

SUZANA HARA

**ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS EM FOLHAS DE *Panicum maximum* Jacq.
SUBMETIDAS À CHUVA SIMULADA COM FLÚOR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2000

À minha família, principalmente à
minha mãe e ao Beto.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade de realização do Programa.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Botânica e aos seus professores, pela oportunidade, pelo apoio e pela colaboração.

À FAPEMIG e à CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À Comercial Fortaleza de Sementes de Capim Ltda., pela doação das sementes utilizadas neste experimento.

Ao professor Eldo Antônio Monteiro da Silva, não só pela orientação e pelo empenho na realização deste trabalho, como também pela preciosa amizade e pelo carinho durante todo o Programa.

Ao professor Kiyoshi Matsuoka, pelas sugestões e pelos ensinamentos, imprescindíveis na realização das microscopias fotônica e eletrônica.

À professora Aristéa Alves Azevedo, pelas sugestões valiosas, pelo apoio e pela amizade durante todo o Programa.

Ao professor Wagner Campos Otoni, pela amizade, pela cooperação sincera e pelas sugestões.

Ao professor Fernando Henrique Aguiar Vale, pela colaboração e amizade.

À professora Renata Maria Strozi Alves Meira, pela contribuição.

Ao professor Vitor Hugo, pelos esclarecimentos com relação ao preparo do solo utilizado neste experimento.

A todos os professores, pelo convívio agradável e pela contribuição na minha formação acadêmica e pessoal.

A Maria Mercês de Souza Gomes, Rogério Mauro Gomide e João Bosco, funcionários da Unidade de Crescimento de Plantas (UCP), pela ajuda na realização do experimento.

A Zilda Alzira Soares, Rosane Cruz Portugal e João Bosco da Silva Rosado, funcionários do Laboratório de Anatomia Vegetal, pela amizade e cooperação durante todo o Programa.

A Alba Lucilvânia Fonseca Chaves e Luzimar Campos da Silva, pela amizade e contribuição na realização deste trabalho.

Ao Armando, estudante de Doutorado em Fisiologia Vegetal, pela ajuda e pelas sugestões.

Ao Bruno, estagiário do Laboratório de Anatomia Vegetal, pela ajuda com as fotografias.

Aos colegas do Programa, em especial à turma de 1998, pela amizade e pelo companheirismo nas horas de estudos e lazer.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, apoiaram-me na realização deste trabalho.

À minha querida mãe, por acreditar em mim e me apoiar nos momentos mais difíceis; ao meu irmão Flávio, pela ajuda; e ao meu pai, pelo apoio e pela paciência.

Ao Beto, pelo carinho e pela compreensão.

A Deus, por tudo.

BIOGRAFIA

SUZANA HARA, filha de Tetuo Hara e Verônica Hara, nasceu em 19 de dezembro de 1972, na cidade de Belo Horizonte, MG.

Em 1997, graduou-se em Ciências Biológicas, com ênfase em Botânica, pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG.

Em março de 1998, ingressou no Programa Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Botânica da UFV, em Viçosa, MG, submetendo-se à defesa de tese em junho de 2000.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	5
2.1. Metodologia geral	5
2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	10
2.3. Microscopia fotônica (MF)	10
2.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	10
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
3.1. Microscopia eletrônica de varredura	15
3.2. Microscopia fotônica	21
3.3. Microscopia eletrônica de transmissão	27
4. RESUMO E CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
APÊNDICE	46

RESUMO

HARA, Suzana, M. S., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2000.
Alterações estruturais em folhas de *Panicum maximum* Jacq. submetidas à chuva simulada com flúor. Orientador: Eldo Antônio Monteiro da Silva. Conselheiros: Aristéa Alves Azevedo e Kiyoshi Matsuoka.

Plantas de *Panicum maximum* (colonião) foram submetidas a chuvas simuladas com soluções de flúor ($15 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), com o objetivo de identificar as alterações causadas pelo flúor na ultra-estrutura das superfícies epidérmicas e dos cloroplastos. Os sintomas visíveis, ao final do tratamento, foram clorose nas folhas em expansão e clorose e necrose nas folhas totalmente expandidas. Na microscopia eletrônica de varredura, a superfície adaxial não apresentou alterações na cera epicuticular entre os tratamentos e estádios foliares. Na superfície abaxial houve leve redução da cera epicuticular com o desenvolvimento foliar e com o tratamento com flúor. Em alguns casos, a face abaxial das folhas totalmente expandidas (com necrose) apresentava depressão da superfície com perda do contorno das células. Foi observado na varredura enrugamento em ambas as superfícies epidérmicas, nos diferentes estádios foliares e tratamentos, o que, provavelmente, não foi uma resposta ao flúor. Nos cortes transversais da região com clorose (folha em expansão) e abaixo da necrose (folhas totalmente expandidas), observaram-se as seguintes alterações nos cloroplastos das células da bainha: redução do tamanho; formato tendendo a lenticular, diferindo da forma irregular encontrada no

controle; redução da quantidade e tamanho de grãos de amido; aumento do número e tamanho dos plastoglóbulos; e estroma mais denso e estrutura de grana e tilacóides mais evidentes. Nos cloroplastos das células do mesófilo houve leve aumento do retículo periférico, e o aumento do número e tamanho dos plastoglóbulos foi mais evidente na região abaixo da necrose. Na região da necrose, todas as células apresentavam-se plasmolisadas. Adjacentes à necrose, os sintomas foram semelhantes aos que ocorreram na região da clorose e abaixo da necrose, no entanto mais intensos e com início de desorganização da estrutura de grana e tilacóides. O conjunto de alterações causadas pelo flúor em *P. maximum* indicou que este poluente não tem uma ação específica sobre todas as espécies. Recomendam-se estudos mais detalhados para caracterizar melhor a injúria por flúor em *P. maximum*.

ABSTRACT

HARA, Suzana, M. S., Universidade Federal de Viçosa, June 2000. **Structural changes in the leaves of *Panicum maximum* Jacq. in response to fluoride dissolved in artificial rain.** Adviser: Eldo Antônio Monteiro da Silva. Committee Members: Aristéa Alves Azevedo and Kiyoshi Matsuoka.

In order to identify ultrastructural changes in leaf surfaces and in the chloroplasts, species of *Panicum maximum* were treated under artificial rain with fluoride solution ($15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Visible symptoms of chlorosis in expanding leaf blade and chlorosis and necrosis in totally expanded leaf blade were observed. When observed in SEM, epicuticular wax on the adaxial surface did not change among treatments and leaf developmental stage. On the abaxial surface a slight reduction on epicuticular wax with development of leaf and with treatment with fluoride was observed. In some cases the adaxial surface of totally expanded leaf with necrosis, presented surface depression with loss of regular cells borders. SEM observations showed wrinkled on both surfaces, leaves stages and treatments, which probably was not a fluoride response. Transversal section through chlorosis region (expanding leaf) and below of necrosis (totally expanded leaf) showed the following changes in bundle sheath cells chloroplasts: size reduction; reduction in size and number of starch grain; increase in number and size of plastoglobulis; darkened stroma and more evident grana and thylakoids structure. A slight increase of peripheral reticulum and the increase of number and size of plastoglobulis were more evident in the

region below necrosis in the mesophyll cells. The necrosis region showed plasmolysis of all cells. The symptoms aside the necrosis were similar to the chlorosis and below necrosis region, however, these necrosis symptoms were more severe and showed a beginning of grana and thylakoids disorganization. The set of changes caused by fluoride in *P. maximum* suggested that these pollutant do not have specific action over all species. To better characterize the ultrastructural injuries caused by fluoride on *P. maximum*, it is suggested further studies.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os poluentes atmosféricos, o flúor é um dos mais fitotóxicos, pois pode causar injúrias em espécies suscetíveis em concentrações atmosféricas 10 a 1.000 vezes menores (menos que $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) que outros poluentes, como o ozônio, o dióxido de enxofre e os óxidos de nitrogênio (WEINSTEIN, 1977).

O flúor raramente ocorre livre na natureza, mas, combinado quimicamente com outros elementos, forma fluoretos, que são amplamente distribuídos e ocorrem em quantidades variadas no solo, na água, na atmosfera, na vegetação e em animais (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 1974). Na atmosfera, o flúor é encontrado principalmente na forma de ácido fluorídrico (HF) e, nos solos, está presente em minerais como fluorita, criolita e apatita. Pode ser originado de fontes naturais, a exemplo de vulcões ou de fontes antropogênicas como as fundições de alumínio, fábricas de adubos minerais, de vidros e cerâmicas (BUNCE, 1985; ARNDT et al., 1995).

O estudo do flúor em solução é importante, pois já foi constatada a presença de fluoretos em águas geotermiais utilizadas como fonte de irrigação (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 1974). Além disso, o flúor ocorre em grandes concentrações na chuva ácida (CETESB, 1984).

Nas plantas, o flúor é absorvido principalmente pelas folhas, na forma gasosa, e penetra nos tecidos, principalmente através dos estômatos e, em menor proporção, pela cutícula (BUNCE, 1985; MILLER, 1993), enquanto o

flúor particulado pode se dissolver e entrar na folha através da cutícula (BUNCE, 1985). Em solução, o flúor é absorvido por toda a superfície foliar. Na maioria das monocotiledôneas, o sintoma inicial de injúria é o desenvolvimento de clorose no ápice e nas margens das folhas, geralmente seguida de necrose (WEINSTEIN, 1977).

Os efeitos do flúor na planta ocorrem primeiramente em níveis subcelular e metabólico, promovendo injúrias não-perceptíveis ou crônicas. O aumento das concentrações de flúor a que estão expostas as plantas, ou do tempo de exposição, leva ao surgimento de lesões perceptíveis ou agudas (ARNDT et al., 1995). Nesses efeitos, em nível de organismo, podem incluir alteração no crescimento, alterações na reprodução ou até mesmo a morte. A planta pode, ainda, tornar-se um veículo para concentração e transferência de flúor ao longo da cadeia alimentar (WEINSTEIN, 1977).

Em geral, entre os efeitos deletérios do flúor nas plantas, incluem-se, principalmente, redução no crescimento (DETEMMERMAN e BAETEN, 1987), alterações nas trocas gasosas e taxa respiratória (HILL et al., 1958; APPLGATE e ADAMS, 1960; DARRAL, 1989), redução nos teores de clorofilas a e b e na taxa fotossintética (IVINSKIS e MURRAY, 1984; PANDEY, 1985; BUSTAMANTE, 1988; ALVES et al., 1990; MILLER, 1993) e redução na atividade de enzimas, como a enolase (WEINSTEIN, 1977).

Em nível ultra-estrutural, os efeitos em resposta ao flúor podem ser expressos pela redução no número de ribossomos e pela indução de mudanças na estrutura das mitocôndrias, do retículo endoplasmático, dos cloroplastos e do núcleo (WEI, 1973). LEDBETTER et al. (1960) observaram distribuição decrescente de flúor nas paredes celulares, nos cloroplastos, nas proteínas solúveis, nas mitocôndrias e nos microssomos. CHANG e THOMPSON (1966), estudando o sítio de acumulação do flúor em *Citrus sinensis* (Lmn.), também obtiveram dados similares, pois constataram que os cloroplastos foram os maiores sítios de acúmulo contendo cerca de 60% do total desse elemento, o que foi confirmado por TRESHOW (1971) e MILLER (1993).

Nos cloroplastos, os sintomas atribuídos ao flúor normalmente são: dilatação e enrolamento dos tilacóides; aumento do número e tamanho dos plastoglóbulos; acúmulo de grãos de amido; e, em alguns casos, descoloração

dos plastoglóbulos e alteração na forma dos cloroplastos (WEI e MILLER, 1972; THOMSON, 1975; SOIKKELI e TUOVINEN, 1979; SOIKKELI, 1981; ZWIAZEK e SHAY, 1987; ELEFThERIOU e TSEKOS, 1991; ANTTONEN, 1992; HOLOPAINEN et al., 1992; MILLER, 1993; AZEVEDO, 1995; WULFF e KÄRENLAMPI, 1996).

Existem poucos dados disponíveis na literatura sobre o efeito do flúor quando dissolvido na água sobre a ultra-estrutura foliar. Em alguns estudos sobre chuva ácida, o flúor está presente, juntamente com outros íons, sem, contudo, ser considerado o seu efeito isolado (EVANS et al., 1977). Com isso, os dados da ação isolada do flúor sobre as plantas podem servir como base de comparação nos estudos de chuva ácida.

Além do conhecimento fisiológico, os estudos estruturais são importantes para o manejo das espécies utilizadas em monitoramento de poluentes. Esses estudos podem contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos de injúria foliar causados por poluentes. Entretanto, os efeitos da poluição são pouco conhecidos em espécies tropicais brasileiras, o que limita o emprego específico de algumas gramíneas, como plantas bioindicadoras (FIGUEIREDO, 1994). Assim, são relevantes estudos das alterações estruturais causadas por mudanças antropogênicas do ambiente, com ênfase nos efeitos da poluição atmosférica sobre as plantas nativas e, ou, cultivadas (AZEVEDO, 1995).

Características da superfície foliar são importantes, pois esta é a barreira entre a planta e a atmosfera e controlam a absorção de poluentes, tanto gasosos quanto aquosos. É a parte da folha mais exposta à ação dos poluentes, e qualquer mudança na sua estrutura induzida pelos poluentes aéreos pode levar a consequências para a planta como um todo (CAPE, 1994).

FIGUEIREDO (1994), analisando as características fisiológicas e bioquímicas de nove espécies de gramíneas forrageiras tropicais submetidas ao flúor, selecionou *Panicum maximum* por ser a espécie com maior potencial para ser empregada como bioindicadora reativa de fluoretos presentes na atmosfera. Posteriormente, CHAVES (1997), comparando *Panicum maximum* com *Chloris gayana*, espécies sensível e resistente ao flúor, respectivamente, relatou alguns aspectos anatômicos, que podem estar contribuindo para a maior sensibilidade de *Panicum maximum* ao flúor, como: menor sinuosidade

da superfície epidérmica e densidade de tricomas, menor concentração de corpos de sílica, estômatos menores e lâmina foliar mais larga em relação à espécie resistente.

Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo identificar as alterações provocadas pelo flúor, dissolvido na água de chuva simulada, em níveis estrutural e ultra-estrutural, nos cloroplastos das células da bainha do feixe vascular e do mesófilo e de superfícies epidérmicas da lâmina foliar de *Panicum maximum* Jacq.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em condições não-controladas, na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG.

A espécie vegetal estudada neste trabalho foi colônio (*Panicum maximum* Jacq. - Poaceae), selecionada por ser sensível ao flúor (FIGUEIREDO, 1994).

2.1. Metodologia geral

O solo utilizado para plantio foi coletado em uma área pertencente à UFV, localizada próxima ao “Tiro de Guerra” de Viçosa, em uma profundidade de aproximadamente 50 cm da camada superior. Foi feita a correção de acidez, de acordo com a rotina do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal da UFV. Para a calagem, foram utilizados CaCO_3 (1,11 kg) e MgCO_3 (0,23 kg), numa proporção de 4:1, respectivamente, para 1.000 kg de solo, sendo este posteriormente esterilizado com brometo de metila e misturado com areia peneirada na razão 2:1, respectivamente. A adubação inicial foi feita, separando-se porções equivalentes a três vasos dessa mistura, com o intuito de melhorar a homogeneização dos nutrientes aplicados. Para cada porção foram aplicados: 20 ml da solução de KH_2PO_4 ($44,116 \text{ g.L}^{-1}$); 20 ml de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($37,795 \text{ g.L}^{-1}$); 20 ml de Na_2SO_4 ($34,553 \text{ g.L}^{-1}$); e 40 ml de

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ($20,03 \text{ g.L}^{-1}$) (CHAVES, 1997). Vinte dias depois, as amostras foram enviadas ao Departamento de Solos da UFV, para verificação do pH e da qualidade da adubação inicial (Quadro 1). Pela análise dos resultados, constatou-se a boa qualidade da adubação inicial e do pH para o prosseguimento do experimento.

Quadro 1 – Resultado da análise do solo utilizado no experimento

pH		CTC									
H ₂ O	P	K	Al	Ca	Mg	H+Al	SB	Efet	Total	V	m
--mg/dm ³ --		-----cmol _c /dm ³ -----					-----		-----%		
5,7	101,8	128	0,0	1,9	0,5	3,3	2,73	2,73	6,03	45,3	0,0

Foram utilizados para o plantio vasos plásticos de aproximadamente 0,65 kg, montados sobre recipientes com água destilada, ficando esses dois sistemas interligados por cordão de poliéster (Figura 1), segundo recomendações de RICK e ARDNT (1987).

As sementes de *Panicum maximum* foram espalhadas em toda a superfície do solo e, depois, cobertas com uma fina camada desse substrato, o suficiente para encobrir as sementes.

