

ESTUDO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO
ULTRAVIOLETA-B NA ORGANIZAÇÃO
CELULAR DURANTE O DESENVOLVIMENTO
INICIAL DE *NEMALION HELMINTHOIDES*
(VELLEY IN WITH.) BATTERS (NEMALIALES,
RHODOPHYTA): ASPECTOS MORFOLÓGICOS
E ULTRAESTRUTURAIS

Eliana de Medeiros de Oliveira



Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Desenvolvimento, Departamento de Biologia Celular,
embriologia e genética, Centro de Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Santa Catarina, como
requisito para a obtenção do título de Mestre em
Biologia Celular e Desenvolvimento

Orientadora: Profa. Luciane Cristina Ouriques, Dra.

ELIANA MEDEIROS DE OLIVEIRA

ESTUDO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA-B NA ORGANIZAÇÃO CELULAR DURANTE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DE *NEMALION HELMINTHOIDES* (VELLEY IN WITH.) BATTERS (NEMALIALES, RHODOPHYTA): ASPECTOS MORFOLÓGICOS E ULTRAESTRUTURAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do grau de Mestre em Biologia celular e desenvolvimento.

Orientadora: Profa. Luciane Cristina Ouriques, Dra.

Florianópolis
2012

Oliveira, Eliana de Medeiros

ESTUDO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA-B NA ORGANIZAÇÃO CELULAR DURANTE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DE *NEMALION HELMINTHOIDES* (VELLEY IN WITH.) BATTERS (NEMALIALES, RHODOPHYTA): ASPECTOS MORFOLÓGICOS E ULTRAESTRUTURAIS [dissertação] / Eliana de Medeiros Oliveira ; orientadora, Luciane Cristina Ouriques - Florianópolis, SC, 2012.

88 p. ; 21cm

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

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Biologia celular vegetal. 3. Desenvolvimento de tetrasporófito. 4. ultraestrutura de alga vermelha. 5. Radiação ultravioleta B. I. Ouriques, Luciane Cristina. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

ELIANA MEDEIROS DE OLIVEIRA

ESTUDO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA-B NA ORGANIZAÇÃO CELULAR DURANTE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DE *NEMALION HELMINTHOIDES* (VELLEY IN WITH.) BATTERS (NEMALIALES, RHODOPHYTA): ASPECTOS MORFOLÓGICOS E ULTRAESTRUTURAIS

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Desenvolvimento, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Desenvolvimento do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, ___ de _____ de 2012.

Prof^a. Ilíada Rainha de Souza , Dra.

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Banca Examinadora:

Prof^a. Luciane Cristina Ouriques, Dra.
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

(continua)

(continuação)

Prof^a. Aurea Maria Randi, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Neusa Steiner, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Éder Carlos Schmidt, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Fernanda Ramlov, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho à minha linda família, e aos meus saudosos amigos e amigas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente à minha orientadora Luciane Ouiriques, pela cooperação, amizade e paciência.

Aos componentes da banca, pela gentileza de aceitar participar da avaliação do presente estudo.

Aos meus colegas de trabalho Avani, Deise, Eduardo, Javier, Luciano e Renata, pela colaboração no presente estudo e pelo carinho e amizade.

Ao pessoal do LAMAR que estiveram sempre dispostos a ajudar: Prof. Zenilda, Carmen, Tici, Eduardo, Rodrigo, Marthi, Gladys, Débora, dentre outros que não lembro o nome agora.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, especialmente aos funcionários da secretaria.

Aos meus irmãos camaradas Júnior e Adriano, e seus respectivos amores.

Aos meus pais, Damiana e Herculano, pelo constante incentivo e amor, especialmente à minha mãe pela ajuda, carinho, incentivo, paciência, dentre outras mil coisas que você faz por mim, sempre.

Aos meus filhos amados Joana e Davi por sempre me fazerem sorrir, mesmo quando a minha vontade era de sumir, ou de morrer, ou os dois juntos! Obrigada meus queridos por encherem a minha vida de beleza e amor.

Ao meu marido Marlon, amigo e amante de todas as horas! Obrigada pela paciência, pelo amor e carinho, pelas noites que passamos sem dormir, enquanto eu escrevi e lia, e você permanecia ao meu lado, só pra não me deixar sozinha.

Aos meus amigos, às minhas amigas, de perto e de longe, que sempre contribuem nessa inacabável metamorfose de ser eu.

Agradeço especialmente à Deus, por me dar paz, serenidade e força durante toda a minha vida. Obrigada Papai do Céu por não permitir que eu enlouquecesse durante o mestrado. Muito obrigada!

À amiga Samya e à cunhada Beth, que revisaram e formataram o presente trabalho.

*... o que realmente importa não é o
que você tem na vida, mas quem
você tem na vida.*

William Shakespeare

RESUMO

As mudanças globais têm sido amplamente discutidas, e dentre essas mudanças, destaca-se o aumento da incidência da radiação ultravioleta B, em função da contínua destruição da camada de ozônio. Estudos científicos têm evidenciado os efeitos deletérios da exposição à radiação UV-B sobre as macroalgas, mas poucos estudos têm abordado o impacto dessa radiação sobre a germinação de esporos e desenvolvimento de fases juvenis. *Nemalion helminthoides* é uma alga vermelha amplamente distribuída nas regiões temperadas e subtropicais do planeta. Na única fase macroscópica da espécie, *N. helminthoides* mostra um talo cilíndrico e gelatinoso, e é encontrada fixada às rochas de regiões intertidais, estando frequentemente exposta à radiação solar. Analisar os efeitos da radiação ultravioleta B sobre o desenvolvimento inicial de *Nemalion helminthoides* foi o principal objetivo deste trabalho. Para tanto, carpósporos de *N. helminthoides* foram cultivados em laboratório, e foram estabelecidos dois grupos: Controle, expostos somente à radiação fotossinteticamente ativa PAR; e tratado, expostos à radiação PAR e UV-B. O grupo tratado foi submetido a 1,6 W.m⁻² de radiação UV-B artificial, 2h por dia, ao longo de 12 dias. As amostras foram avaliadas a cada três dias. O grupo controle mostrou crescente proliferação celular, crescente acúmulo de substâncias de reservas e intensa ramificação nos últimos estágios observados, 9 e 12 dias de desenvolvimento. Nas células do grupo controle o cloroplasto ocupou grande espaço na célula, empurrando as demais organelas para a periferia celular. Além disso, o cloroplasto apresentou um característico pirenóide globoso, profusamente atravessado por lamelas de tilacóides. As células mostraram freqüente associação entre mitocôndrias, núcleos, corpos de Golgi e retículo endoplasmático rugoso, interação que favorece a intensa atividade metabólica característica de fases iniciais de desenvolvimento. Os tetrasporófitos do grupo tratado apresentaram danos a importantes organelas celulares, tais como: desestruturação do pirenóide, perda da organização do cloroplasto, alteração nas cristas mitocondriais, crescente atrofia dos corpos de Golgi. Além de alterações nos padrões de desenvolvimento, como perda da polaridade nas primeiras divisões do carpósporo e ramificação anormal do talo filamentoso. Em

relação à autofluorescência do cloroplasto, o grupo controle mostrou crescente aumento na auto-fluorescência ao longo do desenvolvimento. Enquanto no grupo tratado a autofluorescência acompanhou a intensidade do grupo controle para 3 e 6 dias, mas mostrou redução de aproximadamente 50% na autofluorescência em 9 e 12 dias de desenvolvimento, em relação ao grupo controle. As principais alterações nas células de *N. helminthoides* aconteceram no cloroplasto. Os dados de quantificação da autofluorescência coincidiram com as alterações ultraestruturais apresentadas no cloroplasto das células expostas à radiação ultravioleta B, sugerindo efeitos nocivos dessa radiação ao aparato fotossintético, síntese e acúmulo de substâncias de reserva, como o amido das florídeas, os plastoglóbulos e o pirenoíde. Além disso, a radiação alterou o padrão de desenvolvimento dos tetrasporófitos. Sugere-se neste estudo que a próxima fase do ciclo de vida da espécie, a formação dos tetrasporângios, onde ocorre a meiose e formação dos tetrásporos, seria comprometida caso os tetrasporófitos jovens continuassem no regime de exposição à radiação ultravioleta, mas somente estudos mais longos podem dizer se esta exposição poderá interferir e/ou interromper o ciclo de vida de *N. helminthoides*.

Palavras-chave: *Nemalion helminthoides*. Desenvolvimento inicial. Radiação UV-B. Ultraestrutura. Autofluorescência.

ABSTRACT

Global changes have been widely discussed, and among these changes, there is an increased incidence of ultraviolet B radiation, due to the continuous destruction of the ozone layer. Scientific studies have shown the deleterious effects of exposure to UV-B radiation on macro algae, but few studies have addressed the impact of this radiation on spore germination and development of juvenile stages. *Nemalion helminthoides* is a red alga widely distributed in temperate and subtropical regions of the planet. In the only macroscopic phase of the species, *N. helminthoides* shows a cylindrical and gelatinous stem, and is found attached to rocks in intertidal areas, being frequently exposed to solar radiation. To analyze the effects of ultraviolet B on the initial development of *Nemalion helminthoides* is the main objective of this work. For this new set of carpospores *Nemalion helminthoides* were cultured in the laboratory, and were arranged in two groups: control, exposed only to photosynthetically active radiation (PAR); and treated, exposed to PAR and UV-B. The treated group was exposed to 1.6 Wm⁻² UV-B artificial radiation 2 hours a day over 12 days. Specimens from both groups were evaluated every three days. The control group showed increasing cell proliferation, increasing accumulation of reserve substances and intense branching in the latter observed stages of 9 and 12 days of development. In the cells from the control group the chloroplast occupied much space, pushing the other cell organelles to the periphery. Furthermore, the chloroplast showed a typical globular pyrenoid profusely traversed by thylakoid lamellae. The cells showed frequent association between mitochondria, nucleus, Golgi bodies and rough endoplasmic reticulum, interaction that favors the intense metabolic activity, characteristic of early stages of development. The sporelings from the treated group showed damage to significant cell organelles, such as: pyrenoid disruption, loss of organization of chloroplast, changes in mitochondrial cristae, increasing atrophy of the Golgi bodies, in addition to changes in development patterns, such as loss of polarity in the first divisions of carpospore and abnormal filamentous thallus branching. Regarding the autofluorescence of the chloroplast, the control group showed increasing growth in the photosynthetic response

during development. While in the treated group the autofluorescence followed the intensity for the control group for 3 and 6 days but showed approximately a 50% reduction in response of the photosynthetic apparatus in the stages of 9 and 12 days in relation of the control group. The major damage to the cells of *N. helminthoides* happened in the chloroplast. The quantification of autofluorescence data coincided with the ultra structural changes made in the chloroplast of cells exposed to ultraviolet B radiation, showing the harmful effects of this radiation to the photosynthetic apparatus, synthesis and accumulation of reserve substances such as floridean starch grains, plastoglobuli and pyrenoid . Furthermore, the radiation changed the development pattern of the seedling. It is suggested in this study that the next stage of reproduction of the species, the formation of tetrasporangia, where meiosis and formation of the tetraspores occur, would be compromised if the seedlings continued in the regime of exposure to ultraviolet radiation, but only longer term studies can tell whether this exposure may interfere with and / or interrupt the life cycle of *N. helminthoides*.

Keywords: *Nemalion helminthoides*. Initial development. UV-B radiation. Ultrastructure. Autofluorescence..

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do espectro de ondas emitido pelos sol, e comparação entre a energia dos fótons emitido pelo sol, e comparação entre a energia dos fótons, os comprimentos de onda, e a frequência.....	23
Figura 2: Esquema da transformação da energia luminosa (fóton) em energia química (ATP) nas membranas tilacóides no cloroplasto.....	28
Figura 3: Indivíduos de <i>Nemalion helminthoides</i> oriundos da praia de Pontas das Canas, Florianópolis, SC.....	30
Figura 4: Esquema do ciclo de <i>Nemalion helminthoides</i> . Os asteriscos indicam as fases estudadas no presente trabalho.....	31
Figura 5: a) Porções férteis sobre lâminas para liberação dos carpósporos. b) Ramos cobertos com sacos de plástico preto, para estimular a liberação de carpósporos.....	37
Figura 6: Imagens de microscopia confocal dos tetrasporófitos com três dias de desenvolvimento.....	42
Figura 7: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET), dos tetrasporófitos com 3 dias de desenvolvimento, grupo controle.....	44
Figura 8: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão, dos tetrasporófitos com 3 dias de desenvolvimento, grupo tratado com radiação ultravioleta B.....	45
Figura 9: Imagens de microscopia confocal, dos tetrasporófitos com 6 dias de desenvolvimento, grupo controle.....	46
Figura 10: Imagens de microscopia confocal dos tetrasporófitos com 6 dias de desenvolvimento do grupo tratado.....	48
Figura 11: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão, dos tetrasporófitos com 6 dias de desenvolvimento, grupo controle.....	50
Figura 12: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão, das plântulas com 6 dias de desenvolvimento, grupo tratado com radiação ultravioleta B.....	51
Figura 13: Imagens de microscopia confocal, dos tetrasporófitos com nove dias de desenvolvimento do grupo controle.....	54

Figura 14: Imagens de microscopia confocal do grupo tratado. .	55
Figura 15: Imagens de MET, dos tetrasporófitos com 9 dias de desenvolvimento, grupo controle.	57
Figura 16: Imagens de MET, dos tetrasporófitos com 9 dias de desenvolvimento, grupo tratado.....	59
Figura 17: Tetrasporófitos com 12 dias de desenvolvimento, grupo controle.....	61
Figura 18: Tetrasporófitos com 12 dias de desenvolvimento, grupo tratado.....	62
Figura 19: Micrografias de MET, dos tetrasporófitos com 12 dias de desenvolvimento, grupo controle.....	64
Figura 20: Imagens de MET dos tetrasporófitos com 12 dias de desenvolvimento, grupo tratado.....	65
Figura 21: Taxa de emissão de fluorescência dos cloroplastos dos tetrasporófitos submetidos à radiação PAR (grupo controle) e dos tetrasporófitos tratados com radiação UV-B + PAR (grupo tratado) ao longo de doze dias de desenvolvimento.	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Amido das florídeas
C	Cloroplasto
Cl	Conexão intercelular
G	Corpos de Golgi
M	Mitocôndria
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
N	Núcleo
Nu	Nucléolo
Pi	Pirenóide
P	Plastoglóbulo (s)
PAR	Radiação fotossinteticamente ativa
Pc	Parede Celular
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
Rp	Região reticular do pirenóide
Ti	Tilacóides
UV-A	Radiação Ultravioleta A
UV-B	Radiação Ultravioleta B
UV-C	Radiação Ultravioleta C
V	Vacúolo
ve	Vesículas de Golgi

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 O IMPACTO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA B SOBRE A BIODIVERSIDADE, EM ESPECIAL AS MACROALGAS	23
1.2 FOTOSÍNTESE E AUTOFLUORESCÊNCIA DO CLOROPLASTO	27
1.3 O CICLO DE VIDA DE <i>NEMALION HELMINTHOIDES</i>	29
1.3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	32
1.4 OBJETIVOS	33
1.4.1 <i>Objetivo Geral</i>	33
1.4.2 <i>Objetivos Específicos</i>	34
2 MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1 COLETA E ISOLAMENTO DAS PORÇÕES FÉRTEIS DA ALGA	35
2.2 OBTENÇÃO DOS CARPÓSPOROS PARA CULTURA EM LABORATÓRIO	35
2.3 OBSERVAÇÃO DA MORFOLOGIA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA DE LUZ (CAMPO CLARO – CONFOCAL)	37
2.4 ANÁLISE DA AUTOFLUORESCÊNCIA DO CLOROPLASTO	38
2.5 PROCEDIMENTOS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	39
3 RESULTADOS.....	41
3.1 TETRASPORÓFITOS COM TRÊS DIAS	41
3.2 TETRASPORÓFITOS COM SEIS DIAS.....	46
3.3 TETRASPORÓFITOS COM NOVE DIAS.....	52
3.4 TETRASPORÓFITOS COM 12 DIAS.....	60
3.5 ANÁLISE DA AUTO-FLUORESCÊNCIA DO CLOROPLASTO	66
4 DISCUSSÃO	69
CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 O IMPACTO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA B SOBRE A BIODIVERSIDADE, EM ESPECIAL AS MACROALGAS

A radiação solar que incide na superfície da Terra é composta por um amplo espectro, e neste está presente a radiação ultravioleta (RUV) - que é subdividida em três faixas de comprimentos de onda: a faixa da radiação ultravioleta - UV-A (de 315 a 400nm) UV-B (280-315nm) UV-C (100-280nm) (MADRONICH *et al.*, 1998) - , a faixa visível aos olhos humanos, além da faixa do infravermelho. O espectro de comprimentos de onda é mostrado na Figura 1.

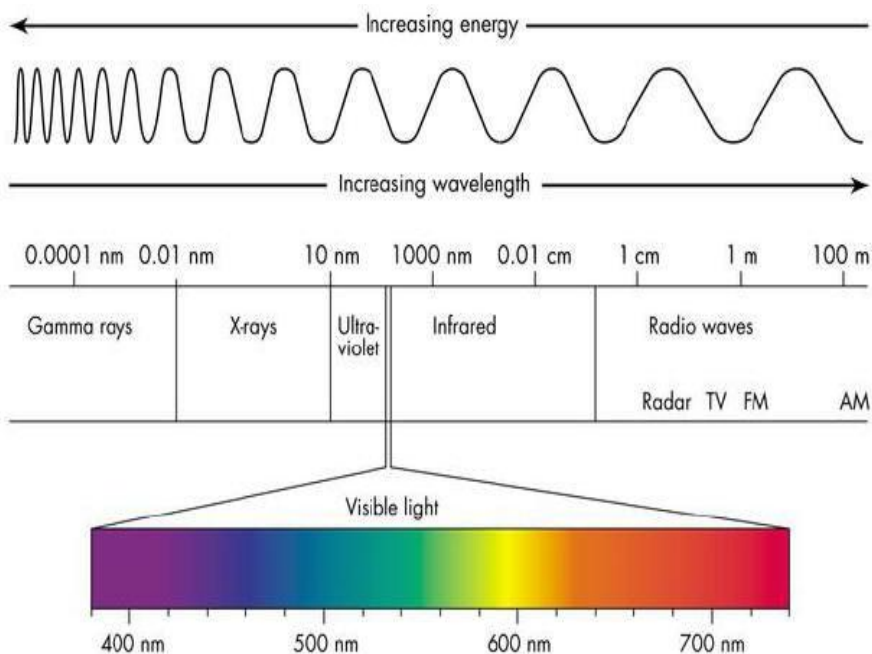


Figura 1: Representação esquemática do espectro de ondas emitido pelos sol, e comparação entre a energia dos fótons emitido pelo sol, e

comparação entre a energia dos fótons, os comprimentos de onda, e a frequência.

