

Ticiane Rover

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ULTRAESTRUTURAL DO
PROCESSO DE EMBRIOGÊNESE DE *Sargassum cymosum* C. AGARDH
(PHAEOPHYCEAE, FUCALES) COMO MODELO DE ESTUDO DE
GERMINAÇÃO DE ALGAS PARDAS TROPICAIS, E SUA ALTERAÇÃO
PELA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação
em Biologia Celular e do Desenvolvimento da
Universidade Federal de Santa Catarina para a
obtenção do Título de doutora em Ciências – Área
de concentração: Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Zenilda Laurita Bouzon

Florianópolis

2014

Dedico este trabalho aos meus pais e minha irmã, que me ensinaram muito sobre o amor e a perseverança frente às adversidades.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que me guia e me dá força todos os dias. Aos meus pais, Antonio e Izabel, por todo amor, dedicação, apoio incondicional, carinho e principalmente pela compreensão do “diferente” caminho que segui. Também agradeço a minha irmã e amiga Gisele, que mesmo longe sempre está tão presente em todos os momentos. Aos meus familiares, tias, tios, primos que sempre proporcionam momentos de alegrias e descontração. Ao Gustavo por todo o carinho, amor, apoio e compreensão, mesmo chegando no final desta etapa, foi muito importante.

A minha orientadora, Prof.^a Zenilda L. Bouzon, por todos os ensinamentos, oportunidades, compreensão e, o mais importante, por ter acreditado no meu trabalho. A Profa. Whitney Hable, que me recebeu em seu laboratório para a realização do doutorado sanduíche, por todo o conhecimento e experiências ensinados, além, da amizade que permaneceu. Também a Prof.^a Luciane Ouriques pelo apoio.

Agradeço também as minhas amigas Aline e Leila, que mesmo distantes sempre estão por “perto” apoiando, aconselhando, torcendo e sendo as melhores amigas do mundo. E além disso, pela leitura da tese que a Aline fez.

Também a amiga e colega de trabalho Carmen, por todo apoio, força, experiências e ajuda em todos os trabalhos realizados. Todo o seu apoio foi muito importante para toda esta fase.

Aos demais colegas e amigos do laboratório, Eder, Marthielen, Luzk, Mariane, Debora, Chirle, Rodrigo, Giulia, por todo apoio, ensinamentos, força e amizade.

Aos professores que gentilmente aceitaram fazer parte da banca de avaliação deste trabalho.

Ao laboratório central de microscopia eletrônica (LCME) e seus funcionários, principalmente a Eliana.

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro. E a todos os demais que de alguma forma contribuíram para a minha formação e a realização deste trabalho, recebam a minha gratidão!

RESUMO

Sargassum cymosum é uma alga parda da ordem Fucales, conspícua da flora marinha bentônica de regiões tropicais e temperadas. É encontrada, principalmente, nos costões rochosos protegidos, onde podem formar extensos bancos, sendo assim as algas mais representativas em biomassa e um importante representante na dinâmica ecológica destes ambientes costeiros. Estudos desenvolvidos ao longo de vários anos demonstram o interesse nas algas pardas da ordem Fucales como um modelo de estudo do processo de embriogênese. No entanto, muitos trabalhos referentes a estes processos são encontrados somente para espécies do gênero *Fucus* e *Silvetia*, algas presentes predominantemente em regiões frias. Sendo assim, o trabalho visou desenvolver estudos iniciais para a produção de um modelo de estudo de desenvolvimento de uma alga parda de regiões tropicais. O desenvolvimento inicial de zigotos e embriões de *S. cymosum* foi caracterizado e comparado com o padrão de desenvolvimento estabelecido para todas as algas fucóides, apresentando algumas características que diferem dos demais gêneros como: o zigoto permanece aderido ao receptáculo no início do desenvolvimento; a segunda divisão celular que forma a célula rizoidal; o eixo polar é fixado 2 horas após a fecundação e; núcleo extremamente pequeno. Quando analisado o envolvimento dos componentes do citoesqueleto neste processo, pode-se indicar que os microtúbulos e os filamentos de actina tem papel importante no desenvolvimento, pois, as amostras tratadas com colchicina sofreram polarização mas, as divisões celulares não foram observadas e, as tratadas com citocalasina B, além de não dividir, também não sofreram polarização. Além do citoesqueleto, o sistema de endomembranas também mostrou-se importante para o desenvolvimento de *S. cymosum*, pois quando tratados os zigotos com BFA, inibidor dos corpos de Golgi, este processo foi afetado. Tal tratamento afetou o correto funcionamento dos corpos de Golgi, assim, comprometendo a formação de parede celular e membrana celular, importantes para a determinação do eixo polar, afetando diretamente o dimensionamento do crescimento celular. Também contribuiu para a alta taxa de fusão de vesículas de compostos fenólicos, os fisóides. Esta fusão dos fisóides ocupou grande parte do citoplasma impedindo os demais processos citoplasmáticos, afetando diretamente o desenvolvimento desta alga. Além disto tudo, os zigotos e embriões são estruturas com simplicidade celular, sendo assim, são extremamente sensíveis aos fatores ambientais. Para avaliar tal característica, plântulas jovens de *S. cymosum* foram tratadas com radiações UVB e UVA, e associação destas radiações. Estes tratamentos afetaram de diferentes formas as plântulas, com alterações nas taxas de crescimento, principalmente, no tratamento PAR+UVB que apresentou o menor valor; alterou levemente a concentração dos diferentes tipos de pigmentos; redução significativa na concentração de compostos fenólicos e; alterações na morfologia ultraestrutural especialmente nas células corticais com, espaçamento da parede celular, degradação dos fisóides e, alterações nos cloroplastos. Desta forma, as alterações nas condições naturais observadas, especialmente com as variações e aumentando da incidência da radiação UV, poderia afetar o recrutamento de *S. cymosum* em leitos naturais, com mudanças na estrutura da comunidade e redução da abundância da espécie no ambiente.

Palavras-chave: *Sargassum cymosum*, desenvolvimento polarizado, citoesqueleto, sistema de endomembranas, zigoto, embrião, plântulas, RUV.

ABSTRACT

Sargassum cymosum is a brown algae of the order Fucales, conspicuous benthic marine flora of tropical and temperate regions. It is found, mainly, in protected rocky shores, where they can form extensive banks, thus being the most representative in algal biomass and a major representative of the ecological dynamics of these coastal environments. Studies conducted over several years show interest in brown algae of the order Fucales as a study model of embryogenesis. However, many papers related to these processes are found only for species of *Fucus* and *Silvetia*, algae present predominantly in cold regions. Therefore, the initial development work aimed to produce a model for studying the development of tropical brown alga studies. The initial development of zygotes and embryos of *S. cymosum* was characterized and compared with the established pattern of development for all fucoides algae, presenting some features that differ from other genres such as: the zygote remains attached to the receptacle at the beginning of development; the second cell division that forms the rhizoidal cell; the polar axis and fixed 2 h after fertilization and; extremely small nucleus. When examined the involvement of cytoskeletal components in this process, could indicate that microtubules and actin filaments plays an important role in development, for the samples treated with colchicine undergone polarization but cell divisions were observed, and the treated with cytochalasin B, in addition to no cell divisions, did not suffer polarization. Besides cytoskeletal, the endomembrane system also proved important for the development of *S. cymosum* because when treated the zygotes with BFA, inhibitor of Golgi bodies, this process is affected. Such treatment affected the correct functioning Golgi bodies, thus jeopardizing the cell wall formation and of membrane cellular, important for determining the polar axis, directly affecting the sizing of cell growth. Also contributed to the high rate of vesicle fusion of phenolic compounds, fucoides. This fusion of fucoides occupied much of the cytoplasm, preventing other cytoplasmic processes, directly affecting the development of this alga. Besides all this, zygotes and embryos are cell structures with simplicity, therefore, are extremely sensitive to environmental factors. To evaluate this characteristic, young plants of *S. cymosum* were treated with UVB and UVA radiation, and combination of these radiations. These treatments affected differently seedlings with changes in growth rates, especially in the treatment PAR + UVB showed the lowest value; slightly alter the concentration of different types of pigments; significant reduction in the concentration of phenolic compounds and; changes in ultrastructural morphology especially in cortical cells with spacing of cell wall degradation fucoides and changes in chloroplasts. Thus, the observed changes in natural conditions, especially with the variations and increasing the incidence of UV radiation could affect the recruitment of *S. cymosum* in natural beds with changes in community structure and reduction of species abundance in the environment.

