Fig. 12D).

Em todas as células observadas o citoplasma aparece bem retraído da parede celular e condensado, permanecendo ligado à parede celular por meio de projeções estreitas ou largas (Fig. 12A, 12B e 12D).

Nessa fase, o citoplasma é visto como um conjunto de porções citoplasmáticas de diferentes densidades eletrônicas (Fig. 12D), havendo um maior contraste entre suas diferentes porções, em relação ao que se observava em 0hR.

Além de porções periféricas do citoplasma, que já vinham se apresentando vesiculadas, a porção central do citoplasma passa a apresentar vesículas de diferentes tamanhos (Fig. 12B).

Não são encontradas membranas elétron-positivas delimitando as organelas no citoplasma, que continua sendo dividido em porções por estreitas faixas elétron-lúcidas (Figs. 12B, 12C e 12D).

Sugere-se a presença do núcleo (Fig. 12D), como uma área mais homogênea que o restante do citoplasma, apresentando um nucléolo.

Glóbulos elétron-densos, maiores que as estruturas encontradas dentro dos vacúolos, são observados no citoplasma (Fig. 12B e 12D).

Uma característica que faz esta fase diferir da anterior é que as vesículas passam a apresentar membranas elétron-densas (Figs. 12B e 12D). As membranas das vesículas não estão propriamente as delimitando, mas sim contidas dentro delas, às vezes as atravessando, como se formassem vesículas menores em seu interior (Fig. 12B, seta). Além de membranas, algumas vesículas contém material particulado (Fig. 12B). Pequenas vesículas da porção central do citoplasma contém estruturas globulares elétron-densas (Fig. 12C).

2hR - CRA = 11,1% - Fixação Não Aquosa (Prancha 13)

Ainda não se detecta nenhuma alteração na morfologia externa dessas folhas, em relação às folhas mais dessecadas.

A lâmina foliar de plântulas com 2hR apresenta deformações longitudinais, correspondentes às faixas onde as células epidérmicas não têm paredes espessadas. Onde ocorrem células epidérmicas com paredes espessadas e fibras sub-epidérmicas a lâmina foliar está menos deformada (Fig. 13A).

No mesofilo dessas plantas, as células continuam bastante deformadas e as paredes bastante onduladas e dobradas, com espaços intercelulares pequenos (Figs. 13A e 13B), principalmente nas áreas correspondentes a epidermes não espessadas (Fig. 13A). Nas regiões com epiderme espessada, o mesofilo apresenta células com paredes mais distendidas, pouco onduladas e com poucas dobras. Os espaços intercelulares, porém, permanecem bastante reduzidos (Fig. 13A).

Nas regiões de maior deformação das células do mesofilo, podem ser observadas grandes dobras nas paredes celulares (Fig. 13B).

O citoplasma está afastado da parede celular, retraído na porção central da célula (Figs. 13A e 13B). Nessa fase, células adjacentes podem apresentar citoplasmas com diferentes graus de compactação. Células com citoplasma pouco compacto podem aparecer ao lado de células com citoplasma ainda compacto (Fig. 13C).

Ainda são observados grandes espaços de retração entre o citoplasma e as paredes celulares (13B, 13C e 13E). O citoplasma mantém-se ligado à parede celular mais por porções largas e vacuolizadas que por porções estreitas de citoplasma (Figs. 13B e 13C). Em algumas células o citoplasma passa a ocupar uma posição mais periférica na célula (Fig. 13C).

Nas várias células onde o citoplasma já está menos compacto, é possível identificar algumas organelas com maior facilidade, em relação às células de plântulas mais dessecadas.

Estruturas elétron-densas pequenas podem ser vistas em grande quantidade no citoplasma (Figs. 13B, 13D e 13E). Essas estruturas são provavelmente plastoglóbulos, observados dentro de estruturas de contorno circular, remanescentes de cloroplastos, agora iniciando o processo de reorganização (Fig. 13D). Pequenos grãos de amido são observados em algumas células (Figs. 13C e 13D), dentro dos remanescentes de cloroplastos.

O núcleo pode ser visto com a cromatina frouxa e o nucléolo bem compacto (Fig. 13D).

Nas células dessa fase de re-hidratação poucas membranas elétron-densas podem ser vistas. Elas aparecem na periferia do

citoplasma, na periferia de algumas vesículas (Fig. 13D) ou como pequenas vesículas no interior das vesículas anteriormente citadas (Fig. 13E). Não são observadas mais as estreitas faixas elétron-lúcidas que delimitavam porções do citoplasma. É interessante notar que ao redor das porções citoplasmáticas, onde as faixas elétron-lúcidas eram observadas, agora são vistas vesículas de diferentes tamanhos (Fig. 13D). O citoplasma está menos compactado.

Dentro de pequenos vacúolos são observadas estruturas elétron-densas que se assemelham a vários pequenos glóbulos anastomosados (Fig. 13C, seta).

4hR - CRA = 21,4% - Fixação Não Aquosa (Pranchas 14 e 15)

Folhas dessa etapa da re-hidratação continuam enroladas e de cor marrom-azulada.

Cortes semi-finos transversais mostram que as folhas ainda estão bem deformadas nas regiões onde a epiderme não é espessada e menos deformadas onde as paredes das células epidérmicas são espessadas (Fig. 14A).

As paredes celulares estão onduladas e as vezes dobradas (Figs. 14B e 14C).

A nível fotônico, o citoplasma continua retraído em relação à parede celular, apresentando uma porção central bem condensada e uma porção periférica mais frouxa (Fig. 14A).

O espaço de retração, formado entre a parede celular e o citoplasma, aparenta estar vazio, quando observado ao microscópio fotônico (Fig. 14A). Ao MET, no entanto, notam-se nesse espaço vesículas delimitadas por uma ou duas membranas, de diversos tamanhos e de forma arredondada ou alongada, além de material finamente particulado, que aparece dentro e fora dessas vesículas (Figs. 14B e 14C). Em alguns pontos é possível observar que as membranas delimitantes dessas vesículas são formadas no citoplasma e projetadas para esse espaço (Fig. 14B).

Apesar da ocupação do espaço de retração por vesículas, dando a impressão de descompactação ao citoplasma, este, na

verdade, aparece mais compacto nessas células de 4hR (Fig. 14B) que o citoplasma de 2hR (fig. 13B).

O citoplasma de algumas células apresenta vesículas, mesmo na sua porção central, mais condensada (Fig. 14B e 14C). Essas vesículas têm limites nítidos e estreitos (Figs. 14C, 14D e 14E), que geralmente não são dados por membranas típicas. Em alguns vacúolos periféricos as membranas podem ser responsáveis pela delimitação da estrutura (Fig. 14B), mas em muitos vacúolos do interior do citoplasma não foram vistas membranas (Figs. 14D e 14E).

No restante do citoplasma não ocorrem membranas. Ele é constituído por material que se dispõe em porções coesas, individualizadas pelos diferentes níveis de compactação e elétron-densidade (Figs. 14C, 14D e 14E) e pelas estreitas faixas elétron-lúcidas que voltam a ser observadas nessa fase (Figs. 14D e 14E).

Os cloroplastos redondos tornam a ser delimitados por faixas elétron-lúcidas (Figs. 14C e 14D) como em 0hR (Fig. 10C).

Não foi possível observar ou distinguir núcleo nas células desta fase de revivescência.

O número de glóbulos elétron-densos presentes no citoplasma aumentou bastante nessa fase (Figs. 14B, 14E e 15A). Alguns são observados no citoplasma, sem aparente relação com outras estruturas e outros estão no meio ou na porção periférica de vesículas da porção central do citoplasma (Figs. 14E e 15A) e emitem finas projeções.

Externamente a algumas vesículas aparecem pontos elétron-densos, acompanhando seu contorno. Eles são provavelmente ribossomos, que voltam a ser observados (Fig. 14E).

Em uma das células é possível observar uma grande vesícula com dois glóbulos elétron-densos internos e periféricos (Fig. 15A), que emitem para o interior da vesícula uma quantidade muito grande de membranas, de forma enovelada (Figs. 15A e 15B). Essa vesícula é bastante grande, ocupando grande parte do citoplasma, desde sua porção central até a periferia da célula. O limite dessa vesícula é uma estreita faixa de citoplasma e membrana

delimitante (Fig. 15A, cabeça de seta). Em aumento maior, notam-se pontos elétron-densos sobre as membranas que estão junto ao glóbulo elétron-denso (Fig. 15B).

10hR - CRA = 25% - Fixação Aquosa (Prancha 16)

As folhas começaram a se desenrolar com 8hR. Com 10hR já estão desenroladas, mas ainda retraídas na largura. Sua cor ainda é marrom-azulada.

A folha observada em corte transversal apresenta-se retraída nas áreas onde a epiderme não é espessada (Fig. 16A). As paredes celulares ainda estão onduladas ou deformadas, mas apresentam poucas dobras (Fig. 16B).

A maior diferença entre esta fase e as fases que a antecedem na revivescência, é o citoplasma ocupar todo o volume da célula (Figs. 16A e 16B). O citoplasma não se apresenta mais dividido em uma porção central mais compacta e uma porção periférica vesiculada. Ele agora está totalmente ocupado por estruturas globulares e vesículas grandes (Figs. 16A, 16B, e 16C). Novamente chama-se atenção para o fato de que a volta da densidade eletrônica positiva das membranas coincide com a troca do tipo de fixador utilizado, do não aquoso para o aquoso.

No citoplasma já são identificadas quatro organelas: cloroplastos (Figs. 16B, 16C, 16D e 16E), mitocôndrias (Figs. 16D e 16E), núcleo (Figs. 16C e 16D) e ribossomos livres (Figs. 16D e 16E).

O cloroplasto é a segunda maior organela observável nessa fase de revivescência, após o núcleo. Nessa fase ele é redondo, delimitado por duas membranas (Figs. 16D e 16E, cabeça de seta) e contém muitas pequenas vesículas, de conteúdo elétron-lúcido ou de densidade eletrônica igual a do citoplasma, além de alguns plastoglóbulos (Figs. 16D e 16E). As vesículas são distribuídas aleatoriamente dentro dos cloroplastos e delimitadas por membranas elétron-positivas (Figs. 16D e 16E). Os cloroplastos de 10hR têm bem menos plastoglóbulos (Fig. 16D) que os de 2hR (Fig. 13D) e neles ainda não são observados tilacóides.

As mitocôndrias são facilmente identificadas, sendo pequenas, redondas e delimitadas por duas membranas (Fig. 16D, cabeça de seta). Em algumas mitocôndrias, a membrana interna já forma uma ou duas pequenas cristas (Fig. 16D, seta).

O núcleo tem elétron-densidade maior ou igual à dos cloroplastos e maior que a das outras organelas (Figs. 16C e 16D) sendo caracterizado por seu envoltório nuclear, composto por duas membranas delimitantes (Fig. 16D, cabeça de seta). Ele tem cromatina descondensada. Não foi observado nucléolo nesses cortes.

Poucos glóbulos elétron-densos (Figs. 16B, 16D e 16E), menores que as mitocôndrias e com diâmetro maior em torno de 1µm (Figs. 16D e 16E) são vistos nessa fase. A maioria aparece na periferia externa de vacúolos (Fig. 16B), mas outros estão no citoplasma, não diretamente ligados a vacúolos (Fig. 16D e 16E).

12hR - CRA = 23,4% - Fixação Aquosa (Pranchas 17 e 18)

Nessa etapa da re-hidratação as folhas estão quase totalmente distendidas e sua cor, desde cerca de 11hR começou a clarear e agora é amarelada.

O aspecto de cortes transversais de folhas de X. plicata com 12hR (Fig. 17B) é semelhante ao de folhas hidratadas (Fig. 1A), sem dobras, retrações ou deformações, apresentando células distendidas. As paredes celulares têm poucas ondulações e nenhuma dobra. Espaços intercelulares grandes (Fig. 17B) são observados por todo o mesofilo, correspondente a epiderme espessada ou não espessada. Note um o traqueíde de transfusão na figura 17B.

Na camada epidérmica, o aspecto do citoplasma ainda é semelhante ao encontrado no mesofilo durante as fases intermediárias da re-hidratação, com o citoplasma bem vesiculado (Fig. 17A). Nessa mesma fase, a maior parte das células do mesofilo já apresenta citoplasma parietal (Figs. 17A, 17B e 17C).

Plasmodesmas podem ser vistos nas paredes celulares (Fig. 18A). De ambos os lados dos plasmodesmas podem ser vistos túbulos do retículo endoplasmático com ribossomos associados (Fig. 18A).

O citoplasma da maioria das células é parietal (Figs. 17B e 17C), mas não é tão estreito quanto o de células totalmente hidratadas (comparar com Fig. 1B).

Os cloroplastos são parietais e lentiformes (Figs. 17C, 17D, 17E e 17E). Eles apresentam poucos tilacóides, nenhum granum e nenhum, um ou dois pequenos grãos de amido. Ainda são observadas pequenas vesículas no estroma do cloroplasto (Fig. 18B). Os tilacóides observados em cloroplastos de 12hR estão em processo de reorganização. Eles parecem ter origem na união de vesículas achatadas, como se formassem um colar de túbulos unidos ponta-a-ponta (Fig. 18B). Os plastoglóbulos são vistos em quantidade variável nos cloroplastos (Figs. 17D, 17E e 18B).

Em uma mesma célula podem ocorrer cloroplastos mais organizados, lentiformes e com tilacóides em processo de reorganização e cloroplastos ainda desorganizados, redondos, contendo pequenas vesículas (Fig. 17D).

Mitocôndrias de contorno alongado ou redondo aparecem junto aos cloroplastos (Figs. 17D e 18B). Elas apresentam as invaginações da membrana interna dilatadas (Fig. 18B).

O núcleo, de forma arredondada, mais regular, ocupa uma posição periférica, mas projeta-se para a porção central da célula, em direção ao vacúolo. A cromatina está descondensada (Figs. 17C, 18A e 18B) e o nucléolo é grande (cerca de 1 μ m de diâmetro) e compacto (Figs. 17c e o mesmo em maior aumento na 18B).

Glóbulos elétron-densos de tamanhos variados, até 0,8 μ m de diâmetro, menores que os cloroplastos (Figs. 17C e 17E), são vistos pelo citoplasma. Não se observa associação entre eles e qualquer organela ou sistema membranoso da célula (Figs. 17C e 17E).

Na faixa de citoplasma periférica ao núcleo podem ser vistos muitos túbulos do retículo endoplasmático rugoso (Figs. 18A e 18B) e também pequenos grupos de ribossomos livres (Fig. 18B).

Na porção parietal do citoplasma também se observa grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso (Fig. 18A).

A parte central da célula é ocupada por um ou mais de um vacúolo (Fig. 17C), de tamanho grande, separados por membranas e estreitas faixas de citoplasma (Figs. 17C e 17E). Os vacúolos, agora em pequeno número e de tamanho grande, ocupam grande parte do volume da célula. Eles apresentam conteúdos com diferentes densidades de material particulado (Fig. 17C, comparar a célula da direita com as células de esquerda, Fig. 17D, com conteúdo muito particulado).

24hR - CRA = 33,5% - Fixação Aquosa (Prancha 19)

Folhas já totalmente distendidas, com a lâmina foliar plana passam a apresentar coloração amarela-esverdeada.

Em corte transversal, as folhas estão totalmente distendidas, sem regiões deformadas e sem enrolamento (Fig. 19A). O mesofilo está homogêneo, com células expandidas nas partes correspondentes a epiderme com paredes espessadas ou não. Há espaços intercelulares entre as células (Fig. 19A). O citoplasma resume-se a uma faixa parietal muito estreita, onde se evidenciam os cloroplastos, alguns glóbulos elétron-densos maiores e o núcleo (Figs. 19A, 19B e 19C).

As paredes celulares praticamente não apresentam ondulações (Fig. 19B). Nelas podem ser vistos plasmodesmas (Fig. 19B).

Os cloroplastos são lentiformes e parietais (Figs. 19B, 19C, 19D e 19E) não mais apresentando vesículas arredondadas em seu interior. Os tilacóides aparecem em maior quantidade (Figs. 19D e 19E), mas ainda estão em formação, pela fusão ponta-a-ponta de pequenas vesículas achatadas (Fig. 19E). Essas vesículas são provavelmente as mesmas que apareceram, ainda com contorno circular, em 10hR (Prancha 16).

Um ou dois grãos de amido lentiformes, com 1,16 a 1,7 μ m de diâmetro maior, são observados nos cloroplastos, ocupando até a metade do volume da organela. Esses grãos de amido são maiores que os observados em 12hR, com até 0,67 μ m de diâmetro maior (Figs. 15c, 15e e 15f).

Em vários cloroplastos aparecem muitos plastoglóbulos, organizados espacialmente em curtas fileiras dispostas lado a lado, entre tilacóides em desenvolvimento (Figs. 19B, setas e 19C, em imagem negativa, pois foram extraídos na preparação do material para a MET)

As mitocôndrias têm contorno alongado (Fig. 19D) ou circular (Figs. 19C e 19D) e estão justapostas aos cloroplastos. Elas têm uma organização interna onde as cristas são frouxas, um pouco dilatadas, parecendo pequenas vesículas que ocupam grande parte da matriz (Fig. 19D).

No núcleo de células do mesofilo com 24hR distingue-se claramente a delimitação pelas duas membranas do envoltório nuclear (Fig. 19C). A membrana externa do envoltório nuclear apresenta continuidade com um túbulo do retículo endoplasmático rugoso (Fig. 19C, cabeça de seta). A cromatina está descondensada e bastante homogênea (Fig. 19C).

Glóbulos elétron-densos de tamanhos bastante variados são observados ao longo do citoplasma (Figs. 19B, 19D e 19E). Não foi observada relação direta entre eles e outros componentes das células.

O retículo endoplasmático rugoso distribui-se por todo o citoplasma, junto à parede celular ou entre as organelas e o vacúolo (Figs. 19C e 19D). Vesículas de diâmetro semelhante ao dos túbulos do retículo endoplasmático são observadas entre o cloroplasto e a parede celular (Fig. 19E).

Cada célula apresenta agora apenas um vacúolo central, que ocupa a maior parte do volume da célula, comprimindo o citoplasma para a periferia e conferindo turgor à célula. O vacúolo de algumas células apresenta conteúdo muito fino, quase homogêneo (Figs. 19B, 19D e 19E) e em outras células tem conteúdo muito particulado (Fig. 19C). Algumas vesículas podem ser observadas no citoplasma, próximas ao vacúolo (Fig. 19C).

2dR - CRA = 46,3% - Fixação Aquosa (Prancha 20)

As folhas dessa fase de re-hidratação não diferem, pela morfologia externa, de folhas totalmente hidratadas. Elas são verdes e apresentam lâmina foliar distendida e plana.

Paredes celulares bem distendidas, sem ondulações ou dobras e o citoplasma parietal, com um grande vacúolo central são características de células hidratadas, apresentadas pelo mesofilo de X. plicata aos dois dias de revivescência (Fig. 20A).

Voltam a ser observados no mesofilo espaços intercelulares grandes, delimitados por paredes celulares distendidas (Figs. 20B e 20C). As paredes apresentam plasmodesmas.

Em algumas células o citoplasma não está completamente parietal, projetando-se em direção à porção central da célula, onde está o vacúolo (Fig. 20C). Também são observadas vesículas entre o citoplasma e o vacúolo (Figs. 20B e 20D).

No citoplasma, parietal, notam-se glóbulos elétron-densos de tamanhos variando entre 0,4 e 1,6 μ m de diâmetro maior (Figs. 20B, 20C e 20E semelhantes ou maiores que os encontrados nas células do mesofilo de 12hR (Fig. 17C, com 0,72 a 0,9 μ m) ou 24hR (Fig. 19B, com 0,5 a 0,6 μ m). Cortes tangenciais de células do mesofilo dessa fase favorecem a observação dos glóbulos elétron-densos e de organelas, uma vez que nessa fase o citoplasma é parietal (Figs. 20C e 20E).

Nos cloroplastos, lentiformes, são observados agora vários tilacóides e alguns grana (Fig. 20F). Alguns cloroplastos apresentam 4 ou 5 grãos de amido (Figs. 20C e 20E), outros apresentam poucos grãos, que ocupam um espaço grande dentro do cloroplasto, em relação ao que vinha sendo observado nas fases anteriores da re-hidratação (Figs. 20B e 20D). Grãos de amido com manchas alongadas (Fig. 20E), como os de células mais hidratadas, são observados em algumas células dessa fase. Os plastoglóbulos aparecem em quantidade variável (Figs. 20D, 20E e 20F), de forma isolada ou em grupos de até 5, desorganizados espacialmente.

As mitocôndrias têm muitas cristas e podem aparecer alongadas (Fig. 20F) e justapostas aos cloroplastos ou redondas

(Fig. 20D), ao lado deles.

O núcleo tem contorno de forma definida, tendendo a elíptico, sua posição é parietal, a cromatina é descondensada e o nucléolo é bastante visível nessa fase (Fig. 20E). O retículo endoplasmático rugoso (Fig. 20E) pode ser observado entre o núcleo e a parede celular.

Em várias células podem ser observadas vesículas (Fig. 20B), corpos multivesiculares (Fig. 20C) e figuras mielínicas (Fig. 20F). Estas estruturas aparecem próximas à parede celular (Fig. 20E) ou ao vacúolo (Fig. 20C).

O vacúolo apresenta conteúdo particulado fino, com diferentes densidades (Figs. 20B e 20F). Algumas células ainda apresentam mais de um vacúolo, separados por membranas (Fig. 20C).

Reação de Imidazol (Prancha 21)

Fragmentos da folha hidratada (CRA = 83%) usada como controle da reação tiveram pouca precipitação de dióxido de ósmio (resultante do tetróxido de ósmio) no citoplasma, mas houve boa precipitação nos glóbulos elétron-densos e nos plastoglóbulos (Fig. 21A). Ainda assim não foi difícil a observação do material nos cortes, que ficou bem menos contrastado que o material das pranchas anteriores (Pranchas 1 a 20).

A folha hidratada usada como controle apresenta o citoplasma muito pouco elétron-denso, mas ainda permitindo a identificação de cloroplastos e mitocôndrias por sua forma e tamanho (Fig. 21A). Nessas organelas os tilacóides e as cristas, respectivamente, são vistos com pouco contraste. Também são observados com baixo contraste alguns túbulos do retículo endoplasmático. Glóbulos elétron-densos e plastoglóbulos estão bem evidentes no citoplasma, podendo ser facilmente identificados (Fig. 21A).

A reação de imidazol na folha hidratada (CRA = 83%) acentuou o contraste do material, por aumentar a precipitação do dióxido

de ósmio (resultante do tetróxido de ósmio) nos glóbulos elétron-densos, que aparecem muito escuros (Fig. 21B).

Ainda na folha hidratada, a reação de imidazol fez com que houvesse uma acentuada e preferencial precipitação do dióxido de ósmio nas cristas mitocondriais e principalmente nos tilacóides, que agora podem ser vistos com grande densidade eletrônica e grande contraste (Fig. 21B). A elétron-densidade das membranas internas de cloroplastos e mitocôndrias é muito maior que a das outras membranas celulares e que a das próprias membranas externas dessas organelas, cuja delimitação não é evidenciada (Fig. 21B).

Na folha dessecada (CRA = 9%) usada como controle, a precipitação do dióxido de ósmio foi baixa (Fig. 21C). O contraste do material é mais baixo que nas folhas secas mostradas nas pranchas anteriores, onde o material cortado também foi contrastado com acetato de uranila e citrato de chumbo. Mesmo assim, é possível observar as estruturas e identificar cloroplastos, mitocôndrias, glóbulos elétron-densos e membranas dentro das células (Fig. 21C).

Na folha dessecada pós-fixada com tetróxido de ósmio em tampão imidazol (CRA = 9%) foram bastante evidenciados os glóbulos elétron-densos (Fig. 21D). Nessa folha podem ser identificados os cloroplastos, com contorno circular (como em 2dD e 10hR, ver pranchas 6 e 16, respectivamente). Os plastoglóbulos foram evidenciados pela precipitação amplificada do dióxido de ósmio.

A parede celular aparece quase totalmente elétron-lúcida (branca) nas folhas hidratadas e dessecadas controle (Figs. 21A e 21C, respectivamente) e nas folhas hidratadas e dessecadas onde o tampão imidazol foi utilizado (Figs. 21B e 21D, respectivamente).

Mitocôndrias também são identificadas na folha seca onde o tampão imidazol foi utilizado, por sua forma e tamanho, mais do que pela evidenciação de sua delimitação (Fig. 21D).

Vacúolos, cloroplastos e mitocôndrias observados em folhas secas controle da reação de imidazol (Fig. 21C), têm uma delimitação nítida, mas a presença de membrana típica não pode

ser afirmada, apenas sugerida em alguns locais. Nas folhas secas pós-fixadas com tetróxido de ósmio em tampão imidazol, essas organelas aparecem com uma delimitação mais espessa (Fig. 21D). Muitos vacúolos aparecem rompidos aí (Fig. 21D).

Microscopia Eletrônica de Varredura (Pranchas 22 e 23)

As plântulas hidratadas apresentam superfície foliar expandida (Fig. 22A), com faixas rugosas e faixas mais lisas. As faixas rugosas correspondem a porções não espessadas da epiderme (Fig. 23C), que ficam deformadas e retraídas quando a folha seca (Figs. 23B e 23D). As faixas mais lisas da superfície de folhas hidratadas (Fig. 22A) correspondem às áreas onde as paredes das células epidérmicas são espessadas e onde há fibras sub-epidérmicas (Fig. 23A). Quando seca, a folha deforma menos nestas faixas (Figs. 22B, 23B e 23D).

Os espessamentos das paredes de células epidérmicas juntamente com as fibras sub-epidérmicas estão dispostos de modo a direcionar o enrolamento da folha durante a perda da água. Assim, na folha enrolada, a face abaxial da folha fica voltada para dentro, mais protegida e a face adaxial da lâmina foliar permanece exposta (Fig. 22D).

Os espessamentos das paredes de células da epiderme ficam mais evidentes nas folhas secas (Fig. 22E). Quando as folhas são observadas em maior aumento ao MEV, eles são observados como cordões longitudinais na superfície da folha (Figs. 22E). As células epidérmicas espessadas (Fig. 23B, vistas em corte transversal) localizam-se sobre feixes vasculares (Fig. 23A).

Nota-se uma maior quantidade de estômatos sobre as faixas não espessadas da epiderme (rugosas) em relação às faixas espessadas (lisas, nas folhas hidratadas) (Fig. 22A).

Cortes transversais de folhas hidratadas mostram os espaços intercelulares no mesofilo e a forma esférica e túrgida das células desse tecido (Fig. 23A e 23C). Nas folhas secas, os espaços intercelulares são bastante reduzidos e as células do

mesofilo são muito deformadas (Figs. 23B e 23D).

Uma comparação mais detalhada entre a superfície de uma folha hidratada e a de uma folha seca pode ser feita com a observação das figuras 22C e 22E, respectivamente. Na região onde a epiderme não é espessada, em uma folha hidratada (Fig. 22C), podem ser observados estômatos e marcas das paredes anticlinais das células epidérmicas, delimitando seu contorno.