Fonte: <<http://9-4fordham.wikispaces.com/Electro+Magnetic+Spectrum+and+light>>
Acesso em 26 de maio de 2012.

Lembrando a constante de Planck, onde a energia de um fóton é diretamente proporcional à sua frequência, e que a frequência é inversamente proporcional ao comprimento de onda de um fóton; temos que fótons com comprimentos de ondas curtos são mais energéticos que fótons com comprimentos de onda longos. Este fato explica o efeito impactante da luz ultravioleta, especialmente do tipo B e C, sobre tecidos e células de organismos vivos.

A RUV-B é muito energética, e quando esta radiação incide sobre as células são geradas moléculas altamente oxidativas, as espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio, e o radical hidroxila. Todos os componentes celulares são vulneráveis à ação das EROs, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da afinidade que as EROs têm com os ácidos graxos (ALBERTS *et al.*, 2010). Essa peroxidação lipídica leva a alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Consequentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas (DAHMS & LEE, 2010).

Estudos com algas mostraram que a exposição à RUV-B gera no DNA lesões muito frequentes e citotóxicas: a formação de dímeros de pirimidina. A energia da radiação ultravioleta B quando transferida para as biomoléculas gera no núcleo celular a quebra das ligações entre as pirimidinas e purinas (opostas) da fita de DNA, e essas bases então se ligam às bases vizinhas (na mesma fita) e estabelecem as ligações carbono-carbono (KIELBASSA *et al.*, 1997; DAHMS & LEE, 2010). Então acontecem as formações de dímeros de pirimidina e se perde a ligação entre as duas fitas de DNA, o que compromete a ação da DNA polimerase, e impede a replicação do DNA, e a transcrição gênica. Segundo SINHA *et al.*, (2005), a taxa de formação de dímeros de ciclobutano-pirimidina é dependente da dose de irradiação UV-B.

Entretanto as macroalgas mostraram mecanismos eficientes de reparação de DNA tais como enzimas do tipo fotolases, glicosilases e polimerases, além do acúmulo de aminoácidos do tipo

micosporinas (MAAs) (FRANKLIN *et al.*, 2003; SINHA *et al.*, 2005, ROLEDA *et al.*, 2007).

O ozônio é o principal gás responsável pela absorção dos raios ultravioletas, e a diminuição de sua concentração na estratosfera causa um aumento na incidência de RUV na superfície do planeta (Van der GRUIJL, 1993). Nos últimos anos, a quantidade de radiação UV-B que atinge a superfície da terra tem aumentado consideravelmente, devido à diminuição da camada de ozônio (KERR, 1993; KIRCHHOFF *et al.*, 2000). Inclusive, segundo dados meteorológicos do INPE, em dias de céu claro (sem nuvens) o índice de radiação ultravioleta ao meio-dia, para o litoral de Santa Catarina, durante a primavera e verão de 2011 e de 2012, chegou a níveis extremos.

Medidas obtidas por instrumentos de solo e por satélite mostram que para latitudes médias, a diminuição média da concentração de radiação ultravioleta do tipo B entre 1997 e 2001, foi de 4% para o hemisfério norte e de 6% para o hemisfério sul. Mesmo que não haja mais emissões de gases destruidores da camada de ozônio, acredita-se que a situação só vai se normalizar em 2050, pois os gases que já estão na atmosfera têm uma vida média maior do que 60 anos.¹ Como a camada de ozônio está ainda diminuindo e provavelmente continuará assim por mais algumas décadas, acredita-se que a radiação UV-B vai aumentar sua intensidade no futuro.²

Os raios UV-B apesar de compreenderem menos de 1% do total da radiação solar global, são responsáveis por graves danos ao DNA, RNA, proteínas, fotossíntese, crescimento e reprodução (FRANKLIN & FORSTER, 1997; HADER, 2001; HUOVINEN *et al.* 2000; SCHMIDT *et al.*, 2009, 2010, 2012), afetando de maneira importante os organismos produtores primários, como as algas e outros vegetais, base da cadeia trófica global.

A radiação UV-B afeta de diferentes maneiras os seres vivos, tanto nos seus processos fisiológicos como na sua morfologia (TEVINI & TERAMURA, 1989; Van de POLL *et al.*, 2002). Além disso, estudos recentes têm evidenciado que esporos e fases ju-

¹ Programa estadual de prevenção à destruição da camada de ozônio, disponível em <<http://homologa.ambiente.sp.gov.br/prozonesp/docs/acamadaozonio.pdf>>.

² Laboratório de Ozônio, disponível em: <<http://www.dge.inpe.br/ozonio/homologacao/ozonioInfo.php>>.

venis são bem mais sensíveis a este tipo de radiação (CORDI *et al.*, 2001; HENRY & Van ALSTYNE, 2004; WIENCKE *et al.* 2006; AGRAWALL, 2009).

As macroalgas bentônicas em contraste com o fitoplâncton têm um crescimento restrito ao local onde se fixam, sendo assim mais vulneráveis aos efeitos da radiação solar, especialmente durante a maré baixa (FRANKLIN & FORSTER, 1997).

A radiação ultravioleta B penetra profundamente em águas tropicais oligotróficas devido à pequena quantidade de matéria orgânica dissolvida e particulada (BAKER *et al.*, 1980; BOELEN *et al.*, 1999).

A radiação UV-B provocou danos efetivos na fisiologia e ultraestrutura de zoósporos da alga parda *Laminaria hyperborea* (Gunnerus) Foslie, reduzindo a taxa de germinação, além de alterar a morfologia das mitocôndrias (STEINHOFF *et al.*, 2008).

Nas algas vermelhas *Palmaria palmata* (Linnaeus) Weber & Mohr e *Odonthalia dentata* (Linnaeus) Lyngbye, a exposição à radiação ultravioleta B ocasionou enrugamentos nas membranas dos tilacóides, dilatação do lúmen do tilacóide além de alteração na membrana externa do cloroplasto e nos plastoglóbulos. Além disso, também foram observadas alterações na mitocôndria (HOLZINGER *et al.* 2004). De maneira semelhante, POPPE *et al.* (2003) verificaram nas espécies de rodófitas *Palmaria decipiens* (Reinsch) R.W.Ricker, *Palmaria palmata*, *Phycodrys austrogeorgica* Skottsberg e *Bangia atropurpurea* (Mertens ex Roth) C.Agardh alterações celulares como: formação anormal de vesículas nos tilacóides e dilatações das cristas mitocondriais.

Em talos de duas variantes pigmentares de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C.Silva, de *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie e de *Condracanthus teedei* (Mertens ex Roth) Kützinger expostas à radiação UV-B foram descritas alterações morfológicas nas células corticais e sub-corticais. Foi observado que os cloroplastos perdem a organização dos tilacóides e que a quantidade de grãos de amido diminui; que a parede celular se torna mais espessa; além de aumento na atividade de enzimas antioxidantes, dentre elas a glutatona redutase (SCHMIDT *et al.*, 2009, 2010, 2012).

Os raios UV-B também interagem com o DNA, e estão relacionados com a formação de dímeros de pirimidina no núcleo celular. Onde ocorre a formação desses dímeros perde-se a liga-

ção entre as duas fitas de DNA, o que compromete a atividade da enzima DNA polimerase, inibindo assim a transcrição gênica, fato que impede a célula de prosseguir seu ciclo de divisão celular (ESSEN & KLAR, 2006).

O dano ao DNA causado pelos raios UV-B está diretamente relacionado com a diminuição no crescimento de algas, e também na inibição da germinação de esporos (WIENCKE, *et al.*, 2000; ROLEDA *et al.*, 2006, AGRAWAL, 2009).

Outros estudos com algas mostraram redução no crescimento em mais de 30% para a alga marrom *Dicyota dichotoma* Lamour e redução de 46% a 70% para a alga vermelha *Chondrus crispus* Stackhouse, depois das mesmas serem submetidas ao tratamento com radiação UV-B (FRANKLIN *et al.*, 1999; KUHLENKAMP *et al.*, 2001; ANDRÉS *et al.*, 2006).

Esporos de algas expostos à radiação UV-B são mais sensíveis que plantas adultas, apresentando maiores taxas de mortalidade, perda da viabilidade do DNA, foto-inibição do aparelho fotossintético e diminuição do crescimento (WIENCKE *et al.*, 2000, SCARIOT, 2012). Pesquisas sugerem que o aumento da temperatura da água aumenta a suscetibilidade dos esporos das algas aos raios UV-B (ALTAMIRANO *et al.*, 2003). Em *Porphyra haitanensis* Chang & Baofu, a presença dos raios UV-B interferiu de forma negativa na liberação de esporos, agiu na diminuição da largura dos mesmos, além de influenciar a diminuição do comprimento e da área do talo das plântulas, assim como o tamanho das células (havendo redução de 6 a 14%) (JIANG *et al.*, 2007).

1.2 FOTOSÍNTESE E AUTOFLUORESCÊNCIA DO CLOROPLASTO

A fotossíntese ocorre no cloroplasto, e nesta organela se encontra um sistema de membranas, os tilacóides, onde se ancoram os pigmentos fotossintetizantes, como a clorofila *a* (LARCHER, 2000).

Na primeira fase da fotossíntese, nas reações dependentes de luz, a clorofila é excitada, no centro de reação do fotossistema, que leva à perda de um elétron, o qual é utilizado para a redução do NADP⁺. Para a nova redução da clorofila é necessário um elétron, e este está disponível após a fotólise da água. Com a

fotólise da água além de um próton (H^+) também é produzido oxigênio molecular. Os prótons então se concentram no interior dos tilacóides e, desta forma, é formado um gradiente de prótons transmembrana. E esse gradiente eletroquímico permite a síntese de ATPs (LARCHER, 2000; FALKOWSKY & RAVEN, 2007; ALBERTS, *et al.*, 2010).

Apenas uma parte da energia luminosa que incide sobre os cloroplastos é absorvida e aproveitada no processo fotoquímico (fotossintético), o restante é convertido em radiação fluorescente e calor (LARCHER, 2000) (Fig. 2)

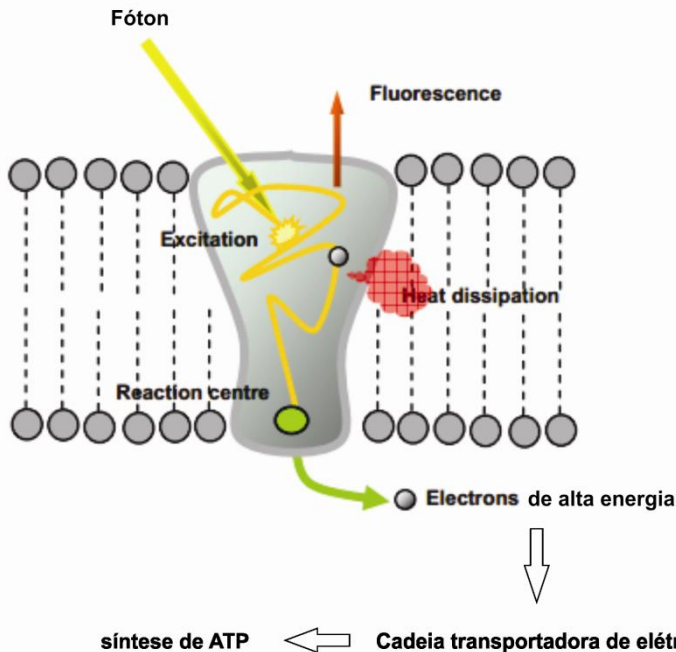


Figura 2: Esquema da transformação da energia luminosa (fóton) em energia química (ATP) nas membranas tilacóides no cloroplasto.

Adaptado a partir de: <http://www.ears.nl/ppm/user_files/Measuring%20fluorescence%20and%20photosynthesis.pdf> Acesso em: 26 de maio de 2012.

As membranas dos tilacóides contêm grandes quantidades do pigmento clorofila, os quais auto-fluorescem nos comprimentos de onda laranja e vermelho (GOVINDJEE, 1995).

Estes pigmentos estão organizados em complexos proteína-pigmento, os chamados fotossistemas. Os fotossistemas convertem a energia capturada da luz principalmente em corrente elétrica (ANDERSON & ANDERSON, 1980).

A clorofila *a* fluoresce fortemente no vermelho, quando excitado pela luz azul e verde, porém o pico de excitação corresponde ao intervalo de 440nm a 490 (luz azul) (AMOS, *et al.* 1987; LICHTENTHALER, *et al.*, 2000).

A maior parte do conhecimento acerca da morfologia e estrutura dos cloroplastos descrevem estas organelas a partir de micrografias de microscopia eletrônica de transmissão, e para isso os cloroplastos são fixados e contrastados. Entretanto, o uso do microscópio confocal, no entanto, permite imagens detalhadas de cloroplastos intactos dentro de células vivas (HEPLER & GUNNING, 1997; KONISHI, *et al.* 2009), o que torna essa ferramenta fundamental para compreender a real forma dos cloroplastos.

A avaliação da autofluorescência da clorofila é um dos métodos utilizados capaz de mensurar as atividades fotossintéticas de plantas, porque essa informação é obtida sem a necessidade de destruição de tecido vivo (OMASA *et al.*, 1987, LICHTENTHALER & MIEHE, 1997; GOVINDJEE, 2004; CHAERLE *et al.* 2007; OMASA *et al.*, 2007). Além disso, o espectro de emissão de fluorescência indicam a composição do fotossistema e são influenciadas pelo teor de clorofila por área foliar (OMASA *et al.*, 2008, OMASA *et al.*, 2009).

1.3 O CICLO DE VIDA DE *NEMALION HELMINTHOIDES*

A ordem Nemiales é considerada a mais primitiva dentro da classe Florideophyceae (WEST & HOMMERSAND, 1981) e o gênero *Nemalion* Duby, o mais primitivo dentro dessa ordem.

Nemalion helminthoides (Velley) Batters 1902 é comumente encontrada fixada em rochas nas zonas intertidais de regiões temperadas (VAN DEN HOEK *et al.*, 1995) (Fig 3a), mas também está presente nos mares subtropicais (CORDEIRO-MARINO, 1978).

O talo é cilíndrico e gelatinoso, simples ou pouco ramificado (Fig. 3b). A espécie é dioica e os carpósporos dão origem a

uma fase filamentosa microscópica que produz tetrasporângios (MARTIN, 1969; CHEN *et al.*, 1978).

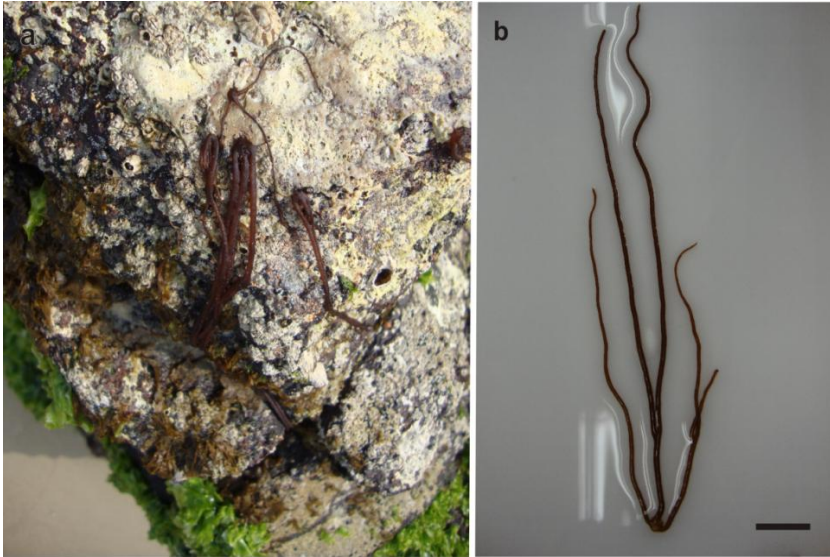


Figura 3: Indivíduos de *Nemalion helminthoides* oriundos da praia de Pontas das Canas, Florianópolis, SC. a Detalhe da alga fixada na rocha. b. Aspecto geral da alga cilíndrica e pouco ramificada. Escala: 3 cm.

A espécie apresenta duas gerações morfológicamente distintas, os gametófitos e os tetrasporófitos. O primeiro é haplóide ($n = 10$) e este último é diplóide ($n = 20$), e a meiose ocorre no tetrasporângio (CHEN *et al.*, 1978) (Fig. 4).

