

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA  
CELULAR E DO DESENVOLVIMENTO**

**EFEITOS DA RADIAÇÃO  
ULTRAVIOLETA-B NA  
ORGANIZAÇÃO CELULAR E  
FISIOLÓGICA DA ESTRUTURA  
FOLIAR DE *ORYZA SATIVA* (L.)  
CULTIVAR EPAGRI 108**

**SÉRGIO LUIZ DE ALMEIDA**

Florianópolis  
2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOLOGIA CELULAR E DO DESENVOLVIMENTO**

**EFEITOS DA RADIAÇÃO  
ULTRAVIOLETA-B NA  
ORGANIZAÇÃO CELULAR E  
FISIOLÓGICA DA ESTRUTURA  
FOLIAR DE *ORYZA SATIVA* (L.)  
CULTIVAR EPAGRI 108**

**SÉRGIO LUIZ DE ALMEIDA**

Orientadora: Dra. Zenilda Laurita Bouzon  
Coorientadora: Dra. Ana Claudia Rodrigues

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do Título de Doutor em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Florianópolis

2013

## Ficha Catalográfica

---

Almeida, Sérgio Luiz de

Efeitos da Radiação Ultravioleta-B na Organização Celular e Fisiológica da Estrutura Foliar de *Oryza sativa* L. cv Epagri 108 / Sérgio Luiz de Almeida ; orientador, Zenilda Laurita Bouzon ; co-orientador, Ana Claudia Rodrigues. - Florianópolis, SC, 2013.

98 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. *Oryza sativa* L.. 3. Radiação Ultravioleta-B. 4. Ultraestrutura. 5. Morfologia Foliar. I. Bouzon, Zenilda Laurita . II. Rodrigues, Ana Claudia. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

Profa Dra Zenilda Laurita Bouzon (Orientadora)

Profa Dra Ana Claudia Rodrigues (Coorientadora)

Profa Dra Fanly Fungyi Chow Ho (USP)

Prof. Dr. Emilio de Castro Miguel (UFES)

Profa. Dra Marisa Santos (UFSC)

Profa Dra Áurea Maria Randi (UFSC)

Prof. Dr. Éder Carlos Schmidt (UFSC)

Profa Dra Luciane Cristina Ouriques (UFSC) - Suplente

Profa Dra Maura Cunha (UFNF) - Suplente

“Se temos de esperar, que seja para colher a semente boa que lançamos hoje no solo da vida. Se for para semear, então que seja para produzir milhões de sorrisos, de solidariedade e amizade.”

**CORA CORALINA**

**DEDICO** este trabalho ao **Marcos Moser** e **Daiane Cristine de Almeida**, que foram pessoas que não mediram esforços, paciência e solidariedade para que eu chegasse ao término deste estudo e a **CISSA** (minha gata) pelo companheirismo em todos os momentos que sentei para ler e escrever este trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a DEUS por conceder saúde, força e coragem para chegar até o final deste estudo.

A Minha mãe, **Nair Simão de Almeida** (*in memorium*) onde quer que esteja sempre estará próximo de mim.

A Minha família, pai, irmão e irmãs, que sempre acreditaram que eu podia ir muito além, sem me cobrar nada.

A Minha irmã Daiane, que mesmo de longe, mas na mesma casa, contribuiu muito nos momentos de ficar sozinho lendo e escrevendo este trabalho.

Ao Marcos (Minha Vida), pela paciência e entendimento, de esperar pela minha companhia, por todos estes anos de estudo e trabalho.

Ao Sr. Realdino Moser, que foi muito importante neste trabalho devido os primeiros ensinamentos e conhecimentos a cerca do plantio e desenvolvimento deste cultivar de arroz.

A Minha professora orientadora Dra Zenilda L. Bouzon, pelos conhecimentos repassados, dedicação e paciência no Laboratório de Microscopia Eletrônica.

A Minha professora coorientadora Dra Ana Claudia Rodrigues, pelos ensinamentos e acompanhamento durante os estudos de anatomia vegetal.

Ao Meu amigo professor Dr. Eder Carlos Schmidt que me ajudou em todos os momentos deste trabalho, sempre muito atencioso e receptivo.

Ao meu amigo professor Sérgio Stähelin pela ajuda na releitura deste trabalho.

A Todos os professores do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina, pelos conhecimentos transmitidos.

A Todos os amigos e colegas de laboratório que tive o prazer de trabalhar junto, LAVEG e LAMAR e a todos os outros que de alguma forma, direta ou indiretamente, fizeram parte deste trabalho.



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

- AMB – Ambiente Natural
- AT-O – Azul de Tolouidina
- CB – Células Buliformes;
- CBB – Azul Brilhante de Comassie
- CG – Células Guardas
- DE – Densidade Estomática
- DT – Densidade de Tricomas
- EAB – Epiderme Abaxial
- EAD – Epiderme Adaxial
- EFT – Espessura Foliar Total
- EME – Espessura do Mesofilo
- MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
- ML – Microscopia de Luz
- PAR – Radiação Fotossinteticamente Ativa
- PAS – Ácido Periódico de Schiff
- PE – Poro Estomático
- UV-B – Radiação Ultravioleta-B



4.2.2 Estudo Estrutural.....	25
4.2.2.1 Microscopia de Luz.....	25
4.2.2.2 Histoquímica.....	25
4.2.3 Estudo Ultraestrutural.....	25
4.2.3.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	25
4.2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	26
4.2.4 Estudos Fisiológicos.....	26
4.2.4.1 Análises dos Pigmentos.....	26
4.2.4.1.1 Clorofila <i>a</i> e <i>b</i> .....	27
4.2.4.1.2 Carotenoides.....	27
4.2.4.1.3 Polifenóis.....	28
4.2.4.2 Determinação de Proteínas.....	28
4.2.5 Análise Estatística.....	28
5 RESULTADOS.....	29
5.1. CAPITULO 1 - Effects of Natural Radiation, PAR and Artificial Ultraviolet Radiation-B on the Ultrastructure and Histochemistry of Leaf of <i>Oryza sativa</i> L.....	29
5.2. CAPÍTULO 2 - Effects of natural radiation, PAR and artificial ultraviolet radiation-B on photosynthetic pigments, morphology and ultrastructure of leaf of <i>Oryza sativa</i> L.....	33

6 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	37
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

## **ABSTRACT**

Ultraviolet radiation-B (UVBR) affects plants in many important ways, including reduced growth rate, reduction of primary productivity and changes in ultrastructure. The rice (*Oryza sativa*) is one of the most cultivated cereal in the world along with corn and wheat, representing over 50% of agricultural production. In this study, we examined *O. sativa* exposed to natural radiation denominated ambient samples (AMB), plants cultivated which photosynthetically active radiation, denominated PAR-only and plants cultivated with PAR + UVBR for 2 h per day during 30 days of cultivation. The samples were processed for light and electron microscopy, histochemistry analysis and in leaf morphology (leaf index, leaf area and specific leaf area, trichomes and papillae), plant biomass (dry and fresh weight) and protein level. PAR + UVBR caused changes in the ultrastructure of leaf of *O. sativa*, mesophyll cells, which included increased thickness of the cell wall and plastoglobuli, reduced intracellular spaces, changes in the cell contour, and destruction of chloroplast and mitochondria internal organization. The exposure to PAR + UVBR led to changes in guard and subsidiary cells, and the stomata and papillae presented irregular shape. The reduction of epicuticular wax that covered the leaf was

observed. Protein and photosynthetic pigments levels were also analyzed. As a photoprotective adaptation strategy against PAR+UVBR damage, an increase of 66.24% in phenolic compounds was observed. Furthermore, compared with ambient samples and PAR-only, chlorophyll a, b and total chlorophyll, in addition to carotenoid contents, were observed to decrease after PAR + UVBR treatment. Taken together, these findings strongly suggested that PAR + UVBR negatively affects the ultrastructure, morphology, photosynthetic pigments and growth rates of leaf of *O. sativa* and, in the long term, the productivity of this economically important plant.

**Keywords:** *Oryza sativa*; Ultraviolet Radiation-B; Histochemistry; Ultrastructure; Leaf Morphology; Phenolic Compounds.

## RESUMO

A radiação ultravioleta-B (UV-B) afeta muitos processos importantes nas fases de vida das plantas, incluindo a taxa de redução do crescimento, redução da produtividade primária e mudanças na ultraestrutura. O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos muitos cereais cultivados no mundo representando cerca de 50% da produção agrícola. Neste estudo, foi examinado o efeito da exposição de *O. sativa* em radiação natural denominada amostra ambiente (AMB), plantas cultivadas sob radiação fotossinteticamente ativa denominada PAR e plantas cultivadas sob PAR+UV-B por 2 horas diárias durante 30 dias de cultivo *in vitro*. As amostras foram processadas para microscopia de luz e eletrônica, análise histoquímica e morfologia foliar (índice foliar, área foliar, área foliar específica, tricomas e papilas), biomassa (massa seca e fresca) e teor de proteínas. Radiação PAR+UV-B causou mudanças na ultraestrutura da folha de *O. sativa*, células do mesofilo no qual incluem aumento da espessura da parede celular e quantidade de plastoglóbulos, redução dos espaços intracelulares, mudanças na forma celular e alterações na organização interna dos cloroplastos e mitocôndrias. A exposição em radiação PAR+UV-B causou mudanças nos estômatos quanto a forma irregular, células guarda e subsidiárias, também nas papilas. Redução de quantidade de ceras

epicuticulares também foi observada na folha. Como uma adaptação fotoprotetora a estratégia da planta contra PAR + danos UV-B, foi observado um aumento de 66,24% nos compostos fenólicos. Além disso, em comparação com as amostras do ambiente e PAR, clorofila *a*, *b* e clorofila total, além de carotenóides, observou-se diminuição após PAR + UV-B. Estas mudanças sugerem que a radiação PAR+UV-B afeta negativamente a ultraestrutura, morfologia, pigmentos fotossintéticos e taxas de crescimento de *O. sativa* e em longo prazo, a produtividade desta planta importante economicamente.

**Palavras-chave:** *Oryza sativa*; Radiação Ultravioleta-B; Histoquímica; Ultraestrutura; Morfologia foliar; Compostos Fenólicos.



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Camada de Ozônio

Para todos os organismos biológicos, a camada de ozônio estratosférico é uma proteção natural contra a radiação UV (ultravioleta) cujo comprimento de onda vai de 100 nm a 400 nm (Madronich, 1992). Há quase três décadas, tem sido observado que o ser humano é responsável pelas mudanças nessa proteção natural, liberando poluentes atmosféricos como: clorofluorcarbonetos (CFCs), halocarbonetos, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metil clorofórmio (MCF) (Kerr & McElroy, 1993). A partir de 1974, foi sugerido que os CFCs são levados à estratosfera e dissociados por fótons solares liberando íons cloro que destroem as moléculas de ozônio, constituindo assim os chamados buracos na camada de ozônio, presentes em algumas regiões do planeta (Stolarski & Cicerone, 1974; Molina & Rowland, 1975). Desta forma, devido à diminuição da camada de ozônio, os níveis de radiação UV-B que chegam à superfície da Terra, nos dois hemisférios, têm aumentado consideravelmente nos últimos anos (Mitchell *et al.*, 1992; Kerr, 1993). Algumas medições revelaram que uma maior destruição desta camada ocorre sobre a Antártida, chegando a 50%, e são

especialmente maiores em algumas épocas do ano, setembro e outubro (Farman et al., 1985; Stolarski *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1992; Hill, 1997). Com o aumento do buraco na camada de ozônio, a partir da década de 90, a quantidade de radiação UV na superfície da Terra alcançou níveis nunca vistos, atingindo não apenas o continente antártico, mas também o continente americano até a latitude de 38° Sul - Chile e Argentina (Bianciotto *et al.*, 2003). Entretanto, nos últimos anos, o Sul do Brasil tem sido também exposto a um gradual aumento nos níveis de radiação UV que chega à superfície terrestre, resultante da diminuição da camada de ozônio estratosférico nesta região (Santee *et al.*, 1995; Kirchhoff *et al.*, 1996, 2000; Rousseaux *et al.*, 1999).

