



Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC
Centro de Ciências Biológicas - CCB
Departamento de Botânica
Pós Graduação em Biologia Vegetal - PPGBVE



Efeitos da radiação ultravioleta-B na germinação e desenvolvimento dos tetrásporos de *Gelidium floridanum* (Gelidiales, Rhodophyta): crescimento, morfologia e ultraestrutura.

Lidiane Ângela Scariot

FLORIANÓPOLIS
2010

Lidiane Ângela Scariot

Efeitos da radiação ultravioleta-B na germinação e desenvolvimento dos tetrásporos de *Gelidium floridanum* (Gelidiales, Rhodophyta): crescimento, morfologia e ultraestrutura.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal, na área de concentração de Biologia Celular e Reprodução de Macroalgas Marinhas.

Orientadora: Zenilda Laurita Bouzon, Dra.

FLORIANÓPOLIS
2010

Scariot, Lidiane Ângela

Efeitos da radiação ultravioleta-B na germinação e desenvolvimento dos tetrásporos de *Gelidium floridanum* (Gelidiales, Rhodophyta): crescimento, morfologia e ultraestrutura.

f. 107, 30 figs.

Orientadora: Dra. Zenilda Laurita Bouzon

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal.

Bibliografia: f. 107, 30 figs.

1. *Gelidium floridanum*; 2. Germinação de tetrásporos; 3. Radiação UV-B; 4. Ultraestrutura.

Dedico aos meus Pais e às minhas irmãs.

E... dedico àquele que não hesitou em confiar em mim desde o início, me incentivar e me dar suporte ao longo de toda esta jornada... mesmo que, para isto, tivesse que se tornar um pouco biólogo...

Agradecimentos

Ao longo do desenvolvimento deste trabalho muitas pessoas contribuíram com incentivos, ideias, apoios e boas críticas, tornando possível a conclusão deste trabalho. A todas estas pessoas eu sou muito grata. Espero que cada uma sinta-se presente ao ler as diferentes ideias e momentos que estruturam esta dissertação.

Agradeço à Professora Dra. Zenilda L. Bouzon, pela oportunidade concedida para desenvolver este trabalho, pela confiança, orientação e amizade.

À Profa. Dra. Luciane C. Ouriques, por também me receber no Lamar, pelo convívio, confiança, conversas e amizade.

À Dra. Leila Hayashi pela grande amizade, conversas, por me apresentar à Dra. Luciana Ferreira e ao Dr. Nelso Navarro, pelas sugestões e “helps”.

Às companheiras de jornada e grandes amigas, Carmen e Ticiane, pela amizade, carinho, companheirismo, pelos momentos agradáveis e inesquecíveis e pelas ajudas diversas nos momentos bons, nos momentos mais-ou-menos e nos momentos ruins. Muito obrigada meninas!

Agradeço ao Gabriel pela ajuda nas coletas, estatística e sugestões. Às alunas de iniciação científica Laise, Raquel e Bianca, além da amizade, foram as primeiras pessoas com quem trabalhei no Lamar e com quem aprendi muito. Ao aluno Frederico, pelo trabalho desenvolvido em conjunto. À Chirle, pela amizade, conversas e ajudas. À Marina e Marthiellen, obrigada pela amizade e ajudas, à Beatriz e à equipe do Lamar pelo convívio e pelas formas com que me ajudaram.

À minha amiga Simone, pelo apoio constante e amizade sincera. Obrigada!

Ao Dr. Eurico Oliveira, à Dra. Luciana Ferreira e Dr. Nelso Navarro pelos e-mails trocados, ajuda em tantas dúvidas que tive e envio de artigos.

Aos técnicos do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC - LCME, Eliana, Luciano e Renata, por toda assistência no processamento e aquisição das imagens de microscopia eletrônica.

À CAPES, pela bolsa de mestrado.

À todos(as) os(as) colegas de mestrado, pelo convívio, aprendizados, trabalhos realizados em conjunto, almoços no RU, sugestões, críticas e amizade. À Dávia, pelo acolhimento quando iniciei os estudos como aluna especial. À Profa. Roselane L. Silva,

Profa. Ana Cláudia Rodrigues e as amigas Caroline, Bianca e Tarsis que me auxiliaram com o direcionamento das análises estatísticas. Também à Profa. Malva Hernández, por seu carisma em me receber para discutir problemas relacionados às metodologias e análises estatísticas.

À todos os Mestres, Professores do Programa de Mestrado em Biologia Vegetal (PPGBVE – UFSC) e funcionários, os quais estiveram presentes nas diferentes etapas deste trabalho.

Ao Prof. Paulo A. Horta, pelos ensinamentos, incentivos, conversas e apoio.

Enfim, agradeço a Deus, aos meus amados pais e às minhas super irmãs, pois são a minha base. Agradeço por viverem e sentirem comigo todas as alegrias e problemas relacionados ao desenvolvimento desta dissertação, mesmo que por vezes não compreendessem o que estava acontecendo. Pelo apoio, pelo valoroso investimento na minha educação e amor imenso.

Ao meu grande amor Mauricio, meu maior incentivador, meu apoio e minha fortaleza. Obrigada por tudo, do apoio às críticas, pela confiança depositada em mim e por seu amor incondicional. Você esteve ali o tempo todo. Eu te amo muito!

À todos e a todas, meu sincero obrigada!

*“O valor do homem é determinado, em primeira linha,
pelo grau e pelo sentido em que se libertou do seu ego”.*

Albert Einstein

Resumo

O aumento na incidência de radiação ultravioleta-B, como consequência da depleção da camada de ozônio, tem ampliado o interesse sobre os efeitos desta faixa do espectro solar sobre as comunidades de macroalgas marinhas. Estudos previamente realizados têm comprovado a sensibilidade dos estágios iniciais do desenvolvimento das algas frente à radiação ultravioleta-B. *Gelidium floridanum* é uma macroalga vermelha produtora de ágar, encontrada na região do mesolitoral inferior dos costões rochosos e, por isso, frequentemente exposta à radiação UV-B. Com o objetivo de investigar os efeitos da radiação UV-B sobre tetrásporos e plântulas de *G. floridanum*, foram realizados em laboratório uma série de experimentos onde foram estabelecidos dois grupos: controle (PAR) e tratado (PAR+UV-B). Ambos os grupos foram cultivados sob fotoperíodo de 12h, temperatura de 24°C, irradiância PAR de $\pm 80 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e salinidade de 35ups. O meio no qual as amostras foram cultivadas foi composto de água do mar esterilizada e filtrada, enriquecida com solução von Stosch (4mL.L^{-1}). Além disto, as amostras tratadas foram submetidas a $0,12 \text{ W.m}^{-2}$ de radiação UV-B artificial, 2h por dia, ao longo de 15 dias. A avaliação das amostras foi realizada a cada 3 dias, após a exposição, visando acompanhar os efeitos da radiação UV-B sobre o processo germinativo. Os parâmetros avaliados tidos como marcadores de efeito da RUV-B, sobre o processo germinativo, foram: a taxa de crescimento, razão comprimento/largura (C/L) e a frequência de tipos morfológicos ao longo do tempo. Os efeitos também foram observados sob microscopia de luz e eletrônica de transmissão visando identificar alterações na organização celular e sub-celular. Comparativamente ao controle, as plântulas irradiadas apresentaram a taxa de crescimento potencialmente reduzida e alteração da razão C/L com nítido atraso do processo germinativo. Com relação às alterações morfológicas, foram observadas torções do talo, perda na pigmentação, formação de várias células apicais, alterações no direcionamento do crescimento do talo e a formação de regiões de expansão da parede celular. As principais alterações ultraestruturais foram especialmente relacionadas ao aparato fotossintético, com danos à estrutura dos tilacóides, aumento no número de plastoglobulos e formação de vesículas no estroma. Outras alterações como redução do número de corpos de Golgi, espessamento da parede celular, vacuolização citoplasmática e aumento do número de grãos de amido acumulados foram observadas nas amostras irradiadas. Estas observações forneceram evidências experimentais indicando que os estágios iniciais de desenvolvimento de *G. floridanum* são bastante sensíveis à radiação UV-B, com potenciais danos ao crescimento e à diferenciação do talo.

Palavras chaves: *Gelidium floridanum*, germinação de tetrásporos, radiação UV-B, ultraestrutura.

Abstract

Increasing in UV-B radiation incidence on Earth surface as a consequence of ozone layer depletion has enhanced the interest on the effects of this band of the solar spectrum over seaweed communities. Previous studies have verified the great sensitivity of algal early developmental stages against UV-B radiation. *Gelidium floridanum* is an agar-producing red macroalga of the lower mesolittoral region and frequently exposed to UV-B radiation. To investigate the effects of RUV-B on *G. floridanum* tetraspores and sporelings laboratory experiments were performed with two established groups: control (PAR) and treated (PAR+UV-B). Tetraspores and sporelings of both groups were cultivated under a 12h photoperiod, 24°C temperature, PAR irradiance at $\pm 80 \mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and 34 psu salinity. Culture media used were von Stoch enriched seawater (4mL.L^{-1}). In addition, the treated samples were submitted to a $0,12 \text{ W.m}^{-2}$ artificial UV-B radiation dose, 2h per day, over 15 days. Samples were assessed every 3 days after exposure, in order to monitor the UV-B radiation impairment on the germination process. The parameters analyzed taken as markers of the UV-B radiation effects on germination were: growth rate, length/width ratio (L/W) and the frequency of morphological types over time. Also, light and transmission electron microscopy were observed to identify changes in the cellular and subcellular structure. Compared to control irradiated sporelings showed a potentially reduced growth rate and changes in the L/W ratio with pronounced delay of the germination process. With respect to morphological changes were observed thallus deformation, loss of pigmentation, formation of several apical cells, changes in the thallus growth orientation and the formation of expansions from the cell wall. The main ultrastructural changes were especially related to the photosynthetic apparatus, with damage to the structure of thylakoids, increase in the plastoblobuli number and size and vesicles formation in the stroma. Other changes such as reducing the number of Golgi bodies, cell wall thickening, cytoplasm vacuolation and increased number of starch grains were observed in irradiated samples. These observations provide experimental evidences that clearly showed the great susceptibility of the initial developmental stages of *G. floridanum* to RUV-B, with potential damage to growth and thallus differentiation.

Key-words: *Gelidium floridanum*, tetraspores germination, ultrastructure, UV-B radiation.

Lista de tabelas

Tabela 3.1. Comparação entre as plântulas em desenvolvimento dos tratamentos 1) PAR (controle) e 2) PAR+UV-B (tratado), avaliadas através de medidas de comprimento do eixo maior, ao longo de 15 dias.

Tabela 3.2. Análise unifatorial de variância dos dados de crescimento do eixo maior das plântulas de *G. floridanum*, ao longo de 15 dias de crescimento (3, 6, 9, 12 e 15 dias), para o controle (PAR) e para o tratado (PAR+UV-B)

Tabela 3.3. Resultado da análise de variância de dois fatores (Fator 1: Dia; Fator 2: Tratamento) em relação a razão C/L ao longo de 15 dias.

Lista de figuras

Figura 1.1. Espécime e ciclo de vida de *Gelidium floridanum*.

Figura 2.1. Local de coleta do material algal e a espécie *Gelidium floridanum* no ambiente natural.

Figura 2.2. Ambiente de experimentação e detalhes da lâmpada utilizada.

Figura 2.3. Curva espectral fornecida pela Lâmpada Vilber Lourmat, modelo VL-6LM, para RUV-B.

Figura 2.4. Imagens geradas pelo programa do termovisor.

Figura 2.5. Sequência de procedimentos utilizados para a obtenção tradicional dos tetrásporos de *Gelidium floridanum*.

Figura 2.6. Estrutura utilizada para adquirir o espalhamento dos tetrásporos recém liberados.

Figura 3.1. Etapas do processo germinativo dos tetrásporos de *Gelidium floridanum* ao longo de 15 dias.

Figura 3.2. Morfologia externa de plântulas de *Gelidium floridanum* após exposição aos tratamentos (controle: PAR e tratado: PAR+UV-B), por 3 dias, observadas sob microscopia de luz.

Figura 3.3. Morfologia externa de plântulas de *Gelidium floridanum* após exposição aos tratamentos (controle: PAR e tratado: PAR+UV-B), por 6 dias, observadas sob microscopia de luz.

Figura 3.4. Morfologia externa de plântulas de *Gelidium floridanum* após exposição aos tratamentos (controle: PAR e tratado: PAR+UV-B), por 9 dias, observadas sob microscopia de luz.

Figura 3.5. Morfologia externa de plântulas de *Gelidium floridanum* após exposição aos tratamentos (controle: PAR e tratado: PAR+UV-B), por 12 dias, observadas sob microscopia de luz.

Figura 3.6. Morfologia externa de plântulas de *Gelidium floridanum* após exposição aos tratamentos (controle: PAR e tratadas: PAR+UV-B), por 15 dias, observadas sob microscopia de luz.

Figura 3.7. Detalhes das alterações encontradas nas plântulas de *Gelidium floridanum* expostas à radiação UV-B, ao final de 15 dias.

Figura 3.8. Esquema geral representando o gradiente de maturação do conteúdo de organelas e, conseqüentemente da concentração de grãos de amido, ao longo do talo diferenciado em região apical, mediana e basal.

Figura 3.9. Plântulas de *Gelidium floridanum* do controle (PAR) com 3 dias.

Figura 3.10. Plântulas de *Gelidium floridanum* expostos à PAR+UV-B ao longo de 3 dias.

Figura 3.11. Plântulas de *Gelidium floridanum* do controle (PAR) com 6 dias.

Figura 3.12. Tetrásporos germinados de *Gelidium floridanum* expostos à PAR+UV-B ao longo de 6 dias.

Figura 3.13. Plântulas de *Gelidium floridanum* do controle (PAR) com 9 dias.

Figura 3.14. Plântulas de *Gelidium floridanum* expostas à PAR+UV-B ao longo de 9 dias.

Figura 3.15. Plântulas de *Gelidium floridanum* do controle (PAR) com 12 dias.

Figura 3.16. Plântulas de *Gelidium floridanum* expostas à PAR+UV-B ao longo de 12 dias.

Figura 3.17. Plântulas de *Gelidium floridanum* do controle (PAR) com 15 dias.

Figura 3.18. Plântulas de *Gelidium floridanum* expostas à PAR+UV-B ao longo de 15 dias.

Figura 3.19. Plântulas de *Gelidium floridanum* expostas à PAR+UV-B ao longo de 15 dias.

Figura 3.20. Desenvolvimento das plântulas de *G. floridanum* sob condições de controle (PAR) e exposição à radiação UV-B (PAR+UV-B), ao longo de 15 dias.

Figura 3.21. Razão C/L das plântulas de *Gelidium floridanum* expostas à PAR e PAR+UV-B, ao longo de 15 dias .

Figura 3.22. Frequência de tipos morfológicos encontrados ao longo do tempo, em ambos os tratamentos: A) controle (PAR) e B) exposto (PAR+UV-B).

Figura 3.23. Taxa de crescimento apresentada por tetrásporos e plântulas de *Gelidium floridanum* de ambos os tratamentos (PAR e PAR+UV-B), ao longo de 15 dias.

Lista de abreviaturas e siglas

A	amido
C	cloroplasto
ca	célula apical
CI	conexão intercelular
Cr	cristal de proteína
G	corpos de Golgi
GM	plântula com corpo multicelular contendo célula apical
GL	plântulas apresentando talo ereto
GT	plântula com tubo germinativo formado
M (estatística)	tetrásporo morto
M (microscopia)	mitocôndria
MAAs	aminoácidos tipo micosporina
MG	plântula germinada morta
MET	microscopia eletrônica de transmissão
ML	microscopia de luz
N	núcleo
Nu	nucléolo
P	plastoglóbulo (s)
PAB	PAR+UVA+UVB
PAR	radiação fotossinteticamente ativa
PCe	parede celular externa
PCi	parede celular interna
r	células de rizóide
RER	retículo endoplasmático rugoso
RUV	radiação ultravioleta
UV-A	radiação ultravioleta A
UV-B	radiação ultravioleta B
UV-C	radiação ultravioleta C
V	vacúolo
ve	vesículas de Golgi

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Importância das macroalgas.....	1
1.2. <i>Gelidium floridanum</i> W.R. Taylor (1943).....	3
1.3. Camada de ozônio, radiação ultravioleta-B (RUV-B) e a influência da RUV-B sobre as diferentes fases do ciclo de vida das macroalgas.....	8
1.3.1 A camada de ozônio e a RUV-B.....	8
1.3.2 Efeitos da radiação UV-B sobre as macroalgas.....	10
1.4. Justificativa do estudo.....	16
1.5. Objetivos.....	19
1.5.1 Objetivo Geral.....	19
1.5.2 Objetivos Específicos.....	19
2. Material e Métodos	20
2.1. Características do local onde as amostras foram coletadas.....	20
2.1.1 Procedimentos no laboratório.....	22
2.2. Condições gerais de cultivo.....	22
2.3. Obtenção dos esporos.....	25
2.3.1 Procedimento tradicional.....	25
2.3.2 Procedimento via espalhamento.....	26
2.4. Análises quantitativas.....	28
2.3.3 Frequência dos tipos morfológicos do padrão germinativo.....	29
2.3.4 Taxa de Crescimento (TC) e razão comprimento/largura (C/L).....	29
2.3.5 Análises estatísticas.....	30
2.5. Observação da morfologia externa através da microscopia de luz (ML).....	30
2.6. Observação da estrutura sub-celular (Ultraestrutura) das plântulas através da microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	31
3. Resultados	33
3.1. Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a morfologia e o desenvolvimento do padrão germinativo analisados sob microscopia de luz.....	33
3.2. Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a ultraestrutura, analisada sob microscopia eletrônica de transmissão.....	40
3.3. Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre o crescimento em comprimento do talo.....	62

3.4. Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a razão comprimento/largura (C/L) do talo	64
3.5. Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre o processo germinativo.....	66
3.6. Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a taxa de crescimento ao longo do tempo	68
4. Discussão	69
5. Considerações finais e perspectivas futuras	80
6. Referências bibliográficas	82

1. Introdução

Macroalgas, *Gelidium floridanum*, camada de ozônio e a radiação UV-B

1.1. Importância das macroalgas

Constituem a maior biomassa de produtores nos costões rochosos e ecossistemas costeiros. Como produtores primários estão na base de toda a cadeia alimentar, incorporando, juntamente com o fitoplâncton, aproximadamente 50% do CO₂ atmosférico (sozinhas contribuem com cerca de 5% do total da produção primária marinha). São ainda berçário e abrigo para esporos, ovos, larvas e diversos grupos animais, evitam mudanças bruscas na concentração de nutrientes na coluna de água e estabilizam os sedimentos (Franklin e Foster, 1997; Lipeert *et al.*, 2001; Martínez, 2004; Häder *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas, grande importância econômica tem sido atribuída às macroalgas marinhas em virtude da produção e deposição de ficocolóides em sua parede celular, tais como ácidos alginicos (algas pardas), agaranas e carragenanas (algas vermelhas). Nas algas, os ficocolóides promovem flexibilidade, crescimento e proteção (McHugh, 2003). Para as indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica, estes são utilizados principalmente por suas propriedades estabilizantes, gelificantes e espessantes. Além destes, são conhecidos também os compostos com ação antioxidante, antibacteriana e antifúngica (Anggadiredja *et al.*, 1997; Hudson *et al.*, 1999). Apresentam, ainda, grande importância na Aquicultura, na dieta humana e de cultivos animais (Marín *et al.*, 2002).

O presente trabalho estudou, dentre os grupos de macroalgas marinhas, as Rhodophyta, macroalgas vermelhas. Em termos de biodiversidade, constituem o maior

grupo de macroalgas com ocorrência em ambientes marinhos, estimado em até 6.000 espécies. No litoral brasileiro o número de espécies tende a ser maior do que o número de espécies de algas verdes e pardas somadas, o que é uma tendência característica de ambientes tropicais e temperados quentes (Pereira e Soares-Gomes, 2009).

Este grupo é caracterizado pela ausência completa de flagelos em todos os seus representantes e fases de vida. As paredes celulares apresentam, quase sempre, um esqueleto de celulose, caracteristicamente impregnadas de galactanas sulfatadas, as agaranas (agar-ágar) ou carragenanas, que também preenchem os espaços intercelulares. Algumas, ainda, depositam carbonatos de cálcio e de magnésio em sua parede celular (família Corallinaceae). Como reserva, acumula um tipo de polissacarídeo denominado amido das florídeas, encontrado livre no citoplasma e, na maioria das vezes, composto apenas por amilopectina e geralmente encontrado em proximidade com o núcleo (Pueschel, 1990). Os cloroplastos apresentam formas discóides ou de fita e são numerosos. Os tilacóides não formam grana, são paralelos e isolados. Possuem clorofila *a*. Os pigmentos acessórios (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina) estão dispostos em grânulos chamados ficobilissomos e encontram-se aderidos à superfície dos tilacóides. Via de regra, são macroscópicas e filamentosas. Predominam no ambiente marinho, são bentônicas e apresentam ciclo de vida bi e trifásico. A importância econômica do grupo é grande, destacando-se sua utilização industrial e na alimentação (Oliveira, 2003). Podem existir ao longo de uma ampla faixa de irradiância luminosa, porém muitas espécies crescem a relativamente baixos níveis de luminosidade. Exceções a isto são algumas algas intertidais, as quais podem sobreviver sob luz solar intensa (Gantt, 1990).

Dentre as algas vermelhas esta dissertação destaca o gênero *Gelidium*. Por apresentar tão significativa importância econômica, principalmente devido a produção de ágar, informações básicas sobre a biologia e a influência de fatores ambientais sobre a reprodução e o crescimento de espécies deste gênero, e espécies próximas, estão sob investigação para proporcionar suporte principalmente no que diz respeito ao pleno manuseio dos bancos naturais e no domínio e estabelecimento de cultivos de massa deste grupo (Gómez e Figueroa, 1998; Gómez *et al.*, 2001).

Em decorrência da colheita intensiva do gênero, tem crescido consideravelmente o interesse de ecofisiologistas de macroalgas em desenvolverem investigações acerca dos mananciais, dos processos demográficos das populações naturais, crescimento e relações de biomassa, aspectos de absorção de nutrientes e sobre o metabolismo fotossintético

(Gómez *et al.*, 2001), as quais têm contribuído significativamente com o conhecimento básico da biologia deste importante gênero. Aqui, encontram-se inseridos também, os estudos sobre as respostas fisiológicas frente à crescente exposição à radiação solar e, em especial, à radiação ultravioleta-B (Gómez e Figueroa, 1998; Gómez *et al.*, 2001; Lee e Shiu, 2009).

1.2. *Gelidium floridanum* W.R. Taylor (1943)

Segundo Santelices (1991) aproximadamente 100 espécies de *Gelidium* tem sido descritas e muitas são amplamente distribuídas em águas temperadas e tropicais. Várias são conspícuas em comunidades intertidais e subtidais e algumas se tornaram localmente dominantes por causa de seu tamanho, densidade, cobertura ou biomassa. Cerca de 10 espécies são consumidas diretamente por comunidades indígenas; em torno de 20 têm sido registradas serem predadas por peixes e outros invertebrados; e, aproximadamente 50 espécies são utilizadas doméstica e industrialmente na produção de ágar e agarose.

É um gênero que ocorre desde a faixa intertidal a profundidades subtidais, de águas frias a, principalmente, quentes e tropicais em todo o mundo. Geograficamente, é o gênero mais difundido dentro das Gelidiaceae. Aparentemente é ausente no Ártico e em águas subantárticas. Ainda, em sua maioria, os bancos de maior acumulação de biomassa encontram-se preferencialmente em águas temperadas (10 a 25°C), enquanto em águas tropicais e subtropicais é registrada maior riqueza de formas e espécies (Santelices, 1991).

Muitos são os esforços na tentativa de estabelecer o cultivo do gênero *Gelidium* no mundo inteiro devido ao grande valor de seus polissacarídeos. O gênero *Gelidium* é constituído por espécies agarófitas, produzindo o ágar de melhor qualidade. É fonte preferida de ágar bacteriológico e agarose, amplamente utilizados em aplicações industriais, tecnológicas e de pesquisa. Ao mesmo tempo, este interesse é suportado no fato de que as populações naturais são relativamente frágeis e sofrem com as flutuações cíclicas advindas da extração (Armisen, 1991; Rojas *et al.*, 1996). Atualmente, toda a colheita comercial deste gênero é realizada de populações naturais (Santelices, 1991). Segundo Friedlander (2008), ainda hoje não existe nenhum cultivo comercial de Gelidiales. Grandes quantidades são colhidas de bancos naturais em diversos países, como Espanha, Portugal,

Marrocos, Canadá, Indonésia, México, Japão, Coréia, Chile, entre outros (McHugh, 2003; Friedlander, 2008).

Correa *et al.* (1985), estudando o gênero no Chile, discorreram sobre a importância do estabelecimento do cultivo de *Gelidium* a partir dos esporos, sugerindo ser a alternativa mais viável, uma vez que o cultivo do talo adulto é ainda mais dispendioso de tempo, de trabalho intensivo e custo, apresentando baixas taxas de crescimento. Fei e Huang (1991) enfatizaram ainda que para o cultivo baseado em esporos, a coleta de pouca quantidade de ramos férteis não esgotaria ou afetaria as reservas naturais. Para tanto, é necessário compreender a ação dos fatores ambientais que afetam o crescimento dos esporos, como um primeiro passo para definir ótimas condições de cultura.

No Brasil, *G. floridanum* Taylor (1943) foi registrado para os estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, segundo dados disponibilizados no site brasileiro Algae Maris Brasilis. Espécies de *Gelidium* diferem em características morfofuncionais ocupando, por isso, diferentes habitats na faixa intertidal dos costões rochosos (Gómez e Figueroa, 1998). As populações de *G. floridanum* estudadas para o Brasil, crescem próximo ao limite inferior da região entre marés, restringindo-se a uma pequena amplitude vertical de aproximadamente 0,5 m, nos costões rochosos, sendo frequentemente expostas ao ar, dessecação e alta irradiância, em períodos de maré baixa (Paula *et al.*, 1988). Em Santa Catarina essa espécie encontra-se distribuída desde os municípios de Itajaí até Laguna. Apresenta maior desenvolvimento na primavera, com picos de liberação de tetrásporos nos meses de setembro e novembro, quando é maior e menos ramificada. Cresce em pequenos tufos, com eixo principal evidente, apresentando coloração vermelho-violácea (Fig. 1.1A-B). O talo pode atingir 1,5mm de largura e 5 a 15 cm de altura. Como apressório apresenta um conjunto de eixos cilíndricos, os rizóides. Os ramos eretos são achatados e a célula apical é saliente na depressão (Cordeiro-Marino, 1978).

Possui ciclo de vida trifásico e isomórfico. As três fases do ciclo de vida: i) gametófito(n), ii) carposporófito (2n) e iii) tetrasporófito (2n) e a indistinção da morfologia externa entre o gametófito e o esporófito, o caracterizam como ciclo do tipo *Polysiphonia* (Santelices, 1988). O gametófito masculino haplóide libera gametas (espermácios) sem flagelo que irão fertilizar o carpogônio, o qual após ser fecundado, permanece aderido ao gametófito feminino haplóide. Cada carpogônio contém uma tricogine. Esta estrutura tem a função de receber o espermácio. Quando um carpogônio é fertilizado por um espermácio, o

desenvolvimento deste caracteriza a fase intermediária diplóide do ciclo, conhecida como carposporofítica. Esta fase desenvolve-se fixa sobre o gametófito feminino, como uma estrutura denominada cistocarpo. O tecido externo do cistocarpo, o pericarpo, é haplóide enquanto que o tecido interno do carposporófito é diplóide. O carposporófito maduro libera carpósporos diplóides aflagelados que, ao fixarem ao substrato, se estabelecem e desenvolvem em tetrasporófitos diplóides. Estes são sempre mais abundantes na natureza quando comparados com os gametófitos (Santelices, 1988). Estes tetrasporófitos sofrem meioses em suas áreas reprodutivas, denominadas tetrasporângios, para originar tetrásporos haplóides do tipo cruciado. Quando estes tetrásporos se fixam em um substrato, cada esporo se desenvolve para formar um novo gametófito feminino ou masculino, reiniciando o ciclo (Fig. 1.1C).

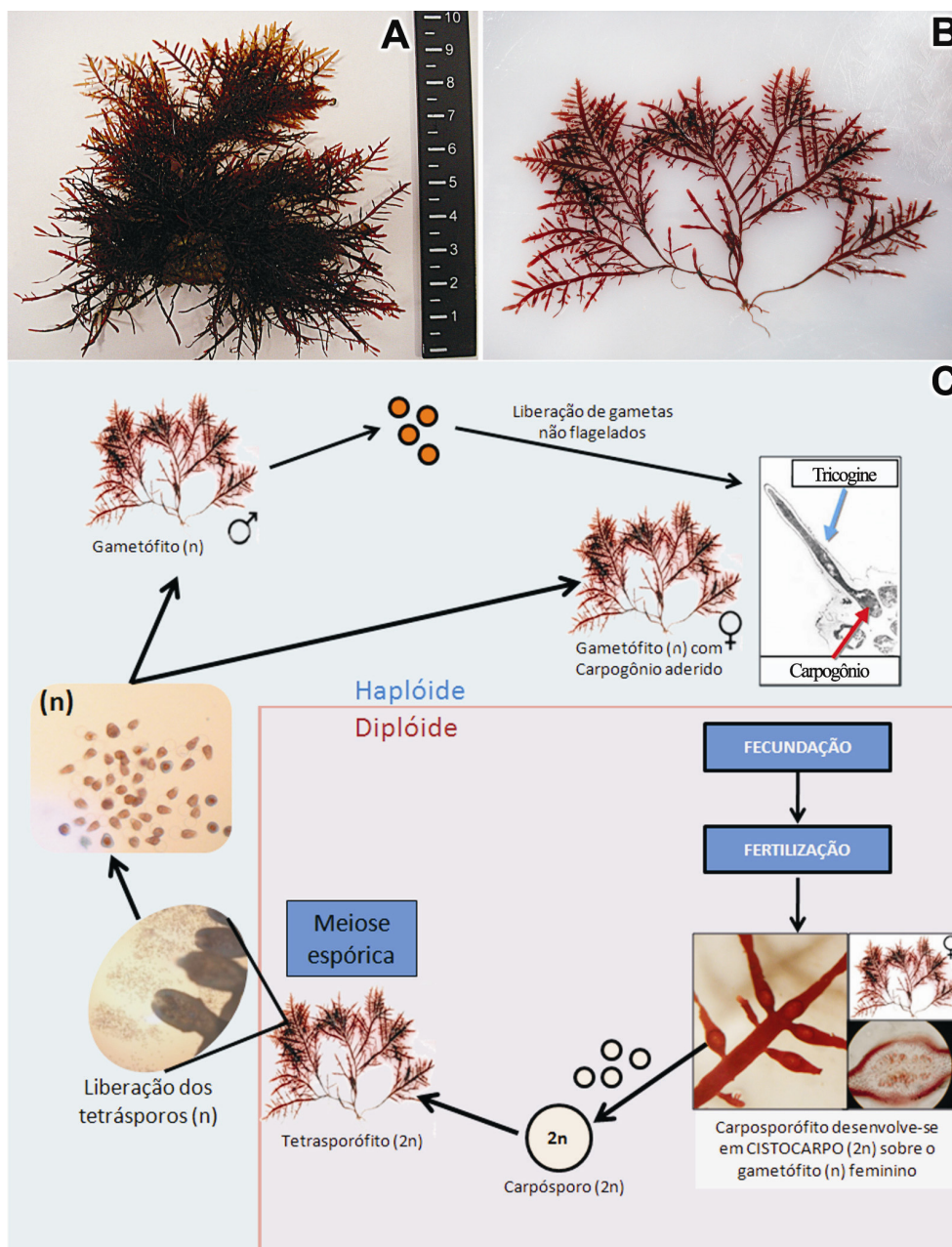


Figura 1.1: Espécime e ciclo de vida de *Gelidium floridanum*. A) Aspecto geral do talo como é encontrado na natureza, em tufos aglomerados. B) Talo individualizado. C) Esquema do ciclo de vida trifásico.

Nas algas os esporos são unidades de dispersão e fixação. A estabilização da fixação da planta adulta depende da adesão do esporo ao substrato. Desta forma, os esporos são uma ligação entre as fases do ciclo de vida das macroalgas, através do recrutamento de novos indivíduos e no estabelecimento de novas populações (Fletcher e Callow, 1992; Apple e Harlin, 1994; Rodrigo e Robaina, 1997).

A germinação dos tetrásporos é do tipo “*Gelidium*” (Ouriques, 2002). Os tetrásporos livres são esféricos, medindo entre 19 e 30µm de diâmetro. Possuem coloração

vermelha evidenciando a presença de vários cloroplastos. Quando liberados, não possuem parede celular, apresentando-se envoltos por uma matriz mucilaginosa, a qual provavelmente é a responsável pela rápida adesão do esporo ao substrato. Logo após a adesão, porém antes do início da germinação, uma fina camada de parede celular é observada separando a membrana plasmática e a mucilagem. Depois de estabelecido no substrato, o tetráspero inicia uma sequência de mudanças na morfologia celular. Inicialmente, o esporo sofre uma desorganização polarizada da parede celular, a qual permite a expansão celular, possibilitando a rápida formação de uma protuberância, denominada tubo germinativo. O conteúdo citoplasmático, presente no esporo inicial é, então, transferido para esta região. Ao mesmo tempo, uma fina camada de parede celular é sintetizada envolta do tubo. Em seguida, há a formação de um septo, o qual separa o esporo inicial do tubo. O esporo inicial permanece com um conteúdo hialino e ligado ao corpo da plântula em desenvolvimento por meio de uma conexão intercelular visível em microscopia eletrônica de transmissão. O tubo germinativo inicia uma série de sucessivas divisões celulares, primeiramente oblíquas e, depois em vários planos. Na sua região distal há a emissão de uma célula rizoidal, a qual dará origem ao rizóide ou ao sistema de rizóides. A partir da fixação do rizóide ao substrato a região oposta origina a parte ereta da plântula. (Chihara e Kamura, 1963; Oliveira e Paula, 1974; Ouriques, 2002; Bouzon *et al.*, 2005, 2006). O termo plântula, assim como apresentado por Oliveira e Paula (1974), é utilizado com o mesmo significado que se atribui a “sporeling” e, refere-se aos estágios posteriores à formação do septo que separa o tubo germinativo do esporo inicial.