Keywords: *Sargassum cymosum*, polarized development, cytoskeleton, endomembrane system, zygote, embryo, seedling, UVR.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 01

- Figura 01:** Os mecanismos pelos quais as divisões celulares assimétricas geram diversos tipos de células durante o desenvolvimento (Bisgrove, Kropf, 2007).....17
- Figura 02:** Representação dos eventos iniciais do desenvolvimento durante o estabelecimento da polaridade em zigotos das algas fucoides (Hable e Hart, 2010).....19
- Figura 03:** Diagrama esquemático dos estágios iniciais do desenvolvimento em *Fucus*. (Goodner e Quatrano, 1993).....20
- Figura 04:** Divisões assimétricas em *Silvetia compressa* (Bisgrove e Kropf, 2007).....21
- Figura 05:** Desenho esquemático da seleção e amplificação da polarização. (Kropf *et al.*, 1999).....23
- Figura 06:** Crescimento do rizóide. (Kropf, 1992).....25
- Figura 07:** Distribuição dos microtúbulos no primeiro ciclo celular do zigoto. (Kropf, 1992).....25
- Figura 08:** a) Desenho esquemático de *Sargassum*. b) Receptáculos masculinos. c) Receptáculos femininos. d) Vesículas flutuadoras. e) Aspecto do corte transversal do filóide (Coimbra, 2006).....29
- Figura 09:** Representação esquemática do processo de formação de zigotos.30

CAPITULO 02

- Figura 01:** A: Zigoto liberados e B: Germinação zigoto.....43
- Figura 02:** Estrutura reprodutiva de *S. cymosum*. a: Receptáculos de *S. cymosum*. b: Receptáculos com os zigotos formados e aderidos à superfície através de mucilagem transparente. c: Zigotos de *S. cymosum*.44

Figura 03: Zigotos e embriões de *S. cymosum*. a) Zigoto com 3 horas. b) Zigoto com 4 horas. c) Embrião de 6 horas. d) Embrião de 8 horas. e) Embrião de 9 horas. f e g) Embriões com 10 horas. h - i) Embrião com 11 horas.46

Figura 04: Embriões de *S. cymosum*. a) Embrião de aproximadamente 20 horas de desenvolvimento. b) Embrião com cerca de 48 horas de desenvolvimento. Escala: 200 um.....47

Figura 05: Zigotos e embriões de *S. cymosum*. a-c) Zigotos de 3 horas AF. a) coloração ATO. b) Coloração CBB. c) Coloração PAS. d-f) Zigotos de 4 horas AF corados com ATO, CBB e PAS. g-i) Embriões de 6 horas AF g) corado com ATO. h) corados com CBB corados com PAS. j-l) Embriões de 8 a 9 horas AF. j) corados com ATO e k) corados com CBB l) corados com PAS...49

Figura 06: Embriões de *S. cymosum* corados com ATO, CBB e PAS. a-c) Embriões de 8 a 9 horas AF corados com ATO, CBB e PAS. b) d-f) Embriões de 10 horas AF corados com ATO, CBB e PAS. g-i) Embriões de 13 horas AF corados com ATO, CBB e PAS. j-l) Embriões de 20 horas AF coradoscom ATO, CBB e PAS.....51

Figura 07: Zigoto e embrião de *S. cymosum* em microscopia de varredura a laser - confocal. Escalas: 40 µm.....53

Figura 08: Zigoto de *S. cymosum* em MET.55

Figura 09: Zigoto de *S. cymosum* em MET.....57

Figura 10: Embrião de *S. cymosum* em MET.58

Figura 11: Embrião de *S. cymosum* em MET.....59

CAPITULO 03

Figura 1: Esquema mostrando o fracionamento dos receptáculos com zigotos aderidos e depois transferidos para a lâmina.....69

Figura 2: Esquema indicando a distribuição dos receptáculos/zigotos nas lâminas durante o tratamento com colchicina.....70

Figura 3: Esquema indicando a distribuição dos receptáculos/zigotos nas lâminas durante o tratamento com citocalasina B.	70
Figura 4: Zigotos de <i>S. cymosum</i> mantidos por 12 horas AF em água do mar esterelizada (controle).	72
Figura 5: Zigotos de <i>S. cymosum</i> tratados com colchicina 5 μ M e 10 μ M por 12 horas.	74
Figura 6: Zigotos de <i>S. cymosum</i> tratados com citocalasina B 50 mM e 100 mM por 12 horas.	75
Figura 7: Zigotos de <i>S. cymosum</i> em microscopia confocal. A-F: Auto fluorescência da clorofila <i>a</i> , em vermelho.	76

CAPITULO 04

Figura 1: Zigotos de <i>S. cymosum</i> em microscopia de luz (ML). A,C,E,G,I: amostras tratadas com diferentes concentrações de brefeldina A (BFA). B,D,F,H,J: amostras colocadas em recuperação por mais 12 horas (totalizando 24 horas AF) em água do mar, sem adição de BFA. Escalas: 20 μ m.	89
Figura 2: Zigotos de <i>S. cymosum</i> em microscopia confocal após 12 horas de tratamento com BFA.	92
Figura 3: Zigotos controle de <i>S. cymosum</i> em microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	94
Figura 4: Zigotos de <i>S. cymosum</i> tratados com BFA 4 μ M por 12 horas em microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	95
Figura 5: Zigotos de <i>S. cymosum</i> tratados com BFA 8 μ M por 12 horas em microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	96
Figura 6: Zigotos de <i>S. cymosum</i> tratados com BFA 16 μ M por 12 horas em microscopia eletrônica de transmissão (MET)..	98

Figura 7: Zigotos de *S. cymosum* tratado com BFA 32 μ M por 12 horas em microscopia eletrônica de transmissão (MET). A: Visão geral do citoplasma. B-C: Detalhe de um agregado de fisóides. F: Agregado de.99

CAPITULO 05

Figura 1: Taxas de crescimento (TCs) de plântulas de *S. cymosum* após 7 dias de exposição aos tratamentos de radiação111

Figura 2: Morfologia geral de embriões de *S. cymosum* após o tratamento com radiação UV.....112

Figura 3: Microscopia de luz de plântulas de *S. cymosum* após exposição aos tratamentos de radiação ultravioleta, coradas com ATO..114

Figura 4: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) imagens de plântulas de *S. cymosum* controle (PAR).117

Figura 5: Microscopia eletrônica de transmissão (MET), imagens microscópicas de plântulas de *S. cymosum* tratadas com PAR + UVA.118

Figura 6: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) plântulas de *S. cymosum* tratadas com PAR + UVB.120

Figura 7: Microscopia eletrônica de transmissão (MET), plântulas tratadas de *S. cymosum* com PAR + UVA + UVB.121

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 04

Tabela 1: Contagem dos zigotos após 12 horas de tratamento com as diferentes concentrações de BFA.90

Tabela 2: Contagem dos zigotos com 24 horas, 12 horas em tratamento com BFA seguido de mais 12 horas de recuperação em água do mar esterelizada.....91

CAPITULO 05

Tabela 1: Pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenóides totais), teores de compostos fenólicos e capacidade de eliminação de plântulas DPPH *S. cymosum* após 7 dias de exposição aos tratamentos de radiação (n = 4, média ± DP).....113

Tabela 2: ANOVA análise de pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenóides totais), teores de compostos fenólicos e capacidade de eliminação DPPH de plântulas *S. cymosum* após 7 dias de exposição aos tratamentos de radiação (n = 4, média ± DP).....113

Tabela 3: Medidas das células corticais (CC) das plântulas de *S. cymosum* após 7 dias de exposição aos tratamentos de radiação (n = 30, média ± DP).....115

LISTA DE ABREVIATURAS

F2: galactanos sulfatados
VnF: proteína vitronectina
F: vesículas derivadas do Golgi
RUV: radiação ultravioleta
RUVA: radiação ultravioleta A
RUVB: radiação ultravioleta B
PAR: radiação fotossinteticamente ativa
L/E: luz e escuro
TC: taxa de crescimento
ML: microscopia de luz
MET: microscopia eletrônica de transmissão
ATO: azul de toluidina
PAS: ácido periódico de Shiff
CBB: Azul brilhante de Coomassie
AF: após fecundação
PC: parede celular
CC: células corticais
C: cloroplasto
M: mitocôndria
G: corpos de Golgi
N: núcleo
Nu: nucléolo
F: fisóides
Ve: vesículas
V: vesículas
P: plastoglóbulo
MT: microtúbulos
DMSO: dimetil sulfoxido
BFA: brefeldina A
EUA: Estados Unidos da América
UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina
LCME: Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
DPPH: atividade antioxidante
Clor. a: clorofila *a*
Clor. b: clorofila *b*
PAR: Luz branca
GR: taxa de crescimento

SUMÁRIO

CAPÍTULO 01.....	14
1. INTRODUÇÃO GERAL – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
1.1. Classe Phaeophyceae.....	14
1.2. Ordem Fucales (Phaeophyceae, Heterokontophyta).....	15
1.3. Desenvolvimento de algas da ordem Fucales.....	16
1.3.1. Participação do citoesqueleto no desenvolvimento de Fucales.....	22
1.3.1.1. Citoesqueleto - Filamentos de Actina.....	22
1.3.1.2. Citoesqueleto – Microtúbulos.....	24
1.3.1.3. Participação do sistema de endomembranas no desenvolvimento de Fucales.....	26
1.4. Efeito de fatores ambientais sobre o desenvolvimento e crescimento de zigotos e embriões de Fucales – Radiação UV.....	27
1.5. <i>Sargassum</i> C. Agardh.....	28
2. JUSTIFICATIVA.....	32
3. OBJETIVOS.....	33
3.1. Objetivo geral.....	33
3.2. Objetivos específicos.....	33
CAPÍTULO 02 - Caracterização ultraestrutural e estrutural de zigotos e embriões durante o desenvolvimento em <i>Sargassum cymosum</i> (Phaeophyceae, Fucales).....	34
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
2.1. Os efeitos da temperatura sobre a libertação e o desenvolvimento de zigotos de <i>S. cymosum</i>	38
2.2. Análises estatísticas.....	39
2.3. Cultura.....	39
2.4. Microscopia de luz (ML).....	39
2.5. Microscopia de varredura a laser – Confocal.....	40
2.6. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	40
3. RESULTADOS.....	42
3.1. Caracterização de desenvolvimento in vivo sob microscopia de luz (ML).....	44
3.2. Caracterização de desenvolvimento com testes citoquímicos observados em microscopia de luz (ML)	46
3.3. Caracterização do desenvolvimento do zigoto com observação por microscopia de varredura a laser – Confocal	51
3.4. Caracterização ultraestrutural do desenvolvimento com microscopia eletrônica de transmissão (TEM).....	53
4. DISCUSSÃO.....	59
CAPÍTULO 03 - Efeitos da colchicina e citocalasina B no desenvolvimento polarizado de zigotos de <i>Sargassum cymosum</i> (Phaeophyceae, Fucales).....	64
1. INTRODUÇÃO.....	65
2. MATERIAL E METODOS.....	67
2.1. Cultura.....	67

2.2. Experimentos com Colchicina e Citocalasina B.....	68
2.3. Análise da morfologia do processo de desenvolvimento.....	70
2.4. Análises em Microscopia Confocal de Varredura a Laser.....	70
3. RESULTADOS.....	70
4. DISCUSSAO.....	76

CAPÍTULO 04 - Efeito da brefeldina A em zigotos de *Sargassum cymosum* (Phaeophyceae, Fucales) durante o seu desenvolvimento inicial: efeitos no sistema de endomembranas, nas divisões celulares e organização celular.....