## **1.2 Radiações Ultravioleta (UV)**

A radiação ultravioleta é um tipo de radiação eletromagnética invisível ao olho humano, com comprimentos de onda menores que a da luz visível e mais longo que os dos raios X. A radiação ultravioleta natural é produzida principalmente pelo Sol, mas nem todos os comprimentos de onda chegam à superfície terrestre. Parte deles, principalmente os mais nocivos aos seres vivos, é interceptada pela alta atmosfera, notadamente pela camada de ozônio. Os raios

ultravioletas, que são emitidos pelo Sol e por lâmpadas junto com o espectro visível, são classificados pelo seu comprimento de onda assim constituído: UV-A – 380 nm a 320 nm, UV-B – 320 nm a 290 nm e UV-C – 290 nm a 200 nm. Os raios UV-C (germicidas), os mais danosos aos seres vivos, são completamente absorvidos na estratosfera pela camada de ozônio. Os UV-B e UV-A, entretanto, atingem a superfície terrestre. A interação com o UV-B e UV-A tem também consequências benéficas e mesmo essenciais à sobrevivência dos seres vivos (Schaberle & Silva, 2000).

A radiação UV no meio ambiente, particularmente a radiação UV-B, é a chave de muitos efeitos deletérios em processos biológicos (Worrest, 1982; Diffey, 1991). Nas plantas terrestres, afeta a fotossíntese e como consequência a taxa de crescimento (Tevini & Teramura, 1989; Jansen *et al.*, 1998; Hao *et al.*, 2000), podendo reduzir a absorção de luz visível, sugerindo assim mudanças nas características foliares (Tosserams & Rozema, 1995). Além disso, a morfofisiologia das células pode também ser afetada, causando aumento na mortalidade das mesmas (Franklin & Forster, 1997).

A radiação UV-B pode reduzir o crescimento das plantas e a produtividade através da redução na produção de biomassa, rendimento de grãos e qualidade da produção; também pode alterar a

morfologia de plantas através de reduções na altura e área foliar, maior perfilhamento, e mudanças na geometria das mesmas (Barnes *et al.*, 1990). Em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Boeger & Poulson, 2006), *Oryza sativa* (L.) (Dai *et al.*, 1995), *Avena fatua* (L.) e *Selaria vulgaris* (L.) (Zuk-Golaszewska *et al.*, 2003), foram observadas mudanças na área foliar e diminuição da densidade de estômatos, após exposição à radiação UV-B. Estudos em folhas de *Solanum tuberosum* (L.) mostraram que a exposição à radiação UV-B levou a diminuição da área foliar e da massa seca (Santos *et al.*, 2004).

Efeitos da Radiação UV-C sobre a simetria e morfoanatomia foliar de *Rapanea ferruginea* (Ruiz et. Pav) Mez., mostraram que a diferenciação das folhas não seguiu um padrão morfométrico, caracterizando uma simetria flutuante, sobretudo no parênquima paliçádico e mesofilo e que algumas folhas apresentaram danos anatômicos, porém não morfológicos (Daloso *et al.*, 2009).

Uma revisão sobre estudos feitos com os efeitos da radiação UV-B sobre as culturas de campo demonstrou que tanto a morfologia vegetativa quanto a reprodutiva são alteradas por esta radiação e que somente 25 dos 129 estudos revisados, aproximaram os experimentos do ambiente natural e a anatomia foliar foi alterada devido a mudanças na espessura da epiderme, parênquima paliçádico

e camadas do mesofilo, assim como a quantidade dos pigmentos fotossintéticos que também foram alterados (Kakani *et al.*, 2003). Estudos dos efeitos elevados níveis de radiação UV-B sobre plantas nativas e cultivadas da África do Sul, mostraram que generalizações sobre sensibilidade vegetal a UV-B, baseados na forma de crescimento e tipo funcional, podem ser desconstruídas e que a grande maioria de espécies importantes economicamente desta região podem ser provavelmente insensíveis ao futuro aumento da UV-B (Musil *et al.*, 2002). Em folhas de *Solanum tuberosum* (L.), expostas à radiação UV-B, a estrutura dos peroxissomos nas células da epiderme e parênquima paliçádico foi notável e a quantidade de amido e cloroplastos nas células do parênquima paliçádico diminuiu (Santos *et al.*, 2004). O processo fotossintético é potencialmente afetado por inibição da atividade ribulose 1,5 difosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), proteína D1 do centro de reação do fotossistema II (Lesser & Shick 1994) e por alteração da estrutura dos tilacóides em algas (Schmidt *et al.*, 2012 a,b). Muitas mudanças ocorrem nos cloroplastos como: modificações da quantidade, tamanho, organização, bem como o quantidade de tilacóides (Talarico & Maranzana, 2000).

Exposições à radiação UV-B em folhas de *Solanum tuberosum* (L.), mostraram aumentos na concentração de flavonóides

e indução de dois novos tipos dos mesmos; diminuição dos níveis de clorofilas e proteínas (Santos *et al.*, 2004). Estudos com plantas de *Capsicum longum* (L.), pimenta vermelha, foram realizados para avaliar os efeitos da radiação UV-A e UV-C sobre os pigmentos fotossintéticos e compostos que absorvem estas radiações em casa de vegetação: clorofila a e b diminuíram ligeiramente, mas não significativamente, a clorofila total; concentrações de carotenóides também reduziram; concentração de flavonóides e antocianinas aumentaram (Sarghein *et al.*, 2008). Respostas do feijão (*Phaseolus vulgaris*) com suplementos de UV-B mostraram aumento das proteínas em relação ao controle (Singh *et al.*, 2011). Nos organismos aquáticos como fitoplâncton e as algas bentônicas também foram observadas diversas alterações morfológicas e fisiológicas (Lorenzen, 1979; Smith *et al.*, 1980; Jokiel & York, 1984; Bühlmann *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1992; Schmidt *et al.*, 2009, 2010 a,b,c). A sensibilidade aos efeitos da radiação UV pode estar associada a outros fatores ambientais como: dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), temperatura, luz e água ou aproveitamento de nutrientes (Caldwell & Flint, 1994; Teramura & Sullivan, 1994).

Todos os organismos sujeitos a radiação UV têm mecanismos para bloqueá-la que entra em suas células (Taylor, 1997). A radiação UV-A, que atinge a superfície da Terra em quantidade

comparativamente maior do que a UV-B contribuiria para processos de reparo dos danos causados pela radiação UV-B (Britt, 1995). Efeitos da elevada radiação UV-B sobre plantas nativas e cultivadas da África do Sul, mostraram que menos de 30% das espécies afetadas, respondem ao aumento real da UV-B e variam em resposta similar, do que entre outras espécies que crescem em outras áreas geográficas e que não há padrões de respostas para relatar a forma de crescimento com UV-B (Musil *et al.*, 2002).

### **1.3 Classificação e estudos com *Oryza sativa* (L.)**

O gênero *Oryza* (L.) pertencente à família Poaceae, detém sete espécies: *O. barthii* (A.Chev.), *O. glaberrima* (Steud), *O. latifolia* (Desv.), *O. longistaminata* (A.Chev. & Roehr.), *O. punctata* (Kotschy ex Steud), *O. rufipogon* (Griff) e *O. sativa* (L.). Todas essas espécies são popularmente conhecidas como arroz (Souza & Lorenzi, 2008).

As Liliopsidas ou monocotiledôneas variam muito quanto às características morfológicas externas, sendo de grande importância a diferenciação que ocorre nas plântulas, durante os estádios de desenvolvimento, nos quais pode ser evidenciada a derivação estrutural (Tillich, 1998). Segundo Oliveira (1999), o período

juvenil pode ser considerado o período mais crítico do ciclo de vida de muitas espécies, uma vez que um fracasso na aclimação neste estágio poderá, em longo prazo, levar a espécie à extinção. As mesmas são organismos peculiares para estudos de crescimento e diferenciação. Seus tecidos vasculares formam faixas discretas e seu desenvolvimento primário permanece discreto pelo tecido vascular secundário. Padrões de diferenciações vasculares são refletidos na distribuição subsequente dos feixes vasculares observados na planta madura (Tomlinson, 1970).

A família Poaceae (Gramineae) possui distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 700 gêneros e 10000 espécies, sendo que no Brasil ocorrem cerca de 170 gêneros, 1500 espécies, é a principal família de angiospermas, do ponto de vista econômico, não apenas pelo número de espécies utilizadas pelo homem, mas também pela importância de algumas delas (Souza & Lorenzi, 2008).

As folhas de Poaceae ou gramíneas, predominantemente exibem uma série de nervuras longitudinais desde a base até o ápice da lâmina foliar e são mais estudadas do que outros órgãos, porque é a primeira parte que se diferencia e também mostra maior especialização do que o pecíolo (quando há) e assim maior do que a bainha, ambos de amadurecimento tardio. Certamente, a parte basal da bainha e da lâmina foliar são regiões de alongamento da folha e



assim através de muitos estágios de desenvolvimentos passam a ser a parte mais distal da mesma (Metcalf, 1960). Segundo Rudall & Buzgo (2002), a folha é um órgão com crescimento determinado, diferente do ápice caulinar que tem crescimento indeterminado e pode continuar a crescer e produzir outros órgãos; embora haja muitas exceções, as folhas das monocotiledôneas adultas são tipicamente estreitas e lineares com nervação paralela, caule envolto por bainha, conforme a descrição da espécie de *Anthurium coriaceum* G.Don (Almeida, 2006).

*Oryza sativa* (L.) é uma espécie com hábito anual. Colmos eretos, ou geniculamente ascendente; bainha foliar pequena; glabras na superfície, com aurículas eretas. Lígula ciliada; inteira ou lacerada. Lâmina foliar de superfície rugosa; adaxialmente bruta; glabra, margens escabrosas, ápice agudo. Inflorescência é uma panícula. Espiguetas solitárias. Lema lanceolada; membranosa, sem nervura lateral. Palea elípticas, coriácea. Fruto: cariopse com pericarpo aderente. (<http://www.kew.org/data/grasses-db/www/imp06801.htm> > Acesso em 05/10/2011).

O arroz é um dos cereais mais cultivados no mundo juntamente com o milho e o trigo, representando mais de 50% da produção agrícola. Na América Latina, o Brasil é o maior produtor desse

cereal, sendo responsável por aproximadamente 88% da produção do MERCOSUL (Bonow *et al.*, 2007).

Vários trabalhos com *O. sativa* já foram realizados abrangendo aspectos como desenvolvimento e estrutura da semente (Juliano & Aldama, 1937; Santos, 1993); ultraestrutura da semente (Bechtel & Pomeranz, 1977, 1978 a, b; Jones & Rost, 1989;); acúmulo de substâncias de armazenamento durante o desenvolvimento da semente (Oparka & Gates, 1981 a, b, 1982; Hoshikawa, 1984); estrutura da semente em relação à produtividade (Ebenezer *et al.*, 1990, 2001); localização histoquímica dos principais componentes armazenados (Krishnan *et al.*, 2001); transporte de substâncias e principais nutrientes armazenados na semente (Krishnan & Dayanandan, 2003); mudanças na morfologia foliar quanto à redução na densidade dos estômatos e sua abertura (Daí *et al.*, 1995); arquitetura da planta como assunto agrônômico para sua produtividade (Wang & Li, 2005).

Outros trabalhos relatam os danos na folha, alterações ultraestruturais e acúmulo de compostos fenólicos após indução com irradiação UV-B em cultivares de arroz (Caasi-Lit *et al.*, 1997); estudo através da microscopia eletrônica de varredura de uma espécie de arroz selvagem da Costa Rica (Sanchez *et al.*, 2006); papel da sílica na palha de arroz, em vários tratamentos, para

contribuir com o valor do arroz do campo (Soest, 2006); função dos corpos silicosos no sistema epidérmico de arroz (Agarie *et al.*, 1996); variação dos corpos silicosos dentro das células longas da epiderme foliar de dezessete espécies de *Oryza* (Poaceae) (Whang *et al.*, 1998).