1.3. Camada de ozônio, radiação ultravioleta-B (RUV-B) e a influência da RUV-B sobre as diferentes fases do ciclo de vida das macroalgas

1.3.1 A camada de ozônio e a RUV-B

O ozônio (O_3) compõe a atmosfera em quantidades mínimas concentrando-se principalmente na estratosfera, entre 15 a 25 km acima da superfície terrestre. Do equilíbrio entre produção e perda de moléculas de ozônio, resulta a concentração do ozônio em estado estacionário, ao que se denomina camada de ozônio ou ozonosfera, ou seja, uma faixa da atmosfera onde a concentração deste gás é elevada em relação ao resto da atmosfera. É o gás atmosférico mais importante quando se fala em radiação UV-B, pois tem a importante função de filtrar os raios solares de energia nesta faixa do espectro, os mais danosos para os organismos vivos (Kirchhoff, 1995; Salgado, 2000). Esta relação foi comprovada já em 1880 por meio de experimentos em laboratório e com a luz solar (Whitehead *et al.*, 2000). É um gás muito reativo e pode interagir com muitas substâncias químicas. A diminuição (adelgaçamento) da camada de ozônio, além de aumentar a incidência da radiação UV-B, também provoca impactos consideráveis sobre toda a química atmosférica. As principais substâncias que danificam a camada de ozônio são compostas por clorofluorcarbonetos (CFCs), muito utilizadas pela sociedade moderna principalmente em aparelhos de refrigeração e ar condicionado, aerossóis, espuma na fabricação de plásticos e outros. A principal forma de ação é através da molécula de cloro que reage rapidamente com o ozônio e com o oxigênio atômico, indisponibilizando-os (Kirchhoff, 1995).

Após as descobertas, na década de 70, do fenômeno do buraco de ozônio, dos estudos relacionando a ação de compostos clorofluorcarbonados com a destruição da ozonosfera e das consequências desta destruição para a saúde humana e o meio ambiente, foi instituído, em 1987, o Protocolo de Montreal sobre substâncias que destroem a camada de ozônio. Este estipula regras para a produção e o consumo de substâncias que destroem o ozônio na estratosfera. Desde que entrou em vigor em 1989 já foi revisado sete vezes. O Brasil é um dos 150 países integrantes e, há duas décadas, vem cumprindo rigorosamente e até antecipando obrigações assumidas junto ao protocolo, segundo site brasileiro sobre o

Protocolo de Montreal e site do Centro Internacional de rede de informações sobre Ciência da Terra (CIESIN – sigla em inglês).

A camada de ozônio apresenta variações geográficas e temporais importantes. Usualmente, tem-se os maiores valores para a coluna de ozônio em altas latitudes e os menores valores sendo observados nas regiões tropicais. As principais variações temporais estão baseadas na estação do ano, a qual é mais pronunciada em altas latitudes e pela hora do dia (Diaz *et al.*, 2006). A quantidade de ozônio é medida em Unidades Dobson (DU). Uma coluna de ozônio considerada normal, na ausência do fenômeno do buraco de ozônio, seria igual a 300 DU, a qual corresponde a 3mm de ozônio puro a uma atmosfera de pressão a 0°C. A mais dramática expressão da diminuição na espessura desta camada é o fenômeno do buraco de ozônio antártico, ou seja, o desaparecimento de mais da metade da camada de ozônio sobre o pólo Sul, toda a primavera (Björn, 2007).

Com a descoberta da diminuição dos níveis de ozônio durante a primavera antártica, na década de 80, o estudo sobre a variabilidade da quantidade de radiação ultravioleta-B que alcança a superfície da Terra tornou-se uma questão de grande interesse para a comunidade científica atmosférica (meteorologistas), biólogos, físicos e epidemiologistas estudando o efeito desta radiação sobre os diferentes ambientes, organismos e sobre a saúde humana (Frederick e Snell, 1988; Diaz *et al.*, 2006). Muitos estudos também vêm sendo realizados no Ártico, uma vez que existe uma potencial perda de ozônio sobre esta região, a qual de igual forma está aumentando com o passar dos anos (Whitehead *et al.*, 2000; Wiencke *et al.*, 2004).

A radiação solar é a principal fonte de energia na maioria dos ecossistemas naturais. Entretanto, a exposição a altos níveis dessa radiação pode ser prejudicial aos seres vivos (Häder *et al.*, 1998, 2007). A radiação ultravioleta é a faixa do espectro solar compreendida entre 100 e 400nm (10^{-9}). Esta, por sua vez, é subdividida em três faixas: UV-A, entre 400 e 320nm, UV-B, entre 320 e 280nm e, UV-C, entre 280 e 100nm. A radiação RUV-A atinge a superfície terrestre sem ser absorvida eficientemente por nenhum constituinte atmosférico. Estudos relatam benefícios, mas também perturbações à saúde causada pela RUV-A. No entanto, a degradação da camada de ozônio em nada interferirá na sua intensidade ao longo do tempo. Da mesma forma, a radiação UV-C é totalmente absorvida na atmosfera terrestre. Por outro lado, como já citado, a RUV-B é fortemente filtrada pela camada de ozônio. (Kirchhoff, 1995; Santee *et al.*, 1995; Kirchhoff *et al.*, 1996, 2000; Rousseaux *et al.*, 1999). Estima-se que reduções de 1% no ozônio total causariam um

aumento de 1,2% na radiação UV biologicamente ativa (UV-B, 280-320 nm) (Kirchhoff *et al.*, 2000).

A América do Sul é uma região de particular interesse para este tipo de estudo em virtude da sua proximidade com o buraco na camada de ozônio da Antártica. Durante a primavera, quando a área do buraco de ozônio aumenta, a extremidade sul da América do Sul está frequentemente sob a influência do fenômeno do buraco de ozônio. Esta área é mais afetada pela depleção dos níveis de ozônio do que qualquer outra região e poucos estudos têm investigado este fenômeno em detalhes. O sul do Brasil, de forma semelhante a outros locais em latitudes médias e altas nos hemisférios norte e sul, têm sido exposto a um gradual incremento nos níveis de radiação ultravioleta-B (Diaz *et al.*, 2006).

Uma série de fatores influencia no alcance da radiação UV-B na superfície da Terra: distância entre a Terra e o sol, o ozônio total, os níveis de gases atmosféricos e aerossóis, ângulo de Zênite solar, cobertura de nuvens, altitude, latitude, superfície de albedo, comprimento do dia, estação do ano, condições atmosféricas locais e outros (Diaz *et al.*, 2006). No ambiente marinho, os principais fatores que atenuam a penetração da radiação UV na coluna de água são as propriedades ópticas do corpo d'água e a quantidade de matéria orgânica dissolvida, as quais promovem dois processos físicos de atenuação: absorção e espalhamento (Whitehead *et al.*, 2000; Tedetti e Sempère, 2006).

1.3.2 Efeitos da radiação UV-B sobre as macroalgas

O comportamento (desempenho) das espécies de macroalgas frente à variação de fatores ambientais como a temperatura, salinidade e a qualidade e intensidade luminosa, é considerado básico para explicar a ocorrência, a distribuição e a época do ano de preferencial ocorrência da reprodução das diferentes espécies, regidas pelas condições de sobrevivência das formas reprodutivas e, desta forma, na frequência das espécies e na consequente manutenção das populações adultas (Soeder e Stengel, 1974; Santelices, 1977; Druehl, 1981; Yokoya, 1989; Lobban e Harrison, 1994; Talarico e Maranzana, 2000; Tala *et al.*, 2007).

A radiação UV é um fator ecológico significativo no ambiente marinho (Häder *et al.*, 2007). Muitos estudos têm sido direcionados para elucidar as consequências para as

macroalgas marinhas e os ecossistemas costeiros (Franklin e Forster, 1997; Bischof *et al.*, 2002a). A RUV solar penetra a profundidades significativas nos sistemas aquáticos atingindo desde produtores a consumidores. Os principais fatores que influenciam na profundidade de penetração da radiação são a espessura da camada de ozônio e as mudanças climáticas, principalmente em relação ao aumento da temperatura, que, por sua vez, diminui a quantidade de matéria orgânica dissolvida na coluna de água aumentando a penetração da RUV (Häder *et al.*, 2007). Vários estudos destacam que os efeitos da radiação UV-B sobre as comunidades de macroalgas podem ser registrados a profundidades de 10-30m (Häder *et al.*, 1998; Talarico e Maranzana, 2000; Roleda *et al.*, 2006).

A radiação ultravioleta-B é considerada a mais danosa parte da faixa da radiação UV que alcança a superfície terrestre, devido ao seu pequeno comprimento de onda e alta energia, de modo que é absorvida diretamente por biomoléculas. A energia contida num fóton é inversamente proporcional ao comprimento de onda, podendo ser suficiente para quebrar ligações químicas. O processo relacionado aos efeitos biológicos da radiação UV é iniciado com a absorção fotoquímica por parte de biomoléculas importantes, tais como ácidos nucleicos, lipídios, aminoácidos, clorofilas e carotenóides (Vass, 1997).

Esta faixa da radiação ultravioleta influencia negativamente não apenas as algas, mas uma ampla faixa dos sistemas biológicos, desde humanos até plantas terrestres, peixes, fitoplâncton, zooplâncton e bactérias (Häder *et al.*, 1998; Tedetti e Sempère, 2006). Os impactos sobre os organismos são variados e a sensibilidade a esta radiação varia enormemente entre os organismos. Os efeitos podem ser perceptíveis em moléculas, células, indivíduos, comunidades e, mesmo, em ecossistemas, afetando ainda ciclos biogeoquímicos importantes (Zepp *et al.*, 1998; Björn, 2007; Häder *et al.*, 2007).

Mesmo na ausência da depleção da camada de ozônio, a radiação UV-B constitui um estressor para as macroalgas (Häder *et al.*, 2007). Os altos níveis de radiação UV-B podem ser especialmente danosos às algas bentônicas da região entre marés, pois estas, ao contrário das espécies fitoplanctônicas, ficam expostas à radiação por períodos prolongados durante as horas de maré baixa, por estarem fixas e restritas ao seu local de crescimento (Franklin e Forster, 1997). O risco da ocorrência de efeitos prejudiciais aumenta quando as algas recebem níveis elevados de radiação UV-B nos meses de primavera-verão na Antártica e parte da América do Sul (Cabrera *et al.*, 1995). As macroalgas são estressadas pela radiação UV em uma extensão a qual é geneticamente

determinada e resulta em uma pronunciada estratificação vertical (Gómez e Figueroa, 1998; Johansson e Snoeijs, 2002; Wiencke *et al.*, 2006).

Os efeitos da RUV-B dizem respeito, principalmente, a fotossíntese, morfologia, danos ao DNA, metabolismo de nitrogênio e taxa de crescimento (revisado por Franklin e Forster, 1997 e Bischoff *et al.*, 2002a). A fotossíntese é potencialmente afetada e de múltiplas maneiras. Os efeitos principais dizem respeito à fotoinibição do fotossistema II (com danos a componentes chave como a proteína D1 ou a enzima Rubisco) (Vass, 1997; Bischoff *et al.*, 2002b) e à degradação de pigmentos fotossintéticos (acessórios e da clorofila) (Dring *et al.*, 1996; Bischoff *et al.*, 1998b, 2000, 2002b). Nas algas vermelhas, as ficobiliproteínas são as mais sensíveis (Sinha *et al.*, 2003). Também, devido a redução da expressão de genes envolvidos na fotossíntese (Bischoff *et al.*, 2002b), a deformação da estrutura dos tilacóides (Holzinger *et al.*, 2004, 2006) e a degradação das enzimas envolvidas na fixação do CO₂ e na formação do açúcar (Bischoff *et al.*, 2002b; Poppe *et al.*, 2003). Aguilera *et al.* (2002) também mostraram efeitos indiretos através do estresse oxidativo.

Investigações laboratoriais têm revelado múltiplos alvos moleculares para a radiação UV, incluindo ácidos nucleicos (Vincent e Neale, 2000; Franklin e Forster, 1997), proteínas fotossinteticamente relevantes (Vass, 1997) e lipídios de membrana (Murphy, 1983). Segundo van de Poll *et al.* (2001), dímeros de ciclobutano-pirimidina (CPDs) são formados dentro do DNA, bloqueando as polimerases de DNA e RNA e conseqüentemente inibindo a replicação e expressão do genoma. Os lipídios mais vulneráveis são aqueles com ácidos graxos insaturados. Estes podem facilmente ser peroxidados pela ação de radicais de oxigênio, produzidos pela irradiação UV, prejudicando a estabilidade das membranas (Kramer *et al.*, 1991).

As mudanças sazonais na RUV e na radiação visível ao longo das estações resulta na sucessão das espécies ao longo do ano nas comunidades macrobênticas (Lotze *et al.*, 2002). A radiação UV interfere diferentemente em cada fase do ciclo de vida das macroalgas (Dring *et al.*, 1996). As fases iniciais de desenvolvimento (tetrásporos, carpósporos, gametas, zoósporos, zigotos) das algas, assim como dos demais organismos, são as mais susceptíveis a estresses do ambiente (Wiencke *et al.*, 2006, Roleda *et al.*, 2007). Em anfíbios, os ovos, assim como gametas e esporos de algas vermelhas, são liberados nus no ambiente aquático, ou seja, sem uma capa protetora. Estudos têm sugerido que o aumento dos níveis de radiação UV seria a principal causa do declínio das

populações em várias partes do mundo (Schoenwaelder *et al.*, 2003). As fases iniciais são o elo entre as diferentes fases do ciclo de vida. A sobrevivência e o crescimento destes estágios é que determinará o recrutamento, os limites da distribuição vertical dos estágios adultos, a manutenção das espécies e, conseqüentemente, da produtividade. É, portanto, crucial, a plena adaptação fisiológica dos estágios iniciais às condições ambientais vigentes. Wiencke *et al.* (2000, 2004) mostraram claramente a relação que existe entre a sensibilidade à RUV e a distribuição em profundidade para espécies de algas pardas. Segundo os autores as diferenças de sensibilidade apresentadas pelos esporos são comparáveis às diferentes tolerâncias da fotossíntese, em talos adultos, de espécies crescendo em diferentes profundidades, também encontrado por Dring *et al.* (1996) e Bischof *et al.* (1998a). Por isto, é de grande relevância avaliar os efeitos deste aumento nos níveis de radiação ultravioleta especialmente sobre a reprodução e crescimento, particularmente nas espécies intertidais (Schoenwaelder *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2007; Roleda *et al.*, 2007).

Qualquer tipo de estresse que influencie a biologia das espécies pode exercer efeitos mais evidentes sobre seus estágios iniciais de desenvolvimento. É conhecida a maior sensibilidade dos esporos e f iniciais aos efeitos deletérios da radiação UV. Esta se justifica devido ao tamanho reduzido, simplicidade estrutural, baixa pigmentação e a estreita secção transversal. Estas características proporcionam uma potencial facilidade de alcance de moléculas alvo como o DNA, com conseqüências para a viabilidade, mobilidade, capacidade de germinação e divisão nuclear (Tala *et al.*, 2007), como tem sido mostrado para zoósporos de várias algas pardas (Dring *et al.*, 1996; Wiencke *et al.*, 2000), Ulvales unicelulares (Cordi *et al.*, 2001), estágios iniciais de vida de Gigartinales (Roleda *et al.*, 2004; Mansilla *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2009; Zacher *et al.*, 2009), conchósporos de *Porphyra* (Jiang *et al.*, 2007) e esporos de *Gracilaria* (Ferreira, 2008).

Atualmente, o maior número de trabalhos com estágios reprodutivos de macroalgas referem-se a zoósporos de algas pardas. Os principais trabalhos mostraram redução na mobilidade dos esporos de *L. saccharina* (Makarov e Voskoboinikov, 2001) e na fototaxia dos zoósporos de *Scytosiphon lomentaria* e *Petalonia fascia* (Flores-Moya *et al.*, 2002) e, a existência de danos aos microtúbulos e, conseqüentemente, a inibição da divisão nuclear e da translocação dos núcleos em zoósporos de *Macrocystis pyrifera* (Huovinen *et al.*, 2000). Outros trabalhos evidenciaram a perda da viabilidade de zoósporos de *Laminaria digitata* relacionada a destruição do DNA e a fotodestruição do aparato fotossintético (Wiencke *et*

al., 2000), a inibição da germinação de *Laminaria solidungula*, e a sua severa redução para *L. digitata* e *L. saccharina*, com visível perda de pigmentação e mesmo desintegração dos esporos germinando. Os zoósporos de *Sarccorhiza dermatodea* e *Alaria esculenta*, no entanto, foram tidos como mais tolerantes. Para todas as espécies citadas, os fisóides, vesículas acumuladoras de florotaninas, aumentaram de tamanho e em abundância sob exposição à radiação. Para *S. dermatodea* a aparência dos fisóides mudou drasticamente para amarelo brilhante (Wiencke *et al.*, 2004). Este estudo comprovou que dentre as espécies estudadas, os esporos das espécies de águas rasas são mais tolerantes comparada às espécies do médio para baixo subtidal. Ainda, que existe uma considerável recuperação dos zoósporos depois de excluída a exposição à radiação e, que o aumento dos fisóides realmente contribui para a proteção contra a RUV-B.

São várias também as formas de defesa na tentativa de sobreviver à exposição às elevadas doses de RUV-B. Entre elas, estratégias reprodutivas para evitar a exposição, tais como sazonalidade na reprodução e periodicidade diária na liberação de esporos (Amsler e Neushul, 1989), sincronizando a produção e a liberação com condições ambientais favoráveis. A liberação de gametas no início da manhã ou ao entardecer pode minimizar os efeitos da exposição, no entanto, é difícil coincidir esta com o ciclo de marés diário (Schoenwaelder *et al.*, 2003). A fuga para longe da fonte estressora (alguns dinoflagelados podem nadar para camadas mais profundas durante as horas do dia de maior intensidade de radiação ultravioleta) também é uma forma de evitar a exposição.

A produção de compostos, intra ou extracelularmente, que absorvem a radiação UV, tem sido amplamente observada para diferentes organismos. Estes podem ser depositados próximo às superfícies mais expostas do corpo, ou mesmo, liberados na coluna de água, de forma que a penetração da radiação é prevenida ou minimizada. Diferentes organismos produzem diferentes tipos de substâncias. Exemplos destes compostos são os aminoácidos do tipo micosporina (MAAs), produzidos pelas rodófitas e algumas cianobactérias. Roleda *et al.* (2008) mostraram pela primeira vez a presença destes compostos para estágios unicelulares (tetrásporos) do ciclo de vida de algas vermelhas. Compostos fenólicos, particularmente flavonóides e antocianinas, são encontrados em plantas superiores, assim como compostos fenólicos armazenados dentro de fisóides, como florotaninas, em algas pardas (Schoenwaelder *et al.*, 2003; Roleda *et al.*, 2006; Björn, 2007). A melanina é outro composto encontrado na pele de vertebrados aquáticos ou na cutícula do zooplâncton. São diversas também as formas de reparo dos danos ao DNA

nuclear ou plastidial, incluindo fotoreativação (reparo induzido pela luz), reparo por excisão de nucleotídeos ou bases e reparo via recombinação (Roy, 2000). Ainda, formas de reparo de enzimas (Schoenwaelder *et al.*, 2003) e, mesmo a apoptose (morte celular programada) pode ser uma forma de enfrentar danos induzidos pela radiação UV-B (Holzinger e Lütz, 2006).

Nas macroalgas os elementos do citoesqueleto estão diretamente envolvidos nos mecanismos de germinação dos esporos. As proteínas do citoesqueleto das células de plantas são possíveis alvos da radiação UV, dentre essas, as tubulinas podem ser as mais sensíveis (Zaremba *et al.*, 1984). Entretanto, apesar do intenso esforço de pesquisa sobre vários aspectos da estrutura e ultra-estrutura dos esporos liberados e germinados em alguns grupos de algas vermelhas (Pueschel e Cole, 1985; Apple *et al.*, 1996; Ouriques e Bouzon, 2003, 2005; Bouzon *et al.*, 2006; Bouzon e Ouriques, 2007), poucos são os estudos encontrados na literatura visando observar os possíveis alvos e danos sobre a morfologia celular e sub-celular das macroalgas após a exposição a radiação ultravioleta (Poppe *et al.*, 2002, 2003).

De acordo com esta explanação, até o momento foi possível encontrar na literatura apenas um trabalho abrangendo a abordagem ultraestrutural de esporos e plântulas após o estresse da radiação UV (Steinhoff *et al.*, 2008). Por outro lado, tem aumentado o número de pesquisas com talos adultos. Os principais efeitos já citados dizem respeito a alterações nas membranas (ondulações, desintegração) e dilatação do lúmen dos tilacóides, alterações no envelope dos cloroplastos, acumulação de plastoglóbulos (reservas de lipídios), formação de vesículas a partir dos tilacóides, diminuição da presença de pirenóides, produção de amidos irregulares, danos às mitocôndrias (maiores e irregulares, com possíveis danos ao ciclo de fosforilação e a respiração celular), formação de vacúolos com volume aumentado e espessamento de parede celular (Meindl e Lütz, 1996; Lutz *et al.*, 1997; Poppe *et al.*, 2002, 2003; Holzinger *et al.*, 2004, 2006; Schmidt *et al.*, 2009; Tian e Yu, 2009).

Por fim, dentre os trabalhos que privilegiam o gênero *Gelidium*, Gómez e Figueroa (1998) mostraram que diferentes espécies de *Gelidium* (*Gelidium latifolium* e *Gelidium sesquipedale*) de regiões distintas da zona entre-marés, possuem sensibilidades diferentes para enfrentar a radiação UV solar. Estes autores monitoraram a resposta fisiológica frente à radiação através da fluorescência modulada da clorofila. Gómez *et al.* (2001) estudaram a regulação do aparato fotossintético durante o estresse por radiação UV (fotoinibição) e

temperatura e a subsequente recuperação de *Gelidium pulchellum*. Lee e Shiu (2009) estudaram a produção de MAAs e defesas antioxidantes de espécies de *Gelidium* e *Pterocladia*. Também, Santos (2009) realizou um trabalho, paralelo a esta dissertação, expondo plântulas de oito dias de *Gelidium floridanum* à radiação UV-B. Este verificou nítida redução no crescimento das plântulas irradiadas quando comparadas às plântulas controle. Em adição, por meio de análises histoquímicas, observou o espessamento de parede celular e desigualdade na distribuição dos grãos de amido ao longo do talo.

1.4. Justificativa do estudo

O presente trabalho traz uma abordagem teórica e experimental sobre os efeitos da radiação ultravioleta-B sobre o processo germinativo da macroalga vermelha *Gelidium floridanum*. A motivação para o desenvolvimento deste estudo recai sobre a importância ecológica e econômica desta espécie nativa, na reconhecida escassez de pesquisas sobre as fases iniciais do desenvolvimento das macroalgas vermelhas (estágios reconhecidamente mais sensíveis a este tipo de radiação) e, à oportunidade de contribuir dentro desta área do conhecimento, proporcionando suporte a trabalhos futuros.

Dentre as tantas mudanças climáticas pelas quais o planeta passa o aumento da exposição à radiação ultravioleta do tipo B, como consequência da depleção da camada de ozônio, tem se destacado e é de grande interesse científico e social. Esta faixa da radiação UV interfere negativamente senão sobre todas, sobre a grande maioria de diferentes formas de vida no planeta. É uma problemática mundial que apresenta hoje tendências desastrosas se continuar se intensificando. Acrescido a ela, o aumento na temperatura mundial, de ambientes terrestres e, principalmente aquáticos, sabidamente potencializa os efeitos danosos da radiação ultravioleta sobre a vida (Häder *et al.*, 2007).

A radiação UV-B é vilã quando se fala em câncer de pele humana, um dos maiores problemas de saúde pública atual (Lucas *et al.*, 2006). Esta mesma radiação interfere sobre diferentes organismos (bactérias, fungos, animais e vegetais), ecossistemas, ambientes (terrestre e aquático) e, mesmo, ciclos biogeoquímicos (Madronich *et al.*, 1998; Zepp *et al.*, 1998). O ser humano se utiliza desses mesmos organismos, ecossistemas, ambientes e

ciclos biogeoquímicos para a sua própria sobrevivência. A relação entre eles determina o equilíbrio do planeta.

As algas, por sua vez, juntamente com as plantas e, conhecidamente em maior proporção, contribuem para este equilíbrio essencialmente através da produção de oxigênio, da fixação do gás carbônico, sendo a base da cadeia alimentar no ambiente aquático, servindo de berçário para diferentes espécies animais, vegetais e algais, entre outros (Franklin e Foster, 1997; Lipeert *et al.*, 2001; Martínez, 2004; Häder *et al.*, 2007).

Além de toda a sua relevância ecológica, é fonte de alimento para o próprio ser humano; fonte de matéria-prima para a indústria cosmética, assim como para diversas áreas da medicina (relevância na saúde pública); fonte de renda (relevância econômica e social) por sua utilização nos mais diversos ramos industriais, movimentando, desta forma, milhões de dólares por ano na economia mundial (Anggadiredja *et al.*, 1997; Hudson *et al.*, 1999; Marín *et al.*, 2002; McHugh, 2003).

Perante tudo isso é evidente a importância dos temas aqui propostos, a radiação ultravioleta e as algas. Os efeitos da radiação têm sido amplamente estudados desde a descoberta do adelgaçamento da camada de ozônio na década de 70 (Diaz *et al.*, 2006). A espécie em questão neste trabalho também reforça a relevância deste por apresentar importância econômica como produtora de ágar, pela sua distribuição na região intertidal, pela dificuldade de seu manuseio no estabelecimento de cultivos viáveis, por ser uma espécie nativa, pela localização geográfica em que se encontra versus o alcance da radiação UV, pela escassez de trabalhos com esta, assim como sobre o processo germinativo (Cordeiro-Marino, 1978; Correa *et al.*, 1985; Armisen, 1991; Santelices, 1991; Gómez e Figueroa, 1998; Gómez *et al.*, 2001).

A germinação por sua vez, é o momento crucial que dita sobre o futuro da população e como a espécie estará apta a sobreviver. A viabilidade dos esporos, tal como no talo adulto, é guiada por suas capacidades de responder à variação dos diferentes fatores, como a luz, salinidade e temperatura (Fletcher e Callow, 1992; Apple e Harlin, 1994; Rodrigo e Robaina, 1997). Neste caso, é mais particular ainda a resposta dos esporos de macroalgas vermelhas aos fatores ambientais, uma vez que estes não dispõem de flagelos para se movimentarem agilmente para longe da fonte estressora.

A maioria dos estudos considera apenas o indivíduo adulto e não esporos e plântulas, ou mesmo o processo germinativo. Segundo Altamirano *et al.* (2003b), conclusões obtidas com estágios macroscópicos não devem ser extrapoladas para estágios

microscópicos. Informações sobre os efeitos da radiação UV-B sobre a sobrevivência e o desenvolvimento dos esporos das algas vermelhas, em específico, são ainda escassos e, por isso, bastante necessários, o que justifica o estudo dos processos de germinação de *Gelidium floridanum*, para o qual não existe registro de estudos realizados com radiação UV. Wiencke *et al.* (2004) mostraram ainda a relação que existe entre a sensibilidade à RUV e a distribuição em profundidade das algas.

Ressalta-se que para o presente estudo se utilizou de talos tetráspóricos e analisou o desenvolvimento de tetrásporos e plântulas (gametófitos jovens). A escolha por tetrásporos justifica-se na facilidade em encontrar tetrásporófitos férteis na natureza. É comum ao gênero *Gelidium* a dominância da fase tetrásporofítica em relação às fases gametofíticas e carposporofíticas, independente da latitude e das condições ambientais. As explicações para a dominância de fase, no entanto, são bastante contraditórias, mesmo intraespecificamente e, podem estar relacionadas à ploidia, taxa de produção de esporos, taxa de fertilização, adaptações fisiológicas fase-específicas, taxa e capacidade de crescimento vegetativo de eixos prostrados ou de fragmentos de frondes re-aderidas (recrutamento assexuado), reprodução sexual e recrutamento de esporos, entre outros (Carmona e Santos, 2006; Roleda *et al.*, 2008).

Por apresentar tão significativa importância econômica, informações básicas sobre a biologia e a influência de fatores ambientais sobre a reprodução e o crescimento de espécies de *Gelidium* e espécies próximas, estão sob investigação para proporcionar suporte principalmente no que diz respeito ao pleno manuseio dos bancos naturais e no domínio e estabelecimento de cultivos de massa deste grupo (Gómez e Figueroa, 1998; Gómez *et al.*, 2001;). Durante a extensa revisão bibliográfica realizada neste trabalho não foram encontrados outros estudos com radiação UV-B para *Gelidium floridanum*. Quando se trata da influência da radiação sobre o processo germinativo, não foram registrados trabalhos com nenhuma espécie deste gênero.

O presente trabalho, desta forma, ampliará os conhecimentos na área de germinação de esporos das algas vermelhas de importância econômica e fornecerá informações adicionais sobre os efeitos deletérios da radiação UV nos processos naturais de germinação de esporos.

A hipótese sugerida é a de que a radiação UV-B interage de forma negativa no processo germinativo dos tetrásporos de *G. floridanum*, causando significativas alterações morfofisiológicas.

1.5. Objetivos

1.5.1 Objetivo Geral

Aprofundar os conhecimentos em germinação de esporos das algas vermelhas, principalmente das espécies que possuem importância econômica, avaliando as possíveis alterações induzidas pela exposição à radiação UV-B sobre as diferentes etapas do processo germinativo de *Gelidium floridanum*, através da análise quantitativa, morfológica e ultraestrutural.

1.5.2 Objetivos Específicos

- 1) Avaliar quantitativamente os efeitos da radiação ultravioleta-B na viabilidade e taxa de crescimento das plântulas, ao longo do processo germinativo.
- 2) Verificar os possíveis efeitos biológicos da radiação ultravioleta na morfologia celular e sub-celular durante os processos de germinação de esporos e desenvolvimento das plântulas.

2. Material e Métodos

Metodologias de avaliação da influência da radiação UV-B sobre o processo germinativo

2.1. Características do local onde as amostras foram coletadas

Talos tetrasporofíticos de *Gelidium floridanum* foram coletados na Praia de Ponta do Sambaqui localizada na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina, Florianópolis, (27°29'18,8"S e 48°32'12,9"W) (Fig. 2.1A e B). A profundidade média neste local é de 2,5 a 3,5 metros, com uma área de aproximadamente de 14,17 hectares e volume de água de 425.100 m³. Caracteriza-se como uma praia de águas moderadas e areia grossa, composta em grande parte por fragmentos de conchas, apresentando uma circulação intermediária, com vento norte predominante e sedimento areno-lodoso. A temperatura média anual da água do mar é de 22°C (Besen, 2005).

O costão rochoso da Praia de Ponta do Sambaqui é caracterizado por uma formação de rochas isoladas (Fig. 2.1C). As populações de *G. floridanum* crescem próximo ao limite inferior da região entre marés, restringindo-se a uma amplitude vertical de cerca de 0,5m. Formam pequenas aglomerações, constituídas por espécimes mais ou menos isolados ou formando faixas de cobertura contínua ou irregular (Figura 2.1D). Sob regime de maré alta, todas as rochas visualizadas ficam submersas. Em maré baixa *Gelidium* fica completamente exposto à radiação ultravioleta (Fig. 2.1E).

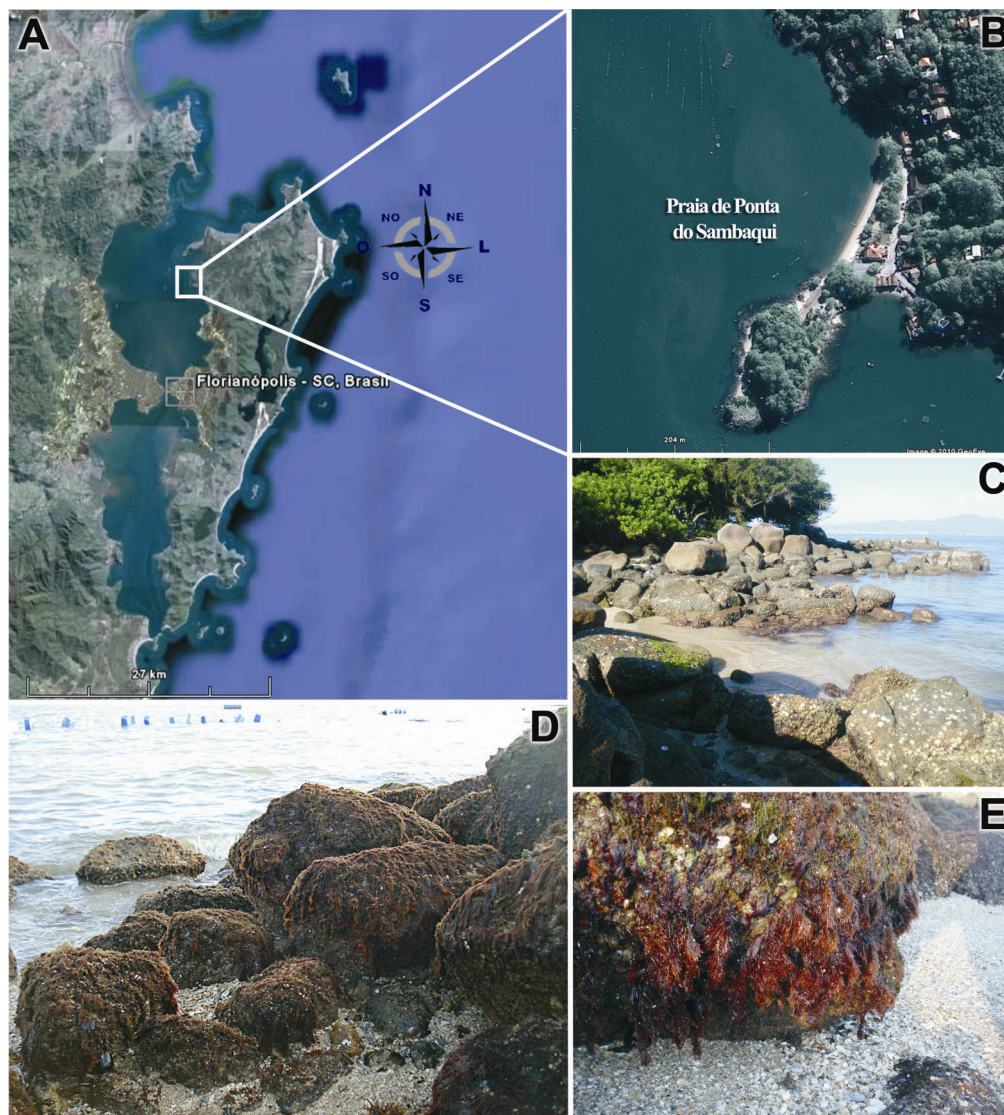


Figura. 2.1. Local de coleta do material algal e a espécie *Gelidium floridanum* no ambiente natural. A-B) Localização geográfica da Praia da Ponta do Sambaqui, Florianópolis-SC (fonte: Google Terra). C) Vista geral do costão rochoso. D) Distribuição da espécie ao longo do costão rochoso em maré baixa. E) Detalhe da espécie totalmente exposta.

As coletas foram realizadas manualmente durante os períodos de marés baixas, na região entremarés. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos contendo um pouco de água e transportadas para o Laboratório de Algas Marinhas – LAMAR, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Não foram observadas interferências nos resultados devido ao horário (fotoperíodo) ou nível da maré ao realizar a coleta do material.