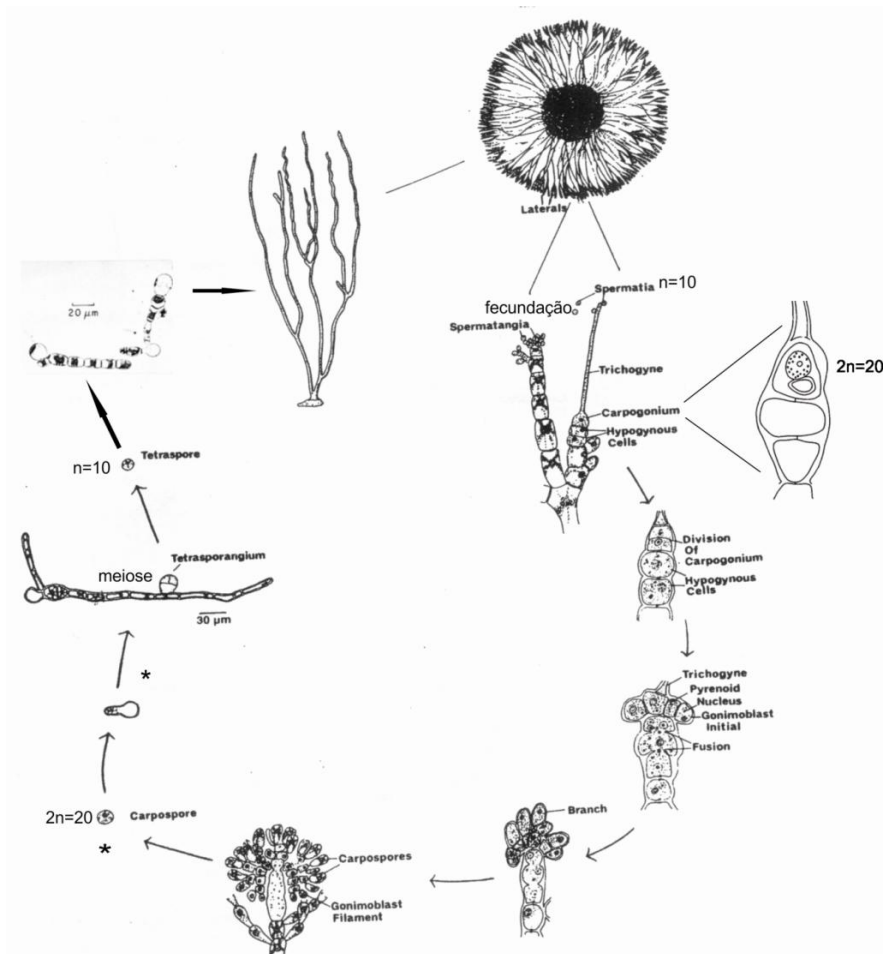


Figura 4: Esquema do ciclo de *Nemalion helminthoides*. Os asteriscos indicam as fases estudadas no presente trabalho.

Fonte: Adaptado de LEE (1989); CHEN *et al.* (1978).

Vários padrões de germinação de esporos têm sido descrito para as espécies de Rhodophyta. Estes padrões foram inicialmente descritos por CHEMIN (1937), subdividido por INOH (1947), e revisado por DIXON (1973). No momento, cinco padrões básicos de germinação de esporos são reconhecidos: *Nemalion*, *Naccaria*, *Gelidium*, *Dumondia* e *Ceramium* (GUIRY, 1990). Os

tipos de germinação não são completos, e vários padrões intermediários de desenvolvimento são conhecidos. Os padrões de germinação não são fixos dentro das ordens, e podem apresentar certo grau de heterogeneidade. A ordem Nematiales exibe ambos os padrões de germinação do tipo *Nemalion* e *Naccaria* (GABRIELSON & GARBARY, 1986). Entretanto, a maioria dos representantes da ordem Nematiales, exibe o padrão de germinação do tipo *Nemalion*. Nesse tipo de germinação, após a fixação o esporo emite uma protuberância passando quase todo o conteúdo citoplasmático para essa região, que funciona como a célula apical. A protuberância produz um filamento que pode funcionar como rizóide ou este é produzido subsequentemente a partir de uma célula inferior do filamento, adjacente à parede do esporo (OURIQUES & BOUZON, 2005, OURIQUES *et al.*, 2011).

A maioria dos esporos das algas vermelhas é liberada sem parede celular envolvida apenas por uma mucilagem transparente, a qual é responsável pela fixação do esporo ao substrato (AVANZINI 1989, OURIQUES & BOUZON, 2003). Esta mucilagem é de natureza glicoproteica (CHAMBERLAIN & EVANS, 1973; PUESCHEL, 1979) e/ou constituída por polissacarídeos sulfatados (DIANNELIDIS & KRISTEN, 1988; OURIQUES *et al.*, 2011).

1.3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Devido à crescente preocupação da sociedade em geral com a destruição da camada de ozônio, estudos que analisem os efeitos da radiação ultravioleta em organismos vivos se tornam cada vez mais necessários. Estudos sobre a influência desses raios na morfologia e fisiologia das células fornecem subsídios e argumentos para a formulação de políticas públicas locais e globais que gerenciem de maneira responsável os gases que danificam a camada de ozônio.

A radiação UV é um fator ecológico limitante no ambiente marinho (DRING *et al.*, 1996; HADER *et al.*, 2007). A radiação ultravioleta natural pode penetrar a profundidades consideráveis dependendo da quantidade de partículas dissociadas na água; e podem afetar assim a diversidade de organismos aquáticos, como as algas. Há diversos registros de que os efeitos da radiação UV-B

sobre as comunidades de macroalgas podem ser observados a profundidades de até 30m (HADER *et al.*, 1998; ROLEDA *et al.*, 2006).

Nas algas, os esporos são unidades de dispersão e de fixação. A estabilização da fixação da alga adulta depende da adesão do esporo (CHAMBERLAIN & EVANS, 1981); por esta razão os esporos são uma ligação entre as fases do ciclo de vida das macroalgas (FLETCHER & CALLOW, 1992; APPLE & HARLIN, 1994). Além disso, a germinação dos esporos parece ser o principal fator eco-fisiológico para iniciar o desenvolvimento e o crescimento em massa das algas (AGRAWALL, 2009).

Existem poucos estudos na literatura, até o presente momento, que visem investigar as possíveis alterações causadas pelos raios UV-B na morfologia celular e sub-celular durante os processos de fixação e germinação de esporos, e desenvolvimento de fases juvenis. Não foi encontrado nenhum estudo visando analisar estes efeitos no desenvolvimento de *N. helminthoides*. Desta forma, os resultados provenientes desse estudo visam contribuir com informações originais sobre os efeitos deletérios da radiação UV-B nos processos do desenvolvimento inicial de *N. helminthoides*.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo Geral

Analisar o desenvolvimento dos tetrasporófitos jovens de *Nemalion helminthoides*, em condições normais de cultura em laboratório – grupo controle - e também, expostos à radiação UV-B – grupo tratado; identificando possíveis alterações estruturais e ultraestruturais, decorrentes desse tratamento.

1.4.2 Objetivos Específicos

1. Verificar os possíveis efeitos da radiação UV-B na morfologia celular e sub-celular durante o desenvolvimento inicial da fase tetrasporofítica de *Nemalion helminthoides*.

2. Analisar comparativamente os grupos controle e tratado, quanto à resposta do aparato fotossintético dos tetrasporófitos jovens, baseado na autofluorescência dos cloroplastos, observados através de microscopia confocal de varredura a laser..

3. Analisar comparativamente a morfologia dos talos microscópicos, e também das células, de ambos os grupos controle e tratado, através de observações por microscopia confocal de varredura a laser.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA E ISOLAMENTO DAS PORÇÕES FÉRTEIS DA ALGA

O material estudado foi coletado durante a maré baixa, nos meses de julho a setembro de 2009, 2010 e 2011, na praia de Ponta das Canas, (27° 24' 4" S e 48° 25' 40" W) no município de Florianópolis, e depois foi transferido para o Laboratório de Macroalgas Marinhas – LAMAR, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

As plantas mais vigorosas e aparentemente livres de epífitas foram selecionadas e lavadas em água do mar esterilizada, para remoção dos detritos e organismos contaminantes. Posteriormente, as plantas foram examinadas sob microscópio estereoscópio, para identificação da fase reprodutiva, sendo selecionadas porções férteis que apresentassem carposporófitos maduros. Logo depois, as porções dos ramos férteis foram cuidadosamente limpas, com auxílio de pincéis e lavagens sucessivas em água do mar esterilizada.

2.2 OBTENÇÃO DOS CARPÓSPOROS PARA CULTURA EM LABORATÓRIO

Para a liberação dos carpósporos, pequenos segmentos de ramos férteis de *Nemalion helminthoides* foram colocados em placas de Petri, sobre lâminas, contendo água do mar esterilizada (Figura 5a). As placas foram mantidas no escuro por um período de 18 horas em temperatura ambiente, para estimular a liberação dos carpósporos (figura 5b). Após a liberação, os segmentos foram removidos, e os carpósporos foram cultivados com luminosidade padrão (Radiação Fotossinteticamente Ativa - PAR), para o acompanhamento da germinação dos esporos. Após três dias do início da germinação, a água do mar esterilizada foi substituída por meio Von Stoch 0,8% que contém os micronutrientes neces-

sários para o desenvolvimento das algas (OURIQUES & BOUZON, 2003, 2005).

Após a liberação dos carpósporos foram estabelecidos 2 grupos: controle e tratado.

Tanto o grupo controle como o grupo tratado foram cultivados num regime diário de 12 horas de luz, sob radiação fotosinteticamente ativa (PAR) constante, fornecida por lâmpadas do tipo "luz do dia" (Philips C-5 Super 84 16W/840, Brasil), dispostas acima das placas de petri. Além dessa exposição, o grupo tratado foi exposto à radiação UV-B artificial durante duas horas por dia (iniciando às 12:00 e terminando às 14:00 h), durante dozes dias consecutivos.

Foram utilizadas quatro placas de Petri com quatro lâminas para observar o desenvolvimento das plântulas. A unidade amostral considerada foi uma lâmina de vidro, devido ao reduzido tamanho das plântulas, e também ao considerável número de indivíduos presentes em cada lâmina de vidro.

Durante os períodos de exposição, a câmara de cultivo contendo a lâmpada emissora de radiação UV-B (potência de 1.6 W/m²), ficou isolada externamente com plásticos transparentes espessos de forma que a radiação ficasse restrita à área das amostras tratadas. Após a liberação dos esporos, nos doze dias subseqüentes, as placas de Petri foram irradiadas para se verificar a germinação e o desenvolvimento das plântulas.



Figura 5: a) Porções férteis carposporofíticas sobre lâminas para liberação dos carpósporos. b) Ramos cobertos com sacos de plástico preto, para estimular a liberação de carpósporos.

2.3 OBSERVAÇÃO DA MORFOLOGIA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA DE LUZ (CAMPO CLARO – CONFOCAL)

Tetrasporófitos jovens vivos dos grupos controle e tratado foram observados e fotografados no Microscópio Confocal de Varredura a Laser, modelo SP 5 da Leica, para análise da morfologia dos filamentos, das células e da disposição tri-dimensional das mesmas.

Foram feitas reconstruções tri-dimensionais no programa LAS AF da Leica a partir de séries de imagens adquiridas no plano Z, com intervalo de 1 μm entre cada foto.

2.4 ANÁLISE DA AUTOFLUORESCÊNCIA DO CLOROPLASTO

Tetrasporófitos jovens vivos, dos grupos controle e tratado, foram observados no Microscópio Confocal de Varredura a Laser, para analisar a autofluorescência do cloroplasto. As observações foram realizadas sempre no final da tarde, para todas as amostras, de ambos os grupos.

Os tetrasporófitos foram irradiados com laser de argônio com comprimento de onda 488 (azul) – para excitação de moléculas autofluorescentes no cloroplasto - e foi analisado o espectro de emissão 600 a 685 (vermelho e vermelho longo). Essas faixas de comprimento de onda foram escolhidas baseadas em estudos de ação da clorofila *a* (LICHTENTHALER, *et al.*, 1986; GOVINDJEE, *et al.*, 1995; FALKOWSKI & RAVEN, 2007), molécula capaz de emitir fluorescência no cloroplasto.

A intensidade do laser que excita a amostra e a sensibilidade do foto-sensor foram padronizados para a amostra controle, que em observações prévias se mostrou mais intensa.

Para quantificação da autofluorescência do cloroplasto foram utilizadas fotos adquiridas no microscópio confocal, e foi então estabelecida uma área elíptica, que abrangia duas células, para cada indivíduo analisado, onde a intensidade de cada pixel foi mensurada utilizando o programa LAS AF da Leica.

Os dados de quantificação da autofluorescência do cloroplasto foram submetidos à análise de variância-unifatorial ANOVA, seguida do teste *a posteriori* de Tukey a fim de se verificar as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as taxas de fluorescência para o grupo controle e tratado.

Os dados foram verificados estatisticamente utilizando-se da análise de variância (ANOVA) por meio do software Statistica 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 PROCEDIMENTOS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

As plântulas aderidas foram fixadas na própria lâmina, em solução de glutaraldeído 2,5%, sacarose 0,2 M, em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, por aproximadamente 12 h. A fixação foi seguida por 3 lavagens, de 20 minutos cada, com concentrações decrescentes de sacarose, no mesmo tampão. Em seguida, o material foi delicadamente raspado das lâminas, com auxílio de uma lamínula de vidro, e transferido para tubos do tipo eppendorf, onde foram centrifugados por 5 minutos (2,000 rpm) e o agregado assim obtido incluído em ágar (2%, 60°C). Logo depois as amostras incluídas em ágar foram resfriadas na geladeira (4 °C). Então, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio (O_4), a 1%, em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, por 5 horas, à temperatura ambiente. O material foi lavado em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2, por três vezes, de 20 minutos cada, e desidratado em uma série de soluções de concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), por 20 minutos em cada concentração, exceto a acetona 100%, com 2 trocas de 20 minutos cada. Após a desidratação, as amostras foram infiltradas lentamente em resina SPURR em uma seqüência de 7 etapas, com acetona 100 % + resina 3:1 (24 horas), 2:1 (24horas), 1:1 (24 horas), 1:2 (24 horas) e 1:3 (24 horas), e 2 vezes, em resina pura, durante 12 horas cada vez. A resina então foi polimerizada em moldes horizontais em estufa a 70°C, por 24 horas (OURIQUES, 2002).

Os cortes ultrafinos foram feitos com navalha de diamante e contrastados em acetato de uranila a 2% durante 5 minutos, no escuro e, logo após, em citrato de chumbo a 1%, durante 10 minutos (REYNOLDS, 1963). Esta etapa foi realizada no Laboratório Central de Microscopia - LCME - da UFSC. Posteriormente, os cortes foram observados e fotografados no microscópio eletrônico de transmissão JEM 1011, com uma tensão de aceleração dos elétrons de 80 kV.

3 RESULTADOS

3.1 TETRASPORÓFITOS COM TRÊS DIAS

Os tetrasporófitos com 3 dias de desenvolvimento de ambos os tratamentos apresentaram de duas a quatro células tubulares, ligadas ainda ao corpo do esporo (Figs. 6a e 6d). Cada célula apresenta o citoplasma compactado, com um único cloroplasto ocupando o centro da célula.

Alguns indivíduos ainda apresentaram material autofluorescente na célula do esporo original, evidenciando que existe material citoplasmático remanescente, e que provavelmente estava ocorrendo fotossíntese neste local (Figs. 6b, 6e, 6c e 6f).

Algumas células ainda apresentaram o tubo germinativo, e todo o conteúdo da célula migrou por este tubo, inclusive o cloroplasto, e por isso constatou-se que também houve fluorescência no tubo germinativo (Figs. 6c e 6f). Nesse estágio de duas a quatro células tubulares não é possível visualizar diferenças significativas entre os grupos controle e tratado, apenas um menor comprimento celular nas células do grupo tratado.

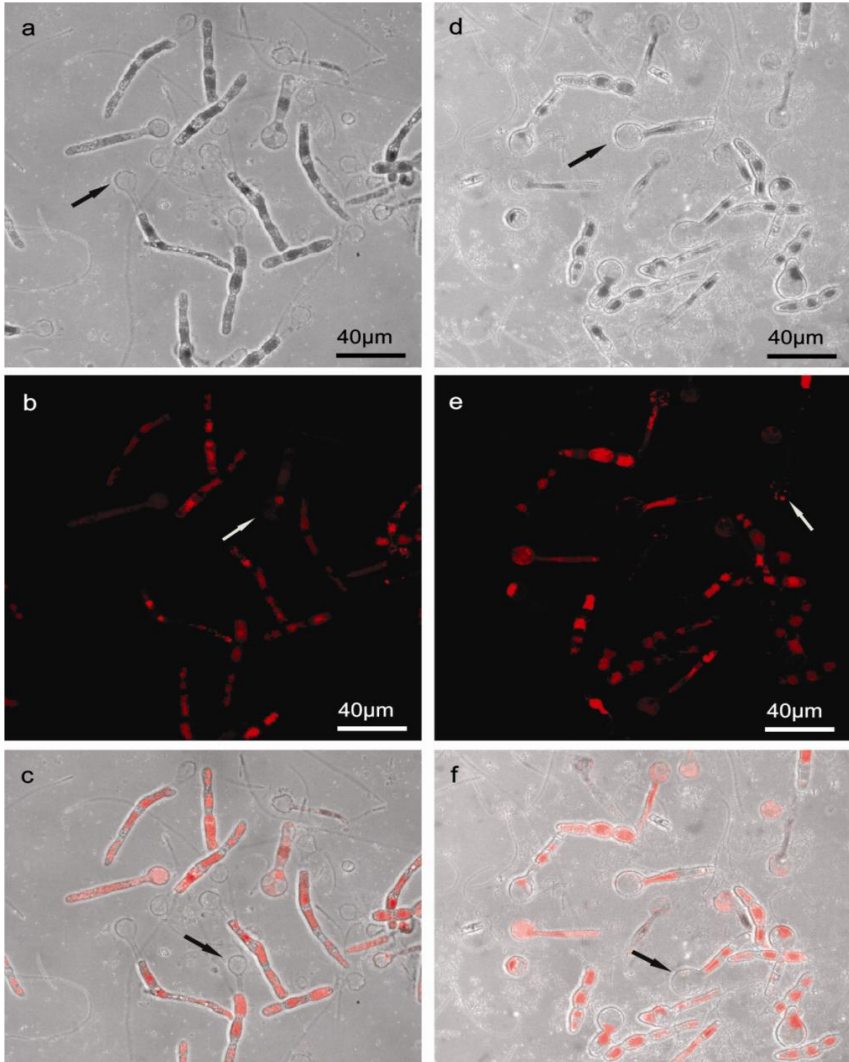


Figura 6: Imagens de microscopia confocal dos tetrasporófitos com três dias de desenvolvimento.

a - c: Grupo controle. d -f: Grupo tratado. 6a e 6d: Imagens de campo claro; 6b e 6e: Imagens de autofluorescência; 6c e 6f: Imagens conjugadas de campo claro e de fluorescência. As setas pretas indicam o corpo do esporo original; e as setas brancas mostram que esses corpos ainda contêm autofluorescência.