Discussão

Fixação

A grande dificuldade encontrada para a obtenção de uma boa fixação para as folhas de Xerophyta plicata em diferentes condições de hidratação deve-se basicamente a dois fatores. Um deles é a própria dificuldade de fixação de tecidos vegetais, onde as paredes celulares atuam como uma barreira que torna lenta a entrada, e portanto a atuação, do fixador. Acreditamos que a utilização do vácuo como forma de aumentar a velocidade de influxo do fixador poderia causar artefatos nas células dessecadas e em processo de dessecação, que têm estrutura intracelular aparentemente frágil, devido à retração do citoplasma em relação à parede celular, por exemplo. Os artefatos, se houvessem, dificilmente seriam diferenciados da verdadeira alteração do citoplasma em resposta à dessecação. Para evitar esse problema, criamos uma outra metodologia de fixação, em que os fragmentos de folhas, cortados dentro de uma gota do fixador, são colocados dentro de saquinhos feitos com tela de aço inoxidável e mergulhados em solução fixadora. Ao final de um período de 2 horas de fixação, os fragmentos são retirados do saquinho e colocados para lavar em tampão fosfato ou em DMSO, conforme o protocolo de fixação seja com veículo aquoso ou não aquoso. Acreditamos que o fato dos fragmentos ficarem submersos no fixador já impõe uma grande pressão no sentido do ar sair de dentro das células, deixando o fixador penetrar nelas. O fato dos fragmentos afundarem na solução ao serem tirados do saquinho feito de tela de aço inoxidável indica que houve a saída da água e a fixação do material. Tentamos fazer fixações mantendo os fragmentos de folhas imersos por algodão, mas muitas vezes eles contornavam o algodão e ficavam boiando e outras vezes eles entravam dentro da malha de algodão e era muito difícil recuperá-los, devido ao seu pequeno tamanho.

Outra dificuldade encontrada foi com relação à adaptação e modificação de receitas e técnicas de fixadores não aquosos, para o nosso material vegetal e para as drogas disponíveis em nosso laboratório. Isso foi necessário para a realização do estudo ultra-estrutural do mesofilo no estado dessecado, uma vez que estas células são extremamente reativas à mínima quantidade de água disponível, o que poderia ocasionar alterações ultra-estruturais nas células dessecadas, no caso de ser utilizado fixador em veículo aquoso.

A reatividade dos tecidos foliares à disponibilidade de água pode ser observada por uma comparação entre 0hR, 1hR e 2hR, onde ocorre uma entrada de 11,1% de água, causando alterações no aspecto morfológico dessas plantas. Até 2 horas de re-hidratação, quando usado fixador não aquoso, foram verificadas alterações celulares consideradas apenas consequências físicas da entrada da água. Se o fixador usado fosse aquoso, essas alterações poderiam ter sido somadas às respostas metabólicas fazendo com que essas fases fossem retratadas com características de folhas com mais tempo de re-hidratação. A utilização de métodos convencionais de fixação, onde as soluções fixadoras são veiculadas em tampões aquosos, para folhas secas, causaria a hidratação do tecido durante o processo de fixação, distorcendo a imagem da verdadeira estrutura celular no estado dessecado (HALLAM, 1976; HALLAM & GAFF, 1978; HALLAM & LUFF, 1980).

A busca de um fixador não aquoso fundamenta-se, portanto, na comprovada rapidez com que as células dessecadas de plantas revivescentes absorvem e respondem física e metabolicamente à água disponível, distendendo-se, reorganizando-se e reativando-se (vide Pranchas 10 a 14, que retratam alterações celulares ocorridas em um período de 4 horas de re-hidratação).

YOO (1970), estudando as alterações celulares durante o processo de embebição de sementes de Pisum sativum L. (Leguminosae), já havia apontado o problema da utilização de fixadores aquosos no estudo de tecidos secos. PERNER (1965, apud YOO, 1970) utilizou a exposição ao vapor de tetróxido de ósmio por vários meses como forma de fixar radículas dormentes de

ervilha. A ultra-estrutura das organelas fixadas dessa maneira foi diferente da observada em organelas fixadas com solução aquosa.

Nós consideramos o método de fixação por vapor de ósmio pertinente apenas para tecidos secos, pois é muito lento. Nas células dessecadas o metabolismo celular, principalmente o proteolítico, está parado, não alterando a célula durante a fixação. No caso do estudo de plantas em processos de dessecação e revivescência, onde as diferenças em hidratação e em tempo decorrido no processo podem ter efeito ultra-estrutural, as células têm que ser inativadas e fixadas rapidamente.

A metodologia de fixação não aquosa proposta por HALLAM (1976) baseia-se no uso de veículos como o glicerol anidro e o DMSO. O autor considerou o último como mais eficiente e atribuiu o sucesso desse tipo de fixação à não-reatividade das estruturas celulares a soluções outras que não a água. Dessa forma, a estrutura da célula seca não se alteraria ao longo do tempo da fixação não aquosa, onde estaria em contato com o DMSO, no caso de fixadores não aquosos.

HALLAM (1976) fez uma comparação entre fixação de folhas dessecadas de uma mesma espécie com fixadores não aquoso e aquoso. As folhas dessecadas fixadas com solução aquosa mostraram paredes celulares distendidas, ao passo que folhas fixadas em solução não aquosa mantiveram as paredes celulares onduladas.

A importância do uso de fixadores não aquosos em tecidos secos, como sementes e pólen, foi enfatizada também por outros autores (PLATT-ALDIA et al., 1986; TIWARI et al., 1990; OPIK, 1985 apud TIWARI et al, 1990).

As observações de TIWARI e colaboradores (1990) sobre os efeitos da incubação de pólen dessecado de Pyrus communis L. (Rosaceae) por 2 minutos em meio de cultura aquoso, confirmaram a importância de métodos não aquosos de fixação. O pólen incubado dessa maneira mostrou alterações em relação às características citoplasmáticas do pólen dessecado (corpos densamente osmiofílicos, membranas multilameladas e invaginações da parede celular desapareciam).

A metodologia de fixação não aquosa proposta por HALLAM (1976) foi adaptada às condições de disponibilidade de material em nosso laboratório. Seguindo sugestão do próprio Prof. N.D. HALLAM (comunicação pessoal, 1990), tentamos retirar a água da solução de glutaraldeído 25%, por meio de filtração de uma mistura da solução com cloreto de cálcio anidro, mas os resultados não foram considerados satisfatórios. Além disso, o rendimento desse processo é baixo e o custo é alto.

Passamos a utilizar glutaraldeído na porcentagem final de 3% a partir de uma solução de glutaraldeído 70% em água, para as fixações, utilizando o DMSO como veículo. Não tentamos retirar a água do glutaraldeído 70% por razões econômicas. A porcentagem final de água nesse fixador ficou em 2,1%, sendo considerada aceitável, no sentido de não provocar alterações significativas nas células dessecadas do mesofilo (em 1hR o CRA é de 10,7% e não são observadas alterações nessas células em relação a células de 0hR, com CRA de 1,7%).

Segundo SZMANT (1975), capacidade do DMSO em penetrar nos tecidos vivos sem causar danos significativos é explicada por sua natureza relativamente polar, sua capacidade de formar pontes de hidrogênio e sua estrutura relativamente pequena e compacta. Estas características, muito semelhantes às da água, dão ao DMSO a habilidade de se associar com a água, propriamente, com proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, substâncias iônicas e outros constituintes dos sistemas vivos. Talvez a mais importante característica do DMSO seja sua capacidade de substituir parte das moléculas de água associadas a constituintes celulares. Por seu pequeno tamanho de molécula e sua natureza relativamente polar, trata-se de um veículo de rápida penetração (SZMANT, 1975).

A comparação entre resultados obtidos na fixação de uma mesma folha seca com fixador não aquoso e aquoso não pode ser feita com plantas tolerantes à dessecação, pelo próprio fato de que o fixador aquoso provoca alterações na ultra-estrutura da célula, na medida em que a re-hidrata. Isso foi por nós confirmado para Xerophyta plicata, pelos diferentes aspectos

ultra-estruturais encontrados em folhas secas, com CRAs próximos, fixadas com tampão imidazol (aquoso), figuras 21C e 21D (CRA = 9%) e o de folhas secas fixadas com veículo não aquoso (DMSO) em 3dD, figuras 7C e 7D (CRA = 7,9%) e em 1hR, figuras 12C e 12D (CRA = 10,7%).

A interpretação das imagens obtidas por meio de fixação não aquosa apresenta dificuldades (HALLAM, 1976; HALLAM & LUFF, 1980), no sentido em que aparecem estruturas (principalmente membranas) em contraste negativo. Não é fácil determinar se esse tipo de contraste é devido à ação do fixador (veiculado em DMSO) ou é consequência real da dessecação.

HALLAM (1976) também descreve os resultados da fixação não aquosa de folhas secas de Talbotia elegans e Craterostigma plantagineum (o autor não fornece os valores de CRA), apontando para o fato de que os únicos sistemas membranosos evidenciados pela precipitação do dióxido de ósmio são os dos cloroplastos, que são observados como agrupamentos de tilacóides. As demais membranas são observadas em contraste negativo.

HALLAM & GAFF (1978) observaram que folhas desseçadas de Xerophyta villosa (CRA = 12,5%), fixadas em veículo não aquoso (DMSO), apresentam o núcleo envolto por dupla membrana e pró-plastídios ou iniciais de plastídios (remanescentes de cloroplastos) contendo vesículas com membranas delimitantes em contraste positivo. As outras membranas são observadas em contraste negativo. (HALLAM & GAFF, 1978).

Essa etapa retratada por HALLAM & GAFF (1978) como sendo o estado seco de Xerophyta villosa pode ser comparada, em termos de conteúdo de água, a 2hR de Xerophyta plicata (CRA = 11,1%), que também foi fixada com veículo não aquoso e onde, ao contrário de Xerophyta villosa, são vistas apenas umas poucas membranas em contraste positivo dentro de vacúolos periféricos do citoplasma. Todas as outras membranas, internas ou delimitantes de organelas, não são observadas nessa fase.

Em várias células de Xerophyta plicata fixadas em solução não aquosa (células desseçadas, em processo de dessecação ou de revivescência), encontramos membranas contrastadas positiva e

negativamente dentro da mesma célula. Apesar das membranas delimitantes das organelas serem observadas em contraste negativo, outras membranas, localizadas na periferia do citoplasma da mesma célula têm contraste positivo. Essas últimas estão voltadas para o espaço de retração entre o citoplasma e a parede celular (em 4dD, 8dD e 4hR), ou, em um caso especial já discutido, dentro de um vacúolo, saindo de um glóbulo elétron-denso. As membranas delimitantes das organelas aparecem em contraste negativo, como se tivessem sido extraídas da célula ou como se as organelas estivessem retraídas, um pouco afastadas umas das outras. Observe isso na prancha 9, correspondente a 7dD (CRA = 12,1%), 8dD (CRA = 3,7%) e 9dD (CRA = 0%) e na prancha 10, correspondente a 0hR (CRA = 1,7%).

O contraste positivo das membranas celulares é dado pela pós-fixação com tetróxido de ósmio, que se liga a duas duplas ligações paralelas dos lipídios das membranas (HAYAT, 1970; GLAUERT, 1975), precipitando como dióxido de ósmio (KIERNAN, 1981), que é elétron-denso.

Vários autores descrevem alterações na organização molecular das bicamadas lipídicas quando submetidas a baixo conteúdo hídrico.

Estudos com bicamadas feitas com fosfolipídios extraídos de cérebro mostraram que, quando o conteúdo hídrico é menor que 20%, as bicamadas invertem a polaridade e assumem uma nova orientação, chamada de hexagonal, onde as cabeças polares dos fosfolipídios voltam-se para o interior da bicamada, ficando em contato com a água, que fica confinada nesse espaço. As cadeias apolares dos fosfolipídios voltam-se para fora da bicamada (LUZZATI & HUSSON, 1962; SIMON, 1974)

ELLEMAN & DICKINSON (1986), usando fixador não aquoso, mostraram que o protoplasma de pólen dessecado de Brassica oleracea L. (Cruciferae) é circundado por um mosaico de vesículas e não pela membrana plasmática intacta, a qual voltava a aparecer após 15 minutos de re-hidratação. Por outro lado, estudos com criofratura ("freeze-fracture"), realizados por outros autores, revelaram a membrana plasmática bem estruturada em pólen

dessecado da própria Brassica e em outras espécies (DUMAS et al., 1984 apud KERHOAS et al., 1987). KERHOAS et al. (1987) acreditam que a técnica de criofratura ("freeze-fracture") seja mais adequada para o estudo de membranas de pólen, e atribuem a presença de vesículas nas micrografias eletrônicas de ELLEMAN & DICKINSON (1986 apud KERHOAS et al., 1987) a artefatos de técnica.

THOMSON & PLATT-ALOIA (1982), também utilizando a técnica de criofratura ("freeze-fracture"), observaram que a estrutura das membranas de sementes de Vigna unguiculata (L.)Walp. (Leguminosae) estava intacta, embora bastante sinuosa. Esses autores acreditam que possa haver uma diminuição da ordem molecular dentro da bicamada, mas que não ocorra re-estruturação ou reorganização dos componentes da membrana, quando esta passa para o estado dessecado.

A não repetitividade dos resultados obtidos por meio de métodos não aquosos de fixação para microscopia eletrônica de transmissão e os resultados de "freeze-fracture", associada à inexistência de estudos bioquímicos e biomecânicos em membranas dentro de células deixa dúvidas quanto ao comportamento das membranas celulares em relação a um baixo conteúdo hídrico. Essa dúvida dificulta ainda mais a interpretação dos resultados obtidos por meio da fixação não aquosa, onde parte das membranas são elétron-lúcidas e outra parte elétron-densas.

Considerando que as membranas respondam à dessecação com a alteração espontânea de sua organização molecular, baseada nas forças de hidrofobicidade de seus lipídios, ela tomaria espontaneamente o arranjo hexagonal (LUZZATI & HUSSON, 1962; SIMON, 1974), com a saída da água.

O arranjo hexagonal dos lipídios de membrana, possivelmente encontrado quando a célula está seca, não ofereceria sítios para a ligação do tetróxido de ósmio e seria retratado pela imagem elétron-negativa ao microscópio eletrônico de transmissão.

Segundo HALLAM & GAFF (1978), o fixador não aquoso não altera o arranjo hexagonal que os lipídios de membrana assumem no estado seco, portanto não provoca a formação de sítios de ligação

para o tetróxido de ósmio. Quando células dessecadas são fixadas em soluções aquosas, a presença da água condiciona uma alteração rápida e espontânea da conformação dos lipídios das membranas, baseada em seu caráter anfipático, e a volta dos sítios de ligação para o tetróxido de ósmio.

HALLAM & GAFF (1978) sugerem que o contraste negativo de membranas de células dessecadas indique, portanto, que a fixação não aquosa, com DMSO como veículo, é realmente muito eficiente.

O problema que resta é explicar a observação de algumas membranas em contraste positivo e outras em contraste negativo na mesma célula dessecada, fixada em veículo não aquoso.

Nossa hipótese teórica para explicar a co-ocorrência de membranas elétron-positivas e elétron-negativas na mesma célula, quando fixadas com veículo não aquoso é a seguinte: 1. A dessecação e a re-hidratação não ocorrem de maneira uniforme em todas as partes do citoplasma. A água sai do interior do citoplasma passando pela periferia, por isso permanece mais tempo na região periférica. Na re-hidratação, a água também tem acesso primeiro à parte periférica do citoplasma e daí passa para o interior. 2. A bicamada lipídica das membranas celulares responde à saída da água invertendo espontaneamente a posição de suas cabeças polares, que passam para o interior da estrutura da bicamada, onde deve haver um resto de água e as cadeias apolares se voltam para fora, onde agora é menos hidratado. Essa conformação invertida da membrana não oferece sítios de ligação para o tetróxido de ósmio. 3. O fixador não aquoso, veiculado com DMSO, não altera as relações de hidrofobicidade dentro da célula, mantendo as estruturas moleculares da maneira como estão. Assim, as membranas totalmente dessecadas, no interior do citoplasma, não oferecem sítios de ligação para o tetróxido de ósmio, portanto são observadas como faixas elétron-lúcidas. Na mesma célula, as membranas periféricas, que ainda (ou já) estão hidratadas, aparecem elétron-densas por oferecerem sítios para o tetróxido de ósmio.

Uma maneira de confirmar se a aparência elétron-lúcida das membranas é devida somente à estrutura invertida dos lipídios na

bicamada, quando no estado dessecado, e não ao fixador, seria proceder uma fixação não aquosa em uma folha hidratada. Os lipídios dessas membranas em estado hidratado estão, certamente, com as cabeças polares voltadas para fora e as cadeias apolares para dentro da bicamada, oferecendo sítios de ligação para o tetróxido de ósmio. Assim, se o fixador não aquoso, veiculado com DMSO, mantiver a estrutura molecular das membranas, elas deverão aparecer elétron-positivas.

Dessecação

Durante a perda de água, folhas de plantas adultas de Xerophyta plicata Spreng. (Velloziaceae) passam por alterações macroscópicas que envolvem a perda da cor verde, o amarelecimento, a redução na largura, o dobramento da lâmina foliar, que é plissada, em zigue-zague e o enrolamento helicoidal da folha. Em folhas de plântulas as alterações são as mesmas, só não ocorrendo o dobramento da lâmina foliar, que é plana, em zigue-zague. O enrolamento da folha ocorre de modo a manter exposta a superfície adaxial e proteger a superfície abaxial da folha, como pode ser observado por microscopia eletrônica de varredura. Nas folhas de plântulas de Xerophyta plicata, existem faixas longitudinais de células epidérmicas espessadas e fibras sub-epidérmicas em profundidade de cerca de 2 células, intercaladas por faixas não reforçadas, como pôde ser visto nas fotos de microscopia de varredura e nos cortes semi-finos.

No processo de dessecação de plântulas de Xerophyta plicata não ocorreu o murchamento das folhas. Folhas distendidas inicialmente apresentaram retrações em faixas longitudinais da lâmina foliar até reduzirem bastante sua largura e depois enrolaram-se, no sentido do eixo maior da folha, mas em nenhuma etapa desse processo houve murchamento da folha.

GAFF e colaboradores (1976) mostraram que em Borya nitida Labill., outra espécie tolerante à dessecação, a redução do volume das folhas ocorre mais em espessura que em largura, devido

à espessa camada sub-epidérmica de esclerênquima (com 4 células de espessura) que segue toda a extensão da folha.

LEBKUECHER & EICKMEIER (1991) sugerem que o enrolamento das folhas está provavelmente relacionado com a evitação dos efeitos deletérios da foto-oxidação sobre os componentes celulares, que poderia ocorrer pela incidência forte de luz nas células com baixo conteúdo de água. Estudos em laboratório mostraram que, em Selaginella lepidophylla (Hook & Grev.) Spring, o enrolamento ajuda a limitar os danos induzidos pela luz, quando a planta tem pouca água (foto-inibição do FS II e foto-oxidação da clorofila). O enrolamento também limitaria a ocorrência de danos durante a re-hidratação sob luz forte, quando a capacidade fotossintética da folha ainda é baixa (LEBKUECHER & EICKMEIER, 1991).

Selaginella lepidophylla é uma pteridófita tolerante à dessecação que ocorre em ambientes desérticos e que se enrola em torno de seu eixo menor, do ápice para a base, durante a dessecação. (LEBKUECHER & EICKMEIER, 1991).

Acreditamos que o enrolamento confira às folhas certa resistência contra quebras causadas pelo vento, por exemplo, sendo uma proteção mecânica, uma maneira de aumentar a rigidez da estrutura da folha, uma vez que as paredes celulares tornam-se quebradiças quando secas.

O gráfico 1 mostra que nas primeiras 10 horas de dessecação em Xerophyta plicata ocorre uma rápida e irregular perda de água, que varia de 20 a 30% em relação ao conteúdo de água de folhas totalmente hidratadas. A nível de microscopia fotônica, alguma alteração morfológica pode ser notada em 10hD. O citoplasma da folha com 10hD apresenta cloroplastos um pouco maiores que em 0hD e 2hD.

A folha com 10hD (CRA = 81,8%) apresentou praticamente o mesmo conteúdo de água que a de 2hD (CRA = 81,4%), no entanto a folha de 2hD não apresentou alteração celular, em comparação com a folha hidratada (CRA = 99,22%), enquanto na folha de 10hD podem ser notadas alterações. Isso sugere a importância do tempo de dessecação na resposta celular e indica que as modificações nas estruturas celulares não estão direta e exclusivamente ligadas ao

conteúdo hídrico da folha.

Vários autores sugerem a necessidade de algum tipo de indução (talvez hormonal) para que a planta seja capaz de sobreviver à dessecação extrema (GAFF & LOVEYS, 1984 apud SCHWAB et al., 1989).

GAFF e colaboradores (1976) sugerem que em Borya nitida, a indução da tolerância à dessecação deve estar relacionada com o aumento no número de mitocôndrias e com a hidrólise do amido, que levam à produção de um suprimento de ATP respiratório para dar suporte à reconstrução do sistema metabólico durante a re-hidratação. Em Xerophyta plicata não detectamos o aumento do número de mitocôndrias, mas sim a redução das reservas de amido.

No período entre 24hD (CRA = 60,3%) e 2dD (CRA = 15,5%) a perda de água foi mais lenta e linear e o processo de dessecação foi acompanhado de alterações morfológicas nas folhas. Grandes alterações morfológicas ocorreram no mesofilo nesse período. As paredes celulares ficam onduladas e dobradas, causando uma retração nas células, que ficam mais próximas umas das outras, com reduzidos espaços intercelulares, como pode ser observado também pela microscopia eletrônica de varredura.

No estado hidratado (CRA = 99,22%) os cloroplastos têm forma irregular, provavelmente conferida pelos grãos de amido (grandes e em número de 1 a 4) que ocupam seu interior. Esses cloroplastos, poderiam ser confundidos com amiloplastos, devido ao grande tamanho e número de grãos de amido que contém, mas, diferentemente dos amiloplastos, estes cloroplastos apresentam clorofila, tilacóides e grana. A morfologia diferente da forma biconvexa usualmente observada em cloroplastos é provavelmente devida aos grãos de amido, uma vez que cloroplastos de 2hD e 24hR, com grãos de amido bem menores, são lentiformes. A grande quantidade e o grande tamanho dos grãos de amido em cloroplastos de plântulas de Xerophyta plicata podem estar relacionados com o fato deste ser um tecido em crescimento, que precisa de mais energia que tecidos já formados e com o armazenamento de reservas energéticas para os processos de dessecação e/ou de revivescência.

O número de plastoglóbulos aumenta visivelmente nos cloroplastos de Xerophyta plicata em processo de dessecação, principalmente de 10hD a 2dD. A partir de 3dD, coincidindo com a fixação não aquosa, eles são dificilmente observados.

Os plastoglóbulos são as estruturas mais resistentes de plastídios de Borça nitida quando secos. Os plastídios degenerados apresentam plastoglóbulos que contém carotenóides (LICHTENTHALER, 1968 apud GAFF et al., 1976). A formação de grupos ("clusters") de plastoglóbulos é a provável razão da difusão de áreas amareladas em células desseçadas viáveis vistas ao microscópio fotônico (GAFF et al., 1976).

A degradação do amido durante a dessecação pode ser incompleta. Isso é sugerido pela observação esporádica de pequenos grãos de amido em etapas mais avançadas da dessecação e até em 9dD (CRA = 0%).

A ausência de grãos de amido em folhas secas de Borça nitida é atribuída a sua hidrólise durante a dessecação (GAFF et al., 1976). Isso parece ser importante para garantir substrato respiratório imediatamente disponível para o processo metabólico de revivescência, permitindo que as mitocôndrias que resistiram à seca rapidamente voltem a produzir ATP para a reconstrução da ultra-estrutura e do metabolismo das células. Além disso, os açúcares solúveis resultantes da hidrólise do amido estariam protegendo as membranas celulares e, em especial, as dos tilacóides, contra a inativação irreversível durante os processos de perda e de volta da água (HEBER & SANTARIUS, 1964 apud SCHWAB et al., 1989).

O desaparecimento dos grãos de amido durante a perda de água é um efeito comum a plantas tolerantes e sensíveis à dessecação (LEVITT, 1972 apud GAFF et al., 1976). Quando folhas dos dois tipos de planta são destacadas da planta e deixadas secar ao ar, o conteúdo de açúcares solúveis de ambas aumenta, devido à hidrólise do amido (SCHWAB & GAFF, 1986). A diferença entre plantas tolerantes e sensíveis é que, nas primeiras, tanto o nível inicial de açúcares, quanto a quantidade de açúcares solúveis produzidos na dessecação são maiores que em plantas

sensíveis (SCHWAB & GAFF, 1986).

Em sementes de amendoim e em folhas de algodão, espécies não tolerantes, o estresse de falta de água leva a uma diminuição na quantidade de amido e a um aumento na quantidade de açúcares solúveis (MUSINGO et al., 1989; MECKEL et al., 1984 apud MUSINGO et al., 1989).

Em Xerophyta plicata, como em outras plantas tolerantes à dessecação, a hidrólise do amido em açúcares solúveis pode estar relacionada com uma série de eventos, como a proteção das membranas contra solutos caotrópicos e radicais livres, que aparecem em maior quantidade durante a dessecação e desestabilizam a ordem molecular das membranas. A hidrólise do amido também deve estar relacionada à conversão das reservas de açúcar insolúvel, de utilização mais lenta e sem atividade osmótica, em um estoque de açúcares solúveis, de fácil e rápido acesso como fonte energética, com distribuição por todo o citoplasma e osmoticamente ativos. Esses açúcares solúveis devem atuar no aumento da pressão osmótica das células e isso possivelmente confere alguma resistência à saída da água da célula.

Logo que os grãos de amido começam a diminuir em tamanho os cloroplastos passam a ser observados com forma biconvexa (2hD), mas, a partir de 10hD eles começam a se tornar arredondados. Entre 24hD e 2dD o volume dos cloroplastos aumenta e eles ficam redondos, passando a ocupar um volume maior na célula, como pode ser visto mesmo por microscopia fotônica. Com 24hD começa a ocorrer um processo de modificação da estrutura interna dos cloroplastos. São observados espaços entre grupos de tilacóides, dando a idéia de uma estrutura mais frouxa. Cloroplastos com diferentes morfologias podem ser observados numa mesma célula, indicando as alterações metabólicas começam a ocorrer de maneira não homogênea nas células. Em 2dD (CRA = 15,5%) não se observam tilacóides. Em seu lugar aparecem pequenas vesículas, distribuídas aleatoriamente pela organela. A partir de 3dD, coincidindo com a mudança para fixador não aquoso, não são mais observadas as membranas delimitantes das organelas. Os

cloroplastos passam a ser identificados pela forma redonda, pelo tamanho grande, pela presença de pequenos grãos de amido e por estruturas elétron-lúcidas pequenas e redondas, que são provavelmente remanescentes de plastoglóbulos. Nos cloroplastos, também não são mais observadas membranas internas.

HALLAM & LUFF (1980b) observaram que os cloroplastos de Xerophyta villosa Th.Dur.& Schinz, uma Velloziaceae revivescente do sul da África, perdem os tilacóides durante a dessecação. No estado dessecado estes cloroplastos são observados como estruturas delimitadas por membranas (fixação em veículo não aquoso, DMSO), contendo plastoglóbulos e pequenas vesículas (HALLAM & LUFF, 1980b). Durante a dessecação estes autores observaram que cada tilacóide do granum aparece mais largamente separado dos outros, como também observamos em Xerophyta plicata entre 10hD e 24hD. Em Xerophyta villosa, no entanto, os plastoglóbulos passam a se apresentar elétron-lúcidos, o que não ocorre em Xerophyta plicata.

HETHERINGTON e colaboradores (1982) observaram um aumento no empilhamento dos tilacóides durante as primeiras 14 horas de dessecação em Borya nitida. Os autores relacionam esse fato ao aumento da concentração de sais dentro dos cloroplastos pela perda da água. Após 18 horas de dessecação os cloroplastos dessa espécie aparecem inchados e os tilacóides parcialmente desempilhados. Essas características persistem até que em 37 horas de dessecação (o autor não fornece o valor do CRA) as folhas apresentam cloroplastos com pouca organização interna (HETHERINGTON et al., 1982).