De acordo com estudos sobre o padrão de proteínas do tecido foliar induzido em arroz por três tipos de estresse (ácido jasmônico, radiação UV e metal pesado) houve mudanças qualitativas no padrão de 12 das 13 proteínas estudadas (Rakwal *et al.*, 1999); investigação de proteínas resposta-estresse de raízes de arroz indicam que elas rapidamente são induzidas através de ativação da via de sinalização do ácido jasmônico e não do ácido abscísico (Hashimoto *et al.*, 2004); a alteração de um único aminoácido leva a um déficit de atividade da enzima fotoliase CPD (Dimer Pyrimidine Cyclobutane) e esta atividade é um dos principais fatores na determinação da sensibilidade de UV-B em arroz (Teranishi *et al.*, 2004). O estresse salino causa em plantas de arroz espessamento nos vasos xilemáticos em raiz, induz a diferenciação celular da epiderme e dos feixes vasculares, em bainha e lâmina foliar, e gera alterações citomorfológicas causando desorganização das membranas dos tilacóides, redução no amido acumulado e acúmulo de lipídeos na forma de plastoglóbulos (Marcondes & Garcia, 2009).

*O. sativa* ocupa uma posição de destaque na produção agrícola nacional, especialmente em Santa Catarina. Todos estes estudos possibilitam um melhor entendimento dos componentes da cadeia produtiva de arroz, tendo a Epagri (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina) como membro participante e responsável pela pesquisa no Estado de Santa Catarina (<http://www.epagri.rct-sc.br>> Acesso em: 15/12/2008).

#### **1.4 – Santa Catarina e a produção de Arroz**

Em Santa Catarina, de acordo com a Epagri, o arroz irrigado é cultivado em aproximadamente 148.000 (cento e quarenta e oito mil) hectares distribuídos em cinco regiões distintas por suas condições geográficas e edafoclimáticas: Alto, Médio e Baixo Vale do Itajaí, Litoral Norte e região Sul de Santa Catarina. Segundo a Epagri, a orizicultura catarinense é conduzida em 100% da área no sistema conhecido como pré-germinado, no qual a semeadura é efetuada em lâmina d'água, com sementes pré-germinadas, sendo os principais cultivares atualmente em uso no Estado: Epagri 108, Epagri 109, SCS 112, SCSBRS Tio Taka (<http://www.epagri.rct-sc.br>> Acesso em: 15/12/2008).

Em Santa Catarina foi constatado que no decorrer dos últimos anos, a incidência da radiação ultravioleta aumentou consideravelmente (Kirchhoff *et al.*, 2000). A utilização de cultivares com elevada capacidade produtiva, semente de alta qualidade, manejo da fertilidade, manejo de plantas invasoras e pragas têm sido os principais responsáveis pela evolução da orizicultura catarinense, tanto no contínuo acréscimo em produtividade quanto na qualidade da semente (<http://www.epagri.rct-sc.br>> Acesso em: 15/12/2008).

## 2 JUSTIFICATIVA

Os altos níveis de radiação UV-B podem ser danosos aos organismos terrestres, especialmente aos vegetais. Estes, ao contrário das espécies animais, ficam expostas à radiação por períodos prolongados por estarem fixos e restritos ao seu local de crescimento. O risco da ocorrência de efeitos prejudiciais aumenta quando as plantas recebem níveis elevados de radiação UV-B nos meses de primavera-verão na Antártica e parte da América do Sul (Cabrera *et al.*, 1995).

O Estado de Santa Catarina encontra-se localizado na região fitogeográfica Temperada Quente, compreendida entre o norte do Estado do Rio de Janeiro e o sul da região de Rio Grande, no Rio Grande do Sul, estando compreendida em uma zona mais exposta a radiação UV, na qual foi constatado que no decorrer dos últimos anos, a incidência da radiação ultravioleta aumentou consideravelmente (Kirchhoff, 1996).

Os estudos com *Oryza sativa* referem-se principalmente a semente em detrimento aos órgãos vegetativos como a folha. Considerando-se que o Sul do Brasil é uma área com crescente exposição à radiação ultravioleta, estudos envolvendo possíveis

efeitos causados por esta radiação sobre as folhas se fazem necessário. Por ser *Oryza sativa* (L.) uma planta de grande interesse econômico, o nosso objetivo neste trabalho foi tentar compreender os possíveis efeitos da radiação UV-B na estrutura foliar do cultivar de arroz, Epagri 108, podendo os resultados serem utilizados futuramente para identificar estratégia a fim de minimizar os efeitos negativos da radiação UV-B sobre a produtividade deste cereal.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos da radiação UV-B na organização celular da lâmina foliar de *Oryza sativa* (L.) cultivar Epagri 108, sobre os aspectos estruturais, ultraestruturais e fisiológicos.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Submeter plântulas de arroz a três tratamentos: ambiente natural (AMB) e ambiente artificial: PAR e PAR+UV-B;
- Caracterizar estruturalmente a lâmina foliar quanto à área e índice foliar, massa fresca e massa seca, área específica foliar;
- Analisar a anatomia da lâmina foliar em microscopia de luz, quanto: altura da epiderme adaxial; densidade estomática; densidade de tricomas; comprimento e largura das células guardas; diâmetros do poro estomático; altura das células



buliformes; altura da epiderme abaxial; espessura do mesofilo e espessura foliar total;

- Analisar a organização ultraestrutural da lâmina foliar em microscopia eletrônica de varredura e transmissão;
- Determinar a quantidade de pigmentos (clorofila *a*, *b*, clorofila total e polifenóis) da lâmina foliar;
- Determinar o perfil carotenóideo da lâmina foliar;
- Determinar o nível de proteínas da lâmina foliar.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

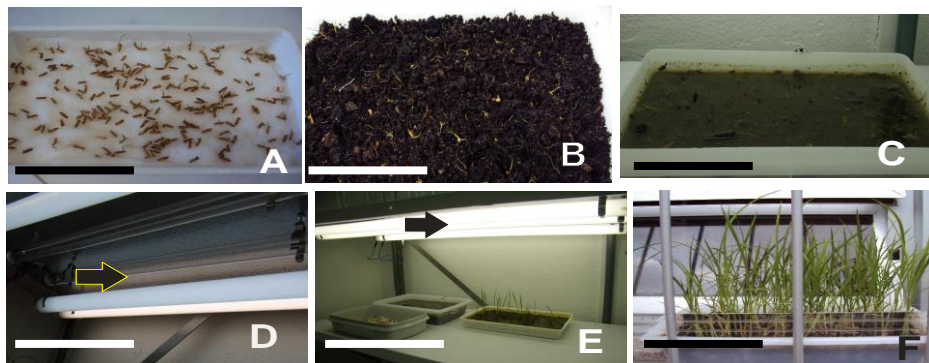
As plântulas de *Oryza sativa* (L.) foram obtidas a partir de sementes do cultivar Epagri 108, fornecidas pela Cooperativa Vitorino – TUBARÃO/SC e pela EPAGRI ITAJAI/SC.

Epagri 108 (SC-140) – É cultivar originária do Centro Internacional de Agricultura Tropical- CIAT (Colômbia). Pertencente ao grupo moderno, de porte baixo, com alta capacidade de afilamento, ciclo longo e notabiliza-se por apresentar boa resistência ao acamamento. Nos ensaios realizados na Estação Experimental de Itajaí, SC apresentou tolerância à toxidez direta (bronzamento) e indireta (alaranjamento), por ferro, e resistência a brusone (considerada doença mais importante para a cultura do arroz que é causada pelo fungo *Pyricularia oryzae*). As características de grãos são excelentes, tanto do ponto de vista de rendimento de engenho, como também de suas propriedades culinárias, o que possibilita seu processamento industrial para arroz branco ou parboilizado. É recomendada para o cultivo em todas as regiões produtoras de SC (<http://www.embrapa.br> > Acesso em 30/01/2009).

## 4.2 MÉTODOS

Os experimentos para PAR (Radiação Fotossinteticamente Ativa) e radiação PAR+UV-B (Radiação Fotossinteticamente Ativa mais Radiação Ultravioleta-B), foram realizados, em câmara de cultivo do Laboratório de Ficologia (LAFIC) do Departamento de Botânica/UFSC/CCB, regulada com fotoperíodo de 12h e temperatura de 23°C e o experimento para ambiente natural (AMB) foi realizado na área externa do Departamento de Botânica/UFSC/CCB. Para germinação, na câmara de cultivo, foram montadas duas bandejas de polipropileno, contendo 200 sementes cada, em algodão embebido em água (**Fig. 1A**). Após cinco dias, 100 plântulas expostas à iluminação PAR e 100 plântulas expostas à radiação PAR+UV-B, foram transplantadas, uma a uma, para outras bandejas de polipropileno contendo uma mistura de vermiculite com solo fertilizado e lâmina d'água de aproximadamente um centímetro (**Fig. 1B e C**). A prateleira contendo à iluminação PAR+UV-B, possuía duas lâmpadas UV-B fluorescentes da marca Phillips Ultraviolet B (TL 20w/12 RS, Holanda), com densidade de fluxo de fótons de  $0,60 \text{ w/ m}^{-2}$  ligada por duas horas diárias, medida com Radiômetro (Model IL 1400A, International Light, Newburyport, MA, USA) e quatro lâmpadas fluorescentes brancas (40w cada) com densidade de fluxo de fótons de  $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (**Fig. 1D**). As

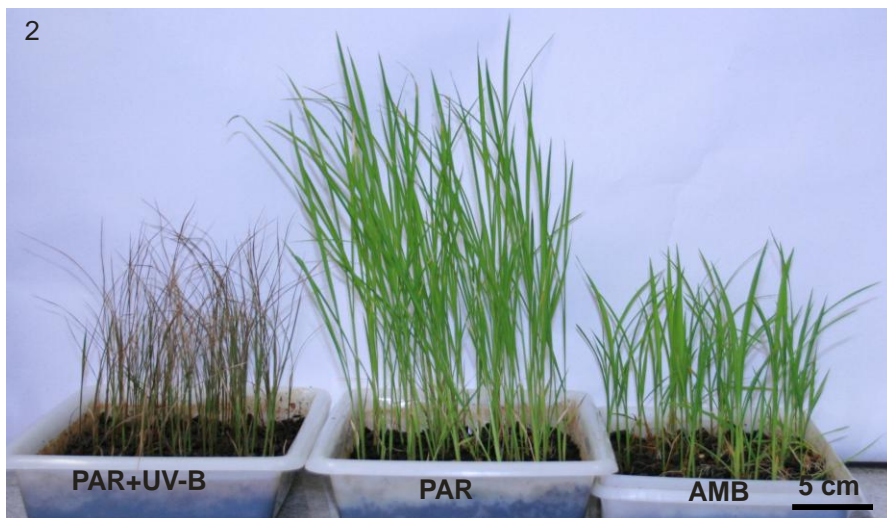
bandejas foram expostas a radiação PAR+UV-B das 12:00 as 14:00 durante trinta dias. Outra bandeja foi submetida à iluminação PAR, com quatro lâmpadas fluorescentes brancas de 40 w cada, com densidade de fluxo de fótons de  $75 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  medida com sensor quantum (Li-cor light meter 250, *United States of America*, USA) (**Fig. 1E**). Para o AMB, outra bandeja com 200 sementes em algodão embebido em água foi exposta à luz e temperatura natural na área externa do Departamento de Botânica, (**Fig. 1F**), sendo que, após cinco dias, 100 plântulas foram transplantadas, uma a uma, para outra bandeja de polipropileno contendo uma mistura de vermiculite com solo fertilizado e lâmina d'água de aproximadamente um centímetro.



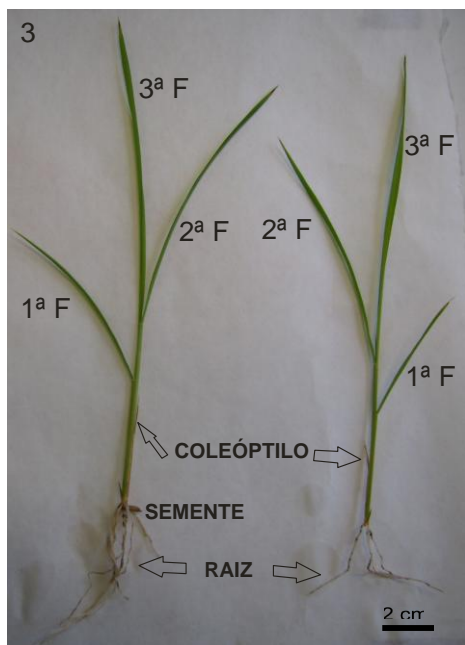
**Fig. 1** – *Oryza sativa* (L.) cv Epagri 108. A – Sementes germinando em algodão. B – Plântulas germinadas em terra adubada. C – Plântulas germinadas em terra adubada com lâmina de água. D – Prateleira com duas Lâmpadas UV-B (seta). E – Prateleira com quatro lâmpadas PAR (seta). F – Bandeja em área externa – AMB. Barra= 3 cm.

