

Carmen Simioni

**ANÁLISE DOS MECANISMOS REGULADORES DOS
PROCESSOS DE POLARIZAÇÃO E GERMINAÇÃO DE
ESPOROS E, DESENVOLVIMENTO DE GAMETÓFITOS
JOVENS DE *Gelidium floridanum* SOB EFEITO DA RADIAÇÃO
ULTRAVIOLETA E DO METAL PESADO CÁDMIO.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e do Desenvolvimento da
Universidade Federal de Santa Catarina, como
requisito para a obtenção do título de Doutora em
Biologia Celular e do Desenvolvimento.
Orientadora: Profa. Dra. Zenilda Laurita Bouzon
Coorientador: Dr. Éder Carlos Schmidt

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Simioni, Carmen

Análise dos mecanismos reguladores dos processos de polarização e germinação de esporos e, desenvolvimento de gametófitos jovens de *Gelidium Floridanum* sob efeito da radiação ultravioleta e do metal pesado cádmio. / Carmen Simioni ; orientadora, Zenilda Laurita Bouzon ; coorientador, Eder Carlos Schmidt. - Florianópolis, SC, 2014.

120 p.

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

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Desenvolvimento de Esporos . 3. Radiação Ultravioleta . 4. Metal Pesado Cádmio . 5. Ultraestrutura. I. Bouzon, Zenilda Laurita. II. Schmidt, Eder Carlos . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

Agradecimentos

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Um agradecimento especial, à minha orientadora Prof(a) Dra. Zenilda, pela oportunidade dada, pelo incentivo nos momentos mais críticos durante o andamento do projeto, pelo seu conhecimento, por acreditar na minha capacidade. Por ser essa “mãe” nesses anos de convívio, meu eterno, muito obrigada!!!

Ao meu coorientador Dr. Éder, agradeço seu incentivo, suas correções, suas contribuições e ajuda em todas as fases do meu trabalho.

Aos colegas do laboratório, Giulia, Débora, Chirle, Fernanda, Gladys, Marthiellen e Luska, pela amizade, companheirismo e colaboração no andamento das atividades, além dos momentos agradáveis e descontraídos. Quero agradecer em especial, ao Rodrigo e a Ticiane, pelas inúmeras coletas realizadas e apoio durante a execução do projeto, as noites que passamos no laboratório e as inúmeras horas em frente à lupa separando material, foram muitas frustrações, mas conseguimos alcançar o objetivo.

À Prof Dra. Luciane agradeço pelos momentos de companheirismo, suas contribuições e parcerias durante esses anos.

À Prof Dra. Fungyi Chow por disponibilizar o equipamento PAM para as análises, pelas explicações e pelos momentos disponibilizados para tirar as dúvidas sobre essa técnica.

Aos colegas do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV), Dra Fernanda Ramlov, Eva Regina e Prof Dr. Marcelo Maraschim, pelo auxílio na extração, identificação e quantificação de carotenoide, além das contribuições para a análise dos resultados.

Aos professores do programa de Pós-Graduação de Biologia Celular e do Desenvolvimento, pelos ensinamentos dados e contribuições para a execução do projeto. Em especial a Prof(a) Dra. Evelise pela revisão feita na tese, muito obrigada!

Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica (LCME), em especial aos funcionários Eduardo e Eliana, pelo atendimento e colaboração em todas as análises necessárias para o projeto.

Aos meus pais, Wilson e Maria, por serem meu porto seguro. Em todos os momentos de dificuldade sempre tive o apoio de vocês. Obrigada por essa família maravilhosa, amo vocês!!

A todos os meus familiares, irmãos, cunhados e sobrinhos, por sempre estarem presentes dando todo o apoio e confiança nos momentos alegres e difíceis da minha vida.

Quero agradecer ao meu companheiro Dreikes, por estar ao meu lado em todos os momentos de dificuldade, contribuindo com seu carinho, atenção e até mesmo ajudando em minhas coletas. Muito Obrigada!!!

Ao meu filho Eduardo, por todo o apoio dado durante esse período, pela compreensão nos momentos ausentes e por ser esse filho maravilhoso!

Por fim, meu profundo e sincero agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta tese, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

Resumo

Gelidium floridanum W.R. Taylor é uma alga vermelha de grande importância comercial por ser fonte de ágar com melhor qualidade. Este estudo teve como objetivo ampliar os conhecimentos sobre a germinação de tetrásporos e os efeitos da radiação ultravioleta e do metal pesado cádmio (Cd) nos gametófitos jovens de *G. floridanum*. Para a análise dos mecanismos reguladores da polarização e germinação, os tetrásporos foram cultivados com brefeldina A (BFA), colchicina e citocalasina, sendo analisados por microscopia de luz (ML), fluorescência e eletrônica de transmissão (MET). Com a utilização da BFA, a germinação dos esporos não ocorreu, a BFA levou a uma desmontagem das cisternas do Golgi com formação de regiões vesiculares no citoplasma, bloqueando a secreção do Golgi para a formação do tubo germinativo e deposição da parede celular. O tubo germinativo, nas amostras controle, é formado pela incorporação de vesículas derivadas do Golgi, a secreção das vesículas e organização dos corpos de Golgi são processos básicos e essenciais na adesão e formação do tubo. A BFA bloqueou a secreção de proteínas e de polissacarídeos amorfos da matriz, impedindo a germinação dos tetrásporos. Com os inibidores do citoesqueleto, citocalasina e colchicina, a germinação de tetrásporos de *G. floridanum* também foi afetada. Estes agentes causaram diminuição das taxas de germinação além da malformação dos tubos germinativos e no caso da citocalasina alteração no formato dos cloroplastos. Pode-se sugerir que tanto os microtúbulos quanto os filamentos de actina são reguladores dos processos de polarização e germinação de tetrásporos de *G. floridanum*. Para os efeitos da radiação ultravioleta, gametófitos jovens de *G. floridanum* foram cultivados em laboratório e expostos a radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de $80\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e PAR+UVA+UVB durante 3 h por dia, por um período de 3 dias. As amostras foram processadas para ML e MET para análise ultraestrutural, bem como análise das taxas de crescimento, teor de pigmentos fotossintéticos, identificação dos carotenóides e avaliação do desempenho fotossintético. PAR + UVA + UVB promoveu aumento da espessura da parede celular, acúmulo de grãos de amido das florídeas no citoplasma e rompimento da organização interna do cloroplasto. As amostras expostas a PAR + UVA + UVB mostraram uma redução na taxa de crescimento de 97%, aumento dos carotenóides, diminuição dos pigmentos fotossintetizantes, em particular, a ficoeritrina e a

alofococianina, e consequente diminuição do desempenho fotossintético observados pela redução da taxa de transporte de elétrons (ETR) e ETR_{max}. Para os efeitos do Cd, gametófitos jovens foram cultivados durante 7 dias com concentrações de 7,5 e 15 μM do Cd. Após o período experimental, foram realizadas análises de ML, confocal e eletrônica de varredura (MEV), taxas de crescimento, quantificação dos pigmentos fotossintetizantes, carotenóides e a fluorescência da clorofila *a*. As amostras tratadas apresentaram diminuição das taxas de crescimento, com despigmentação dos talos, redução dos pigmentos fotossintetizantes, resultando num decréscimo da taxa de transporte de elétrons e da autofluorescência dos cloroplastos. Além disso, o Cd aumentou a quantidade de grãos de amido das florídeas e afetou a distribuição do conteúdo proteico no citoplasma. O metal cádmio é altamente tóxico, causando fotoinibição crônica para a espécie. Pode-se concluir que tanto os corpos de Golgi como o citoesqueleto, filamentos de actina e microtúbulos, estão envolvidos nos processos de polarização e formação do tubo germinativo durante a germinações de tetrásporos e, que gametófitos jovens de *G. floridanum* quando expostos tanto a radiação quanto ao Cd apresentam alterações no metabolismo e na estrutura celular que afetam seu desenvolvimento.

Abstract

Gelidium floridanum W. R. Taylor is a red alga of great commercial importance as a source of high-quality agar. This study aimed to examine the germination of tetraspores and the effects of ultraviolet radiation (UVR) and heavy metal cadmium (Cd) on young gametophytes of *G. floridanum*. To analyze the regulatory mechanisms of polarization and germination, the tetraspores were cultured with brefeldin A (BFA), colchicine and cytochalasin, followed by analysis under light (LM), fluorescence and transmission electron microscopy (TEM). The use of BFA blocked the secretion of protein and amorphous matrix polysaccharides. It also blocked secretion from Golgi bodies, affecting germ-tube formation, as well as, cell wall deposition, and leading to the disassembly of the Golgi cisternae with regions of vesicular formation in the cytoplasm. These events effectively prevented tetraspore germination. Tetraspore germination was also affected by the use of cytochalasin and colchicine, which are inhibitors of cytoskeleton. These agents caused a decrease in germination rates and, in high concentrations, complete inhibition of germination. In addition, the germ tube becomes malformed and, in the case of cytochalasin, the shape of chloroplasts was altered. It can be suggested that both microtubule and actin are regulators of polarization and germination in tetraspores of *G. floridanum*. Next, to assess the effects of UVR, young gametophytes were cultivated under laboratory conditions and exposed to photosynthetically active radiation (PAR) at $80 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and PAR+UVA +UVB for 3 h per day, during three days. The samples were processed for LM and MET to carry out analyses of ultrastructure, growth rates, and content of photosynthetic pigments, as well as, identify carotenoids and evaluate photosynthetic performance. PAR + UVA + UVB caused an increase in cell wall thickness, accumulation of floridean starch grains and changes in the internal organization of the chloroplast. Samples exposed to PAR + UVA + UVB showed a reduction in growth rate of 97%, increased of carotenoids, decreased photosynthetic pigments, in particular, phycoerythrin and allophycocyanin, and a resulting reduction in photosynthetic performance, as observed by the reduction of transport electron (ETR) and ETRmax. Finally, to test the effects of the Cd, young gametophytes of *G. floridanum* were cultured for 7 days with concentrations of 7.5 and 15 μM Cd. After the experimental period, LM, confocal and scanning electron microscopy (SEM) were employed to

analyze growth rates and quantify the content of photosynthetic pigments, carotenoids and chlorophyll a. The treated samples showed a decrease in growth rates, with depigmentation of the thallus and reduction of photosynthetic pigments, resulting in a decrease in the rate of electron transport and autofluorescence of chloroplasts. Furthermore, exposure to Cd proved to be highly toxic, causing chronic photoinhibition, increasing the amount of starch grains, and altering the distribution of protein content in the cytoplasm. It can be concluded that both the Golgi bodies such as the cytoskeletal actin and microtubules are involved in the processes of polarization and germ tube formation during germination tetraspores and that young gametophytes of *G. floridanum* when exposed to both radiation as to the Cd present alterations in metabolism and cellular structure that affect its development.

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema representativo do ciclo de vida trifásico e isomórfico de <i>Gelidium floridanum</i>	5
Figura 2: Detalhe dos procedimentos de coleta e obtenção dos tetrásporos de <i>Gelidium floridanum</i>	15
Figura 3: Tetrásporos de <i>Gelidium floridanum</i> durante o processo de formação do tubo germinativo.....	18
Figura 4: Efeitos da BFA na germinação de tetrásporos de <i>Gelidium floridanum</i> analisados em microscopia de luz.....	19
Figura 5: Microscopia epifluorescente de tetrásporos de <i>Gelidium floridanum</i> marcados com FM4-64.....	21
Figura 6: Microscopia eletrônica de transmissão de <i>Gelidium floridanum</i> durante a formação do tubo germinativo.....	22
Figura 7: Microscopia eletrônica de transmissão de tetrásporos de <i>Gelidium floridanum</i> tratados com 4 μ M de BFA.....	24
Figura 8: Microscopia eletrônica de transmissão de tetrásporos de <i>Gelidium floridanum</i> tratados com 8 μ M de BFA.....	25
Figura 9: Esquema representativo da possível localização espacial dos corpos de Golgi e os efeitos da BFA.....	30
Figura 10: Desenho experimental de <i>Gelidium floridanum</i>	33
Figura 11: Fases iniciais da germinação dos tetrásporos controle de <i>Gelidium floridanum</i> observados na microscopia de luz e confocal.....	36
Figura 12: Germinação de tetrásporos de <i>Gelidium floridanum</i> tratados com colchicina observados na microscopia de luz e confocal.....	38
Figura 13: Germinação de tetrásporos de <i>Gelidium floridanum</i> tratados com citocalasina observados na microscopia de luz e confocal.....	39
Figura 14: Detalhe dos jovens gametófitos de <i>Gelidium floridanum</i> observados através de um microscópio estereoscópico após 3 dias de exposição à radiação ultravioleta..	55
Figura 15: Microscopia de luz de seções transversais e longitudinais de jovens gametófitos de <i>Gelidium floridanum</i> após 3 dias de exposição à radiação ultravioleta.....	58
Figura 16: Microscopia eletrônica de transmissão de gametófitos jovens <i>Gelidium floridanum</i> do controle.....	60
Figura 17: Microscopia eletrônica de transmissão de gametófitos jovens <i>Gelidium floridanum</i> após 3 dias de	

exposição à radiação ultravioleta.....	61
Figura 18: Curvas PI (ETR-PAR) de gametófitos jovens de <i>Gelidium floridanum</i> expostos durante três dias à radiação PAR+UVA+UVB e após 24 horas de recuperação.....	63
Figura 19: Rendimento quântico máximo (Fv/Fm) de gametófitos jovens de <i>Gelidium floridanum</i> expostos durante três dias à radiação PAR+UVA+UVB e após 24 h de recuperação.....	65
Figura 20: Detalhe de gametófitos jovens de <i>Gelidium floridanum</i> observados através da microscopia de luz após 7 dias de tratamento de cádmio.....	77
Figura 21: Microscopia confocal de gametófitos jovens de <i>Gelidium floridanum</i> após 7 dias de tratamento de cádmio.....	78
Figura 22: Microscopia de luz de secções longitudinais de gametófitos jovens de <i>Gelidium floridanum</i> após 7 dias de tratamento com cádmio.....	80
Figura 23: Curvas PI (ETR-PAR) de gametófitos jovens de <i>Gelidium floridanum</i> após 7 dias de tratamento com cádmio (Exposição) e após 24 horas de recuperação (Recuperação).....	82
Figura 24: (a) Rendimento quântico máximo (Fv/Fm) e (b) Rendimento quântico efetivo (Y(II)) de gametófitos jovens de <i>Gelidium floridanum</i> após 7 dias de tratamento com cádmio e após 24 horas de recuperação.....	84
Figura 25: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície do talo de gametófitos jovens de <i>Gelidium floridanum</i> após 7 dias de tratamento com cádmio.....	87

Lista de Tabelas

Tabela 1: Efeito da adição de BFA na germinação de tetrásporos de <i>Gelidium floridanum</i>	20
Tabela 2: Efeito da adição de colchicina e citocalasina na germinação de tetrásporos de <i>Gelidium floridanum</i>	41
Tabela 3: Variações dos pigmentos fotossintéticos de gametófitos jovens de <i>Gelidium floridanum</i> após 3 dias de exposição à radiação ultravioleta	56
Tabela 4: Perfil HPLC de extratos de carotenóides de gametófitos jovens de <i>Gelidium floridanum</i> após 3 dias de exposição à radiação ultravioleta	57
Tabela 5: Tabela com os parâmetros cinéticos da curva PI de gametófitos jovens de <i>Gelidium floridanum</i> após 3 dias de exposição à radiação ultravioleta.....	64
Tabela 6: Alterações dos pigmentos fotossintetizantes (médias \pm SD) de gametófitos jovens de <i>Gelidium floridanum</i> após 7 dias de tratamento com cádmio e após 24 horas de recuperação	81
Tabela 7: Parâmentros cinéticos da curva PI de gametófitos jovens de <i>Gelidium floridanum</i> após 7 dias de tratamento com cádmio e após 24 horas de recuperação.....	83
Tabela 8: Microanálise de raios X da parede celular de gametófitos jovens de <i>Gelidium floridanum</i> após 7 dias de tratamento com cádmio.....	86

Lista de Abreviaturas e Siglas

- A- Grãos de Amido das Florídeas
 ALA-D - Enzima δ - aminolevilínico desitratase, do inglês aminolevulinate dehydratase
 APC- Alococianina (APC)
 ARFs- Fatores de Ribosilação de ADP, do inglês ADP ribosylation factors
 BFA- Brefeldina A (BFA)
 C- Cloroplastos (C)
 CBB- Azul Brilhante de Coomassie, do inglês Coomassie Brilliant Blue
 Cd- Cádmio
 CFCs- Clorofluocarbonos
 CO₂-Dióxido de Carbono
 DAPI - 4',6-Diamidino -2- Fenilindol, do inglês 4',6-diamidino-2-phenylindole
 DMSO- Dimetil Sulfóxido
 EDTA- Ácido Tetra-acético de Etilenodiamina, do inglês Ethylenediamine Tetraacetic Acid
 ETR - Taxa de Transporte de Elétrons, do inglês Electron Transport Rate
 ETRmáx- Taxa Máxima de Transporte de Elétrons
 Fv/Fm - Rendimento Quântico Ótimo
 G- Corpos de Golgi
 GEFs- Fatores de Troca de Nucleotídeos Guanina, do inglês Guanine Nucleotide Exchange Factors
 Ik- Ponto de Saturação Luminosa
 LABCEV - Laboratório de Biologia Celular Vegetal
 LCME -Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
 M- Mitocôndrias (M)
 MAAs- Aminoácidos Tipo Micosporinas, do inglês Mycosporine Like Amino Acid
 MCF - Metil Clorofórmio
 MET- Microscopia Eletrônica de Transmissão
 MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura
 ML- Microscopia de Luz
 N- Núcleo
 Nu- Núcleolo
 PAS - Ácido Periódico de Schiff, do inglês Periodic Ácid Schiff
 PC- Ficoeritrina

PC- Parede Celular
PE- Ficocianina
PI - Fotossíntese/Irradiância, do inglês Photosynthesis/Irradiance
PSII - Fossistema II
RE- Retículo Endoplasmático
RER- Retículo Endoplasmático Rugoso
ROS- Espécies Oxigênio Reativas, do inglês Reactive Oxygen Species
RUBISCO- Ribulose 1,5 – bifosfato carboxilase/oxidase
RUV - Radiação Ultravioleta
RUVB - Radiação Ultravioleta B
TB- Azul de Toluidina, do inglês Toluidin Blue
TC- Taxa de Crescimento
UPS- Unidade Padrão de Salinidade
UV - Ultravioleta
UVA- Ultravioleta A
UVB- Ultravioleta B
UVC- Ultravioleta C
V- Vacúolos
Ve -Áreas Vesiculadas
Y(II) - Rendimento Quântico Efetivo
 α - Eficiência Fotossintetizante

Sumário

RESUMO	vii
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiv
SUMÁRIO.....	xvii
CAPÍTULO I – Introdução Geral	1
1.1 Mecanismos reguladores da germinação.....	1
1.2 <i>Gelidium floridanum</i> W.R. Taylor.....	4
1.3 Agentes estressores: radiação ultravioleta e metais pesados.....	5
2 Objetivo Geral.....	9
2.1Objetivos Específicos.....	9
CAPÍTULO II - Efeitos de brefeldina A no sistema de endomembranas e na formação do tubo germinativo de tetrásporos de <i>Gelidium floridanum</i>.....	11
1 Introdução.....	12
2 Material e métodos.....	14
2.1 Algas e germinação.....	14
2.2 Tratamento com brefeldina A (BFA).....	14
2.3 Análise da morfologia e processos de germinação.....	16
2.4 Análises através da microscopia eletrônica de transmissão.....	16
2.5 Análise com FM4-64.....	16
2.6 Análise dos dados	17
3 Resultados.....	17
4 Discussão.....	26
CAPÍTULO III - Efeitos da colchicina e citocalasina na germinação de tetrásporos de <i>Gelidium floridanum</i>.....	31
1 Introdução.....	31
2 Material e métodos.....	32
2.1 Algas e germinação.....	32
2.2 Experimentos com colchicina e citocalasina B.....	33
2.3 Análise da morfologia e processos de germinação.....	34
2.4 Análises migração nuclear com o uso do DAPI.....	34

2.5 Análises em microscopia confocal de varredura a laser.....	34
2.6 Análises dos dados.....	34
3 Resultados	35
4 Discussão.....	42

CAPÍTULO IV – Efeitos da radiação ultravioleta (UVA+UVB) sobre gametófitos jovens de *Gelidium floridanum*: mudanças na organização ultraestrutural e do metabolismo.....

1 Introdução.....	48
2 Material e métodos.....	49
2.1 Algas.....	49
2.2 Condições de cultura.....	50
2.3 Experimentos com radiação.....	50
2.4 Taxa de crescimento.....	51
2.5 Pigmentos fotossintetizantes.....	51
2.6 Análise dos carotenóides.....	51
2.7 Microscopia de luz (ML).....	52
2.8 Testes histoquímicos.....	52
2.9 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	53
2.10 Fluorescência da clorofila <i>a in vivo</i>	53
2.11 Análise dos dados.....	54
3 Resultados.....	54
3.1 Taxas de crescimento (TC)	54
3.2 Pigmentos fotossintetizantes.....	55
3.3 Carotenóides.....	56
3.4 Microscopia de luz e análises histoquímicas.....	57
3.5 Observações em microscopia eletrônica de transmissão.....	59
3.6 Fluorescência da clorofila <i>a</i>	62
4 Discussão.....	65

CAPÍTULO V – Efeitos do metal cádmio sobre gametófitos jovens de *Gelidium floridanum*: alterações metabólicas e morfológicas.....

1 Introdução.....	73
2 Material e métodos.....	75
2.1 Desenho experimental.....	75
2.2 Experimentos com cádmio.....	75
2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	76
3 Resultados	76
3.1 Morfologia e taxa de crescimento.....	76
3.2 Observações através do microscópio de varredura a laser	

confocal.....	77
3.3 Microscopia de luz (ML) e análises histoquímicas.....	78
3.4 Pigmentos fotossintetizantes.....	79
3.5 Fluorescência da clorofila <i>a</i>	81
3.6 Observações através da microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	85
4 Discussão.....	88
CAPÍTULO VI – Considerações finais.....	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

Capítulo I

Introdução Geral

1.1 Mecanismos reguladores da germinação

As algas são de grande importância nos ambientes marinhos por serem os produtores primários dos oceanos, compõem a biomassa e determinam a produtividade primária para os demais elos da cadeia trófica (Norton *et al.*, 1996). São alimentos para os herbívoros e os detritívoros, como também constituem uma área de berçário e habitat para peixes e invertebrados (Lippert *et al.*, 2001).

Nas últimas décadas, grande importância econômica foi atribuída às macroalgas marinhas devido aos seus compostos de parede celular, por exemplo os polissacarídeos: alginatos, agaranas, carragenanas. Esses polissacarídeos são utilizados em setores importantes, como nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, apresentando alto potencial biotecnológico e despertando interesse mundial, devido ao seu alto valor econômico (De Ruiter & Rudolph, 1997).

Algas vermelhas, em particular, incluem várias espécies de grande importância econômica. Por exemplo, dentro da família Gelidiaceae incluem algumas das algas produtoras de ágar mais importantes do mundo (Lewis & Hanisak, 1996; Melo, 1998). O ágar produzido por estas algas, devido ao seu alto teor de agarose e poucos grupos sulfatados, é o de melhor qualidade em termos de propriedades físicas e químicas sendo recomendado para aplicações biológicas e biotecnológicas (Matsushashi & Harris, 1990). As algas vermelhas compreendem um grupo monofilético, com seres fotossintetizantes, não vasculares, com estruturas reprodutivas sem proteção, produtoras de esporos e desprovidas de sementes e flores (Maggs & Callow, 2002).

Muitas algas vermelhas se reproduzem assexuadamente por liberação de esporos. Reprodução assexuada não envolve a fusão de gametas ou meiose. Se as condições forem adequadas, esporos assexuados aderem ao substrato e crescem por repetidas mitoses dando origem a uma nova alga (Graham *et al.*, 2009).

A produção de esporos é uma forma de reprodução assexuada, com diferentes níveis de especialização, de relativamente simples para tetrasporângios morfologicamente complexos, restrito a maioria das algas vermelhas. Eles também exibem uma vasta gama de tamanhos, de menos de 10 µm em algas pardas e verdes para até 100 µm de diâmetro em algumas algas vermelhas (Maggs & Callow, 2002).

Nas algas, em geral, os esporos são unidades de dispersão e fixação. A estabilização da fixação da planta 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). A fixação pode atuar como um indício para a germinação e acompanhamento das mudanças morfológicas e fisiológicas das células (Apple & Harlin, 1994; Bouzon *et al.*, 2005; Ouriques *et al.*, 2012).

Em alguns grupos de algas vermelhas tais como: Bangiales, Nemaliales e Gelidiales, a germinação tem início com a formação do tubo germinativo para onde migra todo ou parte do conteúdo do esporo, permanecendo o esporo original aparentemente vazio como elemento de fixação primária da plântula, caracterizando a germinação unipolar (Pueschel, 1979; Bouzon *et al.*, 2005). A ativação dos processos de germinação está diretamente relacionada aos eventos pós-liberação dos esporos. Estes eventos incluem fixação dos esporos no substrato, liberação das vesículas, deposição da parede celular e deslocamento do conteúdo citoplasmático (Bouzon *et al.*, 2005; Ouriques *et al.*, 2012).

Durante a germinação, os componentes celulares mais importantes, envolvidos neste processo, são os corpos de Golgi, localizados próximos à formação do tubo responsáveis pela secreção de componentes da parede celular necessários a expansão do tubo germinativo (Bouzon *et al.*, 2005). Os corpos de Golgi são organelas celulares dinâmicas que desempenham um papel fundamental no processamento, na maturação e no encaminhamento de proteínas recém-sintetizadas como as glicoproteínas, proteoglicanas e polissacarídeos complexos, em plantas e animais (Lanubile *et al.*, 1997). Em plantas, os corpos de Golgi desempenham um papel central na síntese dos compostos de parede celular, tais como pectinas e hemiceluloses, e na modificação e transporte das proteínas destinadas para a superfície da célula e para os vacúolos (Northcote, 1985; Nebenfuhr & Staehelin, 2001; Keidan *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, em estudos relacionados com a atividade dos corpos de Golgi, um antibiótico fúngico lipofílico, a brefeldina A (BFA) tem sido amplamente utilizado. Diversos trabalhos com BFA demonstram que este antibiótico possui ação bloqueadora do tráfego de vesículas e mecanismos de secreção em plantas (Satiat-Jeunemaitre *et al.*, 1996; Callow *et al.*, 2001), a secreção de polissacarídeos e proteínas da parede celular (Driouich *et al.*, 1993; Kunze *et al.*, 1995; Tsekos *et al.*, 2007), bem como, o transporte de proteínas solúveis para o vacúolo (Ritzenthaler, 2002; Tse Chung *et al.*, 2006). Diversos autores têm estudado o efeito de BFA nos três grandes grupos de macroalgas. Em algas vermelhas foi observado que esta droga afeta a arquitetura dos corpos de Golgi levando a inibição da formação da parede celular (Keidan *et al.*, 2009; Tsekos *et al.*, 2007). Em zoósporos de algas verdes foi observada a inibição da aderência deste tipo de esporos ao substrato (Callow *et al.*, 2001). Nas algas pardas, a BFA foi utilizada para analisar os efeitos no sistema endomembranas e no desenvolvimento da polarização dos zigotos (Hadley *et al.*, 2006).

Outro componente celular importante na formação do tubo germinativo é o citoesqueleto, que compreende os microtúbulos e os filamentos de actina. O citoesqueleto é responsável por funções essenciais nas células das plantas, incluindo polaridade, transporte intracelular, orientação das microfibrilas da parede celular, alongamento celular, diferenciação e divisão celular (Wang *et al.*, 2005). Além disso, no processo de germinação das algas, o citoesqueleto é responsável pela modificação da forma da célula (Hadley *et al.*, 2006). Os estudos sobre a função do citoesqueleto em algas, além de utilizar marcadores fluorescentes, também estão baseados em experimentos utilizando inibidores do citoesqueleto (Kropf, 1997). Estes inibidores agem sobre a polimerização dos microtúbulos e microfilamentos. Dentre estes, se destaca a colchicina, um alcalóide que inibe a polimerização dos microtúbulos ligando-se aos monômeros de tubulina, causando acumulação de unidades de tubulina no citoplasma (Green *et al.*, 2013). Outro agente inibidor é a citocalasina, uma classe de metabólitos extraída de fungos, que interfere nos movimentos celulares, inibindo a polimerização da actina que formar os microfilamentos (Hadley *et al.*, 2006).

1.2 *Gelidium floridanum* W.R. Taylor

Gelidium floridanum W.R. Taylor pertencente ao grupo das algas vermelhas, possui um tipo de ficocolóide, a agarana, com o ágar de melhor qualidade com alta força de gelificação e baixo teor de sulfato, o qual é extraído e utilizado, principalmente, na indústria alimentícia e na área de pesquisa. No Brasil, *G. floridanum* foi registrado para os estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul segundo dados disponibilizados no site brasileiro *Algae Maris Brasilis* (<http://www.algaemarisbrasilis.ccb.ufsc.br/algaemarisbrasilis.html>). *G. floridanum* possui ciclo de vida trifásico e isomórfico (Fig. 1), a fase sexuada é seguida por duas gerações assexuadas que produzem esporos, denominadas gerações carposporófitica e tetrasporófitica. A carposporogênese é um dos eventos pós-fertilização, que leva a formação assexual de carpósporos diplóides. Os carpósporos quando maduros são liberados e, germinando, produzem uma fase diplóide denominada de tetrasporófito, quando maduro, produz células-mãe de tetrasporângios onde ocorre meiose, dando origem a quatro esporos haplóides (tetrásporos), caracterizando a tetrasporogênese (Santelices, 1990; Scariot, 2010).

A germinação dos tetrásporos é do tipo “*Gelidium*” (Ouriques, 2002), estes quando liberados, não possuem parede celular, apresentando-se envoltos por uma matriz mucilaginosa, a qual provavelmente é responsável pela rápida adesão do esporo ao substrato. Esta mucilagem é de natureza glicoproteica e/ou constituída por polissacarídeos sulfatados. Logo após a adesão, porém antes do início da germinação, uma fina camada de parede celular é observada separando a membrana plasmática e a mucilagem. Depois de estabelecido no substrato, o tetrásporo inicia uma sequência de mudanças na morfologia celular. Inicialmente, o esporo sofre uma desorganização polarizada do conteúdo citoplasmático, que permite a expansão celular, possibilitando a rápida formação de uma protuberância, denominada tubo germinativo. O conteúdo citoplasmático, presente no esporo inicial é, então, transferido para esta região. Ao mesmo tempo, uma fina camada de parede celular é sintetizada envolta do tubo. Em seguida, há a formação de um septo, o qual separa o esporo inicial do tubo. O tubo germinativo inicia uma série de sucessivas divisões celulares, primeiramente oblíquas e, depois em vários planos. Na sua região distal há a emissão de uma célula rizoidal, a qual dará origem ao rizóide ou ao sistema de

rizóides. A partir da fixação do rizóide ao substrato a região oposta origina a parte ereta da plântula (Ouriques, 2002; Bouzon *et al.*, 2005; 2006).

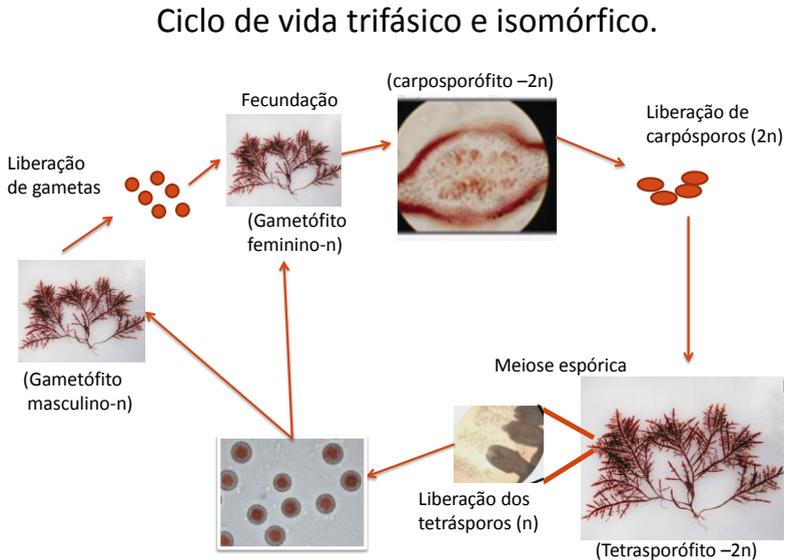


Figura 1: Esquema representativo do ciclo de vida trifásico e isomórfico de *Gelidium floridanum*.

1.3 Agentes estressores: radiação ultravioleta e metais pesados

Em que pese à importância econômica e ecológica das algas vermelhas, poucos estudos foram realizados na costa brasileira com a finalidade de se avaliar os efeitos antrópicos sobre estes organismos. Dentre os vários efeitos das atividades antrópicas, dois têm bastante influência sobre os organismos marinhos: a poluição por metais (cádmio, manganês e cobre, por exemplo), e a diminuição da camada de ozônio.