1. INTRODUÇÃO.....	81
2. MATERIAL E METODOS.....	84
2.1. Cultura.....	84
2.2. Tratamento com Brefeldina A (BFA)	84
2.3. Microscopia de luz (ML) e contagem.....	85
2.4. Microscopia de varredura a laser – Confocal.....	86
2.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	86
3. RESULTADOS.....	86
3.1. Observações em ML.....	86
3.2. Contagem.....	89
3.3. Observações com microscopia confocal.....	90
3.4. Observações em MET.....	92
4. DISCUSSAO.....	99

CAPÍTULO 05 - Efeitos da radiação ultravioleta sobre plântulas da macroalga parda *Sargassum cymosum* (Phaeophyceae, Fucales): alterações nas taxas de crescimento, pigmentos, citoquímica e organização ultraestrutural.....

1. INTRODUÇÃO.....	104
2. MATERIAL E METODOS.....	106
2.1. Cultura.....	106
2.2. Experimentos de radiação UV.....	107
2.3. Taxas de crescimento (GRS)	107
2.4. Análise dos pigmentos.....	107
2.5. Compostos fenólicos.....	108
2.6. Capacidade de varredura de radicais por DPPH.....	109
2.7. Microscopia de luz (ML)	109
2.8. Medidas de células corticais.....	109
2.9. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	109
2.10. Análise dos dados	109
3. RESULTADOS.....	110
3.1. Taxas de crescimento (TCs)	110
3.2. Pigmentos e compostos fenólicos totais.....	111
3.3. Observações em ML e citoquímica.....	113
3.4. Observações em MET.....	115
4. DISCUSSAO.....	121
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	129
REFERÊNCIAS	131

CAPÍTULO 01

1. INTRODUÇÃO GERAL – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Classe Phaeophyceae

A classe Phaeophyceae pertencente à divisão Ochrophyta, sendo conhecida como a classe das algas pardas (Oliveira, 2003). Um grupo quase totalmente marinho, envolvendo as algas mais conspícuas das águas temperadas, boreais e polares (Raven *et al.*, 2001). Formam um grupo homogêneo, que possui entre 1500 a 2000 espécies (Raven *et al.*, 2001; Reviere, 2006), as quais dominam os costões rochosos ao longo das regiões mais frias do planeta e ocorrem do mesolitoral até profundidades de 20 a 30 metros em águas claras (Raven *et al.*, 2001).

Entre as Phaeophyceae, há uma diversidade extraordinária na morfologia, como talos formados por filamentos microscópicos, em forma de crosta, pequenas lâminas e lâminas de grandes tamanhos providas de um apressório e de um estipe, sendo que algumas vezes os apressórios podem apresentar o formato de uma raiz ou de estolões (Oliveira, 2003).

As células vegetativas destas algas apresentam um núcleo, frequentemente central, contendo um ou vários plastídios providos ou não de pirenóides, sendo este quando presente, muitas vezes saliente e pedunculado (Reviere, 2006).

Os cloroplastos podem ser designados como feoplastos, pela sua cor e estrutura. São formados por tilacóides com porções agrupadas em trios e rodeados por quatro membranas, sendo que a mais externa se prolonga com a membrana externa do núcleo. Possuem clorofilas *a* e *c*,

carotenóides como xantofila, o qual confere aos membros dessa classe a sua cor característica marrom-escura ou verde-oliva, além da fucoxantina e dos compostos fenólicos, este, um dos principais componentes das algas pardas. A parede celular apresenta um esqueleto de celulose impregnado por fucanos sulfatados, polímeros de ácidos urônicos e alginatos, que também ocupam os espaços intercelulares e dão flexibilidade ao talo (Oliveira, 2003). O material de reserva desse grupo é o carboidrato laminarina, o qual fica armazenado em vacúolos (Raven *et al.*, 2001).

A reprodução das algas pardas pode ser isogâmica, com um gameta feminino e um masculino, ambos com flagelos (Oliveira, 2003). Ou oogâmica, onde somente o gameta masculino apresenta flagelos de tamanhos diferentes, sendo o anterior com fibrilas laterais, e o posterior liso. O gameta feminino (oosfera) é produzido no interior de um oogônio (estrutura sexuada feminina) e o gameta masculino (anterozóide) é produzido no anterídio (Oliveira, 2003). A reprodução quando sexuada, a fecundação da oosfera é externa e origina um zigoto, o qual se desenvolve em um esporófito diplóide. Quando a reprodução é assexuada, ocorre a formação dos esporângios no esporófito diplóide. Os esporângios sofrem meiose e os esporos liberados possuem a morfologia e os flagelos descritos acima e originam os gametófitos de sexos separados (Oliveira, 2003).

1.2 Ordem Fucales (Phaeophyceae, Heterokontophyta)

As algas Fucales são mundialmente distribuídas, diferindo nos gêneros presentes em cada região. Nos mares temperados do norte o *Fucus* Linnaeus é comum, enquanto que em águas tropicais e subtropicais o *Sargassum* C. Agardh está presente. Em águas australianas, *Cystophora* J. Agardh é um membro predominante da flora, com a grande *Durvillea* Bory de Saint-Vincent sendo comum em águas sub-antárticas (Lee, 2008).

Tanto a distribuição geográfica quanto a localização no costão rochoso de membro das Fucales, dependerá da capacidade do zigoto conseguir se estabelecer e germinar em diferentes condições ambientais (Chapman, 1995).

Os organismos desta ordem são parenquimatosos e com crescimento a partir de uma célula apical. A fase haplóide é caracterizada pela presença de uma oosfera e um anterozóide, sendo o restante do ciclo de vida diplóide (Lee, 2008).

1.3 Desenvolvimento de algas da ordem Fucales

O desenvolvimento de uma única célula, o zigoto, origina um organismo adulto complexo com tipos variados de células e tecidos. Este fenômeno é possível devido à grande habilidade de células em crescimento embrionário adquirirem identidades diversas, um feito que, muitas vezes é realizado por divisões celulares assimétricas (Bisgrove e Kropf, 2007).

As divisões celulares assimétricas produzem células-filhas diferentes e podem, assim, iniciar o processo de diferenciação celular, caracterizando um desenvolvimento com polarização celular. Divisões celulares assimétricas são conhecidas por desempenhar um papel importante no desenvolvimento de todas as plantas e em diversas algas (Bisgrove e Kropf, 2007).

Muitos estudos foram realizados sobre a polarização e fecundação celular em zigotos de algas do gênero *Fucus* Linnaeus e *Silvetia* E. Serrão, T. O. Cho, S. M. Boo & S. H. Brawley, dentre eles podemos destacar os trabalhos de Fowler e Quatrano (1995), Quatrano e Shaw (1997), Hadley *et al.* (2006) e Levring (1952). Além do trabalho de Farmer e Williams (1898) que concluíram que todo o processo de fertilização é rápido, sendo completado em torno de 10 minutos para o gênero *Fucus*.

Devido à relevante importância de divisões assimétricas no desenvolvimento, se tem investigado intensamente os mecanismos celulares envolvidos neste processo em variados organismos, como algas e plantas. Frequentemente há 3 diferentes caminhos pelos quais os produtos celulares em uma divisão assimétrica adquirem identidades diferentes (Fig. 01): A- Fatores externos que atuam no desenvolvimento podem diferencialmente dividir os componentes citoplasmáticos entre as células filhas durante a divisão. Neste caso, cada célula herda um conjunto diferente de

informações citoplasmáticas que a levam a um desenvolvimento único; B- Em alguns casos, o plano de divisão está posicionado de tal forma que as células filhas são colocadas em posições diferentes dentro do organismo em desenvolvimento. Cada célula, então, recebe um conjunto único de sinais de posicionamento a partir de células vizinhas ou do ambiente que influenciará o seu destino, ou seja, o destino desta nova célula irá depender dos sinais recebidos a partir das células vizinhas; C- Uma divisão assimétrica pode produzir células filhas de diferentes tamanhos e/ou formas, e essas diferenças morfológicas determinam o caminho do desenvolvimento que cada célula vai seguir (Bisgrove e Kropf, 2007).