Quando as plantas atingiram 3 cm de altura, cerca de 15 dias após a semeadura, iniciou-se a aplicação das seguintes soluções de cinco em cinco dias, durante todo o experimento: 0,2 ml.vaso⁻¹ de uma solução de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + EDTA, 20 ml.vaso⁻¹ de solução de NH_4NO_3 ($2,33 \text{ g.L}^{-1}$) e 20 ml.vaso⁻¹ de uma solução de micronutrientes, constituída de H_3BO_3 (0,75 g), ZnCl_2 (0,0014 g), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,85 g) e $(\text{NH}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2,14 g) por litro de água destilada (com base no trabalho de WAUGH e FITTIS (1966), foi feita uma alteração na quantidade de zinco — Professor Vitor Hugo, do Departamento de Solos da UFV — comunicação pessoal).



Figura 1 - Vaso com plantas de *Panicum maximum* interligado ao recipiente com água por um cordão de poliéster.

Assim que as plantas alcançaram aproximadamente 5 cm de altura, realizou-se um desbaste para uniformizar o estágio de desenvolvimento e deixar 15 plantas por vaso. Os vasos foram, então, completados com solo para dar maior suporte às plântulas remanescentes (CHAVES, 1997).

O experimento foi composto de dois tratamentos, um controle e um com flúor. Cada tratamento tinha quatro vasos, e em cada um deles foram marcadas quatro plantas para o acompanhamento dos sintomas. As folhas foram numeradas por ordem de surgimento, durante o desenvolvimento da planta.

Para simulação das chuvas, foi utilizada uma réplica da câmara construída e adaptada por ALVES (1988), a partir do modelo proposto por EVANS et al. (1977), Figura 2, localizada no Laboratório da UCP da UFV.

Ao atingirem os estádios de quatro ou cinco folhas, totalmente expandidas, as plantas foram submetidas diariamente à chuva simulada, com duração de 15 minutos, por cinco dias consecutivos. Para preparação da chuva com flúor, foram feitas soluções contendo $15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de F^- , utilizando-se $\text{KF}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (fluoreto de potássio diidratado). No tratamento-controle, foram aplicadas chuvas apenas com água destilada. Antes e depois de cada chuva, as plantas ficaram iluminadas, sob radiação fotossintética ativa de $14,7 \mu\cdot\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, por 15 minutos, dentro da câmara, para abertura dos estômatos (CHAVES, 1997).

Os vasos foram colocados dentro da câmara de chuva; obedecendo-se a um rodízio, a cada dia o vaso era posicionado em um quadrante diferente. Na casa de vegetação, os tratamentos ficaram separados para evitar a contaminação, sendo os vasos posicionados aleatoriamente.

Durante o experimento foram feitas seis observações para acompanhar a evolução dos sintomas visíveis causados pelo flúor. A primeira antes de iniciar o tratamento e as outras, 24 horas após cada chuva, sempre antes da aplicação da chuva subsequente.

A coleta do material, para microscopias fotônica e eletrônica (transmissão e varredura), foi realizada 24 horas após a última aplicação de chuva simulada. As amostragens foram feitas na quarta e quinta folhas, representando a folha totalmente expandida; e na sexta folha, representando a folha em expansão.

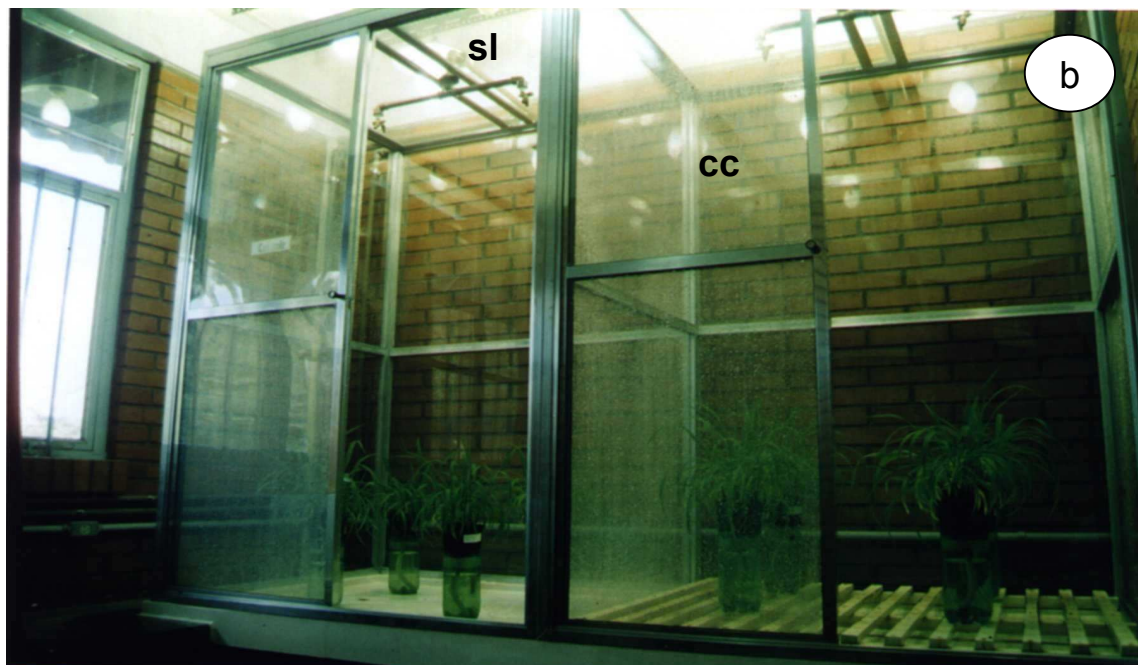
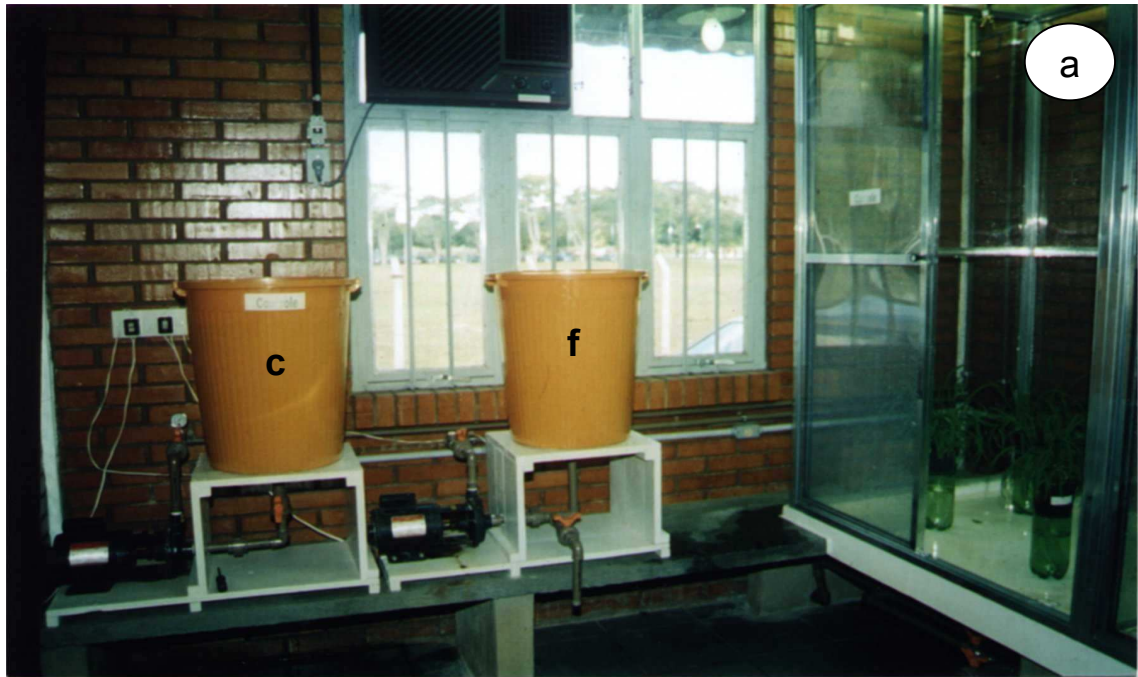


Figura 2 - Sistema utilizado para chuva simulada: **a** - Depósitos para as soluções do tratamento-controle (c) e tratamento com flúor (f) e **b** - Câmaras para simulação de chuvas (cc), sistema de luzes (sl).

2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para microscopia eletrônica de varredura, foram retiradas amostras, com aproximadamente 0,5 cm², da margem na porção mediana das lâminas foliares (Figura 3). Para padronizar a coleta, todas as amostras coletadas do tratamento com flúor apresentavam uma região com sintomas visíveis. Essas amostras foram fixadas em glutaraldeído 3%, durante 12 horas a 8 °C, e pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1%, por cerca de quatro horas a 8 °C, preparados com tampão cacodilato 0,05 M e pH 7,0. Após a desidratação do material em série etanólica, foi feita a secagem em ponto crítico, utilizando-se CO₂ em equipamento Balzers (Modelo CPD 020), e a adesão das amostras em suporte próprio foi feita com fita adesiva de dupla face e cola de carbono. Para cobertura metálica com ouro, foi utilizado o processo de pulverização catódica em equipamento Balzers acoplado com modelo FDU 010. A observação e a documentação fotográfica foram realizadas com o uso de microscópio de varredura Jeol (JSM T200), a 10 e 15 kV, do Departamento de Fitopatologia (DFP) da UFV.

2.3. Microscopia fotônica (MF)

As amostras emblocadas para observação no MET foram as mesmas usadas na microscopia fotônica. Os cortes semifinos, de aproximadamente 2 µm de espessura, obtidos em ultramicrótomo Sorval, foram distendidos, fixados e corados sobre chapa quente. A coloração foi feita com azul-de-toluidina "O" preparado em borato. Os cortes foram montados em óleo de imersão, para evitar que se enrugassem. Esse material foi fotografado no microscópio fotônico Olympus AX70, com equipamento fotográfico Olympus U-Photo, do Setor de Anatomia do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

2.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para observar a ultra-estrutura das células do mesófilo e da bainha do feixe vascular, amostras da margem, com dimensões de 1 X 2 mm, na porção mediana da lâmina foliar, foram coletadas no sentido longitudinal. Na mesma

folha foram coletadas duas amostras, uma da região com sintomas visíveis e outra 1 cm abaixo desta, sem sintomas aparentes (Figura 3). Essas amostras foram fixadas em glutaraldeído 3%, por cerca de 12 horas a 8 °C, e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, por 4 horas a 8 °C, preparados em tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,0 (BOZZOLA e RUSSEL, 1992). A fixação foi seguida de desidratação em série etanólica, embebição e inclusão em resina Spurr (SPURR, 1969). Os cortes transversais ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo Sorval, utilizando-se navalhas de vidro e de diamante. Depois, os cortes foram contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963; BOZZOLA e RUSSEL, 1992), para observação e documentação em microscópio eletrônico de transmissão da Zeiss (EM 109), a 80 kV, do Departamento de Fitopatologia da UFV.

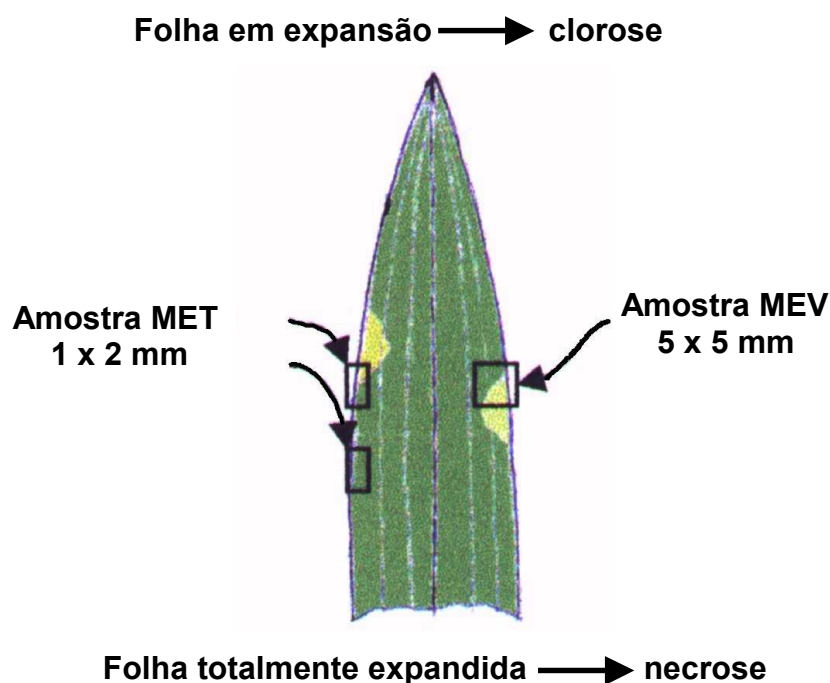


Figura 3 - Esquema das amostras coletadas para microscopia eletrônica de varredura e transmissão, na margem da região mediana da lâmina foliar de *Panicum maximum* tratada com flúor.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o primeiro dia de chuva com flúor, as plantas apresentaram início de sintomas visíveis, nas regiões mediana e apical da lâmina foliar. As folhas totalmente expandidas apresentaram manchas necróticas e as em expansão, manchas cloróticas com aproximadamente 3 mm. CHAVES (1997), estudando a mesma espécie sob a ação do flúor, também obteve dados de sintomas visuais após a primeira chuva. Já FIGUEIREDO (1994) verificou o início das injúrias visíveis no segundo dia de tratamento.

Após a segunda aplicação, as folhas totalmente expandidas apresentaram manchas necróticas principalmente nas margens das regiões basal e mediana da lâmina foliar. Na região apical dessas folhas, o surgimento de clorose seguida de necrose foi progressivo, iniciando-se na extremidade apical e seguindo em direção à região mediana. Esse efeito na região do ápice e da margem pode ser devido ao movimento do flúor, por meio da corrente transpiratória, via apoplasto, até as margens e o ápice foliar, onde é acumulado, promovendo injúrias (WEINSTEIN, 1977; LEBEAU et al., 1992; MILLER, 1993).

Nas regiões mediana e basal das folhas totalmente expandidas, os sintomas foram mais drásticos com manchas necróticas, marrom-escuras, na terceira observação; no dia seguinte, essas manchas apresentavam a intensidade de coloração reduzida. Essa mudança na coloração provavelmente era indicativo da oxidação dos compostos fenólicos que se acumularam em

resposta à alta concentração de flúor nessas regiões, onde as gotas de chuva se instalaram. FIGUEIREDO (1994) verificou, nessa espécie, aumento de 80% nos níveis de fenóis na presença de danos visíveis, decorrentes da ação do flúor.

A coloração intensa pela fucsina observada em todas as áreas injuriadas, registrada em *Glycine max* (AZEVEDO, 1995) e em *Panicum maximum* (CHAVES, 1997), foi atribuída ao acúmulo de compostos fenólicos. SILVA (1998) observou, na maioria das necroses analisadas em *Joannesia princeps* submetida à chuva ácida, uma série de eventos, a saber: acúmulo de compostos provavelmente fenólicos na região de instalação da necrose, plasmólise, hipertrofia e colapso de algumas células.

Segundo ZOBEL e NIGHSWANDER (1991), geralmente o acúmulo de compostos fenólicos é seguido pela degradação do citoplasma, pelo desaparecimento de organelas e pela liberação de conteúdos vacuolares, levando a célula à morte. Esse acúmulo é um mecanismo de defesa das plantas ativado por fatores bióticos e abióticos, ou seja, induzidos pelo estresse (VAUGHN e DUKE, 1984).

As manchas escuras parecem corresponder à localização das gotas que se instalaram após as chuvas simuladas. Essa observação também foi feita por CHAVES (1997). A arquitetura e a pilosidade dessas folhas podem ter contribuído para a disposição das gotas, uma vez que a lâmina foliar se envergava, na forma de arco, propiciando o seu acúmulo, principalmente na região mediana da lâmina foliar, nas superfícies adaxial e abaxial, Figura 4(a).

Apesar de as folhas jovens, em geral, serem mais sensíveis ao flúor do que as totalmente desenvolvidas (LEBEAU et al., 1992), foi observado em *Panicum maximum* que as folhas expandidas mostraram, ao final do tratamento, maior quantidade de necroses e cloroses do que as folhas em expansão que apresentaram somente clorose, Figura 4 (b e c). Semelhantemente, CHAVES (1997) constatou que as folhas totalmente expandidas constituíram o estágio foliar que apresentou os sintomas mais agudos.