2.1.1 Procedimentos no laboratório

No laboratório as plantas mais vigorosas e aparentemente livres de epífitas foram selecionadas e lavadas em água do mar esterilizada e filtrada, na intenção de remover os detritos e demais organismos contaminantes que poderiam afetar as culturas subsequentes.

2.2. Condições gerais de cultivo

Os experimentos foram realizados em sala de cultura, com condições controladas de temperatura ($24^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$), irradiância (radiação fotossinteticamente ativa – PAR) constante igual a $80\pm 10 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas do tipo “luz do dia” (Philips C-5 Super 84 16W/840, Brasil), dispostas acima dos frascos (Fig. 2.2A) e medida através de um medidor de quanta (Li-cor Light Meter 250, USA), salinidade de 35ups e sob ciclo (fotoperíodo) de 12 horas. A água do mar utilizada para os experimento foi esterilizada utilizando lâmpada UV-C 8W e filtrada utilizando filtros de 5 e 1 micrômetro. O meio de cultura foi composto por água do mar esterilizada e filtrada, e meio nutritivo Von Stoch (McLachlan, 1973) (4 mL por litro). Foi acrescido dióxido de germânio (1mg.L^{-1}), quando necessário, para evitar e controlar a proliferação de diatomáceas.

Conforme mostra a figura 2.2A e D, uma mesma prateleira foi dividida abrangendo, desta forma, ambos os ambientes experimentais: o controle (PAR - no qual é excluída a condição de exposição à RUV-B) e o tratamento (PAR + UV-B, com comprimento de onda igual a 312nm). No grupo tratado as amostras foram expostas à radiação UV-B artificial fornecida por lâmpada Vilber Lourmat modelo VL-6LM (Marne La Vallée, France) posicionada a 27,5cm de altura em relação aos frascos contendo os tetrásporos e plântulas (Fig. 2.2B). Diferente das lâmpadas usualmente mencionadas nos artigos, esta permite, através de uma chave seletora, a escolha entre: UV-B, UV-A ou nenhuma emissão. Desta forma, é descartada a necessidade da utilização de filtros para selecionar a radiação emitida (Fig. 2.2C). A figura 2.3 mostra a curva espectral fornecida pela lâmpada de UV-B. A dose utilizada nos experimentos foi de $0,12 \text{ W.m}^{-2}$, medida com radiômetro PMA 2100 (Solar Light Co., Inc, Philadelphia, USA) e sensor UV-B PMA 2102 (Solar Light Co., Inc, USA), dose esta proporcionada pelo espaço físico disponível para os

experimentos. A dose de radiação UV-B encontrada para Florianópolis foi adquirida através de medidas realizadas em campo utilizando o mesmo radiômetro, em 02 de abril de 2010. A dose aérea, dada em potência por área, para a Praia de Ponta do Sambaqui e, realizada em dia ensolarado foi igual a $0,20 \text{ W.m}^{-2}$ ao meio dia. Dados de índice ultravioleta (IUV) fornecidos pelo INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais) para o mesmo dia, igual a 8,4, e transformados para W.m^{-2} segundo Kirchhoff (1995), corroboram os dados de campo ($\pm 0,23 \text{ W.m}^{-2}$).

O tempo de exposição foi estabelecido em 2 horas por dia, coincidentes com os horários de pico de maior amplitude de exposição à radiação UV solar encontrada no ambiente natural ocorrendo, portanto, entre 11 e 13 horas. Um filtro plástico de proteção (Figura 2.2A) foi utilizado para isolar um tratamento do outro, e estes do ambiente, uma vez que a radiação UV-B é prejudicial à saúde humana, assim como aos demais experimentos que ocorrem simultaneamente na sala de cultura.

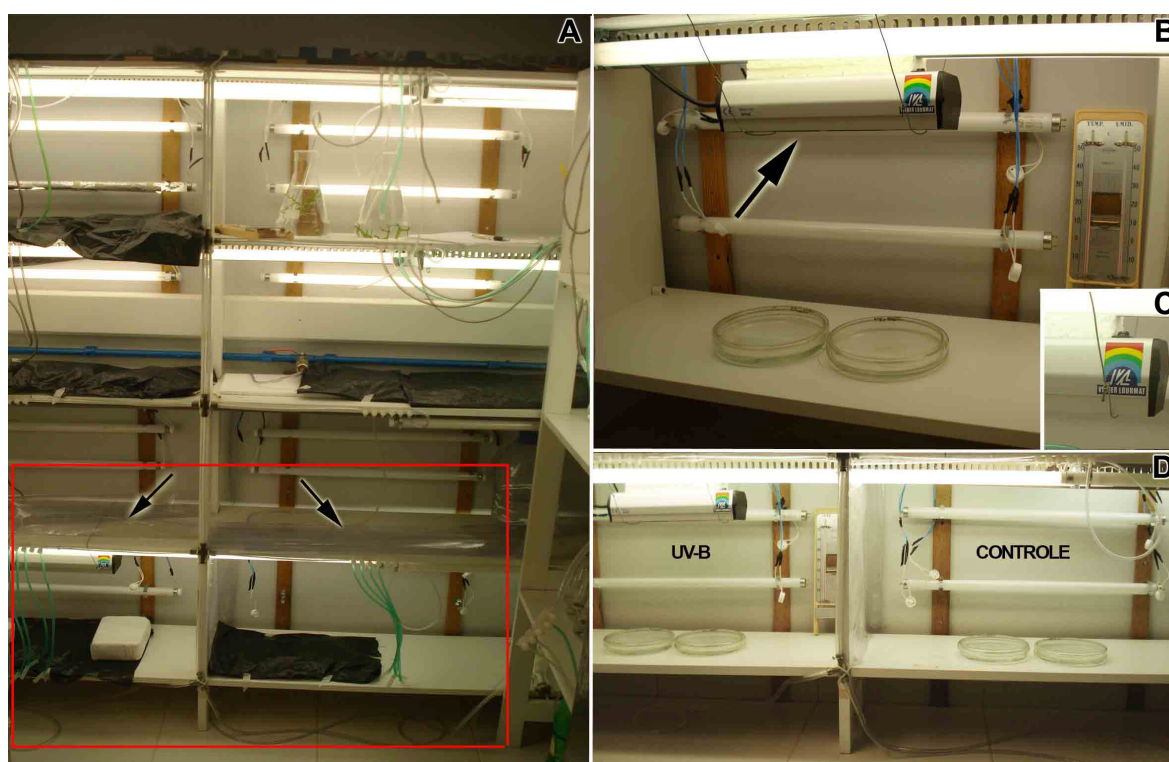


Figura 2.2. Ambiente de experimentação e detalhes da lâmpada utilizada. A) Estantes da sala de cultura: setas indicam o filtro plástico de proteção e o retângulo assinalado em vermelho na figura evidencia a prateleira onde foram realizados os experimentos. B) Lâmpada artificial de UV (seta). C) Detalhe da lâmpada mostrando a chave seletora que permite optar por UV-B ou UV-A. D) Disposição do ambiente de experimentação, mostrando o espaço destinado ao Controle e ao material tratado com UV-B.

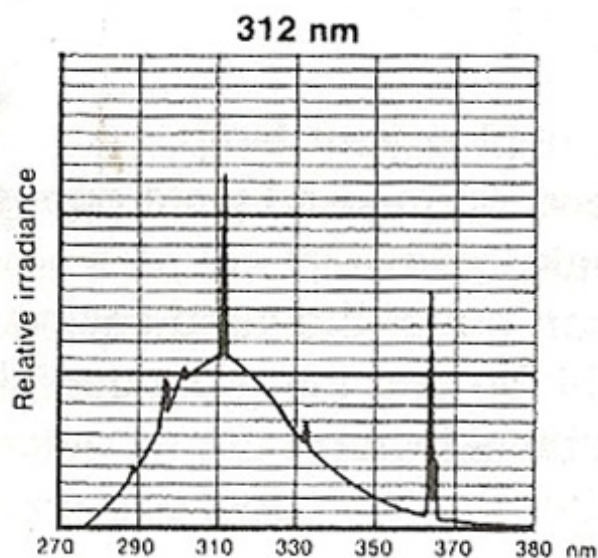


Figura 2.3. Curva espectral fornecida pela Lâmpada Vilber Lourmat, modelo VL-6LM, para RUV-B (312nm – intensidade emitida de $8\text{mW}/\text{cm}^2$) e RUV-A. Fonte: manual do fabricante – ETS Vilber Lourmat.

Durante os períodos de exposição verificou-se, com o auxílio de imagens térmicas obtidas com um termovisor (Fluke Ti-25), que a temperatura dentro das cubetas teve variação média em torno de $1,5^\circ\text{C}$, do início ao fim do período de exposição, como mostra a figura 2.4.

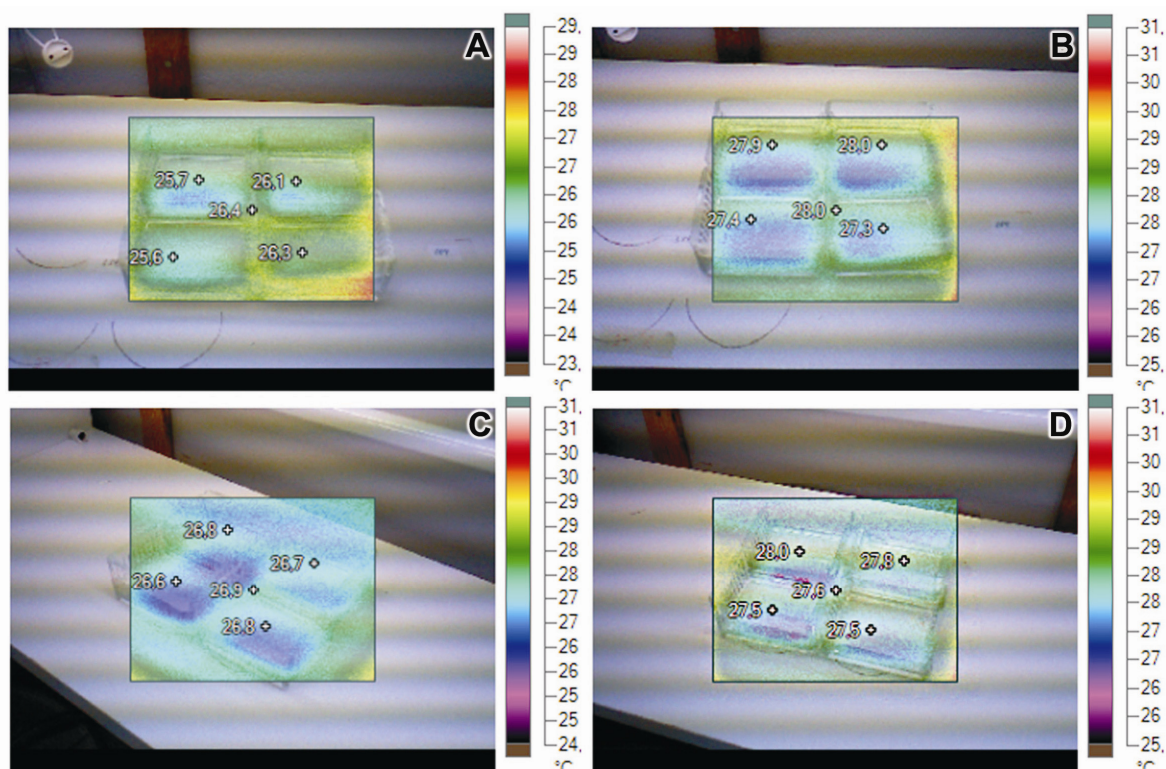


Figura 2.4. Imagens geradas pelo termovisor Fluke Ti-25. A) Controle antes da exposição. B) Controle ao término da exposição. C) Tratamento antes da exposição. D) Tratamento ao término da exposição.

Em sua maioria, as pesquisas realizadas considerando a radiação ultravioleta e as algas, expõem estas por várias horas seguidas e, logo em seguida, analisam os efeitos provocados pela radiação (curta duração) (Makarov e Voskoboinikov, 2001; Poppe *et al.*, 2003; Holzinger *et al.*, 2004; Wiencke *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2008). Por outro lado, tem aumentado o número de trabalhos que monitoram os efeitos da exposição ao longo do tempo, a um médio prazo (15-40 dias), como apresentado neste estudo (Van de Poll *et al.*, 2001, Ayres, 2009 e Schmidt *et al.*, 2009, para talos adultos e, Mansilla *et al.*, 2006, Navarro *et al.*, 2009; Santos, 2009 e Martínez, 2004, por exemplo, para fases iniciais do desenvolvimento). A dose de RUV-B utilizada nos diferentes trabalhos que analisam as fases iniciais do desenvolvimento de macroalgas está compreendida entre $0,1 - 1,2 \text{ W.m}^{-2}$.

2.3. Obtenção dos esporos

Após os procedimentos de coleta e limpeza, dois procedimentos diferenciados foram adotados: **1) tradicional**, o qual objetiva a aquisição de grande quantidade de tetrásporos, necessária para o processamento do material para as observações de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e **2) espalhamento**, que por sua vez promove uma distribuição mais espaçada dos tetrásporos, a fim de possibilitar as análises quantitativas propostas e facilitar a observação do material sob microscopia de luz. Ambos encontram-se descritos a seguir.

2.3.1 Procedimento tradicional

O processamento que leva às análises da ultraestrutura exige a disponibilidade de grande quantidade de esporos. Para tanto, esta forma de aquisição proporciona um número maior de esporos, distribuídos de maneira a formar vários grupos. Esta técnica é bem estabelecida por vários autores (Yokoya e Oliveira, 1993; Bouzon *et al.*, 2005).

Ramos férteis de talos tetráspóricos de *G. floridanum* foram limpos, isolados e dispostos sobre lâminas de vidro em placas de Petri (diâmetro igual a 13,5cm) contendo 100 mL de água do mar filtrada e esterilizada. O material foi, então, mantido no escuro

para estimular a liberação dos tetrásporos (Fig. 2.5 A-D). Segundo Pang e Lüning (2006) a luz branca inibe a liberação dos esporos. O tempo normal, geralmente observado, para a ocorrência da liberação dos esporos é de aproximadamente 12 horas (Yokoya e Oliveira, 1993; Ouriques, 2002; Bouzon *et al.*, 2005).

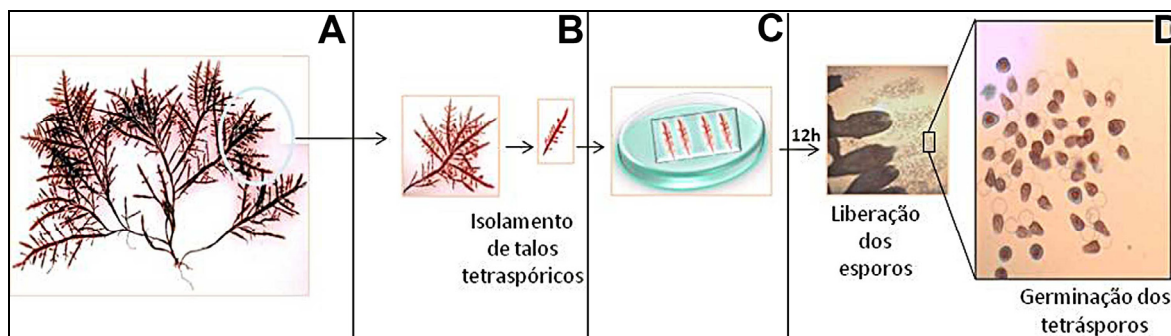


Figura 2.5. Sequência de procedimentos utilizados para a obtenção tradicional dos tetrásporos de *Gelidium floridanum*. A) Espécime vindo do campo e limpo no laboratório. B) Ramos férteis selecionados. C) Ramos férteis dispostos sobre lâminas dentro de placa de Petri contendo meio. D) Liberação dos tetrásporos.

Quando a fixação foi observada, realizou-se a retirada dos ramos. A parcela das lâminas contendo os esporos fixados foi transferida para outras placas contendo 100 mL de água do mar esterilizada e filtrada, acrescida de meio nutritivo Von Stoch para estimular o desenvolvimento.

2.3.2 Procedimento via espalhamento

Talos férteis inteiros de *G. floridanum* foram selecionados e fixados a uma haste, a qual estava presa a um motor (Fig. 2.6A). Este motor realizava movimentos circulares comandados por um programa em um computador, o qual permitiu regular a velocidade do movimento. A haste contendo os talos ficou suspensa e posicionada logo abaixo da linha d'água em um aquário (Fig. 2.6B). No fundo do aquário foi colocado um recipiente contendo várias lamínulas (20x20mm), às quais os tetrásporos liberados se aderiram (seta vermelha na Fig. 2.6A). Os talos foram mantidos em movimento constante ao longo de aproximadamente dez horas, em ambiente escuro, para promover a dispersão ao acaso e espaçada dos esporos recém liberados sobre as lamínulas. O momento da liberação dos tetrásporos foi estimado através de um experimento de liberação realizado paralelamente, à

semelhança do procedimento tradicional descrito no item anterior, o qual foi observado de duas em duas horas, seguindo metodologia descrita por Ngan e Price (1983). Observou-se que o pico de liberação dos esporos de *G. floridanum* ocorreu a partir de nove horas. Após a verificação do início da liberação, o motor foi mantido em movimento por aproximadamente uma hora, sendo posteriormente desligado. O tempo estimado para que houvesse a fixação dos tetrásporos foi de uma hora. Os esporos se depositaram sobre as lamínulas, distribuídos espaçadamente. Este procedimento, desenvolvido neste trabalho, foi importante para as análises quantitativas.

Após o espalhamento, as lamínulas com os esporos aderidos, foram aleatoriamente distribuídas em 8 cubetas de 9x7x4cm cada, 4 para controle (PAR) e 4 para tratado (PAR+UV-B) (Fig. 2.6C). Cada cubeta continha 6 lamínulas mergulhadas em 60mL de água do mar filtrada e esterilizada, enriquecida com meio nutritivo Von Stoch (4mL.L⁻¹). O volume de 60mL proporciona uma coluna de água igual ao conteúdo de 100mL em placa de Petri, utilizada para os experimentos de ultraestrutura.

Este número proporcionou um total de 4 réplicas por amostragem. As amostragens foram realizadas de 3 em 3 dias (do 1º ao 15º dia) – durante 15 dias, contadas a partir da liberação dos esporos seguida da primeira exposição. Exceto durante o período de exposição à RUV-B, os frascos contendo os tetrásporos e plântulas (placas de Petri e cubetas) permaneceram fechados (as cubetas foram fechadas com filme plástico) para evitar a evaporação do meio e, a conseqüente variação da salinidade. O meio foi renovado de 3 em 3 dias, simultaneamente a cada amostragem. Após cada exposição, foi realizado um rodízio destas cubetas, na intenção de garantir que a potência irradiada pelas lâmpadas (luz visível e radiação UV-B) atingisse de maneira homogênea todas as amostras.

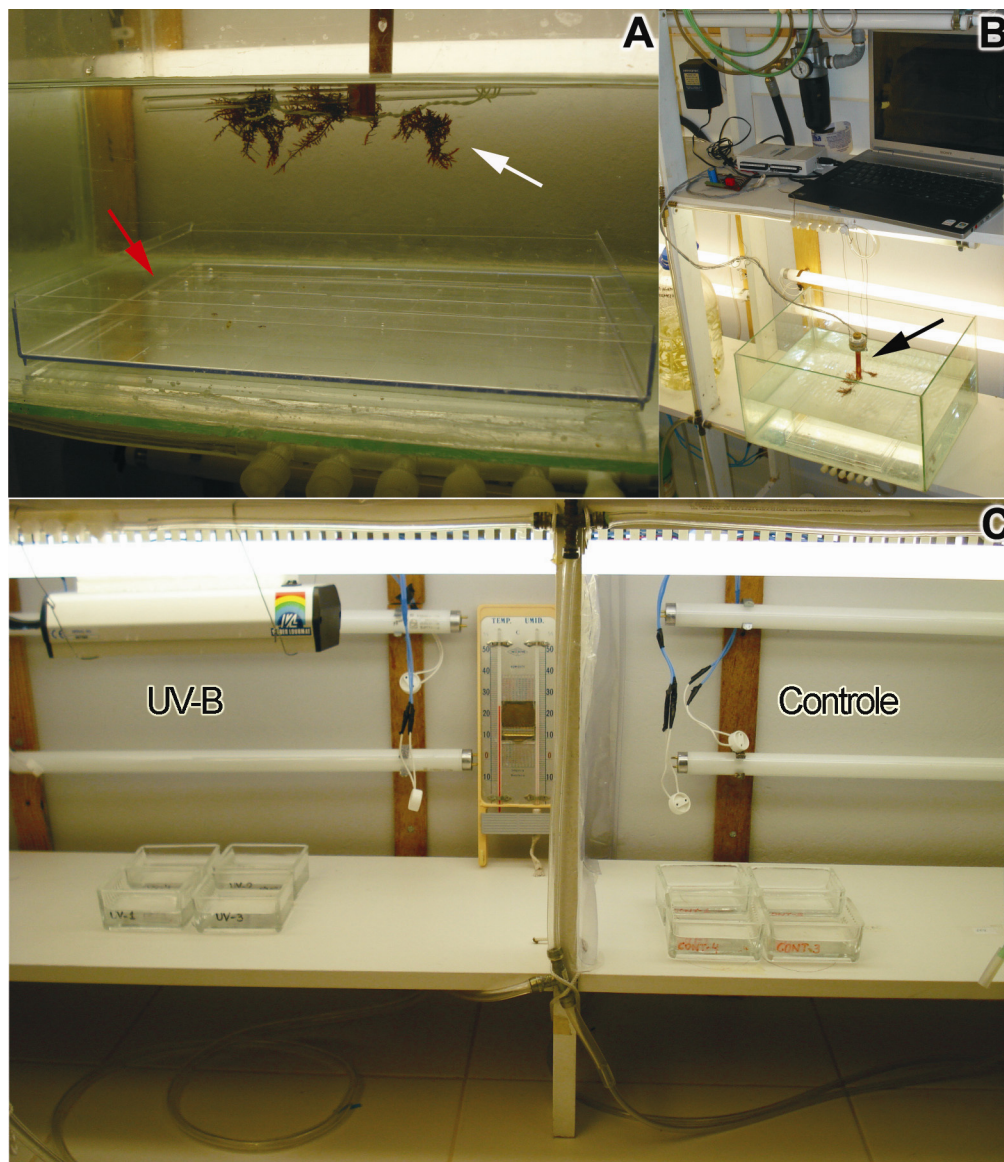


Figura 2.6. Estrutura utilizada para adquirir o espalhamento dos tetrásporos recém liberados. A) Tetrásporófitos férteis (seta branca) e recipiente contendo as lamínulas (seta vermelha). B) Motor (seta) com velocidade comandada por computador. D) Ambiente onde foram realizados os experimentos: as cubetas possuem as lamínulas com os tetrásporos aderidos.

2.4. Análises quantitativas

Análises quantitativas, realizadas por meio de contagem do número de plântulas em determinada fase do desenvolvimento, assim como a aquisição de medidas de comprimento e largura foram efetuadas com o objetivo de compreender de que forma a radiação UV-B interfere no processo germinativo de *Gelidium floridanum*.

Para tanto, em cada amostragem, uma lamínula de cada cubeta foi retirada de ambos os tratamentos, de 3 em 3 dias, disposta sobre lâmina de microscopia, fixada em paraformaldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M e mantida em câmara úmida escura a 4°C. O total de 40 amostras (5 amostragens x 2 tratamentos x 4 réplicas) foi analisado. Com o auxílio de um Contador diferencial de células Phoenix EC 2088 e um microscópio de luz modelo Leica DM500 foi realizada uma varredura da área total de cada lamínula.

2.3.3 Frequência dos tipos morfológicos do padrão germinativo

Considerando o padrão normal, foi possível categorizar o desenvolvimento nos seguintes estágios: tetrásporos mortos (**M**); plântulas mortas, porém germinadas (**MG**); plântulas apresentando tubo germinativo (**GT**) e abrangendo os diferentes graus de maturação do tubo germinativo (número de divisões celulares); plântulas com rizóide inicial ou pequeno (**GP**); plântulas com corpo multicelular e contendo célula apical (**GM**). Ainda, as plântulas apresentando talo ereto foram chamadas **GL** e caracterizadas em relação ao comprimento médio observado em cada amostragem (6, 9, 12 e 15 dias).

A contagem dos tetrásporos e plântulas foi determinada microscopicamente através do uso de microscópio Leica DM500. Para cada uma das 4 réplicas das 5 amostragens, a lamínula foi inspecionada em sua área total, com o objetivo de estabelecer a frequência (porcentagem) de esporos ou plântulas em determinada fase de desenvolvimento dentro do total de indivíduos observados ao longo do experimento.

2.3.4 Taxa de Crescimento (TC) e razão comprimento/largura (C/L)

Medidas de largura e de comprimento do eixo maior do talo das plântulas em desenvolvimento foram realizadas utilizando microscópio Leica DM500 equipado com sistema de captura de imagem (LAS EZ versão 1.6), com o objetivo de analisar a razão comprimento/largura (C/L) e a taxa de crescimento (TC). O modo de aquisição dos

tetrásporos foi do tipo espalhamento. O número de esporos analisados foi igual a 30 indivíduos de cada uma das 5 amostragens de ambos os tratamentos (PAR e PAR+UV-B).

As taxas de crescimento (TC) foram obtidas a partir da mensuração do comprimento do eixo ereto das plântulas, sem considerar o comprimento dos rizóides primários e secundários, e calculadas utilizando a equação abaixo:

$$TC = \frac{(\ln C_f - \ln C_i)}{t} * 100 \text{ (Altamirano } et al., 2003)$$

Onde, $\ln C_f$ é o logaritmo neperiano do comprimento final, $\ln C_i$, logaritmo neperiano do comprimento inicial e t o tempo. As taxas de crescimento foram medidas em $\% \cdot \text{dia}^{-1}$, segundo metodologia citada em Navarro, 2004.

2.3.5 Análises estatísticas

Os diferentes parâmetros observados foram analisados estatisticamente utilizando-se do teste “t” de Student (para a verificação do crescimento em comprimento) e da análise de variância (ANOVA) por meio do software Statística 7.0. Quando encontradas diferenças significativas, foi aplicado o teste *a posteriori* de Tukey. Todas as conclusões estão baseadas em um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) (Zar, 1999).

2.5. Observação da morfologia externa através da microscopia de luz (ML)

Possíveis alterações morfológicas foram acompanhadas sob microscopia de luz, visando caracterizar através de imagens alterações de forma, pigmentação e atrasos no desenvolvimento do processo germinativo.

Foram fotografados esporos vivos e fixados em paraformaldeído 2,5%, em microscópio de luz Leica DM500 equipado com sistema de captura de imagem (LAS EZ versão 1.6).

2.6. Observação da estrutura sub-celular (Ultraestrutura) das plântulas através da microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A análise ultraestrutural é mais uma ferramenta que permite embasar com conhecimentos sub-celulares as discussões sobre os efeitos da radiação UV-B, contribuindo para a compreensão das respostas morfológicas, fisiológicas e até moleculares. Este item, portanto, tem por objetivo observar comparativamente a ultraestrutura, sob microscopia eletrônica de transmissão, das plântulas em desenvolvimento, em ambos os tratamentos (PAR e PAR+UV-B).

Uma vez que o espaço destinado à exposição à radiação UV-B foi limitado devido a área de alcance da radiação emitida pela lâmpada, o número de placas utilizadas no experimento foi pequeno (duas placas de Petri contendo 4 lâminas, com esporos aderidos, por vez, por tratamento). Desta forma, a necessidade de dispor de grande quantidade de esporos e plântulas fez com que o experimento fosse realizado em 45 dias, onde este foi reiniciado 5 vezes. A forma de aquisição dos esporos foi tradicional.

Para cada amostragem, o material foi processado para a observação ao microscópio eletrônico de transmissão (MET), conforme descrição abaixo:

1. **Fixação:** Solução fixadora, contendo glutaraldeído 3% e sacarose 0,2M, tamponada com tampão cacodilato de sódio a 0,1 M (pH 7,2), foi colocada sobre as lâminas com os tetrásporos e plântulas aderidos. O material foi mantido em câmara úmida de 4-12h, a 4°C.
2. **Lavagens:** Foram realizadas 4 lavagens com tampão cacodilato de sódio a 0,1M (pH 7,2), com concentrações decrescentes de sacarose, 30 minutos cada. A quarta lavagem foi realizada com tampão cacodilato de sódio apenas. O procedimento foi realizado da mesma forma utilizada para a fixação.
3. **Raspagem dos esporos:** Os esporos foram removidos das lâminas através de raspagem delicada, utilizando uma lamínula e, transferidos para tubos eppendorf contendo tampão cacodilato de sódio 0,1M.
4. **Centrifugação:** A partir da raspagem dos esporos, o material foi centrifugado por 5 minutos, a 5.000-8.000 rpm, antes de cada uma das etapas de lavagem e

desidratação, a fim de formar um agrupamento dos esporos (pellet), de modo a facilitar a visualização destes, assim como o processamento e evitar a perda de material.

5. **Inclusão em ágar:** Quando necessário, devido ao tamanho reduzido e ao pequeno número de esporos e plântulas, foi realizada a inclusão do material em ágar 4%, dissolvido a 60°C em tampão cacodilato 0,1M. A solução de ágar 4% foi despejada sobre o material já centrifugado contido em eppendorf e, logo em seguida foi realizada nova centrifugação do conjunto. Seguiu-se então a polimerização do ágar à -4°C por, aproximadamente, um minuto.
6. **Pós-fixação:** Os esporos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 (1:1), durante 2-5 horas a temperatura ambiente.
7. **Lavagens:** Foram realizadas 3 lavagens, de 20 minutos cada, em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2.
8. **Desidratação:** Série gradual com concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), 30 minutos em cada etapa; a acetona 100% foi trocada três vezes.
9. **Infiltração:** Após a desidratação o material foi infiltrado com resina Spurr (Spurr, 1969), seguindo uma sequência de 7 etapas com proporções diferenciadas de acetona e resina Spurr (3A:1R; 2A:1R ; 1A:1R ; 1A:2R ; 1A:3R), visando a retirada total da acetona. Por fim, seguiram-se 2 etapas de resina Spurr pura, em vácuo. Todas de 12 horas cada.
10. **Montagem dos blocos e polimerização:** O material foi emblocado em moldes horizontais e polimerizado a 70°C, por 24h.
11. **Ultramicrotomia, contrastação, observação sob microscópio eletrônico de transmissão e aquisição das imagens:** As seções ultrafinas foram adquiridas utilizando navalha de diamante e contrastadas em acetato de uranila seguido de citrato de chumbo. Esta etapa foi realizada pela equipe técnica do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC – LCME. Posteriormente, foram observados e fotografados sob microscópio eletrônico de transmissão JEM 1011, também no LCME.

3. Resultados

Os resultados em geral permitiram constatar que a exposição à radiação UV-B provocou efeitos negativos sobre o processo germinativo dos tetrásporos haplóides de *Gelidium floridanum*.

3.1. Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a morfologia e o desenvolvimento do padrão germinativo analisados sob microscopia de luz

O processo germinativo é caracterizado por modificações na morfologia e intensa proliferação celular. O tetrásporo recém-liberado é esférico e até o segundo dia de desenvolvimento sofre sucessivas alterações na forma que são características das Gelidiales, como a polarização seguida da formação do tubo germinativo, para onde ocorre a transferência do conteúdo citoplasmático (Fig. 3.1A-D). Após a transferência deste conteúdo verifica-se a formação do septo que separa o esporo inicial do restante do talo em formação, dando início às sucessivas divisões celulares que formarão um corpo multicelular. Na porção distal deste corpo ocorre a emissão do rizóide (Fig. 3.1E-G). Com 3 dias inicia-se a formação da região apical (Fig. 3.1H) e, com 6 dias, a plântula em desenvolvimento já possui um talo ereto longo e fusiforme com célula apical evidente (Fig. 3.1I). Com 9, 12 e 15 dias a plântula incrementa ainda mais o crescimento em comprimento do talo ereto (Fig. 3.1J-M).

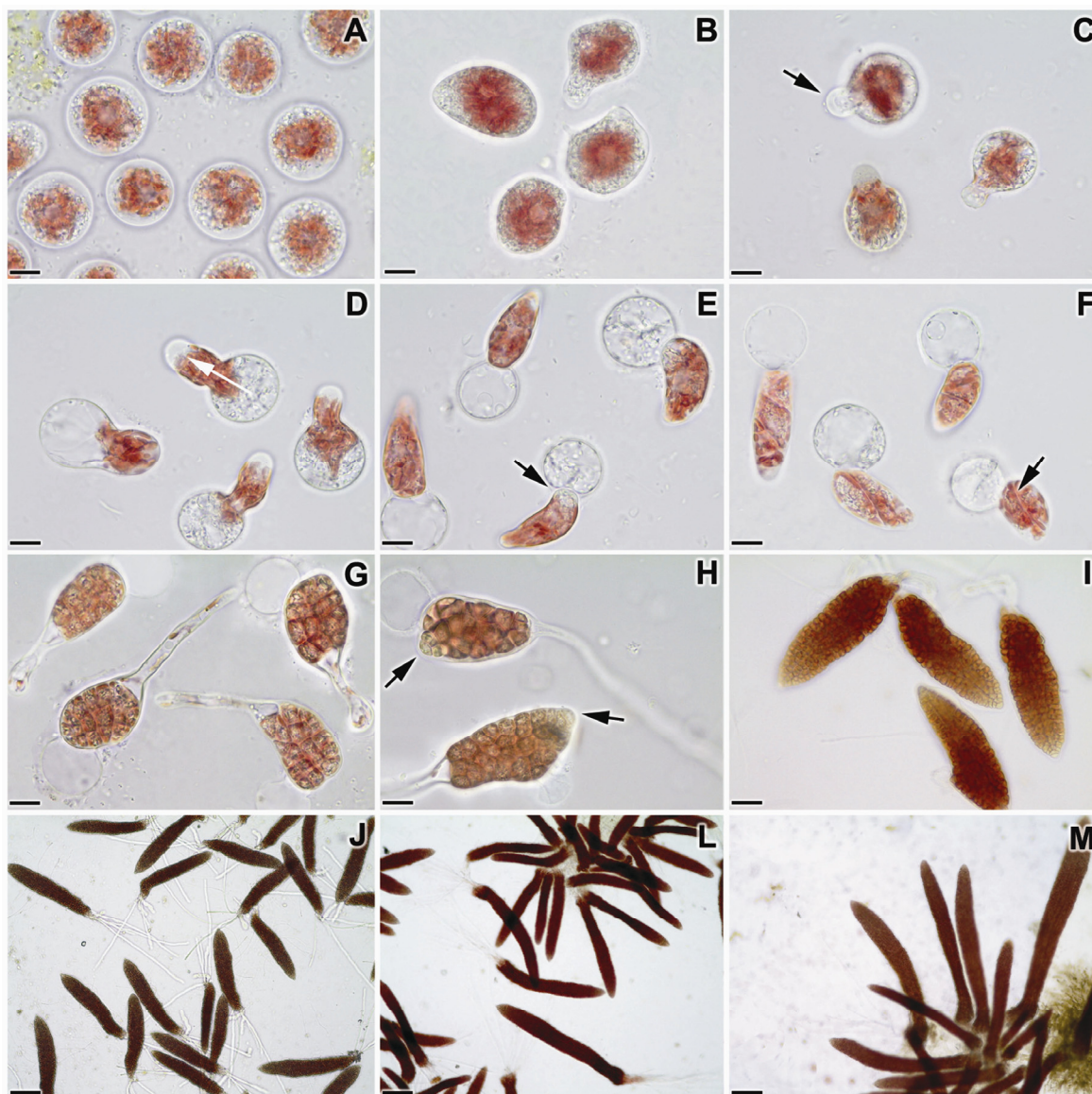


Figura 3.1. Etapas do processo germinativo dos tetrásporos de *Gelidium floridanum* ao longo de 15 dias. A-G) Primeiro e segundo dias de germinação. A) Tetrásporos recém liberados. B) Início da polarização. C) Formação do tubo germinativo (seta). D) Transferência do material citoplasmático (seta). E) Esporo inicial com conteúdo hialino e deposição da parede celular (seta) que separa o esporo inicial do tubo germinativo. F) Primeiras divisões celulares (seta). G) Formação do rizóide. H) Plântulas de 3 dias com formação da célula apical (setas). I) Plântulas de 6 dias. O esporo inicial já não é visível. J) Plântulas de 9 dias. L) Plântulas de 12 dias. M) Plântulas de 15 dias. Escalas: A-H=10 μ m; I= 25 μ m; J-M= 100 μ m.