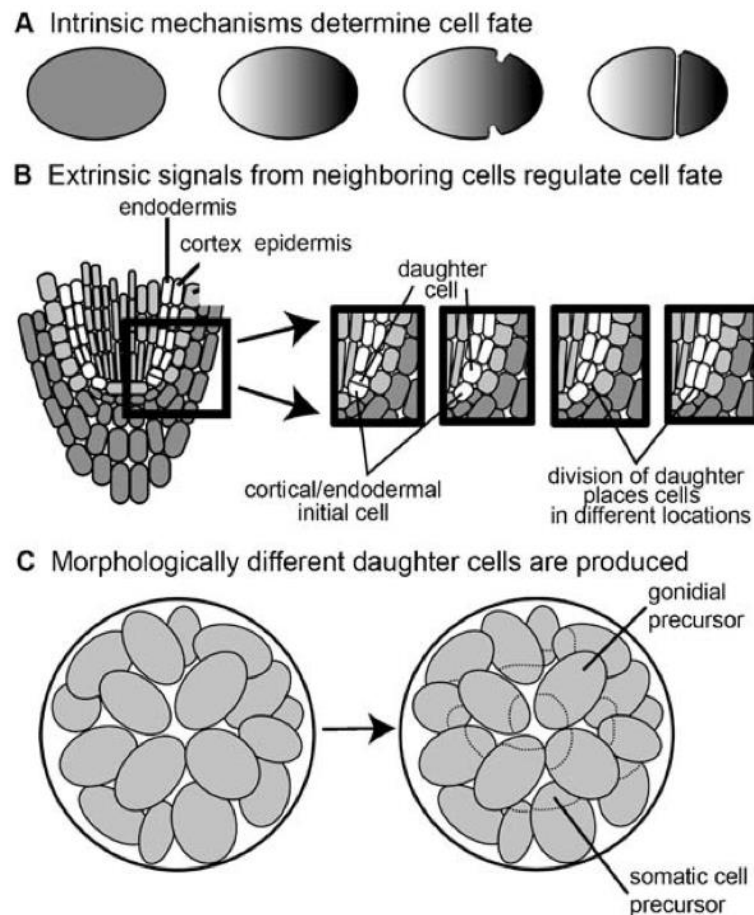


Figura 01: Desenho esquemático dos mecanismos pelos quais as divisões celulares assimétricas geram diversos tipos de células durante o desenvolvimento. A- O desenvolvimento ocorrendo através da influencia de fatores externos. B- Desenvolvimento ocorrendo através da influencia de células vizinhas. C- Desenvolvimento ocorrendo, também, através da influencia de celulas vizinhas, entretanto tais fatores atuando em um conjunto de células filhas (Bisgrove, Kropf, 2007).

Sendo assim, o estabelecimento da polaridade celular é indispensável para o desenvolvimento e diferenciação. Em tecidos multicelulares a polaridade frequentemente é induzida por substâncias externas, secretadas por células vizinhas. Ela também pode ser estabelecida intrinsecamente pela localização de determinantes citoplasmáticos dentro do próprio zigoto. Os fatores extrínsecos são importantes no início do desenvolvimento, já os fatores intrínsecos, mais tardiamente controlam as especificações das células do rizóide e do talo no embrião (Kropf, 1992).

No gênero *Fucus*, após a fecundação, o desenvolvimento polar ocorre de forma síncrona por várias divisões celulares. O eixo polar do zigoto é lábil durante 10 horas após a fertilização e pode ser orientado e reorientado pelos diferentes gradientes (Jaffe, 1968), como, gradiente de luz, local de entrada do anterozóide na célula (Hable e Kropf, 2000) entre outros, antes de se tornar fixo (Quatrano, 1973). Sendo o gradiente de luz branca unilateral o mais simples para manipular a orientação do eixo em laboratório (Goodner e Quatrano, 1993).

Neste mesmo gênero, o local de entrada do gameta masculino no feminino, pode determinar a região da formação do polo rizoidal (Hable e Kropf, 2000). Sendo assim, o zigoto de *Fucus* e *Silvetia*, com 2 a 3 horas após a fertilização, secreta uma mucilagem composta por polissacarídeos e compostos fenólicos, altamente adesivo (Hable e Kropf, 1998), iniciando o processo de fixação da polaridade (Hable e Hart, 2010).

Do ponto de vista celular, um indicador inicial da formação da polaridade, é o acúmulo de retículo endoplasmático rugoso entre 4 a 5 horas após a fecundação (Peters e Kropf, 2010). Outras organelas do sistema de endomembranas, localizadas no polo de formação do rizóide, são acoplados para aumentar a secreção adesiva localmente neste polo (Hadley *et al.*, 2006). De 10 a 12 horas após a fertilização, a deposição e secreção de endomembranas continua em direção ao polo rizoidal. Este ápice de crescimento é definido e expressado nas primeiras horas, e orienta a primeira divisão celular, que é perpendicular ao eixo de crescimento talo-rizóide, gerando células filhas de diferentes tipos. Sendo assim, a assimetria estabelecida no início do desenvolvimento no primeiro ciclo

celular, define os padrões de divisões e diferenciação na alga madura (Fig. 02) (Hable e Hart, 2010).

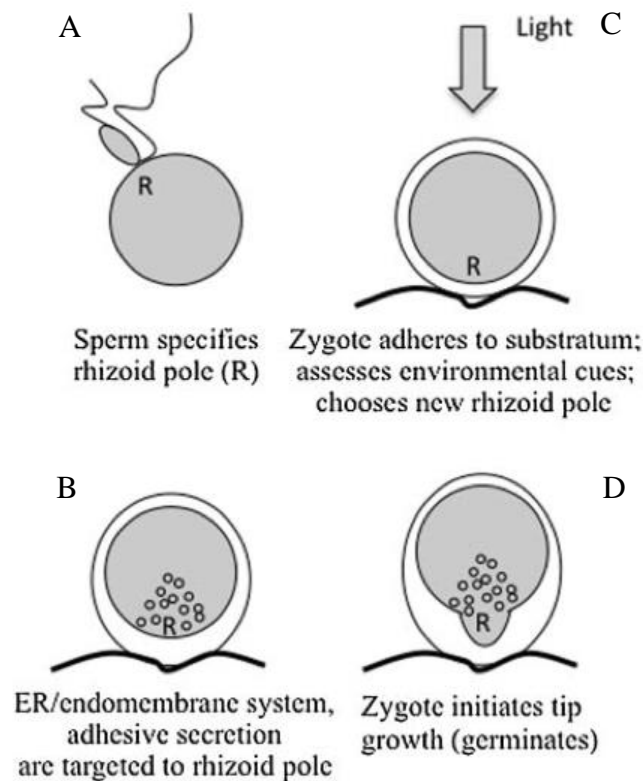


Figura 02: Desenho esquemático dos eventos iniciais do desenvolvimento durante o estabelecimento da polaridade em zigotos das algas fucóides. A: O estabelecimento da polaridade através da entrada do anterozoide. B: Acúmulo de RE/membranas no sitio de formação dos rizóides. C: O estabelecimento da polaridade através da incidência da luz. C: Acúmulo de RE/membranas no sitio de formação dos rizóides. (Hable e Hart, 2010).

As oosferas de *Fucus* são inicialmente delimitadas por uma única membrana plasmática, mas, após a fecundação, ocorre uma rápida secreção da parede celular. O primeiro componente da parede celular formado é o ácido algínico, que pode ser identificado através de testes químicos minutos após a fecundação. A celulose torna-se detectável uma hora após a fecundação e de 4 – 24 horas a composição da parede torna-se estabilizada, consistindo em ácido algínico (60%), celulose (20%) e fucanos sulfatados (20%) (Callow *et al.*, 1978).

As frondes sexualmente maduras liberam um grande número de oosferas e anterozoídes nas águas. A fertilização das oosferas é rápida, seguida pelo desenvolvimento do eixo polar e a primeira

divisão celular dentro de 24 horas. Poucas horas AF torna-se uma célula altamente polarizada, exibindo uma distribuição assimétrica dos componentes citoplasmáticos e um crescimento localizado nas extremidades. O zigoto se fixa ao substrato e inicia o processo de divisões celulares, gerando inicialmente duas células filhas, uma menor que dará origem ao rizóide e, outra maior que originará o talo. Sendo o desenvolvimento orientado pelo eixo talo-rizóide. As células do talo são organizadas dentro de uma estrutura mais esférica, assemelhando-se com os estágios globulares do desenvolvimento dos embriões das plantas. As células originadas pela divisão celular do rizóide, dão origem ao apoio, o qual fixa a planta madura na superfície, já as células derivadas da divisão celular do talo dão origem as frondes fotossintetizantes e reprodutivas (Fowler e Quatrano, 1995)

(Fig. 03)

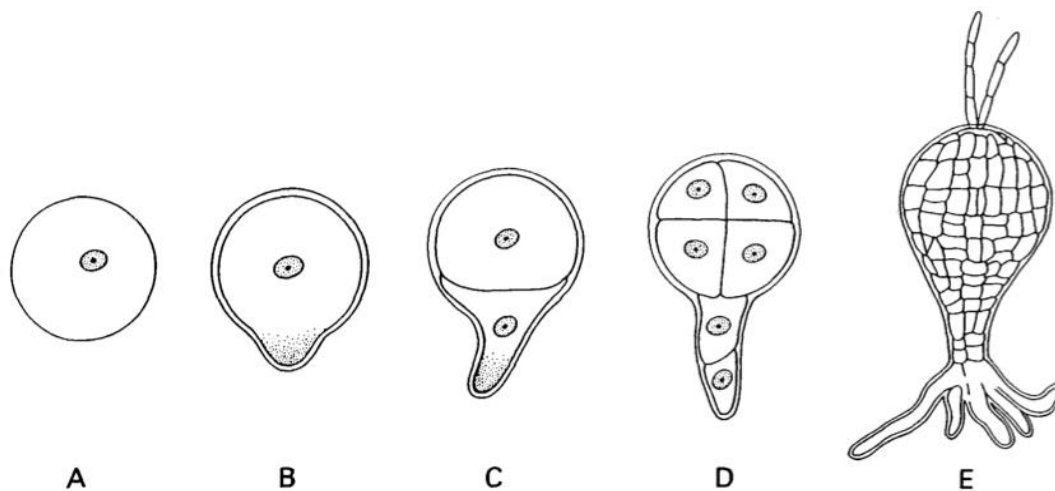


Figura 03: Diagrama esquemático dos estágios iniciais do desenvolvimento em *Fucus*. a) Logo após a fecundação o zigoto permanece apolar. b) Início da fixação do eixo polar, 10 a 12 horas após a fecundação. Com o início da deposição de vesículas secretórias no polo rizoidal. c) Primeira divisão celular perpendicular ao longo do eixo talo-rizóide, aproximadamente 24 horas após a fecundação. Formando duas células filhas, diferentes em tamanho e composição citoplasmática, onde a menor originará o rizóide e a maior o talo. d) A seguinte divisão celular na célula rizoidal é continua paralela em relação ao eixo talo-rizóide, seguida por uma divisão perpendicular na primeira divisão celular. e) Outras divisões celulares dão origem a uma plântula, globular na região do ápice do talo e com várias ramificações no polo rizoidal (Goodner e Quatrano, 1993).