O processo de dessecação de Xerophyta plicata assemelha-se ao de Borya nitida (HETHERINGTON et al, 1982), mas com fases não tão separadas, pois em Xerophyta plicata com 10hD (CRA = 81,86%), os tilacóides parecem mais empilhados que nas células hidratadas, com os grana mais visíveis, mas já nessa fase os cloroplastos começam a se apresentar dilatados. Em 24hD (CRA = 60,3%) os cloroplastos apresentam-se dilatados e com os tilacóides dos grana afastados uns dos outros. Em 2dD (CRA = 15,5%) os cloroplastos são estruturas circundadas por membrana, contendo

plastoglóbulos e vesículas em seu interior, como os de Borja nitida (GAFF et al., 1976; HETHERINGTON et al., 1982) e Xerophyta villosa (HALLAM & LUFF, 1980b; HALLAM & GAFF, 1978).

Mitocôndrias de células hidratadas de Xerophyta plicata são alongadas ou redondas e têm muitas cristas dilatadas. A forma das mitocôndrias e sua posição no citoplasma não se altera muito até 10hD, inclusive. Em 24hD as mitocôndrias aparecem dispostas aleatoriamente pelo citoplasma, que ocupa totalmente o espaço intra-celular, apresentando forma redonda, com poucas cristas, bem curtas e não dilatadas.

SCHWAB e colaboradores (1989) observaram que a respiração é geralmente menos afetada pela dessecação que a fotossíntese, em espécies tolerantes e sensíveis à dessecação. Estes autores compararam as espécies revivescentes Craterostigma plantagineum Hochst. (Scrophulariaceae), Ramonda mykone Reichb. (Gesneriaceae) e Ceterach officinarum Lam. et D.C. (Aspleniaceae - Pteridophyta) com a espécie sensível à dessecação Spinacea oleracea L. (Chenopodiaceae). Esse estudo mostrou que a respiração é menos sensível à perda de água nas espécies tolerantes, mas a sensibilidade da fotossíntese à dessecação é igual em plantas revivescentes e sensíveis. Além disso, em plantas tolerantes à dessecação as trocas gasosas mitocondriais são reativadas mais rapidamente que as reações fotossintéticas, quando ocorre a re-hidratação (SCHWAB et al., 1989). Em Xerophyta plicata, observamos que as alterações na ultra-estrutura das mitocôndrias só começam a ocorrer após 24hD, enquanto em cloroplastos começam com 10hD. O significado metabólico da maior resistência das mitocôndrias em relação aos cloroplastos poderia ser a necessidade de produção de ATP para garantir a ocorrência das modificações celulares características da dessecação de plantas tolerantes. Também pode ocorrer armazenamento de energia na forma de ATP, visando garantir um suprimento dessa molécula energética para a revivescência.

Várias espécies de plantas tolerantes à dessecação foram estudadas por GAFF & ZIEGLER (1989). Dentre elas, várias da família Velloziaceae: Talbotia elegans Balfour, Xerophyta villosa

Th.Dur. & Schinz e Xerophyta viscosa Baker. Várias espécies conservaram alguma quantidade de ATP nas células em estado seco, mas a quantidade de ATP conservado não foi a mesma para todas as espécies. Xerophyta villosa chegou a apresentar mais ATP na folha seca que na folha hidratada. Apesar desses resultados, não foi possível determinar experimentalmente se a conservação de ATP é necessária para a reorganização da estrutura celular com a re-hidratação (GAFF & ZIEGLER, 1989).

A não ocorrência de formação de ATP durante o estado seco é consistente com a degradação da estrutura das membranas de mitocôndrias (NIR et al., 1969). O ATP presente em folhas dessecadas estudadas por GAFF & ZIEGLER (1989) é, portanto, devido à conservação do ATP produzido no estado hidratado e nas primeiras horas de dessecação.

Em cortes de folha com 4hD são observadas pequenas vesículas na face externa da membrana plasmática. Elas aparecem antes de qualquer outro sinal de alteração ultra-estrutural na célula e indicam uma alteração na área de superfície da membrana plasmática. Isso é considerado por TIWARI et al. (1990) como um mecanismo de armazenamento do excedente de membranas.

TIWARI e colaboradores (1990) descrevem dobramentos na parede celular, vesículas associadas à superfície citoplasmática e extra-citoplasmática da membrana plasmática e membranas multilameladas no citoplasma como as principais características de pólen maduro, dessecado, de Pyrus communis L. (Rosaceae). Vesículas associadas com ambas as superfícies da membrana plasmática também foram reportadas para outras células dessecadas, incluindo outros grãos de pólen (ELLEMAN & DICKINSON, 1986; CHABOT & LEOPOLD, 1982). Acredita-se que essas vesículas tenham derivado da membrana plasmática como um mecanismo de conservação de membranas durante a dessecação. Em Xerophyta plicata com 10hD, observamos vesículas para fora da membrana plasmática, concomitantemente com o início de alterações na ultra-estrutura do citoplasma.

O vacúolo também passa por alterações durante o processo de dessecação de Xerophyta plicata, com modificações morfológicas (e

provavelmente metabólicas). Até 10hD a estrutura do vacúolo, único e central, não se altera, mas seu conteúdo sim. Em 10hD passam a ser encontradas pequenas vesículas, formadas a partir do tonoplasto, sem aparente conteúdo. As vesículas devem estar relacionadas com o armazenamento de membranas que estão em excesso, devido à redução do volume vacuolar, do mesmo modo como isso ocorre na membrana plasmática.

HALLAM & LUFF (1980b) observaram que o vacúolo de Xerophyta villosa passa a apresentar uma granulação osmiofílica, de natureza provavelmente fenólica, com o aumento do estresse de falta de água. Em Xerophyta plicata, com 24hD (CRA = 60,3%), o vacúolo da maioria das células apresenta uma grande quantidade de material particulado osmiofílico, mas sua natureza química não foi investigada. Após 24hD a granulação diminui.

O fato de algumas células do mesofilo de Xerophyta plicata apresentarem vacúolo sem granulação ao lado de outras com vacúolo contendo material granulado sugere que o processo de saída da água esteja ocorrendo em diferentes velocidades em células do mesmo tecido. Isso pode ser devido a diferenças na composição de cada vacúolo. Segundo KELLER & MATILE (1985) os solutos do vacúolo (íons inorgânicos, aminoácidos, açúcares, ácidos orgânicos e produtos secundários do metabolismo) são responsáveis pela manutenção da pressão osmótica da célula. O vacúolo, segundo dois autores, é responsável não apenas por isolar, mas também por fazer uso, de solutos não compatíveis com o funcionamento metabólico da célula (LEIGH, 1979; RAVEN, 1987).

Muitas hidrolases foram encontradas dentro de vacúolos de células vegetais (fosfatase ácida, RNase, DNase e muitas outras) (BOLLER, 1982). LEIGHT (1979) discute uma questão, até agora não respondida, se as hidrolases presentes no vacúolo de células diferenciadas participam do processo de "turn-over" dos constituintes celulares e se elas têm alguma participação na degradação organizada das organelas durante a senescência (WOOLHOUSE, 1982; BISWAL & BISWAL, 1988). Em relação a isso, podemos também propôr uma nova questão: As enzimas presentes no vacúolo participam do desaparecimento de algumas organelas

(ribossomos, retículo endoplasmático e dictiossomo) durante a dessecação de plantas revivescentes?

Vários autores observaram que o vacúolo de diferentes espécies revivescentes aparentemente fragmenta-se em vários menores durante a dessecação. Em Xerophyta plicata a célula também fica preenchida por vesículas. No caso de Xerophyta plicata não utilizamos os termos vacúolo e vacuolização para nos referir a essas vesículas, porque não realizamos nenhum estudo específico para determinar se estas vesículas são, de fato, vacúolos. Esse fato parece ter relação com o deslocamento das organelas em direção ao centro da célula, como será discutido mais adiante, juntamente com o aparecimento de vesículas no citoplasma durante a re-hidratação.

HALLAM (1976) observou que o citoplasma das células desseçadas de Talbotia elegans e Craterostigma plantagineum é cheio de vacúolos, chamados de "vacúolos de ar" pela aparente ausência de conteúdo. Nessas espécies eles são evidentes mesmo em cortes à mão livre ou em cortes semi-finos (HALLAM, 1976). GAFF e colaboradores (1976) observaram que em Borya nitida o vacúolo fragmenta-se em vários menores, de tamanhos variados, ao longo da dessecação. Alguns dos vacúolos apresentam massas de material granular, elétron-denso que se coram em verde por Azul de Toluidina, que provavelmente são polifenóis (GAFF et al., 1976).

Em 24hD, além das vesículas encontradas desde 10hD, são observados 1 ou 2 corpos multivesiculares no interior e na periferia interna dos vacúolos de Xerophyta plicata. Os corpos multivesiculares podem ter, como as vesículas, uma função de armazenamento de membranas. Também são observadas dentro do vacúolo, vesículas um pouco maiores que em 10hD, com forma irregular e conteúdo denso, semelhante ao citoplasma.

Segundo SINGH e colaboradores (1984), a perda de água pelas plantas resulta no encolhimento das células, que é crítico para a manutenção da fluidez dos fosfolipídios das membranas e da integridade da bicamada lipídica. Nas plantas tolerantes à dessecação, qualquer que seja a forma assumida pelas membranas no estado dessecado, a compartimentalização da célula precisa ser

restaurada assim que ocorrer a re-hidratação (SINGH et al., 1984). A tolerância à dessecação exige que as biomembranas resistam aos estresses químicos e mecânicos que acompanham a retração das células durante a perda da água e sua expansão durante a re-hidratação (HEBER & SANTARIUS, 1964 apud SCHWAB & HEBER, 1984; SCHWAB & HEBER, 1984; SCHWAB et al., 1989) e esse ciclo se repete várias vezes com as mesmas células. Apesar disso, SCHWAB e colaboradores (1989) consideram que, até o momento, a diferença entre espécies tolerantes e sensíveis não pôde ser explicada com base em diferenças na sensibilidade das biomembranas.

GAFF e colaboradores (1976) realizaram um estudo comparativo, utilizando fixadores em veículo aquoso, entre Borya nitida e espécies não tolerantes. Embora os passos da degradação celular durante a dessecação sejam praticamente os mesmos para esses dois tipos de plantas, Borya nitida conservou intactas as membranas do envoltório nuclear quando dessecada, enquanto as espécies sensíveis mostraram fragmentação do envoltório nuclear e agregação de material elétron-denso em volta do núcleo (GAFF et al., 1976). Os autores mostraram que células dessecadas viáveis de Borya nitida, fixadas em veículo não aquoso (DMSO), apresentaram membranas delimitantes de cloroplastos e mitocôndrias pouco definidas. Essas organelas puderam ser identificadas pela diferença de granulação entre elas e pela presença de plastoglóbulos nos cloroplastos (GAFF et al., 1976).

A ocorrência de diferentes unidades sub-celulares também é observada em células dessecadas de Xerophyta plicata. Até 2dD as membranas nucleares e citoplasmáticas são mantidas intactas, mas quando a fixação passa a ser não aquosa, as membranas não são mais observadas em contraste positivo. Mesmo assim unidades sub-celulares distintas são observadas, pela diferença de granulação e elétron-densidade entre elas.

Borya nitida não apresentou as grandes massas concêntricas de membranas (figuras mielínicas) apresentadas por espécies sensíveis, quando submetidas à dessecação (GAFF et al., 1976). Xerophyta plicata apresentou figuras mielínicas durante a

dessecação, mas menores e em menor quantidade que corpos multivesiculados, também presentes nessa espécie.

SCHWAB & HEBER (1984) acreditam que a reorganização do material de membranas na forma de vesículas e corpos multivesiculares (durante a dessecação) seja um fato comum e favorável entre plantas revivescentes. Segundo estes autores, esta seria uma resposta à redução do volume celular, para reduzir a área de superfície da membrana plasmática e, ao mesmo tempo, manter esse material disponível. Se não houvesse disponibilidade desse material durante a re-hidratação, a membrana plasmática iria se romper durante a expansão do protoplasma. Embora não possamos provar esta hipótese no presente trabalho, acreditamos que SCHWAB & HEBER (1984) estejam corretos, dada a rapidez com que o citoplasma se expande e se reorganiza na re-hidratação e à diminuição do número e tamanho de vesículas e corpos multivesiculares nas células re-hidratadas, sugerindo que tenham sido utilizados no processo.

No musgo revivescente Tortula ruralis (Hedw.) Gaertn, Meyer & Scherb., ocorre a produção de vesículas no retículo endoplasmático quando no estado hidratado, que formam camadas sob a membrana plasmática. Em alguns casos, foi observada a fusão entre elas, sugerindo que sejam reservatórios de membrana para acomodar alterações de área de superfície durante a dessecação e a re-hidratação (SINGH et al., 1984).

Em pólen de Pyrus communis, maduro e dessecado, as membranas plasmática, de vesículas, do retículo endoplasmático e de organelas delimitadas por duas membranas empacotam-se de maneira multilamelada durante o processo de dessecação. Na re-hidratação precedente à germinação do tubo polínico, as membranas reassumem o aspecto unilamelado (TIWARI et al., 1990).

Os efeitos da escassez de água nas células são muitos. Em plantas sensíveis à dessecação ocorre a perda irreversível das funções bioquímicas de membranas durante o estresse de falta de água. Esse efeito é atribuído ao aumento de substâncias potencialmente tóxicas, chamadas de solutos caotrópicos, no citoplasma. Eles desestabilizam as membranas (SANTARIUS, 1973

apud SCHWAB & GAFF, 1990; SCHWAB & HEBER, 1984). No entanto, quando a perda das funções da membrana é causada artificialmente por estresse osmótico em presença de açúcares, essa perda é reversível (SCHWAB & HEBER, 1984).

Solutos caotrópicos são constituintes normais das células, quando em baixa concentração. O efeito tóxico desses solutos é devido a sua alta concentração causada pela seca (SCHWAB & HEBER, 1984).

DHINDSA & MATOWE (1981) relacionaram a tolerância à dessecação em duas espécies de musgo com a capacidade de metabolizar enzimaticamente os intermediários reativos de oxigênio tóxicos (peróxido de hidrogênio, radicais superóxido e radicais hidroxila) formados durante a saída da água. O controle dos níveis desses radicais de oxigênio livres ficaria a cargo da superóxido dismutase, da catalase, da peroxidase e de antioxidantes, como a vitamina C (IRIGOYEN et al., 1992).

Segundo SCHWAB & HEBER (1984), a tolerância ao estresse de falta de água pode ser atribuída em grande parte a componentes das membranas que aumentam sua estabilidade. São os chamados solutos compatíveis com membranas (açúcares e aminoácidos, principalmente prolina), que aparecem em quantidades muito mais altas em plantas tolerantes que em plantas sensíveis à dessecação. Experiências com tilacóides isolados e mantidos em soluções com excesso de açúcares mostraram que eles permanecem funcionais mesmo após liofilização (SCHWAB & HEBER, 1984).

De acordo com a "hipótese da reposição da água" (CLEGG et al., 1982) os solutos compatíveis vão substituindo as moléculas de água que estão evaporando, conservando estável a estrutura das membranas. Eles também substituem a água quando a atmosfera de solvatação ao redor das macromoléculas solúveis ligadas a membranas é gradualmente removida (CLEGG et al., 1982; CAFFREY et al., 1988; SCHWAB & GAFF, 1990). Segundo CAFFREY et al (1988) a estrutura líquido-cristalina das membranas é dependente das forças organizadoras da água, mas açúcares como a sacarose podem alterar as características físicas das membranas fosfolipídicas, fazendo com que elas mantenham as características do estado

hidratado, mesmo no estado seco. Baseando-se na atuação dos solutos compatíveis sobre as macromoléculas solúveis ligadas às membranas, SCHWAB & GAFF (1990) propõe que, em plantas tolerantes à dessecação, os solutos compatíveis também atuam na proteção de enzimas solúveis.

Em plantas revivescientes os açúcares solúveis resultantes da hidrólise do amido atuam como protetores de membranas contra os estresses químicos (SCHWAB & GAFF, 1986; KAISER et al., 1986).

SCHWAB & HEBER (1984) fizeram uma comparação entre Spinacea sp (espécie sensível à dessecação) e várias espécies revivescientes, que indicou uma maior resistência à falta de água nos tilacóides de espécies tolerantes à dessecação. Os autores sugerem que isso pode ser atribuído, ao menos em parte, à composição dos arredores da membrana. Uma análise de amostras celulares brutas ("crude cell sap"), mostrou que plantas tolerantes têm muito mais solutos compatíveis com membranas e menos solutos caotrópicos que plantas sensíveis. A ação conjunta de diferentes agentes estabilizadores de membranas parece prevenir a quebra irreversível das estruturas das membranas durante a dessecação, em plantas tolerantes (SCHWAB & HEBER, 1984).

Segundo vários autores, a conservação de lipídios de membranas por meio de diferentes mecanismos, como a formação de vesículas endocitóticas, protrusões de membranas, invaginações, corpos lipídicos etc. é comum em células em que o protoplasma é experimentalmente dessecado (SINGH, 1979; PEARSE, 1982; STEPONKUS, 1984).

Dentre os meios de conservação de lipídios estão os glóbulos elétron-densos. No caso de Xerophyta plicata, onde a natureza lipídica dos glóbulos elétron-densos foi confirmada pela reação de imidazol, o aumento do número e da quantidade deles durante a dessecação sugere sua função de armazenamento de lipídios dos excedentes de membranas. De fato, os glóbulos elétron-densos modificam-se bastante durante a perda da água, nessa espécie. Nas células hidratadas eles são poucos e pequenos. Seu tamanho e quantidade aumenta no decorrer do processo, até 24hD

(CRA = 60,3%) e 2dD (CRA = 15,5%). A partir de 3dD, coincidindo com a mudança de fixador aquoso para não aquoso, eles não foram mais observados. Somente em 8dD (CRA = 3,7%), e não em 7dD (CRA = 12,1%) nem em 9dD (CRA = 0%), os glóbulos elétron-densos voltaram a ser observados, em tamanho e quantidade semelhantes a 2dD.

Não apenas em espécies tolerantes à dessecação ocorre esse mecanismo de armazenamento e proteção do excedente (mesmo que temporário) de lipídios. NIR e colaboradores (1969) acompanharam o estresse hídrico de milho, espécie sensível à dessecação e observaram o aparecimento de gotas de lipídios perto da membrana plasmática. Quando a intensidade da dessecação não era letal, essas gotas desapareciam durante a re-hidratação. A formação de glóbulos deve ser, portanto, a forma mais espontânea e estável para o armazenamento de lipídios durante o processo de perda de água.

Durante a dessecação de Xerophyta plicata o citoplasma vai se condensando e movendo-se em direção a porção central da célula, permanecendo ligado às paredes por fios ou faixas de material citoplasmático. O núcleo é a organela que sofre menos alterações nesse processo, durante a perda da água, o núcleo altera sua forma, de alongada para irregular.

A manutenção do núcleo em estado intacto nas células revivescentes desseçadas é consistente com a hipótese de GAFF e colaboradores (1976) que nessas células as alterações ultra-estruturais ocorrem de maneira limitada e orientada, de modo a conservar as estruturas vitais e reativar o metabolismo rapidamente durante a re-hidratação. Colaborando com a rápida reativação metabólica, o nucléolo é mantido mesmo em células com CRA muito baixo. Em folhas secas de Borja nitida, espécie tolerante à dessecação, o núcleo também permanece intacto durante o estado seco (GAFF et al., 1976).

Em células hidratadas do mesofilo de Xerophyta plicata, muitos ribossomos são observados por todo o citoplasma, na forma livre, como parte do retículo endoplasmático rugoso (RER) ou ligados à membrana externa do núcleo. Em 2hD (CRA = 81,39%) os ribossomos são observados em pequena quantidade, mas em 10hD

(CRA = 81,86%) eles são vistos em quantidade maior, principalmente na forma de RER, próximos à parede celular. A partir de 24hD torna-se muito difícil observar ribossomos talvez porque o citoplasma apresente muita granulação.

Em folhas secas de Borja nitida também não são observados polissomos nas etapas mais avançadas da dessecação (GAFF et al., 1976).

O retículo endoplasmático é visto em Xerophyta plicata só até 24hD. Em 2dD, ainda com fixação em meio aquoso, ele não é mais observado.

Com relação à presença de polissomos e à ocorrência de síntese protéica, BEWLEY & LARSEN (1980) estudaram o efeito de estresse hídrico letal e não letal em espécies sensíveis à dessecação. Nas plantas sensíveis estudadas, mesmo quando o estresse foi letal, não permitindo a volta da síntese protéica com a re-hidratação, não houve perda total dos ribossomos. O estresse letal afetou a capacidade dos ribossomos em se combinar com o mRNA e de conduzir a síntese protéica in vivo. Os ribossomos de células submetidas a estresse letal permaneceram na célula por cerca de duas horas após a re-hidratação, indicando que os eventos degradativos não começam logo em seguida.

Uma vez que a parada da síntese protéica durante a dessecação, em plantas sensíveis, não é devida a degradação ou perda dos ribossomos (BEWLEY & LARSEN, 1980) outros fatores, como alterações na estrutura das membranas celulares (DHINDSA & CLELAND, 1975) e a redução da atividade mitocondrial, levando ao declínio da quantidade de ATP (BEWLEY & LARSEN, 1980), devem ser responsáveis por esse efeito.

Em plantas tolerantes à dessecação esse quadro é bastante variável, a começar pela diminuição acentuada dos ribossomos e conservação da estrutura das mitocôndrias até baixos CRA em algumas espécies, como em Xerophyta plicata, e não em outras, como em Tortula ruralis, que conserva os ribossomos nas células desseçadas (BEWLEY, 1972, 1973). Além disso, existem resultados mostrando a conservação de ATP em células no estado seco de algumas espécies tolerantes à dessecação (GAFF & ZIEGLER, 1989).

Uma organela muito difícil de ser observada em Xerophyta plicata, em qualquer etapa da dessecação, é o dictiossomo. Ele não têm uma posição preferencial na célula, não se dispõe em grupos e é formado por apenas 2 a 4 pequenos sáculos.

Num tecido em crescimento como folhas de plântulas, em que o dictiossomo deveria estar envolvido com a formação da parede celular era esperada uma quantidade maior dessa organela.

Durante a compactação do citoplasma, a partir de 3dD, as unidades sub-celulares (organelas) ainda são distinguíveis em Xerophyta plicata, pelas diferenças de elétron-densidade e por estreitas e descontínuas faixas elétron-lúcidas (brancas). A não identificação de membranas delimitantes coincide com a mudança do veículo do fixador, que passa a ser não aquoso. Nas fases seguintes a distinção entre os remanescentes de organelas passa a ser basicamente devida a diferenças na compactação do material. Em fases além de 3dD somente o núcleo e os remanescentes de cloroplastos podem ser identificados. As outras organelas passam a fazer parte da massa citoplasmática, não sendo identificáveis. Em 7dD pequenos grãos de amido lentiformes são observados, indicando a localização dos remanescentes dos cloroplastos.

Em 8dD as características das células diferem das apresentadas por células de folhas com 7 e 9dD. Isso pode ser resultado da variação individual das plantas. Nessa fase, 8dD, são observados glóbulos elétron-densos e plastoglóbulos, além de grãos de amido. O aspecto das organelas, no entanto, não difere do aspecto das fases adjacentes.

Aos 9dD o amido não é mais observado e os cloroplastos são identificados pela imagem negativa dos plastoglóbulos e pela forma redonda, delimitada por uma faixa elétron-lúcida estreita. O aparecimento dessa delimitação elétron-lúcida das organelas, em lugar de membranas típicas foi discutido anteriormente.

A degradação ultra-estrutural de células de plantas revivescentes durante a perda da água ocorre em grande escala, mas não atinge indiscriminadamente todas as organelas. É possível perceber a manutenção de um nível básico de organização celular mesmo nas células desseçadas, incluindo a identificação de

cloroplastos e mitocôndrias, embora bastante modificados e a conservação do núcleo, praticamente intacto, com forma não muito alterada, até no estado seco (GAFF et al., 1976).

GAFF e colaboradores (1976) observaram que células dessecadas viáveis de Borya nitida apresentam degeneração do citoplasma, indefinição das membranas limitantes de cloroplastos e mitocôndrias e perda dos grana e dos grãos de amido, mas o núcleo, porém, mantém sua integridade e apresenta um nucléolo. Aparentemente as alterações induzidas pelo estresse em plantas revivescentes são muito semelhantes às que ocorrem em espécies sensíveis à dessecação, mas vão até um nível em que as estruturas remanescentes são suficientes para iniciar o processo de reconstrução da ultra-estrutura das células (GAFF et al., 1976; SCHWAB et al., 1989).

A dessecação em células do mesofilo pode ser comparada com os processos de senescência, que levam à inviabilidade celular, com base nas semelhanças entre os processos e fases de dessecação e senescência foliar.

Segundo GAMALEI (1975 apud VORONIN et al., 1991), o volume relativo ocupado pelos plastoglóbulos no cloroplasto aumenta com o passar do tempo, servindo como o único marcador de idade para cloroplastos individuais. A quantidade de plastoglóbulos aumenta visivelmente nos cloroplastos de Xerophyta plicata em processo de dessecação. A partir de 3dD, coincidindo com a fixação em veículo não aquoso, eles passam a ser dificilmente observados. Esse aumento reversível da quantidade de plastoglóbulos durante a dessecação, pode ser comparado com o que ocorre no processo de senescência.

O começo da senescência foliar compromete a habilidade de Borya nitida, espécie tolerante, em sobreviver à dessecação (GAFF et al., 1976). Esse é um dado importante para a diferenciação entre os processos de dessecação em plantas revivescentes e sua senescência: O processo de senescência em plantas tolerantes tem fases e características celulares diferentes da dessecação nessas mesmas espécies. A senescência promove a desintegração das membranas celulares, rompendo os compartimentos sub-celulares

fundamentais para o desenvolvimento das alterações ultra-estruturais de preparo para uma situação de viabilidade celular durante a seca. O rompimento dos limites sub-celulares impede a manutenção ou a re-aquisição dos diferentes pHs em cada organela, responsáveis pelo funcionamento das enzimas características de cada organela e do qual dependem os sistemas metabólicos celulares (GUERN et al., 1991). A desintegração das membranas, associada aos efeitos do estresse hídrico levam a uma desorganização celular letal (GAFF et al., 1976). Daí sugerimos que a membrana é uma estrutura fundamental para a manutenção da viabilidade celular em baixo conteúdo relativo de água, CRA, portanto para a tolerância à dessecação. As membranas celulares têm que ser protegidas e mantidas intactas durante todo o processo ou tem que ser as primeiras a serem reorganizadas na re-hidratação, pois da compartimentalização sub-celular dependem todos os sistemas metabólicos da célula (GUERN et al., 1991).

Revivescência

Sugerimos que os termos re-hidratação e revivescência referem-se a eventos diferentes. A re-hidratação refere-se à entrada de água na planta, nos tecidos ou nas células e apenas às suas conseqüências físicas, ou seja morfológicas. A revivescência é a resposta metabólica (que implica em alterações morfológicas, também) à entrada de água na célula. A re-hidratação pode ocorrer, até certo ponto, em uma folha dessecada não-viável, por capilaridade, por exemplo. Já a revivescência só ocorre em células dessecadas viáveis, ou seja, só nas plantas tolerantes à dessecação. A revivescência é a resposta morfo-metabólica responsável pela reorganização e re-ativação das células de plantas tolerantes à dessecação quando ocorre a re-hidratação.

O gráfico 1, apresentado junto com os resultados, mostra que a re-hidratação segue o mesmo padrão da perda de água. Nas primeiras 10 horas ocorre um ganho de água rápido e irregular, de cerca de 25%. Após esse período a entrada de água fica um pouco

mais lenta e mais regular.