As bandejas com as 100 plântulas foram colocadas novamente nos locais como descrito acima. Após 30 dias na bandeja, as plantas jovens, de cada tratamento: AMB, PAR e PAR +UV-B (**Fig. 2**), já constavam com três a quatro folhas. Foi fixada a terceira folha, totalmente expandida dos indivíduos (**Fig. 3**), no sentido basípeto, para estudos de microscopia de luz e eletrônica (características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas).

Para cada análise realizada foram utilizadas 20 folhas por tratamento (n=20).



**Fig. 2** – Plantas jovens de *O. sativa* cv Epagri 108 com 30 dias de desenvolvimento.



**Fig. 3** – Plantas jovens de *O. sativa* cv Epagri 108. Legenda: 1ª F – primeira folha, 2ª F – segunda folha e 3ª F – terceira folha.

#### 4.2.1 ESTUDOS QUANTITATIVOS

Para determinação da área foliar de cada lâmina, foi realizado o contorno delineado em papel com massa constante (tamanho ofício padrão  $75\text{g/m}^2$ ). Os moldes foram recortados e medidos em balança digital. A massa destes moldes foi relacionada com a massa de área conhecida em  $\text{cm}^2$  do mesmo papel, para a determinação da área foliar em  $\text{cm}^2$ . O índice foliar (IF) foi calculado pela equação: IF =

C/L, onde C é o comprimento e L é a largura da lâmina (van Steenis, 1987). Para tanto, foram medidas as dimensões da lâmina foliar: comprimento (C = eixo longitudinal, desde a base até o ápice) e largura (L = eixo transversal, de bordo a bordo, na região média). Para a determinação da massa fresca, cada lâmina foliar foi medida a massa de cada lâmina foliar individualmente, em balança digital, cujas medidas foram anotadas em tabela. Em seguida as folhas foram colocadas em envelopes de papel jornal individualizados e numerados, e colocados para secar em estufa a 60°C, no Departamento de Botânica por 30 dias. Neste período, foram realizadas três medidas em balança digital em intervalos de 10 dias, sendo observada a massa até a medida constante. Para a determinação da área específica foliar foi feita a relação entre massa seca e área foliar usando os dados retirados dos procedimentos acima descritos.

Foram analisados os seguintes parâmetros para a análise das características anatômicas quantitativas: altura da epiderme adaxial (EAD); densidade estomática (DE); densidade de tricomas (DT); comprimento e largura das células guarda (CG); diâmetro do poro estomático (PE); altura das células buliformes (CB); altura da epiderme na face abaxial (EAB); espessura do mesofilo (EME) e espessura foliar total (EFT).

Para realização do estudo quantitativo da lâmina foliar: EAD; CB; EAB; EME e EFT foram utilizadas as lâminas permanentes de acordo com o item 4.2.2.1. As imagens foram projetadas para o papel com auxílio de câmara clara (câmara Leica DSC 290) acoplada ao microscópio de luz (Leica standart DM 750) e as medições foram realizadas com paquímetro digital (Caliper Digital).

#### **4.2.1.1 ESTUDO DOS ESTÔMATOS E TRICOMAS**

Para a realização do estudo quantitativo dos estômatos e tricomas foram utilizadas as lâminas semipermanentes feitas de acordo com o item 4.2.2.1.

##### **4.2.1.1.1 DENSIDADE ESTOMÁTICA**

A contagem do número de estômatos por área foi feita em microscópio de luz (Leica standart DM 750), utilizando secções paradérmicas para observações em vista frontal da superfície epidérmica, considerando-se apenas as zonas intercostais das amostras. Para determinar a densidade estomática média por mm<sup>2</sup> da folha, as imagens foram projetadas com auxílio de câmara clara (câmara Leica DSC 290) acoplada ao microscópio de luz (Leica



standart DM 750), sobre área delimitada conhecida. A quantidade de estômatos foi expressa em estômatos/mm<sup>2</sup>.

#### **4.2.1.1.2 DIMENSÕES DAS CÉLULAS-GUARDA E DO PORO ESTOMÁTICO**

As mesmas lâminas usadas para estudo de densidade estomática foram aproveitadas para a determinação das dimensões das células-guarda, em vista frontal da superfície epidérmica, sendo considerados o comprimento (eixo longitudinal, entre os dois polos da célula) e largura (eixo transversal, na porção média da célula). Para a determinação das dimensões do poro estomático, foi considerado o eixo longitudinal, quando em vista frontal da superfície epidérmica. As imagens foram projetadas com auxílio de câmara clara (câmara Leica DSC 290) acoplada ao microscópio de luz (Leica standart DM 750). Para as medições foi utilizado paquímetro digital (Caliper Digital).

#### **4.2.1.1.3 DENSIDADE DE TRICOMAS**

A contagem do número de tricomas por área foi feita em microscópio de luz (Leica standart DM 750), utilizando lâminas temporárias de secções paradérmicas para observações em vista

frontal da superfície epidérmica, em ambas as faces das amostras. Para determinar a densidade média de tricomas por mm<sup>2</sup> da lâmina foliar, as imagens foram projetadas com auxílio de câmara clara (câmara Leica DSC 290) acoplada ao microscópio de luz (Leica standart DM 750), sobre área delimitada conhecida. A quantidade de tricomas foi expressa em mm<sup>2</sup>.

## **4.2.2 ESTUDO ESTRUTURAL**

### **4.2.2.1 MICROSCOPIA DE LUZ**

Amostras *in vivo* da lâmina foliar, nos três tratamentos, foram seccionadas transversalmente, com auxílio de lâminas de barbear, usando suporte de isopor (Quintas, 1963), para confecção de lâminas semipermanentes com gelatina glicerinada (Kaiser 1880, *apud* Kraus & Arduin 1997). Outras amostras foram clarificadas em hipoclorito de sódio e coradas com Safranina para análise da superfície foliar.

As amostras de aproximadamente de 5 mm de comprimento foram fixadas em paraformaldeído a 2,5% em tampão de fosfato 0,1 M (pH 7.2) durante a noite. Subsequentemente, as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol em soluções aquosas. Após a desidratação, as amostras foram infiltradas em historesina (Leica

Historesin, Heidelberg, Alemanha). Foram feitas secções com 5µm de comprimento para confecções de lâminas permanentes utilizadas nas reações com diferentes técnicas de histoquímicas e analisadas com um microscópio de epifluorescência (Olympus BX 41) equipado com Captura de Imagem Q Pro 5.1 Software (Qimaging Corporation, Austin, TX, EUA).

#### **4.2.2.2 HISTOQUÍMICA**

Secções de microscopia de luz, foram coradas da seguinte forma: ácido periódico de Schiff (PAS) utilizado para identificar polissacáridos neutros (Gahan, 1984), Azul de Toluidina (TB-O) a 0,5%, pH 3,0 (Merck Darmstadt, Alemanha) utilizado para polissacarídeos ácidos através de uma reação metacromática (McCully, 1970; Gordon & McCandless, 1973), e Azul brilhante de Comassie (CBB) a 0,02% em solução de Clarke (Serva, Heidelberg, Alemanha) utilizado para proteínas (Gahan, 1984). Os controles não foram corados.

## **4.2.3 ESTUDO ULTRAESTRUTURAL**

### **4.2.3.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO**

Para observação ao microscópio eletrônico de transmissão (MET), amostras de aproximadamente 5 mm de comprimento foram fixadas com glutaraldeído a 2,5% e em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) adicionado 0,2 M de sacarose, por 12 horas (Schmidt *et al* 2012a). O material foi então pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% durante 4 horas, desidratado numa série gradual de acetona e embebido em resina Spurr (Spurr, 1969) diluída em acetona, durante 4 dias, nas seguintes proporções: 1:3 – over-night (Resina:acetona), 1:2 – 12 horas, 1:1 – 12 horas, 2:1 – over-night (Resina: acetona), 3:1 – 12 horas, 3:0 – 12 horas (Resina pura) e 3:0 – over-night (Resina Spurr`s pura). Secções finas foram contrastadas com acetato de uranila aquoso seguido por citrato de chumbo (Reynolds, 1963). Quatro réplicas foram feitas para cada grupo experimental; duas amostras por réplica foram então examinadas sob MET JEM 1011 (JEOL Ltd., Tóquio, Japão, a 80 kV). Similaridades baseadas na

comparação de tratamentos individuais com réplicas, sugere que as análises ultraestruturais sejam confiáveis.

### **4.2.3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**

Para o estudo da superfície foliar, as amostras fixadas, seguiram os mesmos procedimentos utilizados para o MET. As amostras foram desidratadas com série etílica gradual e secadas com ponto crítico de CO<sub>2</sub> EM-CPD-030 (Leica, Heidelberg, Alemanha). As amostras secas foram aderidas sobre suportes de alumínio, com auxílio de fita de carbono dupla face, e cobertas com 20 nm de ouro, em metalizador marca Baltec, modelo CED 030. As amostras foram observadas e documentadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), marca Jeol, modelo JSM-6390LV (JEOL Ltd., Tóquio, Japão, em 10 kV), do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica – UFSC.

## **4.2.4 ESTUDOS FISIOLÓGICOS**

### **4.2.4.1 ANÁLISES DOS PIGMENTOS**

O teor de pigmentos fotossintéticos (clorofila a e b) de *O. sativa* foi analisado para os tratamentos e o controle. Imediatamente

após os 30 dias de exposição, as amostras (peso fresco) foram congeladas por imersão em nitrogênio líquido e mantidos a -80 ° C para uso posterior. Todos os pigmentos foram extraídos em quadruplicatas.

#### **4.2.4.1.1 CLOROFILA a E b**

Clorofila a, b e total foram extraídos a partir de cerca de 1 g de lâmina foliar em 3 ml de Dimetilsulfoxido (DMSO, Merck, Darmstadt, FRG) a 40 ° C, durante 30 min, usando um vidro homogeneizador de tecidos (Hiscox e Israelstam, 1979; Schmidt *et al.*, 2010c). Os pigmentos foram quantificados por espectrofotometria, de acordo com Wellburn (1994).

#### **4.2.4.1.2 CAROTENÓIDES**

Os carotenóides foram extraídos de amostras (1,0 g de massa fresca, n = 4), utilizando hexano: acetona (1:1, v / v) contendo 100 mg L-1 terc-butil-hidroxitolueno (BHT). As soluções foram filtradas através de uma membrana de celulose para remover as partículas e o extrato organo-solvente foi evaporado sob fluxo de N<sub>2</sub>. O resíduo foi dissolvido em hexano (3 mL). Antes da análise cromatográfica, 10% de KOH em metanol (100 mL / mL) foi adicionado a 1 ml do

extracto organo-solvente, a fim de se obter a saponificação completa dos carotenóides, o que permitiu uma melhor identificação dos compostos por meio de HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Esta solução foi incubada (3 h, no escuro, à temperatura ambiente), seguida de lavagem com água destilada-desionizada e água destilada (três vezes). O extrato de-esterificado foi recolhido, concentrado sob um fluxo de N<sub>2</sub> e ressolubilizado em hexano: acetona: BHT (100 µL) para análises cromatográficas adicionais, como previamente descrito (Kuhnen *et al.* 2009.). A amostra concentrada (10 µL, n = 3) foi injetada no cromatógrafo líquido (Shimadzu LC-10A), equipado com uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (Vydac 218TP54, 250 mm x 4,6 mm Ø, 5 µm, 30 ° C) , protegida por uma pré-coluna de 5µm de fase reversa C<sub>18</sub> (Vydac 218GK54) e um detector UV-visível (450 nm). A decantação foi realizada com MeOH: CH<sub>3</sub>CN (90:10,v/v) a uma taxa de fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. A identificação de carotenóides (β-caroteno e luteína) foi realizada utilizando os tempos de retenção e co-cromatografia de compostos padrão (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), bem como, por analogia com outros relatórios de análise de carotenóides por RP-HPLC-UV-visível em condições semelhantes (Scott e Eldridge 2005;. Hulshof et al 2007). A quantificação de carotenóides foi baseada em curvas padrão, utilizando a curva padrão de luteína

(0,5-45  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $y=7044x$ ;  $r^2 = 0,999$ ) para a quantificação de luteína e xantofila a curva padrão  $\beta$ -caroteno (0,01-12  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $y = 1019x$ ;  $r^2 = 0,998$ ). Os resultados foram calculados como médias de triplicados e expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DS).