A polarização do embrião das algas Fucales pode ser dividida em três estágios: formação do eixo polar, fixação desse eixo e expressão da polaridade (o qual determina o destino das células do rizóide e do talo) e a primeira divisão celular perpendicular em relação ao eixo talo-rizóide (Bisgrove e Kropf, 2007) (Fig. 04).

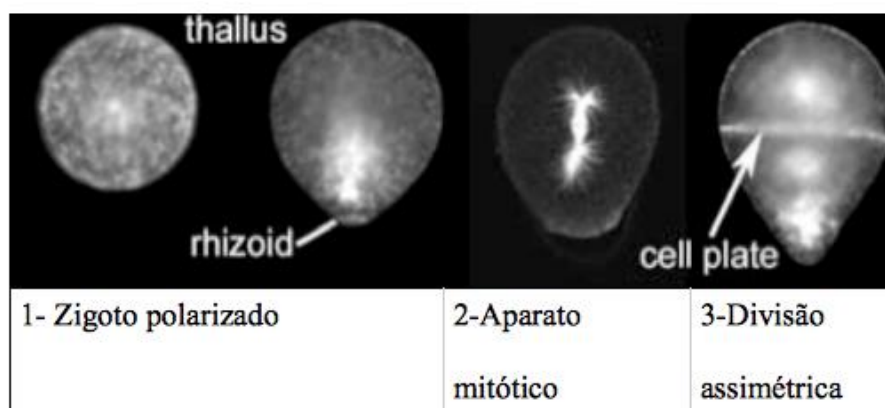


Figura 04: Divisões assimétricas em *Silvetia compressa* (J.Agardh) E.Serrão, T.O.Cho, S.M.Boo & Brawley (Bisgrove e Kropf, 2007).

Em *Fucus distichus* Linnaeus, a formação do eixo ocorre entre 6 a 10 horas após a fertilização, e após 10 a 14 horas depois da fertilização o eixo torna-se insensível aos sinais externos, sendo esse processo chamado de fixação do eixo (Fowler e Quatrano, 1995). O citoplasma das células do polo do rizóide é rico em vesículas de Golgi, as quais depositam, por exocitoses, o conteúdo dentro da parede celular recém-formada. O resultado da parede celular do rizóide é estruturalmente e quimicamente diferente da parede celular do talo. Por exemplo: um único polissacarídeo de fucano sulfatado (F2) e a proteína vitronectina (VnF), são localizadas somente na parede celular da extremidade de crescimento no rizóide. Ambas, acredita-se serem empacotadas nas vesículas derivadas do Golgi (grânulos F), e esses grânulos F são inicialmente distribuídos aleatoriamente no zigoto. No entanto, experimentos utilizando SO_4 indicaram que os grânulos F são direcionalmente transportados para um sítio de desenvolvimento do rizóide depois que o eixo é

irreversivelmente determinado (Goodner e Quatrano, 1993). Para o transporte dos grânulos F, derivados dos corpos de Golgi, para o sítio das extremidades de crescimento requer a participação de microfilamentos de actina. A presença de citocalasina B, pode promover a perturbação do conjunto de microfilamentos, inibindo o alongamento do rizóide, mas a divisão celular não é afetada, resultando em um embrião com duas células esféricas. (Goodner e Quatrano, 1993).

Desta forma, a morfogênese (polarização) do zigoto inclui processos nos quais a expressão da parede celular e do citoesqueleto estão fortemente envolvidas. Em zigotos de algas pardas os microtúbulos e os filamentos de actina participam da polarização e fixação do eixo, da divisão celular e do crescimento das extremidades (Katsaros *et al.*, 2006).

1.3.1 Participação do citoesqueleto no desenvolvimento de Fucales

Durante o desenvolvimento do zigoto, a actina tem papel importante na seleção do eixo talo-rizóide, polarização. Já os microtúbulos não apresentam função relevante nesta etapa, entretanto, em estágios mais avançados este atua no alinhamento das divisões assimétricas (Kropf *et al.*, 1999).

1.3.1.1 Citoesqueleto - Filamentos de Actina

O papel da actina no estabelecimento e manutenção da polaridade celular tem sido amplamente estudado. A actina é regulada por determinadas proteínas, principalmente pela GTPases da superfamília Ras, especialmente da família Rho. Em *Fucus distichus* foi isolado o gene de uma GTPase da família Rho que codifica a proteína FdRac1, a qual foi detectada próxima a extremidade de crescimento do rizóide, além da actina. Esta dupla presença indica que a FdRac1 regula a polaridade celular através da actina (Fowler *et al.*, 2004).

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).

Dois fatores que estimulam a atividade da actina para a polarização: a entrada do anterozóide na oosfera e a fotopolarização. Tais eventos induzem o rearranjo da F-actina cortical no sítio de entrada do gameta masculino. Inicialmente a F-actina cortical está distribuída de forma heterogênea no gameta feminino, sendo direcionada ao sítio de entrada do gameta masculino minutos depois da fecundação. Até hoje não é conhecido qual o processo para este evento, entretanto, acredita-se que outras proteínas possibilitam o direcionamento da F-actina a este sítio, proteínas como as GTPases da família Rho (Fig. 05) (Kropf *et al.*, 1999).

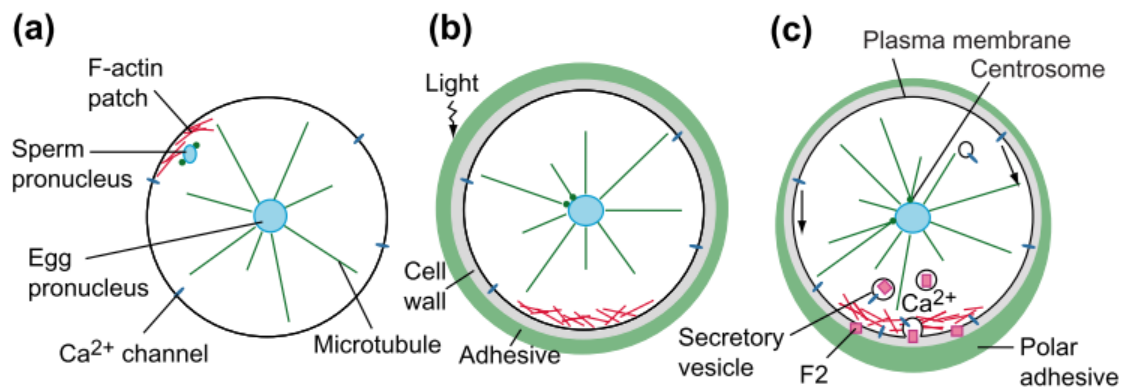


Figura 05: Desenho esquemático da seleção e amplificação da polarização. a) Fertilização, a F-actina é direcionada ao sítio de entrada do anterozóide, canais de cálcio estão distribuídos na membrana plasmática, e os microtúbulos estão uniformemente distribuídos na superfície do pró-núcleo da oosfera. b) Fotopolarização, 3 horas após a fecundação o zigoto sintetizou a parede celular e torna-se suscetível aos fatores ambientais externos. A fotopolarização provoca a reorganização da F-actina no polo do rizóide, oposto ao hemisfério iluminado. c) Amplificação, 4 horas após a fecundação ocorre deposição elevada de moléculas, como, F-actina, Ca^{2+} e secreção adesiva, localizadas no polo do rizóide. Mais tarde os fucanos sulfatados (F2) são depositados no polo do rizóide pelo direcionamento da F-actina, para serem depositados na parede celular (Kropf *et al.*, 1999).

Para que ocorra a formação dos caminhos de F-actina a partir do núcleo em direção ao polo do rizóide, se faz necessária a sua nucleação. Tal tarefa é realizada por um conjunto de proteínas altamente conservadas, o complexo Arp2/3, que atua no ponto de entrada do anterozóide em média 30 minutos após a fecundação em *S. compressa* (Hable e Kropf, 2005).

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 rizóide (Hable e Hart, 2010).

Sendo assim, para que haja a correta deposição da F-actina no polo rizoidal, se faz necessário, também, um fluxo no gradiente de Ca^{2+} disponível no citoplasma do zigoto (Hable e Hart, 2010).

1.3.1.2 Citoesqueleto – Microtúbulos

Após a fixação do eixo talo-rizóide, ocorre o delicado crescimento do rizóide, que se manifesta também pela deposição da parede celular nesta região, assim como todas as estruturas em crescimento, esta é mais fina que nas outras regiões. Para tal atividade se faz necessária a deposição de vesículas com materiais derivados do Golgi para a sua formação (Kropf, 1992).

Neste contexto, o início do desenvolvimento nada mais é que a continuidade de deposição de materiais na região do rizóide após a fixação do eixo no zigoto, ocorrendo uma dramática deposição de materiais para o alongamento do rizóide. Para que estas vesículas cheguem ao local desejado, há uma distribuição específica de microtúbulos no citoplasma do zigoto (Quatrano, 1968).

Previamente os microtúbulos estão distribuídos uniformemente, a partir da região perinuclear em direção ao córtex, para a continuidade do desenvolvimento, esta distribuição é substituída, sendo os microtúbulos direcionados a partir do núcleo até a extremidade de crescimento do rizóide, ao longo do ápice polar da célula (Fig. 06 e 07) (Kropf, 1992).