A área foliar exposta às chuvas simuladas pode ter contribuído para a ocorrência dos diferentes sintomas. No início, as folhas em expansão apresentavam, muitas vezes, a região basal totalmente enrolada, sendo as



Figura 4 - Aspecto de *Panicum maximum* após a chuva e sintomas comuns no terceiro dia de tratamento com flúor: **a** – Disposição das gotas de solução na folha após a chuva; **b e c** – Lâmina foliar com injúrias, principalmente nas margens, causadas pelo flúor; **b** – clorose (→); e **c** – Necrose (→), barra=1,5 cm.

regiões apical e mediana levemente enroladas, paralelas à nervura central, o que diminuía a superfície de contato. Já as folhas totalmente expandidas iniciaram o tratamento com a bainha evidente, ou seja, com as regiões basal, mediana e apical mais expostas.

3.1. Microscopia eletrônica de varredura

Ao microscópio eletrônico de varredura, a superfície adaxial das folhas em expansão apresentou, no controle, estruturas bem definidas: micropêlo, pêlo com forma de acúleo, corpos de sílica nas células epidérmicas situadas sobre as regiões das nervuras, estômatos com células-guarda halteriformes, células buliformes nos sulcos da lâmina foliar, cera epicuticular bem distribuída e células epidérmicas alongadas com paredes sinuosas, Figura 5 (a e b), de acordo com a classificação de METCALFE (1960) para essa espécie.

No tratamento com flúor, a superfície adaxial das folhas em expansão apresentou enrugamento na superfície semelhante ao ocorrido no controle, Figura 5 (c), mas não foi constatada a perda da cera epicuticular e nem uma região que possa identificar o início de injúria; nesse caso, a clorose, Figura 5 (d a f).

Não foi observado, no tratamento-controle, diferença na distribuição da cera epicuticular na face adaxial entre as folhas em expansão e totalmente expandidas, Figura 6 (a e b). Pode-se notar, nessa figura, que as folhas totalmente expandidas do controle também apresentaram, na superfície adaxial, regiões com células aparentemente normais e regiões com células murchas. Essas regiões com perda da turgidez foram semelhantes às que ocorreram no tratamento com flúor, o que pode indicar ser alteração causada por outros fatores, mas não especificamente pelo flúor, Figura 6. O processo de secagem em ponto crítico pode ter sido drástico, afetando as células buliformes, que são altamente sensíveis à perda de água.

Nas folhas em expansão do controle, a superfície abaxial apresentava a cera epicuticular mais esparsa do que na outra superfície. No entanto, CHAVES (1997) relatou que a presença da cera epicuticular nessa epiderme abaxial não era nítida.

Figura 5 - Superfície adaxial das folhas em expansão de *Panicum maximum*: **a a c** - controle; **d a f** - tratamento com flúor; **a** – Ampla distribuição de pêlos em forma de acúleo na margem da folha, visto em detalhe em **b**, barra=100 μm ; **b** – Presença de corpos de sílica (CS) nas células epidérmicas e pêlos com forma de acúleo (PA) sobre as nervuras, estômatos (E) e micropêlo (MI), notando-se a distribuição homogênea da cera epicuticular, barra=50 μm ; **c** – Superfície das células epidérmicas com aspecto enrugado mostrando o pêlo em forma de acúleo (PA) e estômatos (E), barra=50 μm ; **d** – Superfície enrugada, com pêlo em forma de acúleo sem turgidez, barra=50 μm ; **e** – Região enrugada (EN) ao lado de uma região com início da perda de turgidez, (TU), barra=50 μm ; e **f** – Detalhe da região com perda de turgidez em que a região dos feixes vasculares (FV) sobressai ainda mais, e células buliformes (BU) nos sulcos da epiderme, barra=20 μm .

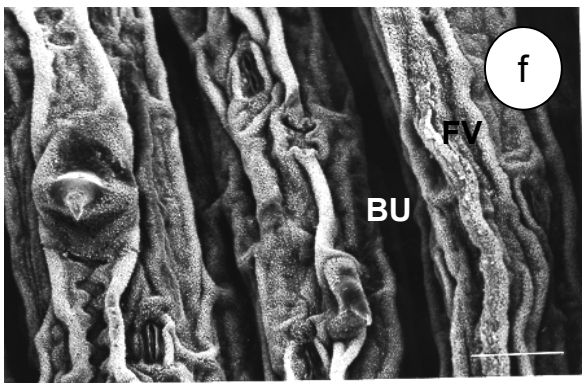
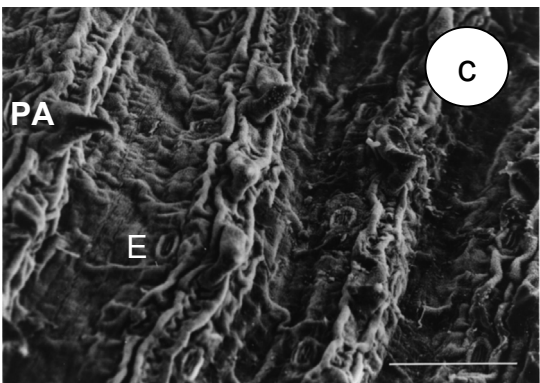
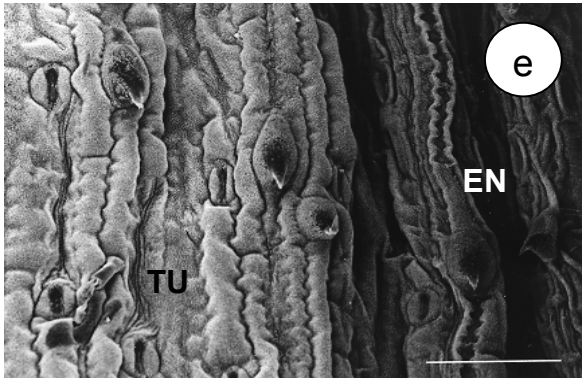
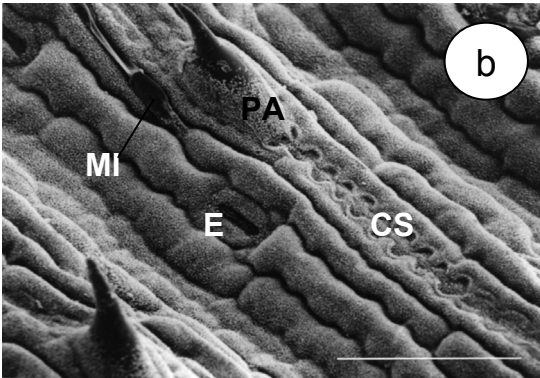
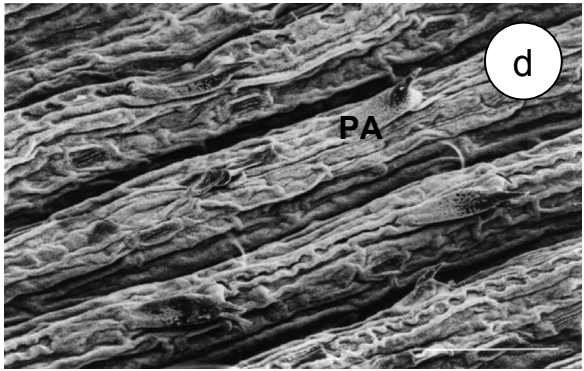
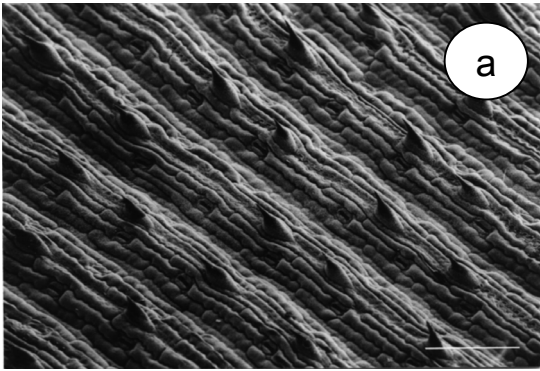
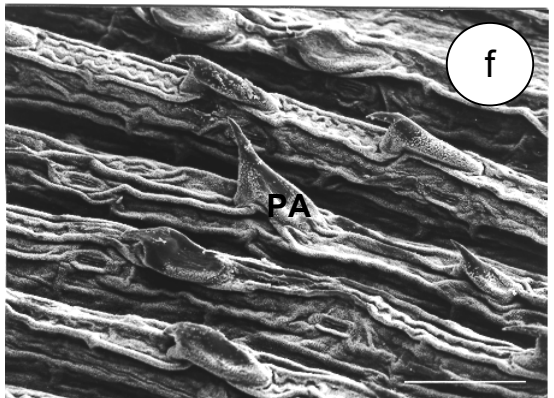
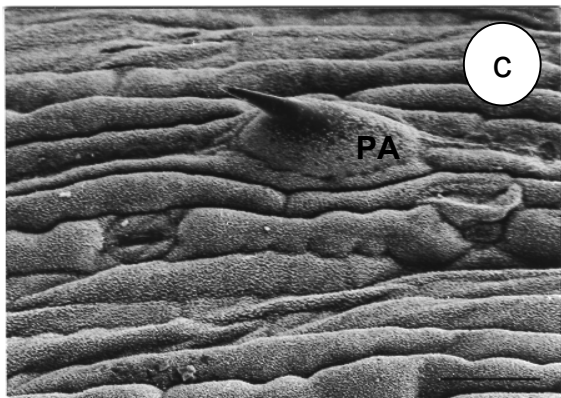
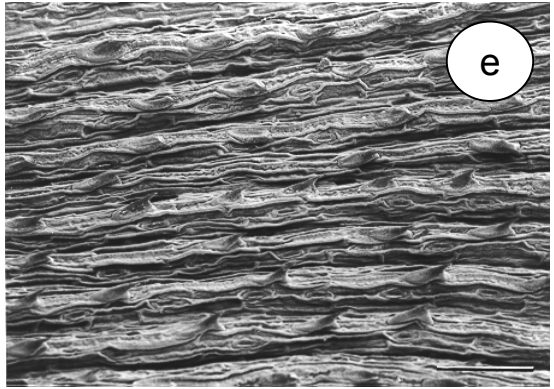
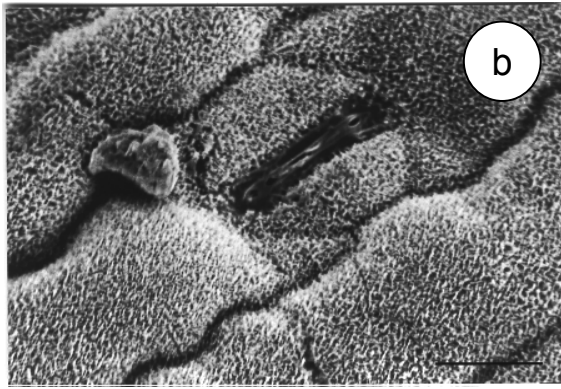
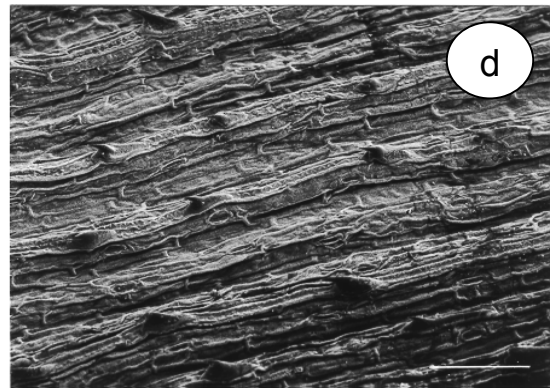
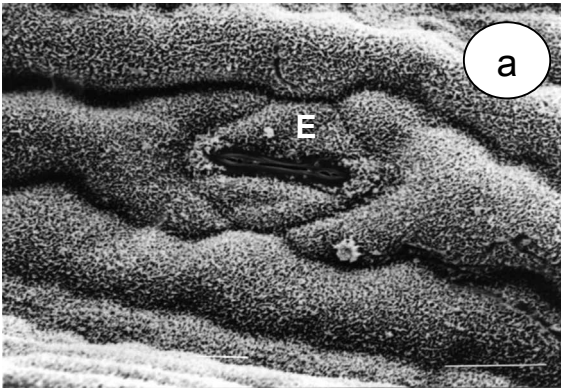


Figura 6 - Superfície adaxial das folhas de *Panicum maximum*: **a a d** - controle; **b a f**, folhas totalmente expandidas; **e a f**, tratamento com flúor; **a** – Distribuição uniforme da cera epicuticular e estômato (E) com células-guarda halteriformes nas folhas em expansão, barra=10 μm ; **b** – Distribuição uniforme da cera epicuticular semelhante ao encontrado nas folhas em expansão e estômato (E) com formato mais arredondado no controle, barra=10 μm ; **c** - Superfície com células túrgidas com pêlo em forma de acúleo (PA), barra=25 μm ; **d** – Vista geral da superfície enrugada no controle, barra=100 μm ; **e** – Vista geral da superfície enrugada semelhante à encontrada no controle, barra=100 μm ; e **f** – Detalhe da perda de turgidez do pêlo com forma de acúleo (PA), mas cera epicuticular intacta, barra=50 μm .



Este trabalho vem reforçar a presença de macropêlos somente na superfície abaxial, encontrados por CHAVES (1997), o que não está de acordo com METCALFE (1960). As sementes utilizadas neste trabalho e no de CHAVES (1997) foram fornecidas pela mesma empresa, o que pode ter contribuído para a semelhança anatômica entre elas.

A perda de turgidez das células epidérmicas foi observada nos tratamentos-controle e com flúor, na face abaxial. Foi verificado ainda, na amostra submetida ao flúor, redução generalizada da cera epicuticular, não deixando indícios de um local que pudesse apresentar maior permeabilidade ao flúor naquela face, Figura 7.

A superfície abaxial das folhas totalmente expandidas, Figura 8, apresentou aspecto mais liso do que nas folhas em expansão. A perda de turgidez foi novamente observada na face abaxial das folhas totalmente expandidas, tanto no controle quanto no tratamento com flúor. Foi observado na amostra submetida ao flúor depressão brusca em uma região da epiderme, com enrugamento das células epidérmicas que apresentavam aspecto murcho, não sendo possível evidenciar contorno nítido entre as células e nem a cera epicuticular, Figura 8 (f). Essa depressão está representando a região da necrose, pois redução brusca da espessura do mesófilo foi também observada nos cortes semifinos, Figura 11 (a e b).

CHAVES (1997) verificou redução ou perda total da cera epicuticular na região da lâmina foliar afetada pelo flúor, fato esse não evidenciado na face adaxial no presente trabalho. A divergência dos resultados obtidos nesta pesquisa com os de CHAVES (1997) pode estar relacionada com diferenças na realização dos experimentos, como: temperatura, luminosidade, duração do experimento e área foliar amostrada. O experimento de CHAVES (1997) pode ter sido feito em um período do ano diferente; logo, sofrendo temperaturas e umidade relativa do ar diferentes; as plantas foram submetidas à luminosidade direta do Sol apenas no período da manhã, enquanto neste trabalho as plantas foram expostas à luz direta do Sol, tanto na parte da manhã quanto na parte da tarde, na casa de vegetação; as aplicações de chuvas foram de 20 dias consecutivos, diferentemente do que ocorreu no trabalho, com aplicações de 5 dias, e a área amostrada não foi na margem da lâmina foliar e sim entre a margem e a nervura principal.

Figura 7 - Superfície abaxial da lâmina foliar em expansão de *Panicum maximum*:
a – Superfície do controle com macropêlo (MA), exclusivo desta epiderme, micropêlo (MI), estômato (E) e cera epicuticular mais esparsa, barra=50 μm ; **b** – Controle com perda de turgidez das células da base do macropêlo (MA) e adjacentes a ela e estômatos (E), barra=50 μm ; e **c** – Amostra submetida ao flúor com a cera epicuticular removida e grande perda de turgidez da superfície, incluindo pêlo em forma de acúleo (PA), macropêlo (MA) e estômatos, barra=50 μm .