Com relação à ultraestrutura, as plântulas com 3 dias de desenvolvimento do grupo controle apresentaram células com o citoplasma bem compactado por organelas (Fig. 7a).

O núcleo apresentou um grande nucléolo elétron-denso, e ocupou uma posição extracêntrica, em função do cloroplasto volumoso (Fig. 7b). Foram visualizados muitos grãos de amido espalhados pelo citoplasma.

Foi observado em cada célula um único cloroplasto, que projetou braços de aspecto radial, com aparência estrelada, ocupando a maior parte do volume celular (Figs. 7a e 7b). Os tilacóides apresentaram disposição paralela e continham os plastoglobulos, que são gotículas lipídicas, com função de reserva (Figs. 7b e 7c). Um grande pirenóide, que nas células das algas funciona como reserva de proteínas fotossintetizantes, ocupou a região central do cloroplasto, profundamente atravessado por lamelas de tilacóides; com alguns destes tilacóides formando um retículo dentro do pirenóide (Figs. 7c e 7e).

Mitocôndrias e corpos de Golgi, formado por cisternas dilatadas, encontraram-se na periferia do citoplasma (Figs. 7d e 7f).

As células do talo estavam conectadas através de conexões intercelulares (Fig. 7g).

Após 3 dias de exposição à radiação ultravioleta B, observou-se através da microscopia eletrônica de transmissão que as células dos tetrasporófitos ainda não demonstravam muitas alterações ultraestruturais, sendo estas ainda raras.

Assim como no controle, as células do grupo tratado mostraram muitos grãos de amido amplamente distribuídos pelo citoplasma (Fig. 8a), núcleo celular com um grande nucléolo (Fig. 8b) além de um grande pirenóide no centro do cloroplasto (Figs. 8b e 8d).

Essas células apresentaram também um cloroplasto muito volumoso que deslocou as demais organelas para a periferia celular (Fig. 8b). E o cloroplasto projetou braços que se espalharam por toda a célula (Fig. 8e).

Foram observadas diversas vezes a associação de corpos de Golgi hipertróficos a mitocôndrias (Figs. 8f, 8h e 8j).

A única mudança observada no grupo tratado em relação ao grupo controle foi um maior espaçamento entre os tilacóides dos braços do cloroplasto que se localizaram na periferia das células (Figs. 8c e 8e).

Observou-se neste grupo conexões intercelulares padrão para esta fase de vida de *N. helminthoides* (Fig. 8g), como também observadas por OURIQUES (2002).

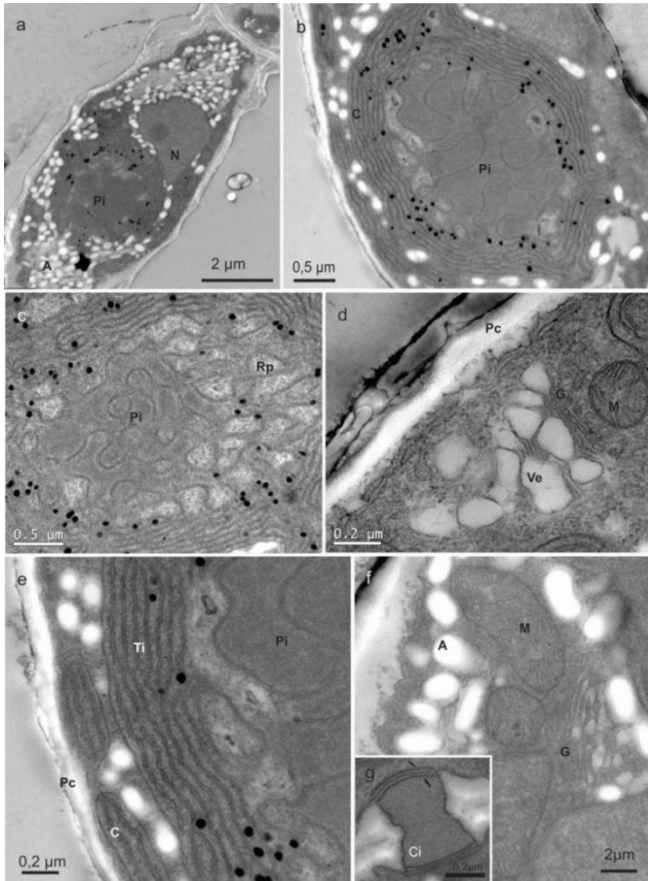


Figura 7: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET), dos tetrasporófitos de *Nematolium helminthoides* com 3 dias de desenvolvimento, grupo controle. a) Vista longitudinal de célula do talo filamentosso, mostrando o cloroplasto com pirenóide central, e o núcleo extracêntrico, b) Pirenóide (Pi), cloroplasto (C) e plastoglóbulo (esferas elétrondensas), c) Detalhe do cloroplasto mostrando o pirenóide, envolvido e atravessado por lamelas de tilacóides, e região reticular (Rp), d) Mitocôndria (M), Corpo de Golgi (G) e vesículas (Ve), e) Detalhe do cloroplasto e dos tilacóides (Ti) paralelos e justapostos, e a parede celular (Pc); f) g) Detalhe do cloroplasto (Cl).

Detalhe da conexão intercelular (Ci), as setas mostram as duas "cap layers", e entre elas está a "cap membrane".

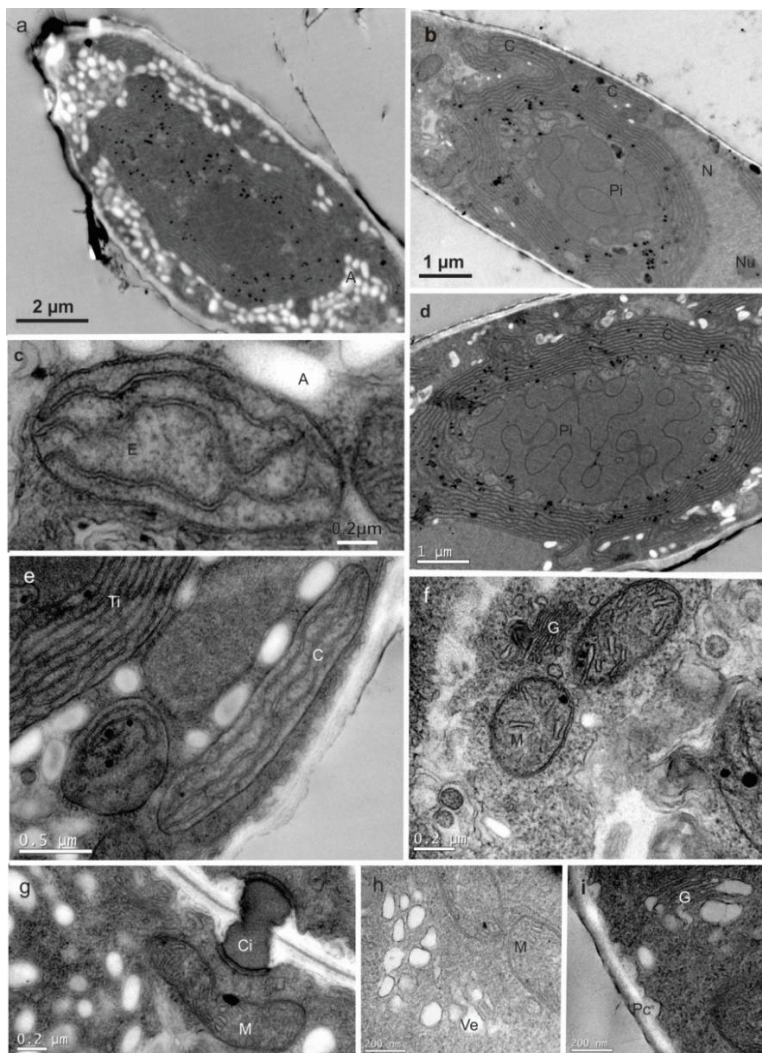


Figura 8: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão, dos tetrasporófitos de *N. helminthoides* com 3 dias de desenvolvimento, grupo tratado com radiação ultravioleta. a) Vista longitudinal de célula, mostrando os grãos de amido distribuídos por todo o citoplasma; b) Vista do cloroplasto (C) e do núcleo (N) extracêntrico, com nucléolo (Nu); c)

Cloroplasto alterado, d) cloroplasto (C) e pirenóide (Pi) central, e) periferia da célula, com braços do cloroplasto alterado, f) mitocôndrias (M) e corpo de Golgi (G), h) Conexão celular (Ci) e mitocôndrias, i) Corpo de Golgi e parede celular (Pc).

3.2 TETRASPORÓFITOS COM SEIS DIAS

Tetrasporófitos com seis dias de desenvolvimento apresentaram talo com um filamento central (principal). Em uma das extremidades do talo as células começaram a se dividir lateralmente, originando ramos laterais (Figs. 9a e 9b). Na outra extremidade do filamento central apareceram células mais estreitas de conteúdo menos denso, que formaram a região rizoidal da alga (Figs. 9a e 9c).

Todas as células apresentaram cloroplasto com autofluorescência (Figs. 9b e 9c).

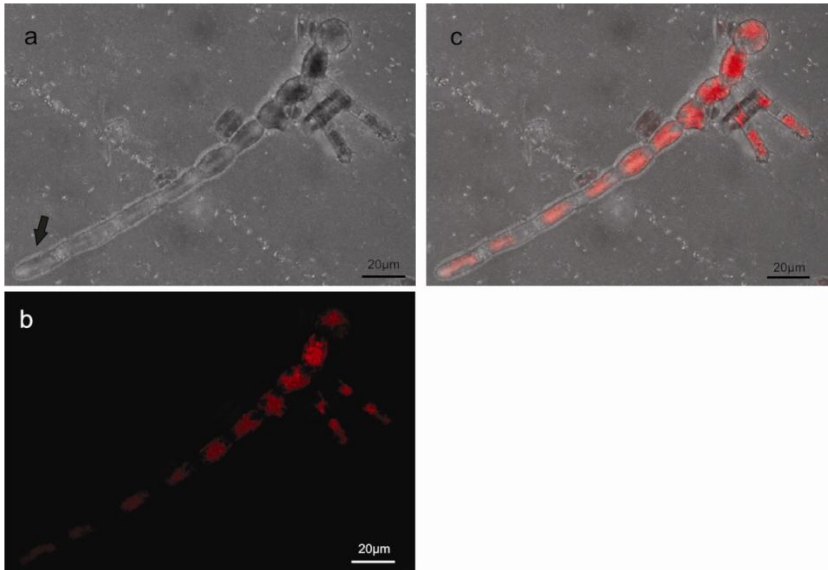


Figura 9: Imagens de microscopia confocal, dos tetrasporófitos de *N. helminthoides* com 6 dias de desenvolvimento, grupo controle.

9a: Imagem de campo claro do talo, mostrando dois ramos laterais, com duas células cada ramo, a seta indica a região rizoidal da alga; 9b Imagem de campo escuro do talo, mostrando a autofluorescência dos cloroplastos.

gem de fluorescência; 9c: Imagem conjugada de campo claro e fluorescência do talo.

Observou-se nos tetrasporófitos expostos à radiação UV-B um atraso no desenvolvimento do talo. Esta característica foi verificada pela falta de sincronia entre os estágios de desenvolvimento, onde várias fases foram observadas. Notou-se que alguns tetrasporófitos já apresentavam a primeira ramificação lateral, outros apresentavam um filamento simples com um número reduzido de células (Figs. 10a, 10b e 10c), além de alguns indivíduos que se apresentaram na primeira divisão do carpósporo.

Por outro lado, alguns indivíduos perderam a polaridade, e chegaram a formar duas extremidades rizoidais (Figs. 10d, 10e e 10f).

Apesar das diferenças no padrão de crescimento, todas as células do grupo tratado apresentaram cloroplastos autofluorescentes (Figs. 10b e 10e).

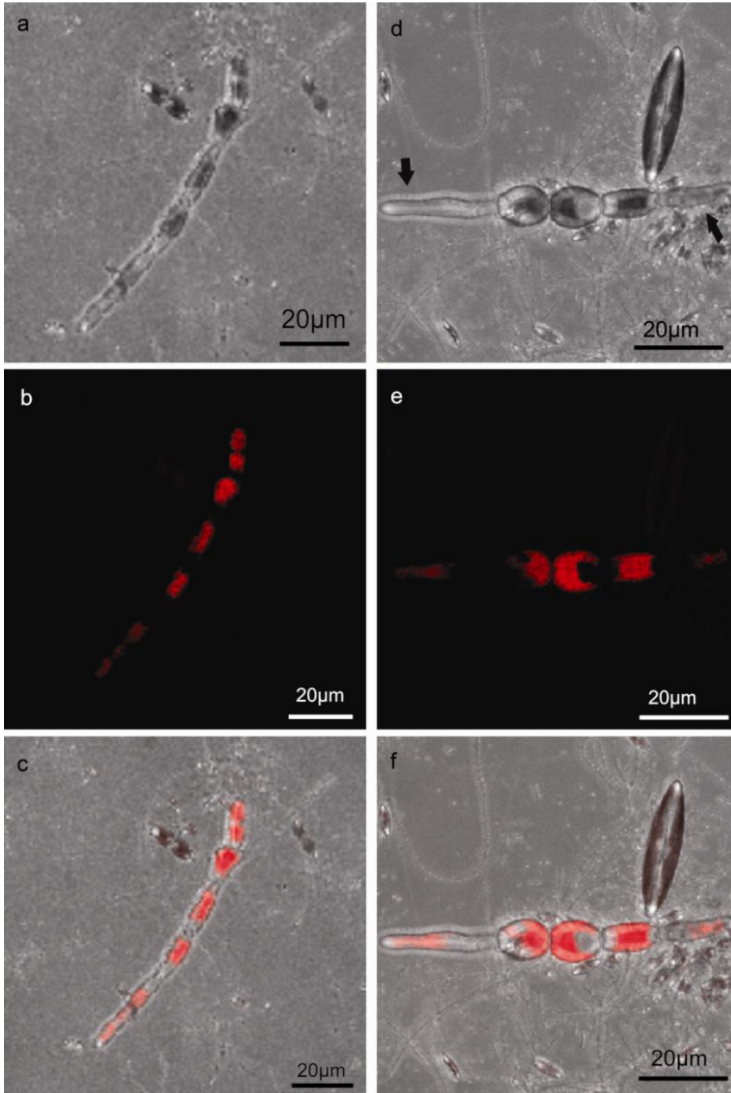


Figura 10: Imagens de microscopia confocal dos tetrasporófitos de *N. helminthoides* com 6 dias de desenvolvimento do grupo tratado.

a) Campo claro de indivíduo com talo simples, b) Fluorescência do mesmo indivíduo, c) Imagem conjugada de campo claro e fluorescência, d) Campo claro de talo com duas extremidades rizoidais (setas); e) Fluorescência do mesmo indivíduo, f) Imagem conjugada de campo claro e fluorescência.

Ultraestruturalmente, as células tubulares do talo filamentoso apresentaram as mesmas características das células anteriormente descritas (três dias).

As células apresentaram um grande pirenóide central, sendo atravessado por inúmeros tilacóides e circulado pelo único cloroplasto (Figs. 11a e 11b). Este cloroplasto evidenciou tilacóides com disposição paralela, e, devido ao seu grande volume, acabou por “empurrar” as demais organelas para a periferia da célula (Figs. 11a e 11d). Foi possível observar também muitos ribossomos livres na região reticular do cloroplasto (Fig. 11d).

O retículo endoplasmático se mostrou mais desenvolvido nesta fase, do que na fase anterior de três dias (Figs. 11c).

Os tetrasporófitos apresentaram ainda muitos corpos de Golgi hipertróficos e núcleos com grandes nucléolos (Figs. 11a, 11f, e 11g). As células apresentaram muitas mitocôndrias associadas aos núcleos, aos corpos de Golgi, e ao retículo endoplasmático rugoso, fato que evidencia intensa atividade metabólica (Fig. 11f).

As células dos tetrasporófitos tratados mostraram acentuado aumento na quantidade de grãos de amido, e de plastoglóbulos (Figs. 12a e 12b).

As porções do cloroplasto próximas à periferia celular continuaram apresentando alterações, mas agora o que ficou evidente foi um grande espaçamento entre os tilacóides (Figs. 12d e 12g). Além disso, foi possível observar uma desorganização na estrutura do pirenóide (Figs. 12b e 12d). As células, assim como na fase anteriormente observada, apresentaram corpos de Golgi hipertróficos, e próximos ao núcleo celular (Fig. 12c).

As mitocôndrias observadas apresentaram cristas dilatadas, além de um acúmulo anormal de pontuações elétron-densas, vistas nas micrografias (Figs. 12e, 12f).