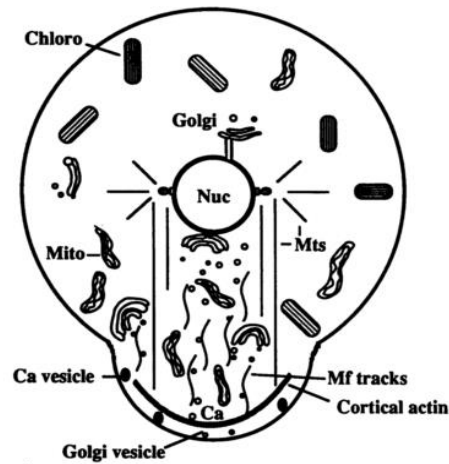


Figura 06: Crescimento do rizóide. O citoplasma é altamente polarizado, com mitocôndrias, actina cortical, Golgi, vesículas derivadas do Golgi, e vesículas de Ca^{2+} preferencialmente na região do rizóide. Os microtúbulos prolongam-se entre o núcleo e o córtex do rizóide, a ligação com o núcleo ocorre pela região MtOCs, que contém centríolos aderidos no envelope nuclear. O eixo definido pelos MtOCs inicialmente é perpendicular ao eixo de crescimento. E os cloroplastos com grana axial são preferencialmente encontrados no hemisfério talo (Kropf, 1992).

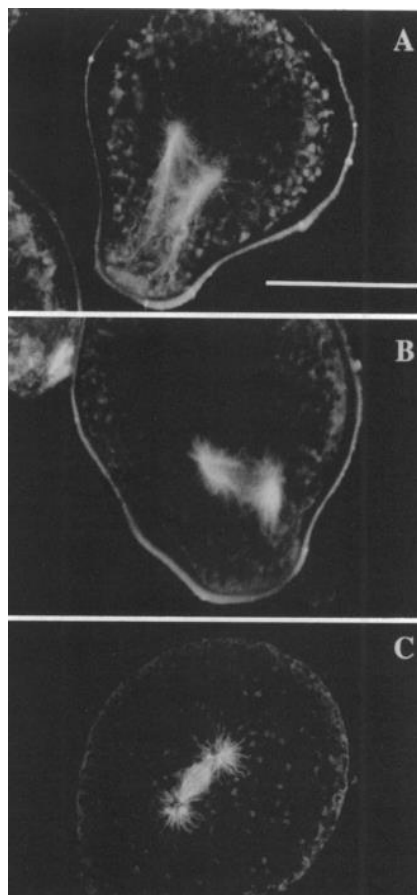


Figura 07: Distribuição dos microtúbulos no primeiro ciclo celular do zigoto. a) os microtúbulos se estendem para a região de crescimento logo que esta se inicia. b) o ápice MtOC é rotativo no zigoto em desenvolvimento. c) depois que a rotação é completada, o aparato mitótico forma um alinhamento com o ápice de crescimento (Kropf, 1992).

Enquanto está claro o papel da F-actina na dinâmica de crescimento e desenvolvimento do zigoto, o papel exato dos microtúbulos ainda não está bem esclarecido. Evidências sugerem que a mobilidade de determinados componentes é dependente da atividade destes, que realizam principalmente a mediação de moléculas motores que contribuem significativamente para o crescimento. Entretanto, o exato papel dos microtúbulos precisa ser mais investigado (Hable e Hart, 2010).

1.3.1.3 Participação do sistema de endomembranas no desenvolvimento de Fuciales.

O estabelecimento da polaridade celular em eucariotos é dependente do ciclo regulado das endomembranas (endocitose, exocitose e tráfico entre organelas). O ciclo de endomembranas regularmente permite a entrega e a retirada de moléculas específicas em sítios localizados, o que facilita a formação de gradientes de morfologia e a montagem de domínios corticais únicos que controlam o crescimento, divisão e desenvolvimento (Kropf, 1997; Belanger e Quatrano, 2000; Fowler, 2000).

O crescimento em uma extremidade representa uma forma extrema de polaridade celular e é distribuído por todo o domínio eucarionte. Em muitas células nas extremidades do crescimento, incluindo brotamento de leveduras, hifas de fungos, rizóides de algas, raízes e tubos polínicos, o sistema de endomembranas está focado em direção do alongamento do ápice (Hadley *et al.*, 2006).

Um sistema de endomembrana polarizado não só permite deposição local de membrana e precursores de parede necessários para o alongamento e sustentação celular, mas também facilita a formação de domínios apical e subapical distintos nas extremidades (Kropf, 1997; Fowler e Quatrano, 1997). Embora muito pouco se saiba sobre os mecanismos que estabelecem e mantêm um sistema de endomembrana polar em células nas extremidades de crescimento, o citoesqueleto de actina parece estar intimamente envolvido. Actina é pensada para servir várias funções em polarização de endomembranas, incluindo organizar a matriz das próprias endomembranas, criando

um sítio de destino para exocitose, transportando vesículas e especialmente restringir a ação no local de endocitose (Drubin e Nelson, 1996; Fowler e Quatrano, 1997; Belanger e Quatrano, 2000).

1.4 Efeito de fatores ambientais sobre o desenvolvimento e crescimento de zigotos e embriões de Fucales – Radiação Ultravioleta.

Na estratosfera concentra-se a camada de ozônio (O₃) em quantidade mínima. Esta região é responsável pela absorção de grande parte da radiação UV incidente na Terra. O ozônio é formado constantemente na estratosfera e corresponde à união química de uma molécula de O₂ comum, este último proveniente da dissociação do O₂ por um fóton de radiação UV com comprimento de onda inferior a 242 nm (Okuno *et al.*, 1996).

O processo de degradação da camada de ozônio, principalmente pela influência antrópica, se deve principalmente pela produção de compostos com cloro como metilclorofórmio, halons e clorocarbonados, que tendem a reagir com as moléculas de ozônio e causando a sua decomposição. Resultando, assim, em sua diminuição da espessura desta camada, conseqüentemente também, o aumento da radiação UV que incide na superfície terrestre (Polo *et al.*, 2014).

Os altos níveis de radiação ultravioleta UV podem ser danosos aos organismos marinhos, especialmente às algas bentônicas. Estas ficam expostas à radiação por períodos prolongados durante horas de maré baixa por estarem fixas e restritas ao seu local de crescimento. O risco da ocorrência de efeitos prejudiciais aumenta quando as algas recebem níveis elevados de radiação ultravioleta UV nos meses de primavera-verão na Antártica e parte da América do Sul (Cabrera *et al.*, 1995).

A maioria dos estudos sobre os efeitos da radiação UVs que abordam a relação entre os padrões de zoneamento e suas possíveis causas, são centrados sobre os estágios adultos dos ciclos de vida das macroalgas. Considerando o tamanho reduzido e maior simplicidade estrutural das fases microscópicas (simples e algumas unicelulares), qualquer tipo de estresse pode afetar a biologia

destes organismos exercendo efeitos mais evidentes nestas fases, que são mais sensíveis (Yakovleva *et al.*, 1998; Wiencke *et al.*, 2000). Sendo assim, para os estudos de predição de fatores de estresses ambientais, tais como a radiação UV, o conhecimento sobre a sensibilidade destas fases iniciais de desenvolvimento é crucial, uma vez que a dependência das espécies dependem da sobrevivência destas fases, e as conclusões obtidas com fases macroscópicas não devem ser extrapolados para microscópica queridos (Altamiro *et al.*, 2003).

1.5 *Sargassum* C. Agardh

O gênero *Sargassum* é um componente conspícuo da flora marinha bentônica de regiões tropicais, temperadas quentes e frias (Rivera e Scrosati, 2006; Veloso e Széchy, 2008), sendo considerado muitas vezes a alga mais importante em abundância em regiões tropicais e subtropicais (Széchy e Paula, 2000). Em costões rochosos, protegidos do embate direto de ondas, espécies de *Sargassum* podem ser encontradas formando extensos bancos na zona sub-litorânea rasa, sendo as macroalgas mais representativas em termos de altura e/ou biomassa (Veloso e Széchy, 2008).

Este gênero constitui um dos mais representativos da ordem Fucales, possuindo aproximadamente 485 espécies (Guiry *et al.*, 2006). Várias destas espécies formam florestas subaquáticas que promovem habitat e alimento para peixes e outros organismos marinhos (Uchida, 1993), assim como sítios seguros de predadores para o crescimento de juvenis desses organismos (Rivera e Scrosati, 2006).

A dinâmica de populações de espécies do gênero *Sargassum* tem sido reportadas por alguns estudos (McCourt, 1984; Arenas, *et al.*, 2002; Engelen *et al.*, 2005), que envolveram fatores sobre a distribuição, dispersão, crescimento e mortalidade dos indivíduos. Trabalhos relacionados aos efeitos de contaminantes no ambiente também são reportados na literatura e apontam para a capacidade de bioacumulação de metais pesados por espécies do gênero *Sargassum* (Yang e Volesky,

1999; Voleskya *et al.*, 2003).

Neste gênero, os indivíduos adultos são constituídos por eixos principais e ramos laterais e fixados ao substrato por um apressório. Na extremidade superior dos ramos principais são produzidos contínua e radialmente os ramos laterais primários, que apresentam crescimento indeterminado, se ramificam, diferenciam receptáculos e geralmente se tornam senescentes após o período de maturação e liberação dos gametas. O crescimento dos ramos laterais primários ocorre por célula apical única. A diferenciação de receptáculos geralmente ocorre nos ramos laterais primários mais desenvolvidos ou, a partir das axilas dos filóides; estas estruturas diferenciam-se em cavidades internas (conceptáculos), que contém os anterídios e / ou os oogônios. A senescência consiste na diminuição do vigor e subsequente fragmentação dos ramos laterais primários férteis, após a liberação dos gametas (Veloza e Széchy, 2008). Algumas espécies podem apresentar vesículas que auxiliam na flutuação das plantas, os aerocistos (Fig. 08) (Coimbra, 2006).