No que se refere à influência antrópica sobre a camada de ozônio, sabe-se que a produção de compostos com cloro tendem a reagir com a molécula de ozônio, resultando na sua diminuição (Okuno *et al.*, 1996). A diminuição da camada de ozônio leva a um aumento da

radiação ultravioleta (UV) que atinge a superfície terrestre. Os altos níveis de radiação ultravioleta-B (UVB) podem ser danosos aos organismos marinhos, especialmente às algas bentônicas. Estas, ao contrário das espécies fitoplanctônicas, ficam expostas à radiação por períodos prolongados durante horas de maré baixa por estarem fixas e restritas ao seu local de crescimento. O impacto do aumento da radiação UV na superfície da Terra tem sido investigado por vários grupos de pesquisadores, avaliando-se o efeito natural e artificial dessa radiação no crescimento e nos demais aspectos fisiológicos dos organismos fotossintetizantes (Schmidt *et al.*, 2009). Além disto, a biologia e fisiologia celular também podem ser afetadas, conduzindo à crescente mortalidade de espécies vegetais (Franklin & Forster, 1997). A radiação UV no meio ambiente, particularmente UVB, é a chave de muitos efeitos em processos biológicos (Worrest, 1982), como a fotossíntese e crescimento de plantas terrestres (Tevini & Teramura, 1989) e fitoplâncton (Smith *et al.*, 1980), absorção de nitrato em diatomáceas (Döhler & Biermann, 1987), locomoção em protistas, crescimento e fotossíntese em culturas de zooxantelas (Lesser & Shick, 1989), e crescimento de macroalgas (Schmidt *et al.*, 2009). No que tange à fotossíntese, este processo é potencialmente prejudicado após a exposição à radiação UVB devido ao dano à proteína D1 ou à Rubisco (ribulose 1,5-bifostato carboxilase), ou perda de pigmentos (Bischof *et al.*, 2000), como também a redução na expressão dos genes envolvidos na fotossíntese (Holzinger *et al.*, 2004).

Alguns estudos (Talarico, 1996; Talarico & Maranzana, 2000; Schmidt *et al.*, 2009) sugerem que o espessamento da parede celular seja um mecanismo de defesa à exposição de radiação UV. Uma das estratégias, também utilizadas pelas macroalgas para sobreviverem à exposição a altos níveis de radiação UV é a síntese e o acúmulo de compostos fotoprotetores, como os aminoácidos tipo micosporinas (MAAS) e os carotenóides, que direta ou indiretamente absorvem a energia da radiação UV (Sonntag *et al.*, 2007). Outros estudos apontam alterações na ultraestrutura dos cloroplastos e das mitocôndrias (Poppe *et al.*, 2002, 2003; Holzinger *et al.*, 2006). Estudos realizados por Schmidt *et al.*, (2009) em duas variantes pigmentares (verde e vermelha) de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. Silva apontaram alterações ultraestruturais nos cloroplastos, a formação de corpos membranosos com membranas concêntricas, aumento no número de ribossomos livres, aumento de plastoglôbulos no interior dos cloroplastos, diminuição na quantidade de grãos de amido das florídeas e aumento da espessura da

parede celular (compostos de celulose e hemicelulose) após a exposição à radiação UVB.

O aumento gradativo das ações industriais nos últimos anos promoveu também a poluição de águas estuarinas, rios, lagos e águas costeiras com grandes impactos sociais e econômicos. Do ponto de vista ecotoxicológico, as algas têm dois usos importantes nas pesquisas: um de biorremediador e outro de bioindicador. No que tange à biorremediação, muitas algas possuem a capacidade de produzir quelatinas para realizar a detoxificação dos metais pesados (Küpper, 2002), o que poderia ser uma das causas da sobrevivência destes organismos nestes ambientes (Hu *et al.*, 1996). No que se refere ao uso de algas como bioindicador, Malea & Haritonidis (1999) evidenciaram que *Gracilaria verrucosa* no Golfo de Thermaikos, Grécia, apresentou variações nas quantidades de metais pesados em seus talos, conforme variação da concentração presente no ambiente.

A interferência de cada metal pesado na alga depende do metal, da concentração deste metal, tempo de exposição (Mamboya *et al.*, 1999) e dos mecanismos de quelação e detoxificação de cada alga (Lombardi *et al.*, 1998). Vallee & Ulmer (1972) acrescentam que os metais pesados não essenciais à formação de compostos orgânicos, como o chumbo e o cádmio, são extremamente tóxicos mesmo em pequenas concentrações, pois competem por sítios de ligação de metais essenciais. Metais pesados como o Cd, estando presente no meio marinho, serão seqüestrados do meio por algas ricas em compostos sulfatados como ágar e carragenana (Hamdy, 2000; Hashim & Chu, 2004).

O cádmio pode ligar-se a metaloproteínas e metaloenzimas, que são enzimas e proteínas com sítios de ligação metálicos, neutralizando suas funções, além de prejudicar a conformação do DNA e RNA (Vallee & Ulmer, 1972). O Cd pode interferir na absorção de nutrientes importantes como cálcio, magnésio, fósforo e potássio, devido a sua semelhança, o que permite a utilização dos mesmos transportadores (Andosh *et al.*, 2012). Estudos demonstraram que as algas vermelhas são eficientes na absorção de Cd, porém menos eficientes que algumas algas pardas como *Sargassum siliquosum* (Hamdy, 2000; Hashim & Chu, 2004). Estudos da presença de Cd apontaram diminuição das taxas de crescimento (Collén *et al.*, 2003; Xia *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2012), alterações dos cloroplastos (Pinto *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2012), danos as ficobiliproteínas interferindo na absorção

de energia luminosa e sua conseqüente transferência para os centros de reação do fotossistema I e II (PSI e PSII) (Xia *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2012).

Assim, através dos levantamentos iniciais sobre os mecanismos reguladores da germinação e fatores estressores, este trabalho teve como hipóteses: a) os corpos de Golgi são responsáveis pela formação do tubo germinativo e são os principais produtores de materiais necessários para o crescimento do mesmo; b) que os elementos do citoesqueleto estão envolvidos na polarização e direcionamento dos componentes celulares na formação do tubo germinativo; c; que nos gametófitos jovens, a radiação UV e o Cd provocam alterações em níveis subcelulares principalmente nos cloroplastos, afetando os pigmentos e consequentemente a atividade fotossintética, levando a redução das taxas de crescimento de gametófitos jovens de *Gelidium floridanum*.

2. Objetivo Geral

Caracterizar os mecanismos reguladores dos processos de polarização e germinação de esporos de alga vermelha – como modelo *Gelidium floridanum*, como também compreender os possíveis efeitos biológicos da radiação ultravioleta (PAR+UVA+UVB) e do metal pesado cádmio durante o desenvolvimento inicial de gametófitos jovens desta espécie.

2.1 Objetivos específicos

- a) Verificar a participação dos corpos de Golgi no processo inicial de germinação;
- b) Analisar as variações morfológicas e ultraestruturais durante a germinação causada pelo uso de inibidores da atividade dos corpos de Golgi e do citoesqueleto;
- c) Avaliar a participação dos elementos do citoesqueleto durante o processo inicial de germinação;
- d) Analisar possíveis alterações estruturais e ultraestruturais causadas pela radiação UV e com o Cd em gametófitos jovens;
- e) Verificar as taxas de crescimento dos gametófitos jovens após a exposição à radiação UV e Cd;
- f) Determinar as alterações nas concentrações dos pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a* e ficobiliproteínas) nos gametófitos jovens após a exposição à radiação UV e Cd;
- g) Verificar a variação do perfil carotenóidico após a exposição à radiação UV e Cd;
- h) Avaliar o desempenho fotossintético dos gametófitos jovens após a exposição à radiação UV e Cd.

CAPÍTULO II

Efeitos da brefeldina A no sistema de endomembranas e na formação do tubo germinativo de tetrásporos de *Gelidium floridanum*

J. Phycol. *, ***-*** (2014)
© 2014 Phycological Society of America
DOI: 10.1111/jpy.12187

EFFECTS OF BREFELDIN A ON THE ENDOMEMBRANE SYSTEM AND GERM TUBE FORMATION OF THE TETRASPORE OF *GELIDIUM FLORIDANUM* (RHODOPHYTA, FLORIDEOPHYCEAE)¹

Carmen Simioni,² Ticiane Rover, Éder C. Schmidt, Marthiellen R. de L. Felix, Luz Karime Polo, Rodrigo dos Santos, Giulia Burle Costa, Marianne Kreusch, Debora T. Pereira, Luciane C. Ouriques, and Zenilda L. Bouzon

Plant Cell Biology Laboratory, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, CP 476, Florianópolis, Santa Catarina 88049-900, Brazil

Central Laboratory of Electron Microscopy, Federal University of Santa Catarina, CP 476, Florianópolis, Santa Catarina 88049-900, Brazil

1. Introdução

Gelidium floridanum é fonte de agar bacteriológico e agarose de melhor qualidade, amplamente utilizado em aplicações industriais, tecnológicas e de pesquisa (Murano *et al.*, 1998; Bouzon *et al.*, 2006). Possui ciclo de vida trifásico e isomórfico, com germinação de tetrásporos do tipo "Gelidium" (Ouriques, 2002). Os tetrásporos livres são esféricos, medindo entre 19 e 30 µm de diâmetro. Quando liberados, não possuem parede celular, são envolvidos por uma matriz mucilaginosa, que provavelmente é responsável pela rápida adesão ao substrato. Depois de aderidos ao substrato, os tetrásporos começam uma sequência de alterações na morfologia e na organização celular. A fase inicial de germinação é caracterizada pela reorganização do conteúdo citoplasmático, com o deslocamento das organelas a um pólo da célula (Bouzon *et al.*, 2005). Dentre as organelas mais abundantes durante a fase inicial do desenvolvimento de *G. floridanum*, destaca-se os corpos de Golgi na região onde é formado o tubo de germinação e são as primeiras organelas a migrar para esta região (Ouriques, 2002; Bouzon *et al.*, 2005; 2006.).

A organização dos corpos de Golgi e a sua interação no desenvolvimento está bem estabelecido em plantas. Em plantas, as fases iniciais de crescimento do pólen são polarizadas e resulta da fusão contínua de vesículas secretadas pelos corpos de Golgi com a membrana plasmática. Este processo proporciona amplificação da membrana plasmática e auxilia na composição da parede celular (Mascarenhas, 1993; Wang *et al.*, 2005). Os corpos de Golgi são organelas celulares dinâmicas que desempenham um papel fundamental no processamento, na maturação e encaminhamento de proteínas recém sintetizadas, glicoproteínas, proteoglicanas e polissacarídeos complexos, em plantas e animais (Lanubile *et al.*, 1997). Em plantas, os corpos de Golgi desempenham um papel central na síntese dos compostos de parede celular, tais como pectinas e hemiceluloses, e na modificação e transporte das proteínas destinadas para a superfície da célula e para vacúolos (Northcote, 1985; Nebenfuhr & Staehelin, 2001; Keidan *et al.*, 2009).

O antibiótico fúngico lipofílico, brefeldin A (BFA), tem sido amplamente utilizado nos últimos anos em estudos relacionados com a atividade dos corpos de Golgi. Diversos trabalhos com BFA demonstram que este antibiótico possui a ação bloqueadora do tráfego de vesículas e mecanismos de secreção em plantas (Callow *et al.*, 2001; Satiat-Jeunemaitre *et al.*, 1996), a secreção de polissacarídeos e proteínas da parede celular (Driouch *et al.*, 1993; Schindler *et al.*, 1994;

Kunze *et al.*, 1995; Tsekos *et al.*, 2007), bem como o transporte de proteínas solúveis para o vacúolo (Ritzenthaler, 2002; Tse Chung *et al.*, 2006).

Os efeitos da BFA, no tráfego vesicular, são parcialmente explicados pela capacidade de prevenir a ligação de proteínas de revestimento citosólicas nas membranas. A BFA bloqueia o conjunto de revestimento através da inibição dos fatores de ribosilação de adenosina difosfato (ADP) (ARFs) que são pequenas GTPases envolvidas principalmente na iniciação do complexo de revestimento em torno do Golgi, bloqueando o transporte de proteínas do retículo endoplasmático rugoso (RER) para o Golgi (Donaldson *et al.*, 1992).

Para a maioria dos tipos de células de plantas investigados, uma resposta a BFA foi observada nos corpos de Golgi. Efeitos ultraestruturais relatados incluem um aumento no comprimento da cisterna (Kimura *et al.*, 1993; Yasuhara *et al.*, 1995), redução do número de cisternas por pilha (Schindler *et al.*, 1994), e vesiculação das cisternas *cis* ou *trans* (Satiat - Jeunemaitre & Hawes, 1992; Driouch *et al.*, 1993; Kimura *et al.*, 1993; Rutten & Knuiman, 1993; Dairman *et al.*, 1995; Steele-king *et al.*, 1999).

Diversos autores tem estudado o efeito de BFA nos três grande grupos de macroalgas. Em algas vermelhas foi observado que a droga afeta a arquitetura do corpos de Golgi levando a inibição da formação da parede celular (Keidan *et al.*, 2009; Tsekos *et al.*, 2007). Em zoósporos de algas verdes foi observada a inibição da sua aderência ao substrato (Callow *et al.*, 2001). Nas algas pardas, o BFA foi utilizado para analisar os efeitos no sistema endomembranas e no desenvolvimento da polarização dos zigotos (Hadley *et al.*, 2006).

Para algas vermelhas, análises sobre o sistema de endomembranas durante o desenvolvimento de tetrásporos não têm sido elucidado. Para a espécie *G. floridanum*, em estudos ultraestruturais, foi descrito a presença de endomembranas na região de formação do tubo germinativo (Bouzon *et al.*, 2005). Assim, o objetivo deste estudo foi entender qual o papel do sistema de endomembranas na formação do tubo germinativo durante a germinação de tetrásporos de *G. floridanum*, através da ação do BFA sobre os corpos de Golgi.

2. Material e métodos

2.1 Algas e germinação

Talos tetrásporófitos de *G. floridanum* foram coletados na praia de Sambaqui (27°29'18.8"S e 48°32'12.9"W), Florianópolis, Santa Catarina, durante o período do verão. As amostras de algas foram coletadas no costão rochoso e transportadas à temperatura ambiente em recipientes escuros para LABCEV-UFSC (Laboratório Célula Vegetal, da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil). Para a coleta de tetrásporos não germinados foram realizados diversos experimentos no laboratório para a padronização de protocolo de coleta. Para este procedimentos foram limpos e selecionados talos férteis e colocados para liberação de tetrásporos (*overnight*), em água do mar filtrada proveniente do local da coleta, com salinidade de 32 ups (unidade padrão de salinidade) (Fig. 2). Os tetrásporos liberados foram coletados e colocados sobre lâminas em placas de petri para a germinação, e foram cultivados em temperatura de 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), irradiância de 40 (± 10) $\mu\text{mol de fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Fig. 2). Todas as análises foram realizadas após 6 horas (após colocados na placa de Petri), momento em que se inicia o processo de formação do tubo germinativo.

2.2 Tratamento com brefeldina A (BFA)

A solução estoque de BFA (B-7651 Sigma Chemicals, Alemanha) foi preparada a uma concentração de 5 mM em dimetil sulfóxido (DMSO, Merck, Alemanha). A partir desta solução estoque, foram preparadas duas concentrações finais de BFA, 4 e 8 μM . Para realizar os tratamentos experimentais, as amostras controle foram incubadas sem o inibidor, mas com o solvente utilizado. As concentrações finais de BFA foram adicionadas juntamente com os tetrásporos sobre lâminas durante 6 horas conforme a descrição de Keidan *et al.* (2009). Oito repetições foram feitas para cada grupo experimental, em 4 experimentos independentes.



Figura 2: Detalhe dos procedimentos de coleta e obtenção dos tetrásporos de *Gelidium floridanum*. Os ramos são limpos e separados (**a,b**) pela identificação das estruturas reprodutivas, os tetrasporófitos, e a presença de tetrásporos em seu interior (setas) (**c**). Estes ramos são colocados em uma rede sobre um funil encaixado num béquer de 1000 mL com água do mar filtrada, tendo em sua base um tubo para a coleta dos tetrásporos (**d,e**). Após a liberação, os tetrásporos contidos no tubo (**f**) são colocados em lâminas sobre placas de Petri para a adesão e germinação (**g**).

2.3 Análise da morfologia e processos de germinação

As características morfológicas do controle e das amostras tratadas de tetrásporos de *G. floridanum* foram analisadas e fotografadas com um microscópio epifluorescente Olympus BX 41 equipado com sistema de captura de imagens QCapture Software 5.1 Pro. A análise foi realizada através da avaliação das seguintes características: 1) tetrásporos com formação do tubo germinativo, 2) tetrásporos inviáveis (pigmentação verde) e 3) tetrásporos não germinados dilatados ($> 30 \mu\text{m}$ de largura). As características morfológicas foram analisadas em 250 tetrásporos por lâmina para os diferentes tratamentos e em quadruplicata ($n=1000$ tetrásporos).

2.4 Análises através da microscopia eletrônica de transmissão

Após o período experimental, os tetrásporos de *G. floridanum* foram processados para análises em microscopia eletrônica de transmissão (MET), segundo o método de Bouzon *et al.* (2006). As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, sacarose 2% em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M (pH 7,2), durante 12 horas à temperatura de 4°C. Em seguida, foram realizadas 4 lavagens com tampão cacodilato de sódio a 0,1M (pH 7,2), com concentrações decrescentes de sacarose, durante 30 minutos. Os tetrásporos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2, durante 6 horas a temperatura ambiente. Foram realizadas 3 lavagens, de 20 minutos cada, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Após as lavagens, as amostras foram desidratadas em uma série acetônica crescente (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), 30 minutos em cada etapa. A última série de acetona 100% foi trocada duas vezes. O material foi então infiltrado com resina Spurr em séries graduais de acetona-resina Spurr durante três dias, seguido de duas infiltrações em resina pura por 12 horas, e polimerizado em estufa a 70°C por 24 horas. As secções ultrafinas foram realizados com navalha de diamante em ultramicrótomo e, posteriormente, contrastados com acetato de uranila 1% e citrato de chumbo 1%. As secções foram observadas e fotografadas no microscópio eletrônico de transmissão JEM 1011 do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

2.5 Análise com FM4-64

Para analisar o sistema de endomembranas, após 6 horas de desenvolvimento, os tetrásporos foram encubados com 4 μM de FM4-64 (Molecular Probes), marcador de endomembranas, diluído em água

do mar (Bolte *et al.*, 2004) por 30 minutos. A concentração da solução estoque de FM4-64 BFA foi de 20 mM em DMSO (Dimetil Sulfóxido). Os tetrásporos foram observados em Microscópio Epifluorescente DM5500B Leica equipado com sistema de captura de imagens DFC300FX Digital Color.

2.6 Análise dos dados

Dados foram analisados por Análise de Variância Unifatorial (ANOVA) e o teste Tukey *a posteriori*. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando programa *Statistic* (versão 10.0), considerando significativo $p \leq 0,05$.

3. Resultados

A germinação dos tetrásporos de *G. floridanum* (Fig. 3a) inicia-se 5 a 6 horas após a sua liberação e adesão ao substrato. Os tetrásporos são esféricos com presença de cloroplastos com coloração avermelhada na região central (Fig. 3a). O início do processo de germinação se caracteriza por alterações morfológicas como a presença de vacúolos na base do tetrásporo (Fig. 3b) e no lado oposto há uma expansão da parede celular indicando a polarização e início da formação do tubo germinativo (Fig. 3c). A migração das organelas celulares é concomitante à formação e alongamento do tubo germinativo (Fig. 3d-e).

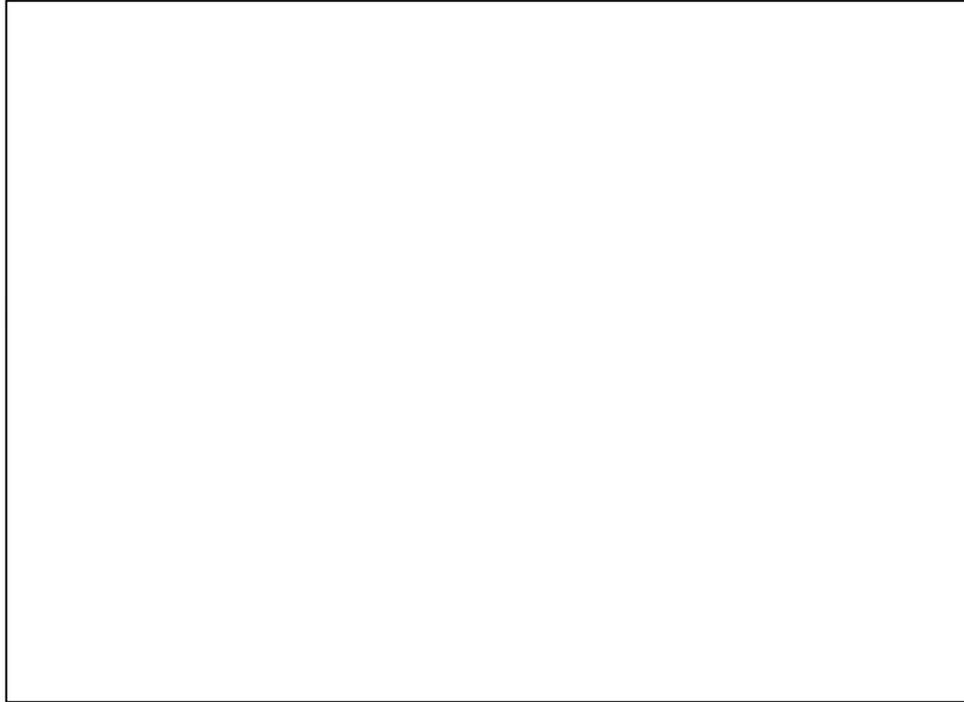


Figura 3: Tetrásporos de *Gelidium floridanum* durante o processo de germinação. **(a)** Tetrásporo recém-liberado. **(b,c)** Início da germinação com aumento de vacúolos de um lado e do outro a formação do tubo germinativo. **(d,e,f)** Deslocamento das organelas para a região de formação do tubo (setas). (Simioni *et al.*, 2014)

Os tetrásporos tratados com BFA, tanto em 4 μM e 8 μM , não aderiram ao substrato. Quando analisados em microscopia de luz, ao contrário do controle (Fig. 4a,b), estes tetrásporos não apresentaram a formação do tubo de germinação (Fig. 4c-f). Muitos destes tetrásporos apresentaram aumento no volume celular com diâmetro maior que 30 μm (Fig. 4c,d). Através da alteração de coloração foi possível observar que vários tetrásporos tornaram-se inviáveis, esta inviabilidade foi mais visível na concentração de 8 μM de BFA (Fig. 4e,f).

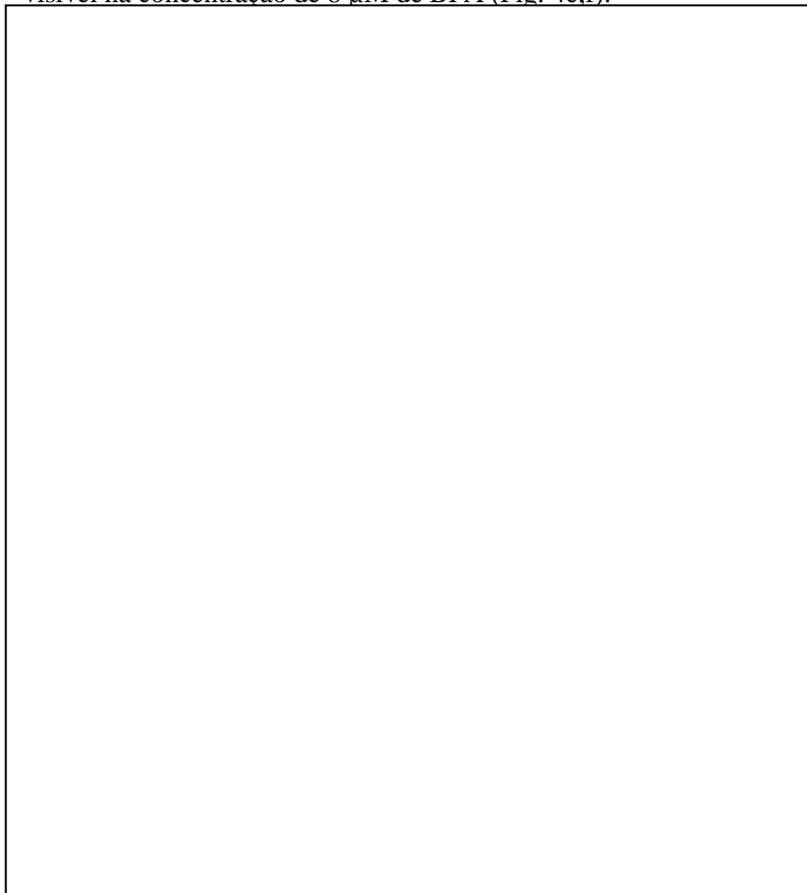


Figura 4: Efeitos da BFA na germinação de tetrásporos de *Gelidium floridanum* analisados em microscopia de luz. **(a,b)** Tetrásporos controle. **(c,d)** Tetrásporos tratados com 4 μM de BFA. **(e,f)** Tetrásporos tratados com 8 μM de BFA. Observe o aumento de esporos inviáveis com pigmentação verde (setas). (Simioni *et al.*, 2014)

Na tabela 1 foi possível observar que ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos em relação às taxas de germinação, mortalidade e tetrásporos dilatados. Os tetrásporos controles apresentaram uma taxa de germinação de 70%, entretanto, os tratados com brefeldina A 4 μM a taxa é menor que 1%, e os tratados com 8 μM não germinaram apresentando um índice de mortalidade de 46,25%, indicando ser esta uma concentração sub-letal para os tetrásporos (LD 50%). Nos tratamentos, muitos tetrásporos permaneceram pigmentados, aparentemente viáveis, porém não germinaram.

Tabela 1: Efeito da adição de BFA na germinação de esporos de *Gelidium floridanum*. (Simioni *et al.*, 2014)

--

Dados são apresentados em 4 unidades amostrais, 250 esporos em 4 experimentos independentes. Médias \pm SD. Letras indicam diferenças significativas de acordo com o teste Tukey ($p \leq 0.05$). (n=1000)

Nas análises com FM4-64, o sistema de endomembranas nos tetrásporos controle foi observado próximo da membrana celular e em maior quantidade na região de formação do tubo germinativo (Fig. 5a). Já nas amostras tratadas (Fig. 5b,c), o sistema de endomembranas não apresentou regiões específicas, estando disperso por todo o citoplasma formando diversas granulações visíveis, principalmente no tratamento de 8 μM .



Figura 5: Microscopia epifluorescente de tetrásporos de *Gelidium floridanum* marcados com FM4-64. **(a)** Tetrásporo controle mostrando a fluorescência do FM4-64 (em vermelho) na ponta do tubo de germinação (setas). **(b)** Tetrásporo tratados com 4 μM de BFA. **(c)** Tetrásporo tratado com 8 μM de BFA, mostrando que o sistema de endomembranas aumenta e torna-se disperso no citoplasma (setas). Sobreposição da autofluorescência do cloroplasto (C) em amarelo (Simioni *et al.*, 2014).

Quando observados no microscópio eletrônico de transmissão (MET), os tetrásporos controle apresentaram como característica na fase inicial da germinação a formação de diversos vacúolos na base do esporo. Estes vacúolos aumentaram de volume concomitante ao crescimento do tubo germinativo (Fig. 6a). O crescimento do vacúolo desloca as organelas para a região do tubo germinativo. Neste estágio, corpos de Golgi são abundantes, especialmente na região de formação do tubo germinativo e também foram observados nas proximidades do vacúolo, na região oposta do tubo em formação (Fig. 6a). Estes corpos de Golgi são hipertróficos (Fig. 6b-c) e apresentam de 7 a 8 cisternas. Além disso, nesta fase, os cloroplastos estão bem desenvolvidos, com a organização dos tilacóides característica das algas vermelhas, onde um tilacóide periférico envolve os tilacóides paralelos (Fig. 6d). Estes cloroplastos presentes desde o início do tetrásporo liberado migram em direção a formação do tubo germinativo. Com a intensa atividade dos corpos de Golgi na região apical do tubo, muitas mitocôndrias foram observadas (Fig. 6e). Neste estágio a quantidade de grãos de amido, que foram acumulados durante a tetrasporogênese, é bem reduzida quando comparado ao tetrásporo recém-liberado (Fig. 6a).

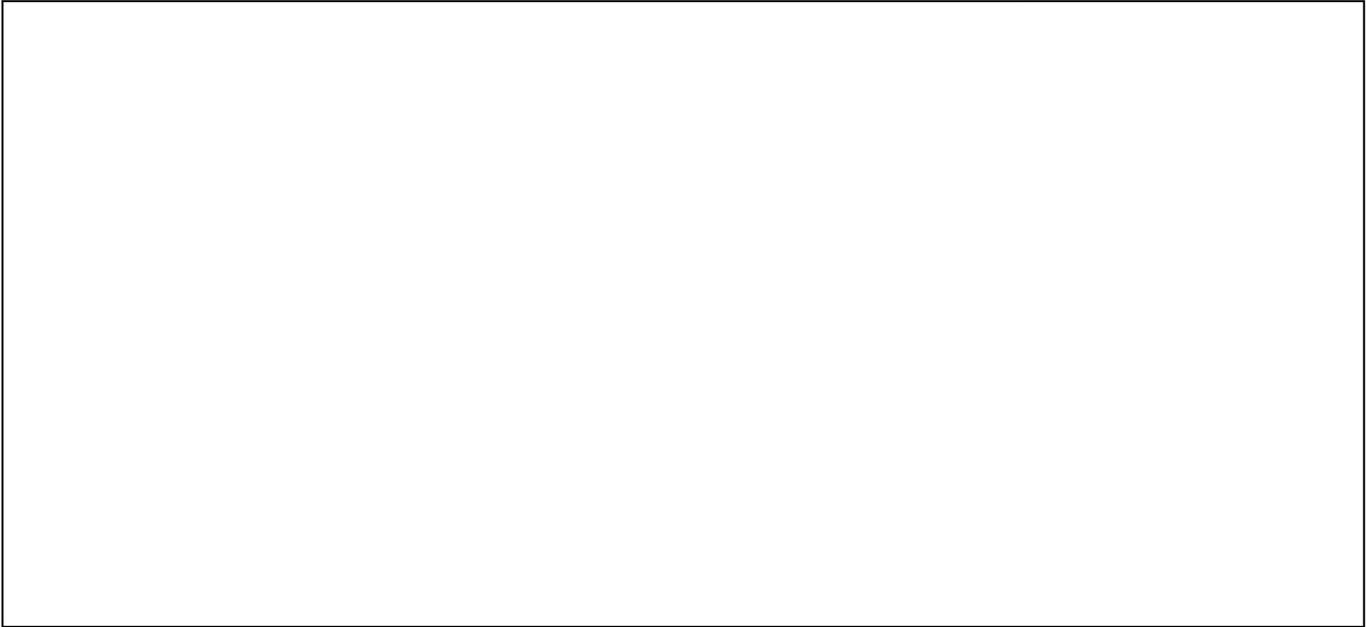


Figura 6: Microscopia eletrônica de transmissão de *Gelidium floridanum* durante a formação do tubo germinativo. **(a)** Vista geral do tetrásporo com tubo germinativo no início do alongamento com polarização das organelas, com corpos de Golgi (G) na ponta do tubo, vacúolos (V) na base, cloroplastos (C) e Grãos de amido (A). **(b)** Detalhe da migração de corpos de Golgi (G) na região do tubo germinativo. **c:** Estrutura das vesículas do Golgi com conteúdo fibroso. **(d,e)** Estrutura dos cloroplastos (C) e mitocôndrias (M) presentes nos tetrásporos (Simioni *et al.*, 2014).

Os tetrásporos *G. floridanum* tratados com BFA 4 μ M apresentaram um aumento de volume decorrente da formação de pequenos vacúolos dispersos por todo o citoplasma (Fig. 7a), corroborando o observado no uso do FM4-64 (Fig. 5b,c). Estes tetrásporos continuaram esféricos e não apresentaram a polarização típica dos processos de germinação das Gelidiales (Fig. 7a). As cisternas do Golgi perderam seu formato característico formando numerosas vesículas de diferentes tamanhos (Fig. 7b-c). Os cloroplastos, quando visualizados, não apresentaram alterações, já os grãos de amido mostraram formato alongado e quantidade semelhante aos tetrásporos recém-liberados (Fig. 7d-e). No tratamento com BFA 8 μ M, os tetrásporos apresentaram em seu interior um aumento no processo de vesiculação e na quantidade de grãos de amido (Fig. 8a-b). As inúmeras vesículas se espalharam em praticamente todo o citoplasma formando grandes áreas vesiculadas (Fig. 8c-d).