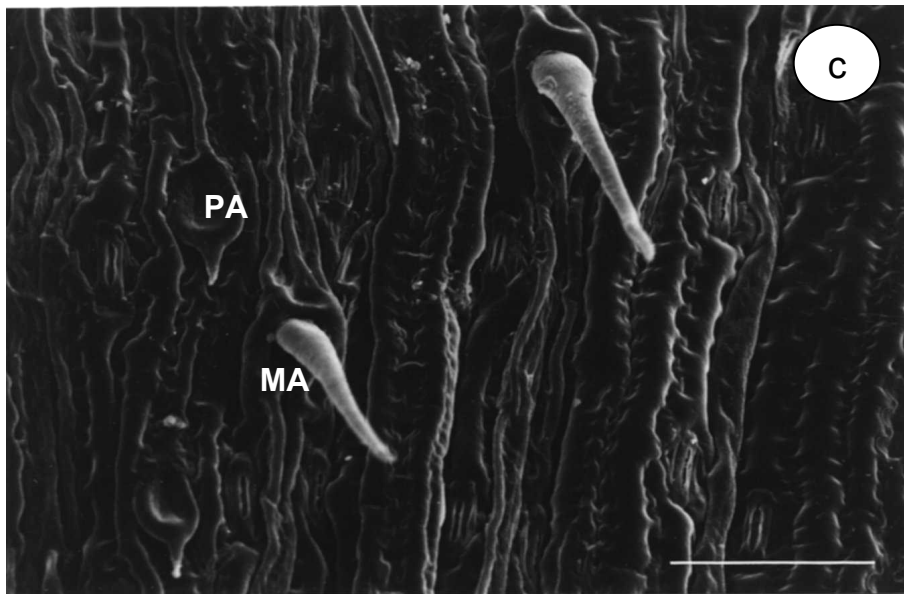
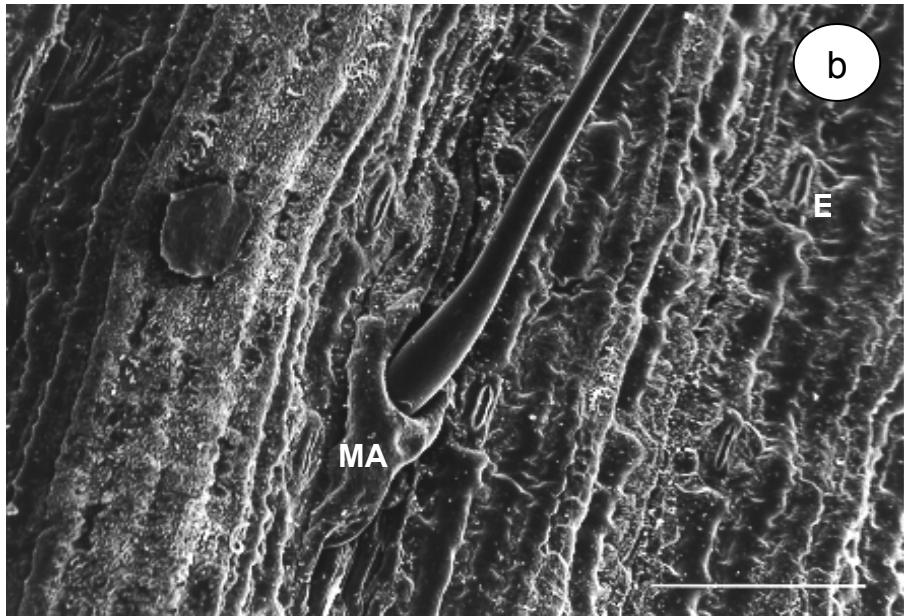
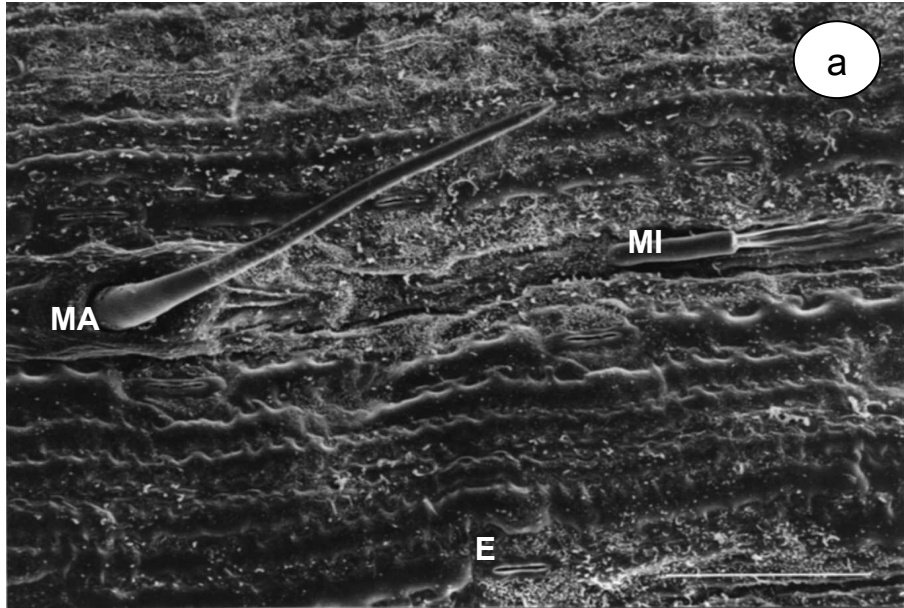
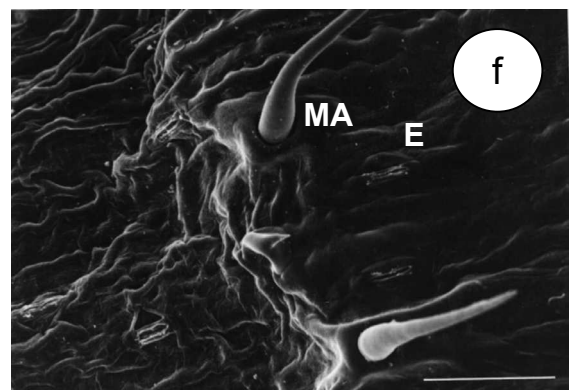
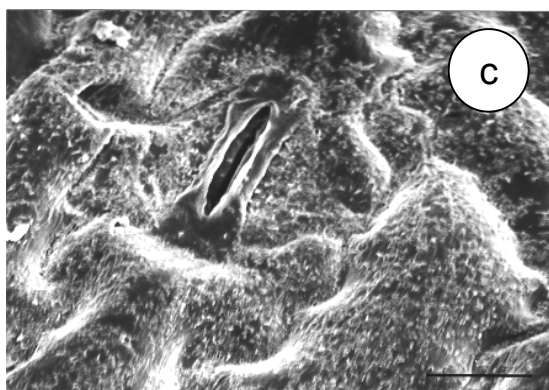
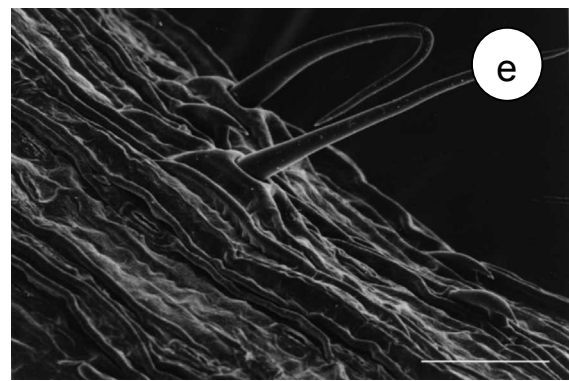
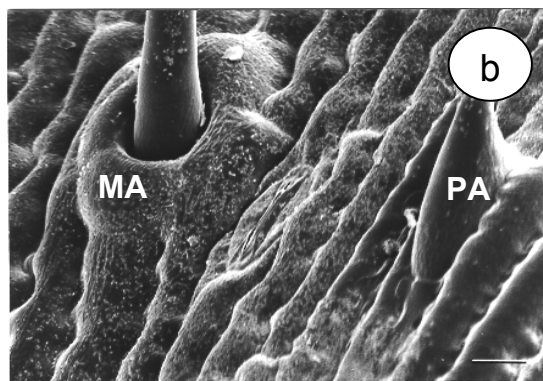
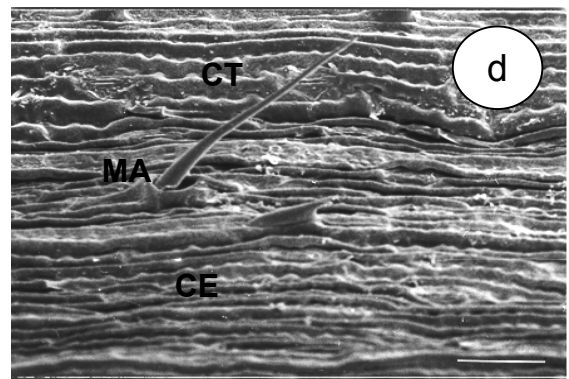
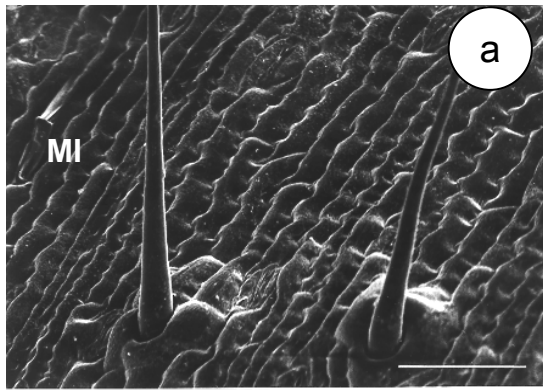


Figura 8 - Superfície abaxial da folha totalmente expandida de *Panicum maximum*: **a a d**, controle; **e e f**, tratamento com flúor; **a** – Macropêlo com células túrgidas na base, estômatos e micropêlo (MI), barra=50 μm ; **b** – Detalhe das células da base do macropêlo (MA) túrgidas, estômato e pêlo em forma de acúleo (PA). Superfície menos rugosa do que nas folhas em expansão, barra=10 μm ; **c** – Estômato e presença da cera epicuticular, barra=10 μm ; **d** – Região com superfície enrugada (CE), perda de turgidez na base do macropêlo (MA) e pêlo em forma de acúleo ao lado de uma região com células túrgidas, barra=50 μm ; **e** – Superfície enrugada no tratamento com flúor semelhante ao enrugamento observado no controle, barra=50 μm ; **e e f** – Folha tratada com flúor apresentando perda da cera epicuticular e depressão da epiderme com perda do contorno das células, provavelmente representando a necrose, adjacentes à região com células túrgidas na base do macropêlo (MA) e estômato (E), barra=50 μm .



Alguns pesquisadores (ALVES e OLIVA CANO, 1993; AZEVEDO, 1995) têm relacionado a erosão da cera epicuticular com o impacto das gotas de chuvas que removeriam essa cera. Além do impacto das gotas de chuva, CAPE (1994) relatou que a superfície foliar também está sujeita à abrasão física por outras folhas. Dessa forma, aumentaria sua permeabilidade e elevaria o risco de injúrias. No entanto, não foi detectado alteração perceptível na cera, após cinco dias de tratamento com a chuva simulada, o que levanta a hipótese de a remoção da cera ser consequência da injúria sofrida pela folha e não o contrário. Além disso, se as gotas de chuva simulada causassem erosão da cera epicuticular, então todas as amostras deveriam apresentar erosão, pois ambos os tratamentos foram submetidos à ação da chuva simulada. É possível que a duração deste experimento não tenha sido suficiente para provocar alterações na cera epicuticular, ou a área amostrada foi insuficiente para verificar essas alterações.

A hipótese de o flúor estar afetando a síntese de cera epicuticular pode ser analisada através de estudos bioquímicos, fisiológicos e anatômicos mais específicos.

O enrugamento das células epidérmicas nas folhas em expansão e folhas totalmente expandidas de ambos os tratamentos, tanto na superfície adaxial quanto na superfície abaxial, indica que as amostras podem ter sofrido alterações durante o processamento do material, ou que as plantas sofreram alguma interferência durante o experimento, o que levou a uma maior cautela ao se diagnosticar um sintoma causado pelo flúor na MEV. Com isso, não foi possível afirmar que a perda de turgidez nas células da base do macropêlo seja indício da via de entrada do flúor em solução, como foi observado por AZEVEDO (1995) em pêlo tector de *Glycine max*.

Não se pôde observar na MEV um local preferencial da ocorrência de lesões causadas pelo flúor, por isso seria imprudente inferir, neste estudo, a respeito da principal via de entrada do flúor para esta espécie.

3.2. Microscopia fotônica

Conforme observado nos cortes semifinos, a anatomia da folha de *Panicum maximum* confere com as descrições da espécie feitas por

METCALFE (1960) e CHAVES (1997). Nos cortes semifinos das folhas do tratamento-controle, puderam ser observados feixes vasculares menores sem mestoma evidente e o mesófilo com espaços intercelulares conspícuos e parede celulares delgadas, Figura 9 (a e b).

A folha em expansão com clorose apresentou células da bainha com cloroplastos de tamanho reduzido, Figura 9 (c).

Os cortes semifinos obtidos na amostra retirada 1 cm abaixo da clorose, Figura 9 (d), não apresentaram diferenças estruturais em relação aos do controle, Figura 9 (a), indicando que a clorose causada pelo flúor possa estar restrita à área visivelmente alterada.

Visivelmente, notou-se redução do número de cloroplastos nas células da bainha vascular das folhas totalmente expandidas, Figura 10 (b), em relação aos cloroplastos das folhas em expansão, Figura 10 (a). No entanto, essa redução pode estar relacionada à expansão celular e não necessariamente à redução do número de cloroplastos.

Na folha totalmente expandida, observou-se que, na região da necrose, as células epidérmicas estavam colapsadas com dobras nas paredes, Figura 10 (c e d); as células do mesófilo apresentavam-se totalmente plasmolisadas, e no centro das células restava apenas uma massa compacta; nas células da bainha, havia perda total do arranjo centrífugo dos cloroplastos, normalmente encontrado em plantas C₄ do tipo PEP - carboxicinase (HATCH et al., 1975), e os conteúdos celulares estavam dispersos na célula.

CHAVES (1997), estudando o efeito do flúor em *Panicum maximum* Jacq., relatou a perda de turgidez das células epidérmicas, em virtude da plasmólise, e deformação de suas paredes. Observou, ainda, redução ou perda total da cera epicuticular na região da lâmina foliar afetada pelo flúor. AZEVEDO (1995) também obteve resultados semelhantes, estudando o efeito do flúor nas folhas de *Glycine max* (L.) Merril, mas concluiu que os componentes celulares mais afetados pelo flúor foram a parede celular e os cloroplastos.

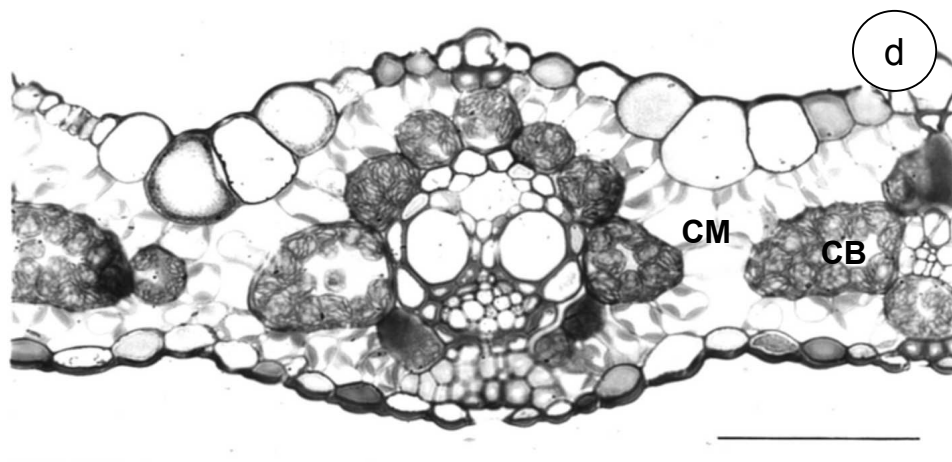
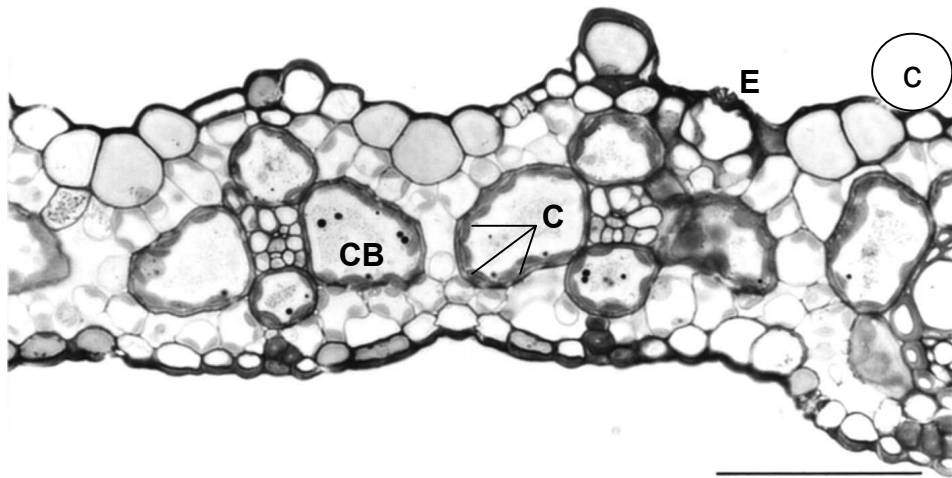
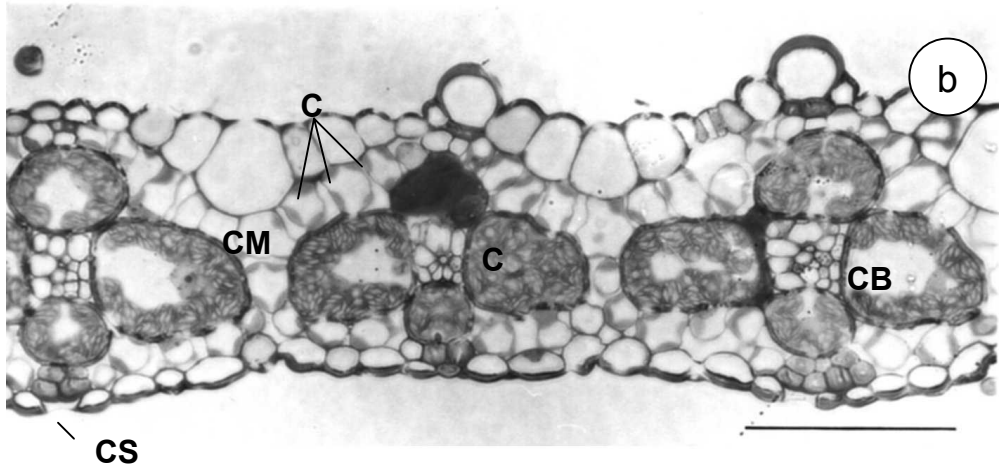
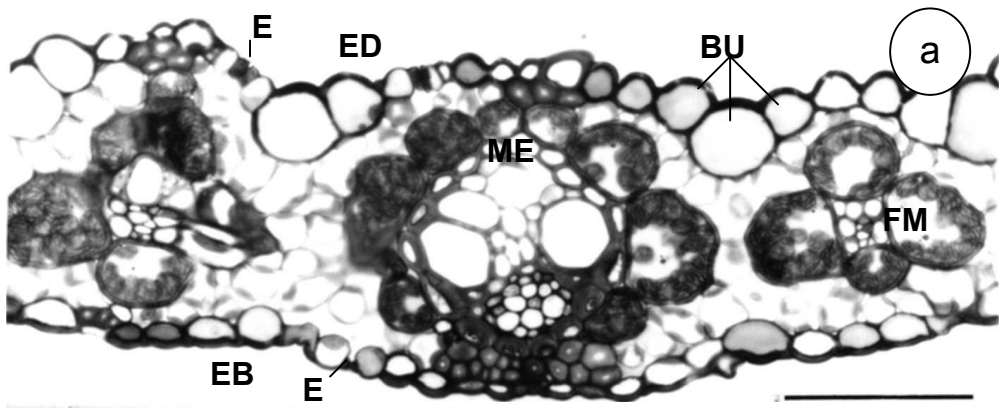
Nas regiões adjacentes, Figura 11 (a a b) e 1 cm abaixo da necrose, Figura 11 (c), foi observada a diminuição nítida do tamanho dos cloroplastos das células da bainha, em relação ao controle, Figura 11 (d), indicando que nos