#### **4.2.4.1.3 POLIFENÓIS**

Os polifenóis foram extraídos de amostras (1,0 g massa fresca,  $n = 4$ ) usando 80% de metanol acidificado com 1% HCl. A quantificação de polifenóis foi baseada nas curvas padrão empregando a curva de galocatequina (2,5–200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $y = 795.09x$ ;  $r^2 = 0.999$ ).

#### **4.2.4.2 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS**

A quantidade de proteína (1,0 g de massa fresca (mg / g (FW),  $n = 4$ ) nas amostras foi determinada de acordo com Lowry *et al.* (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

#### **4.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram submetidos à Análise da Variância Unifatorial (ANOVA), e de Teste Tukey a posteriori. Análises



estatísticas unifatorial foram realizadas utilizando o pacote de software Statistica (versão 6.0), considerando  $p \leq 0,05$ .

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 CAPÍTULO 1**

Effects of Natural Radiation, PAR and Artificial Ultraviolet Radiation-B on the Ultrastructure and Histochemistry of Leaf of *Oryza sativa* L.

Efeitos da radiação natural PAR e artificial Ultravioleta-B sobre a ultraestrutura e histoquímica da folha de *Oryza sativa* L.

---

**Artigo publicado na Revista *American Journal of Plant Sciences***

**(3) 1361-1368. 2012. DOI: 10.4236/ajps.2012.310164**

Effects of Natural Radiation, PAR and Artificial Ultraviolet Radiation-B on the Ultrastructure and Histochemistry of Leaf of *Oryza sativa* L.

**Sérgio L. de Almeida<sup>1</sup>, Éder C. Schmidt<sup>1</sup>, Ana C. Rodrigues<sup>2</sup>,  
Zenilda L. Bouzon<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Post-Graduate Program in Cell Biology and Development, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil;

<sup>2</sup>Department of Botany, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil;

<sup>3</sup>Central Laboratory of Electron Microscopy, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

## **ABSTRACT**

Ultraviolet radiation-B (UVBR) affects plants in many important ways, including reduced growth rate, reduction of primary productivity and changes in ultrastructure. The rice (*Oryza sativa*) is one of the most cultivated cereal in the world along with corn and wheat, representing over 50% of agricultural production. In this study, we examined *O. sativa* exposed to natural radiation denominated which “ambient samples”, plants cultivated which photosynthetically active radiation (PAR), denominated with PAR-only and plants cultivated with PAR + UVBR for 2 h per day during 30 days of cultivation *in vitro*. The samples were processed for electron microscopy and histochemistry analysis. PAR + UVBR caused changes in the ultrastructure of leaf of *O. sativa*, mesophyll cells, which included increased thickness of the cell wall and plastoglobuli, reduced intracellular spaces, changes in the cell contour, and destruction of chloroplast and mitochondria internal organization. The exposure to PAR + UVBR led to changes in guard and subsidiary cells, and the stomata and papillae were with irregular shape. The reduction of epicuticular wax that covered the leaf, was observed. Taken together, these findings strongly suggested that PAR + UVBR negatively affects the ultrastructure and morphology

and growth rates, of leaf of *O. sativa* and, in the long term, their economic viability.

**Keywords:** *Oryza sativa*; Ultraviolet Radiation-B; Histochemistry; Ultrastructure.

## RESUMO

A radiação ultravioleta-B (RUVB) afeta muitos caminhos importantes das plantas, incluindo a taxa de redução do crescimento, redução da produtividade primária e mudanças na ultraestrutura. O arroz (*Oryza sativa*) é um dos muitos cereais cultivados no mundo representando cerca de 50% da produção agrícola. Neste estudo, foi examinada a exposição de *O. sativa* em radiação natural denominada “amostra ambiente”, plantas cultivadas com radiação ativa fotossinteticamente (PAR) denominada com somente-PAR e plantas cultivadas com PAR+UV-B por 2 horas diárias durante 30 dias de cultivo *in vitro*. As amostras foram processadas para microscopia eletrônica e análise histoquímica. Radiação PAR+UV-B causou mudanças na ultraestrutura da folha de *O. sativa*, células do mesofilo no qual incluem aumento da espessura da parede celular e plastoglóbulos, redução dos espaços intracelulares, mudanças na forma celular e destruição dos cloroplastos e mitocôndrias na organização interna. A exposição em radiação PAR+UV-B mostrou mudanças nas células guardas e subsidiárias e forma irregular dos estômatos e papilas. Redução da cera epicuticular também foi observada na folha. Estas mudanças sugerem que a radiação PAR+UV-B afeta negativamente a ultraestrutura, morfologia e taxa

de crescimento da folha de *O.sativa* e assim sua viabilidade econômica.

Palavras-chave: *Oryza sativa*; Radiação Ultravioleta-B; Histoquímica; Ultraestrutura.

## 5.2 CAPÍTULO 2

Effects of natural radiation, PAR and artificial ultraviolet radiation-B on photosynthetic pigments, morphology and ultrastructure of leaf of *Oryza sativa* L.

Efeitos da radiação natural PAR e artificial Ultravioleta-B sobre os pigmentos fotossintéticos, morfologia e ultraestrutura da folha de *Oryza sativa* L.

---



**Artigo submetido à Revista *Protoplasma* em 28 de Janeiro de 2013**

Effects of natural radiation, PAR and artificial ultraviolet radiation-B on photosynthetic pigments, morphology and ultrastructure of leaf of *Oryza sativa* L.

Sérgio L. de Almeida<sup>a</sup>, Éder C. Schmidt<sup>a</sup>, Roberta de Paula Martins<sup>b</sup> Fernanda Ramlov<sup>c</sup>, Tiago José G. Carvalho<sup>c</sup>, Marcelo Maraschin<sup>c</sup>, Ana C. Rodrigues<sup>d</sup>, Zenilda L. Bouzon<sup>e</sup>.

<sup>a</sup>Post-Graduate Program in Cell Biology and Development, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil

<sup>c</sup>Plant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil

<sup>d</sup>Department of Botany, Federal University of Santa Catarina 88010-970, CP 476, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>e</sup>Central Laboratory of Electron Microscopy, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brazil

## **ABSTRACT**

Ultraviolet radiation-B (UVBR) affects plants in many important ways, including reduced growth rate, reduction of primary productivity and changes in ultrastructure. Rice (*Oryza sativa*) is one of the most cultivated cereals in the world, along with corn and wheat, representing over 50% of agricultural production. In this study, we examined *O. sativa* plants exposed to natural radiation using “ambient samples” and plants cultivated with photosynthetically active radiation (PAR), including PAR-only and PAR + UVBR, for 2 h 8 per day during 30 days of cultivation *in vitro*. The samples were processed for electron microscopy and histochemistry. Protein levels and the content of photosynthetic pigments were also analyzed. PAR+UVBR caused changes in the ultrastructure of leaf of *O. sativa* and in leaf morphology (leaf index, leaf area and specific leaf area, trichomes and papillae), 12 plant biomass (dry and fresh weight) and protein content. As a photoprotective adaptation strategy against PAR+UVBR damage, an increase of 66.24% in phenolic compounds was observed. Furthermore, compared with ambient samples and PAR-only, chlorophyll *a*, *b* and total chlorophyll, in addition to carotenoid contents, were observed to decrease after PAR + UVBR treatment. Taken together, these findings strongly suggested that PAR + UVBR

negatively affects the ultrastructure, morphology, photosynthetic pigments and growth rates of leaf of *O. sativa* and, in the long term, the viability of this economically important plant.

Keywords: *Oryza sativa*, ultraviolet radiation-B, leaf morphology, phenolic compounds

## RESUMO

Radiação ultravioleta-B (UV-B) afeta plantas em muitos aspectos importantes, incluindo redução da Taxa de crescimento, redução da produtividade primária e as alterações na ultra-estrutura. Arroz (*Oryza sativa*) é um dos cereais mais cultivada em todo o mundo, como milho e trigo, representando mais de 50% da produção agrícola. No presente estudo, nós examinamos plantas *O. Sativa* expostas à radiação natural "usando amostras ambientais" e plantas cultivadas com radiação fotossinteticamente ativa (PAR), incluindo somente PAR e PAR + UV-B, por 2 h diárias, durante 30 dias de cultivo em casa de vevegetação. As amostras foram processadas para microscopia eletrônica e histoquímica. Os níveis de proteína e o conteúdo de pigmentos fotossintéticos também foram analisados. Mudanças PAR + UV-B causados na ultraestrutura de folhas de *O. Sativa* e na morfologia foliar (índice foliar, área foliar, área foliar específica, tricomas e papilas), biomassa (massa seca e fresca) e teor de proteínas. Como uma adaptação fotoprotetora ha estratégia da planta contra PAR + danos UV-B, foi um aumento de 66,24% nos compostos fenólicos. Além disso, em comparação com as amostras do ambiente e PAR, clorofila a, b e clorofila total, além de carotenóides, observamos diminuição após PAR + UV-B. Estes

resultados sugerem que PAR + UV-B afetam negativamente a ultraestrutura, morfologia, pigmentos fotossintéticos e taxas de crescimento de *O. sativa* e a longo prazo, a viabilidade desta planta importante economicamente.

**Palavras-chave:** *Oryza sativa*, radiação ultravioleta-B, morfologia foliar, compostos fenólicos.

## 6 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os efeitos isolados da radiação UV-B, sobre a organização celular da lâmina foliar de *Oryza sativa* (L.) cultivar Epagri 108, revelaram alterações significativas no ponto de vista fisiológico, estrutural e ultraestrutural após serem cultivadas por 30 dias com exposição de duas horas diárias. Estas alterações diferiram em relação aos indivíduos submetidos somente à radiação fotossinteticamente ativa (PAR) e aos expostos a radiação ambiente natural (AMB).

Modificações e/ou danos fisiológicos, como a diminuição dos pigmentos fotossintéticos, determinaram menor crescimento. A exposição à radiação UV-B levou a uma redução na biomassa das plantas, alteração nas células guarda e área foliar de *O. Sativa*. Resultados semelhantes foram observados em *Brassica napus* (Alenius *et al.*, 1995), *Pisum sativum* (Gonzales *et al.*, 1998; Nogués *et al.*, 1998), *Lycopersicon esculentum* (Hao *et al.*, 2000) e *Arabidopsis thaliana* (Boeger & Poulson, 2006). Alterações na morfologia da folha e redução da biomassa de *O. sativa* podem estar relacionadas com o atraso no processo de divisão celular, o que resulta da formação de dímeros de pirimidina e possivelmente

causou uma redução do crescimento e expansão de células de *O. sativa* quando expostas à radiação PAR+UV-B.

Com radiação UV-B crescente, a falha dos mecanismos de proteção pode causar alterações e desequilíbrios celulares (Bowler *et al.*, 1992). Estes desequilíbrios levam a alterações conformacionais nas moléculas de DNA e, conseqüentemente, na replicação, transcrição e tradução. De acordo com Boeger & Poulson (2006), essas mudanças na morfologia das folhas submetidas à radiação PAR+UV-B são respostas ao estresse causado no processo de desenvolvimento e metabolismo celular.

As plantas expostas à radiação UV-B apresentaram menores valores morfoanatômicos, indicando menor crescimento e alterações na morfologia foliar (índice foliar, área foliar, área foliar específica, tricomas e papilas), biomassa vegetal (peso seco e fresco), especialmente quando comparado com o crescimento das plantas sob radiação PAR. No entanto, quando comparadas com as plantas cultivadas sob condições ambientais naturais, a diferença no padrão de crescimento foi menor. Isto ocorreu provavelmente porque as plantas que cresceram em condições ambientais foram expostas também a diferentes quantidades de radiação, incluindo UV-B.