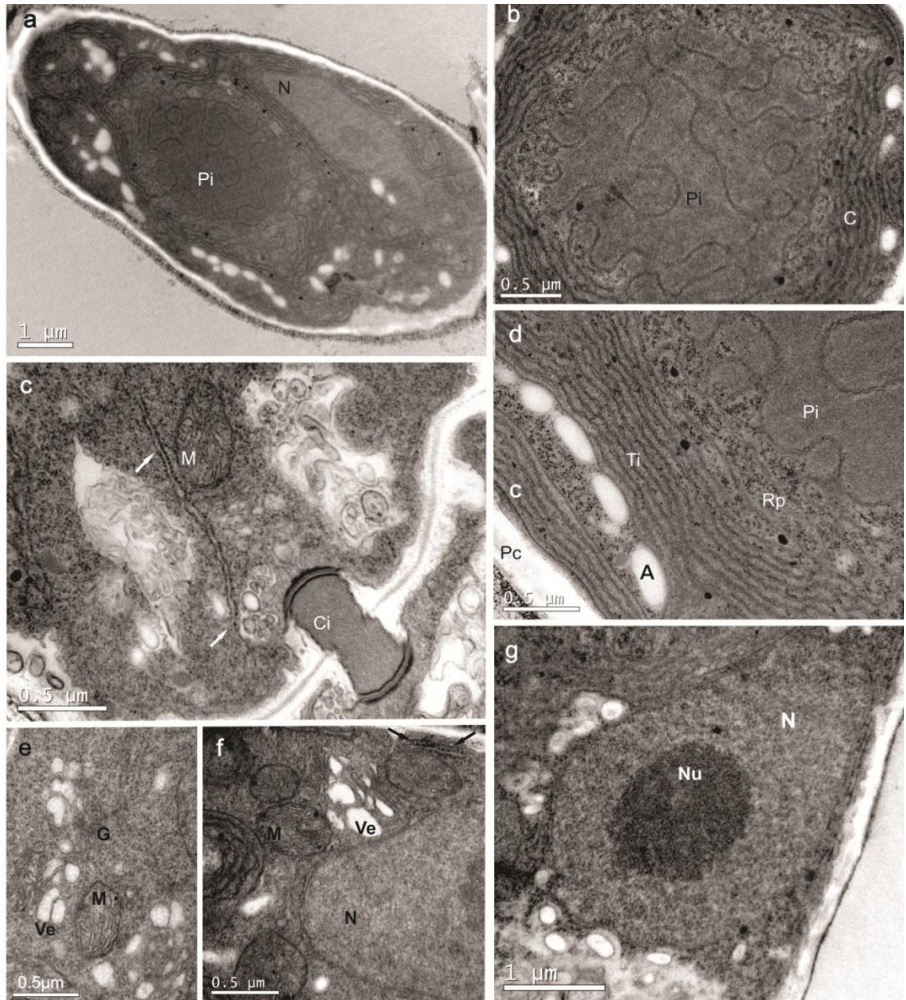


Figura 11: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão, dos tetrastorófitos com 6 dias de desenvolvimento, grupo controle.

a) Vista longitudinal de célula do talo, b) Vista geral do pirenóide (Pi) envolvido pelo cloroplasto (C), c) Conexão intercelular (Ci), mitocôndria (M) e retículo endoplasmático rugoso (setas), d) Detalhe da disposição paralela dos tilacóides (Ti), das região reticular do pirenóide (Rp) e dos grãos de amido das florídeas (A), e) Detalhe das vesículas (Ve) e corpos de Golgi (G); f) Associação do corpo de Golgi (G), mitocôndrias, RER (setas) e núcleo, g) Núcleo com grande nucléolo (Nu) elétron denso.

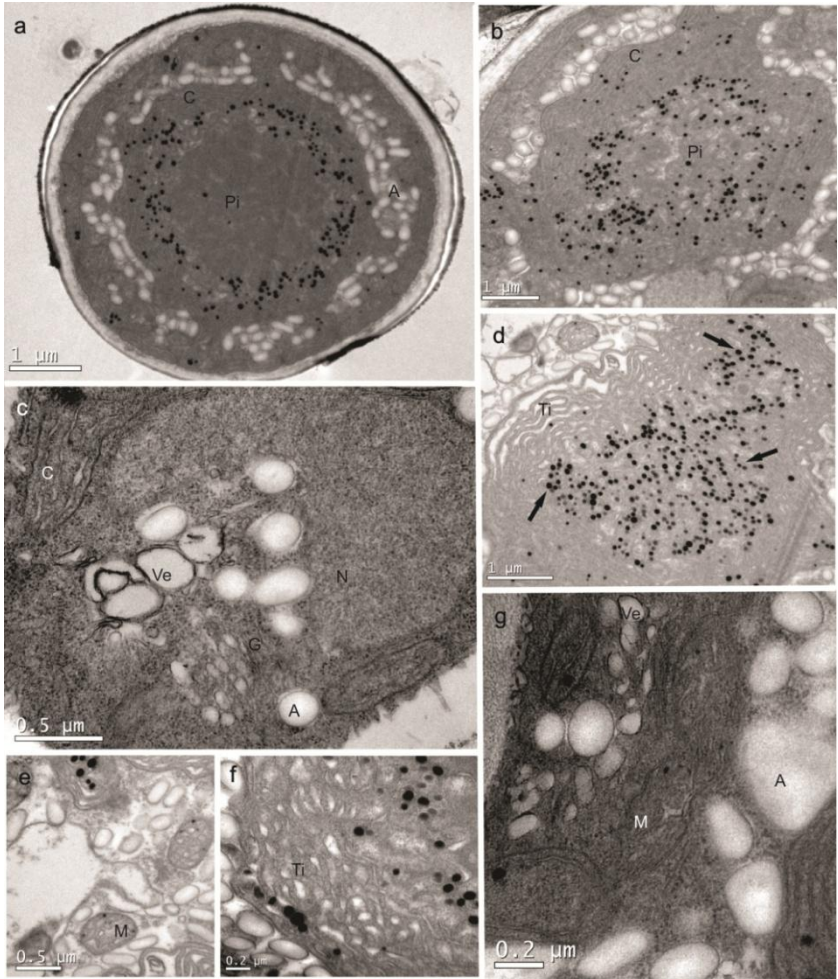


Figura 12: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão, dos tetrasporófitos de *N. helminthoides* com 6 dias de desenvolvimento, grupo tratado com radiação ultravioleta B. a) Vista transversal de célula do talo; b) Vista geral do pirenóide e do cloroplasto; c) Corpo de Golgi e vesículas (Ve); d) Detalhe do pirenóide (Pi) irreconhecível, e cloroplasto (C) alterado, com os tilacóides (Ti) se afastando. Notar a grande quantidade de plastoglóbulos (setas); e) Corpos de Golgi e mitocôndrias com alterações nas cristas; f) Detalhe da perda de estrutura dos tilacóides; g) Mitocôndrias com cristas dilatadas, e pontuações elétrondensas em seu interior.

3.3 TETRASPORÓFITOS COM NOVE DIAS

Nos tetrasporófitos com nove dias de desenvolvimento do grupo controle as divisões celulares prosseguiram, aumentando consideravelmente o número de células tubulares do talo filamentososo (Figs. 13a, 13b, 13c e 13d). Diversos filamentos laterais foram observados, e estes apresentaram ao menos duas células (Figs. 13b e 13c)

Através das imagens de autofluorescência ficou constatado que o cloroplasto é uma organela muito grande, e que ocupou a maior parte do volume celular (Fig. 13f).

Nas células do grupo controle onde houve intensa autofluorescência, foi observada a forma estrelada do cloroplasto, com uma evidente fluorescência na região central, que se mostrou globosa (em virtude dos tilacóides que envolveram e atravessaram o pirenóide), e com braços que emitiram projeções por todo o espaço celular (Fig. 13e).

Através da visualização tridimensional no microscópio confocal foi possível constatar que os tetrasporófitos do grupo controle já apresentavam divisões celulares em três direções (Figs. 13e, 13f), enquanto no grupo tratado estas divisões ficaram restritas a dois planos, eixos X e Y (Figs. 14a, 14b e 14c).

Nos tetrasporófitos tratados observou-se divisões desordenadas das células, em todas as direções dificultando o reconhecimento do filamento principal, em relação aos filamentos laterais (Figs. 14a, 14b e 14c).

As células tratadas com radiação UV-B apresentaram cloroplastos com pouca autofluorescência, quando comparado ao grupo controle.

Dentre o grupo tratado, alguns indivíduos atrasaram muito o seu desenvolvimento, se mostrando ainda na fase inicial de germinação, apresentando indivíduos com apenas duas células, sendo uma destas o corpo original do esporo (Figs. 14d e 14e). Mesmo estes indivíduos com grande atraso no desenvolvimento mostraram material citoplasmático capaz de responder à luz azul, e que emitiu fluorescência na faixa do vermelho, assim como os cloroplastos das células do grupo controle (Figs. 14e, 14f). Porém esta fluorescência não estava com a mesma distribuição das célu-

las em desenvolvimento do grupo controle, onde se viu perfeitamente a morfologia do cloroplasto, com uma região central globosa e com projeções, que lembram braços, por toda a extensão da célula. Nos indivíduos pouco desenvolvidos do grupo tratado, a fluorescência se mostrou bem dispersa, e sem formar a região globosa (Fig. 14e).

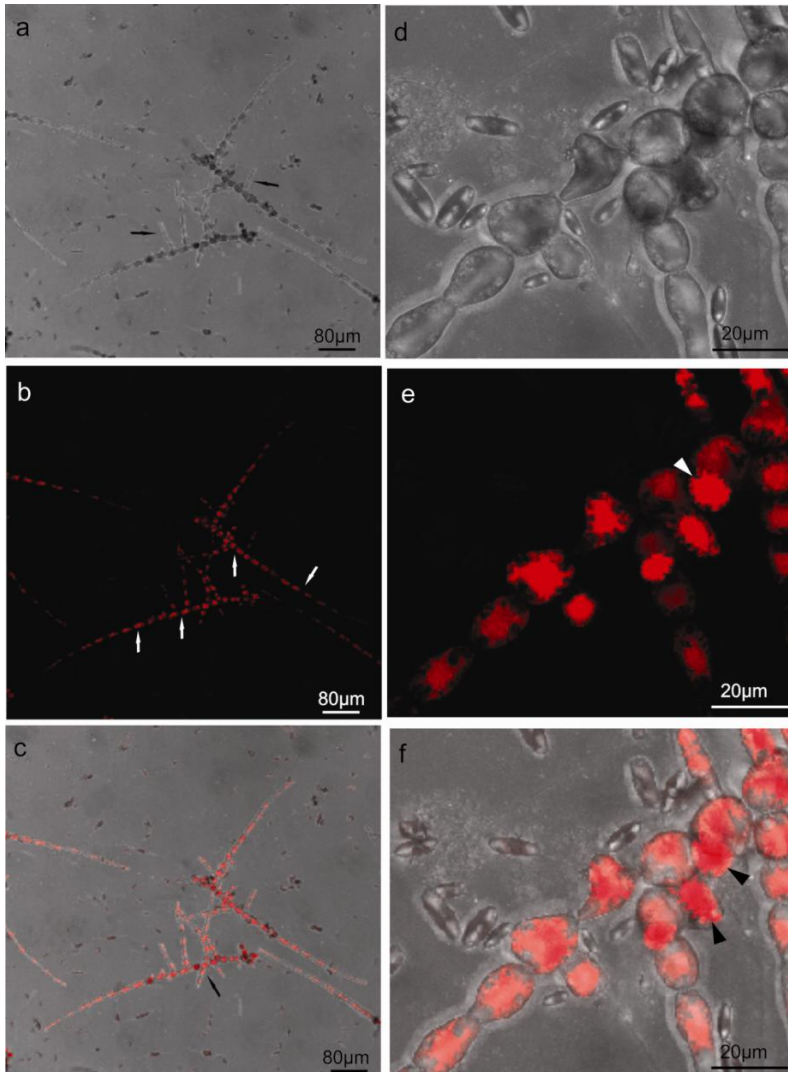


Figura 13: Imagens de microscopia confocal dos tetrasporófitos de *N. helminthoides* com nove dias de desenvolvimento do grupo controle. a) Imagem de campo claro do talo filamentosos; b) Imagem de fluorescência; c) Imagem conjugada de campo claro e fluorescência do talo. As setas brancas indicam o filamento central; e as setas pretas mostram os ramos laterais. d) Detalhe de células em planos diferentes em campo claro; e) fluorescência; e) campo claro e fluorescência conjugados. As cabeças de seta indicam células que cresceram num segundo plano.

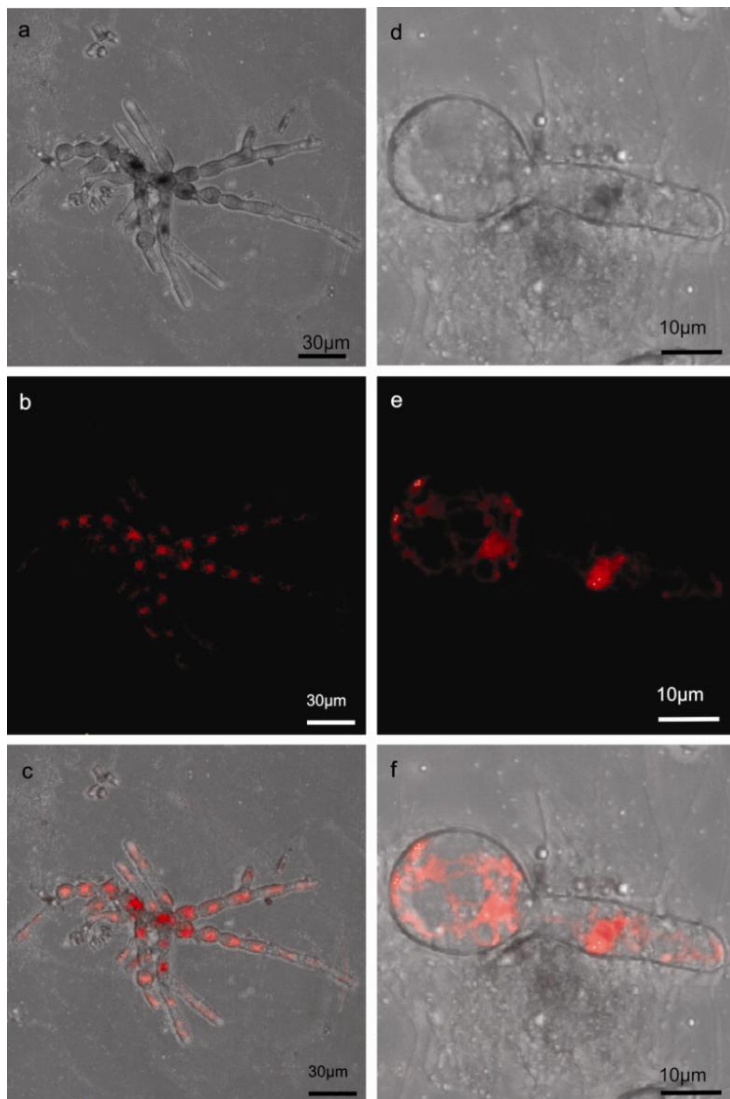


Figura 14: Imagens de microscopia confocal dos tetrasporófitos de *N. helminthoides* com nove dias de desenvolvimento, grupo tratado. a) Imagem de campo claro do talo filamentosos; b) Imagem de fluorescência; c) Imagem conjugada de campo claro e fluorescência do talo. d) campo claro de indivíduo com acentuado atraso de desenvolvimento; e) e f) A autofluorescência evidencia que há material fotossintético mesmo em indivíduos com grande atraso na germinação.

As observações no microscópio eletrônico de transmissão mostraram para as células do grupo controle apresentaram uma organização semelhante àquela observada nos indivíduos com seis dias de desenvolvimento.

As células apresentaram um grande pirenóide central, sendo atravessado por inúmeros tilacóides e circulado pelo cloroplasto; e este evidenciou tilacóides com disposição paralela, e, devido ao seu grande volume, acabou por “empurrar” as demais organelas para a periferia da célula (Figs. 15a, 15b e 15d). As células apresentaram também núcleos com grandes nucléolos (Fig. 15c).

As células apresentaram uma grande quantidade de corpos de Golgi, com vesículas volumosas (Figs. 15f e 15g). As células apresentaram ainda mitocôndrias associadas aos núcleos, aos corpos de Golgi, e ao retículo endoplasmático rugoso, interação que favorece a intensa atividade metabólica desta fase de desenvolvimento (Fig. 15f).

A conexão intercelular se manteve muito semelhante em todos os estágios até o momento, mostrando morfologia cingulada, e três membranas em cada extremidade da conexão (duas “cap layers” e uma “cap membrane”) (Fig. 15e).

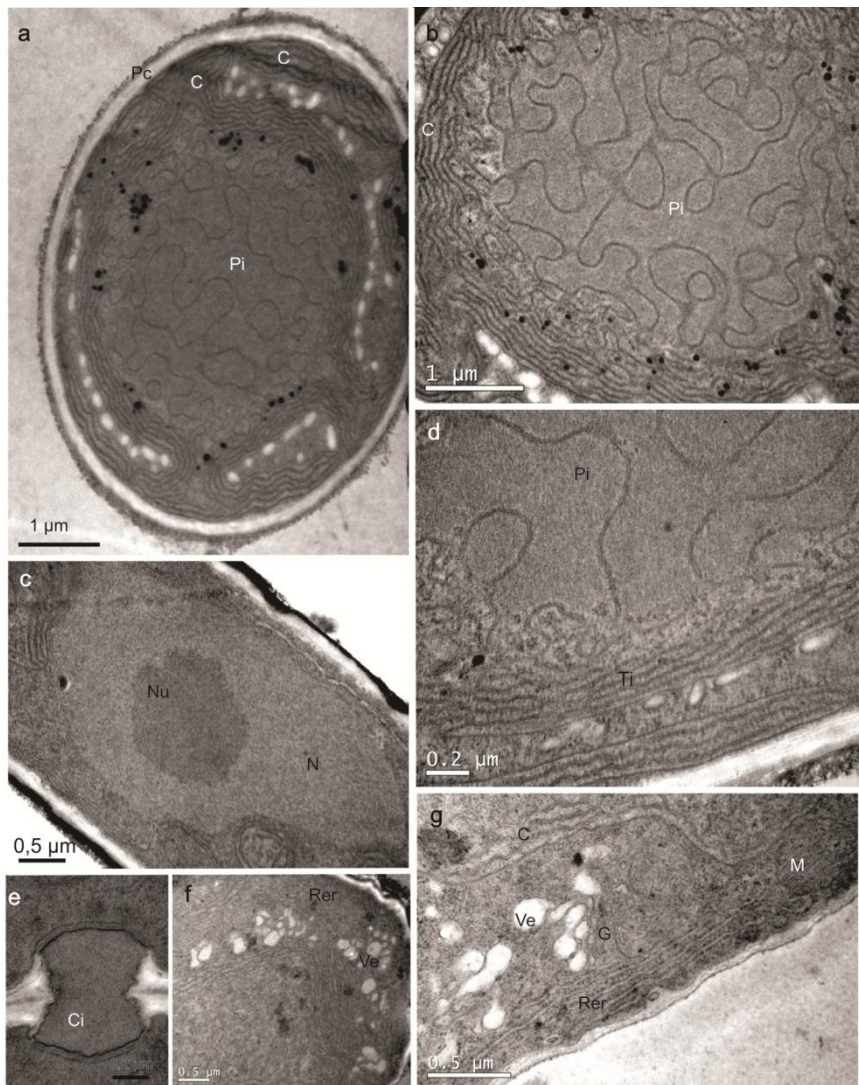


Figura 15: Imagens de MET, dos tetrasporófitos de *N. helminthoides* com 9 dias de desenvolvimento, grupo controle.

a) Vista transversal de célula do talo. b) Detalhe do pirenóide e tilacóides que o envolvem, c) Núcleo (N) e Nucléolo (Nu) proeminente, d) Detalhe das membranas dos tilacóides, bem justapostas, e) Detalhe da conexão intercelular (Ci), f) Múltiplos corpos de Golgi (G), g) Associação comum de mitocôndrias (M), complexos de Golgi, retículo endoplasmático rugoso (R).