casos de injúria mais avançada, na necrose, as alterações anatômicas se estendem além do ponto de necrose visível.

A hipertrofia das células do mesófilo ou das células buliformes, nas folhas em expansão (CHAVES, 1997), não foi observada neste trabalho.

Com base nas observações feitas nos cortes semifinos, foram selecionadas as amostras para análise na MET.

Figura 9 - Cortes transversais semifinos da região mediana da folha em expansão de *Panicum maximum*: **a** e **b** – controle; **c** e **d** – tratamento com flúor; **a** – Células buliformes (BU) na epiderme adaxial (ED), estômatos (E) em ambas as epidermes, mestoma (ME) no feixe vascular de maior porte e feixe vascular menor (FM), sem mestoma evidente, barra=50 µm; **b** – Células do mesófilo (CM) com espaços intercelulares conspícuos, paredes celulares delgadas com poucos cloroplastos (C) e células da bainha (CB) volumosas e repletas de cloroplastos (C), barra=50 µm; **c** – Amostra com clorose provocada pelo flúor, com cloroplastos (C) das células da bainha (CB) menos volumosos, barra=50 µm; e **d** - Corte transversal da região 1 cm abaixo da clorose, com células do mesófilo (CM) e da bainha (CB) semelhantes às do controle, barra=50 µm.



Figuras 10 - Cortes transversais semifinos da região mediana da lâmina foliar de *Panicum maximum*: **c** e **d** – Região da necrose em folhas totalmente expandidas, submetidas a chuvas com flúor; **a** – Folha em expansão do tratamento-controle com células da bainha (CB) repletas de cloroplastos (C), barra=50 μm ; **b** – Folha totalmente expandida visualizando uma menor concentração de cloroplastos (C) nas células da bainha (CB) em relação às folhas em expansão e células do mesófilo (CM) sem diferença perceptível, barra=50 μm ; **c** – Células epidérmicas (ED) colapsadas com paredes retorcidas, células do mesófilo (CM) plasmolisadas e células da bainha (CB) com conteúdo celular disperso, barra=50 μm ; e **d** - Células do mesófilo (CM) com conteúdo denso formando uma massa no centro da célula e células da bainha (CB) com conteúdo celular desorganizado, barra=50 μm .

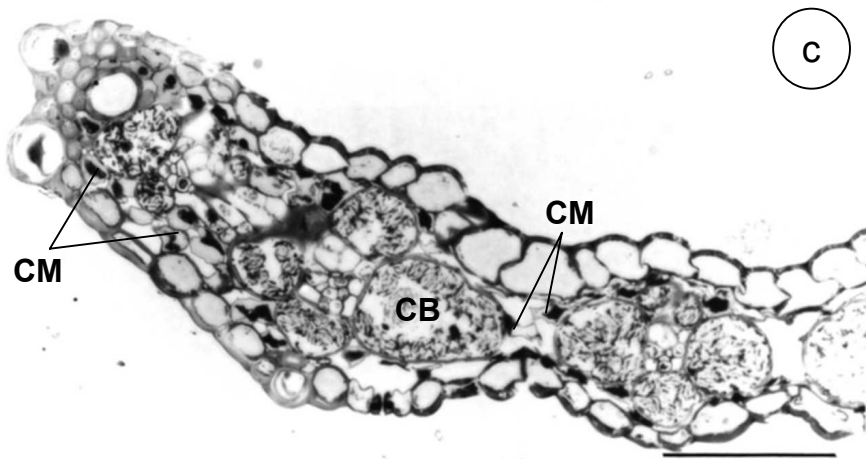
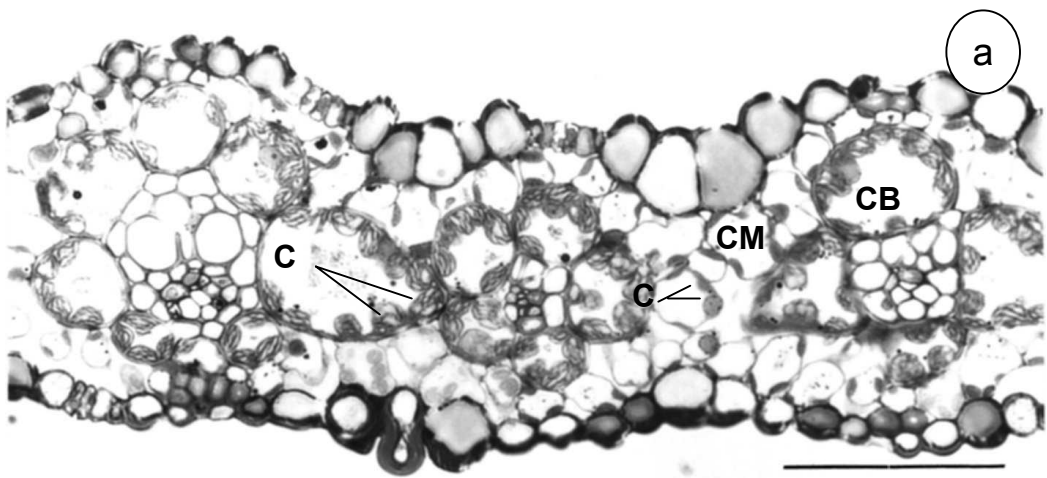
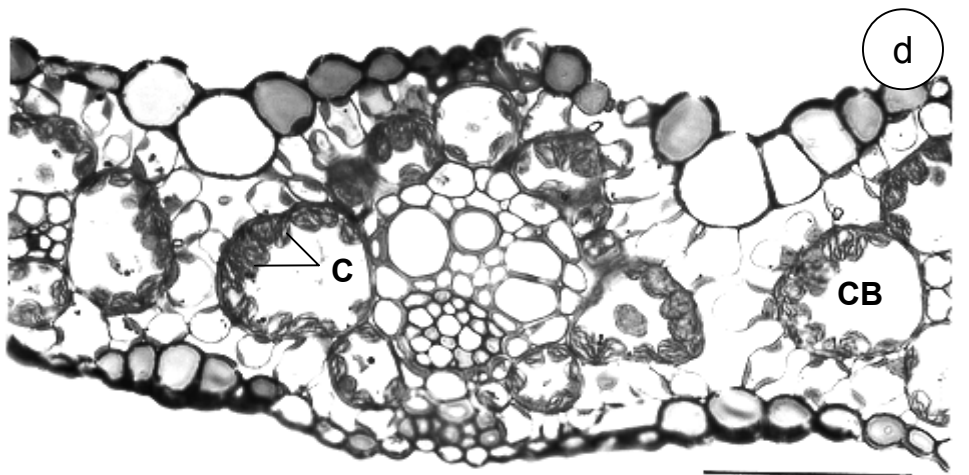
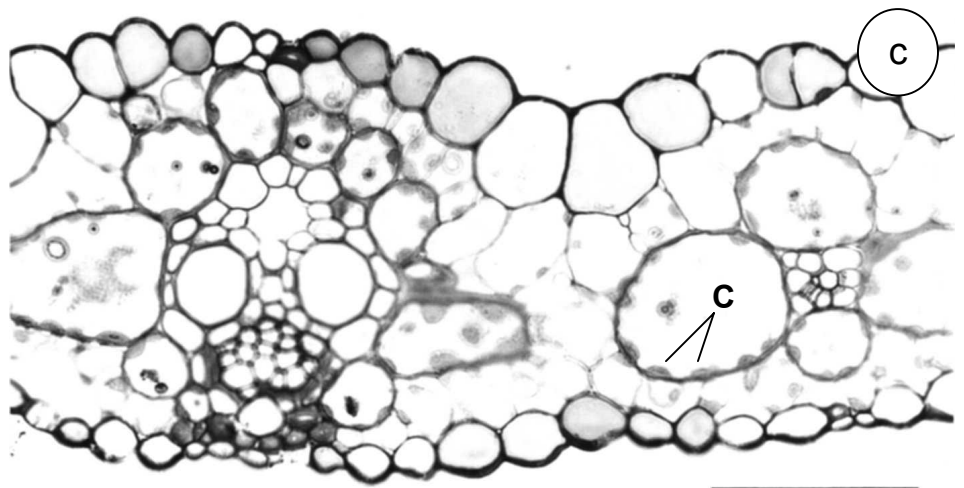
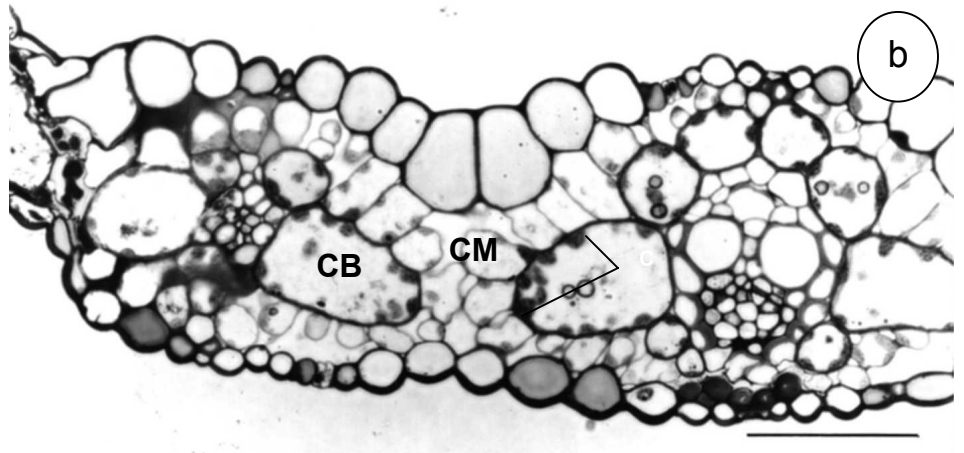
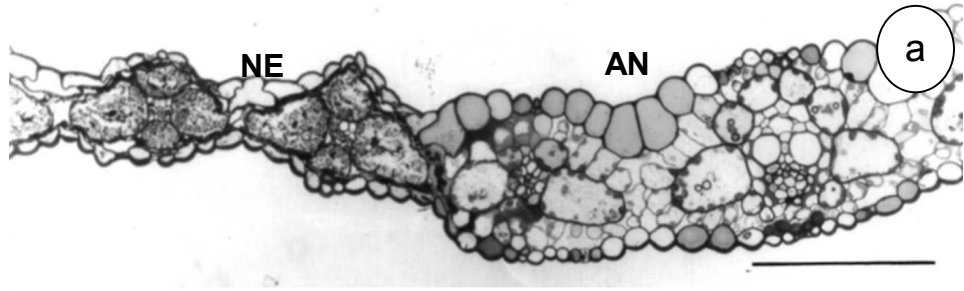


Figura 11 - Cortes transversais semifinos em folhas totalmente expandidas de *Panicum maximum*: **a**, **b** e **c** – Folhas tratadas com flúor; **a** – Região de necrose (NE) e adjacente à necrose (AN), barra=100 µm; **b** – Região adjacente à necrose com cloroplastos (C) das células da bainha (CB) e das células do mesófilo (CM) reduzidos em tamanho, barra=50 µm; **c** – Corte da amostra retirada 1cm abaixo da necrose com cloroplastos (C) das células da bainha reduzidos e semelhantes aos encontrados no corte anterior, barra=50 µm; e **d** – Corte da folha do controle com cloroplastos (C) das células da bainha (CB) volumosos, barra=50 µm.



3.3. Microscopia eletrônica de transmissão

No tratamento-controle, pôde-se verificar, nas folhas em expansão, que os cloroplastos das células da bainha eram maiores, não tinham forma bem definida, estavam repletos de grãos de amido e apresentavam estrutura de grana e tilacóides e retículo periférico pouco evidente. Os cloroplastos do mesófilo ocorrem em número e tamanho reduzidos, em geral com o formato lenticular, retículo periférico (contornando internamente os cloroplastos), estrutura de grana e tilacóides bem definida e sem grãos de amido, Figura 12. Segundo LAETSCH (1974), o retículo periférico geralmente é mais desenvolvido nos cloroplastos das células do mesófilo do que no das células da bainha.

A folha em expansão com clorose apresentou células da bainha com cloroplastos de tamanho reduzido, cuja forma destes tendia a ser lenticular, contrastando com o controle, em que o cloroplasto não apresentava forma definida. Pôde-se notar, ainda, que houve redução do número e tamanho dos grãos de amido, aumento no número de plastoglóbulos e aumento da elétrondensidade do estroma, e a estrutura de grana e tilacóides tornou-se mais evidente. Nas células do mesófilo, os efeitos não foram tão evidentes, mas se observou, nos cloroplastos, pequeno aumento no retículo periférico e no número de plastoglóbulos, Figura 13.

Quanto à presença de estroma mais elétron-denso nos cloroplastos da célula da bainha, KUKKOLA et al. (1997) afirmaram que um dos sintomas de injúria mais comuns encontrados numa área com grande emissão de SO_2 , N e Cu foi o escurecimento do estroma. GONZÁLEZ et al. (1993) também encontraram, em folhas de pinheiros, cloroplastos alongados, com estroma denso, uniforme e escuro, após a exposição ao ambiente industrial (onde o principal poluente era o SO_2). Esse aumento na densidade do estroma pôde ainda ser observado por SWANSON et al. (1973) e THOMSON (1975), após a fumigação com O_3 . SUTINEN (1992) relatou que o ozônio causa acumulação de material ribossomal no estroma, fazendo-o parecer escuro, o que indica que o flúor e outros poluentes também podem estar atuando nesse acúmulo. O estroma denso também tem sido relacionado à deficiência de nutrientes (FINK,

Figura 12 - Cortes transversais ultrafinos da região mediana da folha em expansão de *Panicum maximum* – controle: **b** e **c** – Células da bainha; **d**, **e** e **f** – Células do mesófilo; **a** – Células do mesófilo (CM) de parede celular delgada com cloroplastos de formato lenticular, células da bainha (CB) com parede espessada e cloroplastos repletos de grãos de amido e maiores do que os do mesófilo, barra=2 μm ; **b** – Detalhe da periferia dos cloroplastos com retículo periférico (RP) pouco evidente e repletos de grãos de amido (A), barra=1 μm ; **c** – Cloroplasto da célula da bainha com a estrutura de grana (G) e tilacóides e repletos de grãos de amido (A), barra=1 μm ; **d** – Cloroplastos com formato lenticular nas células do mesófilo (CM), barra=2 μm ; **e** – Cloroplastos com retículo periférico (RP) no estroma e periférico à dupla membrana e sistema de grana (G) e tilacóides (T) bem evidente, barra=0,5 μm ; e **f** – Cloroplasto sem grãos de amido evidente, estrutura de grana (G) e tilacóides (T) bem definida, estroma (E) com poucos plastoglóbulos (P) e presença do retículo periférico (\rightarrow) na periferia interior do cloroplasto, barra=1 μm .