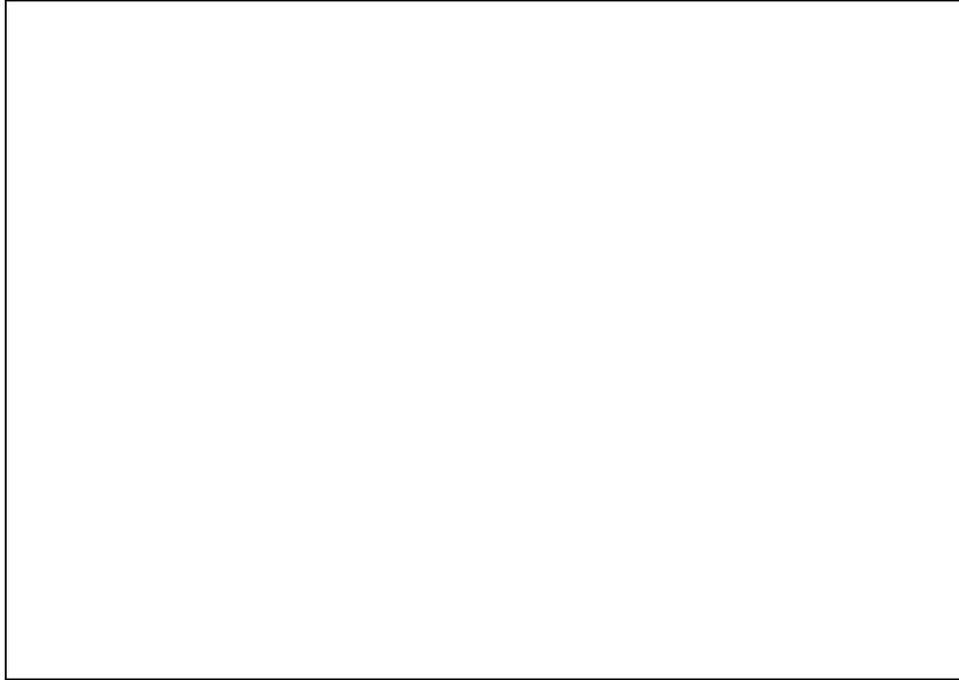


Figura 7: Microscopia eletrônica de transmissão de tetrásporos de *Gelidium floridanum* tratados com 4 μM de BFA. **(a)** Vista Geral do tetrásporo não germinado, com presença de áreas vesiculadas (Ve) e diversos vacúolos (V) pelo citoplasma. **(b,c)** Detalhe das regiões vesiculadas resultantes da desorganização dos corpos de Golgi. **(d,e)** Detalhe dos grãos de amido (A) com diferentes formatos. Cloroplastos (C). (Simioni *et al.*, 2014)

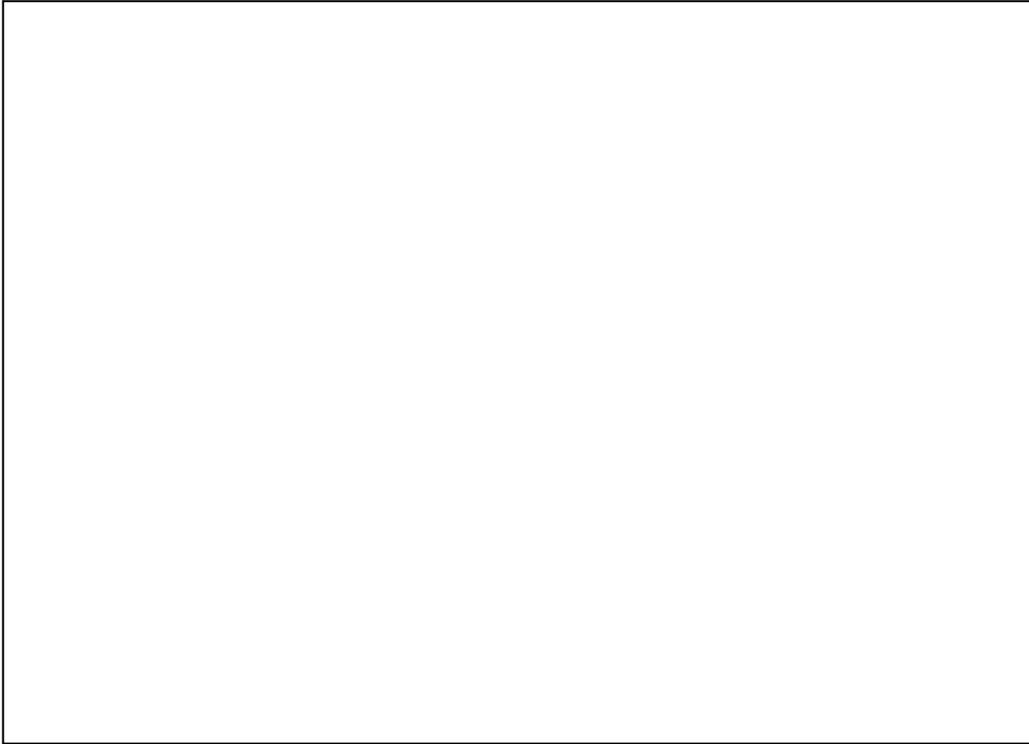


Figura 8: Microscopia eletrônica de transmissão de tetrásporos de *Gelidium floridanum* tratados com 8µM de BFA. **(a)** Vista Geral do tetrásporo não germinado, com aumento das áreas vesiculadas (Ve) e grãos de amido (A). **(b,c,d)** As áreas vesiculadas perdem as delimitações de membrana e os grãos de amido apresentam diversos tamanhos (Simioni *et al.*, 2014).

4. Discussão

A germinação dos tetrásporos de *Gelidium floridanum* tem início 5-6 horas após a liberação, entretanto, nos tetrásporos tratados com brefeldina (BFA) não houve adesão ao substrato, impossibilitando o início da germinação. A adesão é um pré-requisito para a germinação (Bouzon *et al.*, 2006), e segundo Callow *et al.* (2001) envolve uma maciça liberação de glicoproteínas adesivas derivadas dos corpos de Golgi. Esta deficiência no processo de adesão está relacionada com a inibição de secreção celular após o uso de BFA, como também, demonstrado por Callow *et al.* (2001) com zoósporos de alga verde *Enteromorpha linza*. Desta forma, pode-se supor que nos tetrásporos de *G. floridanum* as vesículas produzidas pelos corpos de Golgi são responsáveis pela produção de material necessário para a adesão ao substrato.

Os tetrásporos apresentaram alta sensibilidade BFA que, além de impedir a germinação resultou em altas taxas de mortalidade (46,23%) principalmente na concentração de 8 μM , podendo ser considerada uma DL50 (dose sub-letal) que induz metade do efeito máximo da droga para a espécie *G. floridanum*. A concentração usada neste estudo foi menor do que as utilizadas por Keidan *et al.* (2009) em microalga vermelha, que foi de 25 μM , concentração que inibe a viabilidade celular. Em zoósporos de algas verdes, Callow *et al.* (2001) relataram que a utilização de concentrações superiores a 80 mM tem efeitos citotóxicos. Os resultados apresentados neste estudo indicam uma maior sensibilidade dos tetrásporos *G. floridanum* na presença do BFA em comparação com as espécies já estudadas.

Após a adesão, os tetrásporos iniciam uma série de alterações morfológicas e ultraestruturais onde a reorganização espacial das organelas é um pré-requisito para a formação do tubo germinativo. Em estudos com pólen, a formação e crescimento do tubo é polarizada e resulta da fusão contínua de vesículas secretoras derivadas dos corpos de Golgi com a membrana plasmática (Wang *et al.* 2005). Em tetrásporos de *G. floridanum* a polarização é caracterizada pela formação de 2 regiões: grande vacúolo basal resultante da fusão de vesículas de Golgi, e a região apical que apresenta grande quantidade de corpos de Golgi. Bouzon *et al.* (2005) verificaram também na mesma espécie uma alta concentração de corpos de Golgi na região do tubo germinativo. Em análises ultraestruturais e na presença do marcador FM4-64, o sistema de endomembranas concentra-se em maior

quantidade na região de formação do tubo germinativo, indicando ser responsável pela formação e crescimento do mesmo, corroborando as observações feitas por Bouzon *et al.* (2005) nos processos iniciais de germinação de tetrásporos de *G. floridanum*. A polarização do sistema de endomembranas também foi observada no crescimento do tubo polínico (Derseken *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2005) e em zigotos de fucóides (Hadley *et al.*, 2006), neste último, a polarização de endomembranas e a secreção ocorreu simultaneamente no início do desenvolvimento demonstrando serem processos intimamente ligados.

Das estruturas que compõem o sistema de endomembranas, dos tetrásporos de *G. floridanum*, os numerosos corpos de Golgi são hipertróficos com 7 a 8 cisternas, corroborando as características típicas desta organelas em algas vermelhas (Zhang & Staehelin, 1992, Tsekos *et al.*, 2007). A presença destas estruturas na porção apical do tubo germinativo, evidencia a participação direta das vesículas do Golgi no crescimento deste tubo (Fig. 9a-f). Em plantas, os corpos de Golgi são responsáveis pela síntese de material da parede celular, como pectinas e hemicelulose, modificações e classificação de proteínas destinadas para a superfície celular, e estão envolvidos na exocitose de vesículas para formação da parede celular (Nebenfuhr & Staehelin, 2001). Durante a síntese de parede celular em algas vermelhas os polissacarídeos não cristalinos da matrix e outras moléculas, como as proteínas da parede, são direcionadas a membrana plasmática por vesículas derivadas do Golgi (Tsekos, 1996; Tsekos *et al.*, 2007). Em *Porphyridium*, estruturas precursoras do complexo enzimático responsável pela formação da parede celular “membranas tetraédricas” foram observadas nas membranas das cisternas do Golgi antes da formação de vesículas, nas membranas das vesículas do Golgi próximas a face trans do Golgi e, nas membranas das vesículas citoplasmáticas pouco antes da fusão com a membrana plasmática (Tsekos, 1996). O transporte e exocitose de "membranas tetraédricas" é uma função primária do aparelho de Golgi para posterior síntese de parede celular.

A BFA bloqueia o padrão dos corpos de Golgi e sua secreção em tetrásporos de *G. floridanum*, provocando uma rápida perda da assimetria endomembranar (Fig. 8g-h). Os tetrásporos tratados com BFA continuam a produzir membranas, mas estas não são direcionadas corretamente, tendo como consequência o aumento do volume celular e formação de regiões vesiculadas no citoplasma. Estes resultados corroboram os encontrados em plantas, em um estudo com cultura de células embriogênicas, a estrutura tanto do retículo endoplasmático como dos corpos de Golgi também apresentaram alterações (Capitiano

et al., 1997). Em tubos polínicos do tabaco, o aparecimento de vesículas como estruturas associadas a ER foi sugerido ser a fusão dos corpos de Golgi com o ER (Rutten & Knuiman, 1993). Conforme Capitanio *et al.* (1997) alterações estruturais nos tratamentos com BFA incluem uma rápida desorganização dos corpos de Golgi e a formação de estruturas tubulares, através dos quais proteínas do Golgi são redistribuídos para a ER. Henderson *et al.* (1994) têm explanado que o processo de vesiculação é consequência da inibição do transporte de proteínas do retículo endoplasmático para os corpos de Golgi. Similarmente em algas, diversos estudos relataram que BFA tem como alterações a diminuição do número de cisternas do Golgi e aumento do processo de vesiculação (Noguchi *et al.*, 1998; Callow *et al.*, 2001; Tsekos *et al.*, 2007; Keidan *et al.*, 2009) corroborando os resultados do presente estudo com tetrásporos de *G. floridanum*. Os principais alvos da BFA são fatores de troca de nucleotídeo guanina (GEFs), envolvida na ativação de fatores de ribosilação de ADP (ARFs) que são pequenas GTPases envolvidas principalmente na iniciação do complexo de revestimento em torno de vesículas COPI (proteína de revestimento) derivadas do Golgi (Robinson *et al.*, 2008). Segundo Donaldson *et al.* (1992), a BFA interage com uma proteína GTP-ligante chamada fator de ribosilação de ADP (ARF) e impede a catálise de GTP a partir GDP no ARF. Como resultado, o revestimento necessária para a vesícula nascente não pode ser formado (Donaldson *et al.*, 1992, Helms & Rothman, 1992). A interrupção das vesículas de revestimento resulta na reabsorção da membrana do Golgi no ER como observado em proteínas Golgi GFP-marcadas do Golgi em células vivas de *Arabidopsis* (Saint-Jore *et al.*, 2002).

O bloqueio da atividade dos corpos de Golgi pela BFA em tetrásporos de *G. floridanum* impediram a formação da parede celular e em consequência a formação do tubo germinativo. Além disso, foi visualizado em análises ultraestruturais, aumento na quantidade de grãos de amido das florídeas no citoplasma nestes tetrásporos tratados com BFA. Segundo Hummel *et al.* (2010), os corpos de Golgi desempenham um papel fundamental na biossíntese de compostos da matriz da parede celular, e na glicosilação de proteínas. Um suprimento constante de açúcares para a importação nas membranas cisternais dos corpos de Golgi é necessário e, perturbações e/ou perda das pilhas cisternais resultam em um acúmulo de carboidratos citoplasmáticos (Hummel *et al.*, 2010). O aumento dos níveis de amido após a inibição pela BFA, da secreção de vesículas produzidas pelos corpos de Golgi, foi elucidada nos estudos de Hummel *et al.* (2010), na espécie *Chlamydomonas*

noctigama. Similar resultado foi relatado em células de *Chlamydomonas reinhardtii* que cresceram sob condições de estresse (sem nitrato), as macromoléculas foram direcionadas para os plastídios para a síntese de amido e lipídios (Ball, 2002). O comprometimento da atividade do Golgi resultou na perda da função secretora e apresentou fortes evidências para a hipótese de que a atividade dos corpos de Golgi tem um efeito direto sobre os níveis de carboidratos do citoplasma e que, em circunstâncias particulares o carboidrato livre é redirecionado para os plastídeos para a conversão de amido (Hummel *et al.*, 2010). Em microalgas vermelhas *Porphyridium* sp., que não armazenam amido nos seus plastídeos, a presença de BFA induz a uma alteração na composição da parede celular e também gera um acúmulo amido citoplasmático (Keidan *et al.*, 2009).

Em *G. floridanum* a formação de um grande vacúolo na região oposta ao tubo germinativo caracteriza o início do processo germinação. Conforme Bouzon *et al.* (2005), a pressão de turgor dos grandes vacúolos provavelmente é responsável pelo alongamento do tubo de germinativo e concomitante ao deslocamento das organelas citoplasmáticas. Em nosso estudo, após o tratamento com BFA, são formados pequenos vacúolos dispersos por todo o citoplasma não ocorrendo fusão para a formação do grande vacúolo basal. Segundo Gomes & Chrispeels (1993) BFA inibe o direcionamento de secreção de proteínas solúveis destinadas ao vacúolo .

Após a utilização de BFA em tetrásporos de *G. floridanum* podemos concluir que os corpos de Golgi são responsáveis por processos relevantes para a germinação (Fig. 9). Dentre os quais, destacamos: 1) produção e secreção de moléculas adesivas; 2) formação de um grande vacúolo basal responsável pelo deslocamento das organelas citoplasmáticas e 3) produção de membranas necessárias para a formação e alongamento do tubo germinativo. A BFA afetou a arquitetura dos corpos de Golgi resultando no bloqueio da síntese da parede celular necessária a formação do tubo germinativo, como também, afetou a estrutura e quantidade de grãos de amido. Concluímos assim que a polarização do sistema de endomembranas é um evento inicial na adesão ao substrato e no estabelecimento da polaridade. O direcionamento das vesículas secretoras oriundas dos corpos Golgi tem um papel fundamental na formação do tubo germinativo durante a germinação de tetrásporos de *G. floridanum*.

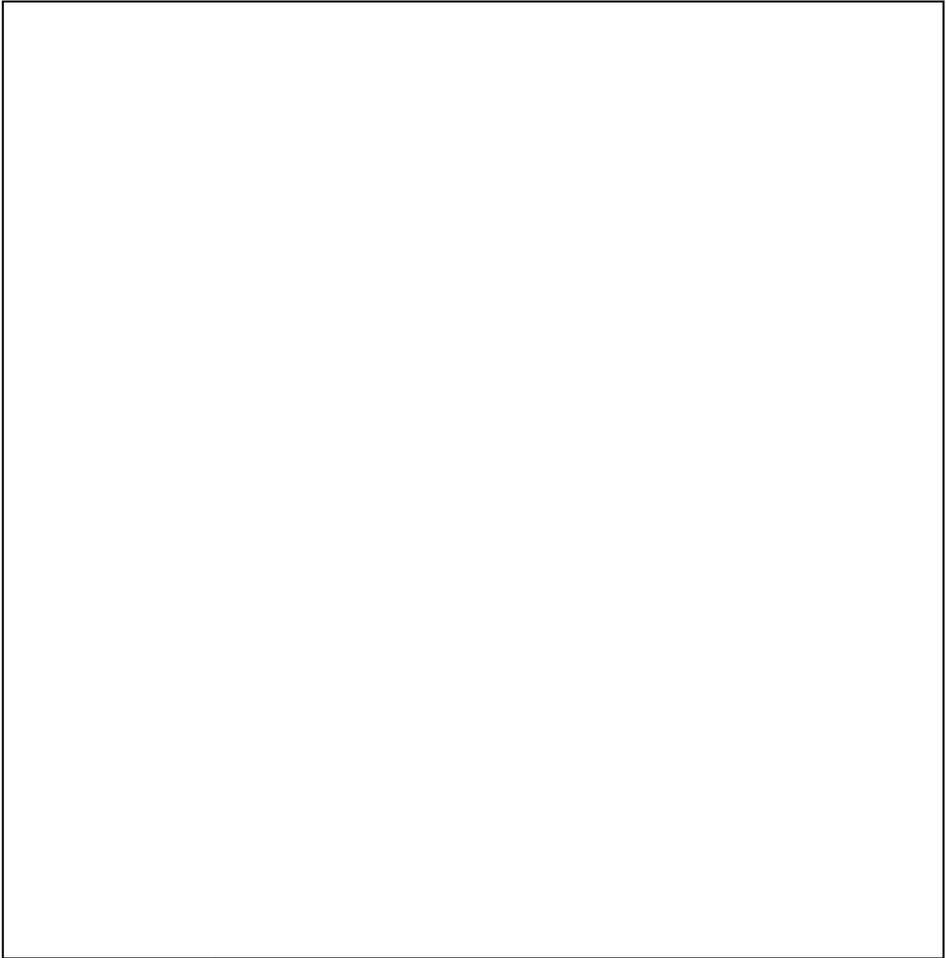


Figura 9: Esquema representativo da possível localização espacial dos corpos de Golgi e os efeitos da BFA. **(a-f)** Tetrásporos controle, **(a)** inicialmente os corpos de Golgi se encontram próximos a membrana celular e os cloroplastos centralizados próximos a núcleo, **(b,c)** o deslocamento inicial dos corpos de Golgi em um dos lados e aumento dos vacúolos no outro indicam o início da germinação e **(d,e,f)** formação do tubo germinativo com o deslocamento das organelas a um pólo da célula. **(g)** Estrutura celular dos tetrásporos tratados com 4 μM BFA, as cisternas do Golgi perdem seu formato característico formando numerosas vesículas de diferentes tamanhos. **(h)** Estrutura celular dos tetrásporos tratados com 8 μM BFA, com grandes áreas vesiculadas e aumento na quantidade de grãos de amido. (Simioni *et al.*, 2014)

CAPÍTULO III

Efeitos da colchicina e citocalasina na germinação de tetrásporos de *Gelidium floridanum*

1. Introdução

O desenvolvimento de todos os organismos eucarióticos é mediado pela polarização celular (Green *et al.*, 2013). O estabelecimento da polaridade celular está associado com a organização molecular, organelar e/ou assimetrias morfológicas na célula. O alongamento da célula é generalizada, sendo observada em células eucarióticas, incluindo neurônios, tubos polínicos, hifas fúngicas, e filamentos de algas (Katsaros, 1995; Kropf *et al.*, 1998; Campas & Mahadevan, 2009).

Em plantas, os filamentos do citoesqueleto parecem estar envolvidos na determinação da morfologia das células e na polaridade do eixo de formação do tubo polínico durante a diferenciação celular (Lloyd *et al.*, 1985). Na formação do tubo polínico, a característica principal é a presença do citoesqueleto, que compreende os filamentos de actina e microtúbulos.

Em estudos sobre a formação do tubo polínico, a função dos microtúbulos foi observada estar relacionada com o zoneamento no tubo (Taylor & Hepler, 1997) e seu alongamento (Joos *et al.*, 1995). O movimento de organelas no tubo polínico ocorre ao longo de feixes de filamentos de actina que são organizados como um colar cortical na região apical que se destina a polarizar o citoplasma no ápice do tubo (Cardenas *et al.*, 2008; Cai & Caestri, 2010). Nas algas pardas, os microtúbulos exercem um papel na organização do retículo endoplasmático e migração dos componentes que são secretados, contribuindo para a formação de uma polaridade celular (Peter & Kropf, 2010).

O envolvimento dos microtúbulos no estabelecimento da polaridade celular foi demonstrado em vários estudos empregando colchicina (Medvedev, 2012). Já na década de 30, observou-se que o alcalóide colchicina paralisa a mitose na metáfase, e, desde então, a colchicina tem sido usada nos estudos sobre os cromossomos e a divisão celular, e investigações sobre microtúbulos (Alberts *et al.*, 2010). Este alcalóide em concentrações micromolares se liga a tubulina, bloqueando sua polimerização (Medvedev, 2012). O tratamento com colchicina

mostrou interromper o padrão de formação polarizada das células ciliadas da raiz de *Gibasis geniculata* e *Tradescantia fluminensis* (Yamazaki, 1988).

Para a inibição dos filamentos de actina, uma das drogas muito utilizada é a citocalasina B, quando utilizada interfere com os movimentos celulares. As citocalasinas se combinam com as moléculas de actina e impedem a polimerização dessas moléculas que formam os microfilamentos (Alberts *et al.*, 2010). A utilização da citocalasina na diferenciação de zigotos de *Fucus* sp. e *Pelvetia* sp. mostrou que a actina desempenha um papel fundamental na polarização celular e manutenção da morfogênese celular (Brawley & Robinson, 1985).

Em algas, a grande maioria dos estudos sobre o citoesqueleto foram realizados principalmente em algas pardas. Em zigotos de algas pardas os microtúbulos e os microfilamentos de actina participam da polarização e fixação do eixo, da divisão celular e do crescimento das extremidades (Katsaros *et al.*, 2006). Em algas vermelhas a polarização do conteúdo celular foi observada em alguns estudos (Bouzon *et al.*, 2005; Ouriques *et al.*, 2012) entretanto o estudo do papel biológico e a ação dos microtúbulos ainda não foi descrita.

Em *Gelidium floridanum* a observação da polarização e migração das organelas foi observada através das análises ultraestruturais (Bouzon *et al.*, 2005). Segundo os mesmos autores, a organização polarizada para esta espécie é caracterizada pela formação de 3 zonas, um largo vacúolo basal, o tubo germinativo e a região apical na qual as vesículas do Golgi estão localizadas, mas não foram descritas a presença e ação dos microtubulos neste processo. Este estudo teve como objetivo de investigar a função dos elementos do citoesqueleto durante a polarização e formação do tubo de tetrásporos de *G. floridanum* através do uso da colchicina e da citocalasina.

2. Material e métodos

2.1 Algas e germinação

A obtenção dos tetrásporos está descrita no item 2.1 do capítulo

II.

2.2 Experimentos com colchicina e citocalasina B

Para análise do envolvimento do citoesqueleto no processo de germinação dos esporos foi adicionado à água do mar filtrada, inibidores de polimerização de microtúbulos e microfilamentos, respectivamente, colchicina (C-9754, Sigma Chemicals, Alemanha) e citocalasina B (C-6762, Sigma Chemicals, Alemanha) em diferentes concentrações. As soluções estoques foram inicialmente dissolvidas em dimetil sulfoxido (DMSO) sendo a colchicina a concentração de 100 mM e a citocalasina B 1 mM. A partir destas soluções estoque foram preparadas as concentrações finais em água do mar filtrada de 5 e 10 mM para os tratamentos com colchicina e, 50 e 100 μ M para citocalasina B (Fig.10). As amostras controle foram incubadas com as mesmas concentrações do solvente sem os inibidores. Tanto o solvente utilizado no controle, quanto às concentrações finais de colchicina e citocalasina B foram adicionados juntamente com os tetrásporos, por um período de 6 horas, conforme Pillai *et al.* (1992). Quatro repetições foram feitas para cada grupo experimental, em quatro experimentos independentes (Fig.10)

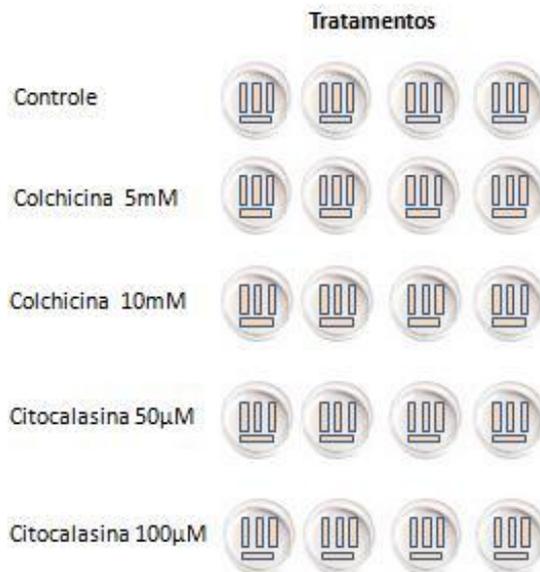


Figura 10: Desenho experimental de *G. floridanum*. Cada tratamento com as diferentes concentrações de colchicina e citocalasina foram realizados em quadruplicatas.

2.3 Análise da morfologia e processos de germinação

As características morfológicas do controle e das amostras tratadas de tetrásporos de *G. floridanum* foram analisadas e fotografadas com um microscópio epifluorescente Olympus BX41 equipado com sistema de captura de imagens QCapture Software 5.1 Pro. A análise foi realizada através da avaliação das seguintes características: 1) tetrásporos com a formação do tubo germinativo, 2) tetrásporos inviáveis (pigmentação verde), 3) tetrásporos com tubo germinativo malformado e 4) tetrásporos não germinados e/ou alterados. As características morfológicas foram analisadas em 250 tetrásporos por lâmina para os diferentes tratamentos e em quadruplicata (n=1000).

2.4 Análises da migração nuclear com o uso do DAPI (4-6-diamidino-2-fenilindol)

Após o período experimental (6 horas) , os tetrásporos de *G. floridanum* foram fixados em solução de paraformaldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, e mantidas em geladeira a 4°C. No dia da análise, o material foi lavado duas vezes em tampão fosfato, colocados em Triton X100 (0,2%) por 1 hora, e tratados com DAPI (Molecular Probes) na concentração de 0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ por aproximadamente 50 minutos. Os tetrásporos foram observados em um microscópio epifluorescente Olympus BX41 equipado com sistema de captura de imagens QCapture Software 5.1 Pro.

2.5 Análises em microscopia confocal de varredura a laser

Para analisar a estrutura dos cloroplastos durante a germinação dos tetrásporos de *G. floridanum*, amostras de todos os tratamentos foram observadas em um Microscópio Confocal de Varredura a Laser DMI6000B (Leica TCS SP-5, Alemanha) do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME). A autofluorescência dos cloroplastos foram observadas em um comprimento de onda de excitação com laser de 488 nm (violeta) com um espectro de emissão de 510 a 750 nm (Zitta *et al.*, 2013).

2.6 Análise dos dados

Dados foram analisados por Análise de Variância Unifatorial (ANOVA) e o teste Tukey *a posteriori*. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando programa *Statistic* (versão 10.0), considerando significativo $p \leq 0,05$.

3. Resultados

Os tetrásporos livres são esféricos, medindo 25-30 μm de diâmetro, apresentaram coloração vermelho escuro devido à presença de muitos cloroplastos pequenos característico das algas vermelhas (Fig. 11a). Os esporos foram liberados sem parede celular envoltos por uma matriz mucilaginosa, que provavelmente é responsável pela rápida adesão ao substrato. Após a fixação ao substrato, os esporos começaram a germinação. O início da germinação é caracterizado por uma desorganização citoplasmática e formação de um pólo na célula onde será formado o tubo germinativo (Fig. 11a). A maioria do conteúdo citoplasmático do tetrásporo migrou para esse tubo germinativo (Fig. 11b,c).

Com o uso do DAPI, nas amostras controle, foi verificada a presença de um único núcleo por célula nos tetrásporos livres (Fig. 11d). No entanto, com o decorrer da germinação a célula inicial do tetrásporo tornou-se multinucleada (Fig. 11e,f), e apresentou posteriormente a migração de um destes núcleos para o pólo de formação do tubo germinativo (Fig. 11g). Estes núcleos durante o deslocamento foram observados alongados (Fig. 11g). Mesmo após a primeira divisão ainda foram visualizados vários núcleos na célula inicial do tetrásporo (Fig. 11h). Em paralelo a migração do núcleo, através da autofluorescência foi possível observar o deslocamento dos cloroplastos na fase inicial de reorganização das organelas (Fig. 11i).

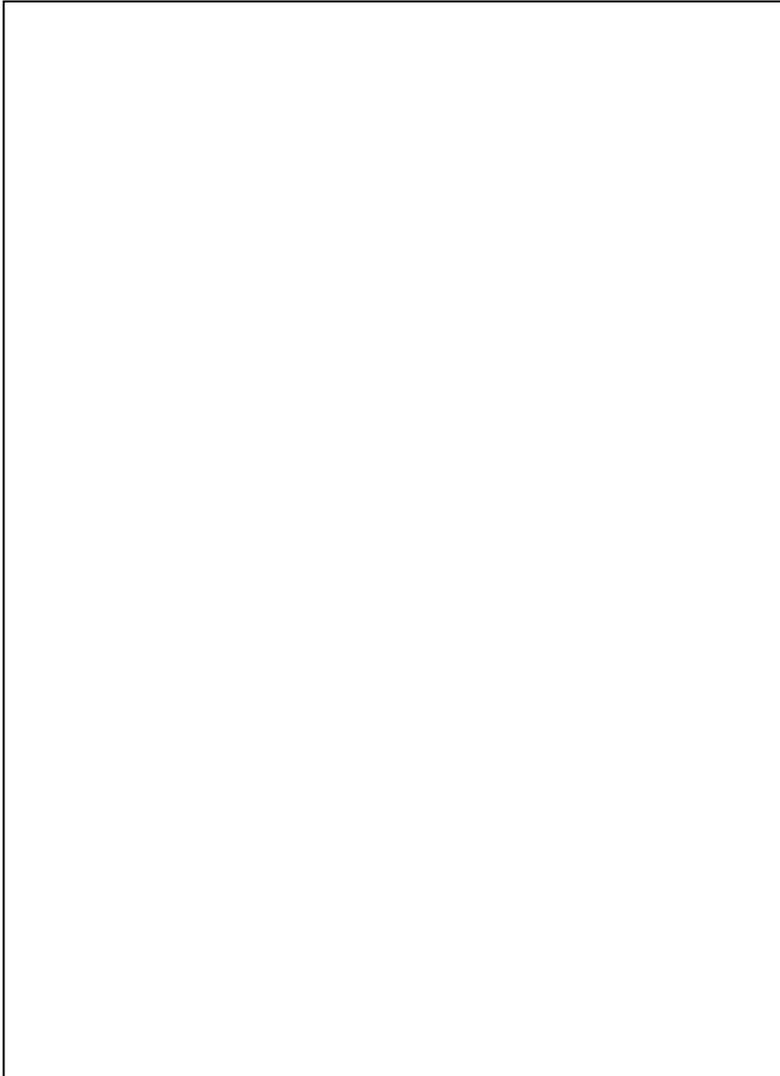


Figura 11: Fases iniciais da germinação dos tetrásporos controle de *Gelidium floridanum* observados na microscopia de luz e confocal. **(a-c)** Tetrásporos livres com início da germinação, **(a)** formação do tubo germinativo e migração do conteúdo citoplasmático **(b,c)**. **(d-h)** Marcação com DAPI. Inicialmente os tetrásporos apresentaram um único núcleo (seta) **(d)** e posteriormente tornaram-se multinucleados (setas) **(e,f)**. Um dos núcleos migra para o tubo germinativo **(g)** permanecendo alguns ainda na célula do tetrásporo inicial **(h)**. **(i)** Autofluorescência dos cloroplastos mostrando sua movimentação pelo tubo germinativo.

No tratamento com colchicina, os tetrásporos tratados com 5 mM apresentaram baixa taxa de germinação (Fig. 12a), este processo é mais lento quando comparado ao controle. Os tetrásporos que germinaram apresentaram alteração na formação do tubo germinativo (Fig. 12b), com tubos alargados e/ou bem constrictos, mas com presença de núcleos tanto na região do tubo quanto na célula inicial do tetrásporos (Fig. 12c). Os cloroplastos se mantiveram aparentemente viáveis, tanto nos tetrásporos não germinados quanto naqueles com tubos formados (Fig. 12d). Por outro lado, nos tetrásporos tratados com 10 mM de colchicina, houve total inibição da germinação dos tetrásporos. Este tratamento resultou numa grande quantidade de tetrásporos inviáveis (esverdeados) (Fig. 12e) e poucos não germinados com coloração normal da espécie (Fig. 3f). Os tetrásporos, aparentemente normais, apresentaram núcleos em seu interior (Fig. 12g), mas seus cloroplastos apresentaram estrutura desorganizada e com autofluorescência difusa (Fig. 12h).

O tratamento com citocalasina, na concentração de 50 μ M, resultou em poucos tetrásporos germinados (Fig. 13a,b), os quais também apresentaram alterações no formato do tubo germinativo. Muitos dos tetrásporos não germinados mostraram conteúdo celular desorganizado (Fig. 13c). Os núcleos foram visualizados principalmente no corpo inicial do tetrásporo (Fig. 13d). Os cloroplastos apresentaram formatos alterados, com estrutura circular, quando comparados ao do controle (Fig. 13e). No tratamento de 100 μ M de citocalasina, os tetrásporos não germinaram e também apresentaram alteração no formato das células (Fig. 13f,g). Estes tetrásporos mantiveram os núcleos (Fig. 13h), porém os cloroplastos apresentaram formato esférico (Fig. 13i), diferente do observado no controle.