Mudanças na quantidade de carotenoides e compostos fenólicos das plantas tratadas com radiação UV-B sugerem a



expressão de mecanismos de defesa associados a compostos antioxidantes. Quando as plantas tratadas com radiação PAR+UV-B foram analisadas em Microscopia de Luz (ML), mostraram a presença de compostos fenólicos em três métodos histoquímicos diferentes possivelmente, como uma estratégia contra os efeitos do ROS, plantas de *O. sativa* expostas a radiação PAR+UV-B aumentaram o teor de compostos fenólicos, provavelmente como um mecanismo fotoprotetor contra danos a radiação UV-B. De acordo com Ruhland *et al.* (2007) e Schmidt *et al.* (2012 b), as concentrações crescentes de compostos fenólicos em resposta à radiação elevada têm duas funções diferentes: a primeira é para agir como um filtro solar contra radiação UV-B potencialmente prejudicial e a segunda, para minimizar os danos causados pelo aumento da ROS mitocondrial. Os compostos fenólicos podem atuar como um mecanismo de fotoproteção, devido à alta irradiância nos ecossistemas, por absorver fons incidentes e/ou indiretamente como resultado de sua atividade antioxidante (Abdala-Diaz *et al.* 2006).

Modificações e/ou danos ultraestruturais, como: diminuição do tamanho do estômato e célula silicosa; alterações na organização interna do cloroplasto e da mitocôndria; alterações nas células guarda e célula subsidiária do estômato e parede celular com camada

de cera espessa, também foram maiores nas plantas tratadas com radiação UV-B.

Após a exposição à radiação UV-B, as lâminas foliares de *O. Sativa*, mostraram células com parede celular primária espessada. Este aumento da espessura da parede da célula pode ser interpretado como um mecanismo de defesa contra a exposição à radiação ultravioleta. De acordo com Hóllosy (2002), um aumento na espessura da parede celular é especificamente interpretado como um mecanismo de proteção contra os danos causados pela radiação UV. Além disso, outras alterações celulares e morfológicas foram relatadas como um mecanismo de defesa contra radiação UV-B como: a alteração da deposição de microfibrilas e microtúbulos que despolimerizam quando irradiados por radiação UV-B e o rompimento da rede de microtúbulos de células epidérmicas corticais resultando na forma da célula alterada e, por conseguinte, alteração na morfologia da folha (Staxén e Bornman, 1994).

Os resultados deste trabalho mostraram que as células de plantas que cresceram em ambiente natural (AMB) e sob radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de *O. sativa*, possuem cloroplasto típico com grana e tilacóides estromais bem desenvolvido, geralmente orientados paralelamente ao eixo longitudinal do plastideo. Os cloroplastos de *O. sativa* exposta à radiação UV-B

mostraram mudanças estruturais significativas, como tilacóides interrompidos e dilatados. Alguns estudos com *Pisum sativum* mostraram respostas similares, como dilatação dos tilacóides (Brandle *et al.*, 1977; He *et al.*, 1994.). Estudos com diferentes macroalgas importantes, expostas a radiação UV-B, incluindo *Kappaphycus alvarezii* (Schmidt *et al.*, 2009), *Gracilaria domingensis* (Schmidt *et al.* 2010c), *Chondracanthus teedei* (Schmidt *et al.*, 2012a) e *Hypnea musciformis* (Schmidt *et al.*, 2012b) também mostraram alterações ultraestruturais nos cloroplastos que se manifestam como dilatação e desorganização dos tilacóides.

Neste estudo, clorofilas (a, b e clorofila total) e teor de carotenóides de *O. sativa* diminuíram após a exposição à radiação PAR+UV-B, de forma semelhante ao observado em *Canavalia ensiformis* onde ocorreu redução do teor de clorofila nas folhas (Choi e Hoh, 2003). Com o aumento da radiação UV-B, foi verificado em folhas de milho o acúmulo de flavonóides e foram reduzidos os teores de clorofila a, b (Gao *et al.*, 2004). Estudos com algas têm geralmente demonstrado uma diminuição na concentração de clorofila após exposição à radiação UV-B, incluindo, por exemplo, a variante de *Kappaphycus alvarezii* cultivada *in vitro*, durante 28 dias de exposição (Schmidt *et al.*, 2010b), *Euclima*

*strictum* F. Schmitz cultivadas *in vitro*, durante 16 dias de exposição (Wood, 1989), e *K. alvarezii* cultivada em período longo e mantida com radiação UV-B (Eswaran *et al.*, 2001), indicando que diferentes organismos fotossintetizantes têm resposta de redução de clorofila. No entanto, outras investigações com diferentes algas têm mostrado que radiação UV-B estimula a síntese de clorofila a, tais como as variantes pigmentares de *K. alvarezii*, verde e vermelho (Schmidt *et al.*, 2010a), *Mastocarpus stellatus* e *Chondrus crispus* (Roleda *et al.*, 2004b).

Fotossistema II (PSII) é um dos principais alvos da radiação UV-B em organismos fotossintéticos (Post *et al.*, 1992; Neale *et al.*, 1993 e Vass, 1997). Uma vez que é difícil de estabelecer um gradiente de protons através da membrana do tilacoide sob radiação UV-B, as reações fotossintéticas são prejudicadas (Poppe *et al.*, 2003). Outros estudos de indução de radiação incluem alterações na despolarização do potencial de membrana, perda ou efluxo de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  e diferentes atividades da enzima ATPase nas membranas celulares (Doughty & Hope, 1973; Murphy, 1983; Gallo *et al.*, 1989) e na membrana dos tilacóides (Iwanzik *et al.*, 1983; Chow *et al.*, 1992; Hideg & Vass, 1996).

A lâmina foliar de *O. sativa* exposta a radiação UV-B, mostrou um aumento no número do plastoglobulos no cloroplasto.

Conforme Marcondes & Garcia (2009), o estresse salino gerou aumento de plastoglóbulos em plantas de arroz IAC-4440. Wi *et al.* (2005) observaram também aumento de plastoglóbulos em *Arabidopsis* submetidas a radiação gama. De acordo com Holzinger *et al.* (2004), quando as algas são submetidos a estresse, a limitação de nitrogênio e a síntese de lípidos são observadas. Estes fenômenos ocorrem porque os percursos para formar estruturas contendo proteínas celulares são suprimidos.

As mitocôndrias da lâmina foliar de *O. sativa* em radiação UV-B também mostraram alterações ultraestruturais como: forma intumescida e membrana mitocondrial interna interrompida. Santos *et al.* (1998), observou em células de pólen de *Zea mays* submetidas à radiação UV-B, mitocôndrias com perfis mal discerníveis e cristas pouco diferenciadas. Outros estudos relatam alterações ultraestruturais na mitocôndria do *G. domingensis* (Schmidt *et al.*, 2010c) e *C. teedei* (Schmidt *et al.*, 2012 a), estas alterações foram manifestadas por uma aparente dilatação e por alterações na membrana mitocondrial interna de uma estrutura de túbulos para sáculos quando expostos à radiação UV-B. Mitocôndrias intumescidas e grânulos elétron-densos na matriz mitocondrial, as quais podem resultar em um metabolismo desordenado de ATP (Vosjan *et al.*, 1990).

A redução do teor de proteínas observada em plantas de *O. sativa* tratadas com radiação PAR+UV-B, concorda com os resultados anteriores, mostrando redução nas concentrações de proteína na alga *K. alvarezii* quando exposta a radiação UV-B (30 a 180 min) Eswaran *et al.* (2001) e por Schmidt *et al.* (2012b) com a alga *Chondracanthus teedei*. Estes dados indicam que a combinação de radiação PAR+UV-B inibe o metabolismo de proteínas, provavelmente mudando vias biossintéticas, ou mobilização de proteína para os processos de reparação, incluindo a ativação da defesa antioxidante. Mecanismos de reparação de danos induzidos pela radiação UV-B das membranas ou componentes de transporte de elétrons, exigem o aumento da atividade enzimática com requisitos mais elevados de nitrogênio (Poppe *et al.*, 2003). Por exemplo, as proteínas fotossintéticas importantes, tais como o 1,5 difosfato carboxilase / oxigenase (Rubisco) ou proteína D1, mostram um aumento do teor sob exposição à radiação UV-B, levando a um aumento da atividade fotossintética (Aro *et al.*, 1993; Bornmann e Teramura, 1993; Strid *et al.*, 1994).

Em resumo, o presente estudo demonstrou que a radiação PAR+UV-B afeta negativamente a lâmina foliar de *O. sativa*, um dos cereais mais cultivados em todo o mundo. Isto se tornou evidente através do dano ultraestrutural e mudanças observadas na

morfologia celular, biomassa vegetal, pigmentos fotossintéticos e proteínas. Alterações no conteúdo dos compostos fenólicos de plantas tratadas com radiação UV-B em comparação com as amostras do ambiente e PAR, também foram confirmadas, o que sugere a expressão dos mecanismos de defesa associados a esses compostos antioxidantes (proteínas, cloroplastos, mitocôndrias).

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALA-DÍAZ, R.T., CABELLO-PASINI, A., PÉREZ-RODRÍGUEZ, E., CONDE ÁLVAREZ, R. M. & FIGUEROA, F. L. Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and phenolic compounds in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta). **Marine Biology** 148:459-465. 2006.

AGARIE, S., AGATA, W., UCHIDA, H., KUBOTA, F. & KAUFMAN, P.B. Function of silica bodies in the epidermal system of rice (*Oryza sativa* L.): testing the window hypothesis. **Journal of Experimental Botany** 47(298):655-660. 1996.

ALENIUS, C. M., VOGELMANN, T.C. & BORNMAN, J. F. A three-dimensional representation of the relationship between penetration of UV-B radiation and UV-screening pigments in leaves of *Brassica napus*. **New Phytologist** 131:297-302. 1995.

ALMEIDA, S. L. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Anthurium coriaceum* G.Don (Araceae) em diferentes estádios do desenvolvimento. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina. p.75. 2006.



ARO, E. M., VIRGIN, I. & ANDERSSON, B. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein, protein damage and turnover. **Biochim Biophys Acta** 1143:113-134. 1993.

BARNES, P.W., FLINT, S.D. & CALDWELL, M.M. Morphological responses of crop and weed species of different grow forms to ultraviolet-B radiation. **American Journal of Botany** v.77, p.1354-1360. 1990.

BECHTEL, D. B. & POMERANZ, Y. Ultrastructure of the mature ungerminated Rice (*Oryza sativa* L.) caryopsis: The caryopsis coat and the aleurone cells. **American Journal of Botany** 64:966-973. 1977.

\_\_\_\_\_. Ultrastructure of the mature ungerminated Rice (*Oryza sativa* L.) caryopsis: The germ. **American Journal of Botany** 65:75-85. 1978a.

\_\_\_\_\_. Ultrastructure of the mature ungerminated Rice (*Oryza sativa* L.) caryopsis: The starchy endosperm. **American Journal Botany** 65:684-691. 1978b.

BIANCIOTTO, O. A., PINEDO, L.B., SAN ROMAM, N.A., BLESSIO, A.Y & COLLANTES, M.B. The effects of natural UV-B radiation on a perennial *Salicornia* salt-mash in Bahia San Sebastián, Tierra del Fuego, Argentina:a 3-year field study. **Journal Photochemistry Photobiology** 70:177-185. 2003.

BOEGER, M. R. T. & POULSON, M. Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a morfologia foliar de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Brassicaceae). **Acta Botânica Brasileira** 20(2):329-338. 2006.

BONOW, S., VON PINHO, E.V.R., SOARES, A. A. & JÚNIOR, S.S. Caracterização morfológica de cultivares de arroz visando à certificação da pureza varietal. **Ciências Agrotecnicas** 31(3):619-627. 2007.

BORNMAN, J. F. & TERAMURA, A. H. Effects of ultraviolet-B radiation on terrestrial plants. 21 In: Young AR, Björn LO, Moan J, Nultsch W, eds. Environmental UV photobiology New 22 York: Plenum Press, 427-72. 1993.

BOWLER, C., VAN MONTAGU, M. & INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 43:83-116. 1992.

BOZZOLA, J.J. & RUSSEL, L.D. **Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologists.** Boston, Jones and Barlett Publishers. 542p. 1991.

BRANDLE, J. R., HINCKLEY, T.M. & BROWN, G. N. The effects of dehydration-rehydration cycles on protein synthesis of black locust seedlings. **Physiology Plant.** 40:1-5. 1977.

BRITT, A. B. Repair of DNA damage induced by ultraviolet radiation. **Plant Physiology** 108: 891-896. 1995.

BÜHLMANN, B., BOSSARD, P. & UEHLINGER, U. The influence of longwave ultraviolet radiation (UV-A) on the photosynthetic activity ( $^{14}\text{C}$ -assimilation) of phytoplankton. **Journal of Plankton Research** 9:935-943. 1987.