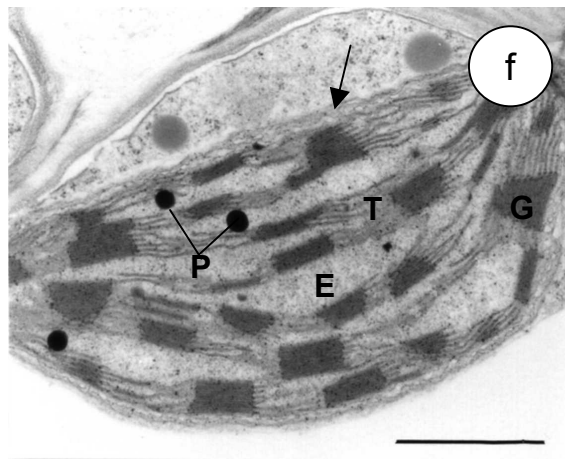
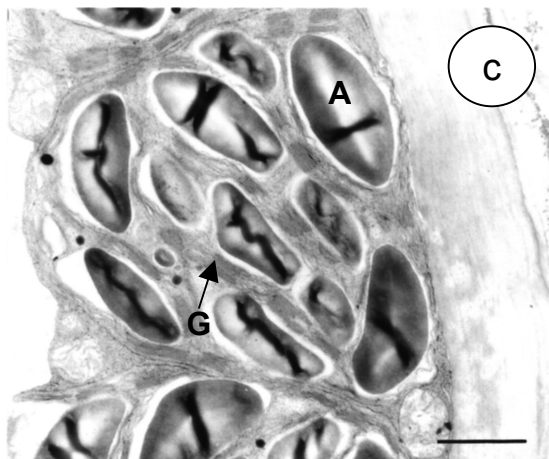
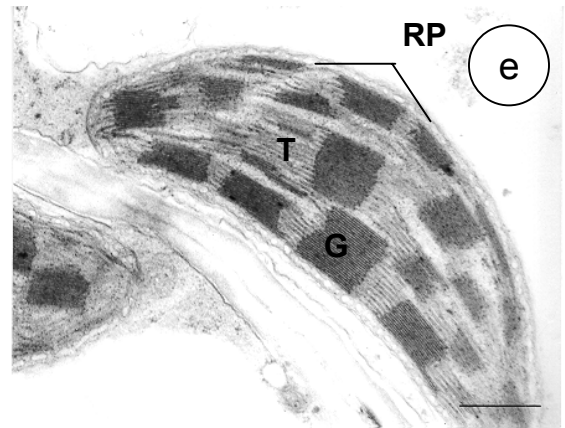
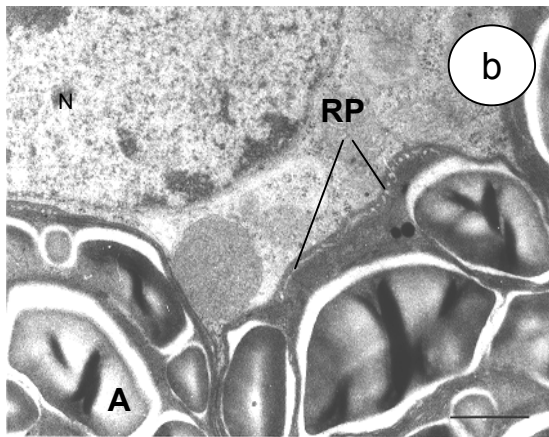
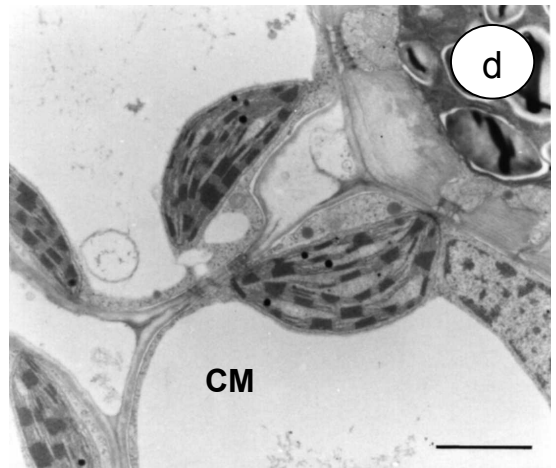
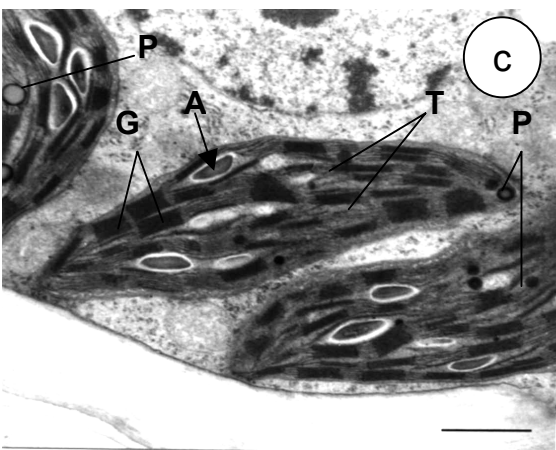
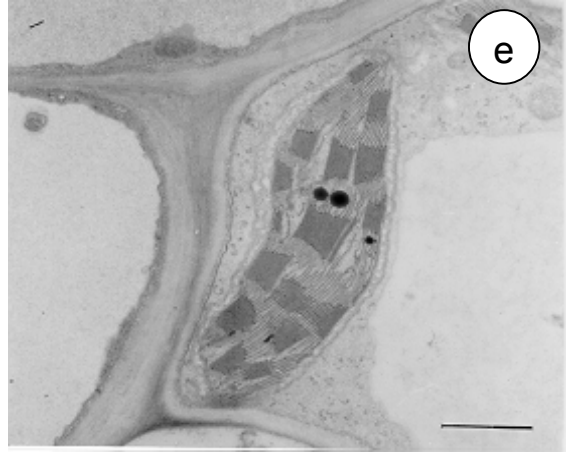
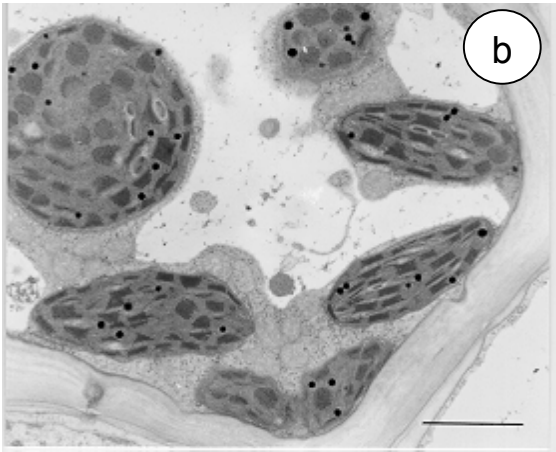
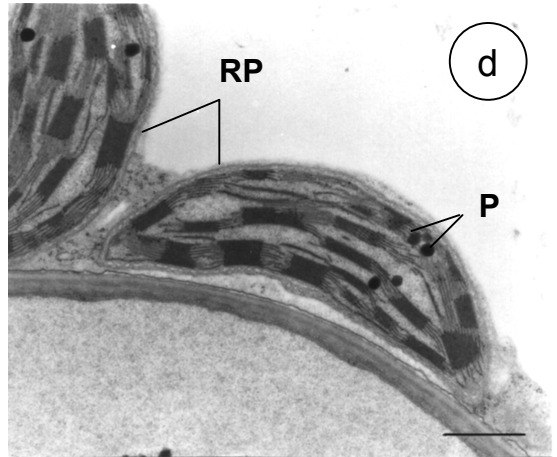
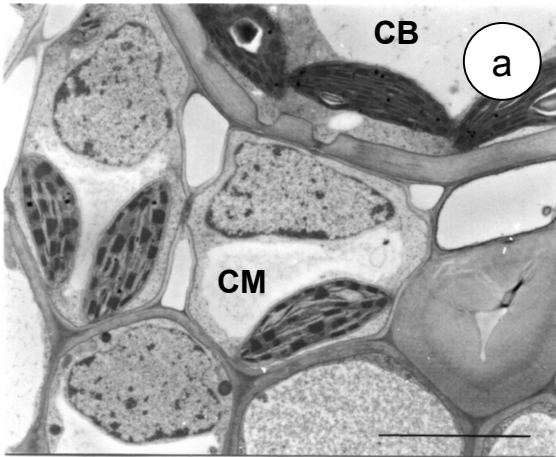


Figura 13 - Cortes transversais ultrafinos das folhas em expansão de *Panicum maximum* com clorose provocada pelo flúor: **d a f** - Cloroplastos das células do mesófilo; **a** - Cloroplastos das células da bainha (CB) com formato lenticular e apresentando estroma mais denso em relação aos dos cloroplastos das células do mesófilo (CM), barra=5 μm ; **b** - Cloroplastos das células da bainha com diferentes formas, barra=2 μm ; **c** - Cloroplastos das células da bainha com diminuição da quantidade e do tamanho de grãos de amido (A), estrutura de grana (G) e tilacóides (T) mais evidente, aumento do número de plastoglóbulos (P), barra=1 μm ; **d** - Leve aumento do número de plastoglóbulos (P), barra=1 μm ; **e e f** - Cloroplastos com retículo periférico (RP) e plastoglóbulos (P) levemente aumentados; **e** - barra=1 μm ; e **f** - barra=0,5 μm .



1988), o que levanta a hipótese de o flúor atuar no balanço nutricional das plantas.

A chuva ácida em condições naturais ou experimentais leva ao aumento no volume do lúmen do tilacóide e à expansão do tilacóide em folhas de coníferas (STOYANOVA e VELIKOVA, 1997/98; WULFF et al., 1996). Nas mesmas condições, os cloroplastos do parênquima lacunoso apresentaram um maior grau de resistência estrutural, em comparação com os do parênquima paliçádico. Essa resposta diferenciada dos cloroplastos foi atribuída à localização histológica dessas organelas, pois as diferenças estruturais e funcionais do parênquima paliçádico e lacunoso determinam respostas diferentes à chuva ácida (STOYANOVA e VELIKOVA, 1997/98). Dessa forma, as diferenças estruturais e funcionais presentes nas células e organelas do mesófilo e da bainha de *P. maximum*, como espessura da parede celular, superfície de contato, localização histológica, local de síntese de amido e local de fixação de CO₂ atmosférico, podem ter contribuído na resposta ao efeito do flúor.

Neste trabalho, o efeito do flúor sobre a densidade de grãos de amido nos cloroplastos foi discordante dos resultados de AZEVEDO (1995) em *Glycine max* (L.) e de ZWIAZEK e SHAY (1987) em cotilédones de *Pinus banksiana*, pois ambos detectaram o aumento de grãos de amido após a exposição ao flúor. Essa diferença pode estar relacionada com os aspectos fisiológicos dessas plantas, que são C₃, enquanto a espécie em foco neste estudo é uma planta C₄.

Distúrbios no metabolismo de carboidratos, em plantas tratadas com flúor, também foram reportados por ADAMS e EMERSON (1961), YANG e MILLER (1963) e GARREC et al. (1981). No entanto, não tem havido concordância geral em relação às causas dessas mudanças.

A alteração no metabolismo do amido não é um efeito específico em resposta ao flúor, pois outros poluentes também podem influenciar seu metabolismo. SHIFFGENS-GRUBER e LÜTZ (1992) verificaram aumento no conteúdo de amido em resposta ao O₃, NO₂ e na mistura dos gases O₃, NO₂ e SO₂, em folhas de cipreste, bem como redução em resposta ao SO₂. SUTINEN (1986) também observou diminuição similar após o tratamento com SO₂. SAASTAMOINEN e HOLOPAINEN (1989) observaram que as únicas

alterações nos cloroplastos de *Pinus sylvestris* fumigados com SO₂ foram tilacóides dilatados e a diminuição do tamanho dos grãos de amido. FORSCHNER et al. (1989) sugeriram que a acumulação de amido nas células do mesófilo das folhas de cipreste pode ser devida à poluição por O₃ ou à mistura de O₃ e SO₂ e que as deficiências minerais do solo também podem interferir nesse processo. HE et al. (1994), estudando cloroplastos de *Pisum sativum* submetido à radiação ultravioleta, citaram que a acumulação de amido pode estar associada à maior taxa de formação dos assimilados do que a taxa de exportação desses para fora das folhas. Então, o flúor pode estar atuando nessas taxas de quebra de amido e exportação de assimilados, promovendo a diminuição de amido nas células da bainha.

Na folha totalmente expandida, observou-se que, na região da necrose, o único conteúdo celular evidente nas células da bainha foram grãos de amido dispersos na célula, Figura 14 (a). A presença de grãos de amido pode ser devida à injúria drástica nesse local, impedindo a degradação e translocação dos grãos de amido. A diminuição de grãos de amido na clorose pode ter sido causada por uma possível degradação e translocação ou pela não-produção dessa substância antes da destruição das células.

Na região adjacente à necrose, Figura 14 (b a f), puderam ser notadas células da bainha com diminuição no tamanho dos cloroplastos, o que pode ter sido causado por diminuição da quantidade de grãos de amido, estroma mais denso, início de desarranjo da estrutura de grana e tilacóides e aumento do número de plastoglóbulos, Figura 14 (c). Nas células do mesófilo, puderam ser observados cloroplastos dilatados e repletos de plastoglóbulos, aumento do retículo periférico e certo grau de desarranjo em tilacóides e grana, Figura 14 (d a f). Em alguns casos, houve formação de alças na dupla membrana, causadas por uma possível distensão das membranas e, ou, retículo periférico, como observado na Figura 14 (d e e).

O retículo periférico é um complexo de vesículas e túbulos que ocorrem na periferia dos cloroplastos das plantas C₄. Sua estrutura é contínua com o envelope dos cloroplastos e, possivelmente, com o sistema de tilacóides. Por essa razão, tem sido sugerido que o retículo periférico pode estar envolvido no transporte rápido de metabólitos entre tilacóides e o envelope dos cloroplastos (LAETSCH, 1974; FISHER e EVERT, 1982). Dessa forma, o aumento do

retículo periférico pode estar relacionado a um possível aumento do metabolismo dessas organelas, em resposta ao estresse causado pelo flúor.

Nas amostras retiradas 1 cm abaixo da necrose, Figura 15, os cloroplastos da bainha, de modo geral, estavam reduzidos, com formato tendendo ao lenticular. Entretanto, em alguns casos puderam ser observados cloroplastos bem dilatados, Figura 15 (b), ou distensão da membrana dupla e do retículo periférico formando uma espécie de vesícula dentro dele, Figura 15 (c). Puderam-se observar também cloroplastos com leve protuberância de retículo periférico, Figura 15 (d). Em geral, foram visualizados aumento do número de plastoglóbulos, redução do número e tamanho dos grãos de amido e organização mais nítida de grana e tilacóides semelhantes aos dos cloroplastos do mesófilo. Em algumas células do mesófilo, houve cloroplastos com retículo periférico mais pronunciado, deformando seu formato original, e início de desarranjo de grana e tilacóides, Figura 15 (e). Houve também cloroplastos sem alteração evidente do retículo periférico, mas com o processo de degradação da estrutura de grana e tilacóides bem avançado, Figura 15 (f), mostrando grande quantidade de plastoglóbulos. Essas observações foram semelhantes àquelas obtidas na região da clorose das folhas em expansão, como mostra a comparação dos resultados feita no Quadro 1A. Tal fato pode ter sido causado pela dificuldade de padronizar uma região sem sintomas visíveis, abaixo do necrose, uma vez que as lâminas foliares totalmente expandidas apresentavam clorose em quase toda a sua extensão.

Cloroplastos esféricos também foram observados por WEI (1993) em soja submetida ao HF e por SOIKKELI e TUOVINEN (1979) e SOIKKELI (1981) em coníferas expostas ao SO₂.

Devido às dificuldades da técnica em ultramicrotomia, não foram obtidos cortes seqüenciais com o intuito de verificar seu aspecto tridimensional. Entretanto, observando cloroplastos de vários cortes e de vários campos microscópicos, notou-se tendência à alteração de sua forma, em alguns cloroplastos, nas células do mesófilo.