Notou-se nas células do grupo tratado com 9 dias de desenvolvimento, uma redução nos grãos de amido em relação ao estágio anteriormente estudado (Fig. 16a). Também os plastoglóbulos apresentaram redução quando comparado com o grupo tratado de 6 dias de desenvolvimento (Figs. 16b, 16c) e novamente quando comparado com o grupo controle de 9 dias de desenvolvimento.

As células dos tetrasporófitos do grupo tratado mostraram muitos corpos de Golgi, porém pouco ativos (Figs. 16f, 16g, 16h).

Nos cloroplastos houve um aumento na distância entre os tilacóides (Fig. 16g), e também um acentuado aumento do volume do estroma (Figs. 16d, 16e).

Além disso, o pirenóide apresentou grande desorganização, chegando a ser impossível diferenciá-lo em muitas células (Fig. 16c).

Outra diferença notada, em relação ao grupo controle, foram as dilatações nas cristas mitocondriais, e aumento na frequência de grânulos elétron-densos na mitocôndria (Fig. 16f).

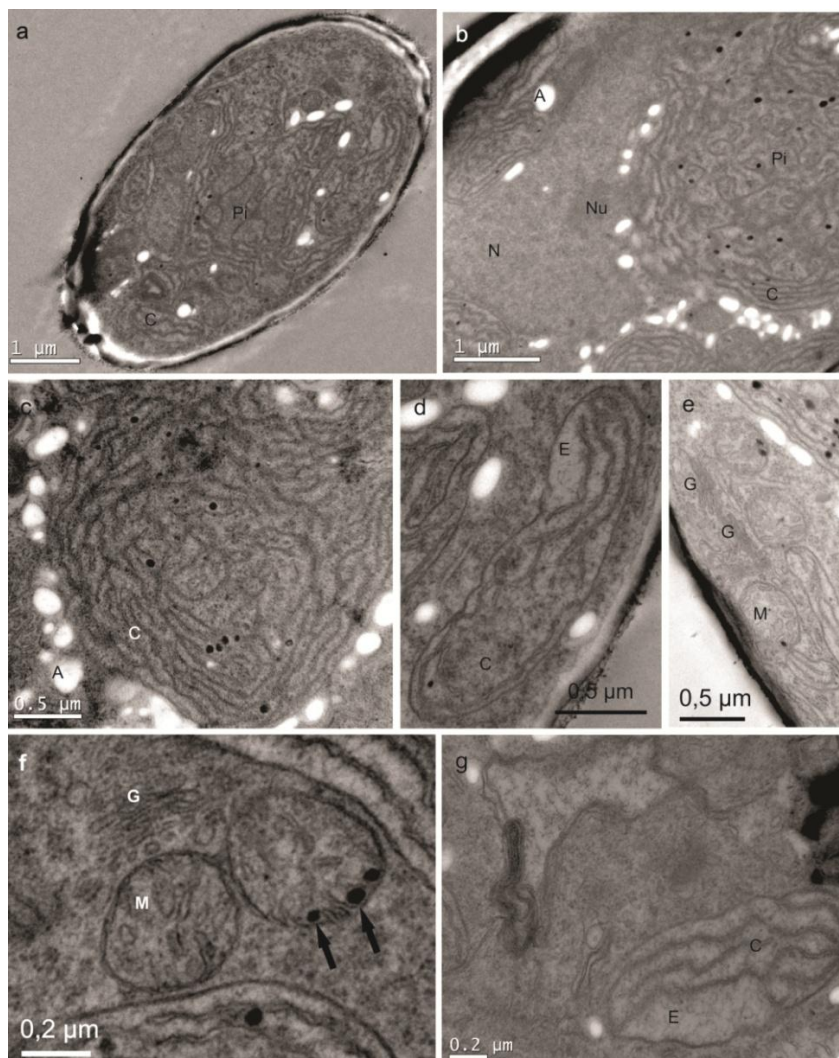


Figura 16: Imagens de MET, dos tetrasporófitos de *N. helminthoides* com 9 dias de desenvolvimento, grupo tratado.

a) Vista longitudinal de célula do talo; b) Vista do núcleo (N) com nucléolo (Nu) e do cloroplasto (C) com pirenóide (Pi) alterado, (A) amido; c) Detalhe de um pirenóide muito alterado; d) Cloroplasto com alteração no volume do estroma (E); e), f) Corpos de Golgi (G) atrofiados e mitocôndrias (M) com cristas dilatadas, e com pontuações elétron-densas (indicadas pelas setas).

3.4 TETRASPORÓFITOS COM DOZE DIAS

Após dozes dias de desenvolvimento os tetrasporófitos do grupo controle, e parte do grupo tratado, apresentaram intensa ramificação, sendo impossível reconhecer aquele que anteriormente era chamado de filamento central (Figs. 17a, 17b, 17 d, e 18^a, 18b, 18c).

As divisões celulares em três dimensões - observadas inicialmente em nove dias para o grupo controle - continuaram e se tornaram mais numerosas (Fig. 17e).

Neste estágio as células do grupo controle apresentaram os cloroplastos com maior fluorescência, além de um maior volume celular (Figs. 17d, 17e) quando comparadas com as células do grupo tratado (Figs. 18d, 18e).

No grupo controle, evidenciou-se uma diferenciação morfológica entre as células que formam o rizóide e as células do talo: estas são maiores, enquanto aquelas são mais estreitas (Fig. 17c). No grupo tratado esta diferença foi menos perceptível (Fig. 18c).

No grupo tratado, em geral as células apresentaram cloroplastos menos fluorescentes quando comparados ao grupo controle (Figs. 17b e 18b). Porém algumas células, do grupo tratado, mostraram intensa fluorescência, mas os cloroplastos apresentaram-se diferentes dos cloroplastos das células controle, não apresentando uma porção globosa central e as típicas expansões laterais em forma de braços (0. 18e).

Os tetrasporófitos do grupo controle apresentaram cloroplastos com maior fluorescência, além de apresentarem maior volume, tanto para as células rizoidais, como para as células do talo, quando comparadas com tetrasporófitos do grupo tratado (Figs. 17c e 17f, 18c e 18f). Além disso, foi possível constatar que as células dos tetrasporófitos controle eram maiores que as células tratadas com radiação UV-B (Figs. 17d e 18d).

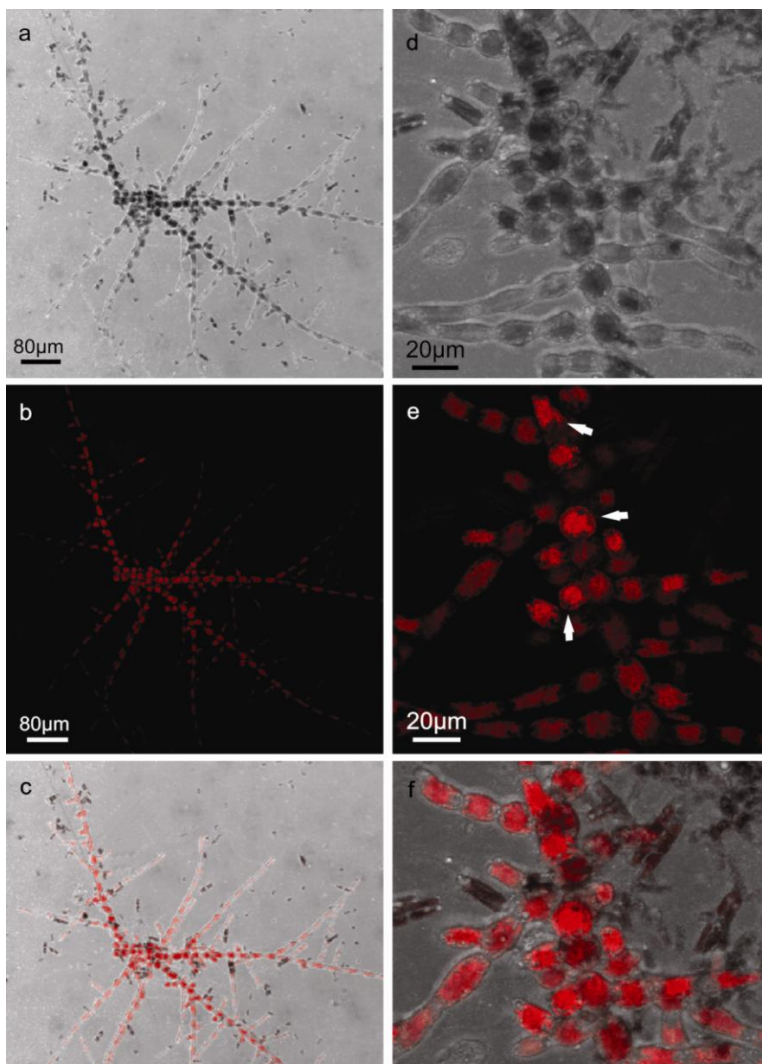


Figura 17: Tetrasporófitos de *N. helminthoides* com 12 dias de desenvolvimento, grupo controle.

a) Campo claro de talo filamentosos com ampla ramificação; b) Fluorescência do mesmo talo; c) Imagem conjugada de campo claro e fluorescência; d) Detalhe do talo; e) Detalhe do mesmo talo, mostrando células em planos diferentes (as setas indicam células num terceiro plano); f) Detalhe que mostra a morfologia e volume dos cloroplastos.

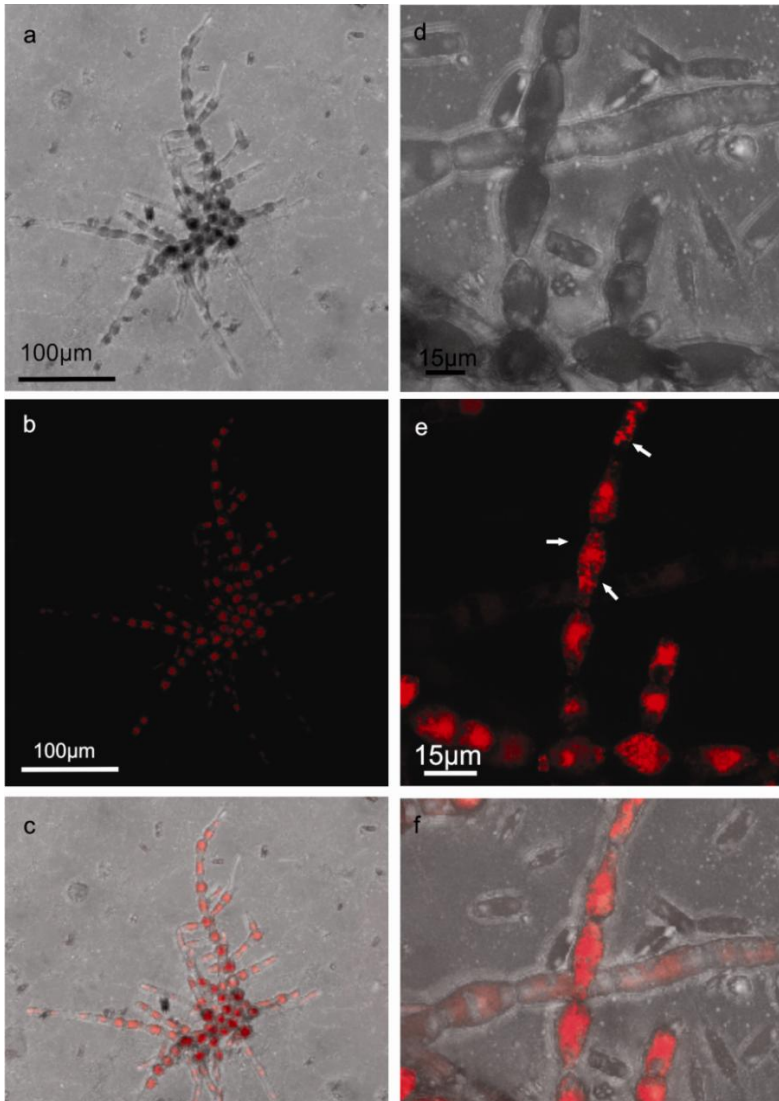


Figura 18: Tetrasporófitos de *N. helminthoides* com 12 dias de desenvolvimento, grupo tratado.

a) Campo claro de talo filamentosos com ramificação; b) Fluorescência do mesmo talo; c) Imagem conjugada de campo claro e fluorescência; d) Detalhe do talo; e) Detalhe do mesmo talo, mostrando a autofluorescência numa estrutura compacta e irregular (setas); f) Detalhe que mostra as estruturas citadas anteriormente num fundo de campo claro.

Observou-se através da microscopia eletrônica de transmissão que as células do grupo controle acumularam grande quantidade de grãos de amido e de plastoglóbulos (Figs. 19a, 19b, 19d e 19e).

Viu-se também que as células do grupo controle mostraram extensos núcleos com nucléolos amplos (Fig. 19c). Estas células apresentaram também extensa rede de retículo endoplasmático rugoso e corpos de Golgi hipertróficos, características que conjuntamente denotam intensa atividade metabólica de síntese (Figs. 19f, 19g).

As células dos tetrasporófitos do material tratado, não apresentaram pirenóide (Figs. 20a, 20b, 20d). Porém estas células apresentaram intensa vacuolização (Figs. 20a e 20b).

Os cloroplastos mostraram maior desorganização e volume alterado, os espaços entre os tilacóides se mostraram também dilatados (Fig. 20a). Além disso, o volume do estroma também estava aumentado (Figs. 20a, 20d, 20e). Alguns cloroplastos apresentaram aglomerados de membranas em seu interior, aos quais se chama corpos membranosos, como anteriormente citados por SCARIOT (2010) (Figs. 20c e 20h). Inclusive em alguns casos, foi observada a ruptura da membrana externa do cloroplasto (Fig. 20i).

Os corpos de Golgi se mostraram raros e com diminutas vesículas (Fig. 20f).

A rede do retículo endoplasmático rugoso não foi visualizada sob microscopia eletrônica de transmissão nesta fase.

As mitocôndrias estavam alteradas, com as cristas mitocondriais dilatadas (Fig. 20f).

As células mais alteradas apresentaram desorganização em quase todas as organelas. E seus citoplasmas se mostraram menos compactos e densos quando comparados às células do grupo controle (Fig. 20b).

Apesar de todas as mudanças descritas acima, morfológicamente o núcleo ainda se parecia com o núcleo de células do grupo controle, se mostrou volumoso e com um grande nucléolo (Fig. 20a).

Registrou-se também, pela primeira vez neste estudo, alteração na conexão intercelular, que se apresentou irregular e com aparente ruptura estrutural (Fig. 20g).

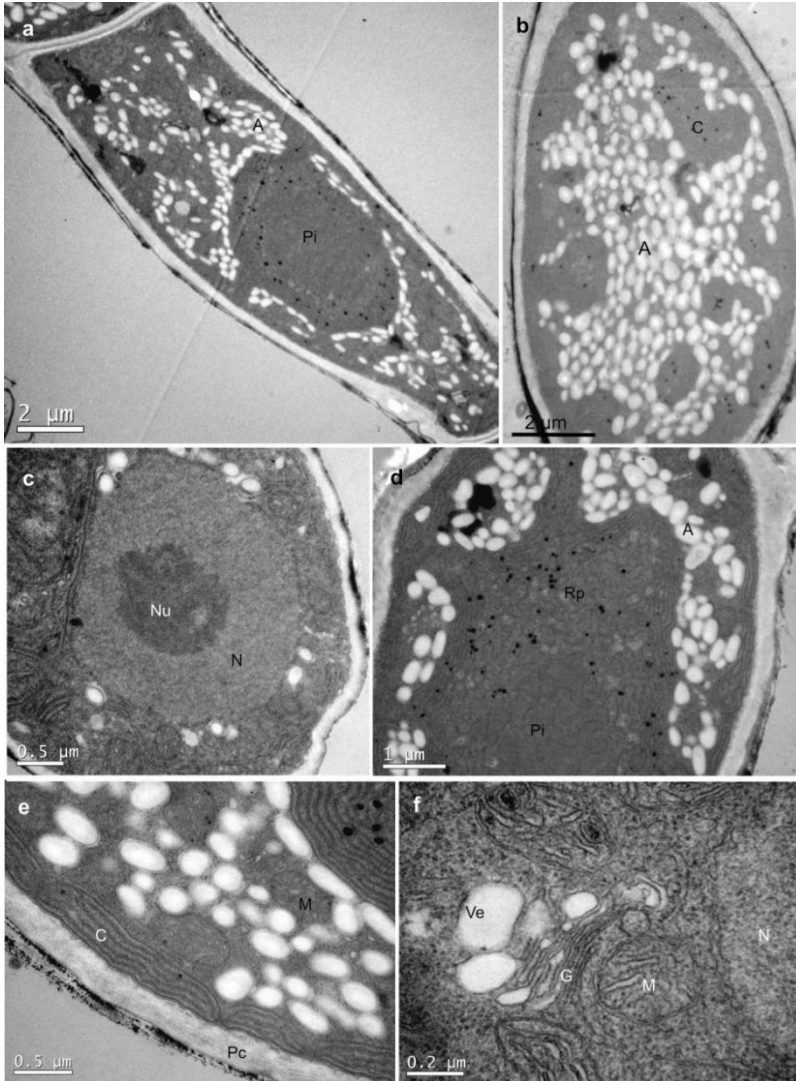


Figura 19: Micrografias de MET, dos tetrasporófitos de *N. helminthoides* com 12 dias de desenvolvimento, grupo controle. a) Vista transversal de célula do talo. b) Detalhe da célula, mostrando a grande concentração de grãos de amido das florídeas, c) Núcleo (N) e Nucléolo (Nu) proeminente, d) Detalhe do pirenóide (Pi) e porção reticular (Rp) e) Detalhe do cloroplasto e da organização paralela dos tilacóides, f) Associação comum de mitocôndrias (M), complexos de Golgi, e vesículas (Ve) e núcleo.