Após 3 dias de experimento as plântulas do grupo controle apresentaram-se saudáveis, com coloração vermelha típica, corpo multicelular e rizóide bem desenvolvidos. Estas apresentaram sincronia no desenvolvimento, onde praticamente todas foram encontradas no mesmo estágio (Fig. 3.2A). Foi possível observar nestas plântulas a formação característica da região da célula apical, a qual guia o crescimento em comprimento do talo ereto (Fig. 3.2B). Por outro lado, as plântulas expostas à radiação

UV-B apresentaram atraso no desenvolvimento. Este foi verificado na falta de sincronia deste, onde várias fases foram observadas. Neste período estavam presentes plântulas sem rizóides, bem como plântulas com corpo multicelular em vários graus de maturação (poucas a muitas células formadas). A mortalidade foi bastante evidente, manifestada através da coloração esverdeada. Em sua maioria, os tetrásporos conseguiram formar o tubo germinativo e iniciar divisões, estas, porém, muitas vezes não seguiram o padrão normal (primeiramente oblíquas e, depois em vários planos) (Fig. 3.2C). As plântulas expostas que sobreviveram, mantiveram o crescimento, porém apresentaram atraso na formação da região apical (Fig. 3.2D). Nesta fase as plântulas, de maneira geral, ainda encontravam-se ligadas ao esporo inicial.

Com 6 dias de cultivo, as plântulas controle apresentaram desenvolvimento do corpo celular formando um eixo ereto, com a região apical fusiforme. A região apical é caracteristicamente mais clara em relação ao restante do talo com destaque para a célula apical na extremidade (Fig. 3.3A). O atraso no desenvolvimento das plântulas expostas tornou-se mais nítido e manteve-se a heterogeneidade de estágios de desenvolvimento. O talo ereto das plântulas irradiadas foi menor e o crescimento nem sempre foi unidirecional como no grupo controle, tornando-se irregular. A região apical também é distinguível do restante do talo. Muitas plântulas, embora tenham sobrevivido, não conseguiram se desenvolver (Fig. 3.3C). As figuras 3.3B e D reforçam a diferença no desenvolvimento das plântulas nos diferentes tratamentos.

No 9º dia de cultivo, as plântulas do controle apresentaram um contínuo crescimento linear do talo ereto que se tornou longo e com aparência de uma estrutura plana e fusiforme (Fig. 3.4A e B). Em contrapartida, a figura 3.4C mostra a realidade do atraso no desenvolvimento padrão, imposta pela radiação UV-B. Comparativamente e, com maior nitidez apresentada na figura 3.4D, as plântulas expostas são drasticamente menores, o talo apresenta torções, a região apical por vezes apresentou-se estrangulada em relação ao resto do talo. Foram várias as fases de desenvolvimento encontradas e houve a formação em algumas plântulas de expansões laterais da parede celular externa próximo da região apical.

Após 12 dias de cultivo as plântulas controle continuaram normalmente o desenvolvimento, apresentando um talo um pouco mais estreito na região basal, bastante longo e saudável (Fig. 3.5A). No talo das plântulas controle foi possível observar que a região apical continuou menos pigmentada do que o restante do talo da plântula e esta

mesma despigmentação também foi característica dos rizóides (Fig. 3.5B). As plântulas expostas que sobreviveram também mantiveram o crescimento, embora este tenha sido bastante lento (Fig. 3.5C). Aparentemente, as plântulas expostas parecem ter um corpo celular mais frouxo e foi clara a deformação do talo (Fig. 3.5D). Em relação aos rizóides, também foram percebidas diferenças neste estágio. O grupo controle mostrou um feixe organizado e verticalmente orientado, enquanto as plântulas irradiadas apresentaram rizóides dispersos desorganizadamente e radialmente orientados (Fig. 3.5B e D).

Da mesma forma, as plântulas controle cultivadas por 15 dias, desenvolveram-se normalmente (Fig. 3.6A e B), ao passo que as plântulas expostas não tiveram o seu crescimento interrompido, porém este foi significativamente reduzido em relação ao controle. As plântulas irradiadas apresentaram encurvamento do talo, da região mediana para a apical (Fig. 3.6C e D). Ao final de 15 dias, as principais alterações morfológicas observadas foram a desorganização da região apical, registrando-se a formação de várias células apicais dispostas muitas vezes de maneira lateralizada (Fig. 3.7A e B), célula apical ora mais pigmentada (Fig. 3.7A e C), ora despigmentada (Fig. 3.7 B, D e E), desorientação da direção de crescimento do talo, estrangulamento da região apical (Fig. 3.7C e D), formação de expansões laterais da parede celular externa na região apical e, ainda, região interna do talo encurvado com pigmentação heterogênea e reduzida (Fig. 3.7E).

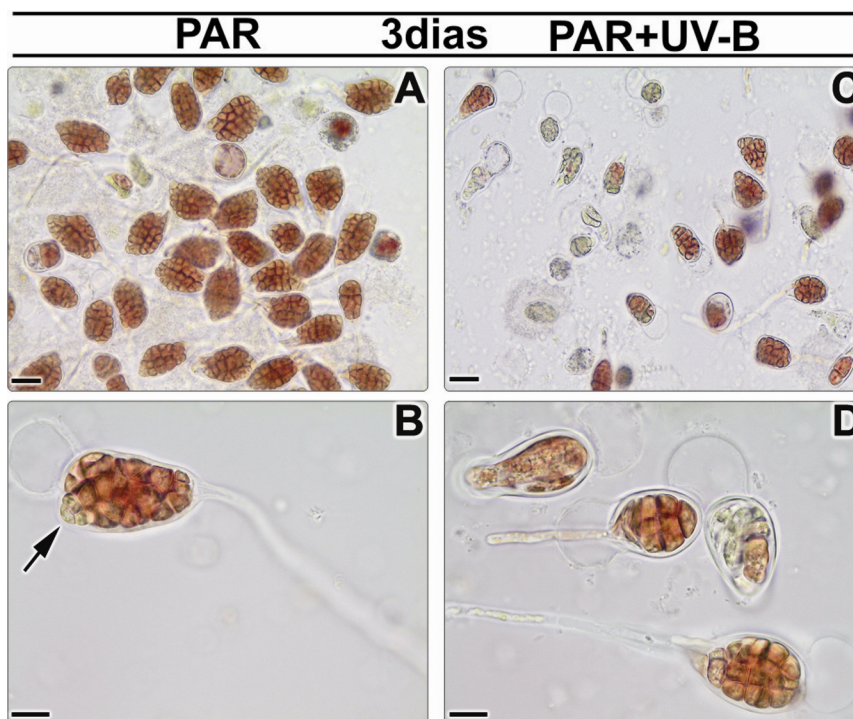


Figura 3.2. Morfologia externa de plântulas de *Gelidium floridanum* após exposição aos tratamentos (controle: PAR e tratado: PAR+UV-B), por 3 dias, observadas sob microscopia de luz. A) Vista geral das plântulas controle, maioria no mesmo estágio de desenvolvimento. B) Detalhe de plântula multicelular, com vesícula ou esporo inicial, rizóide e formação da região apical (seta). C) Grupos de plântulas tratadas, em várias fases de desenvolvimento e com grande mortalidade (esporos verdes). D) Detalhe de plântulas tratadas. Escala: A-C = 20µm; B-D = 10µm.

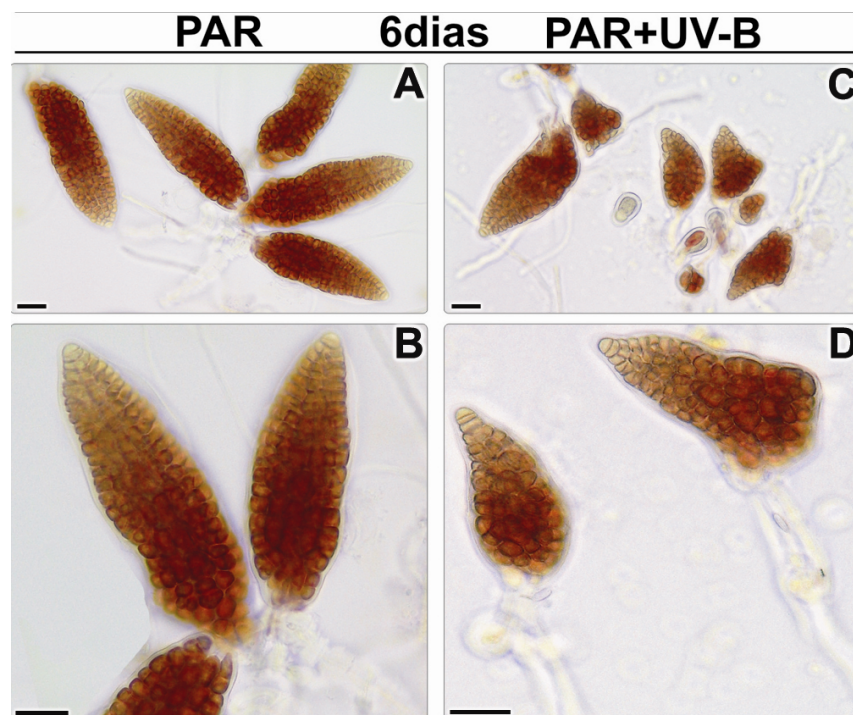


Figura 3.3. Morfologia externa de plântulas de *Gelidium floridanum* após exposição aos tratamentos (controle: PAR e tratado: PAR+UV-B), por 6 dias, observadas sob microscopia de luz. A) Grupo de plântulas controle com desenvolvimento normal. B) Detalhe de plântulas controle. C) Grupo de plântulas tratadas, visivelmente menores e em diferentes fases de desenvolvimento. D) Detalhe de plântulas com atraso no desenvolvimento. Escala: A-C = 20µm; B-D = 40µm.

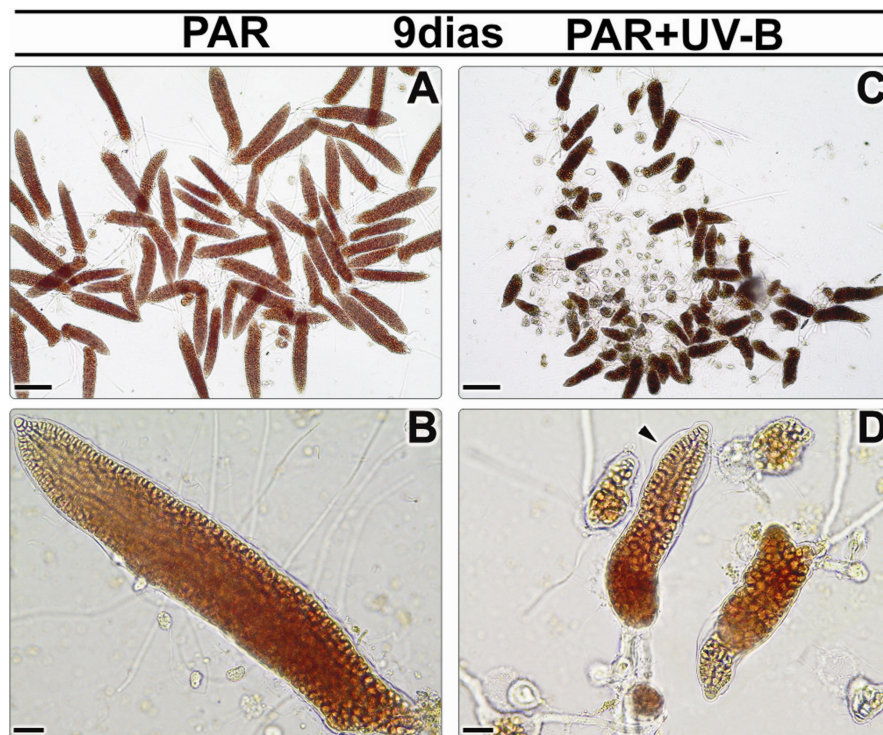


Figura 3.4: Morfologia externa de plântulas de *Gelidium floridanum* após exposição aos tratamentos (controle: PAR e tratado: PAR+UV-B), por 9 dias, observadas sob microscopia de luz. A) Plântulas controle bem desenvolvidas. B) Detalhe de plântula controle com eixo ereto bem desenvolvido e célula apical evidente. C) Grupo de plântulas expostas. D) plântulas expostas com tamanho reduzido, torções do talo e “abas” laterais (seta). A-C = 100µm; B-D = 20µm.

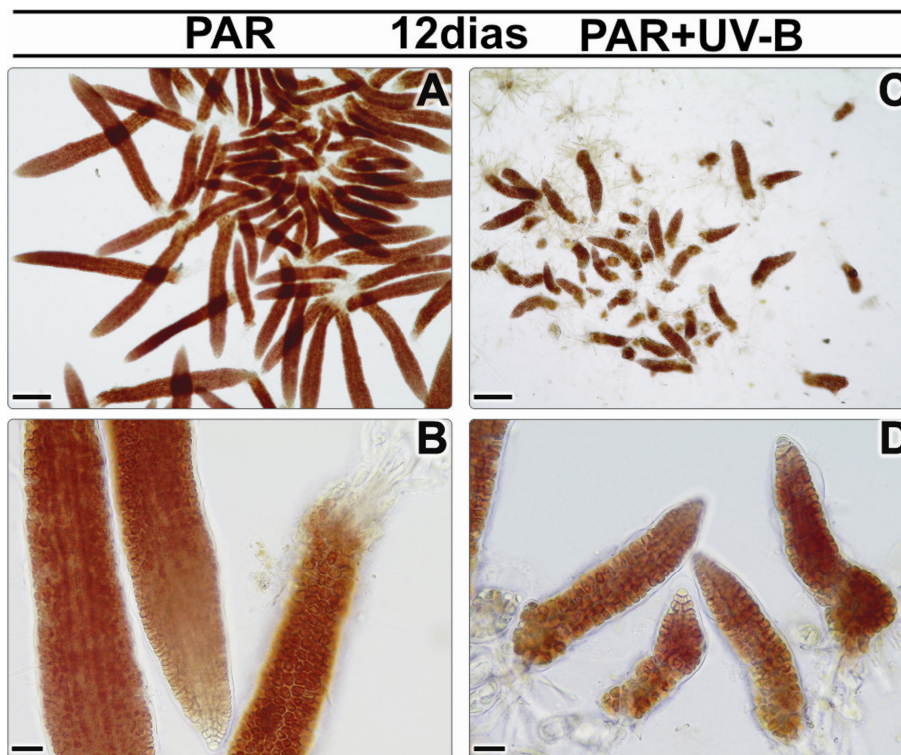


Figura 3.5: Morfologia externa de plântulas de *Gelidium floridanum* após exposição aos tratamentos (controle: PAR e tratado: PAR+UV-B), por 12 dias, observadas sob microscopia de luz. A) Plântulas controle bem desenvolvidas. B) Detalhe de partes do talo das plântulas controle. C) Plântulas expostas. D) Plântulas expostas, menores e encurvadas. A-C = 100µm; B-D = 20µm.

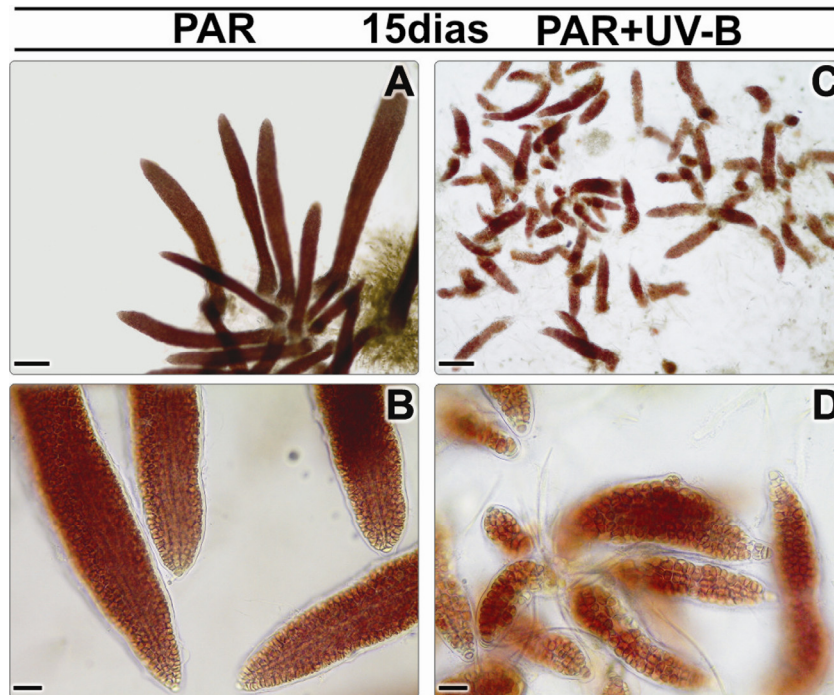


Figura 3.6: Morfologia externa de plântulas de *Gelidium floridanum* após exposição aos tratamentos (controle: PAR e tratado: PAR+UV-B), por 15 dias, observadas sob microscopia de luz. A) Plântulas controle com talo longo. B) Detalhe da região apical das plântulas controle. C) Plântulas expostas visivelmente afetadas pela radiação. D) Plântulas expostas bastante alteradas, com região apical aparentemente estrangulada e encurvamento do talo. Escalas: A-C = 100 μ m; B-D = 20 μ m.

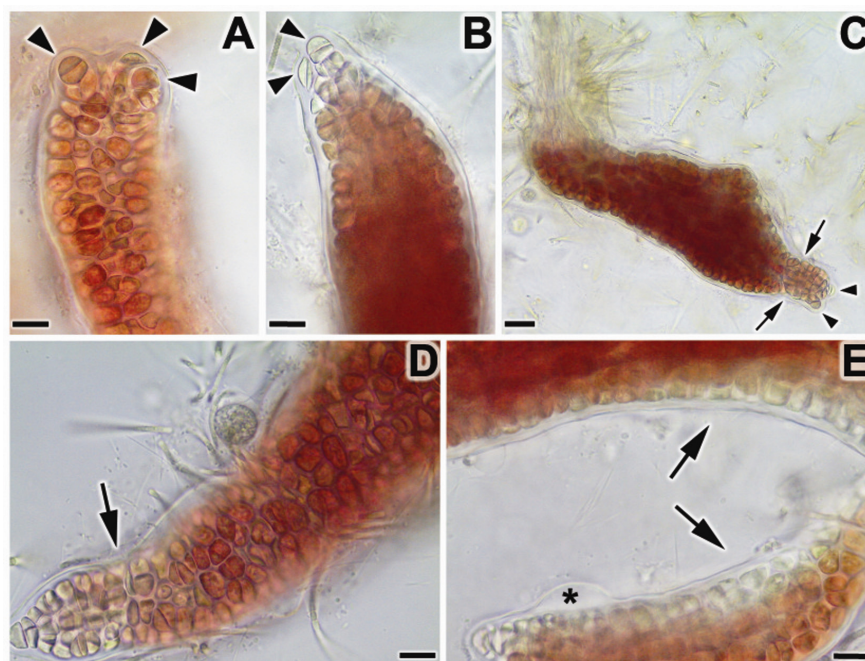


Figura 3.7: Detalhe das alterações encontradas nas plântulas de *Gelidium floridanum* expostas à radiação UV-B, ao final de 15 dias. A-B) Formação de várias células apicais (cabeças de seta). C) Estrangulamento da região fusiforme apical (setas), formação de várias células apicais lateralizadas (cabeças de seta) e desenvolvimento irregular do talo ereto. D) Estrangulamento da região apical (seta) e pigmentação desigual ao longo do talo. E) Formação de “abas” (*) laterais à região apical e, regiões de menor pigmentação das células corticais, geralmente em regiões medianas do talo encurvado (setas). Escala: C=20 μ m; demais = 10 μ m.

3.2. Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a ultraestrutura, analisada sob microscopia eletrônica de transmissão

No terceiro dia de desenvolvimento, as plântulas do tratamento controle encontravam-se ainda ligadas ao esporo inicial, com corpo celular constituído por numerosas células e possuindo um rizóide na extremidade oposta ao esporo inicial, o que caracteriza a região basal. A região apical apresentou célula apical evidente (Fig. 3.9A). Sob microscopia eletrônica, foi possível distinguir a região apical da basal em relação à organização celular, morfologia e quantidade de organelas (Fig. 3.9B). A região apical é conspícua, formada por células que possuem cloroplastos numerosos, pequenos e com menor número de tilacóides, o que os caracterizam como cloroplastos jovens. Nestas células, foram encontrados numerosos corpos de Golgi, em sua maioria hipertróficos, numerosas mitocôndrias e, não se registraram grãos de amido (Fig. 3.9C). A abundância de corpos de Golgi evidencia uma área de intenso metabolismo celular, direcionada ao crescimento. Os corpos de Golgi, nesta fase de desenvolvimento e, em especial nas regiões apicais, são em sua maioria hipertróficos, apresentando vesículas preenchidas com material semelhante ao encontrado na parede celular, as quais, muitas vezes, foram encontradas fundindo-se esta (Fig. 3.9C e D). Nestas células as mitocôndrias estão próximas aos cloroplastos e aos corpos de Golgi sugerindo interação metabólica (Fig. 3.9C e E). Nas células apicais os núcleos são grandes e com cromatina difusa, o que confere a estas células intensa atividade sintética (Fig. 3.9C). Em contrapartida, as células da região basal são caracterizadas pela presença de cloroplastos maiores, em menor número, com grande quantidade de tilacóides (maduros), geralmente localizados na periferia celular (Fig. 3.9F, G e H). Corpos de Golgi são praticamente ausentes nesta região. As mitocôndrias foram observadas em menor número, muitas vezes com maior tamanho. Nestas células as mitocôndrias e os cloroplastos também foram encontrados em associação (Fig. 3.9G). Os grãos de amido estavam presentes basicamente concentrados perinuclearmente (Fig. 3.9H). Foi possível observar um gradiente na concentração de grãos de amido, o qual aumenta da região apical para a basal. O esquema da figura 3.8 mostra o gradiente de maturação do conteúdo de organelas, assim como da concentração de grãos de amido ao longo do talo diferenciado em região apical, mediana e basal. As células constituintes do esporo

germinado estão unidas por conexões intercelulares típicas das algas vermelhas (Fig. 3.9C). Uma parede celular externa, composta por duas camadas reveste toda plântula germinada. A camada mais externa é eletrônica-densa e revestida por uma mucilagem com aspecto irregular. A camada mais interna é eletrônica-transparente e contínua com a parede que separa as células da plântula (Fig. 3.9F). A parede celular que envolve cada célula individualmente apresenta uma textura levemente fibrilar, com fibrilas distribuídas aleatoriamente e mergulhadas em uma matriz amorfa (Fig. 3.9C e G).

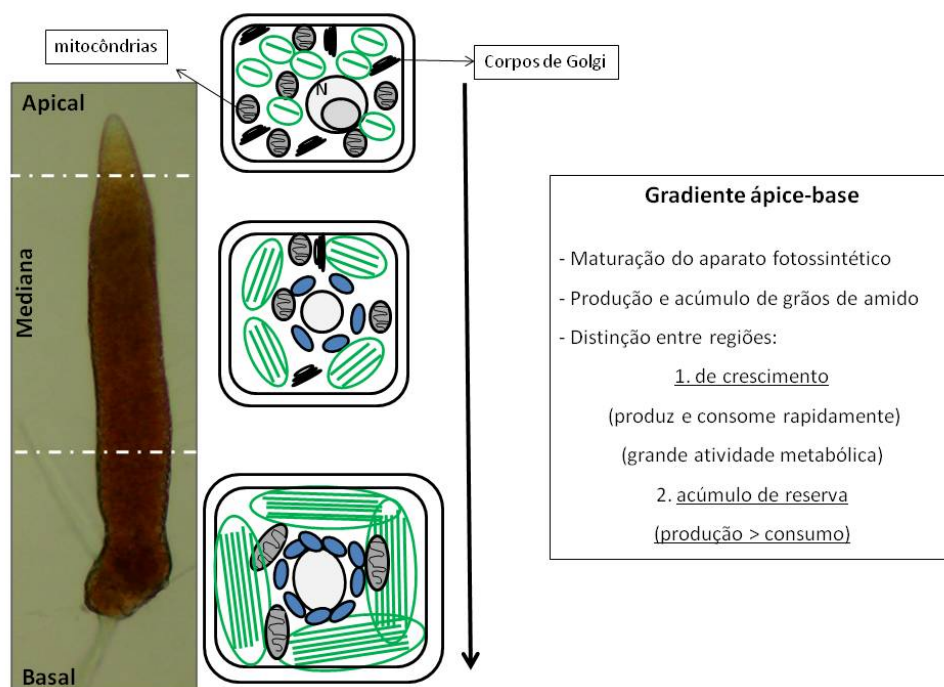


Figura 3.8. Esquema geral representando o gradiente de maturação do conteúdo de organelas e, conseqüentemente da concentração de grãos de amido, ao longo do talo diferenciado em região apical, mediana e basal.

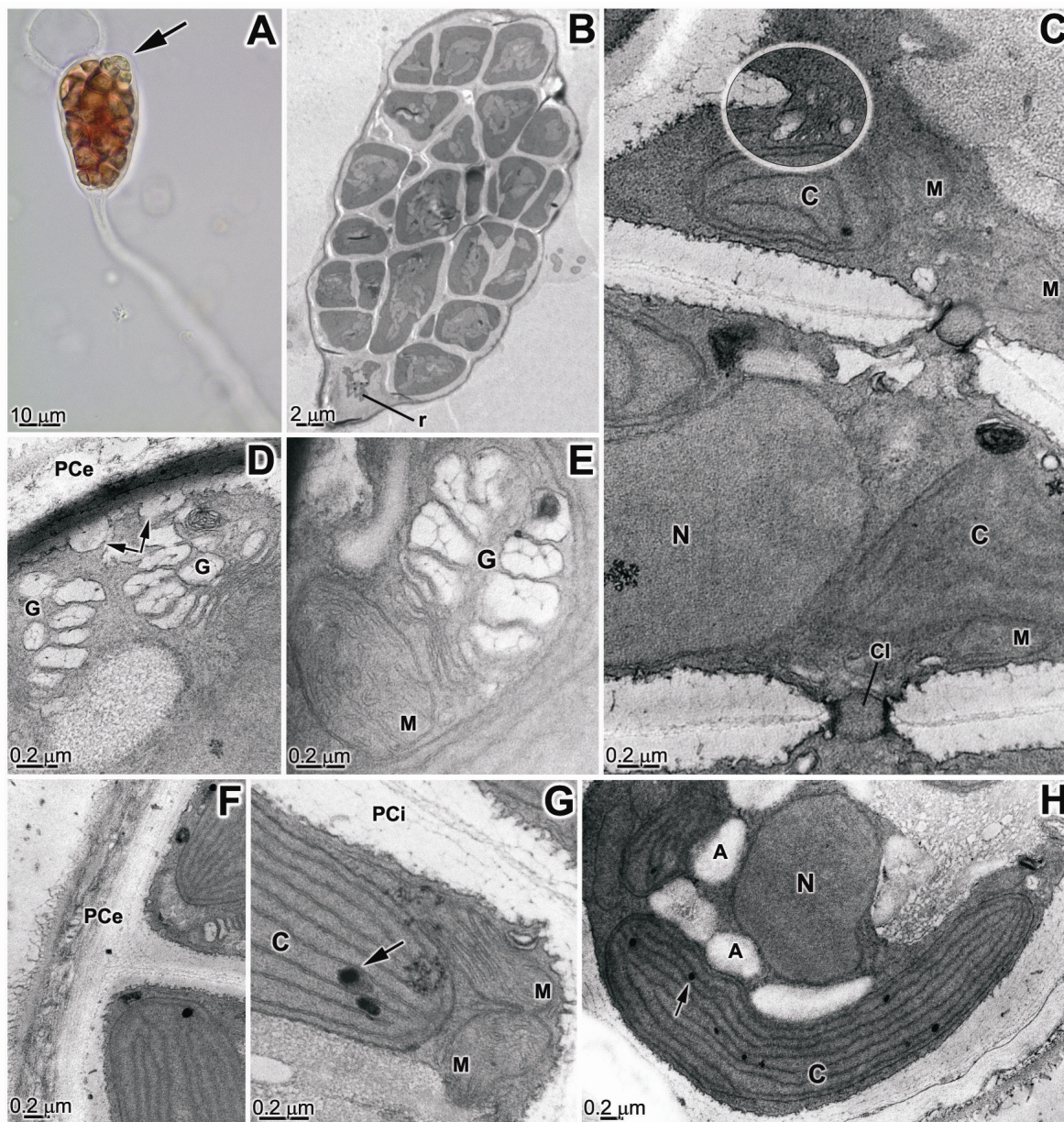


Figura 3.9: Plântulas de *Gelidium floridanum* do controle (PAR) com 3 dias. A) Microscopia de luz evidenciando o estágio de desenvolvimento. A seta indica a formação da região apical. **B-H) Microscopia eletrônica de transmissão.** B) Secção longitudinal de uma plântula mostrando célula rizoidal (r) e células da região intermediária. C) Células da região apical, com cloroplastos (C) jovens, núcleo (N) grande e conexão intercelular (CI). Notar vesículas de Golgi próximas à parede celular em formação (círculo). D) Vesículas de Golgi (G) em fusão com a parede celular externa (setas). E) Golgi hipertrófico associado à mitocôndria (M). F) Detalhe da parede celular externa (PCe), formada por duas camadas. G) Mitocôndrias em divisão e detalhe de cloroplasto com plastoblóbulo (seta). Parede celular interna (PCi) levemente fibrilar em sua porção central. H) Cloroplasto longo e maduro de célula basal com plastoglóbulos pequenos (seta). Notar a disposição perinuclear dos grãos de amidos (A).

As plântulas expostas à PAR+UV-B por 3 dias mostraram atraso na formação da região apical, além de menor número de células (Fig. 3.10A). Quando visualizadas as células da região apical, foi possível verificar que estas apresentaram com maior frequência a formação de grãos de amido (Fig. 3.10B). Da mesma forma que o controle, os cloroplastos destas células são jovens, embora às vezes mais longos do que os observados no material controle. Poucos corpos de Golgi foram encontrados nesta região (Fig. 3.10C). As demais células, que formam o corpo do esporo germinado são preenchidas por grande quantidade de grãos de amidos presentes a partir da terceira camada de células da região apical (Fig. 3.10B e D). Nestas células os corpos de Golgi também estão presentes, porém são menos frequentes e nem sempre hipertróficos (Fig. 3.10E e F). Destacaram-se nestas células grande quantidade de mitocôndrias próximas a corpos de Golgi ou cloroplastos (Fig. 3.10E). Estas organelas foram maiores do que as encontradas nas células do controle e, também, foi possível observar a presença de grânulos eletrôn-densos dispersos na matriz mitocondrial (Fig. 3.10F). A parede celular que reveste toda a plântula mostrou-se, por muitas vezes, mais espessa e irregular quando comparada ao controle. Esta parede apresentou quatro camadas com diferentes eletrôn-densidades (Fig. 3.10G). A parede celular interna, que reveste cada célula da plântula também mostrou organização diferente daquela observada nas células do controle e com fibrilas paralelas a membrana celular (Fig. 3.10H). Nas células localizadas na superfície da plântula os cloroplastos apresentaram desorganização e menor número de tilacóides (Fig. 3.10I). Entretanto, nas células localizadas mais internamente os cloroplastos mantiveram a organização típica. Nas células basais, a quantidade de grãos de amido, assim como o tamanho destes, foi visivelmente maior em relação ao controle (Fig. 3.10J).