Várias espécies de plantas tolerantes à dessecação foram acompanhadas por WELLBURN & WELLBURN (1976) quanto à velocidade de re-hidratação e revivescência. Entre Myrothamnus flabellifolia Welw. (Hamamelidae), Anastatica hierochuntica L. (Cruciferae) e Selaginella dregei (C. Presl) Hieron., as taxas de re-hidratação foram bastante diferentes e, dentro de uma mesma folha, puderam ser observadas células com morfologias indicando estarem em diferentes etapas da revivescência num mesmo momento (WELLBURN & WELLBURN, 1976).

As células desseccadas de plantas tolerantes à dessecação provavelmente contém as organelas essenciais para a reativação do metabolismo, com a volta da água, mas estão muito condensadas, de uma maneira que é difícil reconhecê-las em micrografias eletrônicas (HALLAM & LUFF, 1980).

A folha de Xerophyta plicata seca há duas semanas, com CRA de 1,7%, apresenta-se bastante semelhante a folha de BdD (CRA = 3,8%), com pequenos grãos de amido, glóbulos elétron-densos e plastoglóbulos. Além dos remanescentes de cloroplastos, o núcleo também pode ser identificado.

Com 1hR o conteúdo relativo de água aumenta para 10,7% e algumas alterações ultra-estruturais ocorrem, como o aumento da elétron-densidade da periferia do citoplasma e, mesmo com a fixação não aquosa, o aparecimento de membranas típicas dentro de vesículas da periferia do citoplasma, indicando a ocorrência de atividade metabólica na célula. Como as mitocôndrias ainda não são identificáveis nessa fase da revivescência, acreditamos que elas ainda estejam inativas. Assim, a atividade metabólica detectada nessa fase poderia estar sendo subsidiada por ATP armazenado na célula durante a dessecação e mantido durante o estado dessecado. Sugerimos ainda que, além da produção dessas membranas, o ATP armazenado também deva permitir o início da atividade metabólica de reparo, principalmente o das próprias mitocôndrias, logo no início da re-hidratação.

A folha de 2hR, embora tenha CRA só um pouco maior (11,1%) que a de 1hR, apresenta o citoplasma bem mais frouxo que nas

células da fase anterior. O núcleo, de forma irregular e sem delimitação aparente, aparece em processo avançado de descondensação da cromatina. Como essas alterações parecem ser respostas físicas à re-hidratação, muito mais do que metabólicas, a diferença entre essas duas fases, que tem CRAs muito próximos, poderia ser explicada pelo fator tempo.

De 0hR a 4hR (CRA = 21,4%) ocorre um aumento na quantidade de glóbulos elétron-densos no citoplasma. Nesse intervalo de tempo todas as fixações foram procedidas em veículo não aquoso. Isso indica que o desaparecimento dos glóbulos elétron-densos nas fases finais de dessecação, menos em 8dD, não é devido ao veículo do fixador, DMSO. Sugerimos que isso possa estar relacionado com uma grande compactação ou alteração da organização molecular dos lipídios, que alteraria a reatividade ao tetróxido de ósmio.

No musgo Tortula ruralis, tolerante à dessecação, muitos corpos elétron-densos foram observados em células hidratadas e desseçadas, sem que qualquer estrutura membranosa tenha sido observada em associação com eles ou emanando deles. A partir dessa observação SINGH e colaboradores (1984) sugerem que os corpos elétron-densos não sejam uma fonte específica e direta de fosfolipídios para a membrana plasmática. Em nossas observações da revivescência de Xerophyta plicata obtivemos um resultado inverso ao de SINGH e colaboradores (1984). Pudemos ver em 4hR um vacúolo contendo dois grandes glóbulos elétron-densos de onde saem membranas enoveladas. Sobre a região de saída das membranas são vistos pontos elétron-densos, que podem ser ribossomos. Embora isso tenha sido observado em apenas uma célula, não creditamos essa imagem a artefato de técnica, pois a preservação do resto do citoplasma é satisfatória. Acreditamos que a observação de apenas um caso possa ser devida à rapidez com que ocorre essa transformação, pois na fase seguinte, 10hR, muito poucos e pequenos glóbulos elétron-densos foram observados.

A única descrição semelhante encontrada na literatura, citando a associação de glóbulos elétron-densos com membranas, é bastante recente. TIWARI e colaboradores (1990) observaram durante o processo de dessecação do pólen de Pyrus communis

várias estruturas chamadas de corpos densamente osmiofílicos, semelhantes aos glóbulos elétron-densos observados em Xerophyta plicata, mas com formato não globular. Estes autores propõe que eles sejam formados como resultado da separação dos lipídios de membranas, ao longo da perda de água. Nesses corpos densamente osmiofílicos foram observadas multilamelações, interpretadas como um passo intermediário na conversão dos lipídios de membrana em corpos lipídicos (TIWARI et al., 1990). Nossas observações sobre a natureza lipídica dos glóbulos elétron-densos de Xerophyta plicata, por meio da reação de imidazol, e da formação de membranas a partir deles são bastante consistentes com estas observações TIWARI e colaboradores (1990).

Até 4hR, as membranas que são observadas em contraste positivo estão voltadas para fora do citoplasma, no espaço de retração entre ele e as paredes celulares, ou dentro de vacúolos periféricos, mas não aparecem delimitando organelas. Em 10hR (CRA = 25%), coincidindo com a mudança de fixador não aquoso para fixador aquoso, passam a ser vistas membranas delimitantes das organelas e vacúolos, que agora ocupam todo o espaço intracelular. Em 10hR são distinguidos cloroplastos, mitocôndrias e o núcleo, com a cromatina bem descompactada.

Em 10hR os cloroplastos têm aspecto muito semelhante aos de 2dD. São redondos, contendo pequenas vesículas e poucos plastoglóbulos.

GAFF e colaboradores (1976) observaram que a reorganização dos cloroplastos, durante a revivescência de Borja nitida, envolve a re-habilitação dos remanescentes dessas organelas e não a produção de novas organelas. No interior dos remanescentes de cloroplastos proliferam vesículas, que se achatam na forma de discos e ligam-se ponta-a-ponta para formar os tilacóides. Estes empilham-se formando os grana. Esse processo é igual ao que foi acompanhado na revivescência de Xerophyta villosa (HALLAM & GAFF, 1978) e de Xerophyta plicata, no presente trabalho.

A partir de 12hR, com CRA de 23,4% (mais baixo que o de 10hR), o aspecto do mesofilo de Xerophyta plicata assemelha-se ao de folhas hidratadas: o citoplasma voltou a ser parietal, o

vacúolo passou a ser um só (ou no máximo dois) grande e central. O mesmo foi demonstrado para Borhya nitida, porém só com 3 dias de re-hidratação os vacúolos terminam de se reunir para formar um vacúolo grande e central (HALLAM & GAFF, 1978).

Em 12hR os cloroplastos de Xerophyta plicata, que eram todos redondos e vesiculados em 10hR, passaram a se apresentar de formas diferentes dentro de uma mesma célula, mais e menos reorganizados. Alguns ainda são arredondados e outros já são lentiformes, com algumas vesículas e alguns pequenos tilacóides. Nesta fase, mesmo nos cloroplastos menos diferenciados, onde ainda não existem tilacóides, podem ser vistos pequenos grãos de amido. Devido à variação individual que deve ocorrer entre as células, isso pode indicar que alguns grãos de amido não foram totalmente hidrolizados durante a dessecação.

HALLAM & GAFF (1978) mostraram que a estrutura interna dos cloroplastos de Xerophyta villosa termina de se reorganizar com 24 horas de re-hidratação e a fotossíntese não começa até que toda a estrutura interna esteja reorganizada. Os autores sugerem que os grãos de amido que aparecem antes disso podem ser provenientes de açúcares menores pré-existentes, que foram mantidos no estado seco, não sendo produtos novos de fotossíntese. Eles podem ser produto da reorganização dos açúcares solúveis que excederam as necessidades energéticas da revivescência.

Em Xerophyta plicata, o número de glóbulos elétron-densos decresceu em relação a 4hR e manteve-se constante desta fase até 2dR. O decréscimo deles é compreensível e esperado, se os considerarmos como responsáveis pelo armazenamento de lipídios de membranas, excedentes no estado seco (TIWARI et al., 1990). A partir de 4hR ocorre o rápido aparecimento de membranas nas células, com a utilização dessas reservas de lipídios

A distensão das paredes celulares ocorre gradualmente de 0hR até 12hR, onde não aparecem mais dobras ou ondulações. Nesse período ocorre a distensão da folha, que pode ser acompanhada por cortes semi-finos. A partir dessa fase, as paredes celulares ficam menos quebradiças..

A partir de 12hR (CRA = 23,4%) outras organelas podem ser observadas, como o retículo endoplasmático rugoso, os ribossomos livres e os peroxissomos. É possível inferir que, a partir dessa fase, a síntese protéica esteja reativada, participando dos reparos finais da célula e sintetizando novas enzimas para o metabolismo vegetativo da folha.

As alterações ultra-estruturais que acontecem em seguida são relativas à estrutura interna das organelas, como a finalização da organização dos tilacóides e dos grana e a formação das cristas nas mitocôndrias. Outras alterações que ocorrem, como o aumento dos grãos de amido e mudanças consequentes no formato dos cloroplastos, parecem ser consequências da retomada da atividade metabólica vegetativa de crescimento da célula.

Aos 2dR a plântula de Xerophyta plicata apresenta CRA de 46,3%, a ultra-estrutura já está reorganizada e a folha já está metabolicamente ativa, verde e com cloroplastos contendo grãos de amido que estão aumentando de tamanho. Os cloroplastos já estão na forma reorganizada, mas contém menos tilacóides que cloroplastos hidratados (em 0hD).

Em folhas re-hidratadas de Borya nitida, GAFF & HALLAM (1976) observaram muitos cloroplastos reorganizados, embora alguns plastídios da mesma célula apresentem apenas vesículas, ainda não achatadas para formar os tilacóides. Segundo esses autores, isso pode ser uma indicação de que a reorganização dos cloroplastos é determinada em parte por algum fator endógeno do plastídio, em vez de ser determinada pela célula como um todo.

Cloroplastos re-hidratados de Borya nitida apresentam número de tilacóides e de grana maior que o encontrado nas mesmas células antes da dessecação (GAFF et al., 1976). Isso não foi verificado para Xerophyta plicata pois o acompanhamento do processo de revivescência baseou-se em caracteres externos da folha, que sugeriam que plântulas com 2dR já estavam totalmente re-hidratadas, quando na verdade tinham CRA de apenas 46,3%.

Não é possível identificar as mitocôndrias em células desseçadas, ao contrário de cloroplastos, que têm certos indicadores (grãos de amido residuais e plastoglóbulos, além de

seu tamanho grande). Somente com 10hR, quando aparecem delimitadas por membranas e com uma ou duas pequenas cristas (fixador em veículo aquoso), é que as mitocôndrias podem ser identificadas. Com 24hR elas se apresentam como em células hidratadas, alongadas ou redondas e justapostas aos cloroplastos, com muitas cristas dilatadas.

O número de mitocôndrias encontradas em células re-hidratadas do mesofilo de Borya nitida é menor que número encontrado nessas células antes da dessecação, entretanto, o número de cristas aumentou nessas organelas (GAFF et al., 1976). Essa comparação não foi feita para Xerophyta plicata, pois a folha de 2dR não apresentava CRA igual à folha totalmente hidratada, como mencionado acima.

O núcleo pode ser observado desde 0hR em Xerophyta plicata. A partir de 2hR a cromatina começa a se descondensar (embora não estivesse muito condensada mesmo na célula dessecada) e em 10hR a cromatina já está bastante descondensada, embora o núcleo ainda mostre-se com forma irregular.

CREVECOEUR e colaboradores (1976) observaram que embriões de milho, sensíveis à dessecação, mostram a cromatina condensada quando submetidos ao estresse de falta de água. Na re-hidratação desses embriões sensíveis ocorre a quebra da membrana plasmática e nuclear, que leva à perda da compartimentalização do citoplasma. Além disso, a cromatina permanece definitivamente condensada, perdendo sua função de regulação gênica (CRÈVECOEUR et al., 1976).

Plantas revivescentes e sementes apresentam semelhanças em seus processos de re-hidratação. Ambas são conjuntos de células que permanecem viáveis durante o período de seca, com a manutenção dos sistemas enzimáticos que permitem a reativação do metabolismo assim que a água esteja disponível. É importante lembrar, no entanto, que embriões de sementes são compostos por células não diferenciadas, portanto bastante versáteis, enquanto plantas revivescentes são compostas por células totalmente diferenciadas e que devem reorganizar sua ultra-estrutura e seu funcionamento fisiológico já especializado (HALLAM & GAFF, 1978).

Também é importante lembrar que embriões com algum tempo de germinação nem sempre são tolerantes à um estresse de falta de água, devido à sua já maior diferenciação celular.

Dessecação e Revivescência em Xerophyta plicata

A hipótese inicial desse trabalho era que as alterações ultra-estruturais em resposta à saída ou entrada de água fossem dependentes e quase que diretamente ligadas ao CRA. Por isso, nós utilizamos o tempo de dessecação ou re-hidratação apenas como um indicativo progressivo desses processos. Os resultados, no entanto, mostram que as alterações devem responder a um sinal iniciador (que pode até ser o CRA ou sua variação e/ou o tempo de perda ou ganho de água) e depender de que o processo esteja em curso, ou seja, que a planta não pare de perder ou ganhar água no meio do processo. Os resultados também indicam que o fator tempo influencia os processos de dessecação e revivescência. Assim, optamos por relatar os resultados e discutí-los com base nos dois parâmetros, CRA e tempo.

Os processos físicos de entrada e saída de água em Xerophyta plicata seguem o mesmo padrão. Nas primeiras 10 horas de ambos, o processo é rápido e irregular, mas a variação do conteúdo hídrico não passa de 30% (Fase I). Nas horas seguintes o processo passa a ser mais lento e linear (Fase II).

Ambos os processos têm três fases de resposta celular à alteração do conteúdo hídrico. Uma fase inicial de ausência de resposta metabólica, que na dessecação é mais longa que na revivescência, onde as alterações são devidas aos efeitos mecânicos de saída ou entrada de água na célula, respectivamente. Segue uma fase intermediária, onde ocorre resposta metabólica, causando modificações na estrutura celular e na distribuição e ultra-estrutura das organelas. A terceira fase caracteriza-se por alterações mais lentas, marcadas, na dessecação, por alterações na compactação do material citoplasmático e, na revivescência, por alterações causadas pela volta do metabolismo vegetativo de

folhas em crescimento (no caso de plântulas), como a produção de grãos de amido.

Na Fase I da perda de água, poucas alterações de forma e volume das células e das organelas são detectadas. Nessa fase, a planta não responde metabolicamente à variação do conteúdo hídrico. A partir de 10hD (CRA = 81,86%, perda de 18,4%), começa a Fase II, quando também começa a resposta metabólica das células. O metabolismo celular, incluindo a hidrólise do amido, pode estar contribuindo para que a saída da água seja mais lenta nessa Fase II. As etapas passam a ter características ultra-estruturais bem marcadas, até 3dD (CRA = 7,9%, perda de 92,1%), quando parece que as alterações chegaram ao máximo e passam a ser muito pequenas a partir daí, limitando-se ao aumento da condensação do material citoplasmático.

Na revivescência, no entanto, a Fase I de entrada de água, é acompanhada, desde 4hR por resposta metabólica celular à variação do conteúdo hídrico. Em 2hR (CRA = ganho = 11,1%) as poucas alterações ainda parecem ser somente consequências físicas da entrada de água nas células, mas em 4hR (CRA = ganho = 21,4%) são observadas vesículas que se formam para fora do citoplasma, em direção ao espaço de retração formado entre ele e as paredes. A formação dessas vesículas indica a ocorrência de alguma atividade metabólica, não sendo uma simples resposta física à entrada de água.

Nas células dessecadas de Xerophyta plicata, o citoplasma encontra-se na forma de uma massa compacta na porção central da célula, mas permanece ligado à parede celular por fios citoplasmáticos. Durante a dessecação, o processo de deslocamento das organelas da posição parietal para central ocorre ao mesmo tempo em que modificações na forma de cada organela estão acontecendo.

Em células vegetais hidratadas, a manutenção das organelas em posição parietal é devida em grande parte à presença de um grande vacúolo central, que pressiona as organelas em direção à parede celular. A ausência de efeito da força de gravidade sobre a distribuição das organelas no citoplasma indica a ocorrência de

alguma estrutura que mantenha o posicionamento das organelas nos diferentes pontos da célula. A observação de movimentos não aleatórios das organelas dentro de células vegetais (por exemplo na alga Spirogyra sp.) indicou que essa estrutura também é dinâmica. Assim, a translocação de organelas (transporte e posicionamento) dentro do citoplasma de células vegetais eucarióticas em intérfase é atribuída, assim como nas células animais, a dois tipos de componentes celulares de orientação vetorial, os microtúbulos e os microfilamentos, incluindo f-actina, que formam o citoesqueleto (DOLDER, 1987; PARTHASARATHY & PESACRETA, 1980; PESACRETA et al., 1982; WILLIAMSON, 1986; WAGNER, 1979 apud GRODIG, 1990). O citoesqueleto vegetal foi encontrado em forte associação com o retículo endoplasmático, plasmalema, tonoplasto, núcleo, cloroplasto, mitocôndrias e microcorpos (PARTHASARATHY & PESACRETA, 1980; PESACRETA et al., 1982). Ao contrário de células animais, onde a translocação de organelas deve-se principalmente aos microtúbulos, nas células vegetais ela é feita principalmente pelo sistema actomiosina, que compõe os microfilamentos (WILLIAMSON, 1986; WAGNER, 1979 apud GRODIG, 1990).

O estudo do movimento das organelas em células vegetais, com a utilização de inativadores de actina e de microtúbulos, mostrou que o movimento de cloroplastos e de outras organelas requer a cooperação de microtúbulos e actina. As funções conhecidas do citoesqueleto em células vegetais são o movimento do núcleo para sítios específicos durante a citomorfogênese, os movimentos dos cromossomos no fuso, durante a divisão celular e movimentos das vesículas do dictiossomo durante a citocinese, entre outras (WILLIAMSON, 1986).

Além do transporte e posicionamento, a forma das organelas também parece depender de microfilamentos, em células vegetais, como visto para o retículo endoplasmático (QUADER et al., 1987; QUADER et al., 1989 apud GRODIG, 1990).

A ocupação do citoplasma por vesículas durante a dessecação, em Xerophyta plicata e em outras espécies revivescentes anteriormente citadas, é um processo concomitante com o

deslocamento das organelas da porção parietal para a central da célula. Após o deslocamento das organelas, as vesículas deixam de ser observadas por toda a extensão do espaço intra-celular.

Observamos que o processo de formação de vesículas que ocupam o espaço intracelular de Xerophyta plicata durante a revivescência é inverso ao que ocorre na dessecação. As vesículas saem do centro, onde está o citoplasma compacto, para a periferia da célula e vão formar vias de comunicação direta entre o citoplasma e a região parietal da célula. Durante a dessecação, o vacúolo, único e central nas células hidratadas, é aparentemente multiplicado pela formação de inúmeras vesículas dentro do citoplasma e a partir da membrana do vacúolo (tonoplasto). Essa ocupação do espaço intracelular por vesículas permite a comunicação citoplasmática direta entre os diferentes pontos do espaço intracelular, que antes eram inacessíveis, pela presença do vacúolo. As faixas de citoplasma que atravessam a célula, por entre as vesículas, servem como vias de conexão entre todas as partes do interior da célula. Sugerimos que microtúbulos e microfilamentos do citoesqueleto possam estar se formando por meio dessas vias de conexão. Sua função seria transportar as organelas, da periferia para a porção central da célula, no caso da dessecação e daí para periferia, na revivescência.

Em 10hR (ganho de água de 21,4%) o aspecto ultra-estrutural das células do mesófilo de Xerophyta plicata é muito semelhante ao observado em 2dD (CRA = 15,5%, perda de 84,5%), onde o citoplasma é formado por estruturas globulares e muitas vesículas e preenche todo o espaço intracelular. Esse aspecto também é observado nas folhas secas controle e onde o tampão imidazol foi utilizado (CRA = 9%). Essas três folhas foram fixadas com mesmo tipo de veículo, aquoso. A ocorrência de uma mesma característica ultra-estrutural em folhas sob diferentes condições (com tempos diferentes de estresse e em recuperação após um estresse) sugere que as etapas da resposta celular à dessecação ou à re-hidratação sejam relativamente independentes do CRA e da variação do CRA. Concordamos com a idéia de GAFF & LOVEYS (1984 apud SCHWAB et al., 1989) que os dois processos devem ser iniciados em resposta a

um ou mais sinais de iniciação e que sua velocidade não seja controlada diretamente pelo fator conteúdo (ou variação do conteúdo) de água.

Nossos resultados indicam que as etapas de revivescência são as mesmas, embora invertidas, que as etapas do processo de dessecação. Assim, devem ter ocorrido grandes alterações ultra-estruturais no intervalo entre 10hR e 12hR, correspondendo ao observado em 24hD (citoplasma parietal e cloroplastos redondos) e 10hD (cloroplastos lentiformes e observação de RE e ribossomos), pois em 12hR (ganho de água = 23,4%) a célula já pode ser considerada reorganizada em sua estrutura básica: citoplasma parietal, núcleo com cromatina descondensada e nucléolo grande, cloroplastos lentiformes e já alguns tilacóides, mitocôndrias alongadas e redondas e retículo endoplasmático.

No período inicial de perda de água as células do mesofilo de Xerophyta plicata não respondem metabolicamente ao estresse.

No processo de re-hidratação, a resposta metabólica começa com menos tempo de estresse que no processo de perda de água (4hR contra 10hD), mas em termos de alteração do CRA, a resposta celular à perda de água é um pouco mais rápida que a resposta à volta da água (perda de 18,4% contra ganho de água 21,4%).

Em Xerophyta plicata, o processo de resposta metabólica à dessecação levou 62 horas (de 10hD a 3dD) ao passo que a revivescência levou 20 horas (de 4hR a 24hR). Nesse caso isso pode ser devido a uma maior complexidade do processo de dessecação em relação ao processo de revivescência, mas também pode ter sido provocado pelas condições artificiais em que ocorreram, onde o ganho de água foi bastante facilitado pelo fato so substrato das plântulas ter ficado saturado de água durante todo o experimento.

Nós consideramos o processo celular da dessecação uma resposta metabólica a um estresse hídrico, ao passo que a revivescência consiste na reorganização celular em resposta ao fim do estresse hídrico.

Com este trabalho de tese procuramos responder questões básicas e iniciais com respeito ao mecanismo celular de

tolerância à dessecação em uma Angiosperma brasileira e buscamos acrescentar informações ao conhecimento já existente sobre essa espécie, Xerophyta plicata Spreng. (Velloziaceae) (MEGURO et al., 1977; MEIRELLES, 1990).

Os resultados obtidos e sua discussão geraram uma nova série de sugestões, ainda por investigar:

- O processo de dessecação parece ser mais complexo que o de revivescência, pois deve garantir a manutenção de remanescentes de estruturas sub-celulares em estado viável para a reconstrução de toda a ultra-estrutura celular e dos sistemas metabólicos.

- A formação de vesículas que ocupam todo o espaço interno da célula, durante a dessecação e durante a revivescência, parece ser responsável pela formação de vias de comunicação diretas entre as diferentes partes do espaço sub-celular, por onde sugerimos que devem se formar microfilamentos, responsáveis pelo transporte das organelas para o centro da célula, na dessecação e para a periferia, na revivescência.

- A utilização de fixadores não aquosos deve ser necessária ao estudo de estruturas celulares muito reativas à água, quando estão no estado dessecado ou com pouca água. O fixador não aquoso não deve evitar as alterações físicas causadas pelo meio aquoso, mas sim as alterações metabólicas provocadas pela água.

Conclusões

- As alterações morfo-metabólicas que ocorrem nos processos de dessecação e revivescência não são diretamente ligadas ao CRA e à variação do CRA. As alterações físicas (mecânicas) apresentam relação com o tempo de alteração do CRA.

- Fases da resposta metabólica à perda da água em Xerophyta plicata: dilatação das organelas, formação de vesículas que ocupam todo o espaço interno da célula, deslocamento das organelas para a porção central da célula e compactação do protoplasma. As fases da revivescência são as mesmas, em ordem invertida.

Referências

- BARRS, H.P. (1968). Determination of water deficits in plant tissues. In: KOZLOWISKI, T.T. ed. Water deficits and plant growth, vol. I, pags. 235-368. Academic Press, New York.
- BEWLEY, J.D. (1972). The conservation of polyssomes in the moss Tortula ruralis during total desiccation. J.Exp.Bot. 23: 629-8.
- BEWLEY, J.D. (1973). Desiccation and protein synthesis in the moss Tortula ruralis. Can.J.Bot. 51: 203-6.
- BEWLEY, J.D. (1979) Physiological aspects of desiccation tolerance. Ann.Rev.Plant Physiol. 30: 195-238.
- BEWLEY, J.D. & KROCHKO, J.E. (1982). Desiccation tolerance. pags. 325-78. In: LANGE, O.L.; NOBEL, P.S.; OSMOND, C.B. & ZIEGLER, H. eds. Encyclopedia of plant physiology- New sciences, vol. 12B: Physiological plant ecology - Water relations and carbon assimilation. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- BEWLEY, J.D. & LARSEN, K.M. (1980). Protein synthesis ceases in water-stressed pea roots and maize mesocotyls without loss of polyribossomes. Effects of lethal and non-lethal water stress. J.Exp.Bot. 31: 1245-56.
- BISWAL, U.C. & BISWAL, B. (1988). Ultrastructural modifications and biochemical changes during senescence of chloroplasts. Int. Rev.Cytol. 113: 271-321.
- BOLLER, T. (1982). Enzymatic equipment of plant vacuoles. Physiol.Veg. 20(2): 247-57.
- BONICEL, A. & RAPOSO, N.V.M. (1990). Variation of starch and soluble sugars in selected sections of poplar buds during dormancy and post-dormancy. Plant Physiol.Biochem. 28(5): 577-86.
- BORTLIK, K.; GUT, H. & MATILE, P. (1987). Yellowing and non-yellowing trees: a comparison of protein- and chlorophyll-loss in senescent leaves. Bot.Helv. 97(2): 323-8.
- CAFFREY, M.; FONSECA, V. & LEOPOLD, A.C. (1988). Lipid-sugar interactions. Relevance to anhydrous biology. Plant Physiol. 86: 754-8.

- CHABOT, J.F. & LEOPOLD, A.C. (1982). Ultrastructural changes in membranes with hydration in soybean seeds. Am.J.Bot. 69: 623-33.
- CLEGG, J.S.; SEITZ, P.; SEITZ, W. & HAZLEWOOD, C.F. (1982). Cellular responses to extreme water loss: the water replacement hypothesis. Cytobiol. 19: 306-16.
- COME, D. (1970). Les obstacles a la germination. Masson et Cie., Paris.
- COTTIGNIES, A. (1986-87). Dormance. Annales des Sciences Naturelles, Botanique, Paris. 13^a série, tome 8, pag.93-142.
- CRÈVECOEUR, M.; DELTOUR, R.; BRONCHART, R. (1976). Cytological study on water stress during germination of Zea mays. Planta, 132: 31-41.
- CROWE, J.H. & COOPER, A.F., Jr. (1971). Cryptobiosis. Sci.Am. 225: 30-6.
- DHINDSA, R.S. & CLELAND, R.E. (1975). Water stress and protein synthesis. I. Differential inhibition of protein synthesis. Plant Physiol. 55: 778-81.
- DHINDSA, R.S. & MATOWE, W. (1981). Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defence against peroxidation. J.Exp.Bot. 32: 79-91.
- DOLDER, M.A.H. (1987). Microfilamentos e citoesqueletos. In: Biologia Celular. pags. 139-49. VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S. eds. Livraria Atheneu. Rio de Janeiro, São Paulo.
- DUMAS, C.; KNOX, R.B. & GAUDE, T. (1984). Pollen-pistil recognition: new concepts from electron microscopy and cytochemistry. Int.Rev.Cytol. 90: 239-72.
- ELLEMAN, C.J. & DICKINSON, H.G. (1986). Pollen stigma interactions in Brassica. IV. Structural reorganization in the pollen grains during hydration. J.Cell Sci. 80: 141-157
- FELLOWS, R.D. & BOYER, J.S. (1978) Altered ultrastructure of cells of sunflowers leaves having low water potentials. Protoplasma 93: 381-95.
- GAFF, D.F. (1977) Desiccation tolerant vascular plants of Southern Africa. Decologia 31: 95-109.