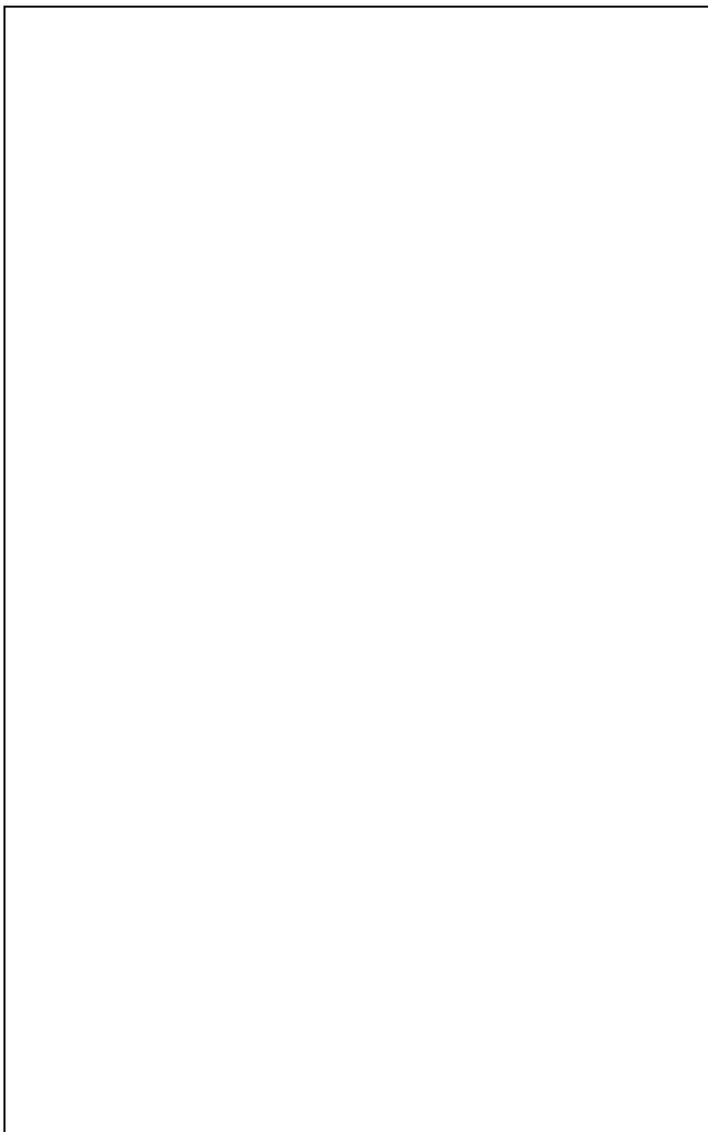


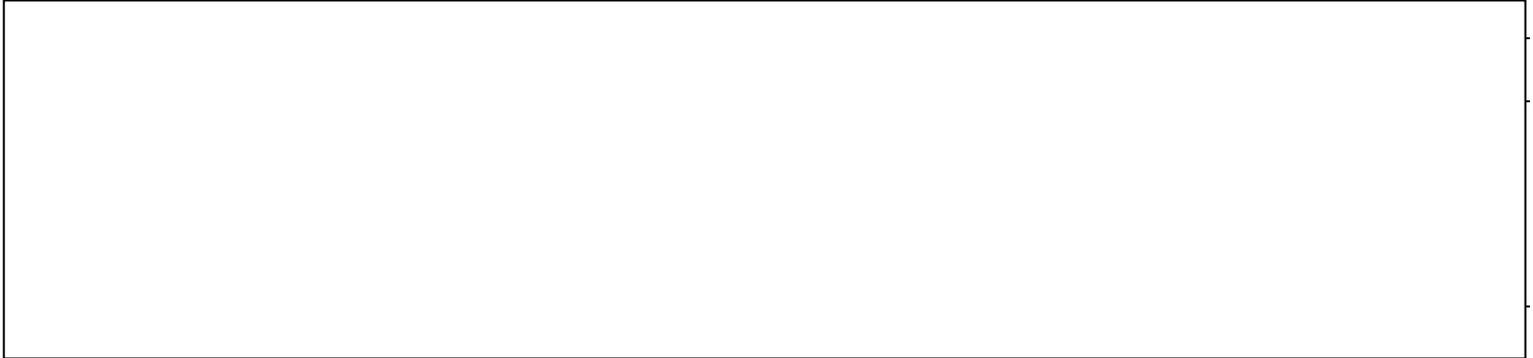
Figura 12: Germinação de tetrásporos de *Gelidium floridanum* tratados com colchicina observados na microscopia de luz e confocal. Grande quantidade de tetrásporos não germinados (**a**) e presença de germinados com tubos malformados (**b**). Detalhe dos núcleos (DAPI) nos tetrásporos germinados (**c**). Presença de cloroplastos ativos com autofluorescência tanto nos tetrásporos germinados e não germinados (**d**). Presença de tetrásporos não germinados (**e,f**) com núcleos (DAPI) (**g**) e difusa autofluorescência dos cloroplastos (**h**).



Figura 13: Germinação de tetrásporos de *Gelidium floridanum* tratados com citocalasina observados na microscopia de luz e confocal. Tetrásporos germinados com tubos alterados (**a,b**). Detalhe de um tetrásporo com citoplasma desorganizado (**c**). Detalhe dos núcleos (DAPI) nos tetrásporos germinados (**d**). Presença de autofluorescência dos cloroplastos com formato alterado (**d**). Presença de tetrásporos não germinados (**f,g,h**) com núcleos (DAPI) em seu interior (**i**) e alteração do formato dos cloroplastos (autofluorescência) (**j**).

Na tabela 2 foi possível observar que ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos em relação às taxas de germinação, mortalidade, tetrásporos com tubos malformados e não germinados. Os tetrásporos, no controle, apresentaram uma alta taxa de germinação de 62,5%, entretanto, quando tratados com colchicina a taxa reduziu para 7,34% na concentração de 5mM e para 1% na concentração de 10 mM com alta taxa de tetrásporos mortos, sendo que para esta última concentração os tubos que germinaram apresentaram malformação. No grupo tratado com citocalasina a taxa de germinação foi de 13,30% na concentração de 50 μ M e não houve germinação na concentração de 100 μ M com total inibição da germinação e alta taxa de tetrásporos mortos. Dos tetrásporos que não germinaram, os do controle apresentaram tetrásporos com aspecto viáveis de pigmentação característica. Porém, nos tratamentos, os tetrásporos que não germinaram, em sua grande maioria, apresentaram citoplasma alterado.

Tabela 2: Efeito da adição de colchicina e citocalasina na germinação de tetrásporos de *Gelidium floridanum*.



4. Discussão

É bem conhecido que os microfilamentos de actina tem um papel importante na motilidade celular e morfogênese em plantas (Williamson, 1986). Em vários estudos envolvendo a administração de citocalasinas demonstraram claramente que os microfilamentos de actina regulam o crescimento do tubo polínico e a associação e movimentação de organelas citoplasmática (Cai & Cresti, 2010).

No início da germinação de *G. floridanum*, através das análises realizadas foi possível observar a migração dos núcleos e dos cloroplastos, com maior ênfase, e percebeu-se todo o deslocamento do conteúdo citoplasmático. Isto também foi observado através de análises ultraestruturais da germinação de *G. floridanum* (Bouzon *et al.*, 2006) e no desenvolvimento de gametófitos de alga parda *Macrocystis pyrifera* (Pillai *et al.*, 1992).

Os eventos normais associados com alongamento do tubo germinativo em gametófitos de *G. floridanum* parecem ser muito semelhantes aos eventos que ocorrem durante o crescimento do tubo de pólen em plantas superiores. Em células com formação de uma ponta de crescimento (tal como o tubo de pólen), expansão e alongamento ocorrem em uma área delimitada, a ponta ou ápice, que normalmente contém um grande número de vesículas derivadas de Golgi (Cai & Cresti, 2010). Os corpos de Golgi e as outras classes de organelas se movem rapidamente no tubo polínico, a fim de distribuir de forma uniforme o conteúdo organelar e continuar o crescimento do tubo. Esse movimento de organelas no tubo polínico (como outras células vegetais) ocorre ao longo de feixes de filamentos de actina (Cardenas *et al.*, 2008).

No tratamento com citocalasina, durante a germinação de tetrásporos de *G. floridanum*, os resultados revelaram que os tetrásporos são sensíveis as variações de concentrações (50 e 100 μM) deste agente inibidor, o qual interferiu nos movimentos celulares, alterando a estrutura do cloroplasto e de todo o formato celular, inibindo totalmente a germinação na maior concentração. Conforme Russel *et al.* (1996) e Garbary *et al.* (1992) citocalasina afetou a estrutura dos cloroplastos causando diversas anormalidades no crescimento com formação de projeções laterais. Citocalasina bloqueou o movimento dos cloroplastos, em estudos com *Griffithsia pacifica* (Russel *et al.*, 1996), e a movimentação dos grãos de amido das florídeas de *Ceramium strictum* (Garbary & McDonald, 1996). Segundo Garbary & McDonald (1996), os microfilamentos de actina estão envolvidos na movimentação de

materiais dentro da célula. Na alga *Porphyra leucosticta*, no entanto, actina foi associada com as células em divisão (McDonald *et al.*, 1992), as agregações de actina estavam presentes ao longo da parede de divisão das células.

O envolvimento do F-actina, no estabelecimento da polaridade em zigotos de *Fucus* sp. ou *Pelvetia* sp. têm sido repetidamente estudado (Hable & Kropf, 1998; Fowler *et al.*, 2004). Estudos utilizando agentes anti-actina como citocalasina ou lantrunculina apoiam a hipótese de que fotopolariação de zigotos é dependente de actina (Hable & Kropf, 1998; Robinson *et al.*, 1999). Em células com crescimento polarizado, a actina suporta e direciona os componentes citoplasmáticos até o sítio de crescimento do rizóide, determinando a direção da expansão celular, tornando-se um componente chave na configuração da polaridade (Katsaros *et al.*, 2006). Segundo Hable & Hart, (2010) a polimerização da F-actina cortical é necessária para transportar vesículas ao polo do rizóide, enquanto que a despolimerização é requerida para realizar a fusão do conteúdo destas vesículas à membrana plasmática no sítio de crescimento do rizoide.

Para algas pardas, em especial *Fucus* sp. ou *Pelvetia* sp., o papel da F-actina na dinâmica de crescimento e desenvolvimento do zigoto já está bem estabelecido, e diversos estudos atualmente estão sendo realizados na identificação das proteínas que regulam o seu funcionamento (Fowler *et al.*, 2004). Já para algas vermelhas, poucos avanços foram realizados nos estudos dos microfilamentos devido a problemas na preservação destas estruturas (Puschel *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 2001)

A diferenciação do tubo germinativo de tetrásporos de *G. floridanum* também foi inibida pela ação da colchicina. Desta forma sugere-se que os microtúbulos também estão envolvidos no processo de migração do citoplasma e formação do tubo germinativo. A colchicina é um agente de despolimerização dos microtúbulos (Morejohn & Fosket, 1986), que inibe a divisão celular e subsequente translocação do núcleo-filho, sugerindo que estes microtúbulos mediam os processos de desenvolvimento. Em algas cenocíticas, *Voucheria longieaulis*, a translocação nuclear tem sido mostrada ser mediada por um sistema de microtúbulos (Ott, 1992). Para gametófitos de alga parda após o alongamento mediado pelos filamentos de actina ocorre a divisão celular a qual é dependente dos microtúbulos (Pillai *et al.*, 1992).

A associação entre núcleos e microtúbulos tem sido demonstrada por Mc Naughton & Goff (1990) em algumas algas verdes multinucleadas. Essa associação é incomum, e não tem sido relatado em

diversos estudos com marcadores de microtúbulos em algas vermelhas (Garbary *et al.*, 1992; McDonald *et al.*, 1992; Garbary *et al.*, 1996; Russell *et al.*, 1996).

Além disso, em plantas, deposição de componentes fibrilares da parede celular também está associada à microtúbulos no citoplasma periférico (Mizuta *et al.*, 1991). Tanto com *G. pacifica* como para *C. strictum*, com o uso de marcador para microtúbulo, essa associação não foi identificada (Garbary *et al.*, 1996; Russell *et al.*, 1996). A deposição de parede em muitas algas vermelhas é localizada em bandas na região apical e/ou basal das células, assim as algas vermelhas podem ser um sistema modelo para a investigação das relações entre os microtúbulos e formação da parede celular.

Mas o papel do citoesqueleto em plantas e algas ainda não está bem estabelecido. Em estudos com grãos de pólen, o movimento e acumulação de vesículas são impulsionados pela interação dinâmica entre o citoesqueleto de actina e as proteínas motoras do tipo miosina. Em contraste, a função dos microtúbulos é menos clara e muitas vezes ambígua (Cai & Cresti, 2010). No entanto, não há evidências que mostram que o tubo polínico contém proteínas motores da família cinesina. Estas proteínas motoras são provavelmente associadas com organelas do tubo polínico e, conseqüentemente, podem participar na distribuição de organelas durante o seu crescimento (Cai & Cresti, 2010). Para as algas pardas, como *Fucus* sp. e *Silvetia* sp., grupo que apresenta mais estudos sobre microtúbulos, também sugerem que a mobilidade de determinados componentes seja dependente de proteínas motoras associadas aos microtúbulos, mas enfatizam a necessidade de mais estudos para avaliar o papel destes no desenvolvimento (Hable & Hart, 2010). Para as algas vermelhas, estudos sobre a função dos microtúbulos são ainda mais escassos (McDonald *et al.* 1992; Garbary *et al.*, 1996; Russell *et al.*, 1996).

Com os dados obtidos neste trabalho conclui-se que, os inibidores do citoesqueleto, citocalasina e colchicina afetaram a germinação de tetrásporos de *Gelidium floridanum*. Estes agentes causaram diminuição das taxas de germinação e nas altas concentrações total inibição da mesma, além de malformação dos tubos germinativos e no caso da citocalasina alteração no formato dos cloroplastos. Pode-se sugerir que tanto os microtúbulos quanto os filamentos de actina são reguladores dos processos de polarização e germinação de tetrásporos de *Gelidium floridanum*. As algas vermelhas fornecem excelentes sistemas experimentais para estudos da morfogênese, incluindo alongamento celular, regeneração tecidual, deposição de parede celular e

movimentação das organelas (Kim *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2001). Desenvolvimento de novos protocolos para a marcação do citoesqueleto podem ser aplicados para um grupo amplo de algas vermelhas que ajudarão no entendimento do comportamento do citoesqueleto durante a polarização celular e o seu estabelecimento relacionados com a organização organelar e assimetrias morfológicas na célula.

CAPÍTULO IV

Efeitos da radiação ultravioleta (UVA + UVB) sobre gametófitos jovens de *Gelidium floridanum*: mudanças na organização ultraestrutural e no metabolismo

1. Introdução

A camada de ozônio estratosférico oferece proteção natural contra a radiação ultravioleta (UV) para todos os organismos biológicos (Madronich, 1992). Já se passaram três décadas desde os primeiros relatórios sobre as mudanças feitas pelo homem neste escudo protetor causadas por poluentes atmosféricos, tais como os clorofluorcarbonos (CFCs), halocarbonos, dióxido de carbono (CO₂) e o metil clorofórmio (MCF) (Kerr & McElroy, 1993). Como consequência da destruição da camada de ozônio, a radiação ultravioleta B (UVB) (280-320 nm) está cada vez mais atingindo a superfície da Terra (Mitchell *et al.*, 1992).

Similarmente a outros lugares com latitudes médias e altas, como nos hemisférios norte e sul (Santee *et al.*, 1995; Kirchhoff *et al.*, 1996; Rousseaux *et al.*, 1999; Kirchhoff *et al.*, 2000), o Sul do Brasil foi exposto a um aumento gradual dos níveis de radiação UV.

A energia UV (280–400 nm) induz a fotoinibição e fotoenvelhecimento em proteínas, ácidos nucleicos, e outros compostos nos tecidos biológicos (Mitchell *et al.*, 1992, Bischof & Steinhoff, 2012), bem como alterações nas ultraestruturas celulares (Schmidt *et al.*, 2009). A radiação ultravioleta afeta todos os organismos, especialmente aqueles no ecossistema aquático, provocando, por exemplo, as mudanças nas taxas de crescimento de macroalgas (Schmidt *et al.*, 2009, 2010a). O processo fotossintético é também afetado pela inibição da atividade da enzima 1,5-bi fosfato carboxilase/oxigenase (RUBISCO), modificação da funcionalidade da proteína D1 do centro da reação do fotossistema II (Lesser & Shick, 1994), e alteração da estrutura das membranas dos tilacóides nos cloroplastos (Grossman *et al.*, 1993). UVA (315-400 nm), a uma taxa moderada, é reconhecida por estimular a fixação de carbono fotossintético (Xu & Gao, 2008; Xu & Gao, 2010; Gao *et al.* 2012), aumentar a reparação do DNA e crescimento em macroalgas (Henry & Van Alstyne, 2004).

Uma das estratégias utilizadas pelas algas para sobreviver quando expostos a altos níveis de radiação UV é a síntese e acúmulo de compostos fotoprotetores, como os aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) e carotenóides, que direta ou indiretamente absorvem a energia da radiação UV (Karsten & Wiencke, 1999). Os compostos fenólicos também estão envolvidos na proteção do talo contra a exposição direta à radiação solar, especialmente radiação UV, como observado na alga marrom *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis (Pavia *et al.*, 1997), *Sargassum cymosum* C.Agardh (Polo *et al.*, 2014) e na alga vermelha *Hypnea musciformis* (Wulfen) JVLamouroux (Schmidt *et al.*, 2012a).

Apesar desta adaptação, em particular os pigmentos fotossintéticos continuam a ser um alvo chave de RUVB. Vários estudos sugerem que mudanças ocorreram nas concentrações de clorofila *a* em *Mastocarpus stellatus* (Stackhouse) Guiry e *Chondrus crispus* Stackhouse (Roleda *et al.*, 2004b), bem como *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. Silva (Schmidt *et al.*, 2010a). Conteúdos de ficobiliproteínas em *K. alvarezii* também foi alterada como demonstrado por Eswaran *et al.* (2001) e Schmidt *et al.* (2010a).

Além das mudanças no perfil de metabólitos secundários, alterações na ultraestrutura celular de algas expostas a radiação UVB têm sido relatados em muitos estudos (Poppe *et al.*, 2002, 2003; Holzinger *et al.*, 2004, 2006, 2011; Holzinger & Lutz, 2006; Schmidt *et al.*, 2009, 2010a, 2010b). Essas alterações ocorrem principalmente nos cloroplastos, modificando a quantidade, o tamanho, a organização, bem como o número de tilacóides (Schmidt *et al.*, 2009). Ao mesmo tempo, outros estudos não mostraram danos ultraestruturais nas algas verdes como *Zygnema* C. Agardh quando expostas à PAR + UVA + UVB durante 24 horas (Holzinger *et al.*, 2009) ou *Urospora penicilliformis* (Roth) JE Areschoug (Roleda *et al.*, 2009a).

Gelidium floridanum WR Taylor é distribuída ao longo da costa brasileira do Espírito Santo até o Rio Grande do Sul, Brasil. *G. floridanum* muitas vezes cresce entre as rochas na zona intertidal (Schmidt *et al.* 2012b). Como uma fonte de extração de ágar em todo o mundo, que alcançou uma importância significativa é utilizada em diversos produtos com propriedades de gelificação e bacteriológicos (Bouzon *et al.*, 2006). Assim, neste estudo, investigamos o efeito *in vitro* do PAR + UVA + UVB sobre jovens gametófitos de *G. floridanum*, e respondemos as seguintes questões: 1) Alterações na morfologia e ultraestrutura entre as amostras controle (PAR) e PAR + UVA + UVB (plantas tratados) podem relacionar a sensibilidade à radiação ultravioleta dos gametófitos jovens de *G. floridanum*? 2) Existe uma diferença nas taxas de crescimento, no conteúdo de pigmentos fotossintéticos, carotenóides e eficiência fotossintética após a exposição à radiação ultravioleta em gametófitos jovens de *G. floridanum*?

2. Material e métodos

2.1 Algas

Espécimes tetraporófitas de *Gelidium floridanum* foram coletados na Praia - Ponta do Sambaqui (27°29'18.8 "S e 48°32'12.9"

W), Florianópolis, Santa Catarina, em janeiro e fevereiro de 2013, durante a temporada de verão. As amostras de algas foram coletadas no costão rochoso e transportadas à temperatura ambiente em recipientes escuros para LABCEV-UFSC (Laboratório Célula Vegetal, da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil). Para eliminar macroepífitas, as algas coletadas foram meticulosamente limpas com uma escova e água filtrada.

2.2 Condições de cultura

Ramos de *G. floridanum* com tetrasporângios foram incubadas em placas de Petri sobre lâminas, contendo água do mar esterilizada, para liberar tetrásporos no escuro, a 23°C. Após a liberação de esporos, os ramos foram retirados, e as lâminas com os tetrásporos foram expostos a lâmpadas fluorescentes (Philips C-5 Super 84 16 W/840, Brasil), 60 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Li-cor 250, EUA) com um fotoperíodo de 12 h (a partir de 8 h). Os tetrásporos foram mantidas por imersão em água do mar enriquecida com von Stosch (VS/2). Após a germinação dos tetrásporos, os gametófitos jovens foram cultivados sob as mesmas condições durante 28 dias antes da sua utilização nos experimentos com radiação ultravioleta. O meio de cultura foi trocado duas vezes por semana.

2.3 Experimentos com radiação

No laboratório, gametófitos jovens de *G. floridanum*, com 28 dias, foram selecionados ($\pm 1,0$ g) e cultivados por três dias em béquers com 250 mL de água do mar esterilizada natural com von Stoch (VS/2) a 30 ups (unidade padrão de salinidade). A irradiância fotossinteticamente ativa (PAR) foi de 60 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (lâmpadas fluorescentes Philips C-5 Super 84 16W/840, Brasil; medições com Li-Cor light meter 250, EUA). A temperatura foi de 24°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo de 12 h (a partir das 8 h) e com aeração contínua.

O tratamento com radiação ultravioleta (PAR + UVA + UVB) foi fornecido por meio de uma lâmpada Vilber Lourmat (VL- 6LM, Marne La Vallée, França), que emite um comprimento de onda de 280-315nm para UVB e de 315-400nm para UVA. Dose total de PAR, UVA e UVB foram: 563,50 kJ m^{-2} (60 ± 10 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 7,56 kJ m^{-2} ($0,70 \text{ Wm}^{-2}$), 3,78 kJ m^{-2} ($0,35 \text{ Wm}^{-2}$), respectivamente. O período de exposição foi de três horas por dia (iniciando as 12:00 h e terminando as 15:00 h). Para evitar a exposição à radiação UVC, foi utilizada uma folha de diacetato de celulose que tem uma espessura de 0,075 milímetros. A escolha do período de exposição foi realizada após

experiências preliminares, que resultou na perda de mais de 50% dos gametófitos jovens quando expostos a um período superior a 3 horas, durante 3 dias. Quatro repetições foram feitas para cada grupo experimental (PAR e PAR + UVA + UVB).

2.4 Taxa de crescimento

As taxas de crescimento (TCs) foram calculadas utilizando a seguinte equação: $TC [\% \text{ dia}^{-1}] = [(Pf/Pi)^{1/t} - 1] \times 100$, onde Pi = peso fresco inicial, Pf = peso fresco depois 3 dias, e t = tempo em dias experimentais (Penniman et al., 1986).

2.5 Pigmentos fotossintéticos

Para a extração dos pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a* e ficobiliproteínas), as amostras de *G. floridanum* (aprox. 0,100 g para cada análise) do controle e dos tratamentos foram congeladas em nitrogênio líquido (N₂) e mantido a -40 ° C até a análise como descrito anteriormente (Schmidt *et al.* 2010b). Clorofila *a* foi extraído em 3 mL de DMSO a 40°C, durante 30 minutos, usando um homogeneizador de tecidos de vidro (Hiscox & Israelstam, 1979; Schmidt *et al.*, 2010c), e quantificadas por espectrofotômetro modelo 100-20 (Hitachi, Co, Japão) de acordo com Wellburn (1994). O teor de ficobiliproteínas foi realizada por trituração do material a um pó com nitrogênio líquido e extraída em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,4, a 4°C na escuro. Níveis de ficobiliproteínas [aloficocianina (APC), ficocianina (PC) e ficoeritrina (PE)] foram determinados por espectrometria e calculada usando as equações de Kursar *et al.* (1983).

2.6 Análise dos carotenóides

A extração de carotenóides seguiu, com modificações, o protocolo anteriormente descrito por Kuhnen *et al.* (2009). A biomassa amostral (0,300 g, peso fresco, n = 4) foi imersa em N₂ líquido, macerada na presença de 10 mL de álcool metílico (p.a.) e incubada (1h, ausência de luz). O extrato organossolvente foi filtrado em suporte de celulose (Ø poro 14 µm), sob vácuo. O filtrado foi transferido a um espectrofotômetro UV-visível para leitura das absorbâncias nos comprimentos de onda de 200-700 nm. Os valores de absorbância a 450 nm foram selecionados para posterior quantificação do teor total de carotenóides, utilizando curva padrão de β-caroteno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA - 0,5 a 10 µg.mL⁻¹, y = 0.167x, r² = 0,99).

A identificação dos carotenóides foi realizada através da espectrometria de massa de cromatografia líquida (LM-MS) pelo sistema UFLC(Shimadzu , Kyoto , Japão), cromatografia líquida ultrarápida, acoplado a um espectrômetro de massa micrOTOF - QII (Bruker Daltonics). A identificação dos componentes individuais foi realizada por comparação dos espectros de massa com os perfis das bibliotecas de LC-MS .

2.7 Microscopia de luz (ML)

Amostras de aproximadamente 5 mm de comprimento foram fixadas em solução de paraformaldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2, durante 12 h, a temperatura de 4°C. Após o período, o material foi lavado duas vezes com tampão fosfato de sódio 0,1 M e desidratado em soluções crescentes de etanol a 30, 50, 70, 90 e 100% (Bouzon, 2006). A pré-infiltração e a infiltração das amostras foram feitas em historesina glicolmetacrilato e os blocos foram montados em historesina glicolmetacrilato adicionando um endurecedor. As secções foram realizadas com espessura de 4 µm em micrótomo modelo Leica RM 2125 com navalha de tungstênio e foram dispostas em lâminas para a aplicação de técnicas de histoquímicas.

2.8 Testes histoquímicos

Para a análise das amostras controle e dos tratamentos, foram aplicados os seguintes testes histoquímicos:

a) Azul de toluidina (TB): foi utilizado para identificar polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia (Gordon & McCandless, 1973). As lâminas com as secções foram coradas por 30 segundos, lavadas em água corrente e secas em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram montadas em bálsamo do Canadá.

b) Ácido Periódico de Schiff (PAS) (Gahan, 1984): foi utilizado para identificar a presença de polissacarídeos neutros. As lâminas com as secções foram imersas em solução aquosa de ácido periódico a 1% durante 15 min. Após esse período, foram lavadas em água corrente por 15 min, e o reativo de Schiff foi aplicado durante 20 minutos no escuro. Em seguida, as secções foram lavadas novamente em água corrente durante 15 min, secas ao ar e montadas com bálsamo do Canadá.

c) Azul brilhante de Coomassie (CBB) (Gahan, 1984): foi utilizado para observação de proteínas totais. As secções foram embebidas em solução de CBB a 0,05% por 40 minutos. Posteriormente foram lavadas em solução de Clark (25 mL de ácido acético com 75 mL

de álcool etílico) por 20 min e secas ao ar, sendo posteriormente montadas com bálsamo do Canadá.

O material corado pelas diferentes técnicas foi analisado e fotografado com um microscópio de epifluorescência (Olympus BX 41) equipado com imagem QCapture Pro Software 5.1 (Qimaging Corporation, Austin, TX, EUA).

2.9 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As amostras foram pré-fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% e sacarose 2%, tamponada com cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) a 4°C por 12h. A pré-fixação foi seguida por quatro lavagens de 30 min cada, no mesmo tampão. Posteriormente, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (1:1), durante 4 h à temperatura ambiente (Pueschel, 1979; Bouzon, 2006). Após esse período, o material foi lavado duas vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1M, sendo mantido por 30 min em cada lavagem. A desidratação foi realizada em uma série de soluções aquosas de concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), sendo o material mantido 30 min em cada etapa. A última série de acetona 100% foi trocada duas vezes. O material foi então infiltrado com resina Spurr em séries graduais de acetona-resina Spurr durante três dias, seguido de duas infiltrações em resina pura por 12 h, e polimerizados em estufa a 70°C por 24 h. Os cortes ultrafinos foram feitos com navalha de diamante em ultramicrotomo e, posteriormente, contrastados com acetato de uranila 1% e citrato de chumbo 1%. Os cortes foram observados e fotografados no microscópio eletrônico de transmissão JEM 2100 do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

2.10 Fluorescência da clorofila *a* in vivo

Desempenho fotossintético foi estimada *in vivo* pela fluorescência da clorofila *a* do fotossistema II (PSII) usando um fluorímetro de modulação de impulsos portátil PAM- 2500 (Walz, Alemanha) após a exposição à radiação PAR + UVA + UVB e, após um dia de Recuperação. O estudo do desempenho fotossintetizante foi avaliado mediante o rendimento quântico ótimo (Fv/Fm; probabilidade que o fóton absorvido ser utilizado na fotossíntese) e a taxa de transporte de elétrons (ETR) dependente de intensidades crescentes de luz (curva de fotossíntese – irradiância; P-I).

Primeiramente foram feitas as medições da taxa de transporte de elétrons (ETR, $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), que é um indicador do requerimento de

luz para alcançar uma determinada eficiência fotossintetizante, a partir das curvas de ETR versus intensidades crescentes de luz PAR (0, 42, 81, 143, 236, 456, 752 e 1078 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) fornecida pelo dispositivo do PAM. Os níveis de ETR foram calculados segundo Schreiber *et al.* (1994) como $\text{ETR} = Y(\text{II}) \times \text{PAR} \times A \times F$; onde $Y(\text{II})$ é o rendimento quântico efetivo, A corresponde ao índice de absorptância da amostra, e F é a fração de quantum absorvida que é requerida para assimilar 1 molécula de CO_2 no PSII, sendo 0,15 para algas vermelhas (Grzymiski *et al.*, 1997; Figueroa *et al.*, 2003). A absorptância do talo de cada amostra foi determinada colocando as algas em um sensor de PAR (LI-COR Quantum LI -1000, EUA), medindo com um medidor de luz PAR (LI-COR LI -250, EUA), e calculou-se a transmissão de luz como $A = 1 - (I_t / I_o)$, onde I_t é a irradiância através do talo (luz transmitida) e I_o é a irradiância inicial.

Após as amostras foram pré-incubadas no escuro por 10 min e foram usadas para avaliar rendimento quântico ótimo (F_v/F_m) como indicador da eficiência quântica máxima do PSII. Foram utilizadas quatro réplicas para estimar cada parâmetro.

2.11 Análise dos dados

Os dados foram analisados por Análise de Variância - unifatorial (ANOVA) com um teste a *posteriori* de Tukey. Para o desempenho fotossintético foram feitas análise de Variância - bifatorial (ANOVA). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote de software Statistica (versão 10.0), considerando significativo $\leq 0,05$.

3. Resultados

3.1 Taxas de crescimento (TC)

Após três dias em cultura, gametófitos de *G. floridanum* apresentaram diferenças estatísticas (ANOVA, $P < 0,0002$) nas taxas de crescimento entre talos cultivados na condição PAR (condição controle) e talos cultivados sob uma combinação de PAR + UVA + UVB. As plantas controle apresentaram uma TC de 25,2% ao dia, com coloração vermelha típica e aumento da formação de ramos pigmentados no final do experimento (Fig. 14a-c). Por outro lado, as plantas expostas à PAR + UVA + UVB aumentaram em apenas 0,66% ao dia, e apresentaram

branqueamento e despigmentação nas pontas dos ramos (Fig. 14d-f), quando comparado com o controle.

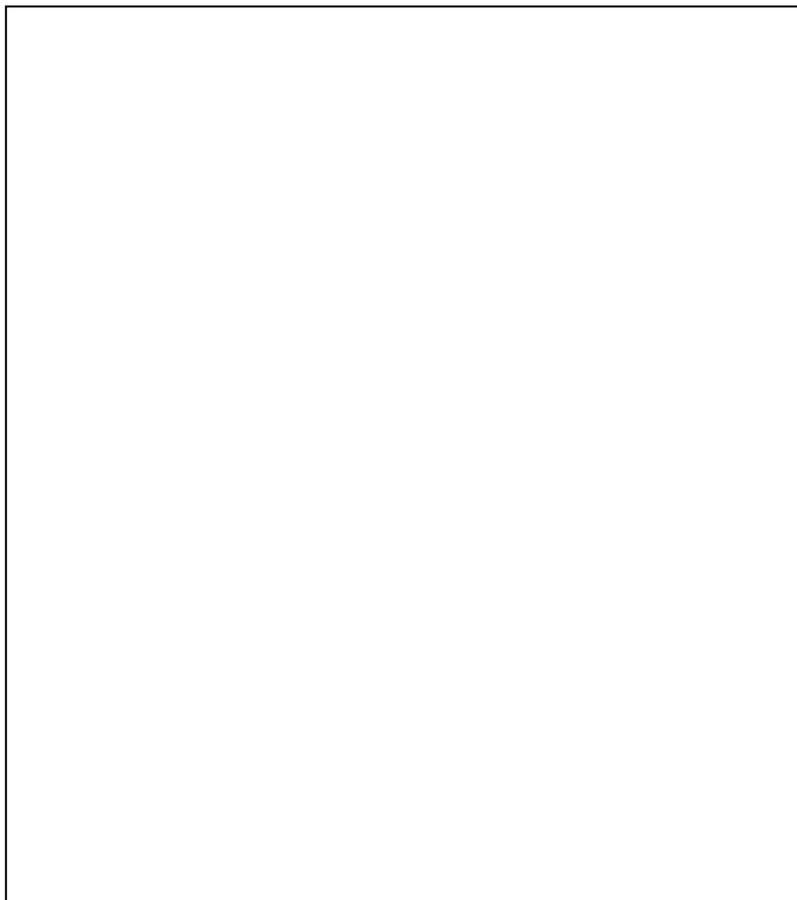


Figura 14: Detalhe dos jovens gametófitos de *Gelidium floridanum* observados através de um microscópio estereoscópio após 3 dias de exposição à radiação ultravioleta. **(a)** Observe os ramos com pigmentação vermelha característica das algas vermelhas. **(b,c)** Detalhe de um ramo mostrando a pigmentação vermelha. **(d)** Detalhe do processo de despigmentação, necrose parcial após a exposição à PAR + UVA + UVB. **(e,f)** Note a perda da coloração vermelha nos ramos após a exposição à radiação ultravioleta.