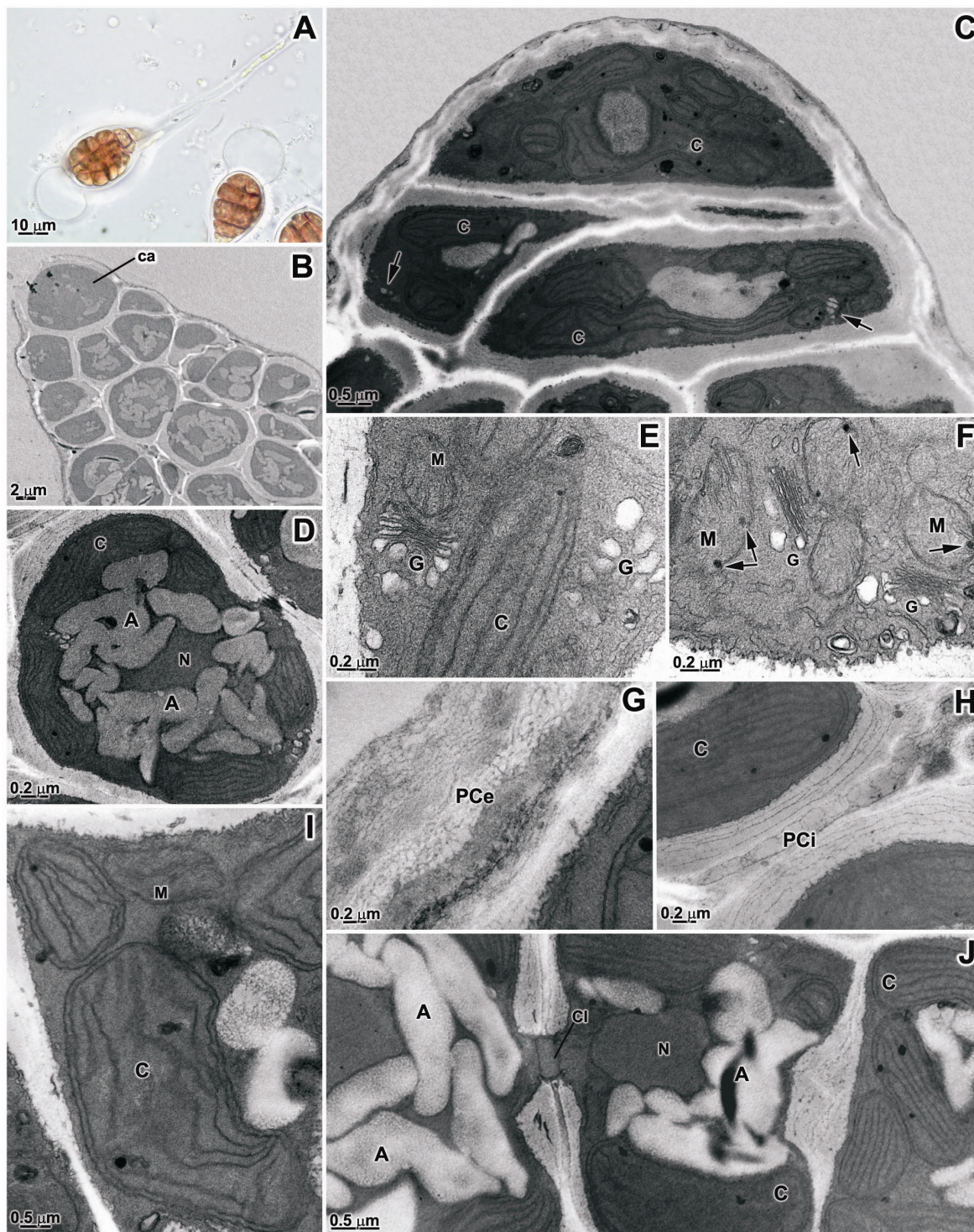


Figura 3.10: Plântulas de *Gelidium floridanum* expostas à PAR+UV-B ao longo de 3 dias. A) Microscopia de luz evidenciando o estágio de desenvolvimento. **B-J) Microscopia eletrônica de transmissão.** B) Secção longitudinal de uma plântula com célula apical (ca) evidente. C) Células da região apical, com cloroplastos jovens (C). As setas indicam pequenos corpos de Golgi (seta). D) Célula da terceira camada da região apical com grande quantidade de grãos de amido (A) perinucleares. E) Detalhe de células com corpos de Golgi próximos a cloroplastos (C) e mitocôndrias (M). F) Grupos de mitocôndrias (M) com grânulos eletrôn-densos (setas) na matriz. G) Detalhe da parede celular externa (PCe) formada por quatro camadas. H) Detalhe da parede celular (PCi) que reveste as células, mostrando fibrilas paralelas. I) Cloroplastos alterados com menor número e ondulação dos tilacóides. J) Detalhe de células basais com grande quantidade de grãos de amido (A) unidas por conexão intercelular (CI) e com núcleo (N) homogêneo. Observe que célula a direita apresentou cloroplastos (C) com organização típica das algas vermelhas.

As plântulas com 6 dias de desenvolvimento mantiveram a característica distinção entre as regiões apical e basal. A extremidade que contém a célula apical é fusiforme e apresenta menor pigmentação (Fig. 3.11A). Em secção longitudinal esta região revelou células com organelas citoplasmáticas semelhantes ao observado nas plântulas com três dias de desenvolvimento. Nestas células muitos cloroplastos jovens, vários corpos de Golgi hipertróficos e numerosas mitocôndrias estavam presentes, evidenciando a grande atividade metabólica desta região (Fig. 3.11B, C e D). Estas células, em especial a célula apical, apresentaram um núcleo grande com nucléolo denso, também indicador de intensa atividade metabólica (Fig. 3.11C). As células adjacentes, até aproximadamente a quarta e quinta camadas abaixo da célula apical, ainda mantiveram o padrão de organização acima descrito, onde não foi observada a presença de grãos de amido (Fig. 3.11B e D). A associação de corpos de Golgi e mitocôndrias foi bastante frequente indicando interação metabólica. Estas mitocôndrias apresentaram cristas tubulares. Foi possível observar também a intensa produção de vesículas de Golgi, as quais se fundiam dando origem a vesículas ainda maiores (Fig. 3.11E). Membranas de retículo endoplasmático rugoso (RER) e muitos ribossomos foram observados no citoplasma, especialmente circundando núcleos e próximos a grãos de amido (Fig. 3.11F).

As células de toda plântula são unidas entre si por conexões intercelulares como as observadas na figura 3.11D. Semelhante ao observado nas plântulas com três dias, as células da região intermediária do talo apresentaram caracteristicamente cloroplastos maiores do que os observados nas células da região apical, apresentando maior número de tilacóides. Os grãos de amido em sua maioria encontraram-se localizados perinuclearmente e em menor quantidade. Nestas células visualizaram-se menos mitocôndrias e o número de corpos de Golgi também foi reduzido a um ou dois por célula. As células da região basal, por sua vez, revelaram-se compostas por cloroplastos maduros e maiores, dispostos na periferia celular e apresentando de 1 a 4 plastoglóbulos pequenos em seu interior. Um número maior de grãos de amido também foi verificado, distribuídos perinuclearmente, como, também, por todo o citoplasma (Fig. 3.11H). A formação de cristais, provavelmente protéicos, foi verificada. Estes foram encontrados dispersos no citoplasma de células mais superficiais da região basal e envolvidos por uma unidade de membrana (Fig. 3.11I).

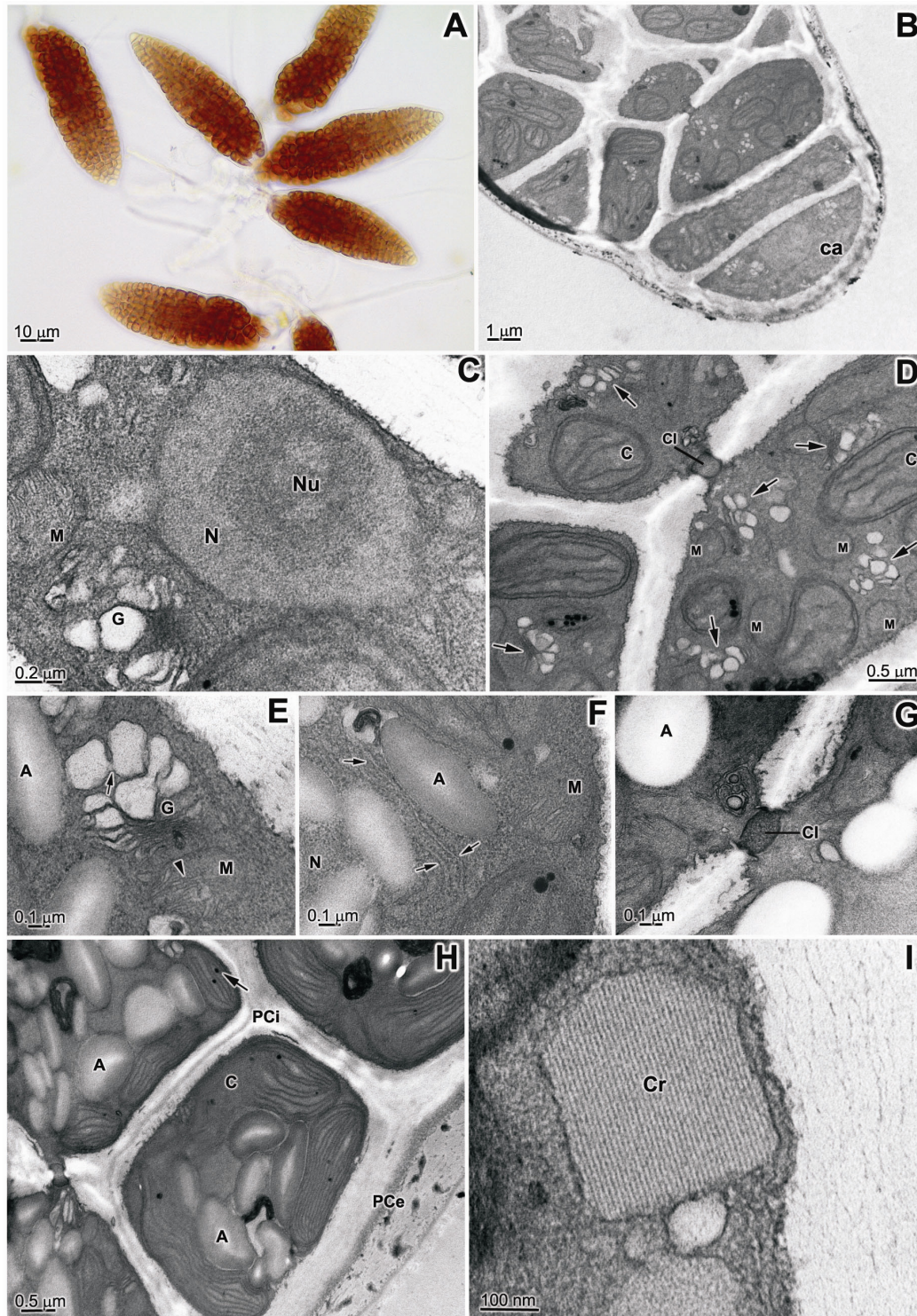


Figura 3.11: Plântulas de *Gelidium floridanum* do controle (PAR) com de 6 dias. A) Microscopia de luz de plântulas com numerosas células, região apical fusiforme e pouco pigmentada. **B-I) Microscopia eletrônica de transmissão.** B) Secção longitudinal da região apical do talo com célula apical (ca) evidente. C) Detalhe de um núcleo (N) grande, contendo nucléolo (Nu) denso, de célula apical. D) Quarta e quinta camadas de célula da região apical com cloroplastos (C) pequenos e jovens, muitas mitocôndrias (M) e vários corpos de Golgi (G) hipertróficos (setas). E) Detalhe de corpo de Golgi hipertrófico. Notar fusão das vesículas (seta) e mitocôndria (M) associada (a cabeça de seta indica as cristas mitocondriais). F) Reticulo endoplasmático rugoso (RER) (setas) próximo a grão de amido. G) Conexão intercelular (CI). H) Células basais, com maior produção de amido (A) e cloroplastos longos e maduros. Notar parede celular externa (PCe) e interna (PCi). I) Cristal de proteína (Cr) no citoplasma da célula basal.

As plântulas com 6 dias de desenvolvimento tratadas com RUV-B apresentaram número reduzido de células quando comparados com o controle (Fig. 3.12A). As células mais superficiais geralmente foram as mais alteradas. A região apical das plântulas expostas aparentemente adquiriu características de células mais maduras, com maior número de cloroplastos contendo maior número de tilacóides, presença e grande número de grãos de amido e com menor quantidade de corpos de Golgi, típicas de regiões basais (Fig. 3.12B). Entretanto estes corpos de Golgi também foram encontrados liberando vesículas hipertróficas e associado a mitocôndrias e cloroplastos, como no controle (Fig. 3.12C). A parede celular externa mostrou-se espessada principalmente em sua porção eletrônica-densa. Uma terceira região, externa à porção eletrônica-densa foi observada. Esta seria provavelmente uma camada de mucilagem, por vezes irregular (Fig. 3.12D). Os cloroplastos de algumas células não sofreram qualquer alteração nos tilacóides. Apenas as dimensões dos plastoglobulos foram aparentemente maiores (Fig. 3.12D). Da mesma forma, a parede celular entre as células se apresentou mais fibrilar (Fig. 3.12E). As cristas mitocondriais aparentemente não apresentaram danos, porém novamente verificou-se a formação de grânulos densos pequenos e grandes dentro das mitocôndrias, como encontrado para as plântulas de três dias irradiadas (Fig. 3.12E e F). Em algumas células os cloroplastos apresentaram uma série de alterações. Alguns perderam grande parte de sua estruturação padrão. Em geral, se manteve a estrutura da dupla membrana externa, porém os tilacóides apresentaram-se desorganizadamente ou mesmo destruídos de tal forma que foi difícil identificá-los. Ao mesmo tempo, aumentou visivelmente o número de plastoglobulos (Fig. 3.12G). Ainda, foi observada a formação de algumas vesículas entre os tilacóides (Fig. 3.12H). A síntese de grãos de amido aumentou notadamente em todas as células observadas (Fig. 3.12I).

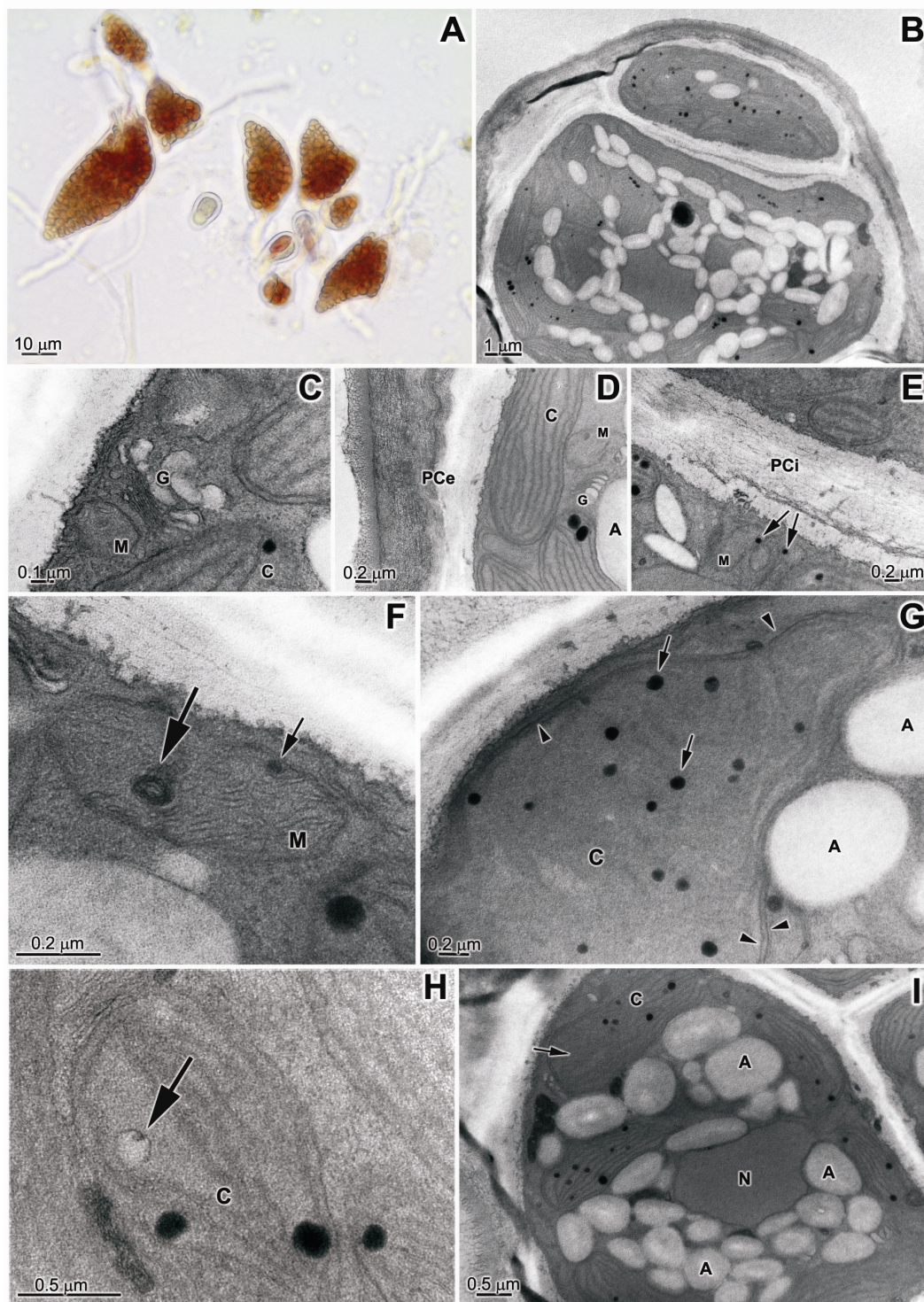


Figura 3.12: Plântulas de *Gelidium floridanum* expostas à PAR+UV-B ao longo de 6 dias. A) Microscopia de luz evidenciando o estágio de desenvolvimento. B-I) Microscopia eletrônica de transmissão. B) Secção longitudinal de uma região apical do talo. C) Corpo de Golgi (G) liberando vesículas hipertroóficas. D) Detalhe da parede celular externa (PCe) espessada. E) Parede celular interna (PCi) fibrilar e mitocôndrias (M) contendo grânulos densos (setas). F) Detalhe do acúmulo de material eletrôn-denso no interior das mitocôndrias (setas). G) Cloroplasto (C) visivelmente alterado. As setas indicam plastoglôbulos e as cabeças de seta a dupla membrana do cloroplasto. H) Formação de vesícula (seta) no interior dos cloroplastos. I) Células basais, com grande produção de amido (A) localizados ao redor do núcleo (N) e distribuídos no citoplasma e, cloroplastos longos com leve alteração dos tilacóides (seta).

Com 9 dias as plântulas da condição controle aumentaram essencialmente em comprimento (Fig. 3.13A) e revelaram a região apical ainda sem produção de amido, com cloroplastos jovens, muitos corpos de Golgi e nucléolo denso. A parede celular externa nesta região apresentou-se um pouco mais espessa (Fig. 3.13B). As células da região apical revelaram plastoglóbulos concentrados nas extremidades dos cloroplastos. Estes últimos apresentaram diminuta quantidade de tilacóides (Fig. 3.13C). Neste estágio, as plântulas em geral apresentaram células com menos grãos de amidos e cloroplastos com poucos plastoglóbulos. As células mais internas ainda registram a ocorrência de corpos de Golgi (Fig. 3.13D). Nestas células foi possível visualizar as conexões intercelulares, com capa evidente (Fig. 3.13E). Mitocôndrias, corpos de Golgi e cloroplastos novamente apareceram em associação (Fig. 3.13F). Células da região intermediária do talo apresentaram cloroplastos pouco mais maduros, núcleo com nucléolo denso muitas vezes evidente e reduzida quantidade de grãos de amido perinuclearmente distribuídos. A parede celular interna manteve o padrão fibrilar (Fig. 3.13G). As células de rizóide caracteristicamente apresentaram espessa parede celular externa e pouco conteúdo citoplasmático, contendo algumas mitocôndrias e vacúolos. Entre o conteúdo citoplasmático e a parede celular visualizou-se espessa camada composta por vacúolos grandes e reticulares (Fig. 3.13H e I).

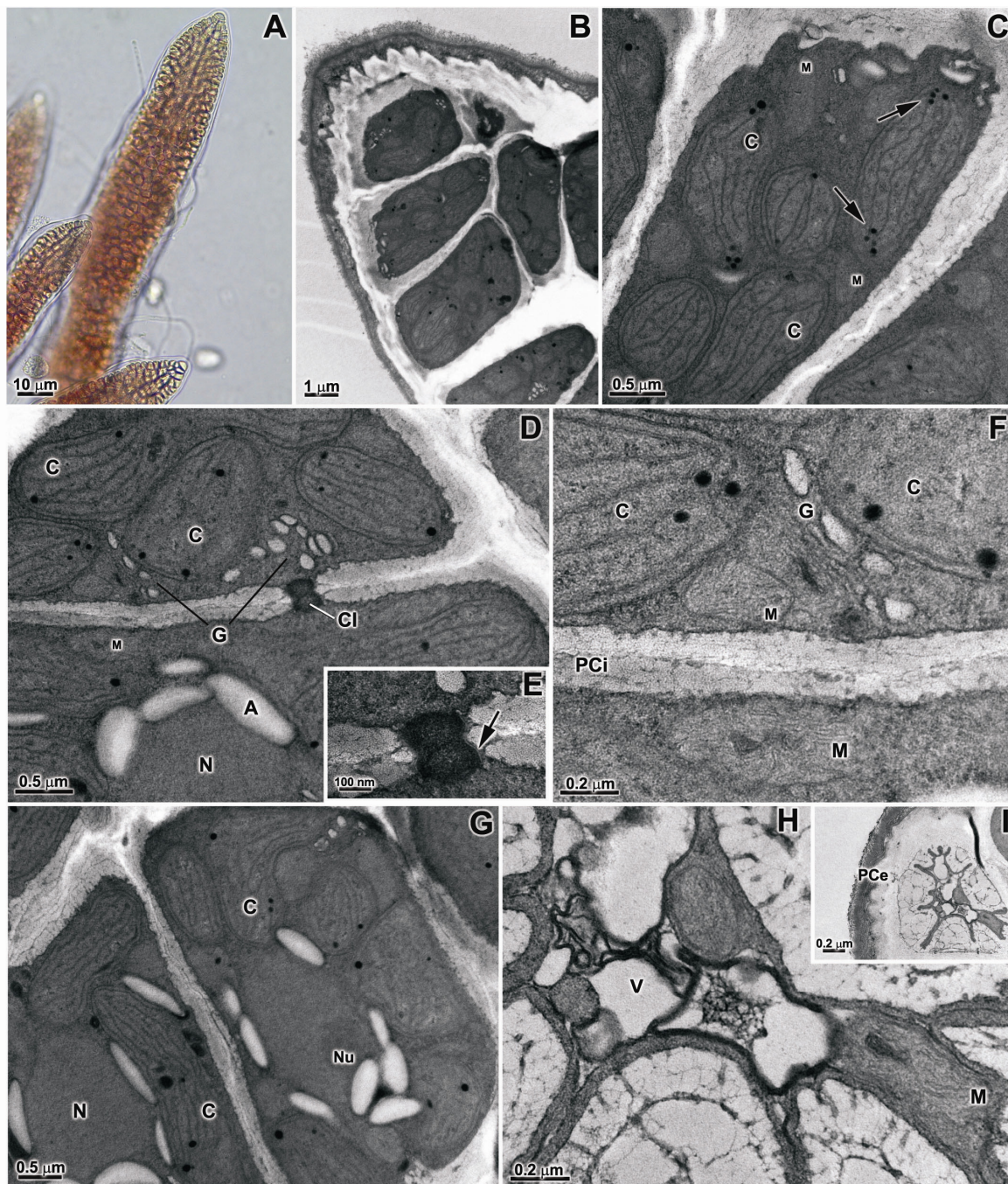


Figura 3.13: Plântulas de *Gelidium floridanum* do controle (PAR) com 9 dias. A) Microscopia de luz evidenciando o estágio de desenvolvimento e célula apical proeminente. B-I) **Microscopia eletrônica de transmissão.** B) Secção longitudinal da região apical. Notar ausência de grãos de amido (A). C) Célula da região apical. As setas indicam o agrupamento de plastoglobulos nas extremidades dos cloroplastos (C). D) Células da região mediana da plântula com muitos cloroplastos (C), corpos de Golgi (G), grãos de amido perinucleares e conexão intercelular. E) Detalhe da conexão intercelular (CI) com capa (seta) evidente. F) Cloroplastos, mitocôndrias (M) e corpos de Golgi associados. Parede celular interna (PCi) característica. G) Células com numerosos cloroplastos, núcleo (N) e nucléolo (Nu) evidente e poucos grãos de amido. H) Detalhe do conteúdo citoplasmático de células do rizóide. I) Célula rizoidal com parede celular externa (PCe) espessa e camada de vacúolos reticulares.

As plântulas de 9 dias irradiadas apresentaram-se menores e com visíveis alterações morfológicas (Fig. 3.14A). A visualização da plântula, em secção longitudinal registrou ainda grande quantidade de grãos de amido por célula (Fig. 3.14B). Nas células da região apical os cloroplastos mostraram-se mais longos (Fig. 3.14C). Aparentemente as células mais internas apresentaram menor grau de danos estruturais, mas mesmo nestas, comparadas ao controle, foi possível verificar que os muitos cloroplastos possuíam poucos tilacóides e, alguns cloroplastos acumularam grande quantidade de lipídio, percebidos pela grande quantidade de plastoglóbulos. Ao mesmo tempo foi possível verificar que as células vizinhas, no entanto, apresentavam-se bastante alteradas, sendo difícil a definição do conteúdo citoplasmático destas (Fig. 3.14D). Outra característica em relação aos cloroplastos foi a destruição dos tilacóides, repetindo o acúmulo de plastoglóbulos em seu interior e a manutenção do envelope apenas (Fig. 3.14E). A presença de corpos mais densos próximos às diferentes organelas, distribuídos aleatoriamente pelo conteúdo citoplasmático foi registrada ao longo de todo o experimento, tanto para controle quanto para tratado, porém, verificou-se uma maior ocorrência destes no material irradiado. Um detalhamento destes corpos indica serem um agrupamento de membranas e, por isso, aqui denominados como corpos membranosos (Fig. 3.14F). Por vezes, também, estes corpos se apresentaram mais densos e de difícil definição (Fig. 3.14C, D, G e H). A parede celular externa apresentou maior fibrilação, assim como expansões da região eletrônica-densa. Nestas células periféricas foi possível verificar a formação de vacúolos e os corpos de Golgi foram visualizados em menor frequência (Fig. 3.14G). Algumas células basais observadas, apesar da difícil definição de cloroplastos, registraram maior número de plastoglóbulos (Fig. 3.14H). As células rizoidais visualizadas mostraram-se bastantes características, possuindo reduzido conteúdo citoplasmático e espessa parede celular (Fig. 3.14I).

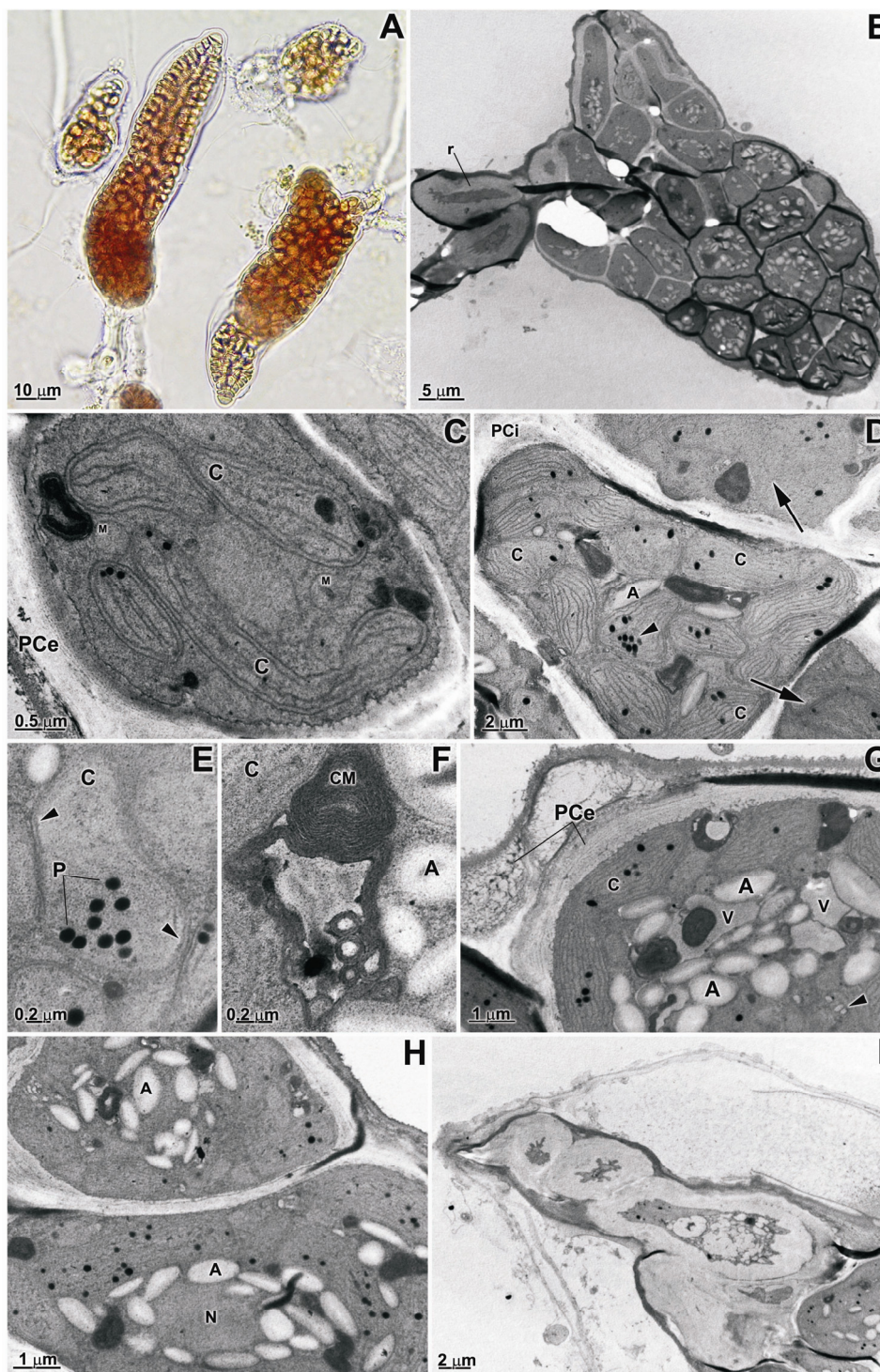


Figura 3.14: Plântulas de *Gelidium floridanum* expostas à PAR+UV-B ao longo de 9 dias. A) Microscopia de luz evidenciando o estágio de desenvolvimento e as alterações morfológicas. **B-I) Microscopia eletrônica de transmissão.** B) Secção longitudinal de uma plântula, onde r indica as células rizoidais que caracterizam a região basal. C) Célula da região apical com cloroplastos (C) longos. D) Célula mediana do talo com cloroplastos apresentando acúmulo de plastoglóbulos (cabeça de seta). As setas evidenciam células vizinhas que apresentam maiores alterações. E) Cloroplasto bastante alterado, somente com tilacóide periférico e envelope (cabeças de setas) e grande acúmulo de plastoglóbulos (P). F) Detalhe de corpos membranosos (CM). G) Célula periférica basal com parede celular externa (PCe) bastante fibrilar e com região eletrônica densa expandida. Notar pequenos vacúolos (V), vesículas de Golgi (cabeça de seta), cloroplastos periféricos e grãos de amido (A). H) Células basais com cloroplastos ricos em plastoglóbulos. I) Células rizoidais com parede espessa. M: mitocôndria; N: núcleo; PCi: parede celular interna.

Com 12 dias as plântulas do grupo controle exibiram talo longo e fusiforme destacando na extremidade a célula apical (Fig. 3.15A). As células superficiais da região mediana do talo apresentaram formação de vacúolos, típica para o estágio de desenvolvimento. Estes vacúolos possuíam conteúdo homogêneo, verificando-se a formação de um a vários por célula e de tamanhos variados (Fig. 3.15B e C). A parede celular externa que reveste toda a plântula apresentou a região externa eletrônica-densa levemente frouxa seguida por uma região mais compacta e uma região eletrônica-transparente em contato com a membrana plasmática (Fig. 3.15B). Nestas células foram observados alguns cloroplastos menores com até 5 tilacóides (Fig. 3.15D), porém muitos cloroplastos aparentemente mais maduros, por sua vez, apresentaram-se longos e com maior número de tilacóides com até 7 por cloroplasto (Fig. 3.15D e E). Em geral, a produção de plastoglóbulos foi menor do que o observado no estágio de 9 dias. As conexões intercelulares mantiveram as mesmas características daquelas observadas nos estágios anteriores. Foram visualizados cloroplastos, grãos de amido e mitocôndrias em proximidade sugerindo interação metabólica (Fig. 3.15E e F). As células mais centrais revelaram amidos perinucleares, em quantidades menores do que as observadas nos estágios anteriores e os cloroplastos distribuídos periféricamente. A parede celular entre as células também se apresentou fibrilar e megulhada em uma matriz amorfa (Fig. 3.15G).

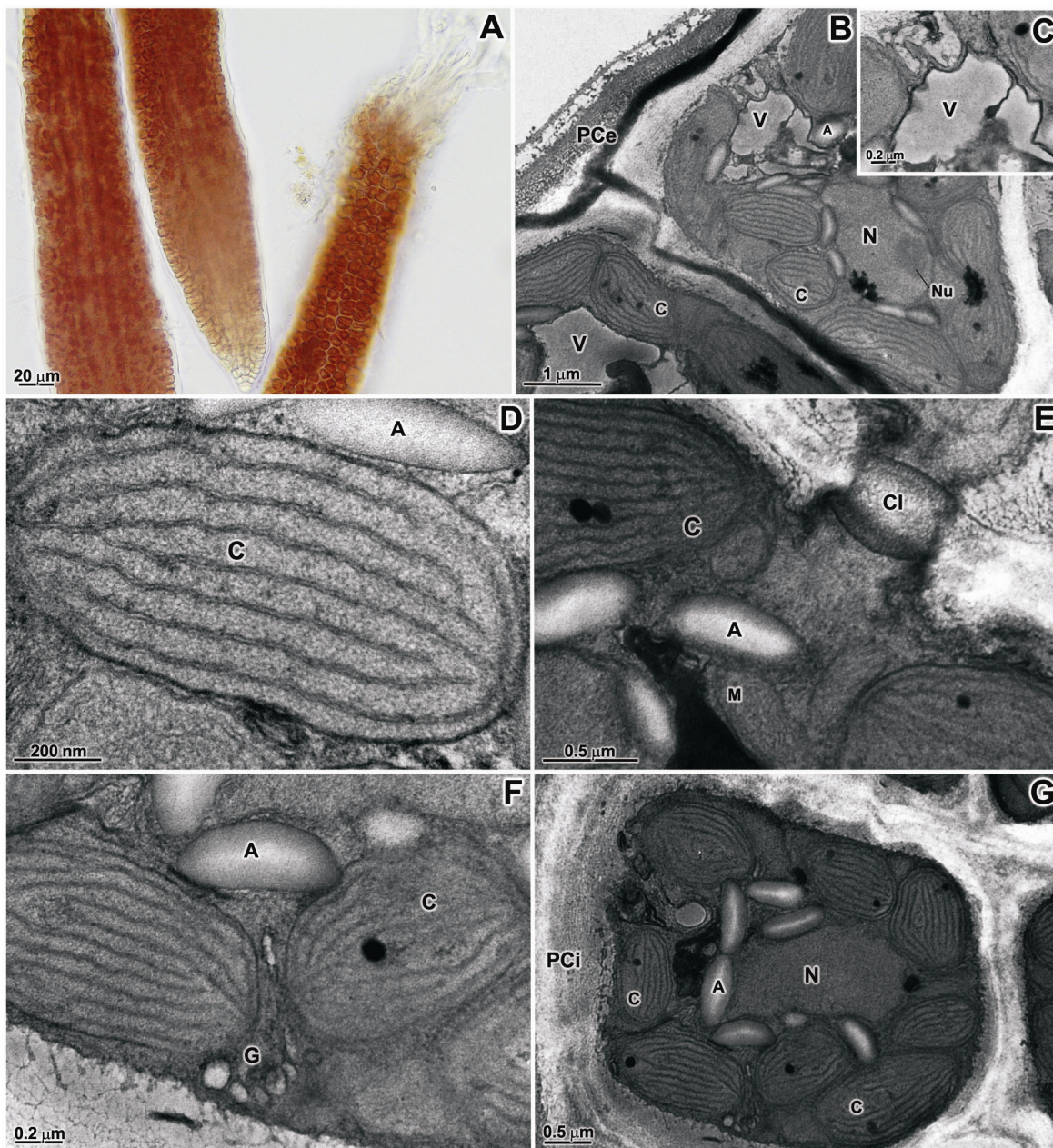


Figura 3.15: Plântulas de *Gelidium floridanum* do controle (PAR) com 12 dias. A) Microscopia de luz evidenciando o estágio de desenvolvimento. B-G) Microscopia eletrônica de transmissão. B) Células periféricas com formação de vacúolos (V). Parede celular externa (PCe) com camadas bem distintas. N: núcleo; Nu: nucléolo. C) Detalhe dos vacúolos. D) Cloroplastos menores (C). E) Detalhe de uma conexão intercelular (CI). Célula com cloroplastos mais maduros e mitocôndrias (M). F) Cloroplastos em íntima associação com grãos de amido e o corpo de Golgi (G). G) Células com parede celular fibrilar (PCi), grãos de amido (A) perinucleares e cloroplastos periféricos.