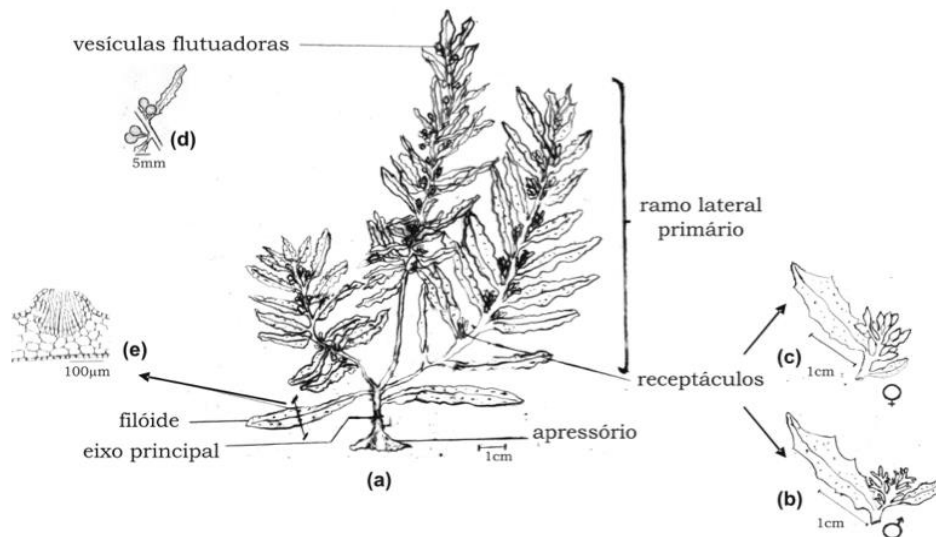


Figura 08: Partes de uma planta de *Sargassum* com suas estruturas. a) Desenho esquemático de uma planta adulta de *Sargassum*. b) Receptáculos masculinos. c) Receptáculos femininos. d) Vesículas flutuadoras. e) Aspecto do corte transversal do filóide (Coimbra, 2006).

Plantas férteis de *Sargassum* possuem estruturas diferenciadas para a reprodução, os quais são denominados receptáculos e produzem os elementos reprodutivos, gametas, no interior de suas cavidades chamadas de conceptáculos. A diferenciação dos receptáculos geralmente ocorre em

ramos laterais primários mais desenvolvidos do ápice dos apêndices foliares. Após o período de maturação dos gametas, estes são liberados, ocorrendo a fertilização e formação dos zigotos (Fig. 09).

Os representantes desse gênero produzem apenas um tipo de elemento de reprodução: os gametas. A reprodução sexuada é sempre oogâmica, no entanto, esta pode não ser a única forma de reprodução em *Sargassum*, já que algumas espécies podem manter suas populações por processos assexuados muito simples, como a fragmentação do talo (Velozo e Széchy, 2008).

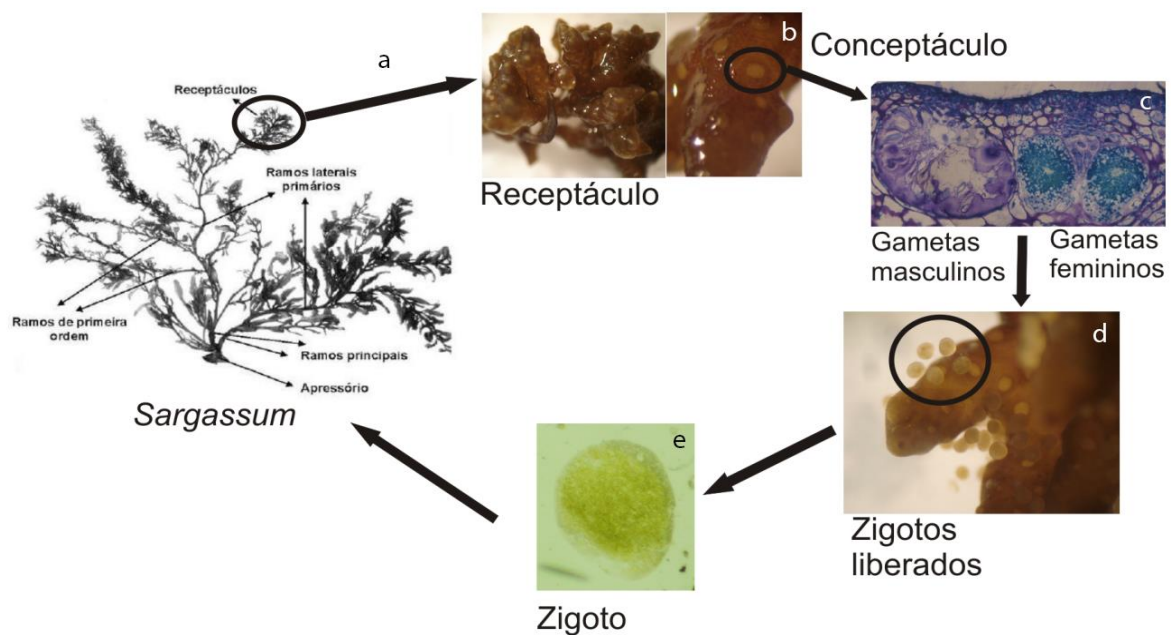


Figura 09: Representação esquemática do processo de formação de zigotos. a-b) representantes de *Sargassum* que produzem em seus ramos laterais primários dos receptáculos. c) dentro desses receptáculos são formados os conceitoáculos. d) os gametas femininos e masculinos são produzidos dentro dos conceitoáculos. Há liberação desses gametas, que são fertilizados no ambiente externo. e) ocorrendo a fecundação, há a formação de zigotos. A plântula de *Sargassum* é resultado do desenvolvimento do zigoto (imagem a Velozo e Széchy, 2008).

Considerando o ciclo de vida de *Sargassum*, os elementos reprodutivos masculinos são dotados de flagelos, os quais se deslocam até os conceitoáculos presentes na superfície do receptáculo, onde encontram os oogônios, gametas femininos. Após a fecundação do oogônio, o zigoto recém-formado permanece aderido ao receptáculo por uma mucilagem. Estes zigotos podem permanecer aderidos ao receptáculo até chegarem a um estágio mais avançado de divisões celulares,

como foi observado para *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt (Norton e Fetter, 1981; Deysher e Norton, 1982), onde os embriões são liberados em estágio avançado de desenvolvimento. Após a fixação no substrato, o desenvolvimento do talo diplóide ocorre, até que este inicie a formação de novas estruturas reprodutivas (Coimbra, 2006).

No Brasil, o gênero *Sargassum* possui representantes em toda a sua costa (Oliveira, 1977), trabalhos realizados destacam espécies do gênero *Sargassum* como mais abundantes no limite inferior da região entre-marés e no infralitoral de ecossistemas costeiros (Eston *et al.*, 1986; Paula e Eston, 1987; Paula, 1989; Eston e Bussab, 1990; Coimbra, 1998; Coimbra e Berchez, 2000; Széchy e Paula 2000; Széchy *et al.*, 2006; Ghilardi *et al.*, 2006). Para este gênero, a literatura relata a presença de alginatos, florotaninos, cumarinas, cromonas, quinonas, feofitinas e terpenóides. Esses metabólitos produzidos por algas do gênero *Sargassum* mostram atividades biológicas, tais como: anticoagulantes, antioxidante, antipirético e analgésica (Montes, 2012). Mas a crescente demanda por produtos originários de macroalgas marinhas podem causar uma diminuição em bancos naturais pela exploração excessiva. Uma alternativa é a maricultura deste gênero de macroalga, que poderá fornecer matéria-prima para a extração de alginato sem afetar os bancos naturais (Pang *et al.*, 2006). Alguns estudos têm sido realizados para estabelecer métodos de cultivo de *S. fusiforme* (Harv.) Setchell, *S. fulvellum* (Turn.) C. Agardh (Ruan e Xu 2001) e *S. thunbergii* (Mertens e Roth) Kuntze para o controle efetivo da reprodução e desenvolvimento de algas (Zhao *et al.* 2008).

2. JUSTIFICATIVA

Estudos desenvolvidos ao longo de vários anos demonstram o interesse nas algas pardas da ordem Fucales como um modelo de estudo do processo de embriogênese. No entanto, muitos trabalhos referentes a estes processos são encontrados somente para espécies do gênero *Fucus*, algas presentes predominantemente em regiões frias. Consequentemente esse trabalho visa o início da produção de um modelo de estudo com uma espécie característica da região tropical, como *Sargassum cymosum*. Sendo as algas deste gênero reconhecidas pela importância ecológica nos ecossistemas costeiros, e também pela importância econômica. Esta importância econômica se deve ao interesse, dos compostos presentes em *Sargassum*, para o desenvolvimento de novas drogas, como para o tratamento de inibição de células tumorais e para o tratamento da diabetes mellitus.

Até o presente momento não foram encontrados estudos detalhados sobre o processo de embriogênese das espécies de *Sargassum*, desta forma, a investigação proposta torna-se relevante para o melhor entendimento das formações e do comportamento dos bancos destas algas nos costões rochosos.

Por tudo isso a seleção deste gênero como um modelo experimental em embriogênese de fucales para as regiões tropicais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar o processo e os mecanismos reguladores de embriogênese de zigotos de *Sargassum cymosum* como modelo de estudo de germinação de algas pardas tropicais e a ação da radiação ultravioleta em plântulas desta espécie.

3.2. Objetivos Específicos

Padronizar em laboratório as condições ideais para o processo da embriogênese de *Sargassum cumosym*.