- GAFF, D.F. (1987). Desiccation tolerant plants in South America. Oecologia 74(1): 133-6.
- GAFF, D.F. & HALLAM, N.D. (1974). Resurrecting desiccated plants. Bull.Royal Soc.New Zeland, 12: 385-93.
- GAFF, D.F. & LOVEYS, B.R. (1984). Abscisic acid content and its effects during dehydration of detached leaves of desiccation tolerant plants. J.Exp.Bot. 35: 1350-8.
- GAFF, D.F.; ZEE, S.-Y.; O'BRIEN, T.P. (1976) The fine structure of dehydrated and reviving leaves of Borcia nitida Labill.- A desiccation tolerant plant. Aust.J.Bot. 24: 225-36.
- GAFF, D.F. & ZIEGLER, H. (1989). ATP and ADP contents in leaves of drying and rehydrating desiccation tolerant plants. Oecologia, 78: 407-10.
- GAMALEI, Y.V. (1975). Lifetime of chloroplasts in the mesophyll cells of deciduous and evergreen plants. Isitologiya, 17(11): 1243.
- GIULIETTI, A.M.; MENEZES, N.L.; PIRANI, J.R.; MEGURO, M. & WANDERLEY, M.G.L. (1977). Flora da Serra do Cipó (Minas Gerais): Caracterização e lista das espécies. Bolm.Botânica - USP 9: 1-151.
- GLAUERT, A.M. (1975). Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. In A.M. Glauert ed. Practical methods in electron microscopy. North Holand Publishing Co. vol.3. p. 1-207.
- GROLIG, F. (1990). Actin-based organelle movements in interphase Spirogyra. Protoplasma 155: 29-42.
- GUERN, J.; FELLE, H.; MATHIEU, Y. & KURKDJIAN, A. (1991). Regulation of intracellular pH in plant cells. Int.Rev.Cytol. 127: 111-73.
- HALLAM, N.D. (1976) Anhydrous fixation of dry plant tissue using non-aqueous fixatives. J.Microsc. 106: 337-42.
- HALLAM, N.D. & GAFF, D.F. (1978) Re-organization of fine structure during rehydration of desiccated leaves of Xerophyta villosa. New Phitol. 81: 349-55.

- HALLAM, N.D. & LUFF, S.E. (1980) Fine structural changes in the leaves of the desiccation tolerant plant Talbotia elegans during extreme water stress. Bot.Gaz. 141(2): 180-7.
- HAYAT, M.A. (1970). Principles and techniques of electron microscopy. vol. I. Van Nostrand Reinhold Company. New York, Cincinnati, Toronto, London, Melbourne.
- HEBER, U. & SANTARIUS, K.A. (1964). Loss of adenosine triphosphate synthesis caused by freezing and its relationship to frost hardiness problems. Plant Physiol. 39: 712-9.
- HETHERINGTON, S.E.; HALLAM, N.D. & SMILLIE, R.M. (1982) Ultrastructural and compositional changes in chloroplasts thylakoids of leaves of Borhya nitida during humidity-sensitive degreening. Aust.J.Plant Physiol. 9: 601-9.
- HILL, A.G.G. & CAMPBELL, G.K.G. (1949). Prolonged dormancy of deciduous fruit-trees in warm climates. Empire J.Exp.Agr., 17: 259-64.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. (1938). The water-culture method for growing plants without soil. Univ.Calif.Agric.Expt.Stn. Circ., 347.
- HSIAO, T.C. (1973) Plant responses to water stress. Ann.Rev. Plant Physiol. 24: 519-70.
- IRIGOYEN, J.J.; EMERICH, D.W. & SÁNCHEZ-DÍAZ, M. (1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfafa (Medicago sativa) plants. Physiol.Plant. 84: 55-60.
- JOLY, A.B. (1970). Conheca a vegetação brasileira. São Paulo, EDUSP/Polígono.
- KAISER, K.; GAFF, D.F. & OUTLAW, W.H., Jr. (1986). Sugar content of leaves of desiccation sensitive and desiccation tolerant plants. Naturwissenschaften 85: 608-9.
- KEILIN, D. (1959). The Leeuwenhoek Lecture. The problem of anabiosis or latent life: history and current concept. Proc. Roy.Soc., London (B), 150:49-191.
- KELLER, F. & MATILE, Ph. (1985). The role of the vacuole in the storage and mobilization of stachyose in tubes of Stachys sieboldii. J.Plant Physiol. 119: 369-80.

- KERHOAS, C.; GAY, G. & DUMAS, C. (1987). A multidisciplinary approach to the study of the plasma membrane of Zea mays pollen during controlled dehydration. Planta 171: 1-10.
- KIERNAN, J.A. (1981). Histological and histochemical methods. Theory and practice. cap. 2, Fixation, pags. 8-24; cap. 12, Lipids, pags. 169-189. 344pp.
- LEBKUECHER, J.G. & EICKMEIER, W.G. (1991). Reduced photoinhibition with stem curling in the resurrection plant Selaginella lepidophylla. Decologia 88: 597-604.
- LEIGH, R.A. (1979). Do plant vacuoles degrade cytoplasmatic components? IIBS 4(2): N37-N38.
- LEVITT, J. (1972). Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, New York.
- LEVITT, J. (1980). Responses of plants to environmental stresses, vol. II. Academic Press, New York, 606p.
- LICHTENTHALER, H.K. (1968). Plastoglobuli and the fine structure of plastids. Endeavour 27: 144-9.
- LUZZATI, V. & HUSSON, F. (1962). The structure of liquid-crystal phases of the lipid-water systems. J.Cell.Biol. 12: 207.
- MECKEL, L.; EGLI, D.B.; PHILLIPS, R.E.; RADCLIFFE, D. & LEGGETT, J.E. (1984). Effect of moisture stress on seed growth in soybeans. Agron.J. 76: 647-9.
- MEGURO, M.; JOLY, C.A. & BITTENCOURT, M.M. (1977) Stress hídrico e alguns aspectos do comportamento fisiológico em Xerophyta plicata Spreng.- Velloziaceae. Bol.Botânica Univ.S. Paulo 5: 27-42.
- MEIRELLES, S.T. (1990) Ecologia da vegetação de afloramentos rochosos do litoral sudeste. Tese de Mestrado em Ciências Biológicas, modalidade Ecologia. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- MEYER, B.S. & ANDERSON, D.B. (1952) Plant Physiology. 2nd ed. Chapman et Hall, New York.
- MUSINGO, M.N.; BASHA, S.M.; SANDERS, T.H.; COLE, R.J.; BLANKENSHIP, P.D. (1989). Effect of drought and temperature stress on peanut (Arachis hypogea L.) seed composition. J.Plant Physiol. 134: 710-5.

- NIR, I.; KLEIN, S. & POLJAKOFF-MAYBER, A. (1969). Effect of moisture stress on submicroscopic structure of maize roots. Aust. J. Biol. Sci. 22: 17.
- OLAND, K. (1963). Changes in the content of dry matter and major nutrient elements of apple foliage during senescence and abscission. Physiol. Plant. 16: 682-94.
- OPIK, H. (1985). The fine structure of some dry seed tissues observed after completely anhydrous chemical fixation. Ann. Bot. 56: 453-66.
- PARTHASARATHY, M.V. & PESACRETA, T.C. (1980). Microfilaments in plant vascular cells. Can. J. Bot. 58: 807-15.
- PARTHASARATHY, M.V.; PERDUE, T.D.; WITZTUM, A. & ALVERNANZ, J. (1985). Actin network as a normal component of the cytoskeleton in many vascular plant cells. Amer. J. Bot. 72(8): 1318-23.
- PEARCE, R.S. (1982). Ultrastructure of tall fescue (Festuca arundinacea) cells fixed while exposed to lethal or non-lethal extracellular freezing. New Phytol 92: 259-72.
- PERNER, E. (1965). Planta, 65: 334.
- PESACRETA, T.C.; CARDEY, W.W.; WEBB, W.W. & PARTHASARATHY, M.V. (1982). F-actin in conifer roots. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 2898-2901.
- PLATT-ALDIA, K.A.; LORD, E.M.; DEMASON, D.A. & THOMSON, W.W. (1986). Freeze-fracture observations on membrane of dry and hydrated pollen from Collomia, Phoenix and Zea. Planta 168: 291-8.
- QUADER, H.; HOFMANN, A. & SCHNEPF, E. (1987). Shape and movement of the endoplasmic reticulum in onion bulb epidermis cells: possible involvement of actin. Eur. J. Cell Biol. 44: 17-26.
- QUADER, H.; HOFMANN, A. & SCHNEPF, E. (1989). Reorganization of the endoplasmic reticulum in the epidermal cells of onion bulb scales after cold stress: involvement of cytoskeletal elements. Planta 177: 273-80.
- RAVEN, J.A. (1987). Benefits and costs of vacuolation. pags. 63-5. In: Marin, B. ed. Plant vacuoles. Plenum Press, New York.
- RUPLEY, J.A.; GRATTON, E. & CARERI, G. (1983). Water and globular proteins. TIBS 8(1): 18-22.

- SANTARIUS, K.A. (1973). The protective effect of sugars on chloroplast membranes during temperature and water stress and its relationship to frost, desiccation and heat resistance. Planta, 113: 105-114.
- SCHWAB, K.B. & GAFF, D.F. (1986) Sugar and ion content in leaf tissues of several drought tolerant plants under water stress. J.Plant Physiol. 125:257-65.
- SCHWAB, K.B. & GAFF, D.F. (1990). Influence of compatible solutes on soluble enzymes from desiccation-tolerant Sorobolus stapfianus and desiccation-sensitive Sorobolus pyramidalis. J.Plant Physiol. 137: 208-15.
- SCHWAB, K.B. & HEBER, U. (1984). Thylacoid membrane stability in drought tolerant and drought sensitive plants. Planta, 161: 37-45.
- SCHWAB, K.B.; SCHREIBER, U. & HEBER, U. (1989) Response of photosynthesis and respiration of resurrection plants to desiccation and rehydration. Planta. 177:217-27.
- SIMON, E.W. (1974). Phospholipids and plant membrane permeability. New Phytol. 73: 377-420.
- SINGH, J. (1979). Ultrastructural alterations in cells of hardened and non-hardened winter rye during hyperosmotic and extracellular freezing stresses. Protoplasma, 98: 329-41.
- SINGH, J.; BLACKWELL, B.A.; MILLER, R.W. & BEWLEY, D. (1984). Membrane organization of the desiccation-tolerant moss Tortula ruralis in dehydrated states. Plant Physiol. 75: 1075-9.
- SOARES, M.J. (1989). Detecção de lipídios. In: Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica. vol. II. Citoquímica ultra-estrutural. pags. 14-20. SOUSA, W. ed. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica.
- SPURR, A.R. (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J.Ultrastructure Res. 26: 31-43.
- STEPONKUS, P.L. (1984). Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. Ann.Rev.Plant Physiol. 35: 543-84.
- STODDART, J.L. & THOMAS, H. (1982). Leaf senescence. Encyclopedia of Plant Physiology, New Series 14A: 592-636.

- SZMANT, H.H. (1975). Physical properties of dimethyl sulfoxide and its function in biological systems. Ann.N.Y.Acad.Sci. 243:20-3.
- TAMM, C.O. (1951). Seasonal variation in composition of birch leaves. Physiol.Plant. 4: 461-9.
- THOMSON, W.W. & PLATT-ALOIA, K. (1982). Ultrastructure and membrane permeability in cowpea seeds. Plant Cell Environ. 5: 367-73.
- TIWARI, S.C.; POLITO, V.S. & WEBSTER, B.D. (1990). In dry pear (Pyrus communis L.) pollen, membranes assume a tightly packet multilamellate aspect that disappears rapidly upon hydration. Protoplasma, 153: 157-68.
- VENABLE, J.H. & COGGESHALL, R. (1965). A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. J.Cell Biol. 25: 407-8.
- VORONIN, Y.V.; MANZHULIN, A.V. & ZHIVUKHINA, N.A. (1991). Dimorphism of chloroplasts from mesophyll and sheath cells of the mature Kochia leaf. Sov.Plant Physiol. 38(4): 489-97.
- WAGNER, G. (1979). Actomyosin as a basic mechanism of movement in animal and plants. In: Haupt, W. & Feinleib, M.E. (eds.) Physiology of movements. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 114-25. [Person, A.; Zimmermann, M.H. (eds.) Encyclopedia of plant physiology, new series, vol. 7].
- WALTER, H. (1955). The water economy and the hydrature in plants. Ann.Rev.Plant Physiol. 6: 239-52.
- WELLBURN, F.A.M. & WELLBURN, A.R. (1976). Novel chloroplasts and unusual cellular ultrastructure in the "resurrection" plant Myrothamnus flabelliflora Welw. (Myrothamnaceae). Bot.J.Linnean Soc. 72: 51-4.
- WILLIAMSON, R.E. (1986). Organelle movements along actin filaments and microtubules. Plant Physiol. 82: 631-4.
- WOOLHOUSE, H.W. (1982). Leaf senescence. In: The Molecular Biology of Plant Development cap. 10, pp. 257-81. Smith, H. & Greeson, D. eds. Blackwell Scientific Publications, London.
- YOO, B.Y. (1970). Ultrastructural changes in cells of pea embryo radicles during germination. J.Cell Biol. 45: 158-71.

Aspectos Celulares de Folhas de
Xerophyta plicata Spreng.
(Velloziaceae), Durante os Processos de
Dessecação e Revivescência.

VOLUME II

de exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) <i>Estela de Sousa Rossetto</i> e aprovada pela Comissão Julgadora.

Estela de Sousa Rossetto

Tese apresentada como requisito
necessário para a obtenção do
título de Mestre em Biologia
Vegetal no Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas -
UNICAMP.

Orientadora: Dra. Mary Anne Heidi Dolder

CAMPINAS

1992.

R735a
v.2
17317/BC

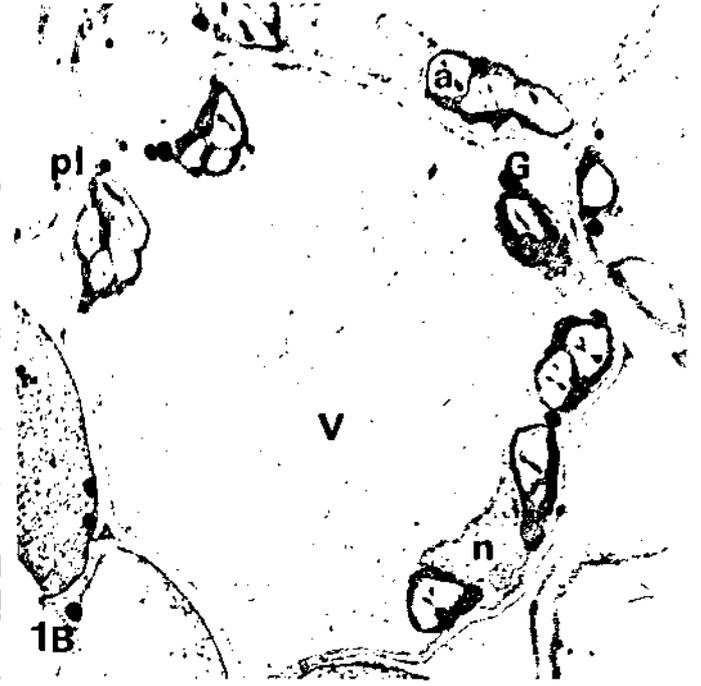
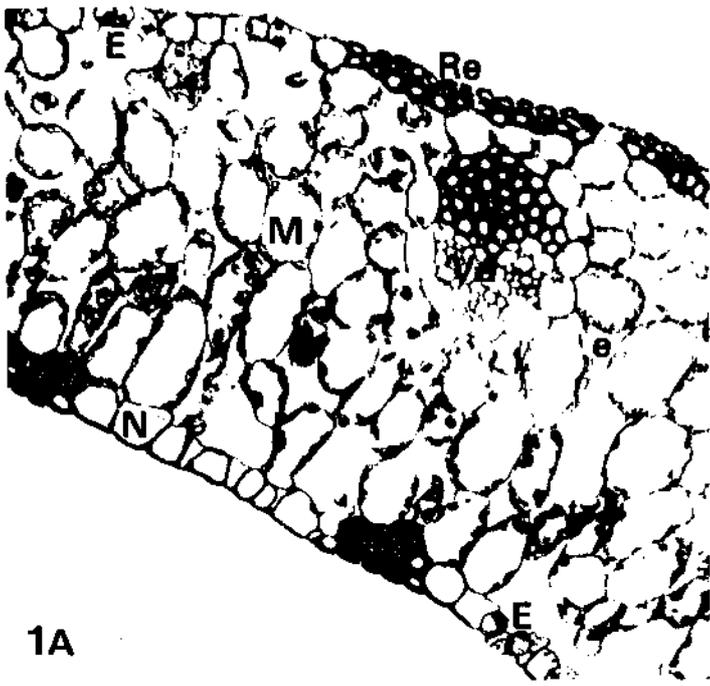
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Abreviações

hD = horas de dessecação.
hR = horas de re-hidratação.
dD = dias de dessecação.
dR = dias de re-hidratação.
CRA = conteúdo relativo de água.
FA = fixação aquosa.
FN = fixação não-aquosa.
Re = células epidérmicas com paredes espessadas.
N = células epidérmicas com paredes não espessadas.
M = mesofilo.
B = célula buliforme.
Va = feixes vasculares.
E = estômato.
P = parede celular.
n = núcleo.
nu = nucléolo.
a = grão de amido.
C = cloroplasto.
g = granum.
m = mitocôndria.
V = vacúolo.
v = vesícula.
G = glóbulo elétron denso.
c = corpo multivesicular.
f = figura mielínica.
pl = plasmodesma.
p = plastoglóbulo.
e = espaço intercelular.
R = espaço de retração entre parede celular e citoplasma.
r = ribossomo.
t = tilacóide.
r1 = retículo endoplasmático liso.
re = retículo endoplasmático rugoso.
Me = membrana plasmática.
Pe = peroxissomo.
d = dictiossomo.
me = membrana.
N1 = estrutura não identificada número 1.
N2 = estrutura não identificada número 2.
A = face abaxial da folha.
D = face adaxial da folha.

Prancha 1 (0hD, CRA = 99,22%, FA)

- 1A: 45x, folha hidratada distendida, com epiderme reforçada (Re) e não reforçada (N), feixes vasculares (Va), estômatos (E) e espaços intercelulares (e). Células do mesofilo (M) com citoplasma parietal, onde se destacam os cloroplastos.
- 1B: 3750x, Cloroplastos (C) apresentam grandes grãos de amido (a). Núcleo (n) com cromatina descompactada; glóbulos elétron-densos (G); grande vacúolo central (V) com conteúdo variando de célula para célula; parede celular com plasmodesmas (pl).
- 1C: 13500x, cloroplastos apresentam plastoglóbulos (p) e grandes grãos de amido (a). Mitocôndrias (m), glóbulos elétron-densos (G), espaço intercelular (e). A parede celular apresenta plasmodesmas (pl).
- 1D: 19000x, cloroplastos com alguns grana (g) e grãos de amido (a). Os plastoglóbulos foram extraídos durante o processamento do material, mas os locais onde eles estavam originalmente podem ser observados (p). Mitocôndrias (m) redondas ou alongadas e túbulos do retículo endoplasmático rugoso (re).



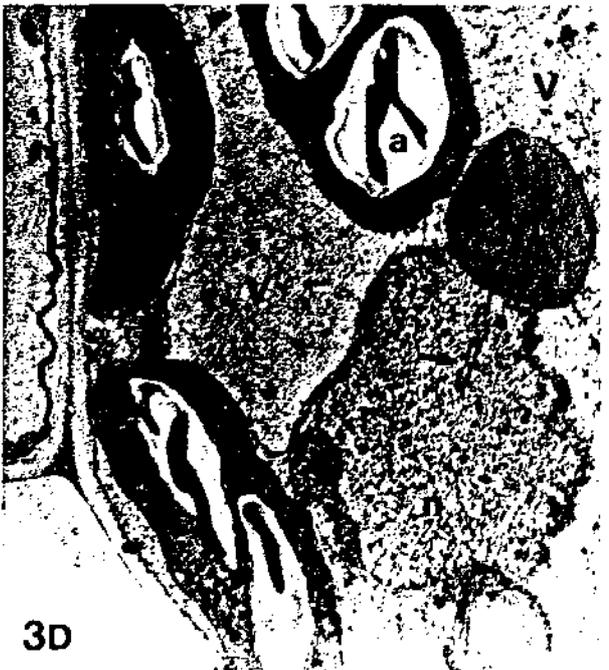
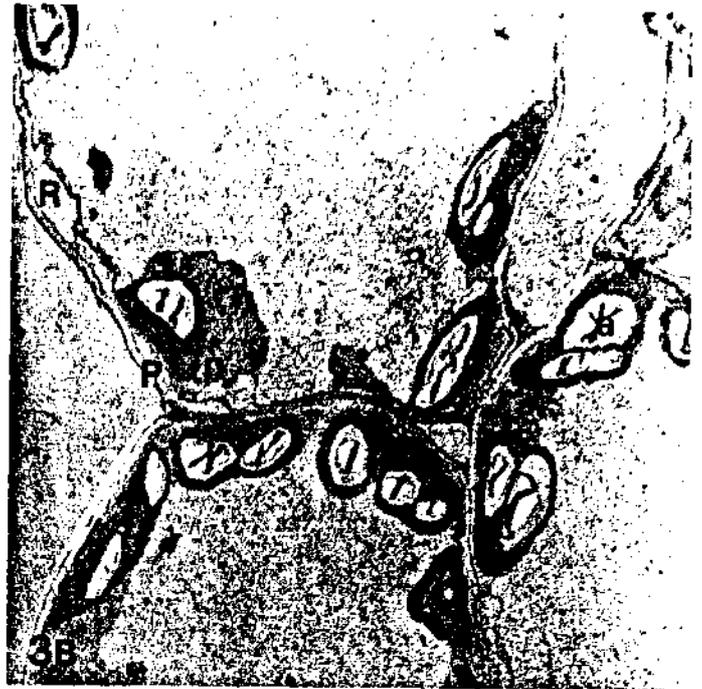
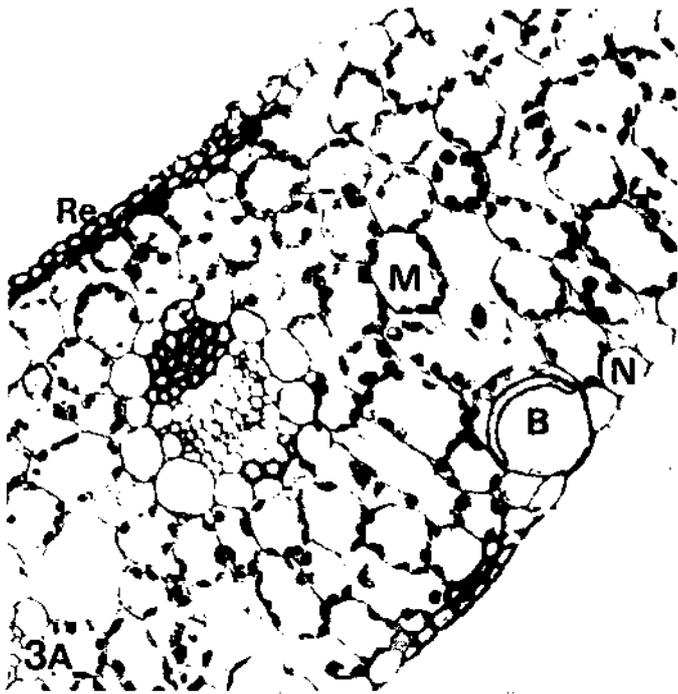
Prancha 2 (ØhD, CRA = 99,22%, FA)

- 2A: 19100x, vacúolos (V) de células adjacentes contendo material particulado em diferentes densidades; mitocôndrias (m), retículo endoplasmático rugoso (re) e um dictiossomo (d). Cloroplasto lentiforme com grão de amido (a) pequeno. Núcleo (n) apresenta envoltório nuclear com as duas membranas visíveis (seta) e porções de cromatina condensada na periferia (cabeça de seta).
- 2B: 18900x, cloroplastos com grana (g); ribossomos livres (r), retículo endoplasmático rugoso (re), dictiossomo (d), mitocôndria (m), pequenas vesículas (v) e um possível peroxissomo (Pe). O núcleo (n) delimitado pelas duas membranas (seta) do envoltório nuclear.



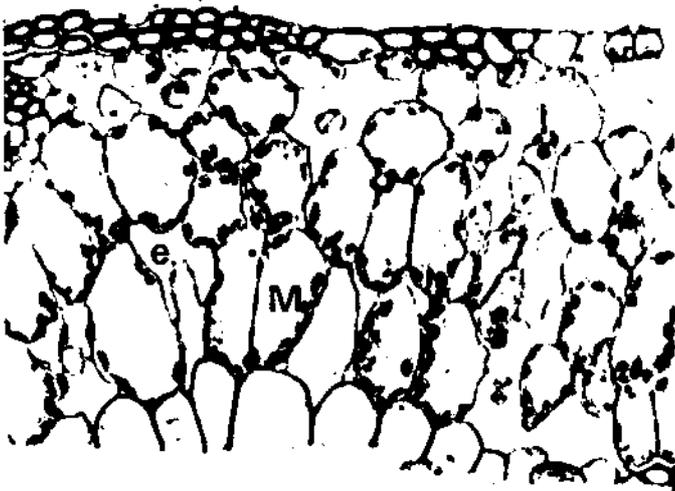
Prancha 3 (2hD, CRA = 81,39%, FA)

- 3A: 45x, corte transversal da folha distendida. Epiderme reforçada (Re) e não reforçada (N), célula buliforme (B). O citoplasma das células do mesofilo (M) é parietal.
- 3B: 5200x, paredes celulares (P) onduladas. Citoplasma apresenta retrações (R) em relação à parede celular. Cloroplastos (C) com grãos de amido (a). Núcleo (n).
- 3C: 15500x, cloroplastos apresentam grana (g) e plastoglóbulos (p). Retículo endoplasmático liso (rl), glóbulos elétrondensos (G), pequenas vesículas (v), espaço de retração entre citoplasma e parede celular (R). Uma estrutura membranosa concêntrica, chamada de figura mielínica (f), surge da membrana plasmática (cabeça de seta).
- 3D: 10300x, o citoplasma projeta-se em direção ao vacúolo (V). Núcleo (n) com forma irregular. Note uma invaginação do envoltório nuclear (seta). Cloroplastos com grãos de amido (a) e maior quantidade de plastoglóbulos (p) que nos de células mais hidratadas. Uma estrutura não identificada (N1).
- 3E: 30100x, detalhe de um cloroplasto com grãos de amido manchados, plastoglóbulos (p) e grana (g). Vesículas (v) entre a membrana plasmática e a parede celular.