Com 12 dias de exposição à radiação, as principais alterações dizem respeito à formação de expansões laterais (“abas”), oriundas da abertura da região eletrôn-densa da parede celular externa (Fig. 3.16A, B, C e D), o espessamento da parede celular interna e externa (Fig. 3.16E e F) e as alterações já citadas para o cloroplasto, relacionadas à desorganização, ondulação, espaçamento e, mesmo, degradação dos tilacóides, assim como a presença de plastoglóbulos maiores. A observação das expansões formadas lateralmente à região apical mostrou ser esta uma expansão da região eletrôn-densa da parede celular externa, a qual aparentou ser frouxa e reticulada (Fig. 3.16B). Foi possível visualizar em detalhe o início desta expansão evidenciando que esta ocorre apenas a partir da região eletrôn-densa. A região eletrôn-transparente é mantida intacta (Fig. 3.16C). Esta expansão foi verificada também de outras formas, ou seja, não se apresentando reticulada (Fig. 3.16D). A vista geral de uma plântula seccionada longitudinalmente permitiu observar a ocorrência do aumento na espessura da parede celular ao longo das células adjacentes (Fig. 3.16E). Células mais internas da região basal também apresentaram espessamento da parede celular entre as células (Fig. 3.16F). Nestas células foi registrado o agrupamento de vários vacúolos pequenos no interior da célula e, assim como em 9 dias, houve a presença de vacúolos maiores (Fig. 3.16F). Em detalhe, estas células, mesmo internamente localizadas, mostraram alterações nos cloroplastos relacionadas à desestruturação dos tilacóides e aumento no tamanho dos plastoglóbulos (Fig. 3.16G). Cloroplastos não muito alterados, porém contendo grande quantidade de ribossomos também foram observados entre os tilacóides. Nestas células, a presença de um conteúdo citoplasmático mais granular, apresentando retículo endoplasmático rugoso próximo aos cloroplastos, foi verificado. A parede celular interna mostrou-se mais densamente fibrilar em sua região mais central e, por vezes, ondulada (Fig. 3.16H). As conexões intercelulares não exibiram alterações visíveis (Fig. 3.16I).

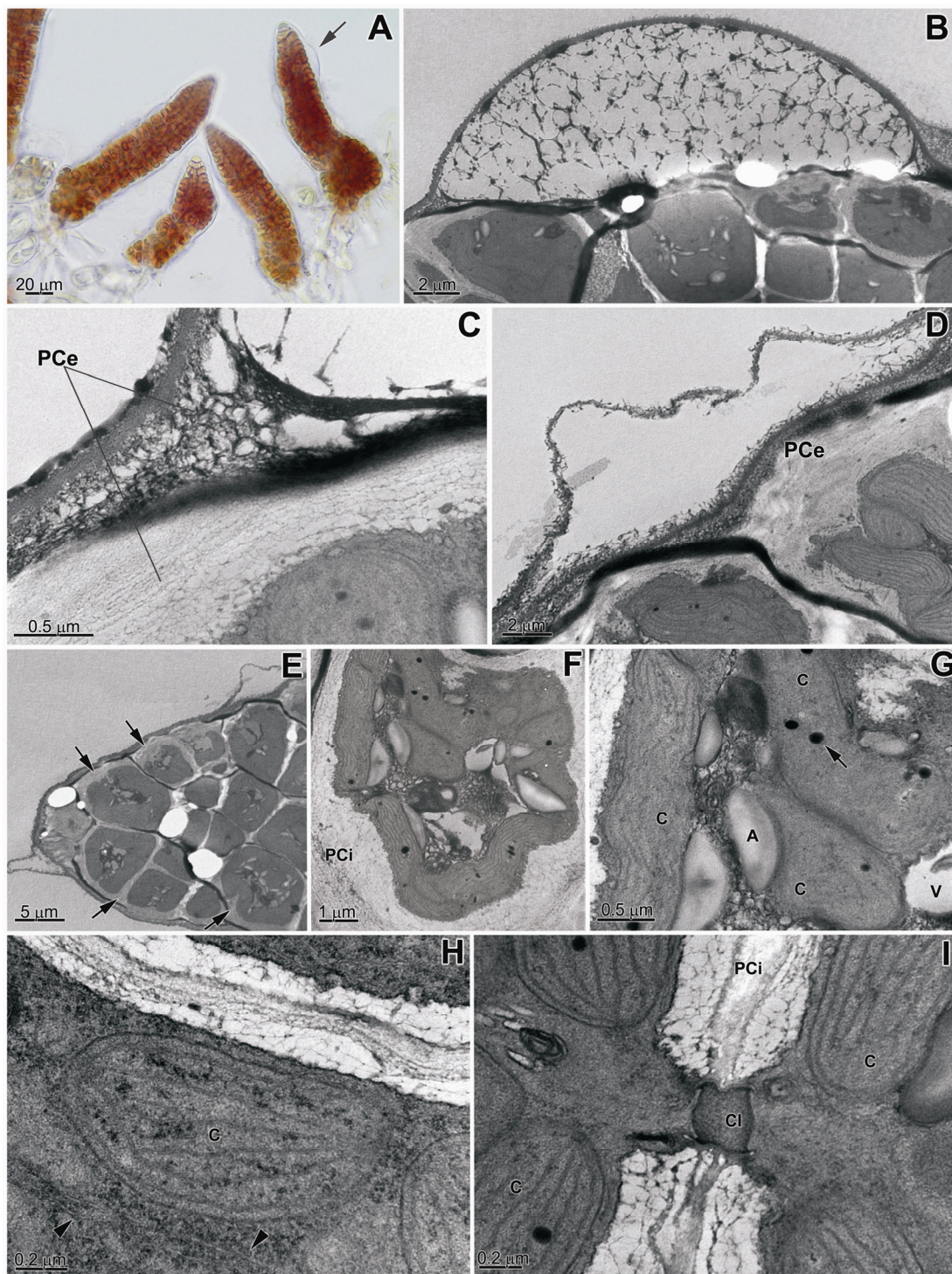


Figura 3.16: Plântulas de *Gelidium floridanum* expostas à PAR+UV-B ao longo de 12 dias. A) Microscopia de luz evidenciando o estágio de desenvolvimento e a formação das “abas” laterais da parede celular externa (Pce) (seta). **B-I) Microscopia eletrônica de transmissão.** B) Região de formação da “aba” a partir da abertura da Pce. C) Detalhe do início da abertura da Pce. D) Região de expansão da parede não reticular. E) Notar espessamento da parede celular ao longo da periferia do talo, assim como de células internas (as setas apontam regiões de espessamento). F) Céula interna do talo com parede celular (Pci) bastante espessa e cloroplastos (C) bem alterados. Notar citoplasma reticular (agregação de vacúolos (V) menores). G) Detalhe de F, evidenciando as alterações dos tilacóides e a formação de plastoglóbulos maiores (seta). A: amidos. H) Detalhe de cloroplasto contendo ribossomos (pontuações eletrôn-densas) e citoplasma granular com retículo endoplasmático rugoso (RER) (pontas de setas) e poliribossomos. I) Conexão intercelular (CI).

Com 15 dias, as plântulas controle apresentam-se morfológicamente semelhantes às plântulas de 12 dias (Fig. 3.17A) e mostram uma parede celular externa em geral mais espessa de maneira uniforme ao longo do talo, provavelmente devido a fase de desenvolvimento (Fig. 3.17B). Foi registrada, ainda, pouca quantidade de grãos de amido, acompanhada por um maior número de cloroplastos. Em geral, verificaram-se vários corpos de Golgi nas diferentes células. Neste estágio, no entanto, as vesículas liberadas continham material fibrilar semelhante ao encontrado nos vacúolos. Aparentemente foi possível acompanhar a liberação e fusão destas vesículas, dando forma a regiões de agregação de vacúolos com aspecto reticular (Fig. 3.17C, D e E). Os cloroplastos tanto jovens quanto maduros apresentaram tilacóides íntegros, bem preservados, com distâncias semelhantes entre si (Fig. 3.17E, F e G). Vacúolos maiores com conteúdo homogêneo também estavam presentes (Fig. 3.17G).

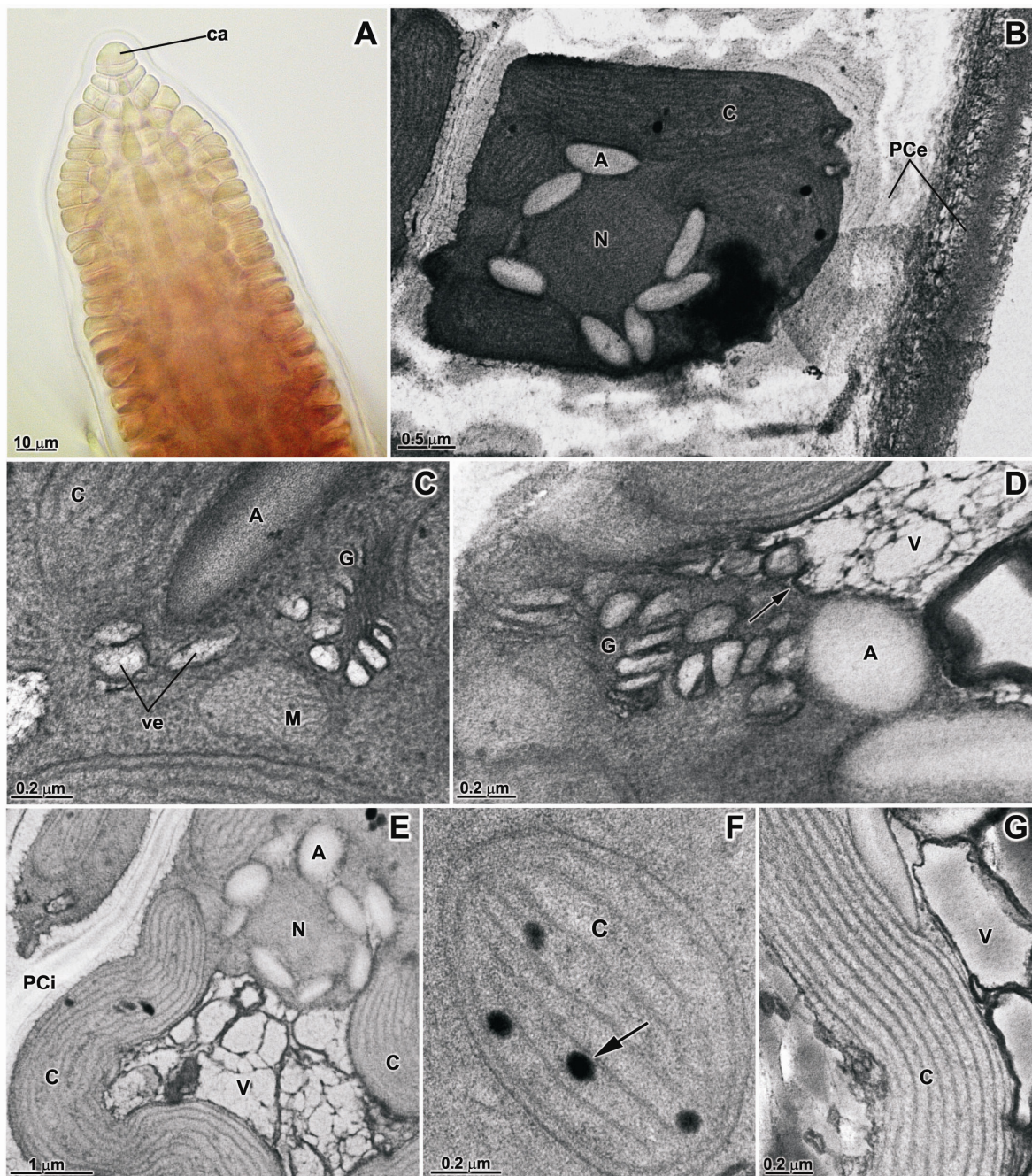


Figura 3.17: Plântulas de *Gelidium floridanum* do controle (PAR) com 15 dias. A) Microscopia de luz evidenciando o estágio de desenvolvimento e a célula de crescimento apical (ca) evidente. **B-G) Microscopia eletrônica de transmissão.** B) Célula periférica mostrando parede celular externa (PCe) espessa. C) Corpos de Golgi (G) liberando vesículas (ve) com material fibrilar. D) Várias vesículas de Golgi. A seta indica o provável sentido seguido pelas vesículas para fusão e formação de vacúolos (V) reticulares. E) Célula interna mostrando vista geral de vacúolos reticulares. Notar pequena quantidade de grãos de amido (A) dispostos ao redor do núcleo (N). PCi: parede celular interna. F) Cloroplasto (C) jovem com plastoglóbulos (seta). G) Cloroplasto maduro e vacúolos com conteúdo homogêneo.

As plântulas irradiadas por 15 dias apresentaram despigmentação na região de encurvamento do talo assim como a formação de expansões da parede celular (“abas”) (Fig. 3.18A). Em secção longitudinal do talo foi possível observar uma região de leve curvatura na porção mediana da plântula (Fig. 3.18B). Esta curvatura caracterizou uma região côncava que apresentou células com aspecto irregular, de esféricas a alongadas. Entre estas células foi possível observar uma camada de parede celular eletrônica-densa de natureza fibrilar (Fig. 3.18 B e D). A camada oposta, na região convexa, revelou-se formada por células com aspecto de taça, com aparente retração na parte apical. Estas células concentraram os cloroplastos parietais na região baso-lateral e os grãos de amido estavam distribuídos no centro, em torno do núcleo (Fig. 3.18 B e E). Toda a superfície da plântula apresentou-se revestida por uma parede espessa formada por uma região externa eletrônica-densa a qual reveste a segunda camada eletrônica-transparente (Fig. 3.18 D e F). Esta parede celular organizada em diferentes camadas (Fig. 3.18F), foi encontrada desestruturada e com aspecto reticular entre a região eletrônica-transparente e a região eletrônica-densa em outras regiões do talo (Fig. 3.18G). A região medular da plântula, em secção longitudinal, é formada por células caracteristicamente mais alongadas que aparentemente não mostraram alterações estruturais (Fig. 3.18B). Foi possível visualizar a conexão intercelular de células da medula, também sem alterações evidentes (Fig. 3.18C).

Em secção longitudinal, grupos de células da região medular, de algumas plântulas analisadas, apresentaram grande vacúolo com conteúdo predominantemente fibrilar. Estas células foram observadas em diferentes graus de preenchimento por estes vacúolos (Fig. 3.19A). Este preenchimento ocorreu de diversas maneiras. Por vezes, este material encontrou-se entre meio o conteúdo citoplasmático e, por vezes, na periferia celular entre a membrana plasmática e a parede celular (Fig. 3.19B e C). Em detalhe esta região mostrou que a região central da parede celular interna permanece homogênea enquanto o material depositado em ambos os lados desta é de aspecto reticular (Fig. 3.19D). Os cloroplastos apresentaram danos nos tilacóides, com visível desestruturação destes, assim como a formação de vesículas entre os cloroplastos (Fig. 3.19E). Foi possível observar células de rizóide, constituídas por reduzido material citoplasmático e espessas regiões eletrônica-transparente e eletrônica-densa da parede celular (Fig. 3.19F).

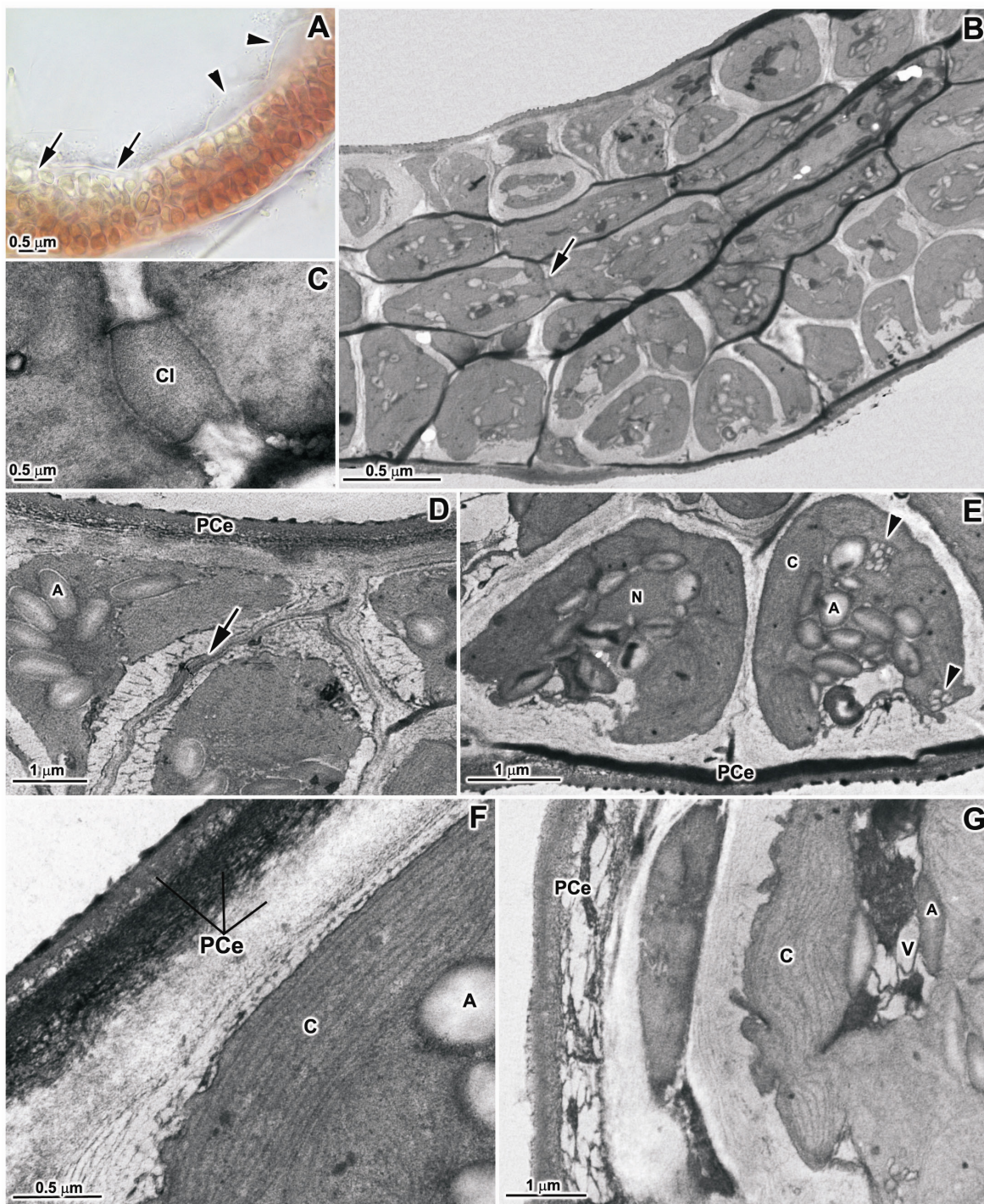


Figura 3.18: Plântulas de *Gelidium floridanum* expostas à PAR+UV-B ao longo de 15 dias. A) Microscopia de luz evidenciando a perda de pigmentação (setas) e a formação de “abas” (cabeças de setas). **B-G) Microscopia eletrônica de transmissão.** B) Secção longitudinal do talo mostrando as regiões corticais superior e inferior com espessamento de parede. A seta indica a localização da conexão intercelular (CI) medular. C) Conexão intercelular de célula da medula. D) Alterações de parede das células corticais superiores. A seta aponta a região central da parede celular interna (PCi). E) Espessamento de parede das células corticais inferiores. As cabeças de seta indicam corpos de Golgi (G) Notar aspecto de taça na morfologia celular. F) Parede celular externa (PCe) organizada. G) PCe desestruturada. A: amido; C: cloroplasto; N: núcleo; V: vacúolo.

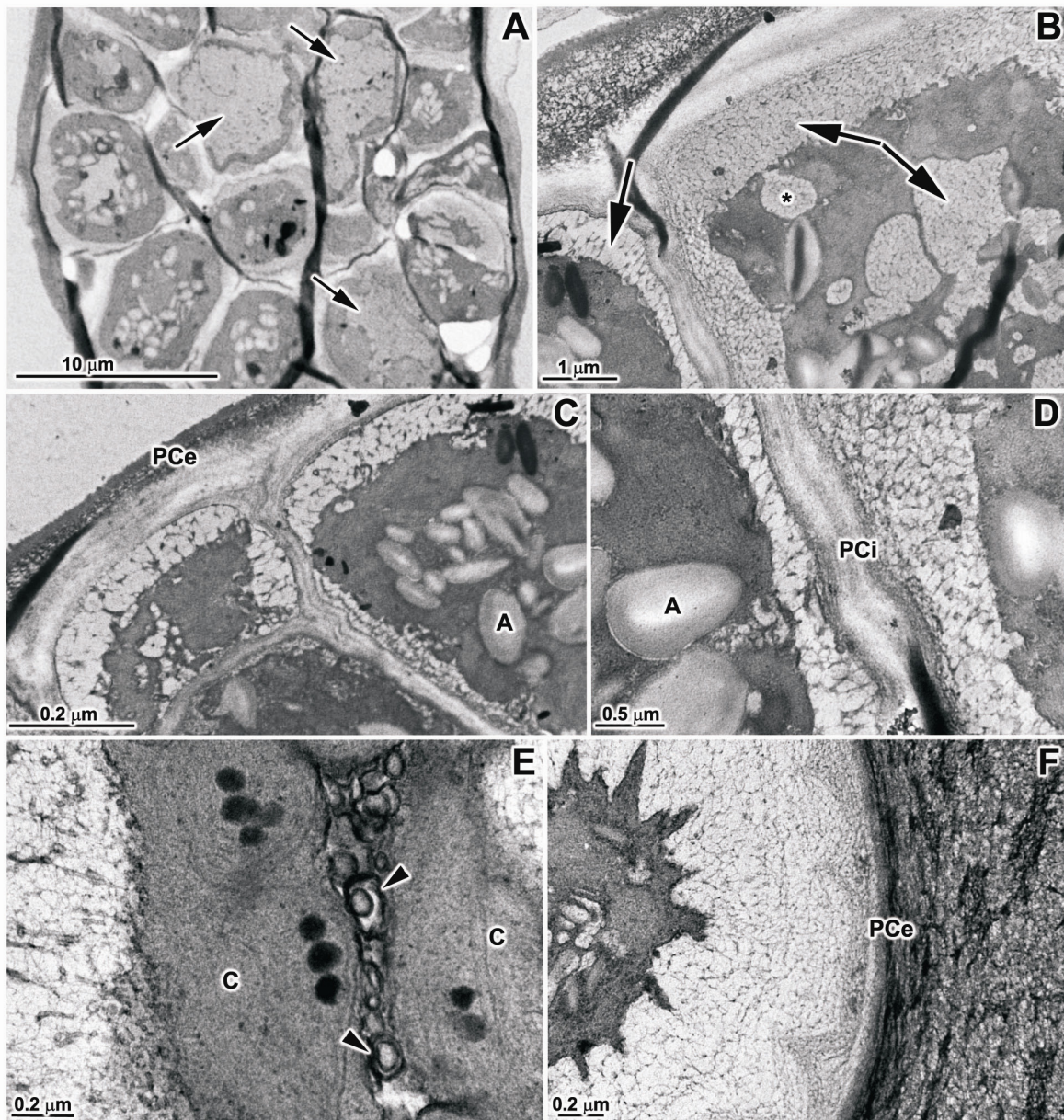


Figura 3.19: Plântulas de *Gelidium floridanum* expostas à PAR+UV-B ao longo de 15 dias. A) Secção longitudinal do talo mostrando diversidade de conteúdo celular. As setas mostram células preenchidas por material reticular. B) Células periféricas com material reticular (setas) no centro do conteúdo citoplasmático e na periferia celular entre a membrana plasmática (MP) e a parede celular externa (PCe). Notar vesícula (*) liberando conteúdo na periferia celular. A: amido. D) Detalhe da região central da parede celular interna (PCi) e material reticular em ambos os lados. E) Cloroplastos (C) danificados. Notar vesículas (cabeças de setas). F) Célula de rizóide com espessa parede em ambas as regiões eletron-transparente e eletron-densa.

3.3. Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre o crescimento em comprimento do talo

Quando recém liberados, os tetrásporos de *Gelidium floridanum* são esféricos, densamente pigmentados e possuem diâmetro médio de 22 μ m (entre 18,7 e 24,7 μ m). Esta medida é igual para a condição de controle e para a condição de exposição à radiação UV-B, uma vez que os tetrásporos de ambos os tratamentos são oriundos da mesma aquisição via espalhamento, assim como porque os esporos somente foram irradiados após a liberação.

Para comparar as condições controle e tratado nos diferentes tempos de exposição, foi utilizado o teste “t”, o qual possibilitou verificar com clareza que apenas para 3 dias de cultivo não existiram diferenças significativas ($p = 0.085$) de tamanho entre os tratamentos (39,28 μ m para o controle e 35,63 μ m para as plântulas expostas) (tabela 3.1).

Após 6 dias de cultivo, as plântulas controle apresentaram aproximadamente 2 vezes o tamanho das plântulas expostas (126 μ m e 68,26 μ m, respectivamente). Seguindo esta tendência, as plântulas de 9 dias de cultivo do controle apresentaram aproximadamente o triplo (2,65x) de tamanho quando comparadas as plântulas expostas.

Com 12 dias as plântulas controle tiveram um tamanho 5,32 vezes maior do que as plântulas expostas e, ao final do experimento, com 15 dias de cultivo, de aproximadamente 6 vezes (5,83) maior.

Tabela 3.1. Comparação entre as plântulas em desenvolvimento dos tratamentos 1) PAR (controle) e 2) PAR+UV-B (tratado), avaliadas através de medidas de comprimento do eixo maior ($x \pm ep$ = média \pm erro padrão), ao longo de 15 dias. O teste de significância t de Student ($p < 0,001$) foi utilizado para comparar os tratamentos ($n=30$). O asterisco (*) indica a existência de diferença estatística significativa.

Dias	PAR (μ m)		PAR+UV-B (μ m)		t	p
	Comprimento (μ m - $x \pm ep$)	Mín. Máx.	Comp. (μ m - $x \pm ep$)	Mín. Máx.		
3	39,28 \pm 1,36	22,92 51,21	35,63 \pm 1,66	10,7 54,72	1,786313	0,085
6	126,00 \pm 3,88	75,51 162,79	68,26 \pm 4,91	34,92 139,12	9,634430	<0,001*
9	301,44 \pm 9,39	182,4 399,00	113,60 \pm 5,40	60,13 184,67	15,77130	<0,001*
12	855,89 \pm 24,14	616,14 1103,82	160,71 \pm 12,34	56,18 375,78	30,63812	<0,001*
15	1399,99 \pm 43,98	832,13 1829,77	240,00 \pm 14,00	124,5 432,05	25,65349	<0,001*

A tendência observada para as plântulas expostas à radiação ultravioleta-B mostrou que estas mantêm o crescimento ao longo do tempo, muito embora este seja visivelmente reduzido em relação ao controle. O gráfico da figura 3.20 permite verificar as diferenças de crescimento do eixo maior do talo entre os tratamentos em cada amostragem.

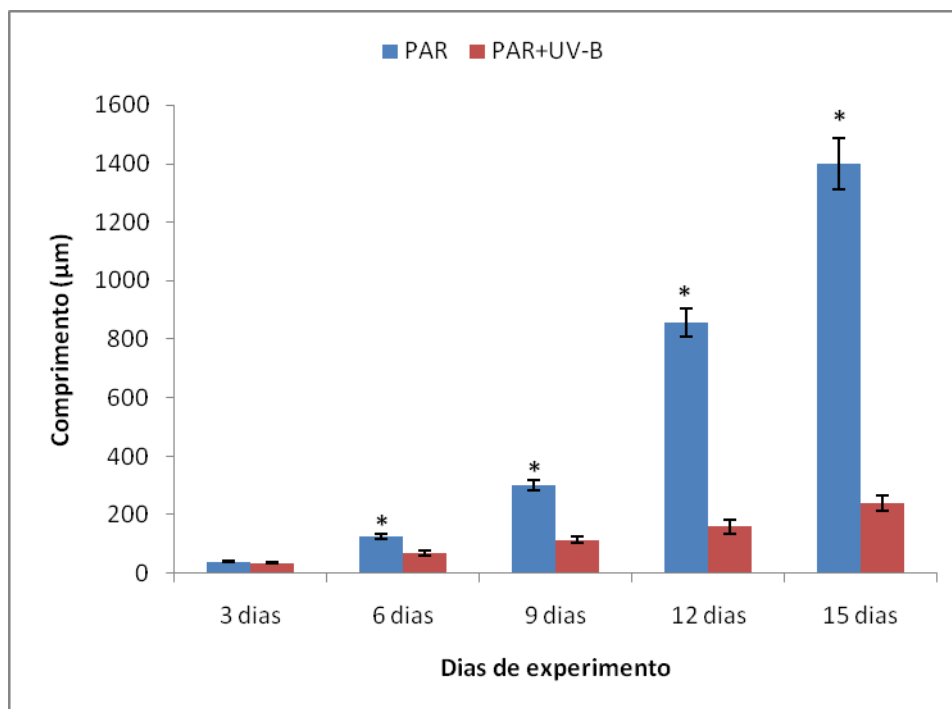


Figura 3.20. Desenvolvimento das plântulas de *G. floridanum* sob condições de controle (PAR) e exposição à radiação UV-B (PAR+UV-B), ao longo de 15 dias. Média do comprimento do eixo maior \pm intervalo de confiança (n=30). Os asteriscos (*) sobre as colunas indicam as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos para o respectivo tempo de exposição.

A análise de variância (anova) confirmou a existência de diferenças de tamanho para o controle (PAR) entre os dias de cultivo, exceto entre o terceiro e o sexto dia (Tukey=0,057). No caso do grupo exposto (PAR+UV-B) houve diferenças em relação ao tamanho das plântulas entre todos os dias de tratamento (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Análise unifatorial de variância dos dados de crescimento do eixo maior das plântulas de *G. floridanum*, ao longo de 15 dias de crescimento (3, 6, 9, 12 e 15 dias), para o controle (PAR) e para o tratado (PAR+UV-B) (* diferenças significativas).

Dias	g.l.	F	p
Controle	4, 145	628.4965	<0,001*
UV-B	4, 145	80.1798	<0,001*

3.4. Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a razão comprimento/largura (C/L) do talo

A razão comprimento/largura do talo mostrou diferenças significativas entre os tratamentos ao longo do tempo. A análise de variância (anova) em função do dia foi significativamente diferente ($F=305,3$), ou seja, a relação C/L aumentou com o tempo para ambos, controle e exposto.

Em relação ao tratamento, também foram observadas diferenças significativas ($F=641,8$), o que significa que o grupo controle (PAR) foi significativamente maior em relação a razão C/L do que o grupo tratado com PAR+UV-B. Nota-se que as linhas do gráfico da figura 3.21 têm taxas de variação da razão C/L bastante distintas.

Quando realizada a análise entre os dois fatores (dia e tratamento) esta também revelou ser significativa, evidenciando que com o tempo a dose de radiação UV-B interferiu acentuadamente, produzindo diferenças maiores sobre a razão comprimento-largura em comparação ao grupo controle (Figura 3.21). Desta forma, uma plântula de 15 dias é essencialmente mais afetada pelo tratamento do que uma plântulas de 3 ou 6 dias.

Tabela 3.3. Resultado da análise de variância de dois fatores (Fator 1: Dia; Fator 2: Tratamento) em relação a razão C/L ao longo de 15 dias.

	g.l	g.l	F	p
Dia	4	290	305,3	<0,001*
Tratamento	1	290	641,8	<0,001*
Dia*Tratamento	4	290	141,6	<0,001*

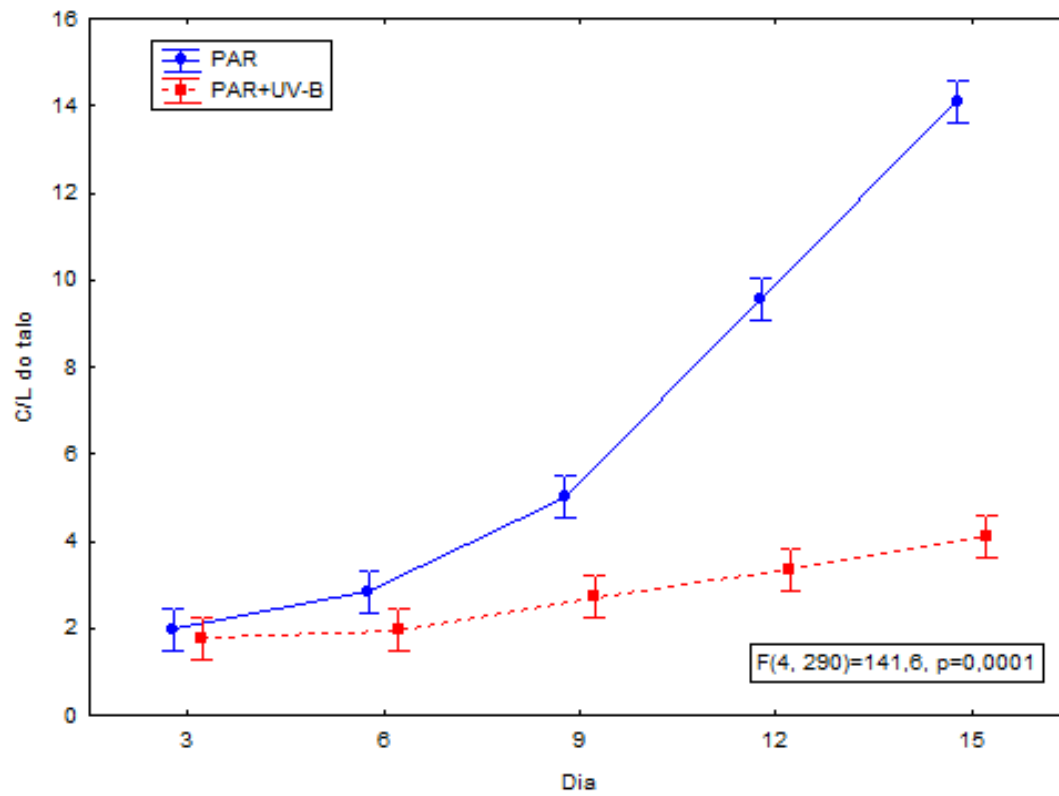


Figura 3.21. Razão C/L das plântulas de *Gelidium floridanum* expostas à PAR e PAR+UV-B, ao longo de 15 dias (média±dp; n=30).