3.2 Pigmentos fotossintetizantes

A radiação UV afetou o conteúdo dos pigmentos fotossintéticos dos gametófitos jovens de *G. floridanum*. As quantidades de pigmentos

fotossintéticos são apresentadas na tabela 3. O conteúdo de clorofila *a* não foi significativamente diferente (ANOVA, $P = 0,078$) entre as plantas controle e plantas cultivadas com PAR + UVA + UVB. Por outro lado, após a exposição, as concentrações de ficobiliproteína (aloficocianina e ficoeritrina) na radiação ultravioleta foram reduzidas e apresentaram diferenças significativas entre o controle e as plantas expostas (análise de variância, $P < 0,0002$). No entanto, a quantidade de ficocianina não foi influenciada pelo tratamento com luz ultravioleta (ANOVA, $P = 0,2979$).

Tabela 3: Variações dos pigmentos fotossintéticos de gametófitos jovens de *Gelidium floridanum* após 3 dias de exposição à radiação ultravioleta ($n = 4$). Chl *a*: clorofila *a*; APC: aloficocianina; PC: ficocianina; PE: ficoeritrina.

Dados são apresentados em médias \pm DP. Letras indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.3 Carotenóides

As quantidades de carotenóides encontradas nas amostras de gametófitos jovens de *G. floridanum* cultivadas sob PAR e PAR + UVA + UVB foram determinadas por HPLC (Tabela 4). A análise cromatográfica permitiu a identificação de luteína, zeaxantina, trans- β -caroteno, e α -caroteno em ambos os tratamentos. Na análise de LC-MS-APPI revelou picos de íons de 551,40 m/z e 893,51m/z, referindo-se a luteína, zeaxantina e clorofila *a*, respectivamente. As concentrações de carotenóides diferiram significativamente entre controle e PAR + UVA + UVB (ANOVA, $p < 0,05$), com exceção da luteína. Em gametófitos jovens tratados, zeaxantina aumentou 39,59%, α -caroteno 95,39% e β -caroteno 64,89% em relação ao controle.

Tabela 4: Perfil HPLC de extratos de carotenóides de gametófitos jovens de *Gelidium floridanum* após 3 dias de exposição à radiação ultravioleta.

3.4 Microscopia de luz e análises histoquímicas

As secções transversais e longitudinais das amostras controle, de gametófitos jovens de *G. floridanum* submetidos ao TB, revelaram uma reação metacromática na parede celular, o que indica a presença de polissacáridos ácidos, tais como ágar (Fig. 15a- b). Quando corados com TB, as plantas tratadas de *G. floridanum* apresentaram reação metacromática e aumento na parede celular (Fig. 15c-d). Quando corados com CBB, as amostras controle apresentaram uma reação positiva, indicando a presença de numerosas organelas ricas em proteína (Fig. 15e- f). As plantas tratadas mostraram uma reação semelhante com conteúdo proteico na periferia e os grãos de amido no meio do citoplasma (Fig. 15g -h).

As amostras exibiram uma forte reação ao PAS, que sugere a presença de compostos de celulose na parede celular. Essa reação também ocorreu no citoplasma indicando a presença de polissacarídeos neutros, especialmente com muitos grãos de amido das florídeas, a principal substância de reserva de algas vermelhas (Fig. 15i-j). Através da reação de PAS, foi também possível detectar um aumento na densidade de grânulos de amido e de compostos celulósicos nas células expostas a PAR + UVA + UVB, quando comparado com o controle (Fig. 15k-l).

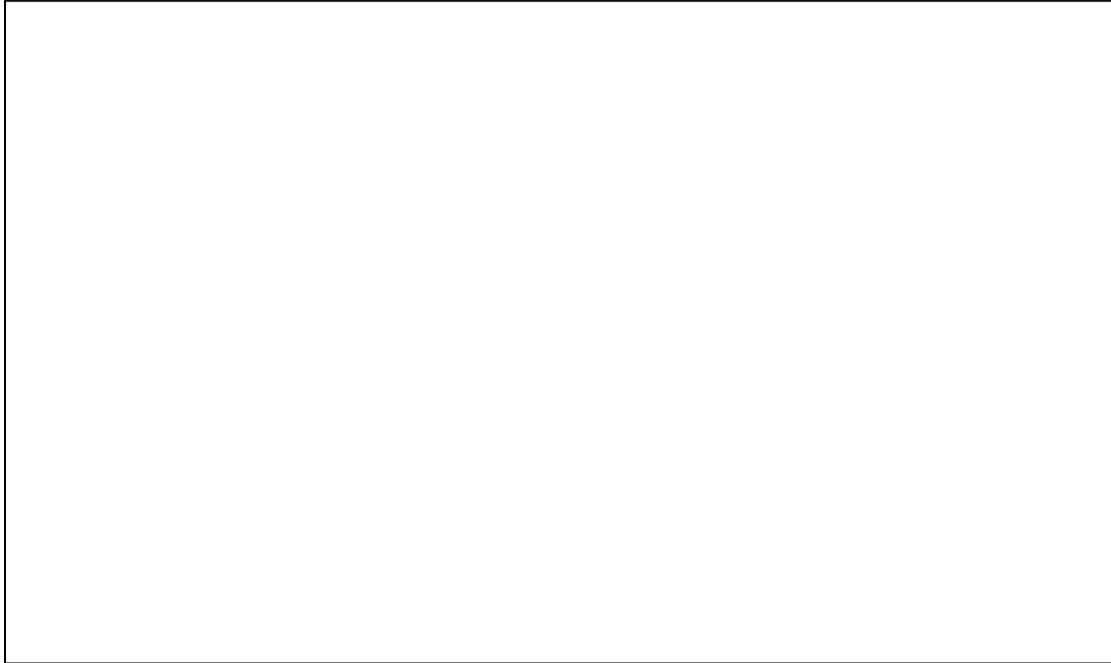


Figura 15: Microscopia de luz de secções transversais e longitudinais de jovens gametófitos de *Gelidium floridanum* após 3 dias de exposição à radiação ultravioleta. **(a-d)** Azul de toluidina (TB) indicando reação metacromática na parede celular no **(a,b)** controle e no **(c,d)** tratado (setas). **(e-h)** Azul brilhante de Comassie (CBB), com reação positiva no **(e,f)** controle e no **(g,h)** tratado, note a marcação mais periférica e na região central (cabeça de setas) sem conteúdo proteico. **(i-l)** Ácido periódico de Schiff (PAS), o **(i,j)** controle com leve reação positiva na parede celular (seta) e mais intensa no citoplasma, já no **(k,l)** tratado intensa reação na parede celular (setas) e no citoplasma (cabeça de seta). Escala: 25µm.

3.5 Observações em microscopia eletrônica de transmissão

As células corticais do gametófito jovem de *G. floridanum*, no controle, apresentaram um citoplasma mais denso com cloroplastos, corpos de Golgi e grãos de amido das florídeas (Fig. 16a). Estas células foram rodeadas por uma parede celular espessa (Fig. 16a- d). O cloroplasto assumiu a organização interna típica das algas vermelhas, onde um tilacóide periférico envolve os tilacóides paralelos (Fig. 16b,c). Estas células jovens mostraram intensa atividade com a presença de muitas mitocôndrias em associação com os cloroplastos e grãos de amido (Fig. 16d). Corpos de Golgi hipertróficos também foram observados (Fig. 16e) além de grande quantidade de ribossomos livres perto do núcleo o qual apresenta nucléolo (Fig. 16f).

No entanto, após três dias de exposição à PAR + UVA + UVB, *G. floridanum* apresentou alterações ultraestruturais, principalmente nos cloroplastos e um aumento na espessura da parede celular (Fig. 17a-f). As células corticais mostraram um contorno irregular e a parede celular tornou-se mais compacta em plantas irradiadas (Fig. 17b-c). Em muitas células, uma grande quantidade de vesículas, com conteúdo fibrilar, posicionadas para formar novas camadas de parede celular pode ser observada (Fig. 17d). Cloroplastos apresentaram mudanças na organização ultraestrutural com morfologia irregular e desorganização dos tilacóides (Fig. 17e). As células apresentaram um aumento na quantidade de grãos de amido das florídeas ocupando a região central do citoplasma (Fig. 17f), similar ao que foi observada por reação PAS.

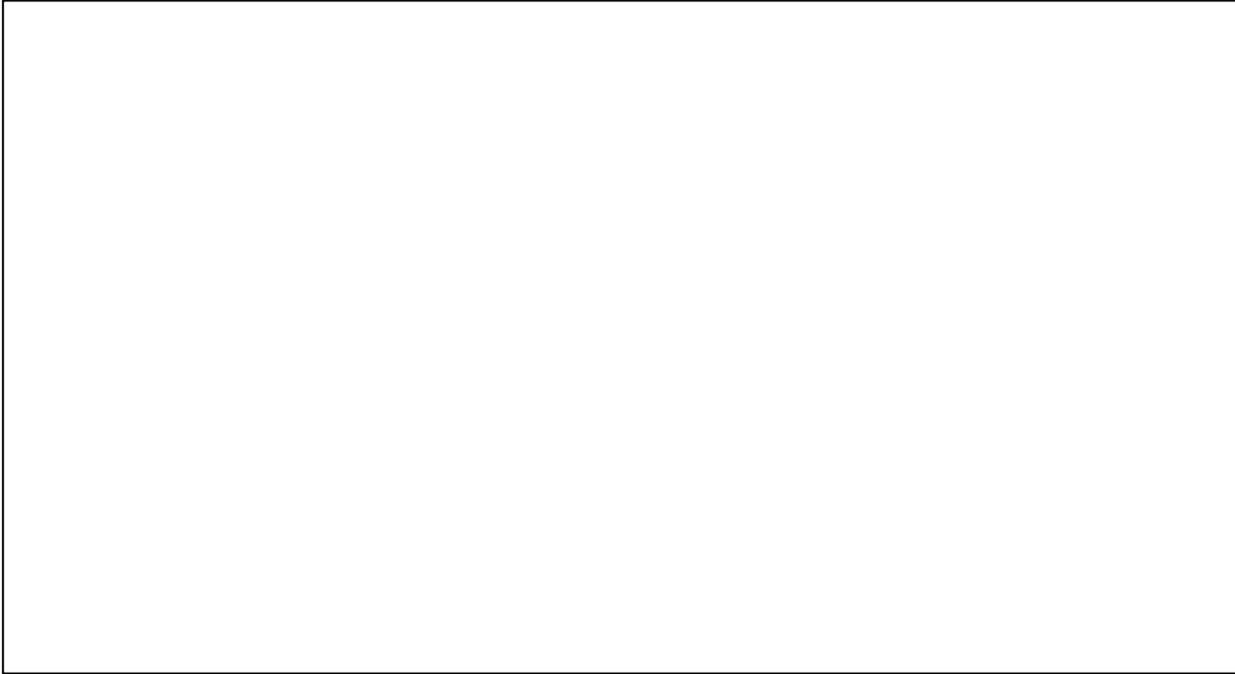


Figura 16: Microscopia eletrônica de transmissão de gametófitos jovens *Gelidium floridanum* do controle. **(a)** Detalhe das células corticais com parede celular espessa (PC), mostrando a presença de cloroplasto (C), grãos de amido (A) e corpos de Golgi (G). **(b-c)** Detalhe da parede celular espessa e cloroplastos com organização interna típica de algas vermelhas. **(d)** Note a associação do cloroplasto com mitocôndria (M) e grãos de amido. **(e)** Detalhe do corpo de Golgi hipertrófico. **(f)** Grande núcleo (N) com o nucléolo (Nu), e uma grande quantidade de ribossomos livres (R, setas).

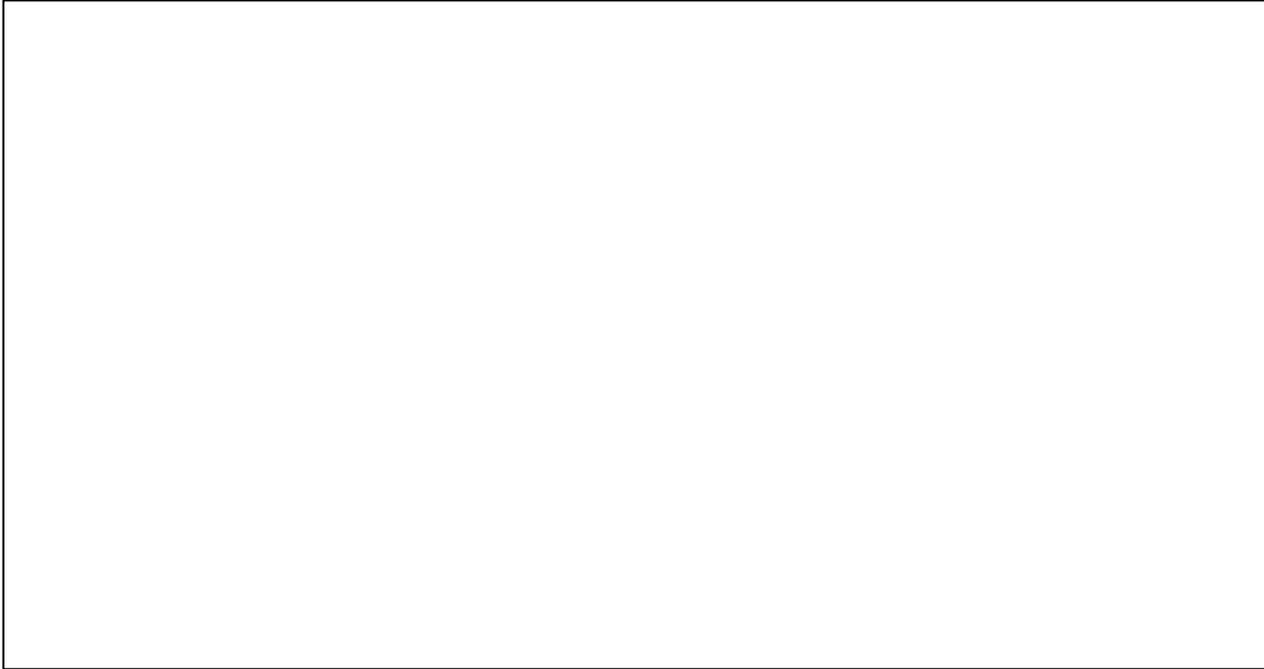


Figura 17: Microscopia eletrônica de transmissão de gametófitos jovens *Gelidium floridanum* após 3 dias de exposição à radiação ultravioleta. **(a)** As células corticais apresentam forma irregular e parede celular (PC) espessa. **(b-c)** Aumento da parede celular (seta) e com cloroplasto na periferia. **(d)** Observe as vesículas (setas) que formam novas camadas da parede celular. **(e,f)** Algumas células apresentaram cloroplastos desestruturados e grande quantidade de grãos de amido (A).

3.6 Fluorescência da clorofila *a*

Análises na curva PI (*Photosynthesis/Irradiance*) (Fig. 18) confirmou que a exposição à PAR+UVA+UVB de gametófitos jovens de *G. floridanum* causou diminuição na taxa de transporte de elétrons (ETR) após o período de exposição (Fig. 18a) e 24 h de recuperação (Fig. 18b). Após 24 h de recuperação, tanto o ETR do controle quanto do tratado, apresentaram aumento nas suas cinéticas. Os valores de ETR_{max} (Tab. 5) apresentaram diminuição de 44,71% nas amostras expostas a PAR+UVA+UVB comparada ao controle após os sete dias de exposição. Após a recuperação, tanto o controle quanto o tratado tiveram um aumento cerca de 32% nas ETR_{max} quando comparadas com o mesmo tratamento do período da exposição. Os valores de I_k (ponto de saturação luminosa) não apresentaram diferenças significativas, tendo valor médio de $160 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Tab. 5). Para a eficiência fotossintetizante (α) (Tab. 5), também observaram-se diferenças significativas durante a exposição a UVR e na recuperação de 24 h, com drástica diminuição nos valores de α quando comparado com seu respectivo controle, sendo a redução cerca de 55%.

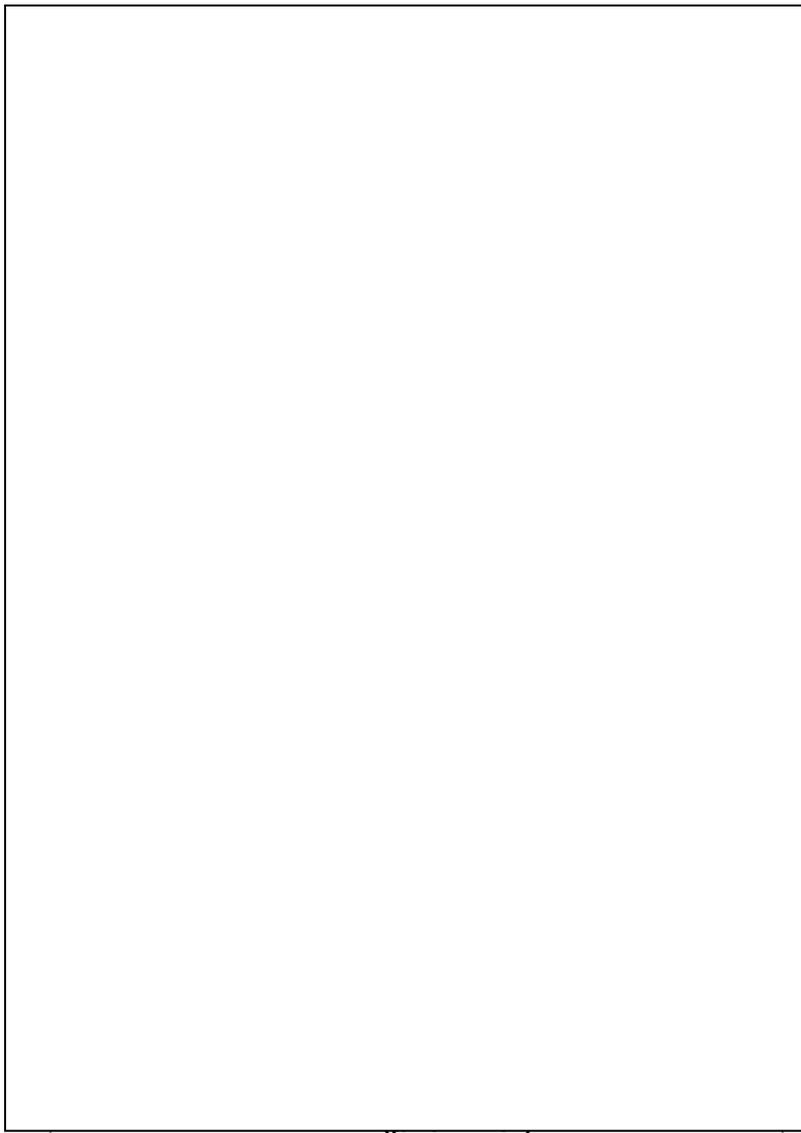


Figura 18: Curvas PI (ETR-PAR) de gametófitos jovens de *Gelidium floridanum* expostos durante três dias à radiação PAR+UVA+UVB e após 24 h de recuperação. **a.** Curva de PI após os três dias de exposição à radiação UV. **b.** Curva de PI após 24 h de recuperação em condição PAR controle. Letras distintas indicam as diferenças significativas de acordo com a ANOVA bifatorial e teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Tabela 5. Tabela com os parâmetros cinéticos da curva PI. ETRmax, taxa máxima de transporte de elétrons; Ik, ponto de saturação luminosa; α , alpha, eficiência fotossintetizante.

O rendimento quântico máximo (Fv/Fm) (Fig. 19) apresentou alterações significativas nas plantas tratadas com radiação UV, tanto para o período de exposição como o de recuperação, tendo no controle da exposição um rendimento médio de $0,341 \pm 0,074$ e as amostras expostas a PAR+UVA+UVB da exposição um decréscimo de 58,35% com valor médio de $0,124 \pm 0,031$. A recuperação da fotossíntese, 24 h após a exposição, mostrou aumento do Fv/Fm para ambos, controle e tratamento. Esta recuperação teve um aumento de 43% em PAR e 87% para PAR+UVA+UVB em relação ao seu respectivo controle no período da exposição.

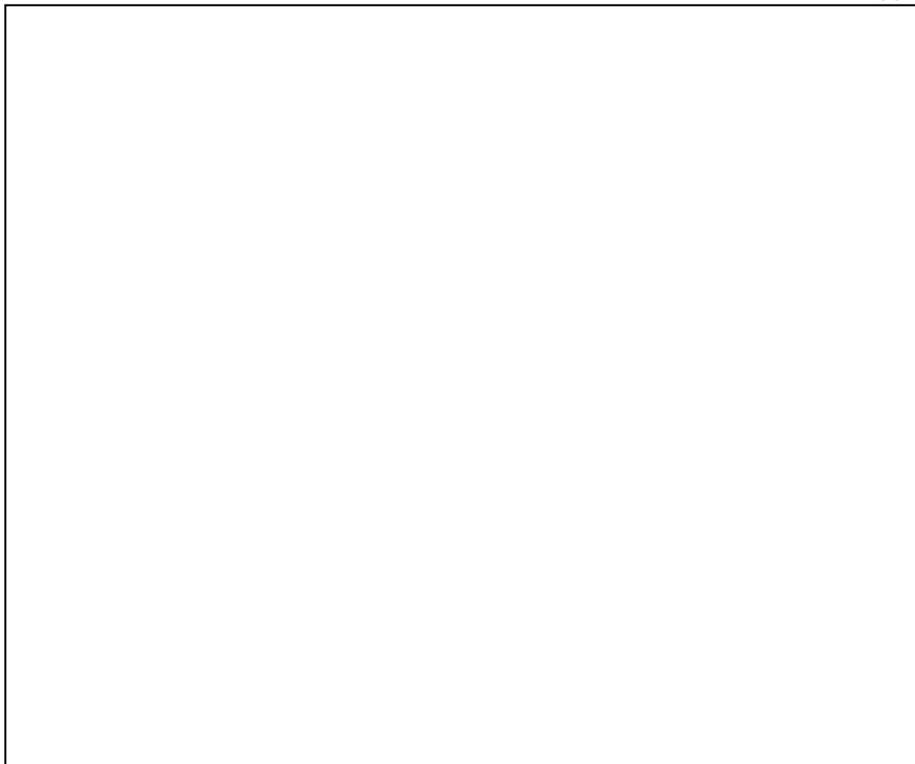


Figura 19: Rendimento quântico máximo (Fv/Fm) de gametófitos jovens de *Gelidium floridanum* expostos durante três dias à radiação PAR+UVA+UVB e após 24 h de recuperação. Letras indicam as diferenças significativas de acordo com a ANOVA bifatorial e teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

4. Discussão

Estudos sobre os efeitos do estresse da luz sobre macroalgas marinhas têm sido em grande parte restrita a fases da vida adulta. Vários relatos indicam que tecidos jovens podem ser mais suscetíveis a estas perturbações (Coelho *et al.*, 2000). Gametófitos jovens de *G. floridanum* mostraram significativa sensibilidade a exposição à radiação UV, com alterações na taxa de crescimento, na morfologia geral, nos conteúdos de ficobiliproteínas e amido, na organização celular e desempenho fotossintético.

A taxa de crescimento de gametófitos jovens de *G. floridanum* foi mais afetada pela RUV do que talos adultos expostos ao PAR + UVA + UVB, observados para a mesma espécie expostas a PAR + UVB por Schmidt *et al.* (2012b). Porém, menores do que o observado por Scariot *et al.* (2013) em gametófitos nas fases iniciais de

desenvolvimento expostos somente a radiação PAR+UVB. A redução da taxa de crescimento tem sido atribuída ao uso de energia para a ativação de mecanismos de defesa e reparações induzidas para a condição de fotodano (Schmidt *et al.* 2010a; 2010c; 2012a).

No desenvolvimento de tetrásporos de *G. floridanum* a fixação e germinação também foi afetada pela radiação UV (Scariot *et al.*, 2013), evidenciando a maior susceptibilidade nos estágios iniciais de desenvolvimento. Na germinação de esporos de *Porphyra haitanensis*, foram observados efeitos negativos significativos da radiação UVB sobre o crescimento e divisão celular, retardando a formação de novas plântulas, já a UVA teve um efeito positivo sobre a morfogênese, aumentando a formação de novas plântulas apresentando células com intensa divisão celular (Jiang *et al.*, 2007). Como foi observado em macroalgas, cada estágio (esporos, plântula, jovem e talo adulto) responde de forma diferente ao estresse ambiental e mostra aumento da tolerância ao estresse com a idade, já que os indivíduos tornam-se mais diferenciados e desenvolvem diferentes mecanismos de defesa (Dring *et al.*, 1996; Forster & Franklin, 1997; Coelho *et al.*, 2000). Por exemplo, Roleda *et al.* (2009) observaram uma maior sensibilidade a RUV em propágulos de *Urospora penicilliformis* quando comparado aos estágios adultos e Jiang *et al.* (2007) também coloca que os esporos germinados de *P. haitanensis* são mais sensíveis à radiação UVB do que as plantas juvenis. Portanto, os resultados do desenvolvimento e crescimento de gametófitos jovens de *G. floridanum*, podem sugerir que o tratamento UVA+PAR + UVB é um fator limitante da taxa de crescimento.

Em algas pardas, Altamirano *et al.* (2003a) descreveu que a radiação UV pode causar danos no DNA de zigotos de *Fucus* sp. de uma forma menos grave do que nos zoósporos. A informação genética diplóide pode significar uma defesa contra danos ao DNA em zigotos em comparação com zoósporos haplóides. A hipótese para o último é que os danos num organismo haplóide podem ser expressos no fenótipo de uma forma mais grave do que, num organismo diplóide. Segundo Altamirano *et al.* (2003b), os efeitos nocivos da radiação UVB em estágios microscópicos de macroalgas podem ter diferentes implicações de acordo com a geração, assexuada ou sexuada.

Quando expostas a PAR + UVA + UVB, a parede celular dos gametófitos jovens de *G. floridanum* apresentaram alterações e aumento da espessura, quando analisada sob MET e na ML quando submetido a histoquímica com TB. O aumento da espessura da parede da célula de gametófitos jovens de *G. floridanum* expostos à radiação ultravioleta pode ser interpretado como um mecanismo de defesa física contra a

exposição à RUV, um espessamento da parede reduz a penetração de radiação UV na célula. Resultados similares, como espessamento da parede celular, também foram observados em *Gracilaria domingensis* (Schmidt *et al.*, 2010c), *Chondracanthus teedei* (Schmidt *et al.*, 2012c) e *Hypnea musciformis* (Schmidt *et al.*, 2012a). De acordo com Schmidt *et al.* (2012c), é provável que a atividade dos corpos de Golgi seja mais intensa nas plantas expostas ao UVR o que resultaria na grande produção de vesículas com conteúdo fibrilar que, em seguida, serão secretadas e incorporadas na matriz da parede celular. Staxén e Borman (1994) relataram que os microtúbulos estão envolvidos na deposição de microfibrilas de parede celular e que estes são despolimerizados quando irradiados por UVB alterando o formato.

Nas amostras tratadas, o material de reserva extra plastidial, os grãos de amido das florídeas, foram visualizados através das análises de microscopia de luz, quando submetidos a reação de PAS, em maior quantidade que nas amostras controle. Esse resultado corrobora com os encontrados nas agarófitas *G. dominguensis* (Schmidt *et al.*, 2010c) em talos adultos de *G. floridanum* (Schmidt *et al.*, 2012b) e *Gracilaria birdiae* (Ayres, 2009). Segundo Malanga (1997), este aumento provavelmente ocorre devido à incapacidade das células em mobilizar estes grãos, como uma consequência das alterações das membranas dos tilacóides dos cloroplastos, modificando a sua permeabilidade e atividade enzimática com danos ao processo fotossintético. É presumível que a energia resultante de processos fotossintéticos em gametófitos jovens de *G. floridanum* do controle seja utilizada para gerar novas células, entretanto, já nos tratados esta energia fica acumulada sob a forma de grãos de amido resultando numa redução da taxa de crescimento.

Neste estudo, através da microscopia de luz, tanto nas células corticais quanto medulares, pode-se observar que estes grãos de amido se encontravam na região central do citoplasma e o conteúdo proteico, visualizado pela reação de CBB, se localizava na periferia das células. Com este método histoquímico, não foi visualizado nenhuma alteração na quantidade das proteínas nas amostras tratadas em relação ao controle. Em outras espécies como a *K. alvarezii* (Schmidt *et al.*, 2010a) e *C. teedei* (Schmidt *et al.*, 2012c), utilizando a mesma técnica, observaram uma intensa reação, indicando aumento no conteúdo protéico após a radiação UV.

Nos cloroplastos dos gametófitos jovens expostos a PAR + UVA + UVB alterações na organização do sistema de tilacóides foram observadas. Alguns estudos relatam que em algas vermelhas expostas a

radiação UV, alterações ultraestruturais em cloroplastos, se apresenta como uma dilatação e desorganização da tilacóides, além da formação de vesículas translúcidas entre os mesmos. Dentre as espécies destacam-se *Palmaria palmata*, *Palmaria decipiens*, *Bangia atropurpurea* (Poppe *et al.*, 2003), *K. alvarezii* (Schmidt *et al.*, 2009), *G. domingensis* (Schmidt *et al.*, 2010c), *C. teedei* (Schmidt *et al.*, 2012c), *H. musciformis* (Schmidt *et al.*, 2012a), *G. floridanum* (Schmidt *et al.*, 2012b), e *Porphyra acanthophora* var. *brasiliensis* (Bouzon *et al.*, 2012a).

Em relação aos pigmentos fotossintetizantes, a clorofila *a* mostrou mais resistência após exposição à PAR + UVA + UVB nos gametófitos jovens de *G. floridanum*, corroborando com o observado nas análises de microscopia de luz, onde as amostras tratadas mostraram uma coloração verde (Figs. 1d-e). O mesmo resultado foi observado com o teor de clorofila no talo adulto de *G. floridanum* (Schmidt *et al.* 2012b) e com *H. musciformis* (Schmidt *et al.*, 2012a). Alguns estudos com algas vermelhas têm mostrado em geral, um decréscimo no teor de clorofila após a exposição à radiação ultravioleta, incluindo, por exemplo, *K. alvarezii* (Eswaram *et al.*, 2001, Schmidt *et al.*, 2010b). No entanto, outras investigações com diferentes algas vermelhas demonstraram que a radiação ultravioleta estimulou a síntese de clorofila *a*, tais como as linhagens verde e vermelha de *K. alvarezii* (Schmidt *et al.*, 2010a), *M. stellatus* e *C. crispus* (Roleda *et al.*, 2004).

Os níveis de ficobiliproteínas (APC e PE) em gametófitos jovens de *G. floridanum* diminuíram após a exposição PAR + UVA + UVB. Esta redução na ficobiliproteínas pode estar relacionada com o processo de branqueamento e de despigmentação nas pontas dos ramos observados nas plantas tratadas. Além disso, no presente estudo, os gametófitos jovens de *G. floridanum* mostraram que a aloficocianina e ficoeritrina foram as ficobiliproteínas que sofreram a maior redução na concentração, sendo a diminuição da ficoeritrina de 48,6% , seguido por 39,5% em aloficocianina. Segundo Eswaram *et al.* (2002), a ficoeritrina é o primeiro pigmento afetado pela radiação UV, seguido de ficocianina, aloficocianina, os carotenóides e, finalmente clorofila *a*, é a mais resistente. Os efeitos nocivos da radiação UV sobre os pigmentos são dependentes dos comprimentos de onda da radiação UV e do tempo de exposição (Huovinen *et al.*, 2006). Os pigmentos à base de proteínas, em particular, as ficobiliproteínas, absorvem radiação UV e são facilmente danificadas (Hader *et al.*, 2004). O excesso de energia de excitação pode resultar na degradação de proteínas e perda de atividades enzimáticas específicas ou outras funções biológicas. Uma vez que os

ficobilissomos são estruturas que contêm ficobiliproteínas e estão localizados externamente aos tilacóides, são pontos-chave de danos da radiação UV (Lao & Glazer, 1996). Estudos com a cianobactéria *Spirulina platensis* confirmou que os ficobilissomos são um alvo primário da radiação UVB, induzindo a um dano no aparelho fotossintético (Rajagopal *et al.*, 2000). A radiação UVB induz a redução do número de ficobilissomos por célula em cianobactérias (Araoz & Hader, 1997).