O aumento do número e tamanho de plastoglóbulos observado nas amostras com clorose (folhas em expansão), adjacentes à necrose e abaixo desta (folhas totalmente expandidas), é considerado sintoma comum de senescência em folhas (DODGE, 1969; BUTLER e SIMON, 1971; SENSER et

al., 1975; CUNNINGHAME et al., 1979; WULFF et al., 1988; NURMI, 1990; WULFF et al., 1996). Do ponto de vista ultra-estrutural, a senescência do cloroplasto (dilatação dos tilacóides, acumulação de plastoglóbulos e eventualmente amido) pode ser acelerada sob o efeito de poluentes.

BUSTAMANTE (1988) relatou que os efeitos do flúor sobre a fotossíntese de plantas de soja submetidas a fluoreto em solução estão associados à desestruturação dos cloroplastos. Pelo fato de essas organelas estarem diretamente envolvidas no processo fotossintético, as alterações na sua estrutura, encontradas neste trabalho, em resposta ao tratamento com flúor podem ter afetado a fotossíntese em *Panicum maximum*.

A amostragem e a coleta padronizadas podem ter restringido a ocorrência de outros sintomas, uma vez que as injúrias podem evoluir de maneiras diferentes em distintas regiões da lâmina foliar.

Figura 14 - Cortes transversais ultrafinos das folhas totalmente expandidas submetidas à ação da chuva simulada contendo flúor: **b a f** – Região adjacente à necrose; **d a f** - Cloroplastos das células do mesófilo; **a** – Célula da bainha, na região da necrose, contendo apenas grãos de amido (A) distinguíveis, barra=2 μm ; **b** - Cloroplastos das células da bainha (CB) reduzidos, com aumento do número de plastoglóbulo e diminuição do número de grãos de amido, células do mesófilo (CM) com cloroplastos mais dilatados e repletos de plastoglóbulos, barra=2 μm ; **c** – Cloroplasto da célula da bainha com plastoglóbulos (P) claros, grãos de amido (A) volumosos, início da desorganização da estrutura de grana (G) e tilacóides, barra=1 μm ; **d** – Formação de alças (AL) com a dupla membrana e o retículo periférico, barra 2 μm ; **e** - Formação de uma alça com a dupla membrana (\rightarrow), barra=1 μm ; e **f** – Aumento do retículo periférico (RP) e do número e tamanho dos plastoglóbulos (P) e início da perda da estrutura de grana (G) e tilacóides, barra=1 μm .

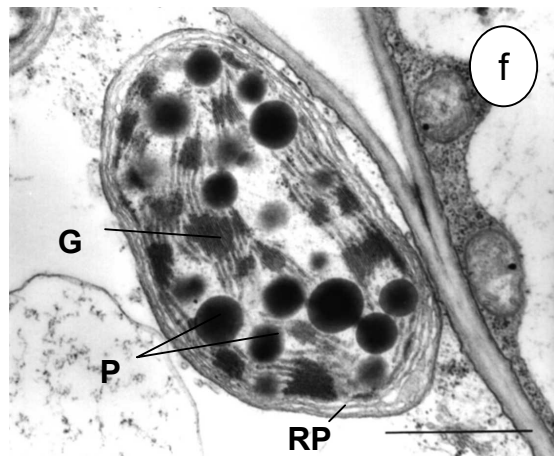
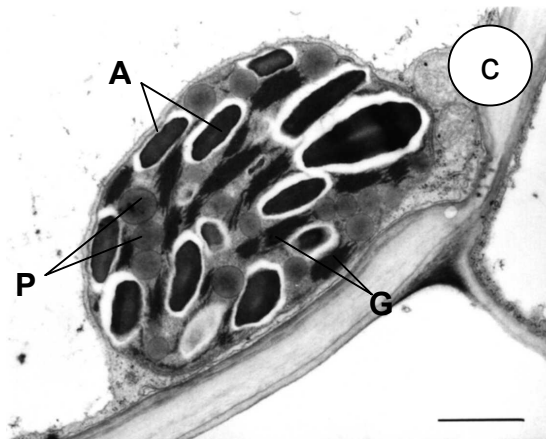
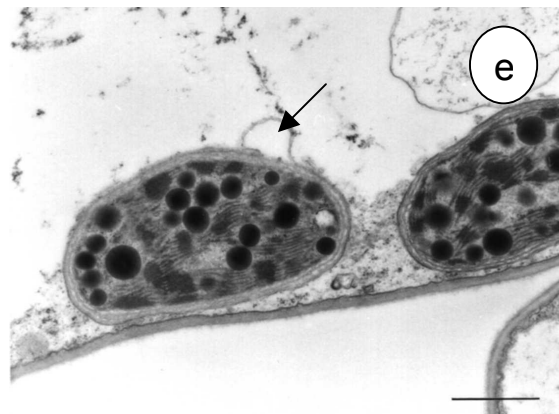
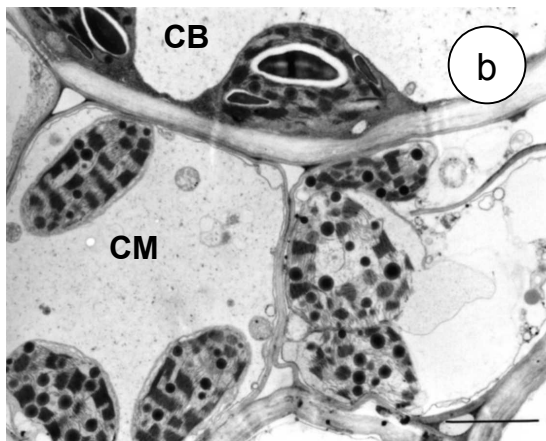
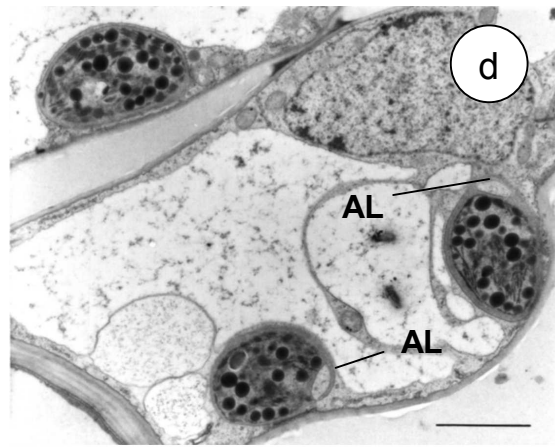
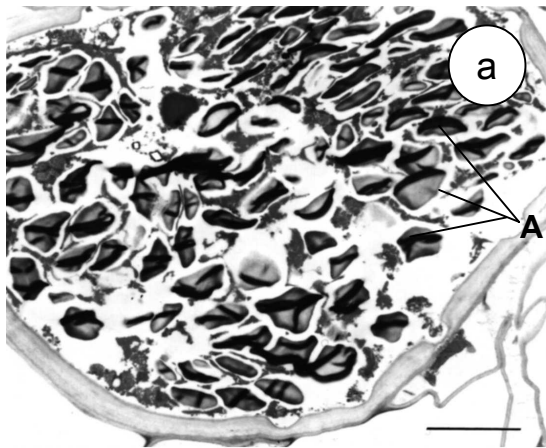
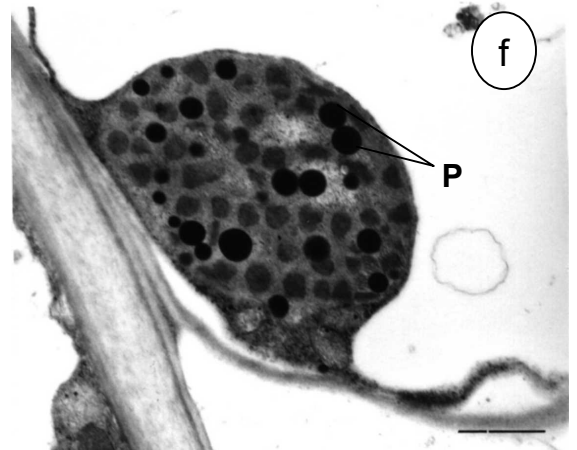
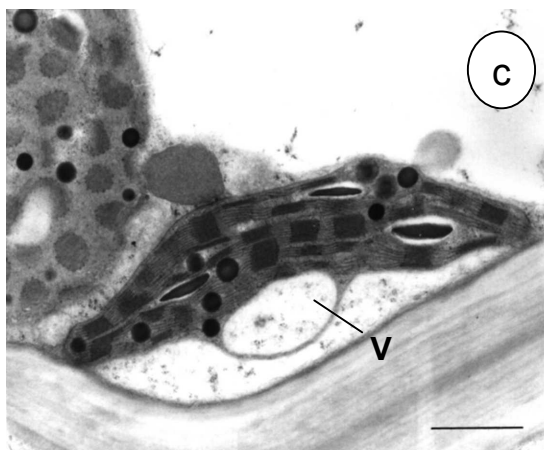
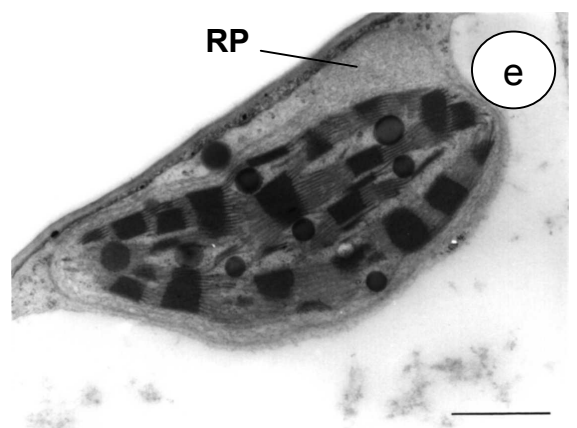
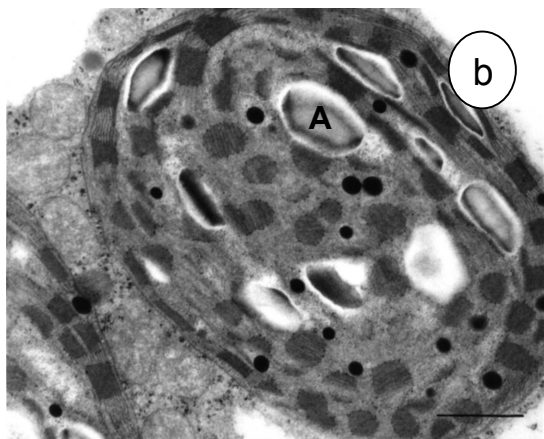
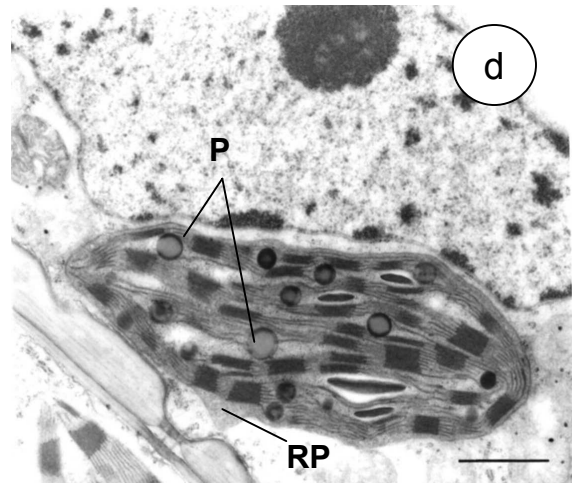
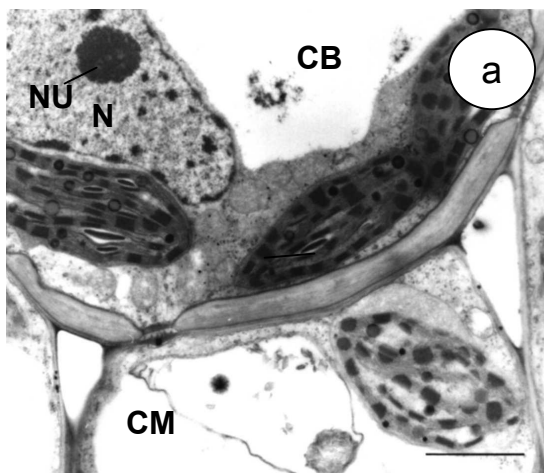


Figura 15 - Cloroplastos vistos na região 1 cm abaixo da necrose nas folhas totalmente expandidas de *Panicum maximum* submetidas ao flúor: **a** – Célula do mesófilo (CM) com núcleo (N) e nucléolo (NU) degradados, com resquício do nucléolo e carioteca e cloroplasto com aumento do retículo periférico. Na célula da bainha (CB), o núcleo (N) e o nucléolo (NU) estavam intactos e os cloroplastos, com estroma mais denso, barra=2 μm ; **b** – Cloroplasto da célula da bainha arredondado e bem volumoso, com muitos plastoglóbulos e redução de grãos de amido (A), barra=1 μm ; **c** – Cloroplasto da célula da bainha com distensão da membrana dupla e retículo periférico formando uma espécie de vesícula (V), barra=1 μm ; **d** – Célula da bainha com núcleo e nucléolo intactos e cloroplasto com o retículo periférico (RP) proeminente, redução dos grãos de amido e aumento dos plastoglóbulos (P), barra=1 μm ; **e** – Cloroplasto das células do mesófilo com retículo periférico (RP) pronunciado deformando seu formato, barra=1 μm ; e **f** – Cloroplasto do mesófilo sem o retículo periférico evidente, mas com grande quantidade de plastoglóbulos (P) e com o processo de degeneração da estrutura de grana e tilacóides bem avançado, barra=1 μm .



4. RESUMO E CONCLUSÕES

Plantas de *Panicum maximum* Jacq. foram submetidas à chuva simulada contendo flúor, durante cinco dias consecutivos, com o objetivo de estudar as alterações estruturais das superfícies epidérmicas e dos cloroplastos.

Para chuvas simuladas foram utilizadas soluções de flúor ($15 \mu\text{g.ml}^{-1}$), enquanto para o controle se utilizou água destilada. Após o tratamento, as amostras das lâminas foliares foram coletadas, fixadas e processadas para análise, em microscopia fotônica, microscopia eletrônica de varredura e transmissão.

Os sintomas visuais foram muito evidentes e iniciaram-se após a primeira chuva. Ao final do tratamento, as folhas em expansão apresentavam clorose e as totalmente expandidas, clorose e manchas necróticas. Nesse caso, as folhas totalmente expandidas se mostraram mais sensíveis à ação do flúor, pois elas apresentaram necrose logo no início do tratamento.

Na MEV, na superfície adaxial das folhas em expansão coletadas com clorose e folhas totalmente expandidas coletadas com necrose, não foram detectadas alterações que pudessem ser atribuídas à ação do flúor, pois não foi observado, em ambos os tipos foliares, alteração na cera epicuticular após o tratamento com flúor. Também, não foi detectado, nessa face, diferença perceptível da cera epicuticular entre folhas em expansão e folhas totalmente expandidas.

Já na superfície abaxial, o relevo das folhas em expansão estava mais rugoso do que nas folhas totalmente expandidas, no controle. Em ambos os estádios foliares, foi observado leve redução da cera epicuticular no tratamento com flúor. Além disso, as folhas totalmente expandidas apresentaram em alguns casos, na face abaxial, redução da cera epicuticular e depressão da superfície com a perda do contorno das células.

O enrugamento da epiderme tanto adaxial quanto abaxial, em ambos os tipos foliares, pode ter sido artefato causado durante o processamento do material ou, mesmo, resposta da planta ao ambiente experimental, pois foi constatado nos tratamentos-controle e com o flúor.

Não foi constatado local preferencial de ocorrência de lesões na MEV.

Ao analisar os cortes transversais semifinos e ultrafinos da porção com clorose (folhas em expansão) e porção 1 cm abaixo da necrose (folhas totalmente expandidas), pôde-se notar que ambos apresentaram sintomas de injúria muito semelhantes: células da bainha com cloroplastos de tamanho reduzido, com formato tendendo a lenticular; redução do número e tamanho dos grãos de amido; aumento no número de plastoglóbulos; estroma mais denso; e estrutura de grana e tilacóides mais evidente. Nas células do mesófilo, houve aumento do retículo periférico. O aumento no número e tamanho dos plastoglóbulos nos cloroplastos dessas células foi mais evidente na amostra retirada 1 cm abaixo da necrose. Tal semelhança nas alterações dos cloroplastos indicou que a porção retirada 1 cm abaixo da necrose se tratava de clorose mais avançada.

Na região da necrose (folha totalmente expandida), a injúria foi severa, com total desorganização do conteúdo celular, tanto do mesófilo quanto da bainha do feixe vascular. Adjacente à necrose, ocorreram os mesmos sintomas citados nas amostras da região da clorose e abaixo da necrose, sendo, no entanto, mais severos e apresentando, além destes, início de desorganização da estrutura de grana e tilacóides.