CABRERA, S., BOZZO, S. & FUENZALIDA, H. Variations in UV radiation in Chile. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** 28:137-142. 1995.

CALDWELL, M.M. & FLINT, S.D. Stratospheric ozone Reduction, Solar UV-B Radiation and Terrestrial Ecosystems. **Climatic Change** 28(4):375-394. 1994.

CASSI-LIT, M. M., WHITECROSS J., NAYUDU M. & TANNER G.J. UV-B radiation induces differential leaf damage, ultra structural changes and accumulation of specific phenolic compounds in rice cultivars. **Australian Journal Plant Physiology** 24:261-274. 1997.

CHOI, B.Y. & ROH, K.S. UVB radiation affects chlorophyll and activation of Rubisco by Rubisco activase in *Canavalia ensiformis* L. leaves. **Journal of Plant Biology** 46:117-121. 2003.

CHOW, W. S., STRID, A. & ANDERSON, J. M. Short-term treatment of pea plants with supplementary Ultraviolet-B radiation: Recovery time-courses of some photosynthetic functions and

components, In: Murata, N, (Ed.), Research in Photosynthesis, Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, pp. 361–364. 1992.

DAI, Q., PENG, S., CHAVEZ, A. Q. & VERGARA, B. S. Effects of UV-B radiation on stomatal density and opening in rice (*Oryza sativa* L.). **Annals of Botany** 76:65-70. 1995.

DALOSO, D. M., HOLSBACK-MENEGUCCI, Z. R. & SANTIAGO, E. F. Efeitos da radiação ultravioleta-C sobre a simetria e morfoanatomia foliar de *Rapanea ferruginea* (Ruiz et.Pav) Mez. (Myrsinaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences** 31(2):165-172. 2009.

DIFFEY, B.L. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. **Phys. Med. Bid.** 36(3):299-328. 1991.

DOUGHTY, C. J. & HOPE, A. B. Effects of ultraviolet radiation on the membranes of *Chara coralline*. **Membrane Biology** 13:185-198. 1973.

EBENEZER, G. A. I., AMIRTHALINGAM, M., PONSAMUEL, J. & DAYANANDAN, P. Role of palea and lemma in the development of rice caryopsis. **Journal Indian Botany Society** 69:245-250. 1990.

EBENEZER, G. A. I., KRISHNAN, S. & DAYANANDAN, P. Structure of rice caryopsis in relation to strategies for enhancing yield: in **Rice reseach for food security and poverty alleviation** (eds) S Peng and B Hardy (Philippines: IRRI). p.109 -117. 2001.

EMBRAPA. Disponível em < [Http://www.embrapa.br](http://www.embrapa.br)> Acesso em: 30 de Janeiro de 2009. 13:30:00.

EPAGRI. Disponível em:< [Http://www.epagri.rct-sc.br](http://www.epagri.rct-sc.br)>. Acesso em: 15 de dezembro de 2008. 14:30:00.

ESWARAN, H., LAL R. & REICH, P. F. Land degradation. An overview conference on land degradation and desertification. khon kaen, Thailand: Oxford Press, New Dehli, India. 2001.

FARMAN, J. C., GARDINER, B. G. & SHANKLIN, J. D. Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO x /NO x interaction. **Nature** 315:207-210. 1985.

FEDER N & O'BRIEN T P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal Botany** 55:123-42, 1968.

FRANKLIN, L. A. & FORSTER, R. M. The changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. **European Journal Phycology** 323:207-232. 1997.

GAHAN, P.B. **Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction**. London: Academic Press. 1984.

GAO, W., Y. ZHENG, J. R. SLUSSER, G. M. HEISLER, R. H. GRANT, J. Xu & D. HE. Effects of supplementary ultraviolet-B irradiance on maize yield and qualities: a field experiment. **Photochemick Photobiology** 80:127-31. 2004.

GALLO, R. L., KOCHEVAR, I. E. & GRANSTEIN, R. D. Ultraviolet radiation induces a change in cell membrane potential in vitro: a possible signal for ultraviolet radiation induced alteration in cell activity. **J Photochem Photobiology** 49:655-662. 1989.

GONZALEZ, R., MEPSTED, R., WELLBURN, A. R. & PAUL, N. D. Non photosynthetic mechanisms of growth reduction in pea (*Pisum sativum*) exposed to UV-B radiation. **Plant Cell and Environmental** 21:23-32. 1998.

GORDON, E.M. & Mc CANDLESS, E.L. 1973. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. In: HARVEY, M. J. & MCLACHLAN, J. (Eds.) *Chondrus crispus*. Halifax: Nova Scotian Institute of Science, p. 111-133.

HAO, X., HALE, B. A., ORMROD, D.P. & PAPADOPOULOS, A.P. Effects of pré-exposure to ultraviolet-B radiation on responses of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. New Yorker) to ozone in ambient and elevated carbon dioxide. **Environmental Pollution** 110:217-224. 2000.

HASHIMOTO, M., KISSELEVA, L., SAWA, S., FURUKAWA, T., KOMATSU, S. & KOSHIBA T. A Novel Rice PR10 Protein, RSOsPR10, Specifically Induced in Roots by Biotic and Abiotic Stresses, Possibly via the Jasmonic Acid Signaling Pathway. **Plant Cell Physiology** 45(5):550–559. 2004.



HE, Q., MARJAMAKI, M., SOINI, H., MERTSOLA, J. & VILJANEN, M. K. Primers are decisive for sensitivity of PCR. **BioTechniques** 17:82–87. 1994.

HIDEG, E. & VASS, I. UV-B induced free radical production in plant leaves and isolated thylakoid membranes. **Plant Science** 115:251-260. 1996.

HILL, M.K. **Understanding environmental pollution**. Cambridge: Cambridge University Press. 1997.

HISCOX, J. D. & ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal Botany** 57:1332-1334. 1979.

HOLLOSY, F. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. **Microbiology** 33:179-197. 2002.

HOLZINGER, A., LÜTZ, C., KARSTEN, U. & WIENCKE, C. The effect of ultraviolet radiation on ultrastructure and photosynthesis in the red macroalgae *Palmaria palmata* and *Odonthalia dentata* from Arctic waters. **Plant Biology** 6:568-577. 2004.

HOSHIKAWA, K. Development of endosperm tissue with special reference to the translocation of reserve substances in cereals. **Japan Journal Crop Science** 53:153-162. 1984.

HULSHOF, P. J. M., KOSMEIJER-SCHUIL, T., WEST, C. E. & HOLLMAN, P. C. H. Quick screening of maize kernels for provitamin A content. **Journal Food Comp Anal** 20:655-661. 2007.

IWANZIK, W., TEVINI, M., DOHNT, G., VOSS, M., WEISS, W., GRÄBER, P. & RENGER, G. Action of UV-B radiation on photosynthetic primary reactions in spinach chloroplasts. **Physiol Plant** 58:401-407. 1983.

JANSEN, M.A.K., GABA, V., & GREENBERG, B.M. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. **Trends in Plant Science** 3(4), 131–135. 1998.

JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique**. New York, McGraw Hill Book Company. 523p. 1940.

JOKIEL, P.L. & YORK, R. H. JR. Importance of ultraviolet radiation in photoinhibition of microalgal growth. **Limnology Oceanography** 29:192-199. 1984.

JONES, T.J. & ROST, T.L. Histochemistry and ultrastructure of rice (*Oryza sativa* L.) zygotic embryogenesis. **American Journal of Botany** 76:504-520. 1989.

JULIANO, J.B. & ALDAMA, M.J. Morphology of *Oryza sativa* L. **Philippines Agriculture** 26:1-134. 1937.

KAKANI, V.G., Reddy, K.R., Zhao, D. & Sailaja, K. Field crop responses to ultraviolet-B radiation: a review. **Agricultural and Forest Meteorology** 120:191-218. 2003.

KERR, R.A. The ozone hole reaches a new low. **Science** v. 262, p. 501. 1993.

KERR J. B. & McELROY C. T. Evidence for large upward trends of ultraviolet-B radiation linked to ozone depletion. **Science** 262:1032-1034. 1993.

KIRCHHOFF, V. W. J. H.; SCHUCH, N.J.; PINHEIRO, D.K. & HARRIS, J.M. Evidence for ozone hole perturbation at 30° South. **Atmospheric Environmental** 30:1481-1488. 1996.

KIRCHHOFF, V.W.J.H., ZAMORANO, F. & CASICCIA, C. RUVB enhancements at Punta Arenas, Chile. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** 38, 174–177. 1996.

KIRCHHOFF, V.W.J.H., ECHER, E., LEME, N.P. & SILVA, A.A. A variação sazonal da radiação ultravioleta solar biologicamente ativa, Brazil. **Journal Geophysical** v. 18, p. 63-73. 2000.

KRAUS, J. E & ARDUIN, M. Manual Básico de Métodos em Morfologia Vegetal. Seropédia, RJ, Editora Universidade Rural. p.194. 1997.

KRISHNAN, S., EBENEZER, G. A. I. & DAYANANDAN, P. Histochemical localization of storage components in caryopsis of rice (*Oryza sativa* L.). **Current Science** 80:567-571. 2001.

KRISHNAN, S. & DAYANANDAN, P. Structural and histochemical studies on grain filling in the caryopsis of rice (*Oryza sativa* L.). **Journal Bioscience** 28:455-469. 2003.

KUHNEN, S., LEMOS P. M. M., CAMPESTRINI, L. H., OGLIARI, J. B., DIAS, P. F. & MARASCHIN, M. Antiangiogenic properties of carotenoids: a potential role of maize as functional food. **Journal Funct Foods** 1:284-290. 2009.

LESSER, M. P. & SHICK J. M. Effects of irradiance and ultraviolet radiation on photoadaptation in the zooxanthellae of *Aiptasia pallida*: primary production, photoinhibition, and enzymic defenses against oxygen toxicity. **Marine Biology** 102:243-255. 1994.

LORENZEN, C. J. Ultraviolet radiation and phytoplankton photosynthesis. **Limnology Oceanography** 24:1117-1120. 1979.

LOWRY, O. H., ROSEBOUGH, N. G. & FARR, A. L. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, 193:265-275. 1951.

MADRONICH, S. Implications of recent total atmospheric ozone measurements for biological active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Geophys Res Lett* 19:37-40. 1992.

MARCONDES, J. & GARCIA, A. B. Aspectos Citomorfológicos do Estresse Salino em Plântulas de Arroz (*Oryza sativa* L.). **Arq. Inst. Biol.** 76(2):187-194. 2009.

Mc CULLY, M.E. The histological localization of the structural polysaccharides of seaweeds. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 175: 702-711. 1970.

METCALFE, C.R. Anatomy of the Monocotyledons. I.Gramineae. Oxford University Press. p.730. 1960.

MITCHELL D. L., JEN J. & CLEAVER J. E. Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated with solar (ultraviolet B) radiation. **Nucleic Acids Research** 20:225-229. 1992.

MOLINA, M. J. & ROWLAND, F. S. Chlorofluoromethanes in the Environment. **Reviews of Geophysics and Space Physics** 13:1-35. 1975.

MURPHY, T. M. Membranes as targets of ultraviolet radiation. **Physiology Plant** 58:381-388. 1983.

MUSIL, C.F., CHIMPHANGO, S. B.M. & DAKORA, F. D. Effects of Elevated Ultraviolet-B Radiation on Native and Cultivated Plants of Southern Africa. **Annals of Botany** 90:127-137. 2002.

NEALE, P. J., CULLEN, J. C., LESSER, M. P. & MELIS, A. Physiological bases for detecting and predicting Photoinhibition of aquatic photosynthesis by PAR and UV radiation, In: Yamamoto, H.Y., Smith, C.M. (Eds.), *Photosynthetic Responses to the Environment*. **American Society Plant Physiology**, Rockville, pp. 61-77. 1993.

NOGUE'S, S., ALLEN, D. J., MORISON, J. I. L. & BAKER, N. R. Ultraviolet-B radiation effects on water relations, leaf development and photosynthesis in droughted pea plants. **Plant Physiology** 117:173-81. 1998.

OLIVEIRA, D. M. T. Morfologia de plântulas e plantas jovens de 30 espécies arbóreas de leguminosas. **Acta Botanica Brasilica** 13:237-330. 1999.