Entre os vários processos fisiológicos, a fotossíntese é potencialmente o principal alvo da radiação UV devido a uma multiplicidade de possíveis efeitos (Holzinger e Lutz, 2006; Pessoa, 2012). A fotoinibição dos parâmetros fotossintéticos foi observada em gametófitos jovens *G. floridanum* expostos à PAR + UVA + UVB. Hanel *et al.* (2006) e Pessoa (2012) relataram que fotoinibição ocorre quando o mecanismo de fotoproteção não consegue mitigar a fotoinativação. Isso acontece quando o dano às proteínas no centro de reação excede a capacidade do PSII para ativar mecanismos de fotoreparação. Esta fotoinibição também foi observada nos talos adultos de *G. floridanum* (Schmidt *et al.*, 2012b). De acordo com Holzinger *et al.* (2004), a eficiência fotoquímica do PSII em *Palmaria palmata* e *Odonthalia dentate* caiu drasticamente para cerca de um terço do seu valor inicial sob UV (Irradiância - 4.7 W m^{-2} UVA e 0.20 W m^{-2} UV-B). Na medida em que ocorre um aumento da radiação UVB aumenta a dificuldade de se estabelecer um gradiente de prótons através da membrana do tilacóide e as reações fotossintéticas decaem (Poppe *et al.*, 2002).

Para o rendimento quântico máximo (Fv/Fm) de gametófitos jovens de *G. floridanum* ocorreu uma redução de 58,57% após a exposição PAR + UVA + UVB. Gomez & Figueroa (1998) observaram que *Gelidium latifolium* e *Gelidium sesquipedale*, expostos à radiação solar durante 3 h, apresentaram fotoinibição da Fv/Fm, especialmente em *Gelidium sesquipedale*. Nesta espécie, nos tratamentos PAR + UVA e PAR + UVA + UVB, os valores de Fv/Fm reduziram entre 30 e 35 % em relação ao controle. Xu e Gao (2010) mostraram que, durante o período do meio-dia, tanto a UVA como UVB, resulta no decréscimo do rendimento quântico máximo (Fv/Fm).

Já para análise da recuperação, os gametófitos jovens de *G. floridanum*, depois de 24 h tiveram uma eficiência de 87% em Fv/Fm. Estes resultados indicam que nesta fase precoce de desenvolvimento, os gametófitos jovens apresentam uma rápida recuperação quando comparado com talo adulto (Schmidt *et al.*, 2012b). Segundo Figueroa

& Gomez (2001) a cinética de recuperação fornece informações sobre as estratégias foto-adaptativas das macroalgas e sua capacidade de tolerância ao estresse da luz. A elevada capacidade de recuperação pode ser explicada pela “fotoinibição dinâmica”, que consiste de uma diminuição na regulação do aparelho fotossintético associado a um excesso de dissipação de energia absorvida (geralmente na forma de calor), ou seja, um mecanismo fotoprotetor permitindo a recuperação de atividade fotossintética quando o excesso de energia radiante é removido (Gomez & Figueroa, 1998). Em estudos com *G. latifolium* e *G. sesquipedale*, Gómez & Figueroa (1998) concluíram que *G. sesquipedale* foi muito mais sensível ao estresse do que *G. latifolium* que não apresentaram recuperação após 24 h, sugerindo fotoinibição e/ou fotodano crônico para a espécie. O mesmo autor define fotoinibição crônica como um mecanismo de recuperação e reparação que pode levar várias horas ou dias para se recuperar.

A alta recuperação após exposição à radiação UV também pode ser explicada pela ação de fotoprotetores de UV como aminoácidos do tipo micosporinas (MAAs) que são utilizados para a fotoproteção contra os efeitos deletérios UV, devido à sua ampla gama espectral de proteção e fotoestabilidade, bem como as suas propriedades antioxidantes (De La Coba *et al.*, 2009). De La Coba *et al.*, (2009) descreveram que um protetor solar não deve apenas ser eficiente na absorção de comprimentos de onda da radiação UV impedindo sua citotoxicidade e formação de ROS (espécies oxigênio reativas), mas também ser eficiente na dissipação da energia absorvida, sem transferi-la para biomoléculas sensíveis.

Neste trabalho não foi analisada as MAAs, mas os gametófitos jovens de *G. floridanum* apresentaram um aumento de 58,7% no teor de carotenóides, sugerindo que o tratamento induziu a produção de antioxidantes para a ativação da defesa da célula e proteção ao aparato fotossintetizante. Este resultado pode estar relacionado com a quantidade de nitrogênio (N) presente no meio, uma vez que a troca de meio de cultura foi realizada no primeiro dia de exposição e a análise de carotenóides foi ao terceiro dia. Barufi *et al.* (2011) sugerem um alto potencial de aclimação e fotoproteção contra fatores de estresse (incluindo alta PAR e UVR) diretamente relacionados com a disponibilidade de N. Segundo os autores, em *Gracilaria tenuistipitata* cultivadas sob condições controladas de laboratório, a capacidade de acumular grandes quantidades de MAAs (composto N), e outros compostos não-N, tais como os carotenóides, são diretamente proporcionais à concentração de nitratos no meio. Korbee *et al.* (2010),

num estudo com *Heterocapsa* sp., concluíram também que não só a acumulação de MAAs, mas também a disponibilidade de N é muito importante para determinar a capacidade fotoprotetora contra RUV.

Finalmente concluiu-se que a exposição PAR+ UVA + UVB afeta negativamente os gametófitos jovens da macroalga vermelha *Gelidium floridanum*. Isto se tornou evidente após 3 h de exposição diária ao PAR+UVA+UVB durante 3 dias de tratamento experimental, resultando em danos ultra-estruturais observados como desorganização interna dos cloroplastos, aumento da espessura da parede celular e alterações na morfologia do talo. Além disso, essa exposição causou fotodanos e fotoinibição dos pigmentos fotossintéticos, resultando em uma diminuição da eficiência fotossintética e diminuição nas taxas de crescimento. No entanto, nesta fase de desenvolvimento, os gametófitos jovens de *G. floridanum* expostos PAR+UVA+UVB apresentaram leve sensibilidade quando comparado com os seus estágios adultos, corroborando com a recuperação do desempenho fotossintético após 24 h sem radiação UV.

CAPÍTULO V

Efeitos do cádmio sobre gametófitos jovens de *Gelidium floridanum*: alterações metabólicas e morfológicas

1. Introdução

A contaminação dos ambientes aquáticos por metais pesados é um problema ambiental em todo o mundo, devido aos seus efeitos tóxicos e de acumulação através da cadeia alimentar (Li *et al.*, 2014). Dada a toxicidade, persistência e natureza não degradáveis dos metais pesados no ambiente, a contaminação por metais representa um dos maiores riscos ecológicos para os ecossistemas marinhos (Pekey, 2006).

O cádmio (Cd) é um metal pesado bivalente altamente tóxico, com presença de ampla disseminação no solo e ambientes aquáticos devido a diferentes atividades antrópicas (Andosch *et al.*, 2012). Poluição de Cd surge, em particular, do aumento da eliminação de componentes eletrônicos em países industrializados e representa uma grave ameaça para a saúde humana, sendo introduzido na cadeia alimentar através da acumulação pelas plantas (Templeton & Liu, 2010). Absorção de Cd, tanto em plantas terrestres e aquáticas, é facilitada pela sua elevada solubilidade em água e pelas suas semelhanças físicas com os cátions essenciais, tais como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} e Ca^{2+} , o que permite a utilização dos respectivos transportadores para absorção química de Cd (Daud *et al.*, 2009; Verbruggen *et al.*, 2009).

Em plantas, o uso do metal Cd resultou numa variedade de efeitos adversos, tais como a supressão da atividade mitótica, divisão celular, inibição do crescimento, desintegração da estrutura do cloroplasto e perturbação da composição da parede celular (Vecchia *et al.*, 2005; Kuthanova *et al.*, 2008; Daud *et al.*, 2009).

Aclimação de algas em metais pesados induz a um estresse oxidativo, o qual envolve um complexo enzimático e sistema antioxidante, que funciona de uma forma coordenada na tentativa de minimizar a osmolaridade celular e o desequilíbrio de íons (Collen *et al.*, 2003; Ratkevicius *et al.*, 2003; Malea *et al.*, 2006; Wu & Lee, 2008). Em macroalgas, foram observados efeitos, como a diminuição das taxas de crescimento (Mamboya *et al.*, 1999; Bouzon *et al.*, 2012b; Santos *et al.*, 2012), alterações nos pigmentos fotossintéticos (Rochetta *et al.*, 2012) e, conseqüentemente uma diminuição do desempenho fotossintético e taxa relativa de transporte de elétrons (Mamboya *et al.*,

1999; Santos *et al.*, 2012). Também alguns estudos têm demonstrado alterações na ultraestrutura de algas vermelhas como *Hypnea musciformis* (Bouzon *et al.*, 2012b) e *Gracilaria domingensis* (Santos *et al.*, 2013), de algas verdes *Ulva intestinalis* e *Ulva laetevirens* (Vecchia *et al.*, 2012) e de algas pardas *Sargassum pallidum* (Li *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, pesquisadores têm focado sua atenção nas macroalgas, pois algumas espécies podem acumular altas concentrações de metais pesados em ecossistemas contaminados, e, como resultado, eles são escolhidos como biomonitores de metais nas zonas costeiras (Li *et al.*, 2014). Os estudos têm focado na determinação, acumulação, bioabsorção e monitoramento de metais pesados em algas marinhas (Engdahl *et al.*, 1998; Haritonidis & Malea, 1999; Villares *et al.*, 2002; Astorga - España *et al.*, 2008; Andrade *et al.*, 2010).

A eliminação incorreta de produtos que contêm metais, como o Cd, em águas tem aumentado com a ação antrópica e crescente desenvolvimento industrial, gerando efeitos sobre os organismos que ainda são desconhecidos. Neste trabalho, tendo em conta a importância das macroalgas como produtores primários e como indicador de poluição, bem como a falta de informações sobre as alterações estruturais e fisiológicas, em especial a falta de informação sobre os efeitos dos metais durante o desenvolvimento, fizemos um estudo sobre os efeitos do Cd em gametófitos jovens de *Gelidium floridanum*.

Gelidium floridanum W.R Taylor é uma macroalga vermelha (Rhodophyta, Gelidiales) distribuídos ao longo da costa brasileira a partir do Estado do Espírito Santo (20°19'10"S e 40 ° 20'16"W), até o Rio Grande do Sul (32°02'06"S e 52°05'55"W), Brasil. Na praia da Ponta do Sambaqui (27°29'18.8"S e 48°32'12.9"W), (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil), *G. floridanum* frequentemente cresce entre as rochas na zona intertidal (Schmidt *et al.*, 2012b). Esta espécie tem grande importância como uma fonte de extração de ágar em todo o mundo e é utilizado em diversos produtos com propriedades de gelificação (Bouzon *et al.*, 2006). Estudos anteriores, usando metais no talo adulto de *G. floridanum* mostraram que Cd, Cu e Pb é tóxico para esta espécie, induzindo a uma série de mudanças na bioabsorção, taxa de crescimento, pigmentos e flavonóides, danos ao aparato fotossintético e alterações ultraestruturais (Santos *et al.*, 2014). Assim, neste estudo, investigamos o efeito *in vitro* de Cd em gametófito jovens de *G. floridanum*, e perguntamos se: 1) o Cd altera a morfologia e estrutura dos cloroplastos? e 2) a exposição dos gametófitos jovens de *G. floridanum* ao Cd pode causar diferenças nas taxas de crescimento, teores de pigmentos fotossintéticos e eficiência fotossintética?

2. Material e métodos

A coleta do material e as condições de cultura foram realizadas conforme item 2.1 e 2.2 do capítulo IV.

2.1 Desenho experimental

Um experimento inicial com gametófitos jovens de *G. floridanum* foi realizado através do crescimento das algas ($\pm 1,0$ g) em frascos de 250 ml de Erlenmeyer contendo concentrações de Cd 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, e 25 μM e nas mesmas condições de cultura descritas acima. O efeito de Cd no crescimento de algas foi expressa como a concentração efetiva dando redução de 50% (EC 50) durante 7 dias em comparação com as amostras controle. Os indivíduos expostos nas concentrações acima de 15 μM de cádmio apresentaram redução nas taxas de crescimento, branqueamento e despigmentação. Portanto, estas concentrações letais não foram utilizadas para o experimento posterior.

2.2 Experimentos com Cádmio

No laboratório, foram selecionados gametófitos jovens de *G. floridanum* ($\pm 1,0$ g) e cultivadas durante 7 dias em béquers com 250 mL de água do mar esterilizada com VSES/2 (sem EDTA, ácido tetraacético de etilenodiamina) em 30 ups. Condições da sala de cultura foram de 24°C, aeração contínua, a radiação fotossinteticamente ativa (PAR) em 60 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (lâmpadas fluorescentes Philips C- 5 Super 84 16W/840, Brasil, com um medidor de luz Li -Cor 250; LICOR Biosciences, Lincoln, NE, EUA) e fotoperíodo de 12h (a partir das 8h). As plantas controle (sem Cd) foram cultivadas como descrito acima, e para as plantas tratadas, CdCl_2 (Cloreto de Cádmio) foi adicionado em concentrações graduadas de 7,5 e 15 μM no meio de cultura durante um tratamento de sete dias. Quatro repetições foram feitas para cada grupo experimental.

Após o experimento foram realizadas as seguintes análises: taxas de crescimento (item 2.4, capítulo VI), pigmentos fotossintetizantes (item 2.5, capítulo VI), ML e reações histoquímicas (item 2.7 e 2.8, capítulo VI), microscopia confocal de varredura a laser (item 2.5, capítulo III), fluorescência da clorofila *a in vivo* (item 2.10,

capítulo VI), microscopia eletrônica de varredura (MEV)(abaixo) e análise dos dados (item 2.11, capítulo VI)

2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para observações no MEV amostras de aproximadamente 5 mm de comprimento foram fixadas com glutaraldeído a 2.5% em tampão cacodilato de sódio a 0.1 M (pH 7.2) (Schmidt *et al.*, 2009). O material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol, após as amostras foram secas com o ponto crítico EM-DPC-030 (Leica, Heidelberg, Alemanha), e, em seguida, revestidas com ouro antes da análise. As amostras foram examinadas no MEV JSM 6390 LV (JEOL Ltd., de Tóquio, Japão, em 10 kV). As análises das moléculas presentes na parede celular, foram feitas no MEV acoplado a um espectrômetro de raios-X de energia dispersiva (SEM-EDX) em amostras não revestidas com ouro.

3. Resultados

3.1 Morfologia e taxa de crescimento

Após 7 dias em cultura, gametófitos jovens de *Gelidium floridanum* mostraram diferenças estatísticas (ANOVA, $P \leq 0.003$) nas TCs entre controle e gametófitos jovens cultivados com diferentes concentrações de Cd (7,5 μM e 15 μM). Plantas controle mostraram um aumento das TCs de 17% dia, com aumento da formação de novos filamentos e talos cilíndricos (Fig. 20a), cada um deles apresentando uma célula apical (Fig. 20b) e formados por células com coloração avermelhada característica da espécie (Fig. 20c,d). Após o período de tratamento, plantas com 7,5 μM Cd já mostraram redução nas taxas de crescimento (5,5% dia), formação de poucos talos (Fig. 19e), com célula apical (Fig. 20f) e células da região do talo (Fig. 20g,h) apresentando uma leve despigmentação quando comparada ao controle. Já no tratamento de 15 μM Cd a taxa de crescimento foi de 4,8% dia, as plantas apresentaram poucos talos com regiões totalmente despigmentadas (Fig. 20i), as células apicais não apresentaram alterações na morfologia em relação ao tratamento de 7,5 μM Cd (Fig.20j), mas as regiões despigmentadas mostraram células totalmente esverdeadas (Fig. 20k,l).



Figura 20: Detalhe de gametófitos jovens de *Gelidium floridanum* observados através da microscopia de luz após 7 dias de tratamento de cádmio. **(a)** Formação de talos filamentosos e cilíndricos **(b)** Célula apical. **(c)** Ramos com pigmentação vermelha característica da espécie. **(d)** Detalhe das células do talo. **(e)** Formação de poucos talos após o tratamento. Células apicais **(f)** e células da região do talo **(g, h)**, mostrando despigmentação. **(i)** Detalhe do talo com região despigmentada. **(j)** Célula apical. **(k,l)** Detalhe das células totalmente esverdeadas.

3.2 Observações através do Microscópio de varredura a laser confocal Amostras de gametófitos jovens de *G. floridanum* do controle apresentaram intensa autofluorescência do cloroplasto, estando estes localizados por toda a periferia das células (Fig. 21a). Nas amostras tratadas com 7,5 μM de Cd, os cloroplastos foram visualizados em uma fina camada na periferia das células e ocorreu uma redução na sua autofluorescência (Fig. 21b). Além disso, neste tratamento já foi

possível observar ausência de autofluorescência em algumas células (Fig. 21b). Para as amostras tratadas com 15 μM de Cd a redução da autofluorescência dos cloroplastos foi ainda maior (Fig. 21c).

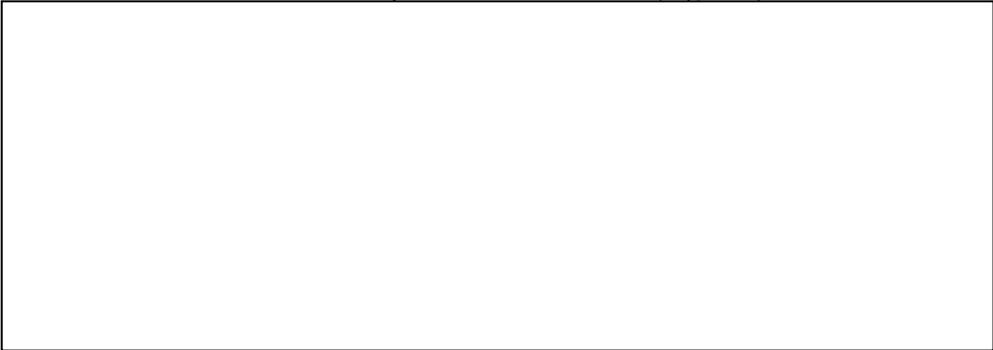


Figure 21: Microscopia Confocal de gametófitos jovens de *Gelidium floridanum* após 7 dias de tratamento de cádmio. **(a)** Amostras controle com autofluorescência e estrutura robusta dos cloroplastos localizados na periferia celular. **(b)** Amostras tratadas com 7,5 μM Cd, com diminuição da estrutura e autofluorescência dos cloroplastos. Note regiões sem autofluorescência dos cloroplastos (setas). **(c)** Amostras tratadas com 15 μM Cd apresentando redução da autofluorescência.

3.3 Microscopia de luz (ML) e análises histoquímicas

As secções longitudinais dos gametófitos jovens de *G. floridanum* do controle submetidas ao PAS exibiram uma forte reação na parede celular, o que sugere a presença de compostos de celulose na parede celular; essa reação também ocorreu no citoplasma pela presença de polissacarídeos neutros, especialmente com muitos grãos de amido das florídeas, a principal substância de reserva das algas vermelhas (Fig. 22a-c). Nas amostras controle, a presença dos grãos de amido das florídeas ocorreu nas células corticais e subcorticais (Fig. 22a). No tratamento de 7,5 μM de Cd houve um aumento desses grãos de amido nas células corticais e subcorticais (Fig. 22b). Já nas amostras do tratamento com 15 μM de Cd, a presença é ainda maior desses grãos e estes se encontram principalmente nas células medulares (Fig. 22c). No que diz respeito aos compostos de celulose também foi possível visualizar um aumento destes compostos na parede das células das amostras dos tratamentos (Fig. 22b,c).

Quando submetidos à reação histoquímica de CBB, as amostras evidenciaram uma reação positiva, indicando a presença de inúmeras organelas ricas em proteínas (Fig. 22d-f). As amostras controle apresentaram um conteúdo protéico distribuído regularmente pela periferia da célula (Fig. 22d). O tratamento com 7,5 μM de Cd, as

amostras começaram a não ter um padrão de distribuição organizada do teor de proteínas (Fig. 22e), e tratamento com 15 μM de Cd mostrou células com material proteico totalmente disperso no citoplasma (Fig. 22f).

3.4 Pigmentos fotossintetizantes

O Cd afetou o conteúdo de alguns pigmentos fotossintéticos de gametófitos jovens de *G. floridanum*. As quantidades dos pigmentos fotossintéticos são mostradas na Tabela 6. A análise apresentou uma diminuição de 40,40% de clorofila em amostras com 7,5 μM de Cd e de 52,58% em amostras tratadas com 15 μM de Cd em comparação com o controle. Depois de 24 h de recuperação, onde a água do mar foi enriquecida com 50% de von Stosch (VS/ 2), o controle e as amostras tratadas mostraram um aumento na quantidade de clorofila. Em relação às concentrações de ficobiliproteínas (aloficocianina e ficoeritrina) ocorreu uma redução com diferenças significativas entre as amostras controle e amostras tratadas com cádmio, mas depois de 24 h de recuperação, as amostras não apresentaram aumento destes pigmentos. A análise não detectou a concentração de ficocianina.

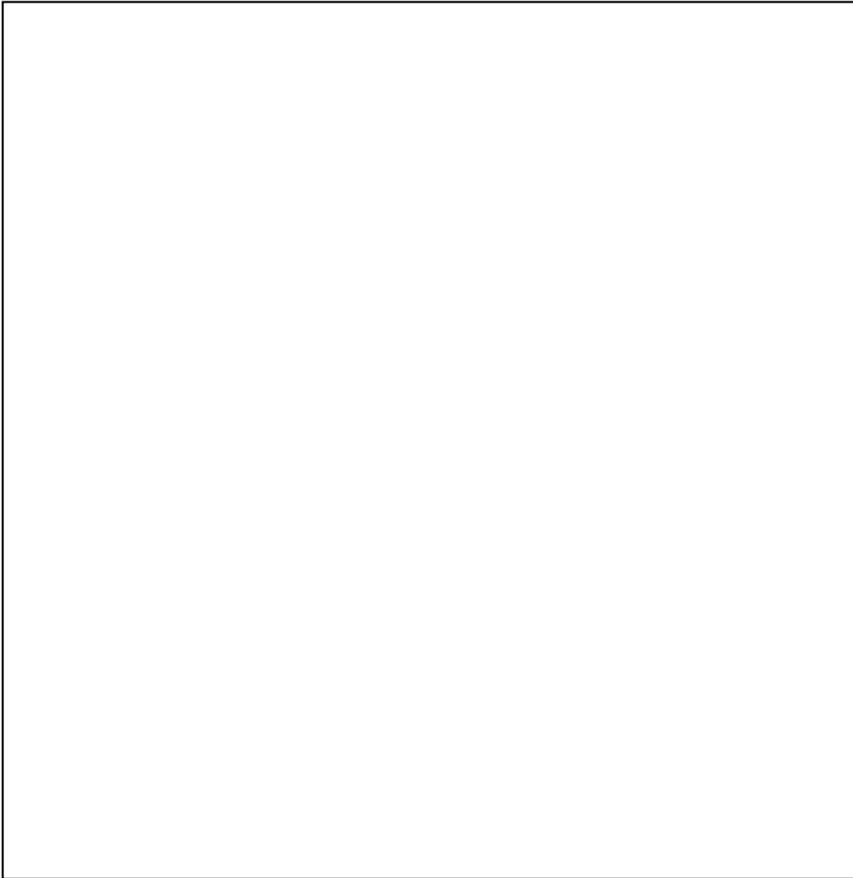


Figura 22: Microscopia de luz de secções longitudinais de gametófitos jovens de *Gelidium floridanum* após 7 dias de tratamento com cádmio. **(a)** Amostras controle com presença de grãos de amido das florídeas nas células corticais e subcorticais. Note que esses grãos de amido (setas) aumentam nos tratamentos de **(b)** 7,5 μM e **(c)** 15 μM de cádmio, acumulados nas células medulares. Reação positiva ao CBB no **(d)** controle e **(e.f)** nos tratamentos. O controle apresentou o conteúdo proteico na periferia das células, e os tratamentos tem o material proteico disperso pelo citoplasma.

Tabela 6: Alterações dos pigmentos fotossintetizantes de gametófitos jovens de *Gelidium floridanum* após 7 dias de exposição ao cádmio e após 24 horas de recuperação (n = 4). Chl *a*: clorofila *a*; APC: alofocianina; PC: ficocianina; PE: ficoeritrina.

3.5 Fluorescência da clorofila *a*

Análise da curva de fotossíntese/irradiância (PI) (Fig. 23) confirmou que gametófitos jovens de *G. floridanum* cultivados em ambas as concentrações, 7,5 μM e 15 μM , apresentaram um decréscimo na taxa de transporte de elétrons (ETR) após a exposição (Fig. 23a). Entretanto, após 24 horas de recuperação (Fig. 23b) onde a água do mar foi enriquecida com meio de cultura von Stosch (VS/2), somente o controle apresentou um aumento destes parâmetros, sendo que as amostras tratadas não apresentaram recuperação. Valores de ETRmax (Tab. 7) mostram um decréscimo de 49,53% e 83,48% em amostras tratadas com 7,5 μM e 15 μM de Cd, respectivamente, comparado com as amostras controle após 7 dias de tratamento. Após a recuperação, as amostras do controle e tratamentos mostraram um aumento nos valores de ETRmax comparado com o mesmo período de exposição. Para o I_k (ponto de saturação de luz), os valores diminuíram para 100.269 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (7,5 μM Cd) e 27.048 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (15 μM Cd) comparado ao controle (160.45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante a exposição (Tab. 7). Na recuperação, comparado a exposição, os tratamentos (7,5 μM e 15 μM Cd) apresentaram um aumento nos valores, mas não houve aumento nas amostras controle. Para a eficiência fotossintética (α) (Tab. 7), diferenças significativas foram observadas entre controle e tratamentos, mas não apresentaram diferenças entre a exposição e o período de recuperação de 24 h.

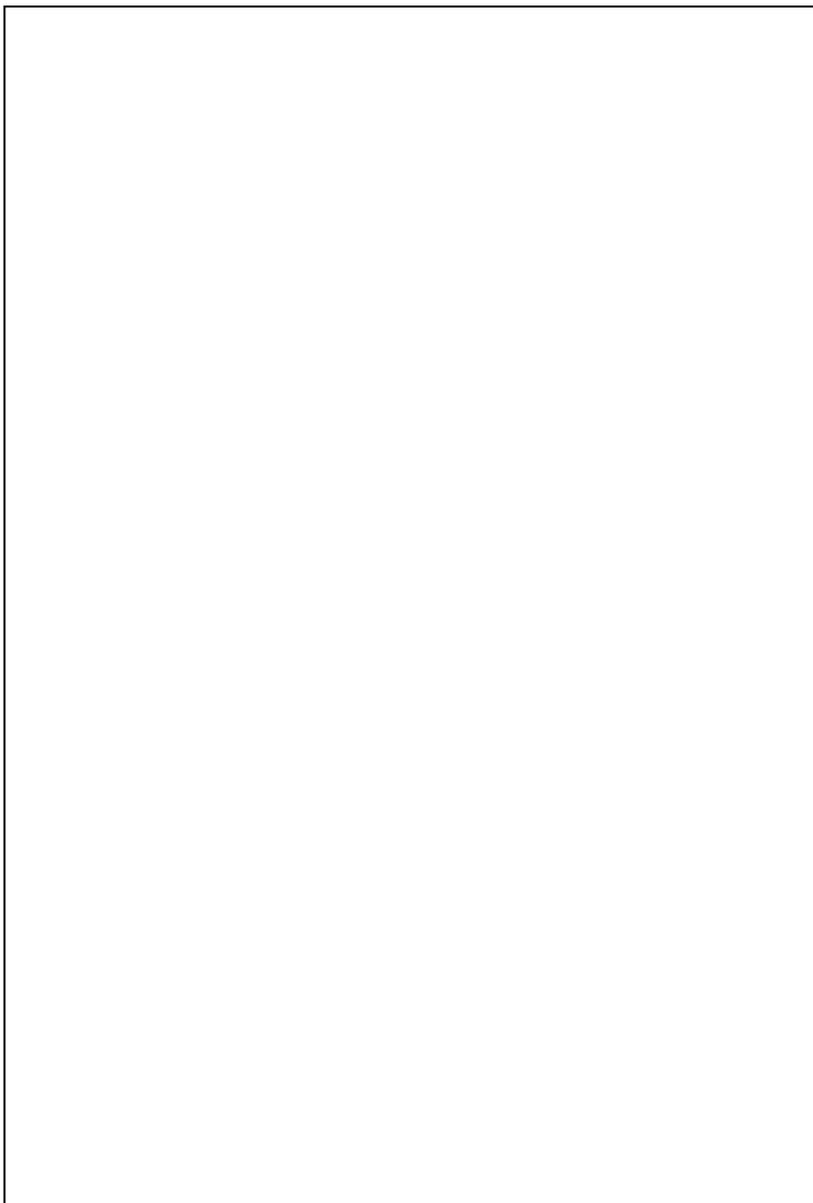


Figura 23: Curvas PI (ETR-PAR) de gametófitos jovens de *G. floridanum* após 7 dias de exposição ao cádmio e após 24 horas de recuperação. **(a)**, Curva de PI após 7 dias de tratamento com cádmio. **(b)** Curva de PI após 24 h de recuperação em condição PAR controle. Letras distintas indicam as diferenças significativas de acordo com a ANOVA bifatorial e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 7. Parâmetros cinéticos da curva PI de gametófitos jovens de *Gelidium floridanum* após 7 dias de tratamento com cádmio e após 24 horas de recuperação. ETR_{max}, taxa máxima de transporte de elétrons; I_k, ponto de saturação luminosa; α , alpha, eficiência fotossintetizante.

O rendimento quântico máximo (Fv/Fm) (Fig. 24a) apresentou alterações significativas nas amostras de gametófitos jovens de *G. floridanum* tratadas com Cd (7,5 μ M e 15 μ M), tanto para o período de exposição quanto o de recuperação. Após o período de exposição, as amostras controle tiveram um rendimento médio de $0,490 \pm 0,034$, enquanto que as amostras expostas ao 7,5 μ M Cd e 15 μ M Cd apresentaram uma redução de 27,14% ($0,357 \pm 0,028$) e de 36,32 % ($0,312 \pm 0,036$), respectivamente. Por outro lado, a recuperação da fotossíntese 24 horas após a exposição não mostrou um aumento em Fv/Fm nem para o controle e nem para os tratamentos.

O rendimento quântico efetivo (Y(II)) (Fig. 24b), seguiu um padrão semelhante do rendimento quântico máximo (Fv/Fm) apresentando diferenças significativas entre o controle e as amostras tratadas. O Y(II) diminuiu entre 23,64 % e 35,55 % na exposição das amostras com 7,5 μ M e 15 μ M de Cd comparado com as amostras controle. Após a recuperação, o controle não apresentou resultados diferentes mantendo uma média de $0,540 \pm 0,020$, já em amostras tratadas, a recuperação ajudou a aumentar as taxas, principalmente no tratamento de 15 μ M ($0,423 \pm 0,020$).

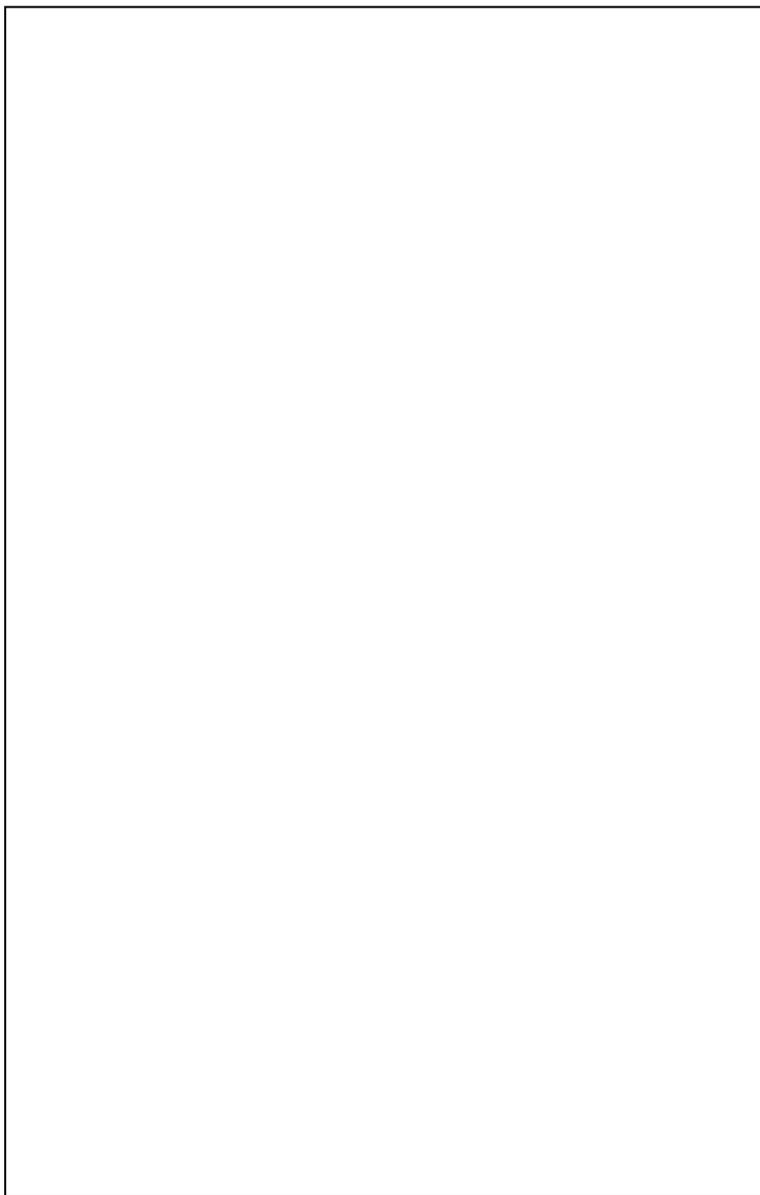


Figura 24: (a) Rendimento quântico máximo (F_v/F_m) e (b) Rendimento quântico efetivo ($Y(II)$) de gametófitos jovens de *Gelidium floridanum* após 7 dias de tratamento com cádmio e após 24 horas de recuperação ($n = 4$, média \pm DP). Letras distintas indicam as diferenças significativas de acordo com a ANOVA bifatorial e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.6 Observações através da microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Sob MEV, a topografia da superfície de gametófitos jovens de *G. floridanum* da amostra controle mostrou paredes celulares das células corticais com ondulações regulares e uma superfície pouco rugosa (Fig. 25a-b). Em contraste, as amostras tratadas (Fig. 25c-f) mostrou um aumento na rugosidade diretamente relacionada com o aumento da concentração do metal cádmio.