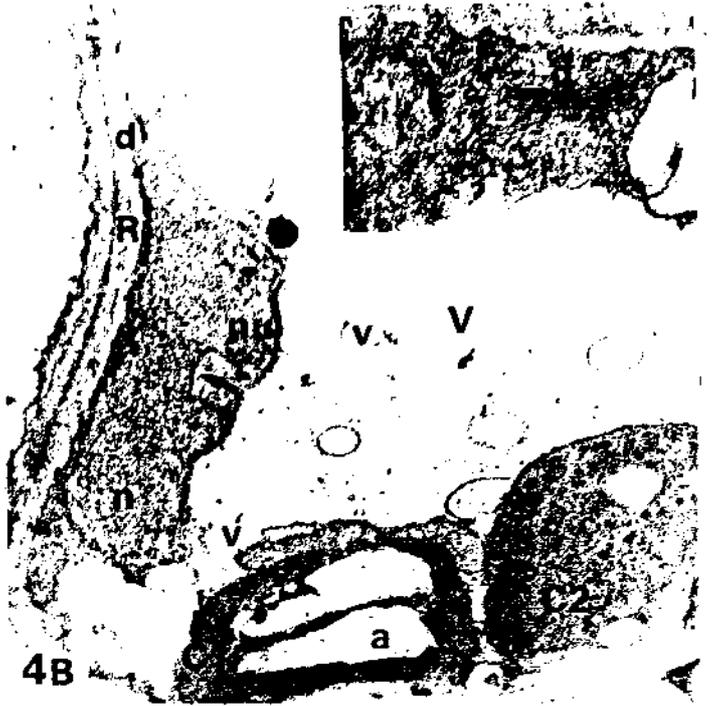


Prancha 4 (10hD, CRA = 81,86%, FA)

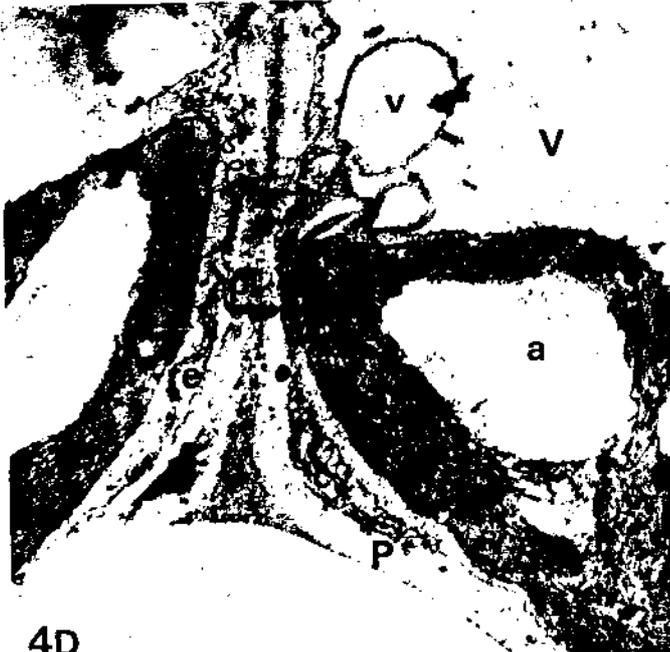
- 4A: 50x, células do mesofilo (M), espaços intercelulares (e) reduzidos.
- 4B: 9450x, espaços de retração (R) entre citoplasma e parede celular. Vesículas (v), vacúolo (V), dictiossomo (d), núcleo (n) com cromatina descondensada e nucléolo (nu) denso. O envoltório nuclear apresenta uma invaginação (seta). Cloroplastos em diferentes etapas de modificação: C1, alongado ou lentiforme, com grãos de amido (a), tilacóides geralmente pouco visíveis e alguns plastoglóbulos e C2, redondos, com muitos grana e plastoglóbulos."inset" (42700x).
- 4C: 17350x, cloroplastos (C1), com grana (g) e plastoglóbulos (p), mitocôndrias (m), um provável peroxissomo (Pe), túbulos do retículo endoplasmático rugoso (re) e um glóbulo elétron-denso (G).
- 4D: 18250x, corpos multivesiculares (c), parede celular (P) com plasmodesmas (pl), retículo endoplasmático rugoso (re) e cloroplastos (C1) com grãos de amido (a). Vesículas (v) sendo projetadas pelo citoplasma para o vacúolo (V).
- 4E: 12800x, espaço intercelular (e), mitocôndrias (m), provável peroxissomo (Pe) e retículo endoplasmático rugoso (re). Pequenas vesículas (v) são vistas no espaço de retração entre citoplasma e parede celular e dentro do vacúolo (V). Note a grande quantidade de grana (g) no cloroplasto C2 e sua maior quantidade de plastoglóbulos (p) em relação ao cloroplasto C1.



4A



4B



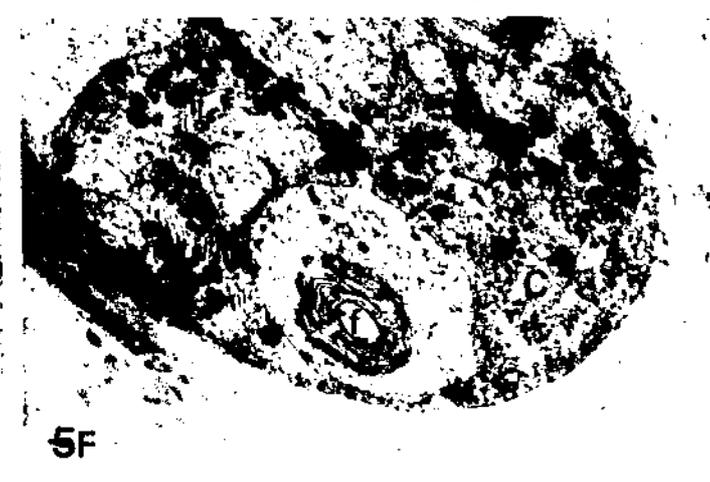
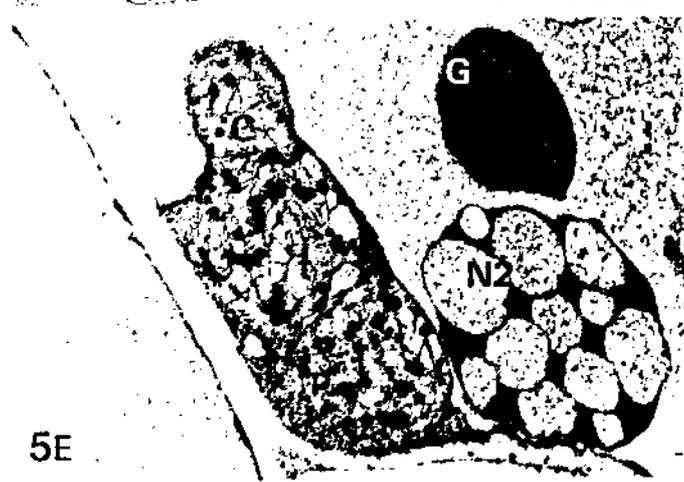
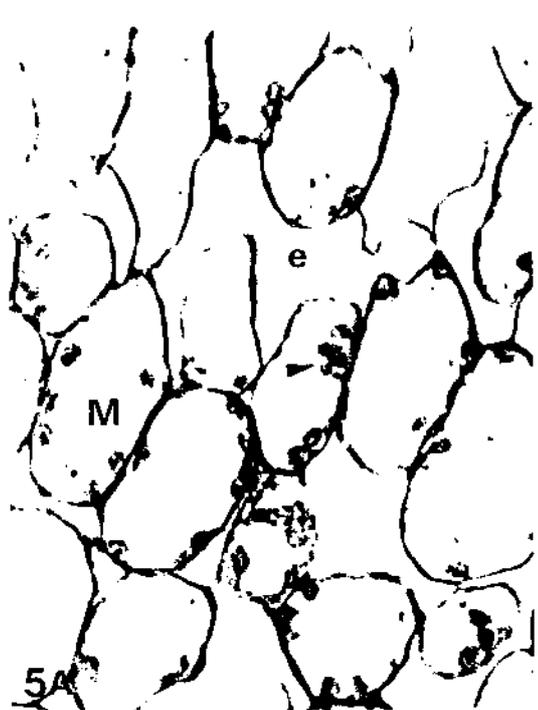
4D



4E

Prancha 5 (24hD, CRA = 60,3%, FA)

- 5A: 100x, células do mesofilo (M), espaços intercelulares (e) de contorno irregular. O citoplasma de algumas células avança em direção ao vacúolo (cabeça de seta).
- 5B: 5000x, rupturas nas paredes celulares (seta), devidas à dificuldade imposta pelo material desta fase ao corte. Vacúolo (V) apresenta conteúdo particulado além de vesículas (v) com diferentes conteúdos, glóbulos elétron-densos (G) e alguns cloroplastos (C), que aparecem em seu interior. Espaço intercelular (e) reduzido.
- 5C: 10800x, as organelas afastam-se da parede celular (P). O citoplasma emite corpos multivesiculares (c) e vesículas (v) para dentro do vacúolo (V). Os cloroplastos (C) redondos, com pequenos grãos de amido e muitos plastoglóbulos (p). Tilacóides (t) afastados uns dos outros. Glóbulo elétron-denso (G).
- 5D: 10000x, o citoplasma emite corpos multivesiculares (c) e vesículas (v) para dentro do vacúolo (V). Mitocôndria (m), retículo endoplasmático rugoso (re) e cloroplastos com pequenos grãos de amido (a) e tilacóides (t) afastados uns dos outros.
- 5E: 10800x, cloroplasto (C) modificado, com tilacóides (t) afastados e grande quantidade de plastoglóbulos (p). Glóbulo elétron-denso (G) e estrutura não identificada (N2).
- 5F: 19200x, figura mielínica (f) dentro de um cloroplasto (C) modificado, de forma irregular.



Prancha 6 (2dD, CRA = 15,5%, FA)

- 6A: 55x, células do mesofilo (M) com paredes celulares onduladas e espaços intercelulares (e) reduzidos. Células da epiderme não espessadas (N) e espessadas (Re).
- 6B: 4300x, espaços intercelulares (e) delimitados por paredes celulares (P) onduladas e dobradas, citoplasma está bastante retraído (R) em relação à parede celular e ligado a ela por meio de projeções citoplasmáticas (seta).
- 6C: 13500x, paredes celulares (P) onduladas e dobradas, com poucas rupturas (*). Citoplasmático periférico comprimido entre dobras das paredes, composto por vesículas (v), glóbulos elétron-densos (G) e remanescentes de organelas.
- 6D: 13950x, citoplasma afastado da parede celular (P), mostrando vesículas (v) com diferentes conteúdos, glóbulos elétron-densos (G), remanescentes de cloroplastos (C) contendo vesículas (v) e plastoglóbulos (p). Remanescentes de mitocôndrias (m), podem mostrar pequenas cristas (cabeça de seta). Espaço de retração (R) entre citoplasma e parede celular. Barra = 1µm. Note todas as membranas em contraste positivo até esta fase da dessecação, nessa e nas pranchas anteriores.



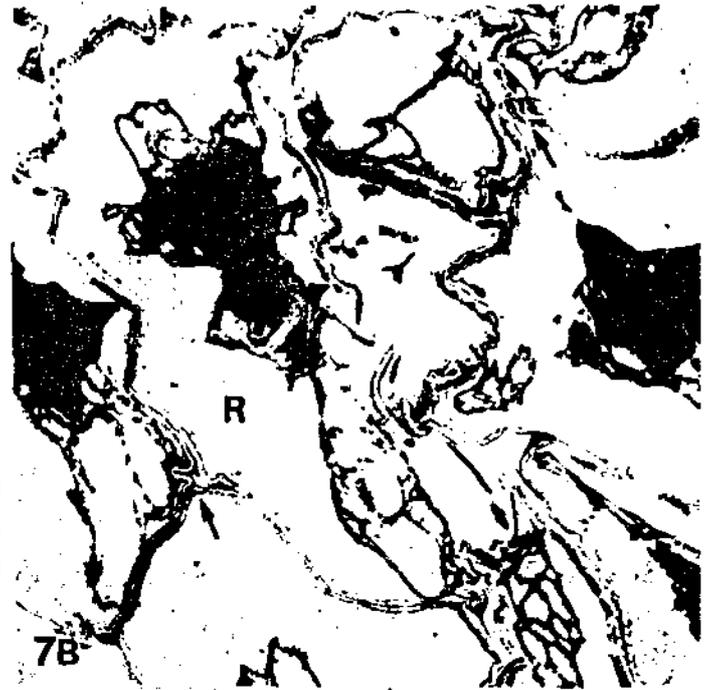
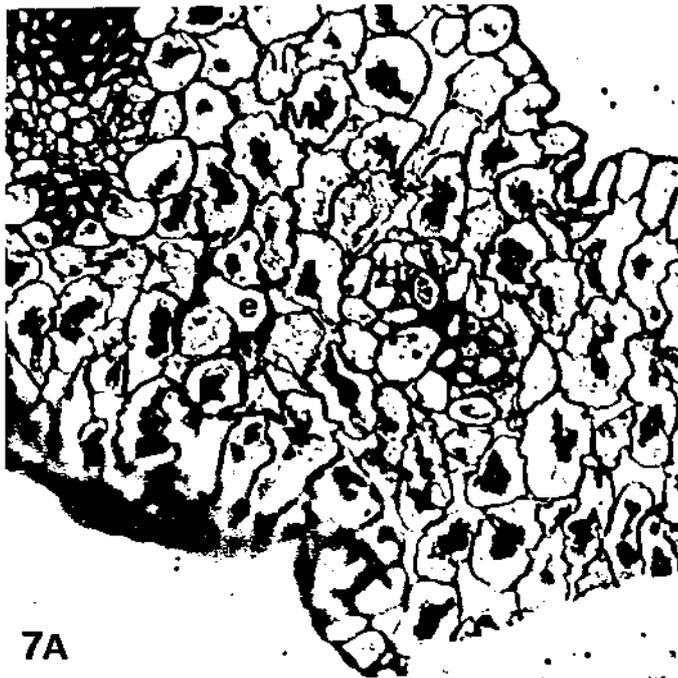
Prancha 7 (3dD, CRA = 7,9%, FN)

7A: 60x, células do mesofilo (M) com citoplasma bastante compacto e retraído das paredes celulares, que formam poucos espaços intercelulares (e).

7B: 3760x, dobras das paredes celulares ocupam grande parte dos espaços intercelulares (seta). Grande espaço de retração (R) entre o citoplasma e a parede celular.

7C: 15300x, a massa citoplasmática composta por estruturas globulares separadas por estreitas faixas elétron-negativas não contínuas (setas). Remanescente do núcleo (n) com nucléolo (nu), distinto das outras estruturas por sua aparência homogênea. Remanescentes dos cloroplastos (C) e plastoglóbulos (p) em contraste negativo. Plasmodesmas (pl).

7D: 14400x, parede celular (P) bastante dobrada, delimitando um espaço intercelular (e). Citoplasma composto por estruturas não identificáveis, separadas por estreitas faixas elétron-negativas (seta).. Na periferia do citoplasma observam-se vesículas (v).



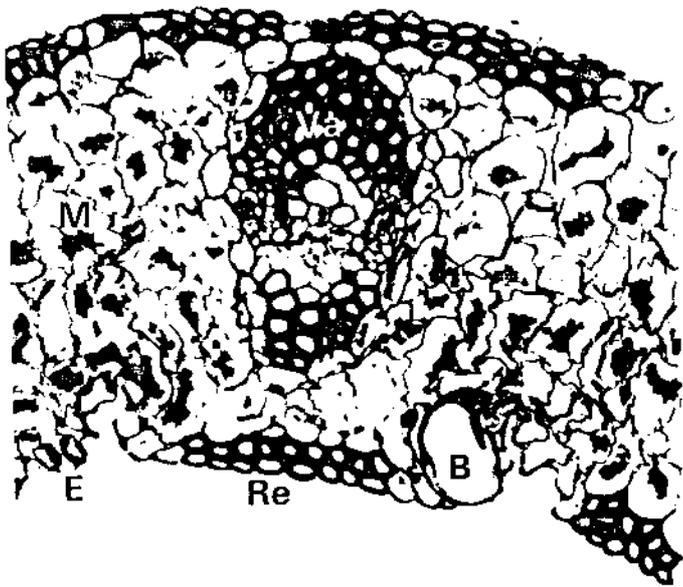
Prancha 8 (FN)

BA: 4dD, CRA = 6,7%, 50x, células do mesofilo (M), com o citoplasma compacto, na porção central da célula. Célula buliforme (B), células estomáticas (E). Feixes vasculares (Va) entre células espessadas da epiderme (Re).

BB: 4dD, CRA = 6,7%, 18300x, paredes celulares (P) bastante dobradas e do material comprimido entre elas, contendo vesículas (v), glóbulo elétron-denso (G) e material elétron-denso de forma irregular.

BC: 5dD, CRA = 4,9%, 45x, o aspecto dessa folha é semelhante ao descrito para a figura BA (4dD). Espaço intercelular (e).

BD: 6dD, CRA = 0%, 40x, aspecto semelhante ao da figura BA (4dD); os locais de retração da lâmina foliar correspondem às células não espessadas da epiderme (N).



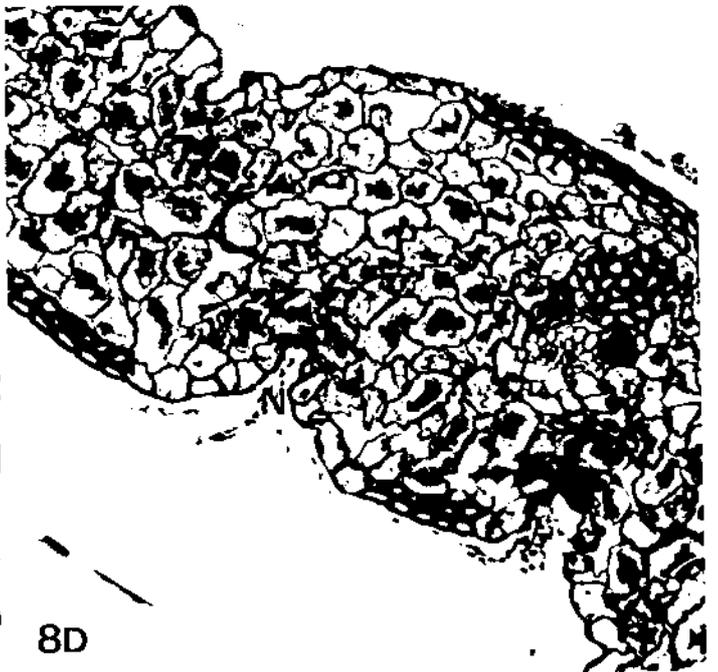
8A



8B



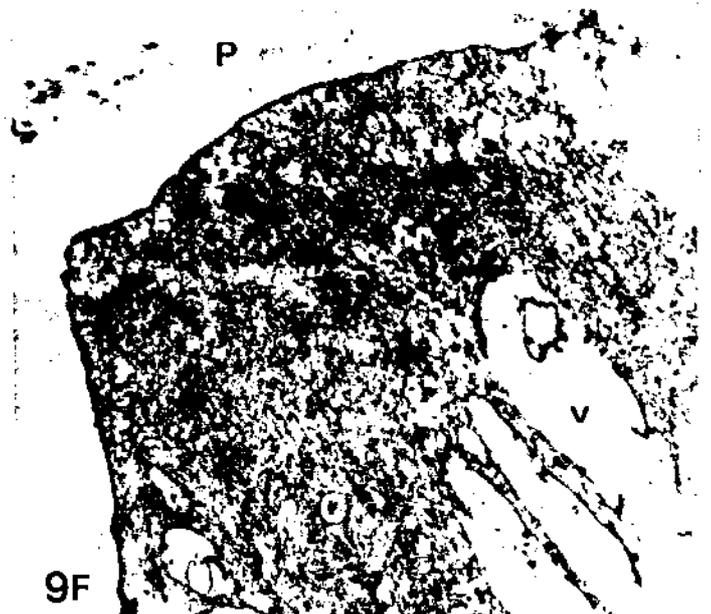
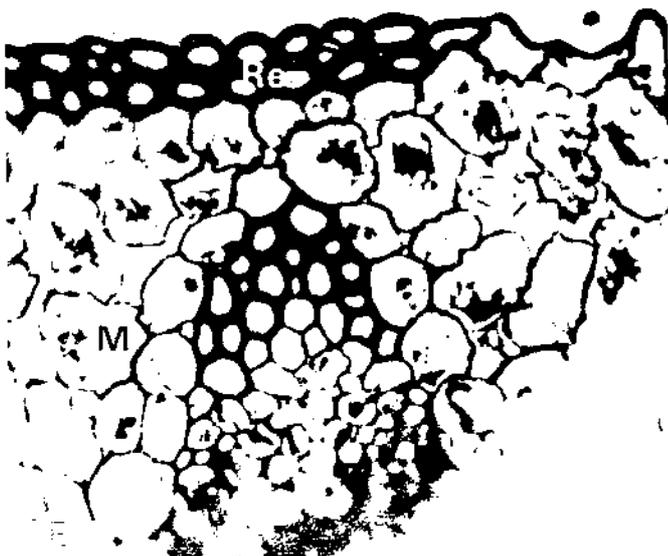
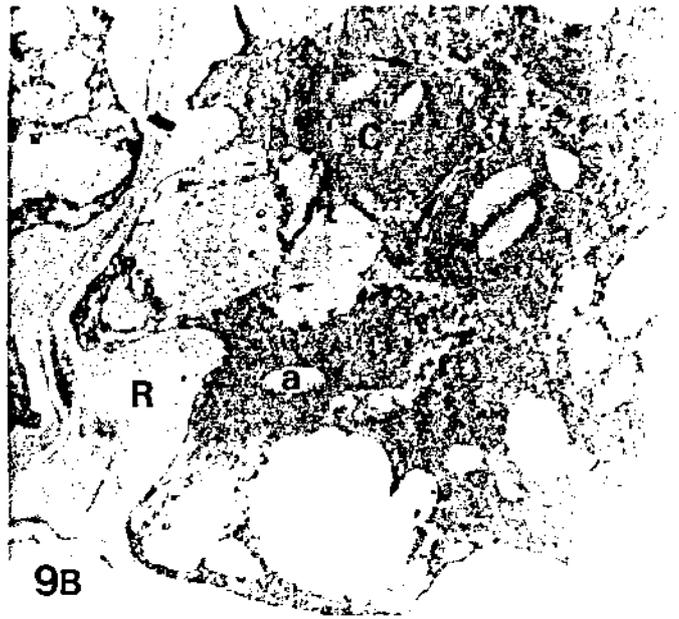
8C



8D

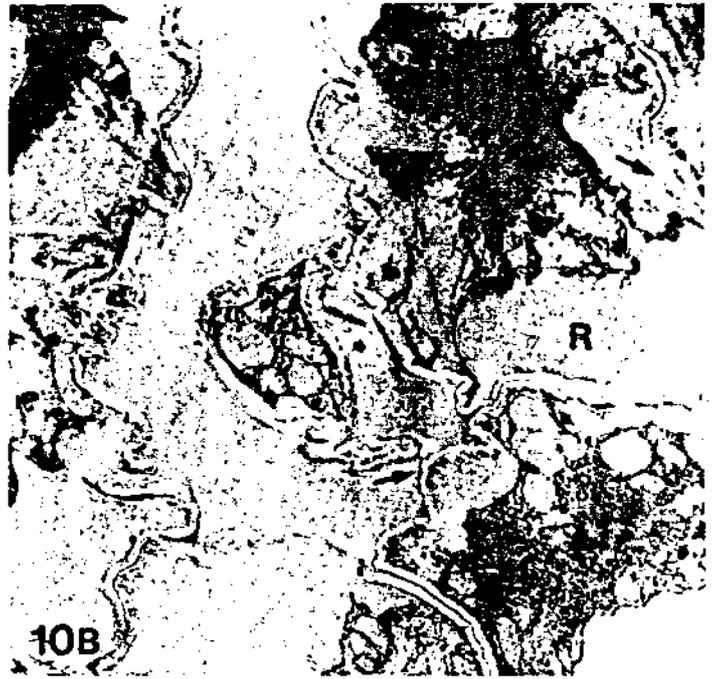
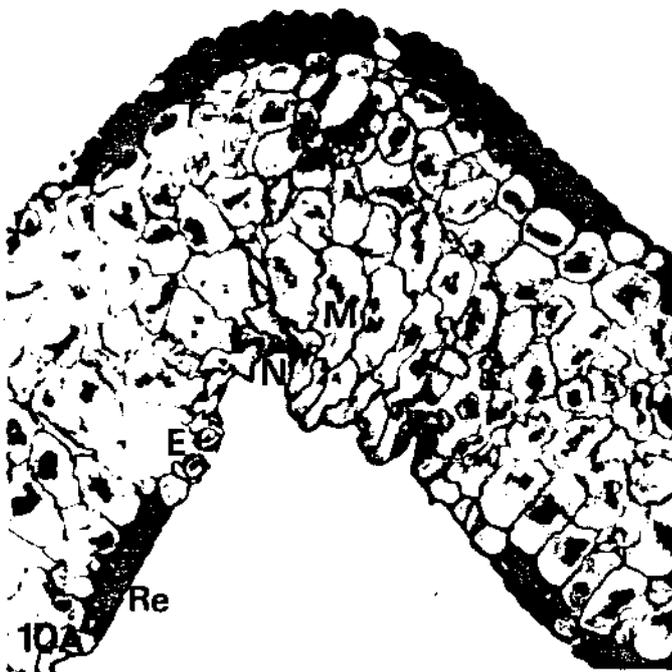
Prancha 9 (FN)

- 9A: 7dD, CRA = 12,1%, 50x, aspecto geral semelhante a 6dD. Epiderme com células não espessadas (N), onde a folha está mais deformada.
- 9B: 7dD, 10300x, citoplasma retraído (R) da parede celular e composto por blocos de material, individualizados pelos diferentes graus de compactação e por linhas elétron-lúcidas descontínuas (setas). Remanescentes de cloroplastos (C) com pequenos grãos de amido (a).
- 9C: 8dD, CRA = 3,7%, 45x, aspecto geral da folha em corte transversal, semelhante a 7dD.
- 9D: 8dD, 8500x, glóbulo elétron-denso (G), remanescentes de cloroplastos (C) com plastoglóbulos (p) e grãos de amido. Pequenas vesículas (v) delimitadas por membranas destacam-se de estreitas porções de citoplasma parietal. Note um remanescente de núcleo (n), com cromatina descondensada, cuja delimitação não é feita por membrana típica.
- 9E: 9dD, CRA = 0%, 85x, células do mesofilo (M) sob epiderme com células espessadas (Re).
- 9F: 9dD, 18300x, citoplasma junto à parede celular (P) com remanescente de cloroplasto (C). Note que as vesículas (v) não são delimitadas por membranas típicas.



Prancha 10 (0hR, CRA = 1,7%, FN)

- 10A:** 45x, células do mesofilo (M) próximas a epiderme com células não espessadas (N) estão muito deformadas e células mais próximas de áreas de epiderme com paredes celulares espessadas (Re) estão menos deformadas. Estômatos (E) pouco deformados.
- 10B:** 4300x, paredes celulares onduladas e dobradas e apresentam algumas rupturas (seta). O citoplasma tem uma porção compacta e uma porção menos densa, geralmente periférica. Espaços de retração (R) ocorrem entre o citoplasma e as paredes celulares. Note as vibrações do corte, provavelmente decorrentes da dureza das paredes celulares.
- 10C:** 9900x, periferia do citoplasma, menos compacto, com vesículas (v) e glóbulos elétron-densos (G). Remanescente de núcleo (n) com nucléolo (nu), formando uma região mais homogênea no citoplasma.
- 10D:** 10350x, porção compacta do citoplasma com remanescente do núcleo (n) com nucléolo (nu) e remanescentes de cloroplastos (C) com plastoglóbulos (p) e grãos de amido (a). Daí projetam-se vesículas (v) em direção à parede celular.