O conjunto de alterações observadas neste trabalho indicou que o flúor, como poluente, não tem uma ação específica sobre todas as espécies, mas que cada espécie pode responder diferentemente a ele. Isso pode ter sido devido a diferenças morfológicas, anatômicas e fisiológicas inerentes às gramíneas tropicais, principalmente na espécie estudada, uma planta C₄.

Outros parâmetros, como fisiológicos e ultra-estruturais em outros componentes celulares, deverão ser investigados para contribuir na caracterização da injúria por flúor em *Panicum maximum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D.F., EMERSON, M.T. Variation in starch and total polysaccharide content of *Pinus ponderosa* needles with fluoride fumigation. **Plant Physiol.**, v.36, p.262-265, 1961.
- ALVES, P.L.C.A. **Efeitos nutricionais, fisiológicos e bioquímicos da chuva ácida simulada e do latossolo vermelho-amarelo de Cubatão-SP, em soja (*Glycine max* L.) Merrill.** Viçosa, MG: UFV, 1988. 144p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 1988.
- ALVES, P.L.C.A., OLIVA CANO, M.A. Reações da soja a chuva ácida e solo contaminado. **Ambiente**, v.7, p.34-39, 1993.
- ALVES, P.L.C.A., OLIVA, M.A., CAMBRAIA, J., SANT'ANNA, R. Efeitos da chuva ácida simulada e de um solo de Cubatão (SP) sobre parâmetros relacionados com a fotossíntese e transpiração de plantas de soja. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v.2, p.7-14, 1990.
- ANTTONEN, S. Changes in lipids of *Pinus sylvestris* needles exposed to industrial air pollution. **Ann. Bot. Fenn.**, v.29, p.89-99, 1992.
- APPLEGATE, H.G., ADAMS, D.F. Effect of atmospheric fluoride on respiration of bush beans. **Bot. Gaz.**, v.121, p.223-227, 1960.
- ARNDT, U., FLORES, F., WEINSTEIN, L. **Efeitos do flúor sobre as plantas: diagnose de danos na vegetação do Brasil.** Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1995. 155p.

- AZEVEDO, A.A. **Ação do flúor, em chuva simulada, sobre a estrutura foliar de *Glycine max* (L.) Merril.** São Paulo, SP: USP, 1995. 95p. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade de São Paulo, 1995.
- BOZZOLA, S.S., RUSSEL, L.D. **Electron microscopy – principles and techniques for biologists.** Boston: Jones and Bartlett, 1992. 542p.
- BUNCE, H.W.F. Fluorides in air, grass, and cattle. **J. Dairy Sci.**, v.68, p.1706-1711, 1985.
- BUSTAMANTE, M. **Efeitos fisiológicos e bioquímicos do flúor em dois cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merril].** Viçosa, MG: UFV, 1988. 75p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, 1988.
- BUTLER, R.D., SIMON, E.W. Ultrastructural aspects of senescence in plants. **Adv. Gerontological Res.**, v.3, p.73-129, 1971.
- CAPE, J.N. Evaluation of pollutant critical levels from leaf surface characteristics. In: PERCY, K., CAPE, J.N., JAGELS, R., SIMPSON, C.J. (Eds.). **Air pollutants and leaf cuticle.** Berlin: Springer-Verlag, 1994. p.123-138. (Ecological Sciences, v.36).
- CHANG, C.W., THOMPSON, C.R. Site of fluoride accumulation in navel orange leaves. **Plant Physiol.**, v.41, p.211-213, 1966.
- CHAVES, A.L.F. **Ação do flúor dissolvido em chuva simulada sobre a estrutura foliar de *Panicum maximum* Jacq. (colonião) e *Chloris gayana* Kunth. (capim-rhodes) – Poaceae.** Viçosa, MG: UFV, 1997. 79p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. **Caracterização química das águas de chuva – impacto ambiental.** São Paulo: CETESB, 1984. 22p. (Relatório Anual).
- CUNNINGHAME, M.E., BOWES, B.G., HILLMANN, J.R. An ultrastructural study of foliar senescence in *Taxus baccata* L. **Ann. Bot.**, v.43, p.527-528, 1979.
- DARRAL, N.M. The effect of air pollutants on physiological processes in plants. **Plant Cell Environ.**, v.12, p.1-30, 1989.

- DETEMMERMAN, L.O., BAETEN, H. Effect of fluorides in ambient air on grass species growing in artificial grassland communities. **Fluoride**, v.20, p.126-136, 1987.
- DODGE, J.D. Changes in chloroplasts fine structure during the autumnal senescence of *Betula* leaves. **Ann. Bot.**, v.34, p.817-824, 1969.
- ELEFThERIOU, E.P., TSEKOS, I. Fluoride effects on leaf cell ultrastructure of olive trees growing in the vicinity of Aluminium Factory of Greece. **Trees**, v.5, p.83-98, 1991.
- EVANS, L.S., GMUR, N.F., COSTA, F. Leaf surface and histological perturbations of leaves of *Phaseolus vulgaris* and *Helianthus annuus* after exposure to simulated acid rain. **Amer. J. Bot.**, v.64, p.903 – 913, 1977.
- FIGUEIREDO, J.G. **Avaliação de gramíneas tropicais como bioindicadoras da presença de flúor**. Viçosa, MG: UFV, 1994. 87p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 1994.
- FINK, S. Histological and citological changes caused by air pollutants and other abiotic factors. In: SCHULTE-HOSTEDE, S., DARRAL, N., BLANK, L.W., WELBURN, A.R. (Eds.). **Air pollution and plant metabolism**. London: Elsevier Applied Science, 1988. p.36-54.
- FISHER, D.G., EVERT, R.F. Studies on the leaf of *Amaranthus retroflexus* (Amaranthaceae): chloroplast polymorphism. **Bot. Gaz.**, v. 143, p.146-155, 1982.
- FORSCHNER, W., SCHMITT, V., WILD, A. Investigations on the starch content and ultrastructure of spruce needles relative to the occurrence of novel forest decline. **Bot. Acta**, v.102, p.207-221, 1989.
- GARREC, J.P., PLEBIN, R., AUDIN, M. Effets du fluor sur les teneurs en sucres et en acides amines d'aiguilles de sapin *Abies alba* Mill. **Environ. Pollut. Ser. A**, v.26, p.281-295, 1981.
- GONZÁLEZ, R., SEGURA, A., GONZÁLEZ, M.L. Ultrastructure of chloroplasts of pine needles exposed to an industrial environment. **Biol. Plant.**, v.35, p.407-416, 1993.
- HATCH, M.D., KAGAWA, T., CRAIG, S. Subdivision of C₄-pathway species based on differing C₄ acid decarboxylating systems and ultrastructural features. **Aust. J. Plant Physiol.**, v.2, p.111-128, 1975.

- HE, J., HUANG, L.-K., WHITECROSS, M.I. Chloroplast ultrastructure changes in *Pisum sativum* associated with supplementary ultraviolet (UV-B) radiation. **Plant Cell Environ.**, v.17, p.771-775, 1994.
- HILL, A.C., PACK, M.R., TRANSTRUM, L.G., WINTERS, W.S. Effects of atmospheric fluorides and various types of injury on the respiration of leaf tissue. **Plant Physiol.**, v.34, p.11-16, 1958.
- HOLOPAINEN, T.H., ANTTONEN, S., WULFF, A., PALOMÄKI, V., KÄRENLAMPI, L. Comparative evaluation of effects of gaseous pollutants, acid deposition and mineral deficiencies: Structural changes in cells of forest plants. **Agric. Ecosyst. Environ.**, v.42, p.341-398, 1992.
- IVINSKIS, M., MURRAY, F. Associations between metabolic injury and fluoride susceptibility in two species of *Eucalyptus*. **Environ. Pollut. Ser. A.**, v.34, p.207-223, 1984.
- KUKKOLA, E., HUTTUNEN, S., BÄCK, J. Scots pine needle injuries at subarctic industrial sites. **Trees**, v.11, p.378-387, 1997.
- LAETSCH, W.M. The C₄ syndrome: a structural analysis. **Annu. Rev. Plant. Physiol.**, v.25, p.27-52, 1974.
- LEBEAU, S., STERCKEMAN, T., PAUL, R. Le fluor et la pollution fluorée (synthèse bibliographique). **Ann. De Gembloux**, v.98, p.207-226, 1992.
- LEDBETTER, M.C., MAVRODINEANU, R., WEISS, A.J. Distribution studies of radioactive fluorine-18 and stable fluorine-19 in tomato plants. **Contrib. Boyce Thompson Inst.**, v.20, p.331-348, 1960.
- METCALFE, C.R. **Anatomy of monocotyledons I. Gramineae.** Oxford: Clarendon, 1960. 731p.
- MILLER, G.W. The effect of fluoride on higher plants. **Fluoride**, v.26, p.3-22, 1993.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. **Effects of fluoride in animals.** Washington, D.C.: 1974. 70p.
- NURMI, A.H. Alteration of thylakoid membrane structure in *Brassica rapa* spp. *Oleifera* during ageing in high and low light. **Plant Cell Environ.**, v.13, p.305-317, 1990.

- PANDEY, G.P. Effects of gaseous hydrogen fluoride on leaves of *Terminalia tomentosa* and *Buchanania lanzan* trees. **Environ. Pollut. Ser. A.**, v.37, p.323-334, 1985.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J. Cell. Biol.**, v.17, p.208, 1963.
- RICK, R.K., ARNDT, U. Methodische Untersuchungen Zur Optimierung des Verfahrens der Standardisierten Graskultr In: VEREIN DEUTSCHER INGENIEURE – VDI. **Bioindikation.**, S.I, 1987. p.301-316. (VDI – Berichte, 609).
- SAASTAMOINEN, T., HOLOPAINEN, T. Needle and root responses of small Scots pine seedlings exposed to sulphur dioxide and simulated acid rain. **Scand. J. For. Res.**, v.4, p. 273-283, 1989.
- SCHIFFGENS-GRUBER, A., LÜTZ, C. Ultrastructure of mesophyll cell chloroplasts of spruce needles exposed to O₃, SO₂ and NO₂ alone and in combination. **Environ. Exp. Bot.**, v.32, p.243-254, 1992.
- SENER, M., SCHÖTZ, F., BECK, E. Seasonal changes in structure and function of spruce chloroplasts. **Planta**, v.126, p.1-10, 1975.
- SILVA, L.C. **Efeitos de chuva simulada, ácida e com fluoreto, sobre o desenvolvimento de plantas de espécies nativas arbóreas.** Viçosa, MG: UFV, 1998. 65p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- SOIKKELI, S. Comparison of cytological injuries in conifer needles from several polluted industrial environments in Finland. **Ann. Bot. Fenn.**, v.18, p.47-61, 1981.
- SOIKKELI, S., TUOVINEN, T. Damage in mesophyll ultrastructure of needles of Norway spruce in two industrial environments in central Finland. **Ann. Bot. Fenn.**, v.16, p.50-64, 1979.
- SPURR, A.R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **J. Ultrastruct. Res.**, v.26, p.31-43, 1969.
- STOYANOVA, D., VELIKOVA, V. Effects of simulated acid rain on chloroplast ultrastructure of primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. **Biol. Plant.**, v.40, p.589-595, 1997/98.

- SUTINEN, S. Ultrastructure of mesophyll cells in and near necrotic spots on otherwise green needles of Norway spruce. **Eur. J. For. Pathol.**, v.16, p.379-384, 1986.
- SUTINEN, M-L. The effect of air pollution on seasonal changes in the frost hardiness of the needles of *Pinus sylvestris* L. In: TIKKANEN, E., VARMOLA, M., KATERMAA, T. (Eds.). Symposium on the state of the environmental monitoring in northern Fennoscandia and the Kola Peninsula. Ravaniemi, Finland, 6-8 October, 1992. **Arct. Cent. Publ.**, v.4, p.326-329, 1992.
- SWANSON, E.S., THOMSON, W.W., MUDD, J.B. The effect of ozone on leaf cell membranes. **Can. J. Bot.**, v.51, p.1213-1219, 1973.
- THOMSON, W.W. Effects of air pollutants on plant ultrastructure. In: MUDD, J.B., KOZLOWSKI, T.T. (Eds.). **Responses of plants to air pollution**. New York: Academic, 1975. p. 179-194.
- TRESHOW, M. Fluorides as air pollutants affecting plants. **Ann. Rev. Phytopat.**, v.9, p.21-44, 1971.
- VAUGHN, K., DUKE, S.O. Function of polyphenol oxidase in higher plants. **Physiol. Plant.**, v.60, p.106-112, 1984.
- WAUGH, D.L., FITTIS, J.W. **Estudios de interpretacion de analisis de suelo: laboratorio Y macetas**. Washington D.C.: DIC, 1966. p.1-36. (Boletim tecnico, 3).
- WEI, L.L. Effect of hydrogen fluoride on ultrastructure of soybean leaf cells. **Diss. Abstr. Int.**, v.33, p.297-3B, 1973.
- WEI, L., MILLER, G.W. Effect of HF on the fine structure of mesophyll cells from *Glycine max* Merr. **Fluoride**, v.5, p.67-73, 1972.
- WEINSTEIN, L.H. Fluoride and plant life. **J. Occup. Med.**, v.19, p.49-78, 1977.
- WULFF, A., CROSSLEY, A., SHEPPARD, L.J. Fine structure of acid mist treated Sitka spruce needles: open-top chamber and field experiments. **Ann. Bot.**, v.77, p.1-10, 1996.
- WULFF, A., KÄRENLAMPI, L. Effects of long-term open-air exposure to fluoride, nitrogen compounds and SO₂ on visible symptoms, pollutant accumulation and ultrastructure of Scots pine and Norway spruce seedlings. **Trees**, v.10, p.157-171, 1996.

- WULFF, A., KÄRENLAMPI, L., ROPPONEN, L. Tree and needles age related ultrastructural changes in mesophyll cells of Norway spruce needles from background and industrial areas in Finland. **Inst. Phys. Conf. Ser.**, v.93, p.79-80, 1988.
- YANG, S.F., MILLER, G.W. Biochemical studies on the effect of fluoride on higher plants. 1. Metabolism of carbohydrates, organic acids, and amino acids. **Biochem. J.**, v.88, p.505-509, 1963.
- ZOBEL, A., NIGHSWANDER, J.E. Accumulation of phenolic compounds in the necrotic areas of Austrian and red pine needles after spraying with sulphuric acid: a possible bioindicator of air pollution. **New Phytol.**, v.117, p.565-574, 1991.
- ZWIAZEK, J.J., SHAY, J.M. Fluoride- and drought-induced structural alterations of mesophyll and guard cells in cotyledons of jack pine (*Pinus banksiana*). **Can. J. Bot.**, v.65, p. 2310-2317, 1987.

APÊNDICE

APÊNDICE

Quadro 1A – Quadro comparativo dos resultados

Sintomas		Folhas em expansão			Folhas totalmente expandidas		
		Clorose			Necrose		
Amostras		Clorose	Adjacente	Abaixo	Necrose	Adjacente	Abaixo
MV	AD	-enrugada	—	—	-enrugada	—	—
	AB	-enrugada -redução da CE	—	—	-enrugada -redução da CE	—	—
MF	CB	-cloroplasto reduzido	—	≅ controle	-sem arranjo centrípeto dos cloroplastos	-cloroplasto reduzido	-cloroplasto reduzido
	CM	-sem alteração perceptível	—	-sem alteração perceptível	-plasmólise com massa compacta no centro -epiderme com dobras	-sem alteração perceptível	-sem alteração perceptível
MT	CCB	-↓ tamanho -↓ grãos de amido -↑ n° PG -forma lenticular -estroma denso -grana e tilacóides evidentes	—	—	-grãos de amido dispersos	-↓ tamanho -↓ grãos de amido -↑ n° PG -estroma denso -início de desarranjo da estrutura de grana e tilacóides	-↓ tamanho -↓ grãos de amido -↑ n° PG -↑ RP -estroma denso -grana e tilacóides evidentes -forma tendendo a lenticular ou dilatados e distensão da MP e RP
	CCM	-↑ do RP e PG	—	—		-↑ do RP e PG -dilatação e alças na MP	-↑ do RP e PG -início de desarranjo da estrutura de grana e tilacóides ou dilatado e repleto de PG

MV = microscopia eletrônica de varredura.

AD = superfície adaxial.

AB = superfície abaxial.

CE = cera epicuticular.

MF = microscopia fotônica.
CB = células da bainha.
CM = células do mesófilo.
MT = microscopia eletrônica de transmissão.
CCB = cloroplastos das células da bainha.
CCM = cloroplastos das células do mesófilo.
PG = plastoglóbulos.
RP = retículo periférico.
MP = dupla membrana.