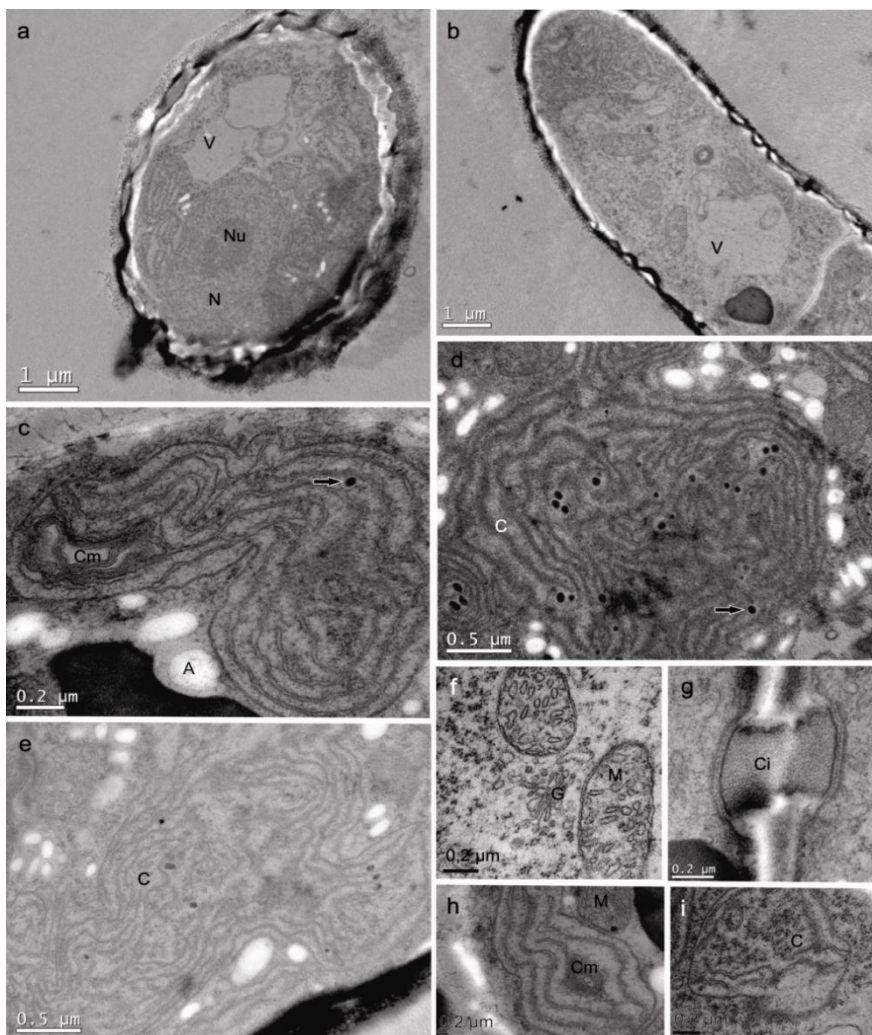


Figura 20: Imagens de MET dos tetrasporófitos de *N. helminthoides* com 12 dias de desenvolvimento, grupo tratado. a) Vista transversal de célula do talo, b) Célula com interior pouco denso, e presença de vacúolos (V), c) Cloroplasto (C) alterado com dilatações entre os tilacóides, e presença de corpos membranosos (Cm), d), e) Cloroplastos sem os pirenóides característicos, f) Mitocôndrias com cristas dilatadas (M) e corpo de Golgi (G) atrofiado (pouco ativo), g) Conexão intercelular (Ci) com aparente ruptura, h) Cloroplasto alterado com dilatações entre os tilacóides, e presença de corpos membranosos, i) Cloroplasto com membrana externa rompida.

3.5 ANÁLISE DA AUTO-FLUORESCÊNCIA DO CLOROPLASTO

A taxa de autofluorescência (valor de intensidade do pixel) se mostrou crescente para os estágios de 3 e 6 dias, nos grupos controle e tratado (Fig. 21). E essa tendência se manteve para o grupo controle, à exceção da taxa de 12 dias, que se mostrou estatisticamente igual à taxa de 9 dias de desenvolvimento. Enquanto para o grupo exposto à radiação UV-B a taxa de fluorescência diminuiu a partir do nono dia de desenvolvimento, e se manteve assim para o décimo segundo dia observado.

Entre o terceiro e o sexto dia de desenvolvimento houve um incremento de pouco mais de 50% na taxa de autofluorescência do cloroplasto, em ambos os grupos.

Já os tetrasporófitos controle de nove dias e doze dias apresentaram taxa de fluorescência duas vezes maior que o material tratado com radiação UV-B (Fig. 21).

A análise de variância (Anova), $p < 0,05$, confirmou a existência de diferenças estatísticas na taxa de autofluorescência para o controle (PAR) para todos os dias de desenvolvimento, exceto entre o nono e o décimo segundo dia. Houve um incremento na autofluorescência à medida que o organismo se desenvolvia.

No caso do grupo tratado à exposição UV-B houve diferenças estatísticas na autofluorescência entre os primeiros seis dias em relação aos últimos seis dias (Fig. 21).

Os testes estatísticos confirmaram a diferença significativa entre a fluorescência do cloroplasto entre os grupos controle e tratado, para nove e doze dias de desenvolvimento.

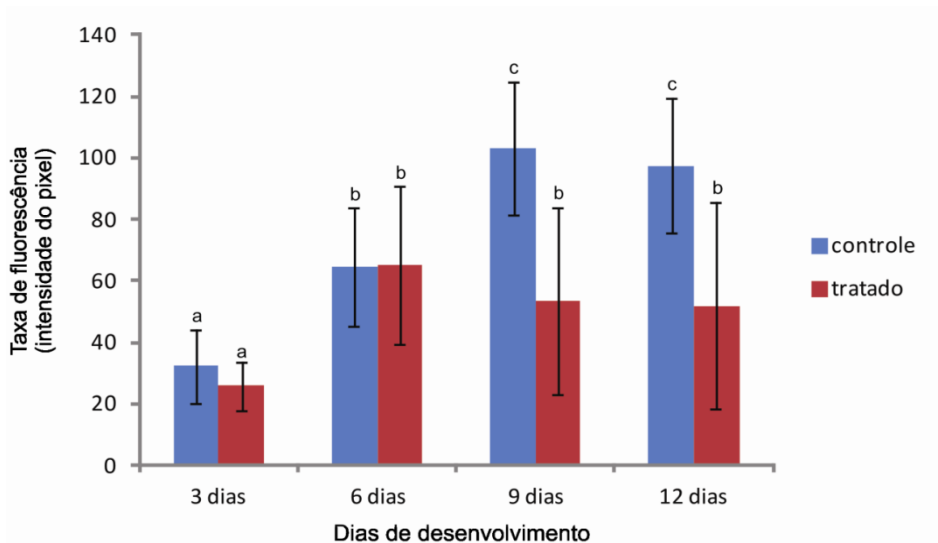


Figura 21: Taxa de emissão de fluorescência dos cloroplastos dos tetrasporófitos submetidos à radiação PAR (grupo controle) e dos tetrasporófitos tratados com radiação UV-B + PAR (grupo tratado) ao longo de doze dias de desenvolvimento. Letras diferentes acima das barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos.

4 DISCUSSÃO

Segundo o presente trabalho a exposição à radiação UV-B durante doze dias (doses diárias de duas horas) evidenciou alterações nocivas ao desenvolvimento de tetrasporófitos jovens de *Nemalion helminthoides*.

Os carpósporos do grupo controle apresentaram um padrão normal de germinação tipo *Nemalion* (OURIQUES & BOUZON, 2005) e consequente aumento gradual na proliferação celular, diferenciação do talo, com sincronia do estágio para os indivíduos observados, ao longo do desenvolvimento. Os indivíduos do grupo tratado apresentaram semelhanças morfológicas ao grupo controle no desenvolvimento e autofluorescência do cloroplasto no primeiro estágio estudado, de 3 dias. A partir do estágio de 6 dias de desenvolvimento observaram-se tetrasporófitos com atraso na diferenciação do talo, e também, em alguns indivíduos, se observou perda da polaridade nas primeiras divisões celulares. E a partir do nono dia de desenvolvimento se constatou que os tetrasporófitos que atrasaram seu desenvolvimento ainda nas primeiras divisões celulares, mantiveram-se no mesmo estágio (sem conseguir prosseguir), porém se mantiveram ainda vivos, fato comprovado pela autofluorescência do cloroplasto observada nestas células. SCARIOT (2010) em sua dissertação de mestrado também observou que esporos e plântulas expostos à radiação ultravioleta B têm seu desenvolvimento atrasado e comprometido.

Sabe-se que os estágios iniciais de desenvolvimento são mais sensíveis aos diversos tipos de estresses ambientais e que a tolerância aos estresses aumenta com a idade, conforme o indivíduo se torna mais diferenciado e desenvolve mais e melhores mecanismos de defesa (DRING *et al.*, 1996; FRANKLIN, FORSTER, 1997, AGRAWAL, 2009). O conhecimento sobre a sensibilidade dos estágios iniciais de desenvolvimento é de suma importância, visto que os estágios microscópicos podem produzir um efeito gargalo no processo de adaptação das comunidades de macroalgas, uma vez que o recrutamento das espécies depende da sobrevivência dos estágios microscópicos, em um cenário de crescentes mudanças climáticas globais (ALTAMIRANO, *et al.*, 2003; AGRAWAL, 2009).

Nos indivíduos do grupo tratado foram observados danos às organelas, diminuição da resposta do aparelho fotossintético, entre outras alterações que serão discutidas a seguir.

Nos tetrasporófitos do grupo tratado observaram-se grandes alterações no cloroplasto, tais como dilatação entre os tilacóides, ruptura de membranas e presença de corpos membranosos dentro das organelas. Alterações semelhantes foram descritas por POPPE *et al.* (2003), HOLZINGER *et al.* (2004), SCARIOT (2012) também para espécies de rodofíceas. Sugere-se então, que essas alterações são regra para as algas vermelhas.

Além das mudanças na ultraestrutura do cloroplasto também se verificou uma redução significativa na fluorescência dos cloroplastos nos tetrasporófitos do grupo tratado, a partir do nono dia de exposição, sugerindo que a radiação UV-B pode comprometer a fotossíntese de *N. helminthoides*.

Redução na capacidade fotossintética em virtude da exposição à RUV-B tem sido amplamente registrada para as algas vermelhas (DRING *et al.*, 1996; ROLEDA *et al.*, 2007; SCHMIDT *et al.*, 2010, 2011, 2012).

A redução na fluorescência do cloroplasto pode significar uma real redução da resposta do aparelho fotossintético, e provavelmente está ligada à desestabilização dos tilacóides, fato observado nas micrografias de microscopia eletrônica de transmissão, e estas membranas (tilacóides) são a plataforma onde se ancoram os pigmentos fotossintetizantes; como também pode estar associado à transcrição comprometida de genes que codificam para as proteínas fundamentais da fotossíntese. Visto que, via de regra, o DNA é um grande alvo celular das espécies reativas de oxigênio, que são geradas em decorrência da exposição à RUV-B (WIENCKE *et al.*, 2000).

A fluorescência da clorofila analisada através da microscopia é uma técnica de estudo avançada, que há alguns anos já vem sendo utilizada para detectar a atividade fotossintética ao nível de células e cloroplastos individuais de uma forma não-invasiva (OXBOROUGH, 2004).

A maioria dos tetrasporófitos que ainda apresentaram-se ligados ao esporo original mostraram autofluorescência nestas células, o que indica que está havendo atividade metabólica e fotossintetizante ainda nessa região. Fato registrado pela primeira vez no presente trabalho.

Nos tetrasporófitos do grupo tratado, o número de plasto-glóbulos é muito maior que o controle, fato comum para plântulas de *Gelidium floridanum* (SCARIOT, 2010, SCARIOT et al. 2012), para o talo de *Kapaphycus alvarezii* (SCHMIDT et al., 2009) e para esporos de *Laminaria hyperborea* (STEINHOFF et al., 2008).

Os corpos de Golgi foram abundantes e hipertróficos nas amostras do grupo controle, do início do experimento ao fim do mesmo. Os corpos de Golgi são muito importantes durante a esporogênese e em esporos (WETHERBEE, et al., 1977). A menor quantidade e a atrofia dos corpos de Golgi foi observada nas células de plântulas irradiadas a partir do nono dia de tratamento. SCARIOT (2012) ao acompanhar o desenvolvimento de plântulas de *G. floridanum*, também descreveu diminuição dos corpos de Golgi, e que isso está associado à redução do crescimento. MEINDL & LÜTZ (1996) associaram este fenômeno a um distúrbio estrutural e funcional do complexo de Golgi, que consequentemente interferiu na habilidade da organela de produzir vesículas secretoras, o que acarretou na inibição do crescimento da alga verde *Micrasterias denticulata*, exposta à radiação UV-B.

A associação de organelas tais como mitocôndrias, retículo endoplasmático e cloroplastos, com os corpos de Golgi, se mostrou sempre presente em todas as fases do grupo controle, e nas faixas de desenvolvimento de três e seis dias do grupo tratado. Esta é uma característica marcante nas algas vermelha (PUESCHEL, 1990). Este tipo de associação proporciona maior eficiência no metabolismo celular, especialmente em fases de vida de intensa divisão e crescimento celular (OATES & COLE, 1989).

Nemalion helminthoides apresenta um pirenoide central, comum a todas as células, e que foi observado em todo o ciclo acompanhado pelo presente estudo. Este pirenoide é uma estrutura primitiva, e está relacionado com a reserva de proteínas e enzimas associadas à fotossíntese, como a Rubisco (MACKAY, et al., 1991; GRAHAM et al., 2009). Nos tetrasporófitos do grupo tratado, a partir do sexto dia de desenvolvimento se torna visível uma desestruturação do pirenoide, provavelmente em função da desestabilização dos tilacóides, que envolvem o pirenoide e dão forma ao mesmo. A maioria dos trabalhos sobre o pirenoide dizem respeito a identificação de enzimas presentes na organela (MACKAY, et al., 1991; MORITA et al., 1999; JENKS & GIBBS, 2000).

Poucos estudos foram feitos abordando a interação da RUV-B e pirenóides de macroalgas. POPPE *et al.* (2003) registraram degradação na estrutura de cristais proteicos de *Phycodrys austrogeorgica*, alga vermelha endêmica da Antártica, e alteração no pirenóide de *Bangia atropurpurea* após a exposição à radiação ultravioleta. Os autores relacionaram os danos à remobilização da reserva de proteína e de nitrogênio para processos de reparo.

Segundo LESSER (1996a, 1996b) a radiação ultravioleta B inibiu a atividade da enzima fotossintetizante Rubisco, e isto pode explicar também a total desestruturação do pirenóide, uma vez que esta organela funciona como reserva de Rubisco, dentre outras proteínas, e o estresse à radiação UV-B pode ter levado ao consumo dessas reservas.

Nas células irradiadas foram observadas alterações nas mitocôndrias em relação ao aparecimento de grânulos elétrondensos, provavelmente ligados ao acúmulo de inclusões de cálcio, desde o terceiro dia de tratamento. Essas pontuações também foram registradas por SCARIOT (2010), que também as ligaram às inclusões de polifosfato cálcio-associados. A habilidade destes associados em se ligar a íons representa um possível papel desses grânulos na regulação do metabolismo mitocondrial (PEACHEY, 1964). Além disso, a mitocôndria apresenta em sua membrana uma bomba de cálcio de baixa afinidade e alta capacidade o que permite que mesmo em baixas concentrações no citosol o cálcio seja bombeado, de maneira ativa, para a mitocôndria (ALBERTS *et al.*, 2010).

Além das inclusões de cálcio, observou-se, na última faixa de tratamento com radiação UV-B, que as mitocôndrias apresentaram alteração no volume e também dilatações nas cristais mitocondriais, alterações também observadas por STEINHOFF *et al.* (2008) nos esporos irradiados com UV de *Laminaria hyperborea*.

As EROs reagem principalmente com lipídeos, devido a afinidade eletrônica. Devido a sua constituição lipoprotéica, as membranas celulares são alvo das EROs, que promove a perda da integridade das membranas e altera a sua permeabilidade (DAHMS & LEE, 2010).

Não foram observadas alterações morfológicas no núcleo celular de *N. helminthoides*, este sempre se apresentou frequentemente com um grande nucléolo. Steinhoff *et al.* (2008), no entanto, registraram o núcleo como a organela cuja forma foi mais

afetada nos esporos de *Laminaria hyperborea* tratados com radiação ultravioleta.