Os resultados da microanálise de raios-X de gametófitos jovens de *G. floridanum*, por microanálise de raios-X qualitativa apresentou diferenças significativas em alguns elementos (Tab. 8). Dos elementos detectados, carbono, magnésio, enxofre, potássio e cálcio mostraram diferenças significativas; e nitrogênio, oxigênio e sódio não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. O metal Cd somente foi detectado nas amostras tratadas (Tab. 8).

Tabela 8: Microanálise de raios X da parede celular de gametófitos jovens de *Gelidium floridanum* após 7 dias de tratamento com cádmio. C, carbono; N, nitrogênio; O, oxigênio; Na, sódio; Mg, magnésio; S, enxofre; K, de potássio; Ca, cálcio; Cd, cádmio.

--

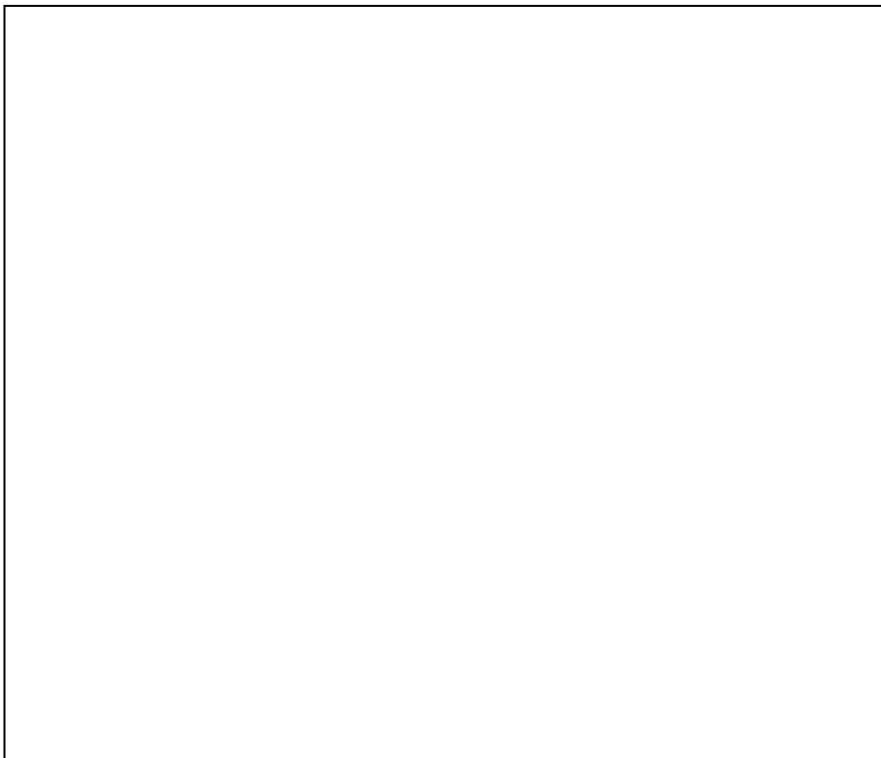


Figura 25: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da superfície do talo de gametófitos jovens de *Gelidium floridanum* após 7 dias de tratamento com cádmio. **(a)** Vista geral da superfície da ponta do talo; **(b)** Detalhe da superfície da parede celular com aspecto regular e com pouca rugosidade. **(c)** Vista geral da superfície da ponta do talo; **(d)** detalhe da superfície da parede celular mostrando um aumento da rugosidade. **(e)** Vista geral da superfície da ponta do talo; **(f)** Detalhe do aumento de rugosidade da superfície da parede da célula.

4. Discussão

O Cd é um fator chave na limitação do crescimento em algas (Bouzon *et al.*, 2012b). As algas podem ativamente adsorvir o Cd para minimizar o impacto tóxico do metal. Um dos resultados observados nesta tese foi a diminuição das taxas de crescimento dos gametófitos jovens após a exposição ao metal cádmio. Em estudos com talos adultos de algas vermelhas como *Gracilaria domingensis* (Santos *et al.*, 2012), *Hypnea musciformis* (Bouzon *et al.*, 2012b) e *G. floridanum* (Santos *et al.*, 2014) também foi relatado a diminuição e até a inibição das taxas de crescimento após exposição ao Cd. O tratamento com Cd também afetou a biomassa em microalgas *Desmodesmus subspicatus* (Bascik-Remisiewicz *et al.*, 2011) e *Micrasterias denticulata* (Andosch *et al.*, 2012) Metais pesados induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Collén *et al.*, 2003), podendo causar danos em proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, levando a morte celular e/ou inibição da proliferação celular (Andosch *et al.*, 2013). A diminuição das taxas de crescimento, neste estudo, demonstrou maior sensibilidade dos gametófitos jovens de *G. floridanum* quando tratados com Cd (7,5 e 15 μM) quando comparado com estudos em talos adultos da mesma espécie (Santos *et al.*, 2014) cultivadas em altas concentrações (50 e 100 μM).

As diferentes respostas das algas ao estresse do Cd podem ser resultantes de especificações químicas deste metal no meio de cultura. Já tem sido bem documentado, que íons Cd^{2+} livres são a forma mais tóxica do Cd para os organismos e que concentrações de íons livres do metal podem variar na presença de agentes complexantes/quelantes (Fernandez-Pinas *et al.*, 1991). Os componentes do meio de cultura (ácido etilenodiamino tetra-acético -EDTA) quelam aproximadamente 70% dos íons livres de cádmio, assim decrescendo a concentração de Cd^{2+} no meio (Bascik-Remisiewicz & Tukaj, 2002). Portanto, a alta toxicidade do cádmio para a células das algas cultivadas com baixo conteúdo de minerais e componentes quelantes podem resultar no aumento da bioviabilidade de Cd (alta concentração de Cd^{2+}) (Bascik-Remisiewicz *et al.*, 2011). Neste estudo, foi utilizado meio de cultura sem EDTA resultando na alta toxicidade do cádmio para os gametófitos jovens de *G. floridanum*, que apresentaram despigmentação e baixa dicotomia nos ramos após os 7 dias de tratamento. Este efeito também foi observado em *G. domingensis* cultivados com 200 e 300 μM de Cd durante 21 dias de cultura (Santos *et al.*, 2012) e em talos adultos de *G.*

floridanum cultivados com 50 e 100 μM de Cd após 7 dias de cultura (Santos *et al.*, 2014).

Estas alterações morfológicas do talo de gametófitos jovens de *G. floridanum* no presente estudo também foram demonstradas pelas análises dos pigmentos fotossintéticos, onde a clorofila *a* e pigmentos acessórios, as ficobiliproteínas (APC e PE), apresentaram uma diminuição em amostras tratadas com Cd. Estes pigmentos são responsáveis pela coloração avermelhada do talo. Metais pesados podem entrar livremente na célula devido à presença de transportadores na membrana plasmática, promovendo alterações nas organelas bem como em proteínas e pigmentos (Xia *et al.*, 2004). O Cd afetou os níveis de clorofila *a* em *G. domingensis* (Santos *et al.*, 2012), *Hypnea musciformis* (Bouzon *et al.*, 2012b), corroborando este estudo. Esta redução pode ser associada com a deficiência de Mg e Fe nos processos de biossíntese da clorofila *a* (Xia *et al.*, 2004).

A degeneração da clorofila levando a uma diminuição da atividade fotossintética tem sido uma resposta comum em plantas expostas aos metais pesados (Kumar *et al.*, 2010). Em estudos com *Ulva lactuca*, uma notável redução no conteúdo de clorofila em talos expostos ao Cd^{2+} foi correlacionado com a diminuição da atividade da enzima ALA-D (δ -aminolevulínico desidratase) (Kumar *et al.*, 2010). O cádmio inibe a atividade da enzima ALA-D por interação com o grupo funcional-SH eventualmente interferindo com a biossíntese e subsequente formação da clorofila (Noriega *et al.*, 2007).

No presente trabalho, os resultados indicaram que Cd inibiu fortemente o acúmulo de ficobiliproteínas. Estes pigmentos são localizados em estruturas chamadas de ficobilissomos associados com a superfície dos tilacóides e são responsáveis pela captura da energia luminosa no comprimento de onda complementar da clorofila *a* que são transferidas ao PSII (Xia *et al.*, 2004). Diversos estudos têm mostrado que o Cd causou modificações nos pigmentos acessórios, como relata o trabalho de Xia *et al.* (2004), que trataram *G. lemaneiformis*, com Cd por 4 dias, e os trabalhos com *H. musciformis* (Bouzon *et al.*, 2012b), *G. domingensis* (Santos *et al.*, 2012) e talos adultos de *G. floridanum* (Santos *et al.*, 2014) com tratamento de cádmio por 7 dias. De acordo com Xia *et al.* (2004), uma alta concentração de Cd altera a estrutura dos ficobilissomos e essas mudanças resultam em uma queda da energia da luz absorvida, inibindo a fotossíntese.

Como uma consequência da diminuição dos pigmentos fotossintetizantes, amostras de gametófitos jovens de *G. floridanum* tratados com Cd mostraram um decréscimo da autofluorescência dos

cloroplastos, bem como alteração de sua estrutura. Santos *et al.* (2014) através de análises por microscopia confocal observou que talos adultos de *G. floridanum* tratados com metais pesados também apresentaram uma redução na intensidade da autofluorescência. Os efeitos severos de Cd no cloroplasto de *G. floridanum* também foram reportados em outras plantas (Küpper *et al.*, 1996; DalCorso *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2010) e algas (Santos *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2014) e são refletidos em sua aparência distorcida através do microscópio de luz. Estudos ultraestruturais também mostram alterações significativas, que incluem a modificação na quantidade, tamanho e organização dos tilacóides dos cloroplastos expostos ao Cd (Talarico, 2002; Bouzon *et al.*, 2012b; Santos *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2014). Segundo Li *et al.* (2006), o aumento de ROS por metais pesados induz a peroxidação e destabilização das membranas do cloroplastos, corroborando o visualizado neste estudo.

A fotoinibição da fotossíntese foi observada em gametófitos jovens de *G. floridanum* após o tratamento com Cd. Segundo Perreault *et al.* (2011) efeitos do Cd sobre os processos fotossintéticos foram identificados em vários locais relacionados com o transporte de elétrons no cloroplasto. Fotossistema II (PSII) foi encontrado ser um local muito sensível ao Cd, sendo inibido pelo mesmo. Diversos estudos têm demonstrado que a presença de Cd resulta na diminuição da atividade fotossintética, em amostras de microalgas *Desmodesmus subspicatus* (Bascik-Remisiewicz *et al.*, 2011), em *Chlamydomonas reinhardtii* (Perreault *et al.*, 2011) e algas vermelhas *G. dominguisensis* (Santos *et al.*, 2012) tratadas com Cd. A fotoinibição também foi observada nas taxas de Fv/Fm e y(II) de gametófitos jovens de *G. floridanum*.

De acordo com dados da literatura, o Cd é capaz de perturbar as reações que envolvem O₂ do PS II, diminuindo o rendimento fotoquímico do PSII, além de inibir a cadeia de transporte de elétrons (Aravind & Prasad 2004; Thapar *et al.*, 2008; Ying *et al.*, 2010). Portanto, vários efeitos de toxicidade observados para Cd pode ser uma causa de inibição do transporte de elétrons na fotossíntese. Krupa *et al.* (1993) estudando os efeitos do Cd na fotossíntese de *Phaseolus vulgaris* concluiu que, durante a exposição a curto prazo das plantas ao Cd nos estágios iniciais de crescimento, as reações do ciclo de Calvin é mais suscetível ao Cd do que o fotossistema II. Portanto o Cd causa fotoinibição pelos efeitos causados sobre o PSII e também ao ciclo de Calvin.

Mesmo após o período de recuperação de 24 h, com troca do meio de cultura, as amostras de gametófitos jovens de *G. floridanum*

apresentaram uma recuperação baixa, sugerindo fotoinibição crônica e/ou fotodano quando tratada com Cd. Isto, também, foi corroborado os dados de pigmentos, onde somente a clorofila *a* teve uma recuperação sem, entretanto, ocorrer aumento dos pigmentos acessórios. A capacidade de recuperação pode ser explicada por “fotoinibição dinâmica”, que consiste de uma baixa regulação do aparelho fotossintético associada a um excesso de dissipação de energia absorvida (geralmente na forma de calor), ou seja, um mecanismo fotoprotetor permitindo a recuperação de atividade fotossintética (Gómez & Figueroa, 1998).

O metabolismo celular dos gametófitos jovens de *G. floridanum* expostos ao Cd é modificado. Nas amostras controle, a presença de grãos de amido das florídeas foi observada nas células corticais e subcorticais, mas nos tratamentos foi observado o aumento dos grãos de amido em células subcortical e principalmente nas células medulares. Santos *et al.* (2013) também demonstraram a presença de numerosos grãos de amido em ambas as células corticais e subcorticais de algas expostos ao Cd e sugerem que este aumento poderia ser associada com alterações morfológicas, tais como uma redução de tilacóides. Em estudos com algodão herbáceo (*Gossypium hirsutum* L.) com diferentes concentrações de Cd (1000 - 10000 mM) também relacionaram como efeito o aumento do número de grânulos de amido (Daud *et al.*, 2013). Segundo Najeeb *et al.* (2011) um aumento no número de grãos de amido é um sinal geral de estresse em plantas. Entretanto, Bouzon *et al.* (2012b) observaram uma diminuição na quantidade de grãos de amido em *H. musciformis* depois de tratados com diferentes concentrações de Cd.

A desorganização do material proteico no interior das células de gametófitos jovens de *G. floridanum* após o tratamento de Cd também foi observada. Daud *et al.* (2013) relataram a desintegração da estrutura organelar em plantas tratadas com Cd, tal como observado em *Elodea canadensis* (Vecchia *et al.*, 2005) e *Sedum alfredii* (Jin *et al.*, 2008).

Além das alterações citoplasmáticas, a parede celular das amostras tratadas sofreram alterações quando tratadas com Cd. Santos *et al.* (2014) também têm relacionado alterações na parede celular de talos de *G. floridanum* que foram expostos ao cádmio, resultando em aumento da rugosidade superficial, corroborando o resultado deste estudo. Tal aumento na espessura da parede celular observada pode ser interpretado como um mecanismo de defesa contra a exposição ao Cd (Bouzon *et al.*, 2012b). Outro fator observado na parede da célula é a presença do metal Cd nas amostras tratadas, além de uma diminuição

nos macrolementos, tais como Na, K, Ca e Mg da parede celular de gametófitos jovens *G. floridanum*.

Concluimos no presente estudo, que o metal Cd apresenta uma toxicidade alta aos gametófitos jovens da macroalga vermelha *G. floridanum*. Este metal, após 7 dias de exposição, induziu a diminuição da concentração dos pigmentos fotossintetizantes e também alterou a morfologia do cloroplasto resultando em uma diminuição da eficiência fotossintética. Tendo como consequência a redução nas taxas de crescimento e alterações na morfologia. Além disso, para esta fase de desenvolvimento, o metal cádmio causou uma fotoinibição crônica, não tendo recuperação após o período de 24 h.

Capítulo VI

Considerações finais

Através do estudo sobre alguns dos mecanismos reguladores da germinação e fatores estressores, pode-se concluir que: a) Durante o processo inicial de formação do tubo germinativo dos tetrásporos de *G. floridanum*, os corpos de Golgi foram os responsáveis pela formação do tubo e os principais produtores de materiais necessários para o crescimento do tubo. b) Os elementos do citoesqueleto estavam envolvidos na polarização e direcionamento dos componentes celulares na formação do tubo germinativo, e, sem a sua organização não ocorre a germinação dos tetrásporos. d) A radiação ultravioleta e os metais pesados provocam alterações ultraestruturais principalmente nos cloroplastos, afetando os pigmentos e consequentemente a atividade fotossintética levando a redução da taxa de crescimento de gametófitos jovens.

A germinação de tetrásporos de *Gelidium floridanum* tem seu início após a adesão ao substrato, iniciando uma polarização de vesículas derivadas do Golgi. Em sequência ocorre a expansão, alongamento do tubo germinativo que é resultado da fusão e secreção de vesículas à membrana plasmática. Os corpos de Golgi são responsáveis pela produção constante destas vesículas e manutenção do crescimento do tubo. Com a brefeldina A pode-se comprovar a importância dos corpos de Golgi como um dos mecanismos reguladores dos processos de germinação, a droga alterou a estrutura dos corpos de Golgi formando estruturas tubulares impedindo tanto a secreção de componentes adesivos necessários a adesão dos tetrásporos, quanto a polarização das vesículas que são necessárias a formação do tubo germinativo. As membranas destas vesículas são incorporadas a membrana plasmática para o alongamento do tubo, e possuem também componentes do complexo enzimático responsáveis pela produção da parede celular.

Além disso, a formação de um vacúolo basal também tem sua origem através da fusão de vesículas derivadas do Golgi. O vacúolo exerce uma pressão de turgor deslocando as organelas para o tubo

germinativo. BFA impede a direcionamento de proteínas para o vacúolo, sendo observado, após o tratamento, somente pequenos vacúolos espalhados pelo citoplasma.

O deslocamento dos corpos de Golgi e suas vesículas derivadas juntamente com as organelas em direção ao tubo germinativo é o primeiro indício do processo de germinação. Esse movimento é direcionado pelos elementos do citoesqueleto, os microtúbulos e os filamentos de actina. Neste estudo, a colchicina e a citocalasina diminuíram a taxa de germinação de esporos causando alterações no tubo germinativo, nas concentrações maiores inibiu totalmente a germinação. Pode-se concluir que tanto os microtúbulos quanto os filamentos de actina regulam os mecanismos de germinação dos tetrásporos de *G. floridanum*. Mas as análises realizadas não elucidaram diretamente a função dos elementos do citoesqueleto durante a germinação. Para algas vermelhas, estudos principalmente no desenvolvimento de esporos são necessários para ampliar o conhecimento da função do citoesqueleto durante este período. Um dos pontos críticos para a realização destes estudos é a utilização de marcadores e a forma de fixação destes elementos que são bastante instáveis. Mesmo já tendo estudos utilizando marcadores em plantas e com algas pardas, os protocolos utilizados para estes grupos devem ser padronizados para a espécie específica. Isso foi verificado com testes realizados em nosso laboratório com protocolos existentes para algas pardas, os quais não obtiveram sucesso. Além da padronização de protocolos específicos para a marcação tanto dos microtúbulos como dos filamentos de actina, investigações sobre as proteínas motoras tanto as miosinas que se associam aos filamentos de actina quanto à cinesinas e dineínas que se associam aos microtúbulos, além das proteínas que regulam o funcionamento do citoesqueleto ajudarão no entendimento de diversas questões em relação aos processos celulares.

Em relação ao desenvolvimento de gametófitos jovens de *G. floridanum*, o presente estudo demonstrou que a exposição PAR+ UVA + UVB afeta negativamente em vários níveis metabólicos e morfológicos. Com somente 3 h de exposição durante três dias de experimento os gametófitos sofrem alterações ultraestruturais como desorganização interna dos cloroplastos, aumento da espessura da parede celular e alterações na morfologia do talo. Consequentemente foram observados fotodanos e fotoinibição dos pigmentos fotossintéticos com diminuição da eficiência fotossintética e das taxas de crescimento. Mesmo assim os gametófitos jovens de *G. floridanum* expostos a PAR + UVA + UVB conseguem se recuperar após 24 h,

indicando que a fotoinibição foi um mecanismo de defesa para minimizar os efeitos da radiação ultravioleta. O estudo apresentou dados referentes aos efeitos conjuntos da radiação UVA + UVB, para uma análise mais detalhada estudos podem ser realizados verificando os efeitos da radiação UVA e da radiação UVB separadamente. Outro ponto que merece aprofundamento é a ação de fotoprotetores de UV como aminoácidos do tipo micosporinas (MAAs) que contribuem para amenizar os efeitos da radiação.

Na exposição ao Cd, os gametófitos jovens de *G. floridanum* após sete dias de tratamento, também apresentaram alterações nos pigmentos fotossintetizantes e na estrutura e autofluorescência dos cloroplastos. Essas alterações provocaram uma diminuição da eficiência fotossintética e das taxas de crescimento com alteração da morfologia. Diferentemente do experimento da radiação, para o metal cádmio, os gametófitos não apresentaram uma recuperação após o período de 24 h, indicando que a utilização de metais nesta fase de desenvolvimento pode causar uma fotoinibição crônica, podendo ser até mesmo irreversível.

Tanto para radiação quanto para estudos com metais em gametófitos jovens de *G. floridanum*, sugere-se estudos que confirmem o estresse oxidativo, através dos níveis de ROS (espécies reativas oxigênio), estudos com atividade enzimática como exemplo, glutatona peroxidase e glutatona redutase, além de verificar danos ao DNA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. **1994**. *Biologia molecular da célula*. Porto Alegre: Artes Médicas. 1294 p.
- Altamirano M, Flores-Moya A, Figueroa FL. **2003a**. Effects of UV radiation and temperature on growth germlings of three species of *Fucus* (Phaeophyceae). **Aquatic Botany**. 75: 9- 20.
- Altamirano M, Flores-Moya A, Külenkamp R, Figueroa FL. **2003b**. Stage dependent sensitivity to ultraviolet radiation on zygotes of the brown alga *Fucus serratus*. **Zygote**. 11:101- 106.
- Andosch A, Affenzellera M J, Lutz C, Lutz-Meindl U. **2012**. A freshwater green alga under cadmium stress: Ameliorating calcium effects on ultrastructure and photosynthesis in the unicellular model *Micrasterias*. **Journal of Plant Physiology**. 169: 1489 -1500.
- Andrade LR, Leal RN, Noseda M, Duarte MER, Pereira MS, Mourão PAS, et al. **2010**. Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity. **Marine Pollution Bulletin**. 60(9), 1482–1488.
- Apple ME, Harlin MM. **1994**. Inhibition of tetraspore adhesion in *Champia parvula* (Rhodophyta). **Phycologia**. 34:417- 423.
- Aráoz R, Häder DP. **1997**. Ultraviolet radiation induces both degradation and synthesis of phycobilisomes in *Nostoc* sp.: a spectroscopic and biochemical approach. **FEMS Microbiology Ecology**. 23: 301–313.
- Aravind P, Prasad MNV. **2004**. Zinc protects chloroplasts and associated photochemical functions in cadmium exposed *Ceratophyllum demersum* L., a freshwater macrophyte. **Plant Sciences**. 166:1321-1327.
- Astorga-Espana, MS, Calisto-Ulloa NC, Guerrero S. **2008**. Baseline concentrations of trace metals in macroalgae from the Strait of Magellan, Chile. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 80(2), 97-101.

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

Ball SG. **2002**. The intricate pathway of starch biosynthesis and degradation in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Australian Journal of Chemistry**. 55: 49-59.

Barufi Bonomi J, Korbee N, Oliveira M, Figueroa FL. **2011**. Effects of N supply on the accumulation of photosynthetic pigments and photoprotectors in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta) cultured under N limitation. **Journal of Applied Phycology**. 23: 457-466.

Bascik-Remisiewicz A, Tukaj Z. **2002**. Toxicity of inorganic cadmium salts to the microalgae *Scenedesmus armatus* (Chlorophyta) with respect to medium composition, pH and CO₂ concentration. **Acta Physiologiae Plantarum**. 24: 59–65.

Bascik-Remisiewicz A, Aksmann A, Zak A, Kowalska M, Tukaj Z. **2011**. Toxicity of Cadmium, Anthracene, and Their Mixture to *Desmodesmus subspicatus* Estimated by Algal Growth-Inhibition ISO Standard Test. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 60:610-617.

Bischof K, Hanelt D, Wiencke C. **2000**. Effects of ultraviolet radiation on photosynthesis and related enzyme reactions of marine macroalgae. **Planta**. 211: 555-562.

Bischof K, Steinhoff FS. **2012**. Impacts of ozone depletion and solar UV-B radiation on seaweeds. In: Wiencke C, Bischof K (eds) *Advances in Seaweed Biology. Novel insights into ecophysiology, ecology and utilization*. **Ecological Studies**. 219: 433-448.

Bolte S, Talbot C, Boutte Y, Catrice O, Read ND, Satiat-Jeuemaitre B. **2004**. FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. **Journal of Microscopy**. 214: 159-173.

Bouzon ZL, Ouriques LO, Oliveira EC. **2005**. Ultrastructure of tetraspore germination in the agar-producing seaweed *Gelidium floridanum* (Gelidiales, Rhodophyta). **Phycology**. 44: 409-415.

Bouzon ZL (2006) Histoquímica e ultra-estrutura da ontogênese dos tetrasporângios de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Rhodophyta, Gigartinales). **Revista Brasileira de Botânica**. 29(2):229–238.

Bouzon ZL, Ouriques LC, Oliveira EC. **2006**. Spore adhesion and cell wall formation in *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Gelidiales). **Journal of Applied Phycology**. 18: 287-294.

Bouzon ZL, Chow F, Zitta C, Santos RW, Ouriques LC, Felix MRL, Polo LKO, Gouveia C, Martins RP, Latini A, Ramlov F, Maraschin M, Schmidt ÉC. **2012a**. Comparative analysis of the chloroplast organization and metabolism in the red algae *Porphyra acanthophora* var. *brasiliensis* under UVB radiation plus par, par-only and natural radiation. **Microscopy and Microanalysis**. 18: 1467-1479.

Bouzon ZL, Ferreira EC, Santos R, Scherner F, Horta PA, Maraschin, M, Schmidt EC. **2012b**. Influences of cadmium on fine structure and metabolism of *Hypnea musciformis* Rhodophyta, Gigartinales cultivated *in vitro*. **Protoplasma**. 249: 637-650.

Brawley S, Robinson KR. **1985**. Cytochalasin treatment disrupts the endogenous currents associated with cell polarization in furoid zygotes: studies of the role of F-actin in embryogenesis. **Journal of Cell Biology**. 100: 1173-1184.

Cai G, Caestri M. **2010**. Microtubule motors and pollen tube growth—still an open question. **Protoplasma**. 247:131-143.

Callow ME, Crawford S, Wetherbee R, Taylor K, Finlay JA, Callow JA. **2001**. Brefeldin A affects adhesion of zoospores of the green alga *Enteromorpha*. **Journal of Experimental Botany**. 52: 1409-1415.

Campas O, Mahadevan L. **2009**. Shape and dynamics of tip-growing cells. **Current Biololy**. 19:2102–2107.

Capitanio G, Baldan B, Filippini F, Terzi M, LoSchiavo F, Mariani P. **1997**. Morphogenetic effects of Brefeldin A on embryogenic cell cultures of *Daucus carota* L. **Planta**. 203: 121-128.

Cardenas L, Lovy-Wheeler A, Kunkel JG, Hepler PK. **2008**. Pollen tube growth oscillations and intracellular calcium levels are reversibly modulated by actin polymerization. **Plant Physiology**. 146:1611-1621.

Chamberlain AHL, Evans LV. **1981**. Chemical and histochemical studies on the spore adhesive of *Ceramium*. In: Proceedings of the 8th International Seaweed Symposium (Ed. By G. E. Fogg & W. E. Jones), p.539-542.

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

Collén J, Pinto E, Pedersén M, Colepicolo P. **2003**. Induction of oxidative stress in the red macroalgae *Gracilaria tenuisitipitata* by pollutant metals. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 45: 337-342.

DalCorso G, Farinati S, Maistri S, Furini A. **2008**. How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression. **Journal of Integrative Plant Biology** 10:1268-80.

Dairman M, Donofrio N, and Domozych D. **1995**. The effects of brefeldin A upon the Golgi apparatus of the green algal flagellate *Gleomonas kupfferi*. **Journal of Experimental Botany**. 46: 181-186.

Daud MK, Sun Y, Dawood M, Hayat Y, Variath MT, Wu YX. **2009**. Cadmium-induced functional and ultrastructural alterations in roots of two transgenic cotton cultivars. **Journal of Hazardous Materials**. 161:463-73.

Daud MK, Ali S, Variath MT, Zhu SJ. **2013**. Differential physiological, ultramorphological and metabolic responses of cotton cultivars under cadmium stress. **Chemosphere**. 93: 2593-2602.

De La Coba F, Aguilera J, Figueroa FL, De Gálvez MV, Herrera E. **2009**. Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated

form three red macroalgae and one marine lichen. **Journal of Applied Phycology**. 21: 161-169.

De Ruiter GA, Rudolph B. **1997**. Carrageenan biotechnology. **Trends in Food Science Technology**. 8: 389-395.

Derksen J, Rutten T, Amstel TV, Win A, Doris F, Steer M. **1995a**. Regulation of pollen tube growth. **Acta Botanica Neerlandica**. 44:93-119.

Döhler G, Biermann I. **1987**. Effect of UV-B irradiance on the response of ¹⁵N-nitrate uptake of *Lauderia annulada* and *Synedra planctonica*. **Journal Plankton Research**. 9: 881-890.

Donaldson JG, Finazzi D, Klausner RD. **1992**. Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. **Nature**. 360: 350-352.

Dring ML, Makarov V, Schoschina E, Lorenz M, 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.

Driouich A, Zhang GF, Staehelin LA. **1993**. Effect of brefeldin A on the structure of the Golgi apparatus and on the synthesis and secretion of proteins and polysaccharides in sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) suspension-cultured cells. **Plant Physiology**. 101: 1363-1373.

Engdahl S, Mamboya F, Mtolera M, Semesi A, Bjorg M. **1998**. The brown macroalgae *Padina boergesenii* as an indicator of heavy metal contamination in the Zanzibar Chanel. **Ambio**. 27(8): 694-700.

Eswaran K, Subbarao PV, Mairh OP. **2001**. Impact of ultraviolet-B radiation on *Kappaphycus alvarezzi* (Solieraceae, Rhodophyta). **Indian Journal of Marine Sciences**. 30: 105-107.

Eswaran K, Mairh OP, SubbaRao PV. **2002**. Inhibition of pigments and phycocolloid in a marine red algae *Gracilaria edulis* by ultraviolet-B radiation. **Biologia Plantarum**. 45: 157-159.

Fernandez-Pinas F, Mateo P, Bonilla I. **1991**. Binding of cadmium by cyanobacterial growth media: free ion concentration as a toxicity index to the cyanobacterium *Nostoc* UAM 208. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 21:425–431.

Figuroa F, Nygard C, Ekelund N, Gómez I. **2003**. Photobiological characteristics and photosynthetic UV responses in two *Ulva* species (Chlorophyta) from southern Spain. **Journal Photochemistry Photobiology**. 72: 35–44.

Fletcher RL, Callow ME. **1992**. The Settlement, attachment and establishment algal spores. **British Phycological Journal**. 27:303 – 329.

Forster RM, Franklin LA. **1997**. The changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. **European Journal of Phycology**. 323: 207-232.

Fowler J, Vejlupkova Z, Goodner B, Lu G, Quatrano R. **2004**. Localization to the rhizoid tip implicates a *Fucus distichus* Rho family GTPase in a conserved cell polarity pathway. **Planta**. 219:856–866.

Franklin LA, Forster RM. **1997**. The changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. **European Journal Phycology**. 323: 207-232.

Gahan PB. **1984**. Plant Histochemistry and Cytochemistry: An Introduction. **Academic Press, London**.

Gao K, Helbling EW, Häder D, Hutchins DA. **2012**. Responses of marine primary producers to interactions between ocean acidification, solar radiation, and warming. **Marine Ecology Progress Series**. 470: 167–189.

Garbary DJ, McDonald AR, Duckett JG. **1992**. Visualization of the cytoskeleton in red algae using fluorescent labelling. **New Phytologist**. 120: 435-444.

Garbary DJ, McDonald AR. **1996**. Fluorescent labelling of the cytoskeleton in *Ceramium strictum* (Rhodophyta). **Journal Phycology**. 32:85 - 93.

Gomez L, Chrispeels M. **1993**. Tonoplast and soluble vacuolar proteins are targeted by different mechanisms. **Plant Cell**. 5: 1113-1124.

Gómez I, Figueroa FL. **1998**. Effects of solar UV stress on chlorophyll fluorescence kinetics of intertidal macroalgae from Southern Spain: a case study in *Gelidium* species. **Journal of Applied Phycology**. 10: 285-294.

Gordon EM, McCandless EL. **1973**. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. In: Harvey MJ, McLachlan J (eds) *Chondrus crispus*. Nova Scotia Institute of Science, Halifax, pp 111–133.