3.5. Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre o processo germinativo

Com a realização dos experimentos, as plântulas apresentando talo ereto puderam também ser caracterizadas especificamente com relação ao comprimento médio a cada amostragem (6, 9, 12 e 15 dias) e, desta forma, o estágio GL foi subdividido. Assim, com 6 dias as plântulas controle apresentaram comprimento médio de 126 μ m (**GL-1**); com 9 dias, cerca de 300 μ m (**GL-2**); com 12 dias igual a 850 μ m (**GL-3**) e, com 15 dias, de 1400 μ m (**GL-4**).

É importante ressaltar que estes foram os aspectos encontrados em cada amostragem considerando o desenvolvimento padrão. No entanto, a ação da radiação UV-B interferiu potencialmente sobre o desenvolvimento das amostras irradiadas, revelando através de alterações morfológicas e principalmente da redução do crescimento, o atraso do processo germinativo característico desta espécie.

As análises mostraram que, em geral, as plântulas controle observadas apresentaram-se, em sua maioria, no mesmo estágio de desenvolvimento em cada amostragem e, portanto, apresentam homogeneidade de desenvolvimento. Em contrapartida, nas amostras irradiadas, as plântulas foram encontradas em várias fases de desenvolvimento, em cada amostragem, evidenciando heterogeneidade no desenvolvimento. Esta heterogeneidade evidencia o atraso do processo germinativo (Fig. 3.22A e B).

Com 3 dias de experimento tratado e controle apresentaram diferentes fases, ou seja, existiram tetrásporos e plântulas nos estágios M, MG, GT, GP e GM. No entanto, foi nítido que as plântulas controle encontraram-se majoritariamente no estágio GM. As plântulas irradiadas, por sua vez, foram visualizadas, em sua maioria, distribuídas entre os estágios anteriores, principalmente GT e GP.

No sexto dia, as plântulas controle encontravam-se em GL-1. Em contrapartida, as plântulas irradiadas com UV-B, apesar de ter um talo ereto fusiforme, este era um pouco mais afilado na extremidade da célula apical e mediam cerca de 68 μ m, caracterizados aquém do estágio GL-1 (126 μ m). Ao mesmo tempo, as formas anteriormente visualizadas em 3 dias, ainda foram observadas.

Com 9 dias as plântulas controle encontravam-se principalmente em estágio GL-2. Em contraste, as plântulas irradiadas mediram cerca de $114\mu\text{m}$ (podendo ser caracterizadas como GL-1) e, ainda apresentavam o estágio GM. Estas plântulas apresentaram alterações morfológicas acentuadas diferindo visivelmente das amostras controle. Com 12 dias, as plântulas controle foram encontradas no estágio GL-3. Por outro lado, as plântulas irradiadas atingiram em média $160\mu\text{m}$ (ainda GL-1) e, também, permanecem na fase GM. Finalmente, com 15 dias, ao passo que as amostras controle apresentavam-se como estágio GL-4, as amostras irradiadas apresentavam apenas $240\mu\text{m}$, podendo ser caracterizadas próximo de GL-2.

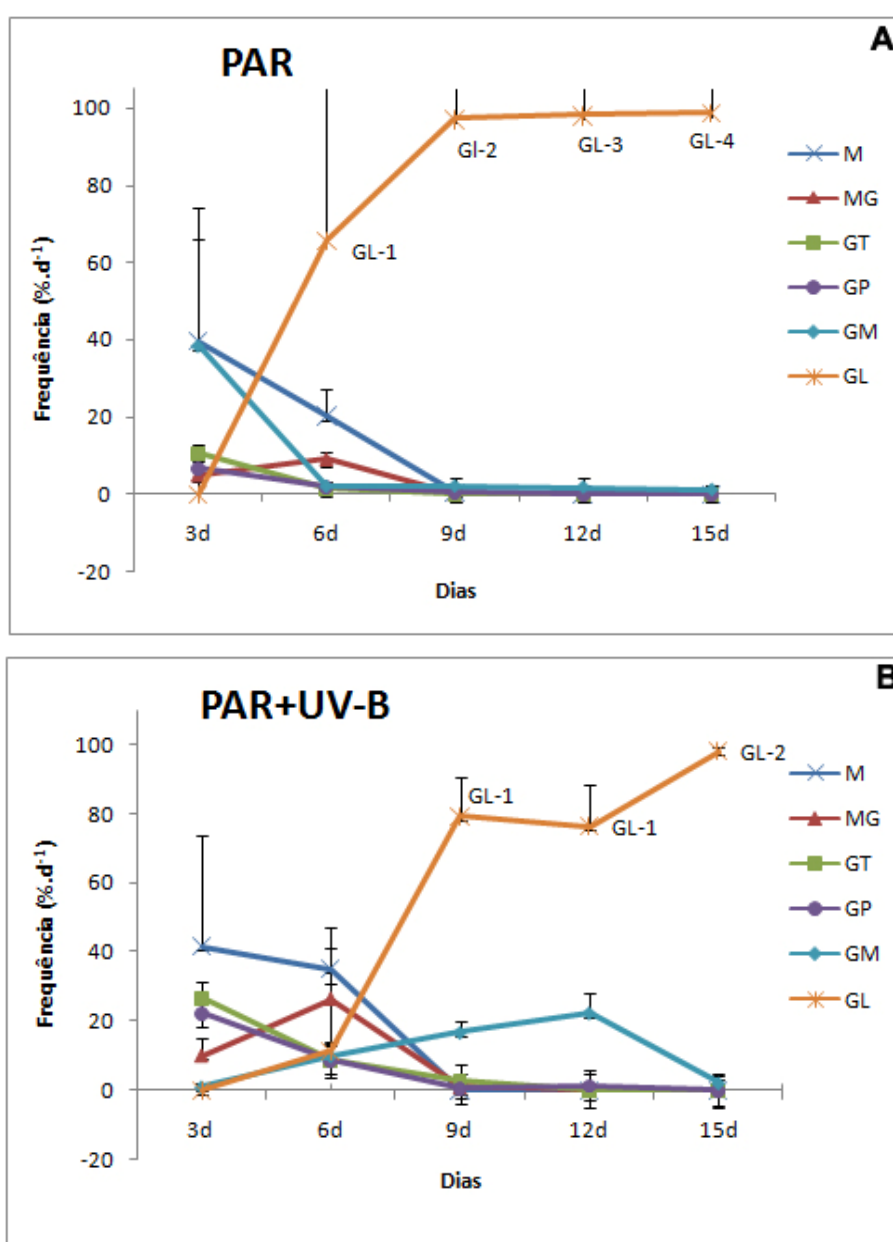


Figura 3.22. Frequência de tipos morfológicos encontrados ao longo do tempo, em ambos os tratamentos: A) controle (PAR) e B) exposto (PAR+UV-B).

3.6. Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a taxa de crescimento ao longo do tempo

A análise da taxa de crescimento, calculada a partir do comprimento do eixo maior das plântulas de *Gelidium*, ao longo do período total de experimento, revelou diferenças entre as plântulas controle e irradiadas. A radiação UV-B provocou severa redução do crescimento das plântulas tratadas. Uma análise detalhada para cada uma das datas de coleta de dados (3, 6, 9, 12 e 15) mostrou que houve variações diárias. As plântulas controle apresentaram maior crescimento para todas as datas quando comparada às plântulas irradiadas com UV-B e, igual a 27% ao dia considerando todo o período experimental. Por outro lado, o grupo exposto cresceu apenas 16%.d⁻¹. De acordo com o gráfico da taxa de crescimento (Figura 3.23) foi possível verificar um nítido crescimento de 3 para 6 dias, especialmente para o grupo controle, mas ambos cresceram. No entanto, de 6 para 9 dias, as plântulas tratadas apresentaram redução (21 para 17%). O crescimento foi retomado no grupo controle de 9 para 12 dias. Porém, 12 dias representou a fase de menor crescimento para o grupo exposto. De 12 a 15 dias o controle reduziu novamente o crescimento e o grupo exposto apresentou leve retomada deste.

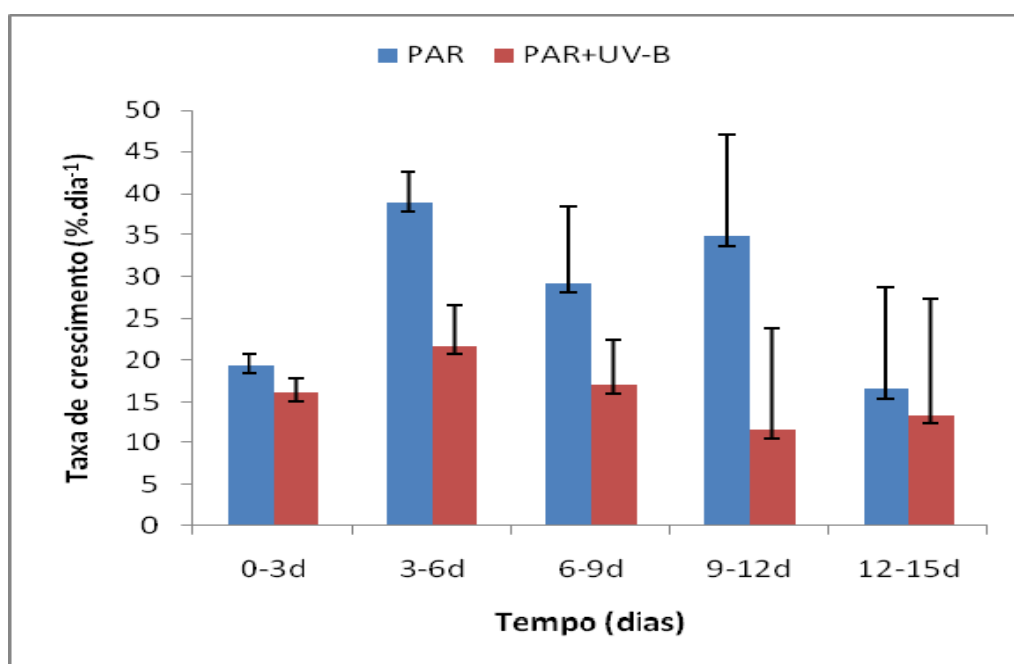


Figura 3.23. Taxa de crescimento apresentada por plântulas de *Gelidium floridanum* de ambos os tratamentos (PAR e PAR+UV-B), ao longo de 15 dias (n=30, x±erro padrão).

4. Discussão

Os resultados apresentados nesta dissertação mostraram que os tetrásporos de *Gelidium floridanum* sofreram significativas alterações morfológicas e ultraestruturais e tiveram seu crescimento potencialmente reduzido quando expostos à radiação UV-B. Estas alterações provavelmente estão relacionadas à maior sensibilidade dos estágios iniciais de desenvolvimento comparado aos respectivos talos adultos. Cada estágio de desenvolvimento (esporo, plântula, talo jovem, talo adulto) responde diferentemente aos diversos tipos de estresses ambientais e a tolerância a estes aumenta com a idade, conforme o indivíduo torna-se mais diferenciado e desenvolve melhores mecanismos de defesa (Dring *et al.*, 1996; Franklin e Forsten, 1997; Coelho *et al.*, 2000). Roleda *et al.* (2009a) demonstraram que mesmo propágulos de espécies insensíveis à radiação UV como *Urospora penicilliformis* apresentam leve sensibilidade quando comparados aos respectivos estágios adultos. Segundo Altamirano *et al.* (2003b) o conhecimento sobre a sensibilidade dos estágios iniciais de desenvolvimento é crucial, pois os estágios microscópicos podem produzir um efeito gargalo no processo de adaptação das comunidades de macroalgas em um cenário de crescente incidência de radiação UV-B, uma vez que o recrutamento das espécies depende da sobrevivência destes.

As principais estratégias adaptativas relacionadas com a qualidade e a intensidade luminosas já descritas para as algas vermelhas foram também verificadas para os tetrásporos de *G. floridanum*. Segundo Talarico e Maranzana (2000), estas estratégias, nas rodófitas, envolvem 1) alterações na anatomia do talo, considerando o indivíduo; 2) mudanças na parede celular e 3) diferenças na morfologia dos cloroplastos e na organização dos tilacóides, considerando a célula e tidas como adaptações a longo prazo; e, 4) alterações de pigmentação e na composição e funcionalidade das membranas fotossintéticas em nível molecular (aclimações a curto prazo).

A microscopia de luz tem sido uma ferramenta amplamente utilizada no estudo das fases iniciais do desenvolvimento e do processo germinativo das macroalgas frente à crescente exposição à radiação ultravioleta (Schoenwaelder *et al.*, 2003; Martínez, 2004; Wiencke *et al.*, 2004; Roleda *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2007). Observações da morfologia externa permitiram visualizar e identificar as respostas morfológicas dos indivíduos de *G.*

floridanum irradiados com RUV-B, tais como torções do talo, perda da pigmentação, redução e direção irregular do crescimento, estrangulamento da região apical, formação de “abas” (expansões da parede celular externa), encurvamento do talo e a formação de várias células apicais.

Todas estas alterações evidenciaram como uma das principais respostas das plântulas sendo o atraso do processo germinativo. Ao longo dos quinze dias de experimento, as plântulas de *G. floridanum* irradiadas germinaram lentamente. Este atraso foi visualizado em cada amostragem através da heterogeneidade de tipos morfológicos registrados. Em contrapartida, os tetrásporos da condição controle, mostraram gradual sequência das etapas do processo germinativo, revelando sincronia de fases. De maneira semelhante, Roleda *et al.* (2006) também mostraram atraso e/ou inibição da germinação para zoósporos de *Saccorhiza dermatodea* expostos a PAB (PAR+UVA+UVB), Mansilla *et al.* (2006) para tetrásporos germinando de *Gigartina skottsbergii* e *Sarcothalia crispata* expostos a PAR+UV-B (PB), Jiang *et al.* (2007) para conchósporos de *Porphyra haitanensis* expostos a PAB e Martínez (2004) para carpósporos e tetrásporófitos jovens de *Iridaea cordata* expostos a PB.

A maioria dos tetrásporos de *G. floridanum* expostos à radiação foi capaz de formar o tubo germinativo. Esta capacidade, no entanto, não foi observada para zoósporos de *Fucus serratus* e *F. distichus*, os quais não foram capazes de polarizar e formar o tubo germinativo e, por isso, permaneceram esféricos quando expostos a 1.2 W.m^{-2} . Tal resposta já foi citada também para embriões de ascídias, peixes e anfíbios sugerindo danos para o citoesqueleto (Schoenwaelder *et al.*, 2003).

Os tetrásporos germinados de *G. floridanum* expostos à RUV-B por 15 dias formaram várias células apicais, diferindo do padrão normal de desenvolvimento observado para os estágios iniciais de germinação desta espécie. Aparentemente, a formação de várias células apicais em estágio precoce é uma novidade no estudo com a RUV-B. Possivelmente, a formação de várias destas células teria o objetivo de formar novos ramos levando precocemente à diferenciação de um talo adulto. A formação de células apicais a partir de células corticais é um processo estabelecido com o intuito de ramificação do talo (Waaland, 1990). Entretanto, a formação de ramos em *G. floridanum* só deveria ocorrer em estágios mais avançados de desenvolvimento. Em adição, vários trabalhos como o de Ziska *et al.*, 2006, realizados com plantas superiores, mostraram que sob estresse da radiação UV-B, verificou-se a diminuição ou perda da dominância apical,

no processo de crescimento e diferenciação de *Manihot esculentum*, principalmente como consequência da destruição da auxina.

Segundo Rodrigo e Robaina (1997), as alterações fisiológicas guiam as variações morfológicas do esporo para o talo adulto. A morfologia final de um organismo depende da coordenação dos padrões de divisão e diferenciação celular. Cada um desses processos pode ser influenciado por fatores ambientais e/ou genéticos. Com relação ao crescimento, na maioria das Florideophyceae a divisão celular, visando o aumento do número de células em um filamento, ocorre através da célula apical. Como consequência, estabelece-se um gradiente ápice-basal na idade das células ao longo do talo. Células subapicais e corticais podem dividir, no entanto, para produzir ramos laterais e rizóides adventícios (Waaland, 1990).

Os principais danos sugeridos seriam prejuízos à região apical, com consequências para o crescimento em comprimento, assim como para o direcionamento deste crescimento. De igual forma, sugerem-se danos para o metabolismo como um todo, com prováveis desvios de rotas metabólicas, devido provavelmente a prejuízos para moléculas alvo como proteínas e ácidos nucleicos (DNA e RNA), que em conjunto regulam o crescimento. Estes danos justificariam também as diferenças encontradas para a razão comprimento/largura e para a taxa de crescimento entre as amostras controle e irradiadas de *G. floridanum*. Buma *et al.* (1996) relacionaram menor germinação e redução da taxa de crescimento a um atraso da mitose até que o DNA seja reparado.

O crescimento das plântulas de *G. floridanum* foi negativamente afetado pela radiação UV-B. Tal redução foi suportada pelo atraso do processo germinativo. O aumento na taxa de crescimento das plântulas tratadas, de 3 para 6 dias, no entanto, destoava dos trabalhos em geral, a exemplo de Navarro *et al.* (2008), para embriões de *Gigartina*. Em sua maioria, os primeiros dias de exposição causam drástica redução da taxa de crescimento e significaria um período de aclimatação da espécie. No entanto, as plântulas de *Gelidium* esboçaram uma primeira tentativa de retomar o crescimento, o que, para *Gigartina*, ocorreu apenas com 9 dias. A partir do sexto dia, no entanto, as plântulas de *Gelidium* irradiadas tiveram seu crescimento visivelmente reduzido até o décimo segundo dia. Assim como para embriões de *Macrocystis* (Navarro *et al.*, 2008), este declínio revelou-se acrescido de várias alterações morfológicas. Com 15 dias a diminuição na taxa de crescimento do grupo controle representaria a estabilização do crescimento e um provável direcionamento das vias metabólicas para outras funções dentro da sequência do

desenvolvimento, tais como o provável início da ramificação do talo. Quando acompanhado o crescimento em comprimento do eixo ereto, foi verificado apenas um discreto acréscimo neste de 12 para 15 dias. Em contrapartida, as plântulas tratadas com UV-B mostraram nova retomada do crescimento. Esta mostraria que, apesar de todos os prejuízos, as plântulas mantiveram seu crescimento, embora este tenha se apresentado potencialmente danificado, ocorrendo lentamente. Segundo Navarro *et al.* (2008) isto poderia representar capacidade de aclimatação. Segundo os autores, embriões de *Macrocystis* que sobrevivem apresentam capacidade de se aclimatar, pois foi observado que após 9 dias o crescimento foi retomado. Argumentam, ainda, que um dos mecanismos envolvidos na aclimatação seria o estabelecimento de barreiras físicas, como as alterações morfológicas, com o objetivo de proteger os tecidos ou parte deles.

O crescimento é um parâmetro importante que integra os efeitos do estresse aos vários processos bioquímicos dentro da célula. É, portanto, indispensável para estimar o impacto da depleção do ozônio e o resultante aumento da RUV-B, o qual limitaria a produtividade e afetaria a distribuição vertical das espécies na zona intertidal (Altamirano *et al.*, 2000, 2003a). Jiang *et al.* (2007) sugerem que a redução na expansão do talo, causada pela RUV-B, resultaria em uma menor capacidade de absorver luz e nutrientes para a fotossíntese quando ocorrer o sombreamento entre os indivíduos dentro da população. Tal fato seria especialmente significativo para estruturas diminutas como os esporos germinando, os quais precisam sobreviver, competir com o fitoplâncton por luz e nutrientes, enquanto são herbivorizados. Em condições de laboratório, estes parâmetros acima citados não estavam presentes e mesmo assim a redução de crescimento foi observada.

A perda do padrão normal de reprodução celular fez com que ocorresse, entre outras alterações, o encurvamento do talo. Este fenômeno foi anteriormente descrito por Martínez (2004) e Santos (2009) como sendo a mesma resposta para plântulas e ápices de *Iridaea cordata* e plântulas de *G. floridanum*, respectivamente. O encurvamento, na ausência de outras formas de proteção (frondes de outras algas, refúgios no substrato) poderia representar uma forma de garantir a região basal para a retomada de crescimento passado o estresse. Segundo Navarro *et al.* (2009) este mecanismo poderia ser considerado uma forma de aclimatação com o objetivo de reduzir a área exposta à RUV-B.

As investigações de ultraestrutura possibilitam localizar os danos no interior das células e, desta forma, endereçar e embasar as respostas fisiológicas observadas. As

consequências celulares e fisiológicas podem resultar em distúrbios e inibição da divisão celular, redução no crescimento, na reprodução, ou na fotossíntese (Holzinger e Lütz, 2006). As observações através da microscopia eletrônica de transmissão mostraram alterações celulares nas amostras irradiadas com UV-B, especialmente na região apical do talo. A ultraestrutura além de apontar os alvos, embasa a hipótese aqui sugerida de que a espécie enfrenta esta adversidade direcionando o seu metabolismo à sobrevivência e ao acúmulo de reservas, ao invés de investir em crescimento. A alocação das reservas varia diferentemente entre espécies e entre habitats (Santelices, 1990). Nas amostras irradiadas foi observada maior quantidade de grãos de amido, inclusive nas células da região apical, uma característica incomum, quando comparada ao controle. Este acúmulo de grãos de amido também foi observado em *Chlorella vulgaris* e *Gracilaria birdiae*, após exposição à RUV-B (Malanga *et al.*, 1997; Ayres, 2009). Os autores sugerem que o acúmulo ocorra provavelmente devido a incapacidade das células de mobilizar estes grãos, principalmente como consequência da destruição de membranas, com alterações na permeabilidade, assim como de enzimas, com danos para a fotossíntese. Entretanto, em *Kappaphycus alvarezii* a quantidade de grãos de amido reduziu em células expostas à RUV-B (Schmidt *et al.*, 2009). Desta forma, maiores detalhamentos das vias metabólicas seriam necessários para sustentar a hipótese de que o aumento ou a redução da produção de grãos de amido, influenciada pela RUV-B, é espécie específico.

Dentre os danos mais significativos relacionados à RUV-B destacam-se os do aparato fotossintético, que têm como resultado a diminuição da taxa fotossintética com consequências diretas para o crescimento. Tais danos geralmente estão associados à variação na proporção dos pigmentos fotossintéticos, danos a proteínas, ao DNA (celular ou do cloroplasto) e alterações nas membranas fotossintéticas. Diversos trabalhos mostram que a redução no desempenho fotossintético causado pela RUV é decorrente do enfraquecimento ou da destruição dos sítios de oxidação e do centro de reação do PSII (Roleda *et al.*, 2007). Isto se torna especialmente danoso quando é considerada a maturação do aparato fotossintético ocorrendo nos estágios iniciais, como os esporos germinando (Santelices, 90).

Sob análise ultraestrutural, as principais alterações dos cloroplastos de *G. floridanum* ocorreram nos tilacóides. Nas amostras irradiadas com UV-B os cloroplastos apresentaram ondulações, desintegração e redução do número de tilacóides. Quando da degradação total dos tilacóides a única forma de reconhecer um cloroplasto foi através da

dupla membrana. Holzinger *et al.* (2004) mostraram alterações ultraestruturais semelhantes para *Palmaria palmata* e *Odonthalia dentata*.

Nas plântulas irradiadas com UV-B foram observadas vesículas membranosas localizadas entre os tilacóides. Sugere-se que estas vesículas possam ser formadas por remanescentes de membranas a partir da ruptura dos tilacóides. Poppe *et al.* (2003) também citaram a formação de vesículas intratilacoidais para quatro espécies de macroalgas vermelhas (*Palmaria decipiens*, *P. palmata*, *Phycodrys austrogeorgica* e *Bangia atropurpurea*), sugerindo ser uma regra geral para os cloroplastos das rodófitas submetidos a RUV. Tal formação também já foi observada para plantas superiores (Bandle *et al.*, 1977). A ruptura dos tilacóides, o aumento do lúmen destes e, mesmo, a desintegração da dupla membrana do cloroplasto observadas por Poppe *et al.* (2003) tiveram implicações fisiológicas especialmente dificultando o estabelecimento do gradiente de prótons através da membrana dos tilacóides. Em continuidade, as plântulas de *G. floridanum* irradiadas também apresentaram significativo aumento no número e tamanho dos plastoglóbulos. O mesmo foi encontrado para esporos de *Laminaria hyperborea* (Steinhoff *et al.*, 2008) e para ápices do talo de *K. alvarezii* (Schmidt *et al.*, 2009).

Outra observação diz respeito à perda da pigmentação de maneira heterogênea ao longo do talo ou, muitas vezes, de forma concentrada nas regiões de encurvamento do talo exposto. Esta poderia ser comparada à falta de pigmentação da região apical do talo das amostras controle. Nesta última, os cloroplastos jovens ainda carecem de acúmulo de pigmentos refletido pela reduzida quantidade de tilacóides. Comparativamente, os danos visualizados aos cloroplastos das células das regiões despigmentadas diz respeito especialmente a menor presença de tilacóides, conseqüentemente, com prejuízos à produção de pigmentos. A foto destruição visível (perda de pigmentação) também foi observada para zoósporos de *Saccorhiza dermatodea* (Roleda *et al.*, 2006). Outra característica observada com relação à pigmentação da região apical foi que esta se apresentou muitas vezes maior nas plântulas irradiadas, também sob microscopia de luz. Por outro lado, a mesma região no controle apresentava-se despigmentada. Estes fatos permitem também sugerir que esta região, sob estresse da radiação UV-B, assumiria características de células mais maduras.

A menor quantidade de corpos de Golgi observada nas amostras irradiadas com UV-B também suporta a hipótese de redução do crescimento. Os corpos de Golgi são comuns em células vegetativas ativas, mas são especialmente encontrados durante a

esporogênese e em esporos. O número, o tamanho e o conteúdo dos corpos de Golgi variam como parte de uma sequência programada de atividades (Pueschel, 1990). O número de corpos e vesículas de Golgi foi reduzido nas amostras de *G. floridanum* irradiadas. Tal observação também foi destacada em trabalho realizado com a alga verde *Micrasterias denticulata* exposta à radiação UV-B (Meindl e Lütz, 1996), correspondendo a um visível distúrbio estrutural e funcional do complexo de Golgi, interferindo, por sua vez, na habilidade deste de produzir vesículas secretoras, o que conseqüentemente contribuiu para a inibição do crescimento. Tian e Yu (2009) também registraram as cisternas de Golgi frouxas e distorcidas para a alga unicelular *Dunaliella salina* expostas a RUV-B.

Nas regiões de crescimento, como o observado para as células apicais de *G. floridanum*, o grande número de corpos de Golgi deve ter o papel de sintetizador de compostos estruturais da parede celular, de membranas e de proteínas diversas necessárias e direcionadas à formação de novas células. Em contrapartida, o reduzido número de corpos de Golgi nas amostras irradiadas, quando comparado ao controle, reforça a hipótese do envolvimento desta organela com a proliferação celular. A presença de corpos de Golgi, embora reduzida, sugere que as sínteses decorrentes desta organela nas amostras irradiadas estariam direcionadas principalmente à produção dos compostos de parede, pois, em paralelo, foi observado que a parede celular tornou-se espessada quando as células foram expostas a RUV-B. Esta parede produzida não seria, portanto, utilizada para envolver novas células, mas acumulada como uma estrutura protetora. Este espessamento, como também observado por Talarico (1996) poderia ser interpretado como um mecanismo de defesa através do qual a alga aumenta a sua área de superfície no sentido de proteger células e as regiões mais internas do talo. Schmidt *et al.* (2009) também verificaram espessamento da parede celular das células corticais de *Kappaphycus alvarezii*. Em adição, Roleda *et al.* (2009b) concluíram que a existência natural de uma parede celular externa bastante espessa nos gametófitos de *Urospora penicilliformis* indicaria uma proteção natural desta espécie frente aos diferentes estresses, particularmente à UV-B, e justificaria a resiliência e a ocorrência desta espécie no médio e supra litoral, assim como a ausência de alterações ultraestruturais.

A associação de organelas tais como mitocôndrias, retículo endoplasmático, núcleos e cloroplastos, com a face cis dos corpos de Golgi, revelou-se presente em praticamente todas as amostras tanto do controle quanto tratadas. Esta é uma característica

marcante nas algas vermelhas (Pueschel, 1990). Tal proximidade proporcionaria uma maior eficiência no metabolismo celular segundo Oates e Cole (1989).

As mitocôndrias observadas no presente trabalho não apresentaram alterações visíveis em relação à morfologia quando as células foram submetidas à RUV-B. O mesmo também foi descrito por Schmidt *et al.* (2009) para os talos vegetativos de *K. alvarezii*. Em contrapartida Steinhoff *et al.* (2008) evidenciaram mudanças nas cristas das mitocôndrias nos esporos de *Laminaria hyperborea* e Tian e Yu (2009), estudando a alga unicelular *Dunaliella salina* (Chlorophyta), registraram mitocôndrias maiores e irregulares com possíveis danos ao ciclo de fosforilação e a respiração celular.

Apesar de não terem sido observadas alterações na estrutura membranosa das mitocôndrias, destacou-se a formação e o repetido acúmulo de grânulos eletron-densos na matriz mitocondrial. Sugere-se aqui que tais grânulos poderiam ser acúmulo de inclusões de polifosfato cálcio-associados. A habilidade destes em se ligar a íons representaria um possível papel desses grânulos na regulação do metabolismo mitocondrial (Peachey, 1964). McGill *et al.* (1973) registraram, via microscopia eletrônica, grânulos semelhantes aos visualizados no presente trabalho. No referido trabalho, estes grânulos também apresentaram maior ocorrência após a exposição de células de mamíferos a brometo de etídio. As mitocôndrias mantêm a homeostase da concentração de cálcio no meio intra e extramitocondrial. O acúmulo evidente de grânulos densos na matrix mitocondrial após tratamento com drogas e agentes tóxicos tem sido amplamente encontrado para células animais (Lehninger, 1983).

Os corpos membranosos observados nas análises ultraestruturais, no citoplasma das células irradiadas, têm sido descritos na literatura relacionada ao estresse da radiação UV (Martínez, 2004; Schmidt *et al.*, 2009), no entanto, por não serem estruturas universais, é difícil fazer afirmações e, sua real composição e funções ainda são incertas.

Inclusões proteicas, especialmente encontradas na forma de cristais ocorrem em praticamente todas as ordens de algas vermelhas. Estes geralmente possuem contornos poliédricos. Assume-se como função destes o armazenamento de proteínas ou nitrogênio para utilização posterior. Sugere-se também a possibilidade de serem mobilizados para suporte à reprodução (Pueschel, 1990, 1992). No presente trabalho, no controle de 6 dias, cristais de proteína foram encontrados livres no citoplasma, aparentemente, envoltos por uma membrana, estruturados com regiões eletron-densas e eletron-transparentes intercaladas e paralelamente distribuídas. Cristais semelhantes estruturalmente foram

encontrados em *Pterocladia caloglossoides* (Pueschel, 1992) e *Gelidium robustum* (Delivopoulos, 2003). Embora não tenham sido observados tais cristais nas amostras irradiadas do presente trabalho, Poppe *et al.* (2003) descreveram alterações da estrutura cristalina e a degradação destes cristais sob a ação da radiação UV em *Phycodryx austrogeorgica*, uma macroalga vermelha da Antártica. Os autores acreditam ser uma forma igualmente de deteriorização e de remobilização da reserva de proteína e de nitrogênio para processos de reparo.

Ao final de 15 dias, as plântulas irradiadas apresentaram uma resposta distinta entre os diferentes tipos celulares espacialmente localizados, quando visualizados em secção longitudinal. Células subcorticais e mais centrais ao longo do talo, apresentaram intensa produção de vacúolos grandes e com aspecto reticular. Tal vacuolização caracteristicamente localizada na periferia celular poderia representar uma alteração do metabolismo celular, direcionada à produção de uma camada protetora. A vacuolização como resposta à radiação UV-B já foi verificada para haptófitas, diatomáceas, para a alga verde *Micrasterias*, a qual apresentou a formação de vacúolos no citoplasma e, para a macroalga *Prasiola crispa* (Meindl e Lütz, 1996; Holzinger e Lütz, 2006).

As conexões intercelulares mostraram o mesmo padrão ao longo de todo o desenvolvimento e, assim como o núcleo aparentemente não apresentaram alterações ultraestruturais no presente trabalho. Steinhoff *et al.* (2008), no entanto, registraram o núcleo como o componente mais afetado nos esporos de *Laminaria hyperborea*.

Este trabalho não teve como objetivo analisar comparativamente os métodos de obtenção dos tetrásporos (tradicional ou por espalhamento), quanto ao seu desenvolvimento. Mas vale a pena registrar que, quando comparadas as observações referentes aos diferentes experimentos, os tetrásporos e plântulas do controle obtidos por meio de espalhamento, apresentaram um maior desenvolvimento do talo. Acredita-se que seja pelo fato de estarem desagrupadas e, por tanto, disporem de mais espaço e menor competição. Ao mesmo tempo, as plântulas expostas, apresentaram maior perda na pigmentação. A liberação dos esporos em grupos protege os mais internos, favorecendo a continuidade do desenvolvimento, enquanto os mais externos sofrem mais. Wiencke *et al.* (2004) fez esta mesma observação para grupos de esporos de *Alaria esculenta*, mostrando que os esporos mais centrais iniciavam a germinação enquanto os esporos mais externos, periféricos, não germinavam.

É conhecido que o gênero *Gelidium* apresenta o desenvolvimento de grande parte de seu ciclo de vida baseado na propagação vegetativa, por estolão. Ao mesmo tempo a razão tetrásporófito: gametófito: carporporófito ao longo do ano, na natureza, assim como para muitas outras macroalgas, não é semelhante (dominância de fases). No caso de *Gelidium*, no ambiente natural os tetrásporófitos são mais comumente encontrados e, de certa forma, este foi um dos principais requisitos que motivaram a utilização desta fase do ciclo no presente trabalho. Em adição, os tetrásporos desenvolvem-se com grande êxito sob condições laboratoriais, como também observado por Paula *et al.* (1988) para a mesma espécie. Como possuem um tipo de germinação (tipo *Gelidium*), o qual envolve caracteristicamente uma sequência de mudanças de forma ao longo do processo germinativo, esta espécie torna-se um objeto interessante no estudo da interferência da radiação UV-B sobre os processos celulares relacionados ao desenvolvimento das fases iniciais do ciclo de vida das macroalgas. Este possibilita o estudo e a compreensão de muitas questões de biologia celular relacionadas com a polarização, translocação de núcleos, deposição de parede e divisão celular. Zigotos de *Fucus* também apresentam uma série de importantes processos celulares que se assemelham em alguns aspectos a *Gelidium*, os quais já foram demonstrados serem negativamente afetados pela radiação UV-B (Altamirano *et al.*, 2003b).