A grande concentração de grãos de amido das florídeas nos indivíduos com doze dias de desenvolvimento sugere que o tetrasporófito está entrando numa nova fase de vida, provavelmente se preparando para a tetrasporogênese. Segundo o estudo citológico do ciclo de vida de *Nemalion helminthoides* (CHEN *et al.*, 1978) os tetrasporângios estavam formados e maduros após quatro semanas de cultura em laboratório.

As conexões intercelulares apresentaram a mesma morfologia ao longo do desenvolvimento, e só foi observada diferença do grupo tratado com radiação ultravioleta B, na última fase de desenvolvimento onde se observaram rupturas nas conexões, porém estas não foram frequentes. Segundo DUCKETT *et al.* (1974), *Nemalion helminthoides* apresenta considerável diversidade de forma e tamanho das conexões intercelulares, dependendo do estágio de vida na qual se encontra a alga.

As alterações mais severas em decorrência da exposição à radiação ultravioleta B foram observadas a partir do sexto dia de desenvolvimento. FALKOWSKY & RAVEN (2007) comentaram que a exposição à radiação ultravioleta B em pequenas doses não gera danos, mas a exposição prolongada a este tipo de radiação pode gerar graves danos às células vegetais.

E por fim, os danos celulares às fases juvenis de *Nemalion helminthoides* causados pela exposição à radiação UV-B interferiram de maneira negativa no desenvolvimento do organismo como um todo, comprometendo seu desenvolvimento, e possivelmente também as atividades fotossintéticas e demais vias metabólicas.

CONCLUSÃO

A radiação ultravioleta B produz grandes alterações morfológicas e fisiológicas nas células durante o desenvolvimento inicial de tetrasporófitos de *Nemalion helminthoides*. Comprometendo assim o desenvolvimento e a viabilidade das fases juvenis dos tetrasporófitos.

Sugere-se que o prolongamento do regime de exposição à referida radiação levaria os tetrasporófitos à morte, e que nestas condições *N. helminthoides* não completaria seu ciclo de vida.

Análises ultraestruturais e de autofluorescência do cloroplasto, como parâmetros para se medir danos pela radiação ultravioleta B em *Nemalion helminthoides* foram registrados pela primeira vez neste presente estudo. E estes parâmetros se mostraram bem ajustados, visto que os resultados de um método de investigação corroboraram com os resultados do outro.

Fica como sugestão também que apesar da fase macroscópica de *N. helminthoides* ocorrer em regiões intertidais, e ficar certo tempo exposta à radiação natural do sol, inclusive à radiação ultravioleta B, as fases microscópicas da espécie se estabelecem em regiões mais profundas e protegidas da radiação UV-B, o que permitiria seu pleno desenvolvimento. E que, provavelmente, os carpósporos uma vez liberados se fixem em regiões mais profundas e protegidas do litoral, onde os mesmos podem se desenvolver com uma menor influência da radiação ultravioleta B presente na luz natural do sol.

E neste sentido, o presente estudo contribuiu no sentido de nos alertar que, ainda que porções maduras de algumas espécies pareçam estar se adaptando ou habituadas à exposição à radiação ultravioleta B, elas podem ter parte de seu ciclo de vida comprometida pela exposição, e isso pode influenciar a ocorrência de determinada fase do ciclo de vida, e/ou espécie na natureza.

A radiação ultravioleta se mostrou de impacto nocivo ao desenvolvimento inicial de tetrasporófitos de *N. helminthoides*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, S.C. 2009. Factors affecting spore germination in algae, **Review Folia Microbiol.** 54 (4), 273-302.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula.** 5ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1268 p.
- ALTAMIRANO, M., FLORES-MOYA, A., FIGUEROA, F.L. 2003. Effects of UV radiation and temperature on growth germlings of three species of *Fucus* (Phaeophyceae). **Aquatic Botany**, 2003. 75:9-20.
- AMOS, W. B., WHITE, J. G., FORDHAM, M. 1987. Use of confocal imaging in the study of biological structures. **Applied Optics.** 26 (16): 3239-3243.
- ANDERSON, B., ANDERSON, J. M. 1980. Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylacoid membranes of spinach chloroplasts. **Biochimia et Biophysica Acta – Bioenergetics.** 593 (2): 427-440.
- ANDRÉS, M., WERLINGER, C., PALACIOS, M., NAVARRO, N. P., 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.
- APPLE, M. E., HARLIN, M. M. 1994. Inhibition of tetraspore adhesion in *Champia parvula* (Rhodophyta). **Phycologia**, 34: 417-423.
- AVANZINI, A. 1989. La Ultraestructura de Las Esporas de Rhodophyta. **Insular**, Florianópolis, 19: 7-10.
- BAKER, K. S., SMITH, R. C., GREEN, A. E. S. 1980. Middle ultraviolet radiation reaching the ocean surface. **Photochemistry and Photobiology**, 32:367-374.

BOELEN, P., OBENOSTER, I., VINK, A. A., BUMA, A. G. J. 1999. Attenuation of biologically effective UV radiation in tropical Atlantic waters measured with a biochemical DNA dosimeter. **Photochemistry and Photobiology**, 69: 34-40.

CHAERLE, L., LEINONEN, I., JONES, H. G., VAN DER STRAETEN, D. 2007. Monitoring and screening plant populations with combined thermal and chlorophyll fluorescence imaging. **Journal of Experimental Botany**. 58: 773 – 784.

CHAMBERLAIN, A. H. L., EVANS, L. V. 1973. Aspects of Spore Production in the Red Alga *Ceramium*. **Protoplasma**, Berlin, 76: 139-159.

CHEMIM, E. 1937. Le Developpement Des Spores Chez Les Rhodophycées. **Revue Générale de Botanique**, 49: 205-234, 300-327, 353-374, 424-448, 478-536.

CHEN, L. C. M., EDELSTEIN, T., BIRD, C., YABU, H. 1978. A culture and cytological study of the history life of Nemalion helminthoides (Rhodophyta, Nemaliales). **Proceedings of the Nova Scotian Institute of Science**, 28: 191-199.

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., DEPLEDGE, M. H. 2001. The influence of UV-B radiation on the reproductive cells of the intertidal macroalga, *Enteromorpha intestinalis*. **Aquatic Toxicology**, 56: 1-11.

DIANNELIDIS, B. E., KRISTEN, U. 1988. Comparative histochemical studies of reproductive and gametophytic tissue of Marine Red Algae by Means of Fluorescent and Light Microscopy. **Botanica Marina**, 31:163-170.

DIXON, P. S. 1973. **Biology of the Rhodophyta**. Edinburgh: Oliver and Boyd, 285 p.

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.

DUCKETT, J. G., BUCHANAM, J. S., Peel, M. C., Martin, M. T. 1974. An ultrastructural study of pit connections and percurrent proliferations in Red Alga *Nemalion helminthoides* (Vell. in With.) BAtt. **New Phytologist**, 73 (3):497-507.

ESSEN L.O., Klar T. 2006. Light-driven DNA repair by photolyases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 63: 1266-1277.

FALKOWSKY, P. G., RAVEN, J., A. **Aquatic Photosynthesis**. 2nd Edition. Princeton: Princeton University Press, 2007. 484 p.

FRANKLIN, L. A., FORSTER, R. M. 1997. The changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. **European Journal of Phycology**, 32: 207-232 .

FRANKLIN, L. A., YAKOVLEVA, I., KARSTEN, U., LUNING, K. 1999. Synthesis of mycosporie-like amino-acids in *Chondrus crispus* (Florideophyceae) and the consequences for sensitivity to ultraviolet B radiation. **Journal of Phycology**, 35: 682-693.

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

GABRIELSON, P. W., GARBARY, D. 1986. Systematics Red Algae (Rhodophyta). **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 3, n. 4:329-366.

GOVINDJEE, R. 1995. Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence. **Australian Journal Plant Physiology**, 22 : 131 – 160 .

GRAHAM, L.E., GRAHAM, J. M., WILCOX, L. W. 2009. **Algae**. 2nd Edition. San Francisco: Pearson Education, 2009. 616 p.

GUIRY, M. D. 1990. Sporangia and spores. In: COLE, K. M., SHEATH, R. G. **Biology of the Red Algae**. Cambridge: Cambridge University Press, 347-376.

HADER, D. P. 2001. Adaptation to UV stress in algae. In RAI, L. C., GAUR, J. P. [Eds.] **Algal Adaptation to Environmental Stresses**. Berlin, 173-202.

HADER, D. P., KUMAR, H. D., SMITH, R. C., WORREST, R. C. 1998. Effects on aquatic ecosystems. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 46 (1-3): 53-68.

HADER, D. P., KUMAR, H. D., SMITH, R. C., WORREST, R. C. 1998. Effects on aquatic ecosystems. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, 46: 53-68.

HADER, D.P., KUMAR, H.D., SMITH R.C., WORREST R.C. 2003. Aquatic ecosystems: effects of solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. **Photochemistry and Photobiology Scientific**, 2: 39-50.

HADER, D. P., SINHA, R.P. 2005. Solar ultraviolet radiation-induced DNA damage in aquatic organisms: potential environmental impact. **Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. Volume 571, Pages 221-233.

HENRY, B. E., VAN ALSTYNE, K. L., 2004. Effects of UV radiation on growth and phlorotannins in *Fucus gardneri* (Phaeophyceae) juveniles and embryos. **Journal of Phycology**, 40: 527-533.

HOLZINGER, A., LUTZ, C., KARSTEN, U., 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**. 2004. 6: 568-577.

HUOVINEM, P. S., OIKARI, A. O. J., SOIMASUO, M. R., CHERR, G. N. 2000. Impact of UV Radiation on the early development of the giant kelp (*Macrocystis pyrifera*) gametophytes. **Photochemistry and Photobiology**, 72: 308–313.

INOH, S. 1947. **Kaiso no Hassei (Germination of marine algae spores)**. Hokuryukan, Tokyo, 255.

JENKS, A. GIBBS, S. P. 2000. Immunolocalization and distribution of form II rubisco in the pyrenoid and chloroplast stroma of *Amphidinium carterae* and form I rubisco in the symbiont-derived plastids of *Peridinium foliaceum* (dinophyceae). **Journal of Phycologie**. 36 (1): 127-138.

JIANG, H., GAO, K., HELBLING, W. 2007. Effects of solar UV radiation on germination of conchospores. **Marine Biology**. 151: 1751-1759.

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

KIRCHHOFF, V. W. J. H., ECHER, E., LEME, N. P., SILVA, A. A. 2000. A Variação Sazonal da Radiação Ultravioleta Solar Biologicamente Ativa. **Brazilian Journal of Geophysics**, Vol. 18(1).

KOMISHI, A. EGUCHI, A., HOSOI, F., OMASA, K. 2009. 3D monitoring spatio-temporal effects of herbicide on a whole plant using combined range and chlorophyll a fluorescence imaging. **Functional Plant Biology**. 36(11): 874–879

KUHLENKAMP, R., FRANKLIN, L.A., L'UNING, K. 2001. Effect of solar UV radiation on growth in the marine macroalgae *Dicyota dichotoma* (Phaeophyceae) at Helgoland and its ecological consequences. **Helgoland Marine Research**, 55: 77-86.

LARCHER, W. 2000. **Ecofisiologia Vegetal**. 1st Edition. São Carlos: Rima Artes e Textos. 531 p.

LEE, R. E. 1989. **Phycology**. 2nd Edition. Cambridge: Cambridge University Press. 645 p.

LESSER, M., P. 1996a. Acclimation of phytoplankton to UV-B radiation: oxidative stress and photoinhibition of photosynthesis are not prevented by UV-absorbing compounds in the dinoflagellate *Prorocentrum micans*. **Marine Ecology Progress Series**. 132: 287-297.

____ 1996b. Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. **Limnology and Oceanography**, 41 (2): 271-283.

LICHTENTHALER, H. K., MIEHE, J. A. 1997. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. **Trends Plant Science**. 2: 316 – 320.

LICHTENTHALER, H. K., BABANI, F. 2000. Detection of photosynthetic activity and water stress by imaging the red chlorophyll fluorescence. **Plant Physiology Biochemistry**. 38 (11): 889-895.

MACKAY, R. M. L., GIBBS, S. P., Vaughn, 1991. RuBisCo activase is present in the pyrenoid of green algae. **Protoplasma**. 162 (1): 38-45.

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

MARTIN, M. T. 1969. A Review of Life-Histories in the Nemateliales and Some Allied Genera. **British Phycological Journal**, London v. 4 n.2: 145-158.

MEINDL, U., LUTZ, C. 1996. Effects of UV irradiation on cell development and ultrastructure of green alga *Micrasterias denticulate*. **Journal of Photochemistry and Photobiology Biol**. 36: 285–292.

MORITA, E., ABE, T., TSUZUKI, M. FUGIWARA, S., SATO, N., HIRATA, A., SONOIKE, K., NONAZI, H. 1999. Role of pyrenoids in the CO₂-concentrating mechanism: comparative morphology, physiology and molecular phylogenetic analysis of closely related strains of *Chlamydomonas* and *Chloromonas* (Volvocales). **Planta**. 208: 365-372.

OATES, B. R., Cole, K. M. 1989. Organelle association in developing trichoblasts of *Polysiphonia hendryi* (Rhodophyta, Ceramiales). **European Journal of Phycology**, 24 (4): 339-345.

OMASA, K., SHIMAZAKI, K., AIGA, I., LARCHER, W., ONOE, M. 1987. Image analysis of chlorophyll fluorescence transients for diagnosing the photosynthetic system of attached leaves. **Plant Physiology**. 84: 748 – 752 .

OMASA K, KONISHI A. Development of a 3D confocal laser scanning microscope for applying the saturation pulse method to chlorophyll a fluorescence. 2008. **14th International Congress on Photosynthesis**. Allen JF, Gantt E, Golbeck JH, Osmond B, editors. Berlin: Springer: 657-660.

OMASA, K., KONISHI, A., TAMURA, H., HOSOI, F. 2009. 3D Confocal Laser Scanning Microscopy for the Analysis of Chlorophyll Fluorescence Parameters of Chloroplasts in Intact Leaf Tissues. **Plant & Cell Physiology**, 50 (1): 90-105.

OURIQUES, L. C. 2002. **Padrões de germinação e aspectos ultraestruturais de esporos de Rhodophyta**. [tese]. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Rio Claro, 2002.

OURIQUES, L. C., BOUZON, Z. L. 2003. Ultrastructure of germinating tetraspores of *Hypnea musciformis* (Gigartinales, Rhodophyta). **Plant Biosystems**, 137:193-202.

____ 2005. Spore development in red algae. A case study with *Nemalion helminthoides* (Nemaliales, Rhodophyta). **Algological Studies**, Stuttgart, 116:115-127.

OURIQUES, L. C., SCHMIDT, E. C., BOUZON, Z. L. 2011. Cytochemical Study of Spore Germination in *Nemalion helminthoides* (Nemaliales, Rhodophyta). **Journal of Advanced Microscopy Research**, 6: 1–8.

OXBOROUGH, K. 2004. Using chlorophyll a fluorescence imaging to monitor photosynthetic performance. *In* **Chlorophyll a Fluorescence. A Signature of Photosynthesis**. 409 – 428 . Springer , Dordrecht.

PEACHEY, L., D. 1964. Electron microscopic observations on the accumulation of divalent cations in intramitochondrial granules. **Journal of Cell Biology**. 20 (1): 95-111.

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

PUESCHEL, C. M. 1979. Ultrastructure of tetrasporogenesis in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). **Journal of Phycology**, 15: 409-424.

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

ROLEDA, M. Y., WIENCKE, C., LUDER, 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.

SCARIOT, L. A. 2010. **Efeitos da radiação ultravioleta-B na germinação e desenvolvimento dos tetrásporos de *Gelidium floridanum* (Gelidiales, Rhodophyta): crescimento, morfologia e ultraestrutura**. [Dissertação]. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, Florianópolis, 2010.

SCARIOT, L., A., ROVER, T., ZITTA, C. S., HORTA, P. A., OLIVEIRA, E. C., BOUZON, Z. L. 2012. Effects of UV-B radiation on *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Gelidiales): germination of tetraspores and early sporeling development. **Journal of Applied Phycologie**.

SCHMIDT, E. C., SCARIOT, L., ROVER, T., 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**, 2009. 40: 860-869.

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

SCHMIDT, E. C., DOS SANTOS, R. W., FAVERI, C., HORTA, P. A., MARTINS, R. P., LATINI, A., RAMLOW, F., MARASCHIN, M., BOUZON, Z., L. 2012. Response of the agarophyte *Gelidium floridanum* after in vitro exposure to ultraviolet radiation B: changes in ultrastructure, pigments, and antioxidant systems. **Journal of Applied Phycology**.

STEINHOF , F. S., WIENCKE, C., MULLER, R., 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.

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

VAN DE POLL, W. H., BISCHOF K., ANITA G. J., BREEMAN, B. 2002. Habitat related variation in UV tolerance of tropical marine red macrophytes is not temperature dependent. **Physiologia Plantarum**. 2002, 28: 118.

VAN DER LEUN, J.C., GRUIJL, F.R. 1993. Influences of ozone depletion on human and animal health. In: TEVINI, M. ed. **UV-B radiation and ozone depletion: effects on humans, animals,**

plants, microorganisms and materials. Lewis Publishers. 4: 95-123.

WETHERBEE, R., West, J. A. 1977. Golgi apparatus of unique morphology during early carposporogenesis in a red alga. **Journal of Ultrastructure Research.** 58: 119—133.

WIENCKE, G. C. I., PAKKER, H. FLORESMOYA, A., Altamiro, M., HANELT D., BISCHOF, K., FIGUEROA, F. L. 2000. Impact of UV radiation on viability, photosynthetic characteristics and DNA on algal zoospores: implications for depth zonation. **Marine Ecology Progress Series,** 2000. 197: 217-219.

WIENCKE, C., ROLEDA, M. Y., GRUBER, A., CLAYTON, M. N., 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.

ZAR, J. H. 1999. **Biostatistical Analysis.** 4th Edition. Prentice-Hall, Inc. 663p.