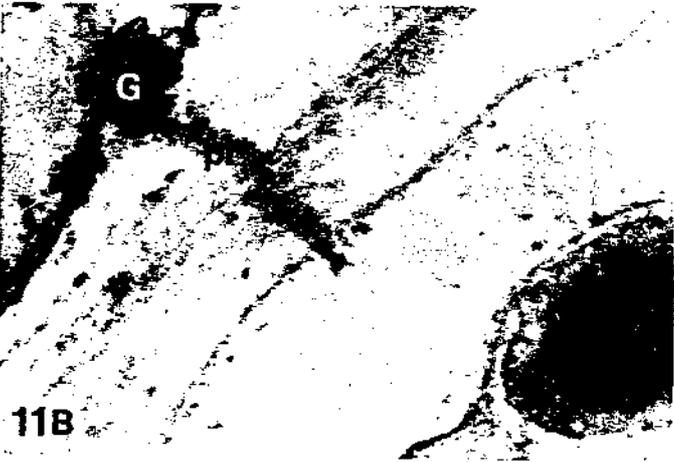
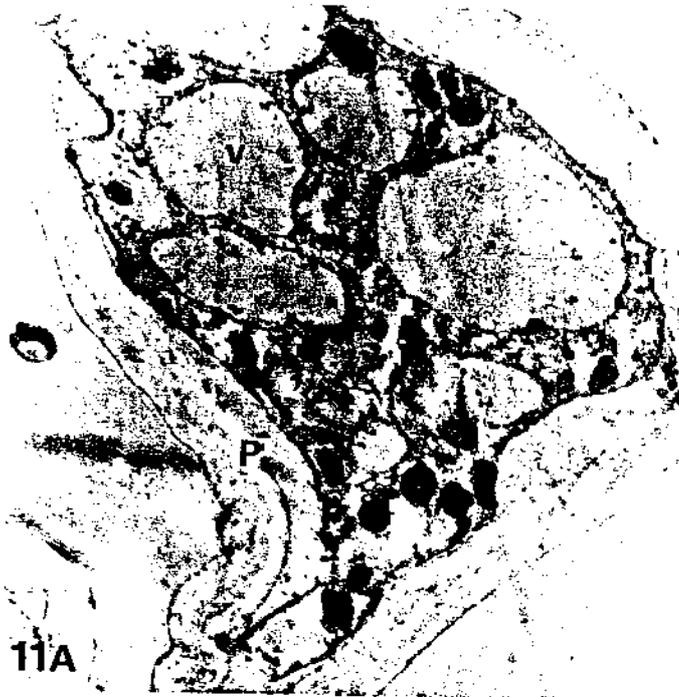


Prancha 11 (0hR, CRA = 1,7%, FN)

11A: 17350x, parede celular (P) e vesículas (v).

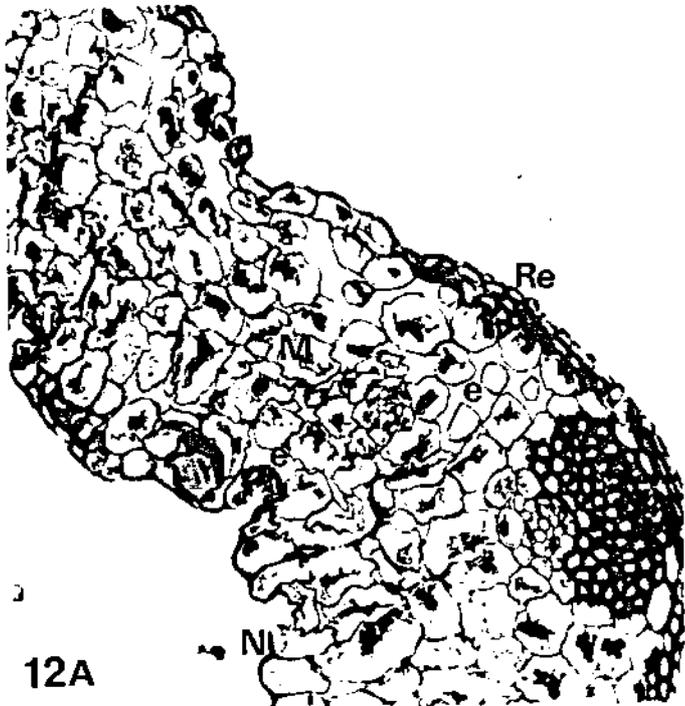
11B: 59800x, glóbulo elétron-denso (G) emitindo material que atravessa um plasmodesma (pl).

11C: 80550x, detalhe do citoplasma com um glóbulo elétron-denso (G) e vesículas (v), que apresentam vesículas (v) menores em seu interior. Note que a delimitação das vesículas não é dada por membrana típica (cabeça de seta), mas por uma faixa mais densa de material citoplasmático.



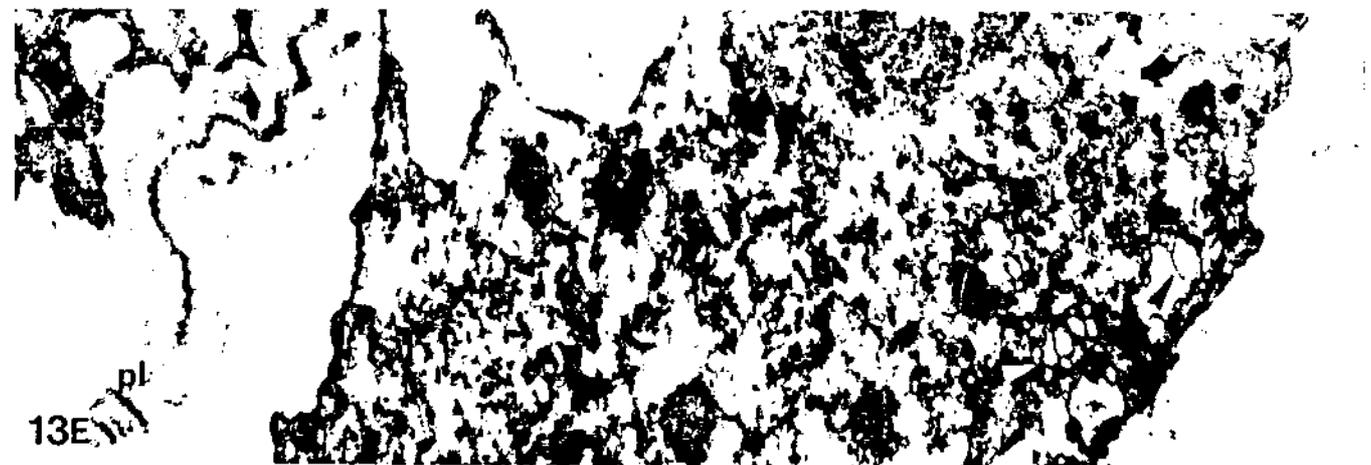
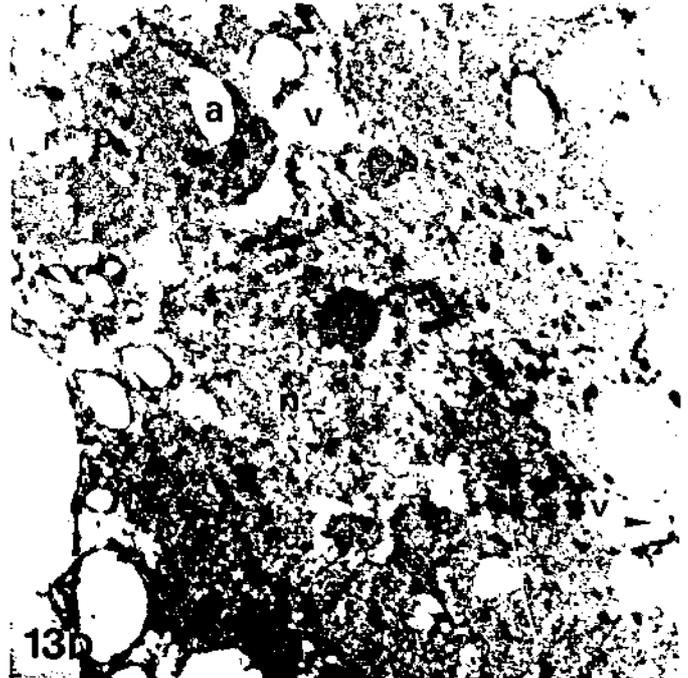
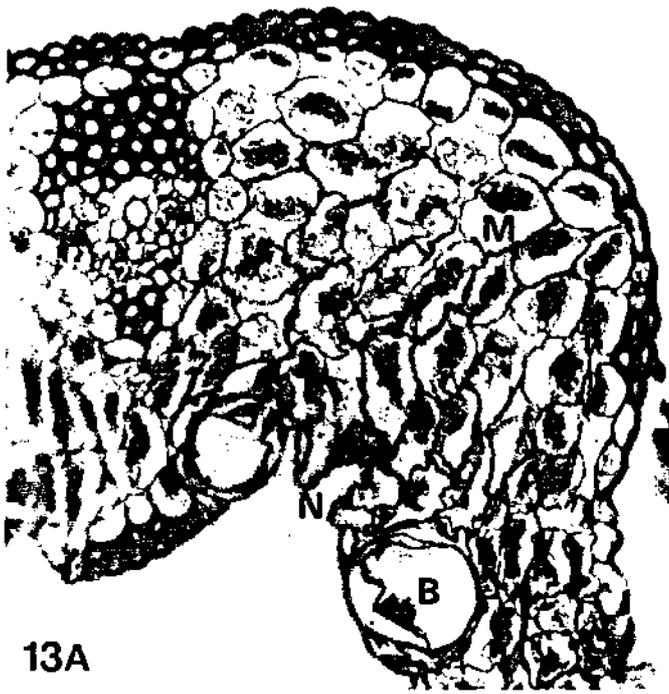
Prancha 12 (1hR, CRA = 10,7%, FN)

- 12A: 45x, células do mesofilo (M) com o citoplasma retraído em relação às paredes celulares. Epiderme com células não espessadas (N) e espessadas (Re) e espaços intercelulares (e).
- 12B: 11000x, vesículas (v) com membranas (seta), que não as delimitam, mas estão em seu interior. Note a presença de vesículas (v) também na porção de citoplasma compacto.
- 12C: 9450x, citoplasma compacto com pequenas vesículas (v) contendo material elétron-denso globular. Faixas elétron-lúcidas estreitas (cabeça de seta) delimitando estruturas citoplasmáticas.
- 12D: 450x, citoplasma com uma porção compacta e outra com vesículas (v) contendo membranas (seta). Remanescente de núcleo (n) com nucléolo (nu). Note as dobras nas paredes celulares (P).



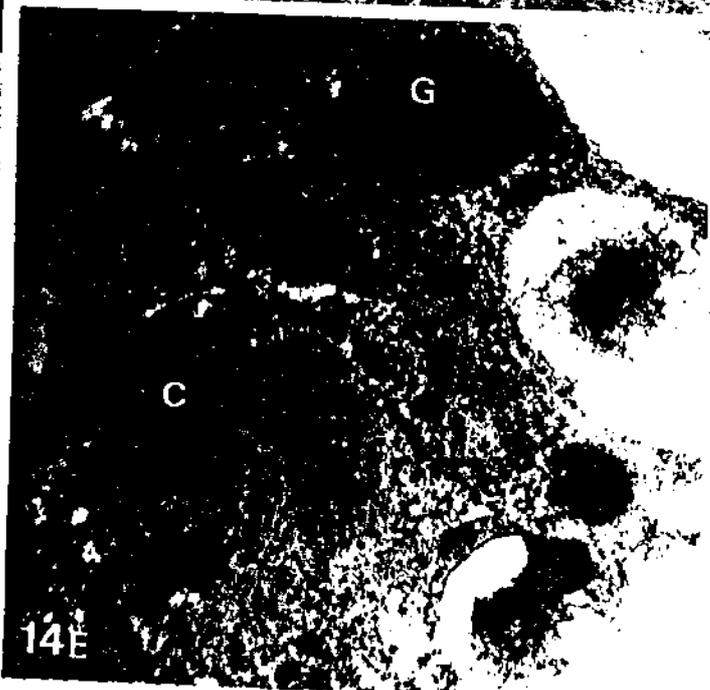
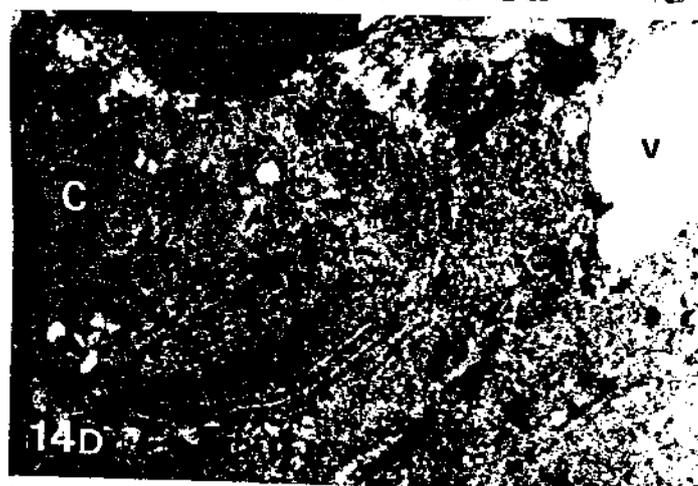
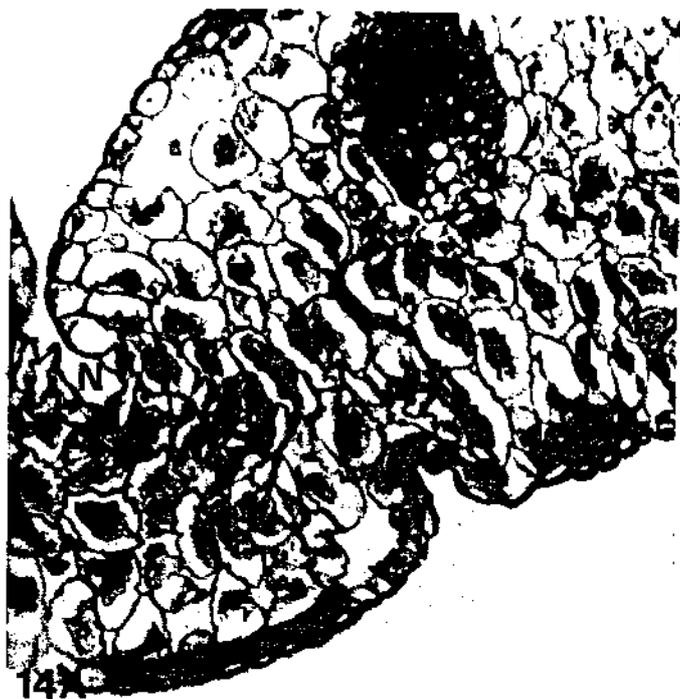
Prancha 13 (2hR, CRA = 11,1%, FN)

- 13A:** 50x, células do mesofilo (M) bastante deformadas. Células epidérmicas não reforçadas (N) estão mais deformadas. Células buliformes (B).
- 13B:** 5200x, citoplasma bastante retraído (R) em relação à parede celular. Dobras da parede celular ocupam áreas de espaços intercelulares (e).
- 13C:** 4500x, células com citoplasma menos compacto podem aparecer adjacentes a células com citoplasma compacto. Nas primeiras ocorrem muitas vesículas (v), contendo estruturas elétron-densas (seta) e nas segundas, grandes espaços de retração (R) entre citoplasma e paredes celulares.
- 13D:** 11700x, remanescentes de cloroplastos (C) com plastoglóbulos (p) e pequenos grãos de amido (a). Vesículas (v) podem apresentar membranas elétron-densas (cabeça de seta). Remanescente do núcleo (n), com cromatina descondensada e nucléolo (nu) aparentemente não é delimitado pelo envoltório nuclear.
- 13E:** 20450x, citoplasma ligado à parede celular por projecções. plasmodesmas (pl) sem contato com o citoplasma das duas células adjacentes. Pequenas vesículas delimitadas por membranas (cabeça de seta)..



Prancha 14 (4hR, CRA = 21,4%, FN)

- 14A: 50x, retrações mais intensas da lâmina foliar nas regiões próximas à epiderme com paredes não espessadas (N).
- 14B: 4500x, espaço intracelular totalmente preenchido pelo citoplasma compacto e por vesículas (v). Paredes celulares (P) com dobras. Barra = 1µm.
- 14C: 6650x, remanescentes de cloroplastos (C) delimitados por estreitas faixas elétron-densas são as únicas organelas identificadas nessas células. Membranas elétron-positivas (seta) delimitando e/ou dentro de vesículas. Espaço de retração (R) entre o citoplasma e as paredes celulares, bastante dobradas.
- 14D: 33800x, remanescente de cloroplasto (C) com plastoglóbulos elétron-lúcidos, delimitado por duas estreitas faixas elétron-lúcidas. Vesícula (v) não delimitada por membrana típica, sem aparente conteúdo.
- 14E: 33800x, glóbulo elétron-denso (G), remanescente de cloroplasto (C) e vesículas contendo estruturas globulares elétron-densas emitindo finas projeções. Note pontos elétron-densos na periferia dessas vesículas, que podem ser ribossomos (r).



Prancha 15 (4hR, CRA = 21,4%, FN)

15A: 15025x, espaço intercelular (e) delimitado por paredes celulares (P) dobradas ou onduladas, vesículas (v) delimitadas ou não por membranas típicas, dentro e fora da massa citoplasmática. Uma grande vesícula (7,6 μ m de comprimento) delimitada por membrana (cabeça de seta) apresenta dois glóbulos elétron-densos (G) periféricos, de onde saem membranas (me) enoveladas. Barra = 1 μ m.

15B: 26500x, detalhe um glóbulo elétron-denso (G) e as membranas enoveladas que saem dele e formam o limite da vesícula (cabeça de seta) e algumas pequenas vesículas. Sobre as membranas que estão se formando, são vistos pontos elétron-densos (seta).



15A



15B

Prancha 16 (10hR, CRA = 25%, FA)

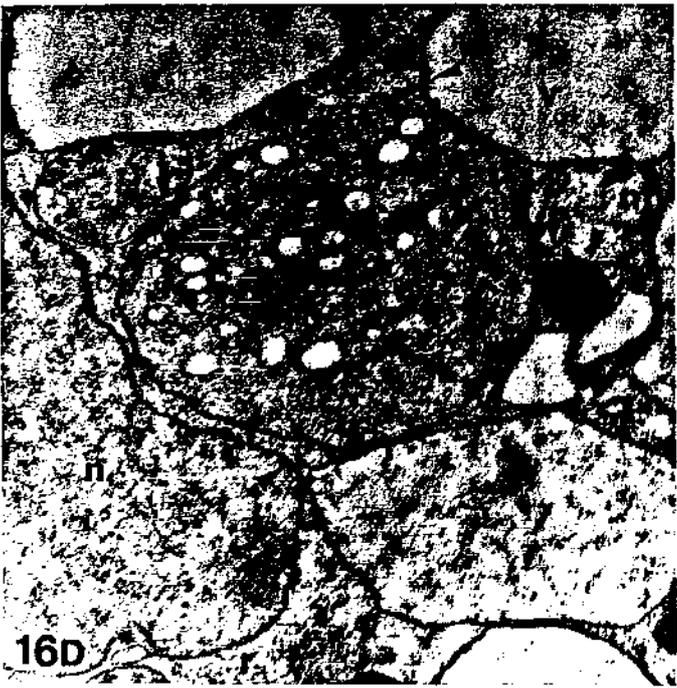
16A: 50x, células do mesofilo (M) ainda deformadas.

16B: 4400x, paredes celulares (P) onduladas, com poucas dobras. Citoplasma ocupa todo o espaço intracelular e é formado por estruturas globulares, grandes vesículas (v) com diferentes conteúdos e glóbulos elétron-densos (G). Note que todas as estruturas voltaram a ser delimitadas por membranas elétron-densas. Barra = 1 μ m.

16C: 9900x, remanescentes de cloroplastos (C), vesículas (v) e remanescente do núcleo (n).

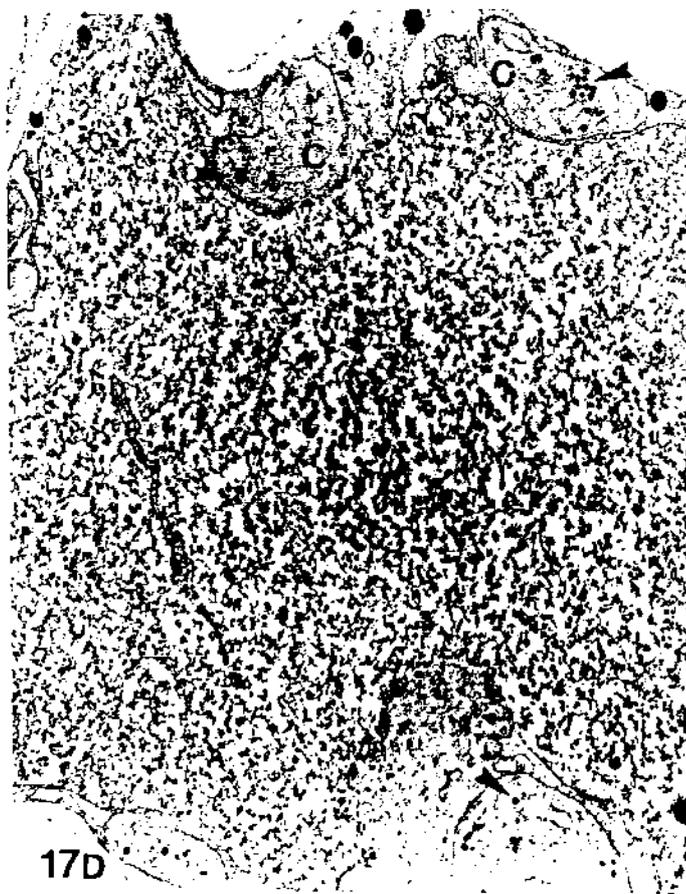
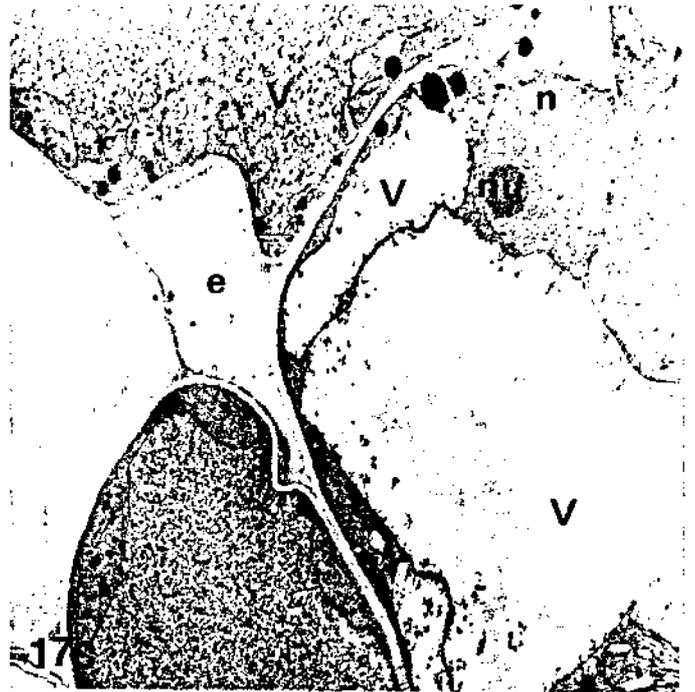
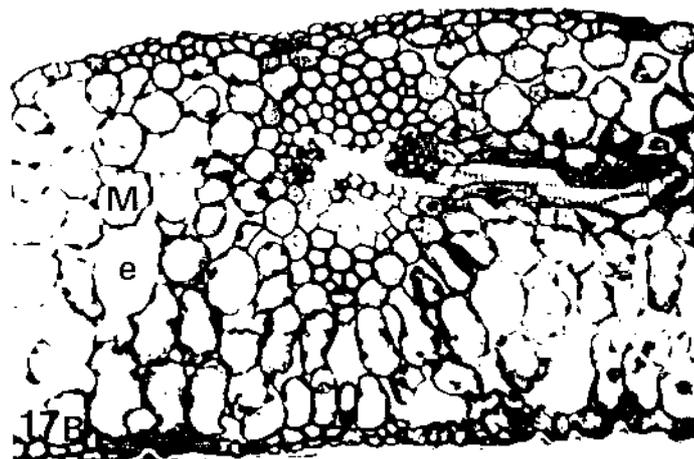
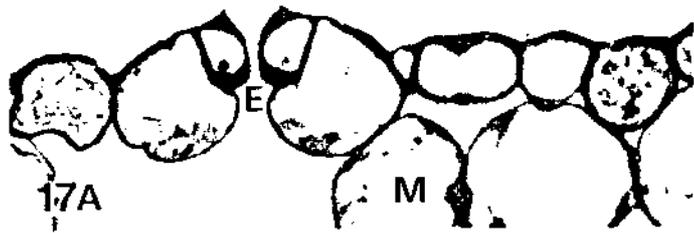
16D: 10250x, membranas delimitantes (cabeças de setas) de cloroplasto (C), mitocôndrias (m), núcleo (n) e vesículas (v). Mitocôndrias com uma ou duas pequenas cristas (seta). Note o re-aparecimento dos ribossomos livres (r).

16E: 22800x, cloroplastos contendo vesículas (v) elétron-lúcidas e plastoglóbulos (p). Note a delimitação por dupla membrana em cloroplastos e mitocôndrias (m) (cabeça de seta).



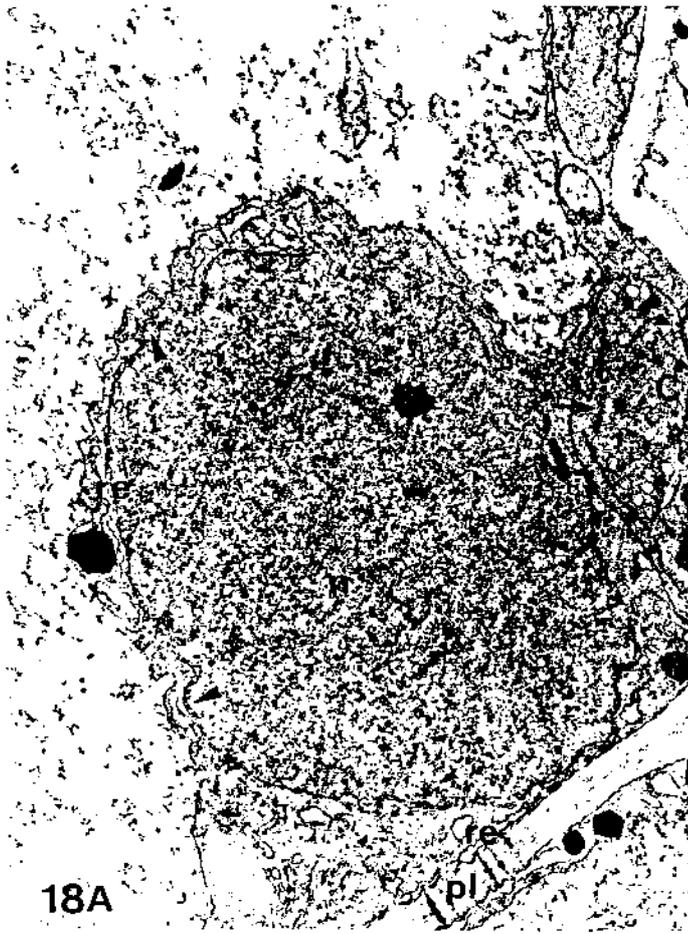
Prancha 17 (12hR, CRA = 23,4%, FA)

- 17A: 115x, células estomáticas (E) com o citoplasma ocupando quase todo o espaço interno da célula, ao passo que nas células do mesofilo (M) ele já é quase totalmente parietal.
- 17B: 35x, a folha já se apresenta distendida. Células do mesofilo (M) com paredes celulares onduladas, mas não dobradas. Espaços intercelulares (e). Note o traqueíde de transfusão (seta).
- 17C: 5550x, células do mesofilo apresentam um ou mais vacúolos grandes (V), com conteúdos bastante diferentes. Citoplasma quase totalmente parietal. Núcleo (n) arredondado com nucléolo (nu) bastante compacto. Espaço intercelular (e) delimitado por paredes onduladas.
- 17D: 10100x, o vacúolo (V) ocupa a maior parte do espaço intracelular. Cloroplastos (C) mais e menos organizados, com quantidade variável de plastoglóbulos (cabeça de seta) isolados ou em grupos.
- 17E: 13480x, Vacúolos (V) de células adjacentes com diferentes conteúdos. Cloroplastos mais e menos organizados, com pequenos grãos de amido (a). Glóbulos elétron-densos (G). Notar o retículo endoplasmático rugoso (re) passando dentro de uma estreita faixa de citoplasma que separa os dois vacúolos. Barra = 1 μ m.