OPARKA, K. J. & GATES, P. J. Transport of assimilates in the developing caryopsis of rice (*Oryza sativa* L.), ultrastructure of the pericarp, vascular trace and its connections with the aleurone layer. **Planta** 151:561-573. 1981a.

\_\_\_\_\_. Transport of assimilates in the developing caryopsis of rice (*Oryza sativa* L.). **Planta** 152:388-396. 1981b.

\_\_\_\_\_. Ultrastructure of the developing pigment strand of rice (*Oryza sativa* L.), in relation to its role in solute transport. **Protoplasma** 113:33-43. 1982.

POPPE, F., SCHMIDT, R. A. M., HANELT, D. & WIENCKE, C. Effects of UV radiation on the ultrastructure of several red algae. **Phycol Research** 51:11-19. 2003.

POST, A., GENTLE, S. & LARKUM, A. W. S. Algal photosynthesis: inhibition by UV-B radiation, recovery and UV-



absorbing pigments, In: Murata, N. (Ed.), Research in Photosynthesis. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, Boston, London, pp. 847-850. 1992.

QUINTAS, A. T. Novo material apoio para cortes histológicos. **Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária do Rio Grande do Sul** 6:51-54. 1963.

RAKWAL, R., AGRAWAL, G. K. & YONEKURA, M. Separation of proteins from stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaf tissues by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: Induction of pathogenesis-related and cellular protectant proteins by jasmonic acid, UV irradiation and copper chloride. **Electrophoresis** 20:3472-3478. 1999.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at light pH as an electron opaque stain in electron microscopy. **Journal Cell Biology** 17:208-212. 1963.

ROLEDA, M. Y., VAN DE POOL, W. H., HANELT, D. & WIENCKE, C. PAR and UVBR effects on photosynthesis, viability, growth and DNA in different life stages of two coexisting

Gigartinales: implications for recruitment and zonation pattern. **Marine Ecology Prog. Ser.** 281:37-50. 2004.

ROUSSEAU, M.C., BALLARÉ, CL., GIORDANO, C.V., SCOPEL, A.L., ZIMA, A.M., SWARCBERG-BRACCHITTA, M., SEARLES, P.S., CALDWELL, M.M. & DÍAZ, S.B . Ozone depletion and RUVB radiation: impact on plant DNA damage in southern South America. **Proceedings of National Academic Sciences-United States America** 96:15310-15315. 1999.

ROYAL BOTANIC GARDENS. Disponível em <[Http://www.kew.org/data/grasses-db/www/imp06801.htm](http://www.kew.org/data/grasses-db/www/imp06801.htm)> Acesso em: 05 de Outubro de 2011. 15:40:00.

RUDALL, P.J. & BUZGO, M. Evolutionary history of the monocot leaf. *Development Genetics and Plant Evolution*. *Capter* 23, p.431-458. 2002.

RUHLAND, C. T., FOGAL, M. J., BUYARSKI, C. R. & KRNA, M. Solar Ultraviolet-B radiation increases phenolic content and ferric reducing antioxidant power in *Avena sativa*. **Molecules** 12:1220-1232. 2007.

SANCHEZ, E., QUESADA T. & ESPINOZA M. Ultrastructure of the wild rice *Oryza grandiglumis* (Gramineae) in Costa Rica. **Revista Biológica Tropical** 54(2):377-385. 2006.

SANTEE, M.L., READ, W.G., WATERS, J.W., FROIDEVAUX, G.L., MANNEY, G.L., FLOWER, D.A., JARNOT, R.F., HARWOOD, R.S. & PECKHAM, G.E. Interhemispheric differences in polar stratospheric HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, ClO, and O<sub>3</sub>. **Science** 267:849-852. 1995.

SANTOS, J. K. Morphology of the flower and mature grain of Philippines rice. **Philippines Journal of Science** 52:475-503. 1993.

SANTOS, A., ALMEIDA, J. M., SANTOS, I. & SALEMA, R. Biochemical and ultrastructural changes in pollen of *Zea mays* L. grown under enhanced UV-B radiation. **Annals of Botany** 82:641-645. 1998.

SANTOS, I., FIDALGO, F., ALMEIDA, J.M. & SALEMA, R. Biochemical and ultrastructural changes in leaves of potato plants

grown under supplementary UV-B radiation. **Plant Science** 167:925-935. 2004.

SARGHEIN, S.H., CARAPETIAN, J. & KHARA, J. Effects of UV-Radiation on Photosynthetic Pigments and UV Absorbing Compounds in *Capsicum longum* (L.). **International Journal of Botany** 4(4):486-490. 2008.

SCHABERLE, F. A. & SILVA, N.C. Introdução à Física da Radioterapia. Departamento de Física da Universidade Federal de Santa Catarina. 2000.

SCHMIDT, É. C., SCARIOT, L. A., ROVER, T., BOUZON, Z.L. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. **Micron** 40:860–869. 2009.

SCHMIDT, É. C., MARASCHIN, M. & BOUZON, Z. L. Effects of UVB radiation on the carragenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales): changes in ultrastructure, growth, and photosynthetic pigments. **Hydrobiologia** 649:171-182. 2010a.

SCHMIDT, É. C., GOMES, B. N., MARASCHIN, M. & BOUZON, Z. L. Effect of ultraviolet-B radiation on growth, photosynthetic pigments, and cell biology of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) macroalgae brown strain. **Photosynthetica** 48:161-172. 2010b.

SCHMIDT, É. C., SANTOS, R., HORTA, P. A., MARASCHIN, M. & BOUZON, Z. L. Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales): Changes in cell organization, growth and photosynthetic performance. **Micron** 41:919-930. 2010c.

SCHMIDT, É. C., PEREIRA, B., SANTOS, R., PONTES, C. L. M., SCHERNER, F., HORTA, P. A., PAULA, M. R., LATINI, A., RAMLOV, F., MARASCHIN, M. & BOUZON, Z. L. Alterations in architecture and metabolism induced by ultraviolet radiation-B in the carragenophyte *Chondracanthus teedei* (Rhodophyta, Gigartinales). **Protoplasma** 249:353-367. (2012a).

SCHMIDT, É. C., PEREIRA, B., SANTOS, R., GOUVEIA, C., COSTA, G. B., FARIA, G. S. M., SCHERNER, F., HORTA, P. A.,

PAULA, M. R., LATINI, A., RAMLOV, F., MARASCHIN, M. & BOUZON, Z. L. Responses of the macroalgae *Hypnea musciformis* after in vitro exposure to UV-B. **Aquatic Botany** 100:8-17. (2012b).

SCOTT, C. E. & ELDRIDGE, A. L. Comparison of carotenoid content in fresh, frozen and canned corn. **Journal of Food Composition and Analysis** 18:551–559. 2005.

SINGH, R., SINGH, S., TRIPATHI, R. & AGRAWAL, S.B. Supplemental UV-B radiation induced changes in growth, pigments and antioxidant pool of bean (*Dolichos lablad*) under field conditions. **Journal Environmental Biology** 32:139-145. 2011.

SMITH, R.C., BAKER, K.S., HOLM-HANSEN, O. & OLSON, R.S. Photoinhibition of photosynthesis in natural waters. **Journal Photochemical Photobiology** 31:585-592. 1980.

SMITH, R. C., PREZELIN, B. B., BAKER, K. S., BIDIGARE, R. R., BOUCHER, N. P., COLEY, T., KARENTZ, D., MACINTYRE, S., MATLICK, H. A., MENZIES, D., ONDRUSEK, M., WAN, Z. & WATERS, K. J. Ozone depletion: ultraviolet radiation and

phytoplankton biology in Antarctic waters. **Science** 255:952–959. 1992.

SOEST, P.J.V. Rice straw, the role of silica and treatments to improve quality. **Animal Feed Science and Technology** 130:137-171. 2006.

SOUZA, V. C. & LORENZI, H. Botânica Sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGII. 2ª Edição. Nova Odessa. SP. **Instituto Plantarum** p.704. 2008.

SPURR, A. R. A low viscosity epoxy resin-embedding medium for electron microscopy. **Journal Ultrastructure Research** 26:31-43. 1969.

STAXÉN, I. & BORNMAN, J. F. A morphological and cytological study of *Petunia hybrida* exposed to UV-B radiation. **Physiology Plantarum**, 91:735-740. 1994.

STOLARSKI, R. S. & CICERONE, R. J. Stratospheric Chlorine: a Possible Sink for Ozone. **Canadian Journal Chemistry** 52:1610–1615. 1974.

STOLARSKI, R.S., KRUEGER, A.J., SCHOEBERL, M.R., MCPETERS, R.D., NEWMAN, P. A. & ALPERR, J.C. "Nimbus-7 satellite measurements of the springtime Antarctic ozone decrease". **Nature** 322:808-811. 1986.

STRID, A., CHOW, W. S. & ANDERSON, J. M. UV-B damage and protection at the molecular level in plants. **Photosynthesis Research** 39:475-489. 1994.

TALARICO, L. & MARANZANA, G. Light and adaptative responses in red macroalgae: an overview. **Journal Photochem Photobiology Botanic Biology** 56:1–11. 2000.

TAYLOR, C. B. Damage Control. **The Plant Cell** 9:111-114. 1997.

TERAMURA, A. H. & SULLIVAN, J. H. Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants. **Photosynthesis Research** 39:463-473. 1994.



TERANISHI, M., IWAMATSU, Y., HIDEWA, J. & KUMAGAI, T. Ultraviolet-B Sensitivities in Japanese Lowland Rice Cultivars: Cyclobutane Pyrimidine Dimer Photolyase Activity and Gene Mutation. **Plant Cell Physiology** 45(12):1848–1856. 2004.

TEVINI, M. & TERAMURA, A.H. UV-B effects on terrestrial plants. **Photochemistry and Photobiology** 50:479-487. 1989.

TILLICH, H. J. Development and organization. In: **The Families and Genera of Vascular Plants**. Vol.3. Flowering Plants. Monocotyledons. Liliaceae (except Orchidaceae). Berlin, Ed. K. Kubitzki. p.1-19. 1998.

TOMLISON, P.B. Monocotyledons - Towards an Understanding of their Morphology and Anatomy. **Advances in Botanical Research** 3:207-292. 1970.

TOSSERAMS, M. & ROZEMA, J. Effects of ultraviolet-B radiation (UV-B) on growth and physiology of the dune grassland species *Calamagrostis epigeios*. **Environmental Pollution** 89(2):209-214. 1995.

VAN STEENIS, C.G.G.J. Rheophytes of the world: supplement. **Allertonia** 4:267-330. 1987.

VASS, I. Adverse effects of UV-B light on the structure and function of the photosynthetic apparatus. *In*: PESSARAKLI M (*ed*). **Handbook of photosynthesis**. New York: Marcel Dekker. p. 931-949. 1997.

VOSJAN, J. H., DÖHLER, G. & NIEUWLAND, G. Effect of UV-B irradiance on the ATP content of microorganisms of the Weddell Sea (Antarctica) *Neth. Journal Sea Reseach* 25(3): 391-393. 1990.

WANG, Y. & LI, J. The plant architecture of rice (*Oryza sativa*). **Plant Molecular Biology** 59:75-84. 2005.

WHANG, S.S., KIM, K. & HESS, W. M. Variation of silica bodies in leaf epidermal long cells within and among seventeen species of *Oryza* (Poaceae). **American Journal of Botany** 85(4):461-466. 1998.

WELLNURN, A. R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Plant Physiology** 144:307-313. 1994.

WI, S.G., CHUNG, B.Y., KIM, J.H., BAEK, M.H., YANG, D.H., LEE, J.W. & KIM, J.S. Ultrastructural changes of cell organelles in Arabidopsis stem after gamma irradiation. **Journal of Plant Biology** 48:195-200. 2005.

WOOD, W. F. Photoadaptive responses of the tropical red alga *Eucheuma striatum* Schmitz (Gigartinales) to ultra-violet radiation. **Aquatic Botanic** 33:41-51. 1989.

WORREST, R.C. Review of Literature concerning the impact of UV-B radiation upon marine organisms. *In*: CALKINS, J. (ed) The role of solar ultraviolet radiation in marine ecosystems. **Plenum Press**. p. 429-457. 1982.

ZUK-GOLASZEWSKA K., UPADHYAYA M. K., GOLASZEWSKI J. The effect of UV-B radiation on plant growth and development. **Plant Soil Environmental** 49:135- 140. 2003.