Outra questão é que os tetrásporos são originados meioticamente e isto gera duas outras indagações: 1) são uma fase haplóide e por isso seriam mais sensíveis ao estresse ou, 2) justamente por apresentarem maior variabilidade genética seriam mais capazes de enfrentar condições de estresse? Esporos produzidos meioticamente, possuem potencial para aumentar significativamente a variabilidade genética que, por sua vez, aumenta as probabilidades de sobrevivência de pelo menos alguns indivíduos durante alterações ambientais. No entanto, a reprodução sexual envolve maiores gastos energéticos e de reserva do que a assexuada (Santelices, 1990). Esta discussão é aqui apresentada buscando compreender se esta fase do ciclo, os tetrásporos, seria realmente um bom modelo de estudo, considerando a baixa proporção de gametófitos encontrados no ambiente natural. No entanto, pelos resultados aqui constatados, talvez o estresse abiótico seja uma das principais razões pelas quais o sucesso no desenvolvimento dos gametófitos jovens seja reduzido.

O estresse à radiação UV-B é espécie e é dose-dependente (Altamirano *et al.*, 2003b). Considerando que a irradiância de $0,12\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ aplicada em laboratório é menor do

que a encontrada para o ambiente ($0,2W.m^{-2}$ – dado para a superfície terrestre) e, que testes simples (pontuais) realizados em campo, mostraram uma atenuação de até 50% para a faixa da zona eulitoral onde se encontram as populações de *Gelidium*, este fato ressalta que *G. floridanum* é uma espécie bastante sensível. Esta sensibilidade pode ser um dos fatores que contribuem para a dominância de fase. No entanto, acredita-se que haja carência de estudos com as diferentes fases e ploidias para se confirmar todo este questionamento, como ocorre com tantas outras espécies de rodófitas (a exemplo do trabalho de Roleda *et al.*, 2008). Por isso, o estudo aqui apresentado pode ser considerado como uma contribuição para estes questionamentos e estudos futuros.

5. Considerações finais e perspectivas futuras

Os dados experimentais aqui expostos evidenciaram grande sensibilidade dos estágios iniciais de vida de *G. floridanum* à radiação ultravioleta-B. Esta sensibilidade foi principalmente visualizada sobre o crescimento, a morfologia e a estrutura subcelular do aparato fotossintético e do organismo como um todo. As alterações em nível celular certamente desencadeiam as reações metabólicas que guiam as respostas observadas. Estas alterações foram visualizadas principalmente nos cloroplastos e corpos de Golgi. Ficou evidente que o complexo de Golgi é um componente chave na compreensão dos danos causados pela radiação UV-B sobre o crescimento e o pleno desenvolvimento das plântulas.

Dos indivíduos que conseguem sobreviver, é reduzido o número dos que conseguem se desenvolver normalmente. Em sua maioria, o padrão germinativo sofre notável alteração e embora as plântulas mantenham o crescimento, este é potencialmente reduzido. Desta forma, os tetrásporos que sobrevivem e se adaptam à exposição à radiação UV-B certamente enfrentarão de maneira diferenciada a continuidade do ciclo de vida.

Certamente, na natureza, a ocorrência de microambientes, proporcionados pelos talos adultos e refúgios no substrato, aumenta as chances de sobrevivência e de dispor de condições para enfrentar e se adaptar ao estresse proporcionado pela radiação UV-B. Por isso, é importante ressaltar que os resultados aqui apresentados são originados de experimentos laboratoriais e, fica registrada a sugestão para que sejam realizados estudos futuros em campo, que venham comparativamente a confirmar estes dados também para o ambiente natural.

Seria importante e interessante realizar um estudo para a espécie *G. floridanum* que comparasse a viabilidade entre as diferentes fases (tetrásporos, carpósporos e talo adulto). Antes disso, até mesmo análises relacionadas à ontogênese dos tetrásporos sob estresse da radiação UV, ainda são escassas. Este foi um trabalho inicial, que disponibiliza uma base de dados preliminar sobre o tema. Seria interessante ainda acompanhar o crescimento

destas plântulas e a extensão dessas alterações no talo adulto e sobre o ciclo de vida. Aliar análises quanto ao conteúdo de ágar também é essencial.

Estudos sobre a dinâmica e o histórico da dose de radiação UV-B sobre a superfície terrestre e seu respectivo alcance ao longo da coluna de água, para Florianópolis, fazem-se necessários.

Por fim, estudos futuros tornar-se-iam ainda mais interessantes ao associarem as análises de histoquímica, ultraestrutura e crescimento à ferramentas de marcação molecular, metodologias de dosagem do conteúdo de grãos de amido via extração, metodologias de análise da taxa fotossintética, metodologias de análise das vias de reparo ao DNA e verificação do conteúdo de compostos que absorvem esta faixa de radiação.

6. Referências bibliográficas

Aguilera, J., Dummermuth, A., Karsten, U., Schriek, R. and Wiencke, C. 2002. Enzymatic defenses against photooxidative stress induced by ultraviolet radiation in Arctic marine macroalgae. *Polar Biology*, 25: 432-441.

Altamirano, M., Flores-Moya, A. and Figueroa, F.L. 2000. Long-term effects of natural sunlight under various ultraviolet radiation conditions on growth and photosynthesis of intertidal *Ulva rigida* (Chlorophyceae) cultivated *in situ*. *Botanica Marina*, 43: 119-126.

Altamirano, M., Flores-Moya, A. and Figueroa, F.L. 2003a. Effects of UV radiation and temperature on growth of germlings of three species of *Fucus* (Phaeophyceae). *Aquatic Botany*, 75: 9-20.

Altamirano, M., Flores-Moya, A., Kuhlenkamp, R. and Figueroa, F.L. 2003b. Stage-dependent sensitivity to ultraviolet radiation in zygotes of the brown alga *Fucus serratus*. *Zygote*, 11: 101-106.

Amsler, C.D. and Neushul, M. 1989. Diel periodicity of spore release from the kelp *Nereocystis luetkeana* (Mertens) Postels *et* Ruprecht. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 134: 117-127.

Anggadiredja, J., Andyani, R. and Hayati, M. 1997. Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* (Phaeophyta) and *Laurencia obtusa* (Rhodophyta) from Seribu Islands. *Journal of Applied Phycology*, 9: 477-479.

Apple, M.E. and Harlin, M.M. 1994. Inhibition of tetraspore adhesion in *Champia parvula* (Rhodophyta). *Phycologia*, 34: 417-423.

Apple, M.E., Harlin, M.M. and Norris, J.H. 1996. Characterization of *Champia parvula* (Rhodophyta) tetraspore mucilage end rhizoids with histochemical stains and FITC-labelled lectins. *Phycologia*, 35: 245-252.

Armisen, R. 1991. Agar and agarose biotechnological applications. *Hydrobiologia*, 221: 157-166.

Ayres, L. M. 2009. Efeitos da radiação UV-B em variantes cromáticas de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): crescimento, conteúdo pigmentar, fotossíntese e ultra-estrutura. Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP. 146p.

Brandle, J.R., Campell, W.F., Sisson, W.B. and Caldwell, M.M. 1977. Net photosynthesis, electron transport capacity, and ultrastructure of *Pisum sativum* L. exposed to ultraviolet radiation. *Plant Physiology*, 60: 165-169.

- Besen, K. 2005. Avaliação comparada de variações temporais de características físico-químicas da água do mar em áreas de produção de moluscos de Santa Catarina – Brasil. Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 45p.
- Bischof, K., Hanelt, D. and Wiencke, C. 1998a. UV-radiation can affect depth zonation of Antarctic macroalgae. *Marine Biology*, 131: 597-605.
- Bischof, K., Hanelt, D., Tüg, H., Karsten, U., Brouwer, P.E.M. and Wiencke, C. 1998b. Acclimation of brown algal photosynthesis to ultraviolet radiation in Arctic coastal waters (Spitsbergen, Norway). *Polar Biology*, 20: 288-295.
- Bischof, K., Hanelt, D. and Wiencke, C. 2000. Effects of ultraviolet radiation on photosynthesis and related enzyme reactions of marine macroalgae. *Planta*, 211: 555-562.
- Bischof, K., Hanelt, D., Aguilera, J., Karsten, U., Voegelé, B., Sawall, T. and Wiencke, C. 2002a. Seasonal variation in ecophysiological patterns in macroalgae from an Arctic fjord: Sensitivity of photosynthesis to ultraviolet radiation. *Marine Biology*, 140: 1097-1106.
- Bischof, K., Krabs, G., Wiencke, C. and Hanelt, D. 2002b. Solar ultraviolet radiation affects the activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase and the composition of photosynthetic and xanthophylls cycle pigments in the intertidal green alga *Ulva lactuca* L. *Planta*, 215: 502-509.
- Björn, L.O. 2007. Stratospheric ozone, ultraviolet radiation, and cryptogams. *Biological Conservation*, 135: 326-333.
- Bouzon, Z.L., Ouriques, L.O. and Oliveira, E.C. 2005. Ultrastructure of tetraspore germination in the agar-producing seaweed *Gelidium floridanum* (Gelidiales, Rhodophyta). *Phycologia*, 44: 409-415.
- Bouzon, Z.L., Ouriques, L.C. and Oliveira, E.C. 2006. Spore adhesion and cell wall formation in *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Gelidiales). *Journal of Applied Phycology*, 18: 287-294.
- Bouzon, Z.L. and Ouriques, L.C. 2007. Characterization of *Laurencia arbuscula* spore mucilage and cell wall with stains and FITC-labelled lectins. *Aquatic Botany*, 86: 301-308.
- Buma, A.G.J., Zemmeling, H.J., Sjollem, K. and Gieskes, W.W.C. 1996. UV radiation modifies protein and photosynthetic pigment content, volume and ultrastructure of marine diatoms. *Marine Ecology Progress Series*, 142: 47-54.
- Cabrera, S., Bozzo, S. and Fuenzalida, H. 1995. Variation in UV radiation in Chile. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 28: 137-142.
- Carmona, R. and Santos, R. 2006. Is there an ecophysiological explanation for the gametophyte-tetrasporophyte ratio in *Gelidium sesquipedale* (Rhodophyta)? *Journal of Phycology*, 42: 259-269.

Chihara, M. and Kamura, S. 1963. On the germination of tetraspores of *Gelidiella acerosa*. *Phycologia*, 3: 69-74.

Coelho, S.M., Rijstenbil, J.W. and Brown, M. 2000. Impacts of anthropogenic stresses on the early development stages of seaweeds. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 7: 317-333.

Cordeiro-Marino, M. 1978. Rodofíceas bentônicas do estado de Santa Catarina. *Rickia*, 7: 37-38.

Cordi, B., Donkin, M.E., Peloquin, J., Price, D.N. and Depledge, N.H. 2001. The influence of UV-B radiation on the reproductive cells of the intertidal macroalga, *Enteromorpha intestinalis*. *Aquatic Toxicology*, 56: 1-11.

Correa, J., Avila, M. and Santelices, B. 1985. Effects of some environmental factors on growth of sporelings in two species of *Gelidium* (Rhodophyta). *Aquaculture*, 44: 221-227.

Diaz, S., Camilión, C., Deferrari, G., Fuenzalida, H., Armstrong, R., Booth, C., Paladini, A., Cabrera, S., Casiccia, C., Lovengreen, C., Pedroni, J., Rosales, A., Zagarese, H. and Vernet, M. 2006. Symposium-in-Print: UV effects on aquatic and coastal ecosystems. Ozone and UV radiation over Southern South America: Climatology and Anomalies. *Photochemistry and Photobiology*, 82: 834-843.

Delivopoulos, S.G. and Kugrens, P. 1985. Thylakoid formation from coiled lamellar bodies during carposporogenesis in *Faucheocolax attenuata* Setch. (Rhodophyta, Rhodymeniales). *Journal of Cell Science*, 75: 215-224.

Delivopoulos, S.G. 2003. Ultrastructure of cystocarp development in *Gelidium robustum*(Gelidiaceae: Gelidiales: Rhodophyta). *Marine Biology*, 142: 659-667.

Dring, M.J., Makarov, V., Schoschina, E., Lorenz, M. and Luning, K. 1996. Influence of ultraviolet radiation on chlorophyll fluorescence and growth in different life history stages of three species of *Laminaria* (Phaeophyta). *Marine Biology*, 126: 183-191.

Druehl, L.D. 1981. Geographical distribution. In: Lobban, C.S. and Wynne, M.J. (eds.). *The biology of seaweeds*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 306-325.

Fei, X.G. and Huarng, L.J. 1991. Artificial sporeling and field cultivation of *Gelidium* in China. *Hydrobiologia* 221: 119-124.

Ferreira, L.B. 2008. Diversidade intraespecífica em *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta): estudos fisiológicos na interpretação do polimorfismo de cor. Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP. 200p.

Fletcher, R.L. and Callow, M.E. 1992. The settlement, attachment and establishment of algal spores. *British Phycological Journal*, 27: 303-329.

- Flores-Moya, A., Posudin, Y.I., Fernández, J.A., Figueroa, F.L. and Kawai, H. 2002. Photomovement of the swimmers of the brown algae *Scytosiphon lomentaria* and *Petalonia fasciata*: effect of photon irradiance, spectral composition and UV dose. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 66: 134-140.
- Franklin, L.A. and Forster, R.M. 1997. The changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. *European Journal of Phycology*, 32: 207-232.
- Frederick, J.E. and Snell, H.E. 1988. Ultraviolet radiation levels during the Antarctic spring. *Science*, 241: 438-32.
- Friedlander, M. 2008. Advances in cultivation of Gelidiales. *Journal of Applied Phycology*, 20: 451-456.
- Gantt, E. 1990. Pigmentation and photoacclimation, In: Cole, K.M. and Sheath, R.G. (orgs.). *Biology of the red algae*. New York: Cambridge University Press, 203-220.
- Gómez, I. and Figueroa, F.L. 1998. Effects of solar UV stress on chlorophyll fluorescence kinetics of intertidal macroalgae from southern Spain: a case study in *Gelidium* species. *Journal of Applied Phycology*, 10: 285-294.
- Gómez, I., Figueroa, F.L., Sousa-Pinto, I., Viñebla, B., Pérez-Rodríguez, E., Maestre, C., Coelho, S., Felga, A. and Pereira, R. 2001. Effects of UV radiation and temperature on photosynthesis as measured by PAM fluorescence in the red alga *Gelidium pulchellum* (Turner) Kützinger. *Botanica Marina*, 44: 9-16.
- Häder, D.P., Kumar, H.D., Smith, R.C. and Worrest, R.C. 1998. Effects on aquatic ecosystems. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 46: 53-68.
- Häder, D.P., Kumar, H.D., Smith, R.C. and Worrest, R.C. 2007. Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate changes. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 6: 267-285.
- Holzinger, A., Lutz, C., Karsten, U. and Wiencke, C. 2004. 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.
- Holzinger, A., Karsten, U., Lutz, C. and Wiencke, C. 2006. Ultrastructure and photosynthesis in the supralittoral green macroalga *Prasiola crispa* (Lightfoot) Kützinger from Spitsbergen (Norway) under UV exposure. *Phycologia*, 45(2): 168-177.
- Holzinger, A. and Lütz, C. 2006. Algae and UV irradiation: effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron*, 37: 190-207.
- Huovinen, P.S., Oikari, A.O.J., Soimasuo, M.R. and Cherr, G.N. 2000. Impact of UV radiation on the early development of the giant kelp (*Macrocystis pyrifera*) gametophytes. *Photochemistry and Photobiology*, 72 (3): 308-313.

- Hudson, J.B., Kim, J.H., Lee, M.K., Dewreede R.E. and Hong, Y.K. 1999. Antiviral compounds in extracts of Korean seaweeds: evidence for multiple activities. *Journal of Applied Phycology*, 10: 427-434.
- Jiang, H., Gao, K. and Hebling, W. 2007. Effects of solar UV radiation on germination of conchospores and morphogenesis of sporelings in *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta). *Marine Biology*, 151: 1751-1759.
- Johansson, G. and Snoeijs, P. 2002. Macroalgal photosynthetic responses to light in relation to thallus morphology and depth zonation. *Marine Ecology Progress Series*, 244: 63-72.
- Kramer, G.F., Norman, H.A., Krizek, D.T. and Mirecki, R.M. 1991. Influence of UV-B radiation on polyamines, lipid peroxidation and membrane lipids in cucumber. *Phytochemistry*, 30: 2101-2108.
- Kirchhoff, V. W. J. H. 1995. *Ozônio e Radiação UV-B*. Transtec Editorial, 149p.
- Kirchhoff, V.W.J.H., Schuch, N.J., Pinheiro, D.K. and Harris, J.M. 1996. Evidence for ozone hole perturbation at 30° South. *Atmospheric Environmental*, 30: 1481-1488.
- Kirchhoff, V.W.J.H., Echer, E., Leme, N.P e Silva, A.A. 2000. A variação sazonal da radiação ultravioleta solar biologicamente ativa. *Journal of Geophysical Research*, 18: 63-74.
- Lee, T.M. and Shiu, C.T. 2009. Implications of mycosporine-like amino acid and antioxidant defenses in UV-B radiation tolerance for the algae species *Pterocladia capillacea* and *Gelidium amansii*. *Marine Environmental Research*, 67: 8-16.
- Lehninger, A.L. 1983. The possible role of mitochondria and phosphocitrate in biological calcification. In: P. Westbroek (ed.). *Biom mineralization and biological metal accumulation*. Dordrecht: D. Retdel Publishing Company, 107-120.
- Lippert, H., Iken, K., Rachor, E. and Wiencke, C. 2001. Epifauna associated with macroalgae in the Kongsfjord. *Polar Biology*, 24: 512-522.
- Lobban, C.S. and Harrison, P.J. 1994. *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, 366p.
- Lotze, H.K., Worm, B., Molis, M. and Wahl, M. 2002. Effects of UV radiation and consumers on recruitment and succession of a marine macrobenthic community. *Marine Ecology Progress Series*, 243: 57-66.
- Lucas, R., McMichael, T., Smith, W. and Armstrong, B. 2006. Solar ultraviolet radiation: global burden of disease from solar ultraviolet radiation. In: *Environmental burden of disease series no. 13*. World Health Organization, 258p.

Lütz, C., Seidlitz, H.K. and Meindl, U. 1997. Physiological and structural changes in the chloroplast of the green alga *Micrasterias denticulata* induced by UV-B simulation. *Plant Ecology*, 128: 55-64.

Madronich, S., McKenzie, R.L., Björn, L.O. and Caldwell, M.M. 1998. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 46: 5-19.

McLachlan, J. 1973. Growth media-marine. In: Stein, J.R. (ed). *Culture Methods and Growth Measurements. Handbook of Phycological Methods*. Cambridge University Press. Cambridge, 25-51.

McGill, M., Hsu, T.C. and Brinkley, B.R. 1973. Electron-dense structures in mitochondria induced by short-term ethidium bromide treatment. *The Journal of Cell Biology*, 59: 260-265.

Makarov, M.V. and Voskoboinikov, G.M. 2001. The influence of ultraviolet-B radiation on spore release and growth of the kelp *Laminaria saccharina*. *Botanica Marina*, 44: 89-94.

Malanga, G., Calmanovici, G. and Puntarulo, S. 1997. Oxidative damage to chloroplasts from *Chlorella vulgaris* exposed to ultraviolet-B radiation. *Physiologia Plantarum*, 101: 455-462.

Mansilla, A., Werlinger, C., Palacios, M., Navarro, N.P and Cuadra, P. 2006. Effects of UVB radiation on the initial stages of growth of *Gigartina skottsbergii*, *Sarcothalia crispata* and *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 18: 451-459.

Marín, S.L., Westermeier, R. and Melipillan, J. 2002. Simulation of alternative management strategies for red algae, luga roja (*Gigartina skottsbergii* Setchell and Gardner) in southern Chile. *Ecological Modelling*, 154: 121-133.

Martínez, N.N. 2004. Efeitos da radiação UVB em *Iridaea cordata* (Gigartinales, Rhodophyta). Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP. 87p.

McHugh, D. J. 2003. A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper No. 441. Roma. 105p.

Meindl, U. and Lütz, C. 1996. Effects of UV irradiation on cell development and ultrastructure of the green alga *Micrasterias*. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 36: 285-292.

Müller, R., Wiencke, C. and Bischof, K. 2008. Interactive effects of UV radiation and temperature on microstages of Laminariales (Phaeophyceae) from the Arctic and North Sea. *Climate Research*, 37: 203-213.

Murphy, T.M. 1983. Membranes as targets of ultraviolet radiation. *Physiologia Plantarum*, 58: 381-388.

- Navarro, N.P., Mansilla, A. and Palacios, M. 2008. UVB effects on early developmental stages of commercially important macroalgae in southern Chile. *Journal of Applied Phycology*, 20 (5): 897-906.
- Navarro, N.P., Mansilla, A. and Plastino, E.M. 2009. *Iridaea cordata* (Gigartinales, Rhodophyta): responses to artificial UVB radiation. *Journal of Applied Phycology*, [online] DOI 10.1007/s10811-009-9470-5.
- Ngan, Y. and Price, R. 1983. Periodicity of spore discharge in tropical Florideophyceae (Rhodophyta). *European Journal of Phycology*, 18: 83-95
- Oates, B.R. and Cole, K.M. 1989. Organelle association in developing trichoblasts of *Polysiphonia hendryi* (Rhodophyta, Ceramiales). *European Journal of Phycology*, 24 (4): 339-345.
- Oliveira, E.C. e Paula, E.J. 1974. Estudos sobre a germinação de esporos de rodofíceas do litoral brasileiro. *Anais da Sociedade Botânica do Brasil*, 125-133.
- Oliveira, E.C. 2003. *Introdução a Biologia Vegetal*. 2a Ed. Edusp- Editora da Universidade de São Paulo, 266p.
- Ouriques, L.C. 2002. Padrões de germinação e aspectos ultra-estruturais de esporos de Rhodophyta. Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Rio Claro, SP. 107p.
- Ouriques, L.C. and Bouzon, Z.L. 2003. Ultrastructure of germinating tetraspores of *Hypnea musciformis* (Gigartinales, Rhodophyta). *Plant Biosystems*, 137: 193-202.
- Ouriques, L.C. and Bouzon, Z.L. 2005. Spore development in red algae. A case study with *Nemalion helminthoides* (Nemaliales, Rhodophyta). *Algological Studies*, 116: 115-127.
- Pang, S.J. and Lüning, K. 2006. Tank cultivation of the red alga *Palmaria palmata*: Year-round induction of tetrasporangia, tetraspore release in darkness and mass cultivation of vegetative thalli. *Aquaculture*, 252: 20-30.
- Paula, E.J., Ugadim, Y. e Shintani, R.S. 1988. *Gelidium floridanum* Taylor (Rhodophyta – Gelidiaceae) Observações na natureza e em cultivo no laboratório. *Gayana Botanica*, 45 (1-4): 379-390.
- Peachey, L.D. 1964. Electron microscopic observations on the accumulation of divalent cations in intramitochondrial granules. *The Journal of Cell Biology*, 20: 95-111.
- Pereira, R.C. e Soares-Gomes, A. 2009. *Biologia Marinha*. 2a Ed. Interciência. 631p.
- Poppe, F., Hanelt, D. and Wiencke, C. 2002. Changes in ultrastructure, photosynthetic activity and pigments in the Antarctic red alga *Palmaria decipiens* during acclimation to UV radiation. *Botanica Marina*, 45; 253-261.

- Poppe, F., Schmidt, R.A.M., Hanelt, D. and Wiencke, C. 2003. Effects of UV radiation on the ultrastructure of several red algae. *Phycological Research*, 51: 11-19.
- Pueschel, C.M. and Cole, K.M. 1985. Ultrastructure of germinating carpospore of *Porphyra variegata* (Kjellm.) Hus (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Phycology*, 21: 146-154.
- Pueschel, C.M. 1990. Cell structure. In: Cole, K.M. and Sheath, R.G. (eds.). *Biology of the Red Algae*. Cambridge: Cambridge University Press, 7-41.
- Pueschel, C.M. 1992. An ultrastructural survey of the diversity of crystalline, proteinaceous inclusions in red algal cells. *Phycologia*, 31(6): 489-499.
- Rodrigo, M. and Robaina, R.R. 1997. Stress tolerance of photosynthesis in sporelings of the red alga *Grateloupia doryphora* compared to that of Stage III thalli. *Marine Biology*, 128: 689-694.
- Rojas, R.H., León, N.M., and Rojas, R.O. 1996. Practical and descriptive techniques for *Gelidium rex* (Gelidiales, Rhodophyta) culture. *Hydrobiologia*, 326/327: 367-370.
- Roleda M.Y., Van de Poll, W.H., Hanelt, D. and Wiencke, C. 2004. 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 Progress Series*, 281: 37-50.
- Roleda, M.Y., Wiencke, C. and Lüder, U.H. 2006. Impact of ultraviolet radiation on cell structure, UV-absorbing compounds, photosynthesis, DNA damage and germination in zoospores of Arctic *Saccorhiza dermatodea*. *Journal of Experimental Botany*, 57(14): 3847-3856.
- Roleda, M.Y., Wiencke, C., Hanelt, D. and Bischof, K. 2007. Sensitivity of the early life stages of macroalgae from the northern hemisphere to ultraviolet radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 83: 851-862.
- Roleda, M.Y., Zacher, K., Wulff, A., Hanelt, D. and Wiencke, C. 2008. Susceptibility of spores of different ploidy levels from Antarctic *Gigartina skottsbergii* (Gigartinales, Rhodophyta) to ultraviolet radiation. *Phycologia*, 47(4): 361-370.
- Roleda, M.Y., Campana, G.L., Wiencke, C., Hanelt, D., Quartino, M.L. and Wulff, A. 2009a. Sensitivity of Antarctic *Urospora penicilliformis* (Ulotrichales, Chlorophyta) to ultraviolet radiation is life-stage dependent. *Journal of Phycology*, 45: 600-609.
- Roleda, M.Y., Lütz-Meindl, U., Wiencke, C. and Lütz, C. 2009b. Physiological, biochemical, and ultrastructural responses of the green macroalga *Urospora penicilliformis* from the Arctic Spitesbergen to UV radiation. *Protoplasma*, [online] DOI: 10.1007/s00709-009-0037-8.
- Rousseaux, M.C.; Ballaré, C.L., Giordano, C.V., Scopel, A.L., Zima, A.M., Swarcberg-Bracchitta, M., Searles, P.S., Caldwell, M.M. and Díaz, S.B. 1999. Ozone depletion and

UVB radiation: impact on plant DNA damage in southern South America. *Proceedings of National Academic Sciences-United States America*, 96: 15310-15315.

Roy, S. 2000. Strategies for the minimization of UV-induced damage. In: Mora, S., Demers, S. and Vernet, M. (eds.). *The effects of UV radiation in the marine environment*. Cambridge: Cambridge University Press, 177-205.

Salgado, C.A.R.C. 2000. Comparação da distribuição vertical do ozônio em altas e baixas latitudes. *Brazilian Journal of Geophysics*, 18 (1): 99-100.

Santee, M.L., Read, W.G., Waters, J.W., Froidevaux, G.L., Manney, G.L., Flower, D.A., Jarnot, R.F., Harwood, R.S. and Peckham, G.E. 1995. Interhemispheric differences in polar stratospheric HNO₃, H₂O, ClO and O₃. *Science*, 267: 849-852.

Santelices, B. 1977. A taxonomic review of Hawaiian Gelidiales (Rhodophyta). *Pacific Scientific*, 31: 61-84.

Santelices, B. 1988. *Algas Marinas Chilenas*. Ediciones Universidad Católica de Chile, 399p.

Santelices, B. 1990. Patterns of reproduction, dispersal and recruitment in seaweeds. In: Barnes, H. and Barnes, M. (eds.). *Oceanography and Marine Biology. An annual review*. Aberdeen University Press, 28: 177-276.

Santelices, B. 1991. Production ecology of *Gelidium*. *Hydrobiologia*, 221: 31-44.

Santos, F.T. 2009. Influência da radiação UVB no desenvolvimento de plântulas de *Gelidium floridanum* (Rhodophyta). Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC. 48p.

Schmidt, E.C., Scariot, L.A., Rover, T. and Bouzon, Z.L. 2009. 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 (8): 860-869.

Schoenwaelder, M.E.A., Wiencke, C., Clayton, M.N. and Glombitza, K.W. 2003. The effect of elevated UV radiation on *Fucus* spp. (Fucales, Phaeophyta) zygote and embryo development. *Plant Biology*, 5: 366-377.

Sinha, R.P., Barbieri, E.S., Lebert, M., Helbling, E.W. and Häder, D.P. 2003. Effects of solar radiation on phycobiliproteins of marine red algae. *Trends in Photochemistry and Photobiology*, 10: 149-157.

Soeder, C. and Stengel, E. 1974. Physico-chemical factors affecting metabolism and growth rate. In: Stewart, W.D.P. (ed.). *Algal Physiology and Biochemistry*. London: Blackwell Scientific Publications, 714-740.

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

Steinhoff, S.F., Wiencke, C., Müller, R. and Bischof, K. 2008. Effects of ultraviolet radiation and temperature on the ultrastructure of zoospores of the brown macroalga *Laminaria hyperborea*. *Plant Biology*, 10: 388-397.

Tala, F., Véliz, K., Gómez, I. and Edding, M. 2007. Early life stages of the South Pacific kelps *Lessonia nigrescens* and *Lessonia trabeculata* (Laminariales, Phaeophyceae) show recovery capacity following exposure to UV radiation. *Phycologia*, 46 (4): 467-470.

Talarico, L. 1996. Phycobiliproteins and phycobilisomes in red algae: adaptive responses to light. *Scientia Marina*, 60: 205-222.

Talarico, L. and Maranzana, G. 2000. Light and adaptive responses in red macroalgae: an overview. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 56: 1-11.

Tedetti, M. and Sempère, R. 2006. Penetration of ultraviolet radiation in the marine environment. A review. *Photochemistry and Photobiology*, 82: 398-397.

Tian, J. and Yu, J. 2009. Changes in ultrastructure and responses of antioxidant systems of algae (*Dunaliella salina*) during acclimation to enhanced ultraviolet-B radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 97: 152-160.

Vadas, R.L.Sr., Johnson, S. and Norton, T.A. 1992. Recruitment and mortality of early post-settlement stages of benthic algae. *European Journal of Phycology*, 27 (3), 331-351.

Van de Poll, W., Eggert, A., Buma, A. and Breeman, A. 2001. Effects of UV-induced DNA damage and photoinhibition on growth of temperate marine red macrophytes: habitat-related differences in UV-B tolerance. *Journal of Phycology*, 37: 30-37.

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

Vincent, W.F. and Neale, P. 2000. Mechanisms of UV damage to aquatic organisms. *In*: Mora, S., Demers, S. and Vernet, M. (eds.). *The effects of UV radiation in the marine environment*. Cambridge: Cambridge University Press, 149-176.

Vignon, M.R., Rochas, C., Vuong, R., Tekely, P. and Chanzy, H. 1994. *Gelidium sesquipedale* (Gelidiales, Rhodophyta) II. An ultrastructural and morphological study. *Botanica Marina*, 37: 331-340.

Zacher, K., Roleda, M.Y., Hanelt, D. and Wiencke, C. 2007. UV effects on photosynthesis and DNA in propagules of three Antarctic seaweeds (*Adenocystis utricularis*, *Monostroma harti* and *Porphyra endiviifolium*). *Planta*, 225: 1505-1516.

Zacher, K., Roleda, M.Y., Wulff, A., Hanelt, D. and Wiencke, C. 2009. Responses of Antarctic *Iridaea cordata* (Rhodophyta) tetraspores exposed to ultraviolet radiation. *Phycological Research*, 57: 186-193.

Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. 4a ed. Prentice-Hall, Inc. 663p.

Zaremba, T.G., Lebon, T.R., Millar, D.B., Smejkal, R.M. and Hawley, R.J. 1984. Effects of ultraviolet light on the in vivo assembly of microtubules. *Biochemistry*, 23: 1073-1080.

Zepp, R.G., Callaghan, T.V. and Erickson, D.J. 1998. Effects of enhanced solar ultraviolet radiation on biogeochemical cycles. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 46: 69-82.

Ziska, L.H., Teramura, A.H., Sullivan, J.H. and McCoy, A. 2006. Influence of ultraviolet-R (UV-B) radiation on photosynthetic and growth characteristics in field-grown cassava (*Manihot esculentum* Crantz). *Plant, Cell & Environment*, 16 (1):73-79.

Yokoya, N.S. 1989. Influência da temperatura e salinidade no crescimento de algumas espécies de agarófitas e carragenófitas – implicações práticas e biogeográficas. Dissertação de mestrado apresentada à Universidade de São Paulo. São Paulo, SP.157p.

Yokoya N.S. and Oliveira E.C. 1993. Effects of temperature and salinity on spore germination and sporeling development in South American agarophytes (Rhodophyta). *Japanese Journal of Phycology*, 41: 283-293.

Waaland, S.D. 1990. Development. In: Cole, K.M. and Sheath, R.G. (eds.). *Biology of Red Algae*. Cambridge: Cambridge University Press, 259-273.

Whitehead, R.F., Mora, S.J. and Demers, S. 2000. Enhanced UV radiation – a new problem for the marine environment. In: Mora, S., Demers, S. and Vernet, M. (eds.). *The effects of UV radiation in the marine environment*. Cambridge: Cambridge University Press, 1-34.

Wiencke, C., Gómez, I., Pakker, H., Flores-Moya, A., Altamirano, M., Hanelt, D., Bischof, K. and Figueroa, F.L. 2000. Impact of UV-radiation on viability, photosynthetic characteristics and DNA of brown algal zoospores: implications for depth zonation. *Marine Ecology Progress Series*, 197: 217-229.

Wiencke, C., Clayton, M.N. and Schoenwaelder, M. 2004. Sensitivity and acclimation to UV radiation of zoospores from five species of Laminariales from the Arctic. *Marine Biology*, 145: 31-39.

Wiencke, C., Roleda, M.Y., Gruber, A., Clayton, M.N. and Bischof, K. 2006. Susceptibility of zoospores to UV radiation determines upper depth distribution limit of Arctic kelps: evidence through field experiments. *Journal of Ecology*, 94: 455-463.

Sites citados:

Distribuição de *Gelidium floridanum* no Brasil. [online]. Disponível em: <http://www.ib.usp.br/algaemaris/algaemarisbrasilis.html>. Acessado em fevereiro de 2009.

Protocolo de Montreal e o Brasil. [online]. Disponível em: <http://www.protocolodemontreal.org.br>. Acessado em junho de 2009.

Protocolo de Montreal. [online]. Disponível em: <http://www.ciesin.org/TG/OZ/ozpolic.html>. Acessado em junho de 2009.