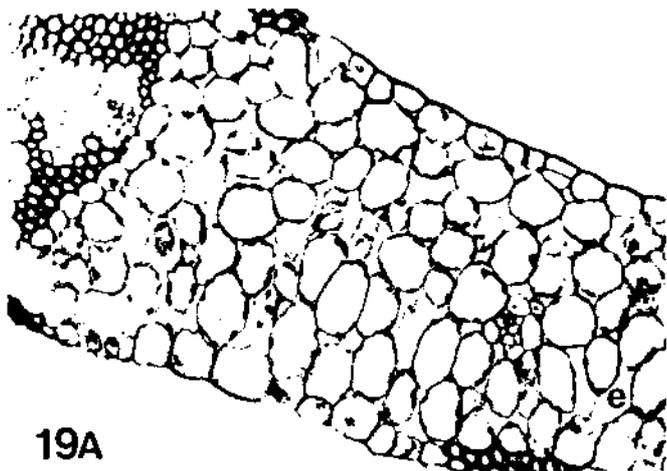
Prancha 18 (12hR, CRA = 23,4%, FA)

- 18A: 16175x, túbulos do retículo endoplasmático rugoso (re) são observados por todo o citoplasma e próximos a plasmodesmas (pl), sem atravessá-los. Ribossomos livres (r), núcleo (n) delimitado pelo envelope nuclear (cabeça de seta), cloroplasto (C) com tilacóides (seta) em formação.
- 18B: 23720x, detalhe do núcleo, delimitado pelas duas membranas do envelope nuclear (cabeça de seta) e apresentando um nucléolo (nu) compacto. Túbulos do retículo endoplasmático rugoso (re), ribossomos livres (r), mitocôndria (m) com cristas dilatadas. Cloroplasto com tilacóides (seta) em formação, poucos plastoglóbulos (p) e algumas vesículas (v) arredondadas.

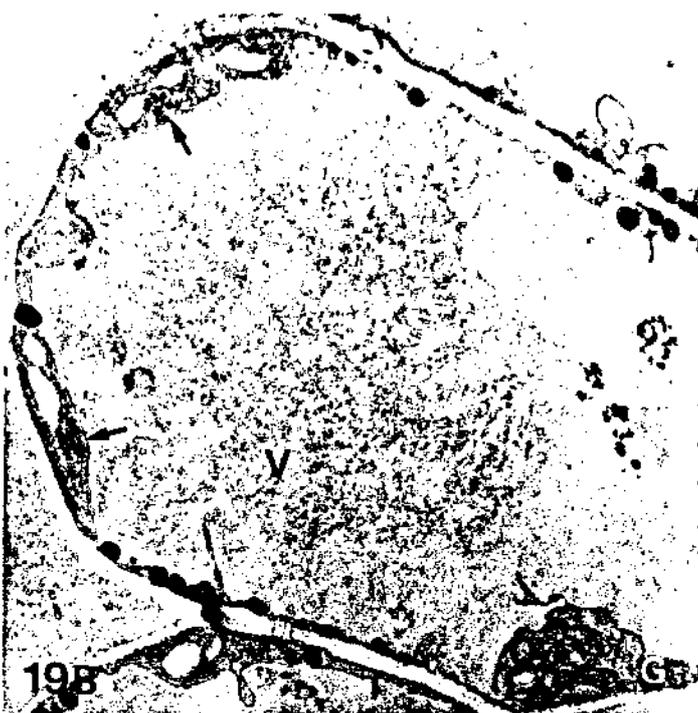


Prancha 19 (24hR, CRA = 33,5%, FA)

- 19A: 30x, células do mesofilo com paredes celulares distendidas delimitando espaços intercelulares (e).
- 19B: 6000x, citoplasma parietal e muito estreito, com um vacúolo (V) único, glóbulos elétron-densos (G) e cloroplastos (C) com plastoglóbulos organizados em curtas fileiras empilhadas (setas).
- 19C: 14400x, vesículas (v) próximas ao vacúolo (V), apresentam conteúdos particulares semelhantes. Cloroplastos com tilacóides (t) em formação e plastoglóbulos organizados em fileiras adjacentes (seta, apontando o local onde estavam antes de serem extraídos na preparação do material). Núcleo (n) com cromatina descondensada. Note a continuidade entre o envoltório nuclear e um túbulo do retículo endoplasmático rugoso (cabeça de seta).
- 19D: 18250x, mitocôndria (m) alongada, com cristas dilatadas justaposta a um cloroplasto (C). Tilacóides (t) sendo formados pela fusão ponta-a-ponta de vesículas achatadas. Grão de amido (a). Barra = 1 μ m.
- 19E: 31000x, detalhe de um cloroplasto com tilacóides (t) em formação e com um grão de amido (a). Glóbulos elétron-densos (G), pequenas vesículas (v) e túbulos do retículo endoplasmático rugoso (re).



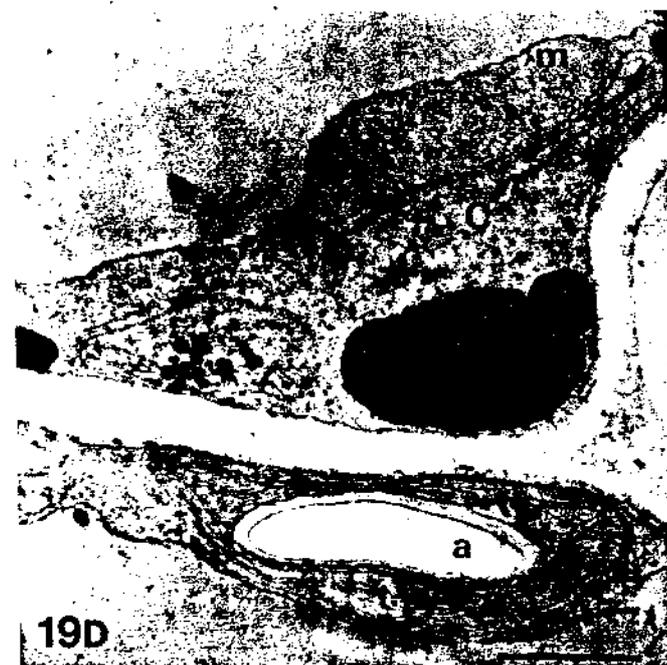
19A



19B



19C



19D



19E

Prancha 20 (2dR, CRA = 46,3%, FA)

20A: 40x, espaços intercelulares (e) semelhantes aos de células mais hidratadas. Células buliformes (B).

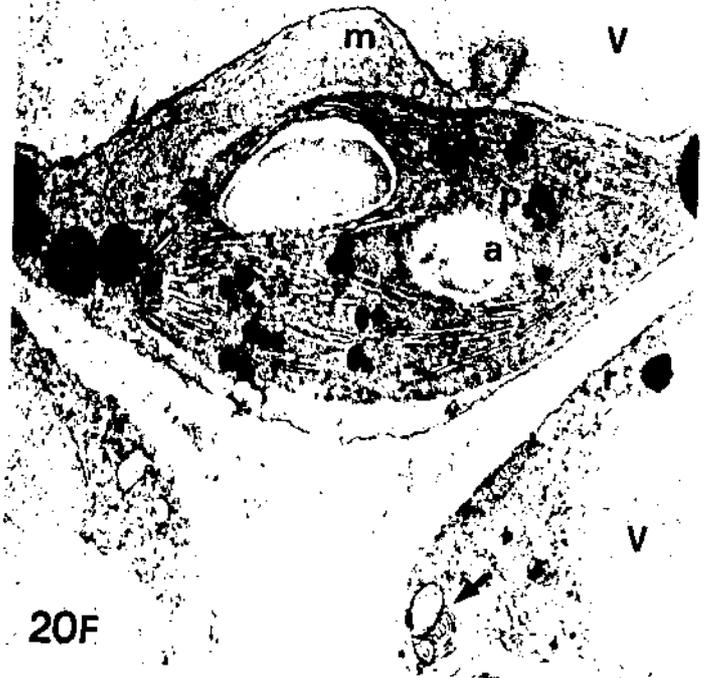
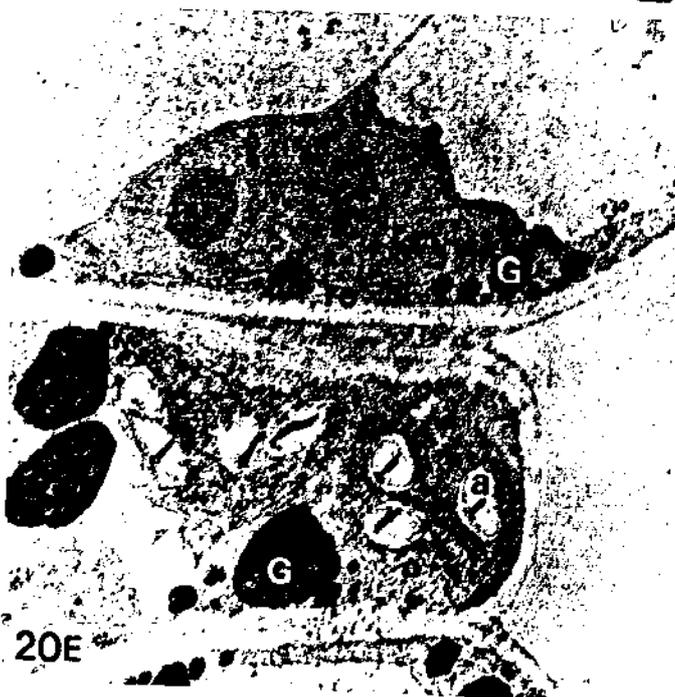
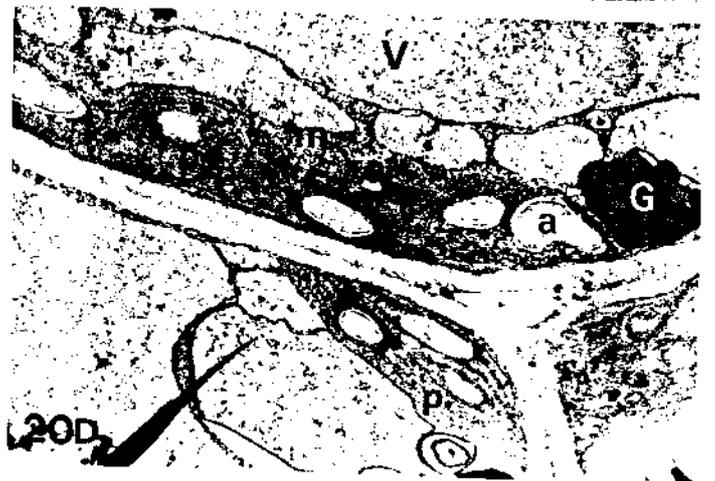
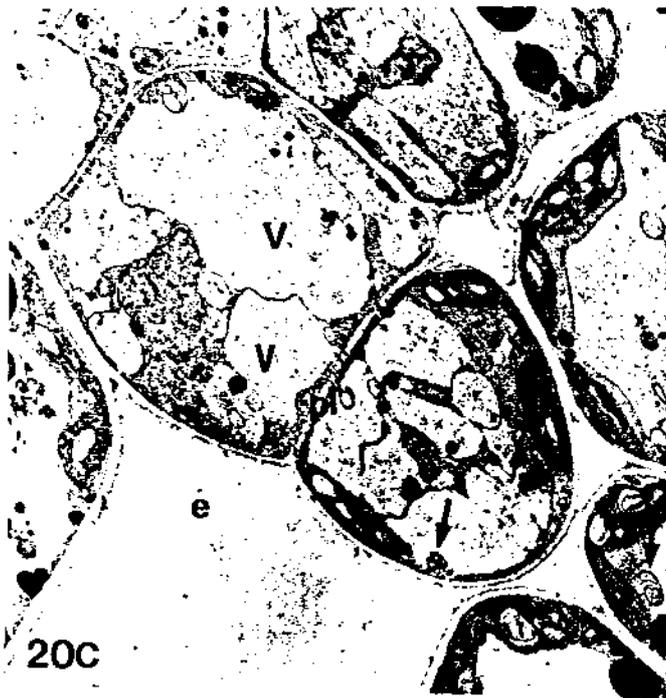
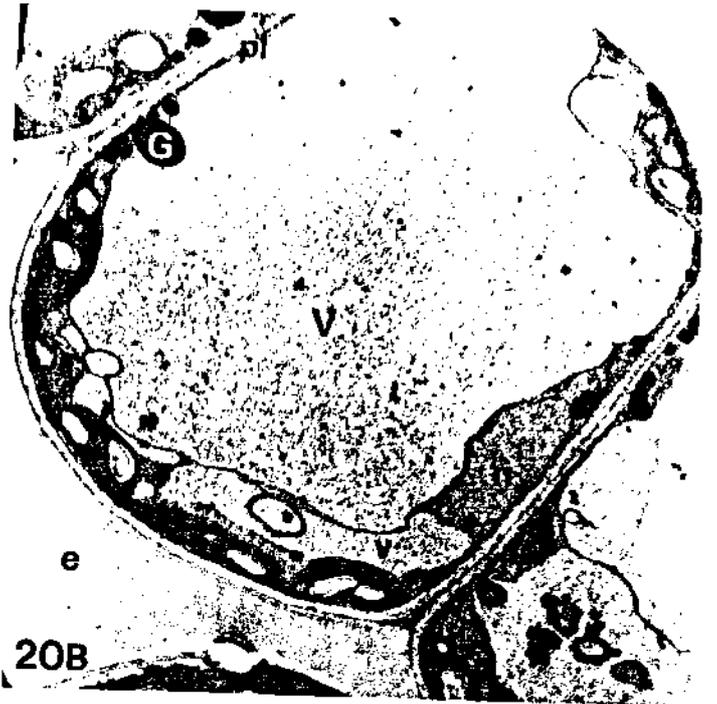
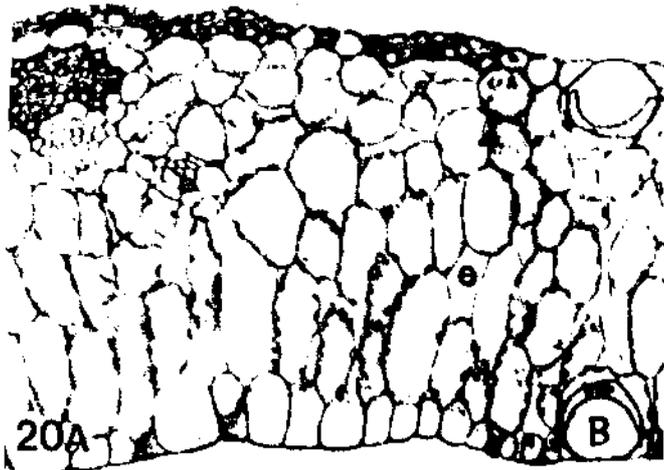
20B: 4850x, paredes celulares com plasmodesmas (pl) definem espaços intercelulares (e). Citoplasma parietal com cloroplastos (C), glóbulos elétron-densos (G), núcleo (n) e vesículas (v) adjacentes ao vacúolo (V) central e grande.

20C: 4500x, algumas células ainda apresentam mais de um vacúolo (V). Paredes celulares com plasmodesmas (pl) delimitam espaços intercelulares (e). Corpos multivesiculares (seta) aparentemente passando do citoplasma para o vacúolo ou para uma vesícula em algumas células.

20D: 10350x, cloroplastos lentiformes apresentam diferentes tamanhos de grãos de amido (a) e quantidades variáveis de plastoglóbulos (p), isolados ou em grupos desorganizados espacialmente. Mitocôndrias (m) redondas e glóbulos elétron-densos (G). Vesículas são observadas entre o citoplasma e o vacúolo (V).

20E: 10350x, grãos de amido (a), retículo endoplasmático rugoso (re), glóbulos elétron-densos (G), núcleo (n) parietal, com nucléolo (nu) compacto, delimitado pelas duas membranas do envoltório nuclear (cabeça de seta).

20F: 24180x, cloroplasto em fase final de organização, com plastoglóbulos (p), grãos de amido (a), tilacóides e já apresentando alguns grana (g). Mitocôndria (m) alongada e justaposta ao cloroplasto. Vacúolo (V) de células adjacentes pode conter material particulado em diferentes densidades. Note uma estrutura intermediária entre corpo multivesicular e figura mielínica (seta).



Prancha 21 (Reação de Imidazol)

- 21A: 18650x, folha hidratada controle (CRA = 83%), células do mesofilo com citoplasma pouco contrastado. Cloroplastos (C) com grana (g) e grãos de amido e mitocôndrias (m). Nele se destacam glóbulos elétron-densos (G) e plastoglóbulos (p).
- 21B: 25100x, folha hidratada (CRA = 83%) submetida à reação apresenta elétron-densidade citoplasmática mais alta que as folhas controle. Grãos de amido (a) estão elétron-lúcidos. Glóbulos elétron-densos (G) e plastoglóbulos (p) estão evidentes. Note que apenas as membranas internas dos cloroplastos, formando os grana (g) e das mitocôndrias, formando cristas (seta) foram evidenciadas pela reação.
- 21C: 12600x, folha dessecada controle (CRA = 9%) mostra citoplasma pouco contrastado. Cloroplasto (C), vesículas (v) e mitocôndrias (m). Em alguns locais podemos sugerir a presença de membranas típicas (cabeça de seta). Plastoglóbulos (p) e glóbulos elétron-densos (G) estão evidentes.
- 21D: 10560x, a folha dessecada (CRA = 9%) reagiu positivamente, apresentando elétron-densidade citoplasmática mais alta que o controle. Plastoglóbulos (p) e glóbulos elétron-densos (G) ficaram mais evidentes. Mitocôndrias (m) e cloroplastos (C) ficaram evidenciados por sua menor elétron-densidade, contrastante com o restante do citoplasma. Note os rompimentos na delimitação das vesículas (v).



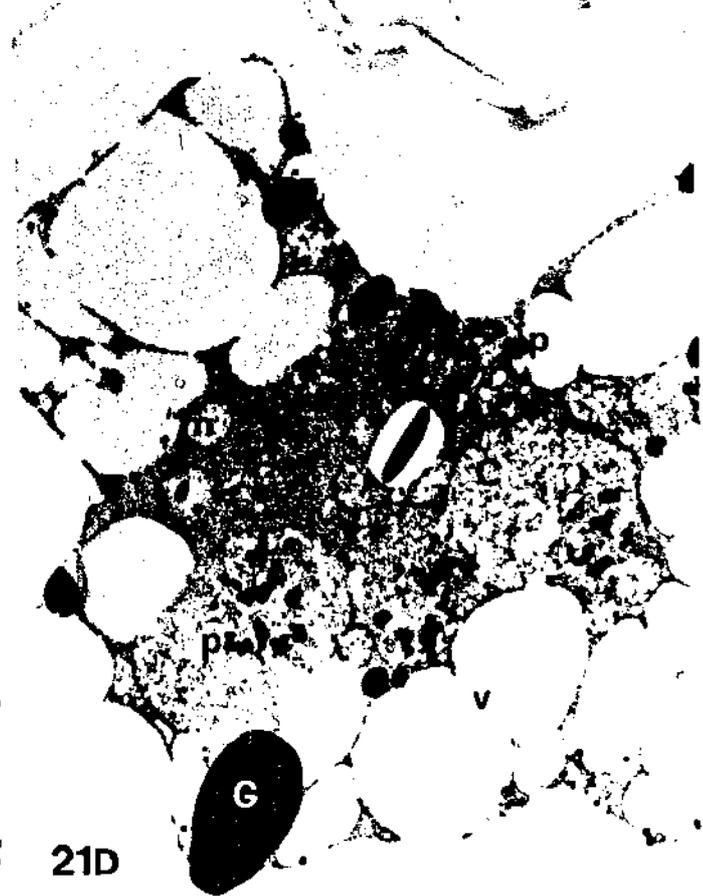
21A



21B



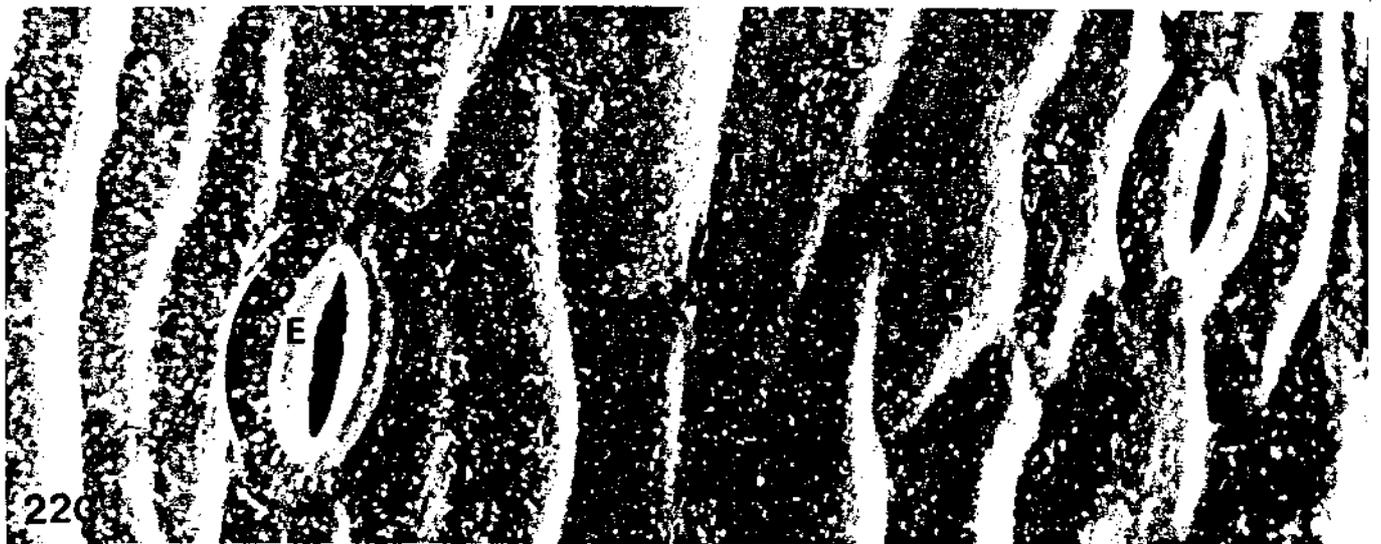
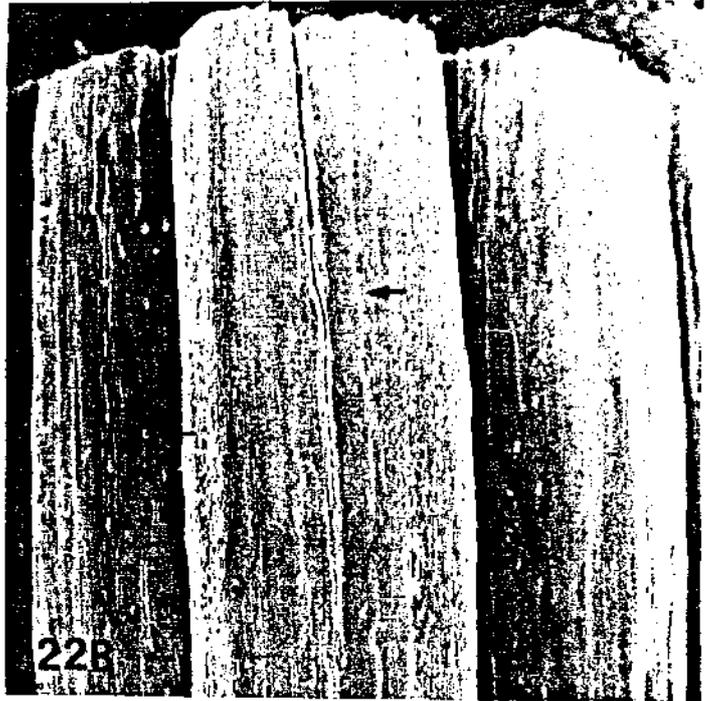
21C



21D

Prancha 22 (Microscopia Eletrônica de Varredura)

- 22A: 230x, superfície de folha hidratada de plântula, onde ocorrem faixas longitudinais rugosas, correspondentes a células epidérmicas com paredes não espessadas (N) intercaladas com faixas mais lisas, que correspondem à epiderme com paredes celulares espessadas (Re). Estômatos (seta) são observados em toda a face adaxial da folha, mas em maior quantidade nas áreas de células da epiderme com paredes não espessadas (rugosas).
- 22B: 170x, superfície adaxial da folha de plântula dessecada mostrando retrações da lâmina foliar. A parte exposta corresponde à epiderme reforçada, que se deforma pouco. Estômatos (seta).
- 22C: 5100x, superfície adaxial da folha hidratada, numa área correspondente à epiderme com paredes não espessadas, onde se observam estômatos (E) e marcas das paredes anticlinais células epiteliais, que ficam individualizadas (*).
- 22D: 70x, folha dessecada de plântula, mostrando o modo como a lâmina foliar se encolhe e enrola, protegendo a face abaxial (A) e expondo a face adaxial (D).
- 22E: 6080x, superfície adaxial da folha dessecada, em área de epiderme com paredes espessadas. Os espessamentos das paredes epidérmicas (Re) aparecem como cordões longitudinais e os estômatos (E) ficam entre esses cordões.



Prancha 23 (Microscopia Eletrônica de Varredura)

- 23A: 1120x, corte transversal de folha de plântula hidratada, mostrando células da epiderme com paredes espessadas (Re) e não espessadas (N), feixes vasculares (Va) e mesofilo (M), com células túrgidas e espaços intercelulares.
- 23B: 1650x, corte transversal de folha dessecada de plântula, mostrando que a parte mais deformada da lâmina foliar fica próxima às células epidérmicas com paredes não espessadas (N) e a parte onde o mesofilo ainda apresenta espaços intercelulares (e) grandes corresponde à epiderme com paredes celulares espessadas (Re).
- 23C: 2475x, folha hidratada de plântula apresenta células túrgidas no mesofilo (M), com espaços intercelulares (e). Note a epiderme com paredes celulares não espessadas (N).
- 23D: 1840x, folha dessecada de plântula apresenta mesofilo (M) com áreas mais e menos deformadas. Note um estômato (E) na face adaxial da folha.