Grahan LE, Wilcox LW, Grahan J. **2009**. Algae. 2nd ed. Pearson: 616pg.

Green JJ, Cervantes DC, Peters NT, Logan KO, Kropf DL. **2013**. Dynamic microtubules and endomembrane cycling contribute to polarity establishment and early development of *Ectocarpus* mitospores. **Protoplasma**. 250:1035–1043.

Grossman AR, Schaefer MR, Chiang GG, Collier JL. **1993**. The phycobilisome a light harvesting complex responsive to environmental conditions. **Microbiology Reviews**. 57:725-749.

Grymski J, Johnsen G, Sakshaug E. **1997**. The significance of intracellular selfshading on the biooptical properties of brown, red and green macroalgae. **Journal Phycology**. 33: 408-414.

Hable W, Kropf DL. **1998**. Roles of secretion and the cytoskeleton in cell adhesion and polarity establishment in *Pelvetia compressa* zygotes. **Developmental Biology**. 198: 45–56.

Hable WE, Hart PE. **2010**. Signaling Mechanisms in the Establishment of Plant and Furoid Algal Polarity. **Molecular Reproduction and Development**. 77:751–758.

Häder DP, Lebert M, Helbling W. **2004**. Variable fluorescence parameters in the filamentous *Patagonian* rhodophytes, *Callithamnion gaudichaudii* and *Ceramium* sp. under solar radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**. 23: 87-99.

Hadley R, Hable WE, Kropf DL. **2006**. Polarization of the endomembrane system is an early event in fucoid zygote development. **BMC Plant Biology**. 6: 5.

Hamdy AA. **2000**. Biosorption of heavy metals by marine algae. **Current Microbiology**. 41:232-238.

Hanelt D, Hawes I, Rae R. **2006**. Reduction of UV-B radiation causes an enhancement of photoinhibition in high light stressed aquatic plants from New Zealand lakes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**. 84:89-102.

Haritonidis S, Malea P. **1999**. Bioaccumulation of metals by the green alga *Ulva rigida* from Thermaikos Gulf, Greece. **Environmental Pollution**. 104: 365–372.

Hashim MA, Chu KH. **2004**. Biosorption of cadmium by brown, green and red seaweeds. **Chemical Engineering Journal**. 97: 249-255.

Helms JB, Rothman JE. **1992**. Inhibition by Brefeldin A of Golgi membrane enzyme that catalyzed the exchange of guanine nucleotide bound to ARF. **Nature**. 360: 352-354.

Henderson J, Satiat-Jeuemaitre B, Napier R, Hawes C. **1994**. Brefeldin A-induced disassembly of the Golgi apparatus is followed by disruption of the endoplasmic reticulum in plant cells. **Journal of Experimental Botany**. 45: 1347–1351.

Henry E, Van Alstyne KL. **2004**. Effects of UV radiation on growth and phlorotannins in *Fucus gardneri* (Phaeophyceae) juveniles and embryos. **Journal Phycology**. 40: 527–533.

Hiscox JD, Israelstam GF. **1979**. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**. 57: 1332-1334.

Holzinger A, Lütz 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**. 6: 568-577.

- Holzinger A, Karsten U, Lütz C, Wiencke C. **2006**. Ultrastructure and photosynthesis in the supralittoral green macroalga *Prasiola crista* from Spitsbergen (Norway) under UV exposure. **Phycologia**. 45:168–177.
- Holzinger A, Lütz C. **2006**. Algae and UV irradiation: Effects on ultrastructure and related metabolic functions. **Micron**. 37: 190–207.
- Holzinger A, Roleda A, Lütz C. **2009**. The vegetative arctic freshwater green alga *Zygnema* is insensitive to experimental UV exposure. **Micron**. 40: 831–838.
- Holzinger A, Di Piazza L, Lütz C, Roleda M. **2011**. Sporogenic and vegetative tissues of *Saccharina latissima* (Laminariales, Phaeophyceae) exhibit distinctive sensitivity to experimentally enhanced ultraviolet radiation: photosynthetically active radiation ratio. **Phycologia Research**. 59: 221–235.
- Hu S, Tang CH, Wu M. **1996**. Cadmium accumulation by several seaweeds. **The Science of the Total Environment**. 187: 65-71.
- Hummel E, Osterrieder A, Robinson DG, Hawes C. **2010**. Inhibition of Golgi function causes plastid starch accumulation. **Journal of Experimental Botany**. 61: 2603-2614.
- Huovinen P, Matos J, Pinto IS, Figueroa FL. **2006**. The role of ammonium in photoprotection against high irradiance in the red alga *Grateloupia lanceola*. **Aquatic Botany**. 84:308-316.
- Jiang H, Gao K, Helbling EW. **2007**. Effects of solar UV radiation on germination of conchospores and morphogenesis of sporelings in *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta). **Marine Biology**. 151: 1751–1759.
- Jin X, Yang X, Islam E, Liu D, Mahmood Q. **2008**. Effects of cadmium on ultrastructure and antioxidative defense system in hyperaccumulator and nonhyperaccumulator ecotypes of *Sedum alfredii* Hance. **Journal of Hazardous Materials**. 156: 387–397.
- Karsten U, Wiencke C. **1999**. Factors controlling the formation of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in the marine red alga

Palmaria palmata from Spitsbergen (Norway). **Journal of Plant Physiology**. 155:407–415.

Katsaros CI. **1995**. Apical cells of brown algae with particular reference to Sphacelariales, Dictyotales and Fucales. **Phycologia Research**. 43:43–59.

Katsaros C, Karyophyllis D, Galatis B. **2006**. Cytoskeleton and Morphogenesis in Brown Algae. **Annals of Botany**. 97: 679–693.

Keidan M, Friedlander M, Arad SM. **2009**. Effect of Brefeldin A on cell wall polysaccharide production in the red microalga *Porphyridium* sp. (Rhodophyta) through its effect on the Golgi apparatus. **Journal of Applied Phycology**. 21: 707–717.

Kerr JB, McElroy CT. **1993**. Evidence for Large Upward Trends of Ultraviolet-B Radiation Linked to Ozone Depletion. **Science**. 262: 1032-1034.

Kim GH, Hwang MS, Fritz L, Lee IK. **1995**. The wound healing response of *Antithamnion nipponicum* and *Griffithsia pacifica* (Ceramiales, Rhodophyta) monitored by lectins. **Phycology Research**. 43: 161-166.

Kim GH, Klotchkooova B, Lee C, Kim SH. **2001**. FITC- Phallooidin Staining of F-actin in *Aglaothamnion oosumiense* and *Griffithsia japonica* (Rhodophyta). **Botanica Marina**. 44:501-508.

Kimura S, Yamada M, Igaue I, Mitsui T. **1993**. Structure and function of the Golgi complex in rice cells: Characterization of Golgi membrane glycoproteins. **Plant Cell Physiology**. 34: 855–863.

Kirchhoff VWJH, Schuch J, Pinheiro DK, Harris JM. **1996**. Evidence for ozone hole perturbation at 30° South. **Atmospheric Environmental**. 30: 1481-1488.

Kirchhoff VWJH, Echer E, Leme NP, Silva AA. **2000**. A variação sazonal da radiação ultravioleta solar biologicamente ativa. **Journal of Geophysical Research**. 18: 63-74.

Korbee N, Mata MT, Figueroa FL. **2010**. Photoprotection mechanism against ultraviolet radiation in *Heterocapsa* sp. (Dinophyceae) are influenced by nitrogen availability: mycosporine-like aminoacids vs. xanthophyll cycle. **Limnology and Oceanography**. 55: 809-908.

Kropf DL. **1997**. Induction of polarity in fucoid zygotes. **The Plant Cell**. 9: 1011-1020.

Kropf DL, Bisgrove SR, Hable WE. **1998**. Cytoskeletal control of polar growth in plant cells. **Current Opinion in Cell Biology**. 10:117–122.

Krupa Z, Öquist G, Huner PA. **1993**. The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris*-a fluorescence analysis. **Physiologia Plantarum**. 88: 626-630.

Kumar M, Kumari P, Gupta V, Anisha PA, Reddy CRK, Jha B. **2010**. Differential responses to cadmium induced oxidative stress in marine macroalga *Ulva lactuca* (Ulvales, Chlorophyta). **Biometals**. 23: 315-325.

Kuhnem S, Lemos PMM, Campestrini LH, Ogliari JB, Dias PF, Maraschim M. **2009**. Antiangiogenic properties of carotenoids: a potential role of maize as functional food. **Journal of Funcional Foods**. 1: 284-290.

Kunze I, Hillmer S, Kunze G, Muentz K. **1995**. Brefeldin A differentially affects protein secretion from suspension-cultured tobacco cells (*Nicotiana tabacum*). **Journal of Plant Physiology**. 146: 71–80.

Kupper H, Kupper F, Spiller M. **1996**. Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. **Journal of Experimental Botany**. 47:259–66.

Kupper H, Setlik I, Spiller M, Kupper FC, Prasil O. **2002**. Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: Targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation. **Journal Phycology**. 38: 439-441.

Kursar TA, Van Der Meer J, Alberte RS. **1983**. Light-harvesting system of red algae *Gracilaria tikvahiae*. II. Phycobilisome Characteristics of Pigment Mutants. **Plant Physiology**. 73: 361-369.

Kuthanova A, Opatrny Z, Fischer L. **2008**. Is internucleosomal DNA fragmentation an indicator of programmed death in plant cells? **Journal of Experimental Botany**. 59:2233–2240.

Joos U, van Aken J, Kristen U. **1995**. The anti-microtubule drug carbetamide stops *Nicotiana sylvestris* pollen tube growth in the style. **Protoplasma**. 187:182–91.

Lanubile R, Piro G, Dalessandro G. **1997**. Effect of Brefeldin A on the synthesis and transport of cell wall polysaccharides and proteins in pea root seedlings. **Journal of Experimental Botany**. 48: 1925-1933.

Lao K, Glazer AN. **1996**. Ultraviolet-B photodestruction of light-harvesting complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 93:5258 – 5263.

Lesser MP, Shick JM. **1989**. Effects of irradiance and ultraviolet radiation on photoadaptation in the zooxanthellae of *Aiptasia pallida*: primary production, photoinhibition, and enzymic defenses against oxygen toxicity. **Marine Biology**. 102: 243-255.

Lesser MP, Shick JM. **1994**. Effects of irradiance and ultraviolet radiation on photoadaptation in the zooxanthellae of *Aiptasia pallida*: primary production, photoinhibition, and enzymic defenses against oxygen toxicity. **Marine Biology**. 102: 243-255.

Lewis R, Hanisak M. **1996**. Effects of phosphate and nitrate supply on productivity, agar content and physical properties of agar of *Gracilaria* strain G-16S. **Journal of Applied Phycology**. 8: 41–9.

Li M, Hu C, Zhu Q, Chen Li, Kong Z, Liu Z. **2006**. Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae). **Chemosphere**. 62: 565–572.

Li M, Yan W, Zhong L, Xu W. **2014**. Effect of heavy metals (Cu, Pb, and As) on the ultrastructure of *Sargassum pallidum* in Daya Bay, China. **Environmental Monitoring and Assessment**. 186:87–95.

Lippert H, Iken K, Rachhor E, Wiencke C. **2001**. Epifauna associated with macroalgae in the Kongsfjord. **Polar Biology**. 24: 512-522.

Lombardi AT, Vieira AAH. **1998**. Copper and lead complexation by high molecular weight compounds produced by *Synura sp.* (Chrysophyceae). **Phycology**. 37: 34-39.

Lloyd CW, Pearce KJ, Rawlings DJ, Ridge RW, Shaw PJ. **1987**. Endoplasmic microtubules connect the advancing nucleus to the tip of legume root hairs, but actin is involved in basipetal migration. **Cell Motility and Cytoskeleton** 8: 27-36.

Madronich S. **1992**. Implications of recent total atmospheric ozone measurements for biological active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. **Geophysical Research Letters**. 19: 37-40.

Maggs CA, Callow ME. **2002**. Algal Spores. **Encyclopedia of Life Sciences**. www.els.net.

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

Malea P, Haritonidis S. **1999**. Seasonal accumulation of metals by red alga *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papens from Thermaikos Gulf, Greece. **Journal of Applied Phycology**. 11: 503-509.

Malea P, Rijstenbil WJ, Haritonidis S. **2006**. Effects of cadmium, zinc and nitrogen status on non protein thiols in the macroalgae *Enteromorpha* spp. from the Scheldt Estuary (SW Netherlands, Belgium) and Thermaikos Gulf (N Aegean Sea, Greece). **Marine Environmental Research**. 62:45-60.

Mamboya FA, Prata PHB, Mtolera M, Bjork M. **1999**. The effect of copper on the daily growth rate and photosynthetic efficiency of the brown macroalga *Padina boergensenii*. In: Richmond, M.D. and Francis, J. (Eds.) **Proceedings of the Conference on Advances on Marine Sciences in Tanzania**. 185-192.

Mascarenhas JP. **1993**. Molecular Mechanisms of Pollen Tube Growth and Differentiation. **The Plant Cell**. 5: 1303-1314.

Matsushashi T, Harris P. 1990. Agar food gels. **Elsevier Applied Science**, New York.

McDonald AR, Garbary DJ, Mitman GG, Chen LC. **1992**. Rhodamine-phalloidin labelling of the actin cytoskeleton in *Porphyra leucosticta* (Bangiaceae, Rhodophyta). **Korean Journal Phycology**. 7: 161 - 166.

McNaughton EE, Goff LJ. **1990**. The role of microtubules in establishing nuclear spatial patterns in multinucleate green algae. **Protoplasma**. 157: 19-37

Medvedev SS. **2012**. Mechanisms and Physiological Role of Polarity in Plants. **Russian Journal of Plant Physiology**. 59: 502–514.

Melo RA. **1998**. *Gelidium* commercial exploitation: natural resources and cultivation. **Journal Applied Phycology**. 10: 303–14.

Mitchell DL, Jen J, Cleaver JE. **1992**. Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated with solar (ultraviolet B) radiation. **Nucleic Acids Research**. 20: 225-229.

Mizuta S, Katoh S, Harada T, Yamada H, Okuda K, Morinaga T. **1991**. Involvement of cytoskeletal microtubules in microfibrillar patterns in the cell walls of the developing coenocytic green alga *Boodlea coacta*. **Botanica Marina**. 34:417-424.

Morejohn LC, Fosket D. **1986**. Inhibition of plant microtubule polymerization in vitro by the phosphoric amide herbicide amiprophosmethyl. **Science**. 224:874-876.

Murano E, Jelluš V, Piras A, Toffanin R. **1998**. Cell wall polysaccharides from *Gelidium* species: physico-chemical studies using MRI techniques. **Journal of Applied Phycology**. 10: 315-322.

Najeeb U, Jilani G, Ali S, Sarwar M, Xu Li Zhou W. **2011**. Insights into cadmium induced physiological and ultra-structural disorders in *Juncus effusus* L. and its remediation through exogenous citric acid. **Journal of Hazardous Materials**. 186: 565–574.

Nebenführ A, Staehelin, LA. **2001**. Mobile factories: Golgi dynamics in plant cells. **Trends Plant Science**. 6: 160–167.

Noguchi T, Watanabe H, Suzuki R. **1998**. Effects of brefeldin A on the Golgi apparatus, the nuclear envelope, and the endoplasmic reticulum in a green alga, *Scenedesmus acutus*. **Protoplasma**. 201: 202-212.

Noriega GO, Balestrasse KB, Batlle A. **2007**. Cadmium induced oxidative stress in soybean plants also by the accumulation of d-aminolevulinic acid. **Biometals**. 20:841–851.

Northcote DH. **1985**. Cell organelles and their function in biosynthesis of cell-wall components: Control of cell-wall assembly during differentiation. In: Higuchi T (Ed.) Biosynthesis and biodegradation of wood components. **Academic Press, New York**.

Norton TA, Melkonian M, Andersen RA. **1996**. Algal biodiversity. **Journal of Applied Phycology**. 35: 308-326.

Okuno E, Nakajima T, Yoshimura EM, Hiodo F, Fausto AMF, Paes WS, Umisedo NK, Otsubo ES. **1996**. Radiação ultravioleta solar em São Paulo, Chiba, Calafate e Ilha de Páscoa. RBE. **Caderno de Engenharia Biomédica**. 12: 143-153.

Ott DW. **1992**. The role of the cytoskeleton in organelle translocation in *Voueheria longieaulis*. In: Menzel D (ed) The cytoskeleton of the algae. CRC Press, Boca Raton, pp 255-272.

Ouriques LC. **2002**. Padrões de germinação e aspectos ultra-estruturais de esporos de Rhodophyta. **Tese** (Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”). Rio Claro, SP. 107p. 2002.

Ouriques LC, Schmidt EC, Bouzon ZL. **2012**. The mechanism of adhesion and germination in the carpospores of *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* (Rhodophyta, Bangiales). **Micron**.43:269-77.

Pavia H, Cervin G, Lindgren A, Aberg P. **1997**. Effects of UV-B radiation and simulated herbivory on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. **Marine Ecology Progress Series**. 157:139–146.

Penniman CA, Mathieson AC, Penniman CE. **1986**. Reproductive phenology and growth of *Gracilaria tikvahiae* McLachlan (Gigartinales,

Rhodophyta) in the Great Bay Estuary, New Hampshire. **Botanica Marina**. 29:147–154.

Pekey H. **2006**. The distribution and sources of heavy metals in Izmit Bay surface sediments affected bay polluted stream. **Marine Pollution Bulletin**. 52: 1197–1208.

Perreault F, Dionne J, Didur O, Juneau P, Popovic R. **2011**. Effect of cadmium on photosystem II activity in *Chlamydomonas reinhardtii*: alteration of O–J–I–P fluorescence transients indicating the change of apparent activation energies within photosystem II. **Photosynthesis Research**. 107:151–157.

Pessoa MF. **2012**. Harmful effects of UV radiation in Algae and aquatic macrophytes – A review. **Emirates Journal of Food and Agriculture**. 24: 510-526.

Peter NT, Kropf DL. **2010**. Asymmetric Microtubule Arrays Organize the Endoplasmic Reticulum During Polarity Establishment in the Brown Alga *Silvetia compressa*. **Cytoskeleton**. 67:102-111.

Pillai MC, Baldwin JD, Cherr GN. **1992**. Early development in an algal gametophyte: role of the cytoskeleton in germination and nuclear translocation. **Protoplasma**. 170:34 - 45.

Pinto E, Sigaud-Kutner TCS, Leitão MAS, Okamoto OK, Morse D, Colepicolo P. **2003**. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. **Journal of Phycology**. 39: 1008-1018.

Polo LK, Felix MR, Kreusch M, Pereira DT, Costa GB, Simioni C, Ouriques LC, Chow F, Ramlov F, Maraschin M, Bouzon ZL, Schmidt EC. **2014**. Photoacclimation Responses of the Brown Macroalga *Sargassum Cymosum* to the Combined Influence of UV Radiation and Salinity: Cytochemical and Ultrastructural Organization and Photosynthetic Performance. **Photochemistry and Photobiology**. 90(3):560-73.

Poppe F, Hanelt D, Wiencke C. **2002**. Changes in ultrastructure, photosynthetic activity and pigments in the Antarctic Red Alga *Palmaria decipiens* during acclimation to UV radiation. **Botanica Marina**. 45: 253–61.

- Poppe F, Schmidt RAM, Hanelt D, Wiencke C. **2003**. Effects of UV radiation on the ultrastructure of several red algae. **Phycological Research**. 51: 11-19.
- Pueschel CM. **1979**. Ultrastructure of tetrasporogenesis in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). **Journal of Phycology**. 15:409-424.
- Pueschel CM. **1990**. Cell structure. In: Cole, K. M.; Sheath, R. G. *Biology of the Red Algae*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 4 - 41.
- Rajagopal S, Murthy SD, Mohanty P. **2000**. Effect of ultraviolet-B radiation on intact cells of the cyanobacterium *Spirulina platensis*: characterization of the alterations in the thylakoid membranes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**. 54(1):61-6.
- Ratkevicius N, Correa JA, Moenne A. **2003**. Copper accumulation, synthesis of ascorbate and activation of ascorbate peroxidase in *Enteromorpha compressa* (L.) Grev. (Chlorophyta) from heavy metal-enriched environments in northern Chile. **Plant, Cell & Environment**. 26:1599–1608.
- Ritzenthaler C, Nebenführ A, Movafeghi A, Stussi-Graud C, Behnia L, Pimpl P, Staehelin LA, Robinson DG. **2002**. Reevaluation of the effects of brefeldin A on plant cells using tobacco Bright Yellow 2 cells expressing Golgi-targeted green fluorescent protein and COPI antisera. **The Plant Cell**. 14: 237-261.
- Robinson KR, Wozniak M, Pu R, Messerli M. **1999**. Symmetry breaking in the zygotes of the fucoid algae: controversies and recent progress. **Current Topics in Developmental Biology**. 44: 101–125.
- Robinson DG, Langhans M, Saint-Jore-Dupas C, Hawes C. **2008**. BFA effects are tissue and not just plant specific. **Trends in Plant Science**. 13: 405-408.
- Rocchetta I, Leonardi PI, Amado Filho GM, Molina MDR, Conforti V. **2007**. Ultrastructure and X-ray microanalysis of *Euglena gracilis* (Euglenophyta) under chromium stress. **Phycologia**. 46:300–306.

Roleda MY, Van de Pool WH, Hanelt D, Wiencke C. **2004.** PAR and UVBR effects on photosynthesis, viability, growth and DNA in different life stages of two coexisting Gigartinales: implications for recruitment and zonation pattern. **Marine Ecology Progress Series.** 281: 37-50.

Roleda MY, Campana GL, Wiencke C, Hanelt D, Quartino ML, Wulff A. **2009.** Sensitivity of Antarctic *Urospora penicilliformis* (Ulotrichales, Chlorophyta) to ultraviolet radiation is life-stage dependent. **Journal Phycology.** 45: 600-609.

Roleda MY, Nyberg CD, Wulff A. **2012.** UVR defense mechanisms in eurytopic and invasive *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta). **Physiologia Plantarum.** 146: 205–216.

Rousseaux MC, Ballaré CL, Giordano CV, Scopel AL, Zima AM, Swarcberg-Bracchitta M, Searles PS, Caldwell MM, Díaz SB. **1999.** Ozone depletion and UVB radiation: impact on plant DNA damage in southern South America. **Proceedings of National Academic Sciences-United States America.** 96: 15310-15315.

Russel CA, Guiry MD, McDonald AR, Garbary DJ. **1996.** Actin-mediated chloroplast movement in *Griffithsia pacifica* (Ceramiales, Rhodophyta). **Phycological Research.** 44: 57-61.

Rutten TLM, Kuniman B. **1993.** Brefeldin A effects on tobacco pollen tubes. **European Journal of Cell Biology.** 61: 247-255.

Saint-Jore CM, Evins J, Batoko H, Brandizzi F, Moore I, Hawes C. **2002.** Redistribution of membrane proteins between the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum in plants is reversible and not dependent on cytoskeletal networks. **The Plant Journal.** 29: 661-678.

Santee ML, Read WG, Waters JW, Froidevaux GL, Manney GL, Flower DA, Jarnot RF, Harwood RS, Peckham GE. **1995.** Interhemispheric differences in polar stratospheric HNO₃, H₂O, ClO and O₃. **Science.** 267: 849-852.

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

Santos RW, Schmidt EC, Martins RP, Latini A, Maraschim M, Horta PA, Bouzon ZL. **2012**. Effects of Cadmium on Growth, Photosynthetic Pigments, Photosynthetic Performance, Biochemical Parameters and Structure of Chloroplasts in the Agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales). **American Journal of Plant Sciences**. 3: 1077-1084.

Santos R, Schmidt EC, Bouzon ZL. **2013**. Changes in ultrastructure and cytochemistry of the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales) treated with cadmium. **Protoplasma**. 250:297–305.

Santos RW, Schmidt EC, Felix MRL, Polo LK, Kreuzsch M, Pereira DT, Simioni C, Chow F, Ramlov F, Maraschin M, Bouzon ZL. **2014**. Bioabsorption of cadmium, copper and lead by the red macroalga *Gelidium floridanum*: physiological responses and ultrastructure features. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 105: 80-89.

Satiat-Jeunemaitre B, Hawes C. **1992**. Reversible dissociation of the plant Golgi apparatus by brefeldin A. **Biology of the Cell**. 74: 325-328.

Satiat-Jeunemaitre B, Cole L, Bourett T, Howard R, Hawes C. **1996**. Brefeldin A effects in plant and fungal cells: something new about vesicle trafficking? **Journal of Microscopy**. 181:162–177.

Scariot LA. **2010**. Efeitos da radiação ultravioleta-B na germinação e desenvolvimento dos tetrásporos de *Gelidium floridanum* (Gelidiales, Rhodophyta): crescimento, morfologia e ultraestrutura. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal. 107p.

Scariot LÂ, Rover T, Zitta CS, Horta PA, Oliveira EC, Bouzon ZL. **2013**. Effects of UV-B radiation on *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Gelidiales): germination of tetraspores and early sporeling development. **Journal of Applied Phycology**. 25:537- 544.

Schindler T, Bergfeld R, Hohl M, Schopfer P. **1994**. Inhibition of Golgi-apparatus function by brefeldin A in maize coleoptiles and its consequences on auxin-mediated growth, cell-wall extensibility and secretion of cell-wall proteins. **Planta**. 192: 404-413.

Schmidt EC, Scariot LA, Rover T, Bouzon ZL. **2009**. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. **Micron**. 40: 860-869.

Schmidt EC, Nunes BG, Bouzon ZL. **2010a**. Effect of ultraviolet-B radiation on growth, photosynthetic pigments, and cell biology of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) macroalgae brown strain. **Photosynthetica**. 48: 161-172.

Schmidt ÉC, Maraschin M, Bouzon ZL. **2010b**. Effects of UVB radiation on the carragenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales): changes in ultrastructure, growth, and photosynthetic pigments. **Hydrobiologia**. 649: 171-182.

Schmidt ÉC, Santos R, Horta PA, Maraschin M, Bouzon ZL. **2010c**. Effects of UVB radiation on the agarophyte **Gracilaria domingensis** (Rhodophyta, Gracilariales): Changes in cell organization, growth and photosynthetic performance. **Micron**. 41: 919-930.

Schmidt ÉC, Pereira B, Santos R, Gouveia C, Costa GB, Faria GSM, Scherner F, Horta PA, Martins RP, Latini A, Ramlov F, Maraschin M, Bouzon ZL. **2012a**. Responses of the macroalgae *Hypnea musciformis* after in vitro exposure to UV-B. **Aquatic Botany**. 100: 8-17.

Schmidt ÉC, Horta PA, Bouzon ZL, Santos R, Martins RP, Maraschin M, Latini A, Faveri C, Ramlov F. **2012b**. 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**. 1: 1-15.

Schmidt ÉC, Pereira B, Pontes CLM, Santos R, Scherner F, Horta PA, Martins RP, Latini A, Maraschin M, Bouzon ZL. **2012c**. Alterations in architecture and metabolism induced by ultraviolet radiation-B in the carragenophyte *Chondracanthus teedei* (Rhodophyta, Gigartinales). **Protoplasma**. 249: 353-367.

Schreiber U, Bilger W, Neubauer C. **1994**. Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. **Ecological Studies**. 100: 49-70.

Simioni C, Rover T, Schmidt EC, Felix MRL, Polo LK, Santos R, Costa GB, Kreusch M, Pereira DT, Ouriques C, Bouzon ZL. **2014**. Effects of brefeldin A on the endomembrane system and germ tube formation of the tetraspore of *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Florideophyceae). **Journal Phycology**. DOI: 10.1111/jpy.12187

Smith RC, Baker KS, Holm-Hansen O, Olson RS. **1980**. Photoinhibition of photosynthesis in natural waters. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. 31: 585-592.

Sonntag B, Summerer M, Sommaruga R. **2007**. Sources of mycosporine-like amino acids in planktonic *Chlorella-bearing* ciliates (Ciliophora). **Freshwater Biology**. 52: 1476-1485.

Staxén I, Borman JF. **1994**. A morphological and cytological study of *Petunia hybrida* exposed to UV-B radiation. **Physiology Plantarum**. 91: 735-740.

Steele-King CG, Evans DE, Satiat-Jeunemaitre B, Hawes C. **1999**. Plant cells show an acquired insensitivity to Brefeldin A. **Journal of Experimental Botany**. 50: 1465-1469.

Talarico L. **1996**. Phycobiliproteins and phycobilisomes in red algae: adaptive responses to light. **Scientia Marina**. 60: 205–22.

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

Talarico L. **2002**. Fine structure and X-ray microanalysis of a red macrophyte cultured under cadmium stress. **Environmental Pollution**. 120:813–821.

Taylor LP, Hepler PK. **1997**. Pollen Germination and tube growth. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 48:461–91.

Thapar R, Srivastava AK, Bhargava P, Mishra Y, Rai LC. **2008**. Impact of different abiotic stresses on growth, photosynthetic electron transport chain, nutrient uptake and enzyme activities of Cu-acclimated *Anabaena doliolum*. **Journal of Plant Physiology**. 165:306–316.

Templeton DM, Liu Y. **2010**. Multiple roles of cadmium in cell death and survival, **Chemico-Biological Interactions**. 188:267–75.

Tevini M, Teramura AH. **1989**. UV-B effects on terrestrial plants. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. 50: 479-487.

Tse Chung Y, Lo SW, Hillmer S, Dupree P, Jiang L. **2006**. Dynamic response of prevacuolar compartments to brefeldin a in plant cells. **Plant Physiology**. 142: 1442-1459.

Tsekos I. **1996**. The supermolecular organization of red algal cell membranes and their participation in the biosynthesis and secretion of extracellular polysaccharides: a review. **Protoplasma**. 193: 10-32.

Tsekos I, Orogas N, Dimopoulou A. **2007**. Effects of brefeldin A on the structure and function of the Golgi apparatus in the marine red alga *Erythrocladia subintegra* Rosenvinge. **Journal of Biological Research**. 7: 29 – 39.

Vallee BL, Ulmer DD. **1972** Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. **Annual Reviews**. 91-128.

Vecchia FD, La Rocca N, Moro I, De Faveri S, Andreoli C, Rascio N. **2005**. Morphogenetic, ultrastructural and physiological damages suffered by submerged leaves of *Elodea canadensis* exposed to cadmium. **Plant Sciences**. 168:329–38.

Vecchia FD, Marzocchi M, Maistro S, Moro I. **2012**. Morpho-physiological effects of cadmium on two *Ulva* species. **Algological Studies**. 138: 13-25(13).

Villares R, Puente X, Carballeira A. **2002**. Seasonal variation and background levels of heavy metals in two green seaweeds. **Environmental Pollution**. 119(1), 79–90.

Verbruggen N, Hermans C, Schat H. **2009**. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. **Current Opinion in Plant Biology**. 12:364–72.

- Wang Q, Kong L, Hao H, Wang X, Lin J, Baluska F. **2005**. Effects of Brefeldin A on Pollen germination and Tube Growth. Antagonistic Effects on Endocytosis and Secretion. **Plant Physiology**. 139: 1692–1703.
- Wang X. **2005**. Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses. **Plant Physiology**. 139: 566-573.
- Wellburn AR. **1994**. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**. 144: 307–313.
- Williamson RE. **1986**. Organelle movements along actin filaments and microtubules. **Plant Physiology**. 82:631-634.
- Worrest RC. **1982**. Review of literature concerning the impact of UV-B radiation upon marine organisms. In: Calkins J. (Eds.). The role of solar ultraviolet radiation in marine ecosystems. **Plenum Press**. 429-457.
- Wu TM, Lee TM. **2008**. Regulation of activity and gene expression of antioxidant enzymes in *Ulva fasciata* Delile (Ulvales, Chlorophyta) in response to excess copper, **Phycologia**. 47(4):346–360.
- Xia JR, Li YJ, Lu J, Chen B. **2004**. Effects of copper and cadmium on growth, photosynthesis, and pigment content in *Gracilaria lemaneiformis*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 73: 979-986.
- Xu J, Gao K. **2008**. Growth, pigments, UV-absorbing compounds and agar yield of the economic red seaweed *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) grown at different depths in the coastal waters of the South China Sea. **Journal of Applied Phycology**. 20:681–686.
- Xu J, Gao K. **2010**. UV-A enhanced growth and UV-B induced positive effects in the recovery of photochemical yield in *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta). **Journal Photochemistry and Photobiology B**. 100: 117–122.

Yamazaki Y. **1988**. Change of Birefringence in Cell Wall of Trichoblasts of *Cibasis* and *Tradescantia*. **Plant Biology**.30: 58–62.

Yasuhara H, Sonobe H, Shibaoka H. **1995**. Effects of brefeldin A on the formation of the cell plate in tobacco BY-2 cells. **European Journal of Cell Biology**. 66: 274-281.

Ying RR, Qiu RL, Tang YT, Hu PJ, Qiu H, Chen HR et al. **2010**. Cadmium tolerance of carbon assimilation enzymes and chloroplast in Zn/Cd hyperaccumulator *Picris divaricata*. **Journal of Plant Physiology**. 167:81–87.

Zitta CS, Rover T, Hayashi L, Bouzon ZL. **2013**. Callus ontogeny of the *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) brown tetrasporophyte strain. **Journal of Applied Phycology**. 25: 615 – 629.

Zhang G, Staehelin L. **1992**. Functional compartmentalization of the Golgi apparatus of plant cells. An immunocytochemical analysis of high pressure frozen and freeze-substituted sycamore maple suspension culture cells. **Plant Physiology**. 99: 1070-1083.