Avaliar , de forma indireta, com o uso de agentes inibidores, a participação dos elementos do citoesqueleto no processo de embriogênese de zigotos *S. cymosum*.

Caracterizar, de forma indireta, com o uso de agente inibidor, a participação do sistema de endomembranas nas fases iniciais do desenvolvimento de zigotos de *S. cymosum*.

Avaliar comparativamente a ação da radiação UVA, UVB, de forma isolada e radiação UVA mais UVB sobre a morfologia, organização celular e fisiologia de plântulas de *S. cymosum*.

CAPÍTULO 02

Caracterização ultraestrutural e estrutural de zigotos e embriões durante o desenvolvimento em *Sargassum cymosum* (Phaeophyceae, Fucales)

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Sargassum* C. Agardh (Phaeophyceae, Fucales) é um componente conspícuo da flora marinha bentônica, encontrado em regiões tropicais e subtropicais (Veloza e Széchy, 2008; Rivera e Scrosati, 2006). As espécies deste são muitas vezes consideradas as mais importantes algas em abundância no meio ambiente nas regiões entremares (Széchy e Paula, 2000). Em rochas protegidas, *Sargassum* sp. pode formar grandes bancos na zona sublitoral, sendo eles os mais representativos em biomassa e altura (Veloza e Széchy 2008). Tais bancos naturais são importantes ecologicamente, principalmente como substratos para a desova, a reprodução e a alimentação de muitos tipos de peixes, crustáceos e outros organismos marinhos (Uchida, 1993; Rivera e Scrosati, 2006), mostrando uma importância ecológica igual ao de algas dos gêneros de regiões de clima temperado, como *Fucus linnaeus* (Mattoo e Payri, 2010).

Várias espécies de algas pardas são amplamente utilizadas para a extração de alginato (Thomas e Subbaramaiah, 1991), um ficolóide amplamente utilizado por muitas indústrias (Oliveira, 1997), com produção em 2009 de 26.500 toneladas, no valor de 318.000 mil dólares americano (Bixler e Porse, 2010). Estas algas são também utilizadas para a extração de bioativos naturais (Lin *et al.*, 2006), para fins medicinais (Masuda *et al.*, 1993), como alimento para animais (Trono Jr. e Lluisma, 1990) e como fertilizantes (Ohno *et al.*, 1990; Williams e Feagin, 2010).

No Brasil, bancos naturais de *Sargassum* são comuns ao longo da costa e apresentam potencial econômico (Oliveira, 1997), mas, a demanda por produtos originários de macroalgas marinhas também pode causar uma diminuição na abundância dos bancos naturais por exploração excessiva. Uma alternativa é a maricultura deste gênero de macroalga, fornecendo assim, matéria-prima para a extração de compostos sem afetar os bancos naturais. Alguns estudos têm sido realizados para estabelecer métodos de cultivo para *S. fusiforme* (Harv.) Setchell, *S. fulvellum* (Turn.) C. Agardh (Ruan e Xu, 2001) e *S. thunbergii* (Mertens et Roth) Kuntze, bem como o

controle efetivo de reprodução e desenvolvimento de algas (Zhao *et al.*, 2007). Entre os fatores ambientais que influenciam a reprodução, desenvolvimento e distribuição de macroalgas, a temperatura é considerada um fator chave (Moss e Header, 1973; Header e Moss, 1975), e entender os efeitos de tais fatores extrínsecos é importante para o desenvolvimento de culturas de macroalgas. Além disso, a compreensão dos fatores abióticos e seus efeitos sobre o desenvolvimento precoce também é importante para manter o estabelecimento destas algas.

A estrutura característica do gênero *Sargassum* é a presença de um talo composto por rizóides para fixação e, de um a vários eixos principais ramificados em "ramos" de várias ordens que se diferenciam em apêndices foliares chamados "filóides", vesículas flutuadoras e receptáculos (estrutura reprodutiva) (Mattio e Payri, 2010). Os representantes deste gênero produzem apenas um tipo de elemento reprodutivo, os gametas, com a reprodução sexual oogâmica. Nos adultos, os ramos laterais primários são produzidos na extremidade superior dos ramos principais. Estes ramos laterais são produzidos continuamente e radialmente, se ramificam e diferenciam-se nos receptáculos, os quais geralmente tornam-se senescentes após o período de maturação e liberação dos gametas (Paula, 1984). A diferenciação dos receptáculos geralmente ocorre em ramos laterais primárias que são mais desenvolvidos do que os dos apêndices foliares; estas estruturas diferenciam cavidades internas conhecidas como conceptáculos, que produzem os gametas (anterozóides e oosferas). Os gametas são liberados e as oosferas são fertilizadas pelo anterozóide (Coimbra, 2006).

Vários estudos sobre polarização celular em zigotos de algas da família Fucaceae detalharam os processos de desenvolvimento e a função do citoesqueleto. Entre eles, podemos destacar o trabalho de Fowler e Quatrano (1995), Quatrano e Shaw (1997) e Hadley *et al.* (2006). Entre outros trabalhos notáveis incluem os de Farmer e Williams (1898) e Levring (1952). Farmer e Williams (1898) concluíram que o processo de fertilização é rápido, sendo concluído dentro de 10 minutos para o gênero *Fucus*. A fertilização é seguida pela formação da parede celular, com o ácido algínico sendo o primeiro composto produzido (Callow *et al.*, 1978).

Inicialmente, o zigoto é simétrico e durante a primeira metade do ciclo celular, é transformado numa célula polarizada, mostrando a distribuição assimétrica dos componentes citoplasmáticos e crescimento localizado nos eixos, sombreado e em direção à luz (Fowler e Quatrano, 1995).

Morfogênese no nível celular inclui os processos em que a expressão da parede celular e o citoesqueleto estão bastante envolvidos. Em zigotos de algas pardas, os microtúbulos e filamentos de actina participam na polarização e formação deste eixo (Katsaros *et al.*, 2006).

Durante o desenvolvimento, padrões específicos de formação e distribuição de estruturas nas células podem ser identificados. Em algumas espécies de algas pardas, o zigoto recém formado é caracterizado como uma estrutura altamente vacuolizada (Pollock, 1970).

Em zigotos de *Scytosiphon lomentaria* (Lyngbye), durante a divisão meiótica, após a reconstituição da membrana nuclear e durante a formação dos dois núcleos-filhos, a formação de múltiplos e grandes vacúolos foram observados ocupando todo o espaço entre eles os novos núcleos. Além disso, a intensa atividade dos corpos de Golgi resulta na formação de vesículas que são numerosas, em seguida, transportadas a partir do centrossoma, em relação ao plano futuro de divisão, permitindo a citocinese através da fusão destas vesículas (Nagasato e Motomura, 2002).

Até o momento, não foram identificados estudos caracterizando a estrutura e ultraestrutura de zigotos durante o desenvolvimento em *Sargassum cymosum*. Portanto, este estudo teve como objetivo compreender o desenvolvimento inicial de zigotos *S. cymosum* cultivados em laboratório, a fim de formar um modelo de desenvolvimento de algas pardas tropicais. Os experimentos foram também conduzidos para determinar o efeito da temperatura sobre o processo de libertação de zigoto e crescimento das plântulas. Os resultados aqui apresentados representam o primeiro passo na domesticação e produção de mudas para o futuro da maricultura de *S. cymosum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Os efeitos da temperatura sobre a libertação e o desenvolvimento de zigotos de *S. cymosum*

Plantas férteis de *S. cymosum* C. Agardh foram coletadas na maré baixa na praia de Ponta das Canas-Ilha de Santa Catarina, Brasil. Para a avaliação da temperatura mais adequada, os receptáculos férteis dos espécimes foram incubados em água do mar enriquecida com von Stosch 50% (McLachlan, 1973) e cultivados em uma mesa com diferentes temperaturas (14°C, 18°C, 22°C, 26°C e 30°C), com irradiância de 45 ± 5 mmol fótons $m^2 s^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas, e salinidade de 34 ups. Para cada temperatura, três placas de Petri ($n = 3$) com 16 receptáculos (cada) foram utilizadas. No 8º dia do experimento, o número total de zigotos em todas as três repetições foi contado em cada temperatura utilizada.

Para avaliar a taxa de crescimento dos zigotos, foram feitas medições do eixo mais longo em 30 embriões em cada réplica em todas as temperaturas. A primeira medição ocorreu no dia 8, a segunda no 12º dia, e a última no dia 16, totalizando 16 dias de cultura: $GR (\% \text{ dia}^{-1}) = (\text{peso}/W_i) [1/t - 1] \times 100$, onde W_i = peso úmido inicial e W_t = peso úmido após t dias. Para suprimento de nutrientes, a água do mar filtrada esterilizada, com meio von Stosch, foi usada como o meio de cultura, e trocada a cada 4 dias.

2.2. Análises estatísticas

Os dados foram analisados por análise de variância unifatorial (ANOVA) e com o teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote de software Statistica (versão 10.0), considerando-se $p > 0,05$. A homogeneidade da variância foi testada pelo teste de Levene.

2.3. Cultura

Após caracterização das melhores temperaturas, novas plantas férteis de *S. cymosum* C. Agardh foram coletadas na maré baixa na praia de Ponta das Canas-Ilha de Santa Catarina, Brasil. No Laboratório de Célula Vegetal (LabCev) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), os ramos férteis, caracterizados pela presença de gametas nos receptáculos, foram separados. Esses ramos foram colocados em placas de Petri (14 centímetros de diâmetro x 1,5 cm de profundidade) para induzir a liberação de gametas, e os receptáculos foram potencializados para a liberação destes gametas colocando-os à luz uniforme ($45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) a $22^\circ\text{C} (\pm 1)$ em água do mar esterilizada, durante 12 horas e, em seguida, transferidos para o escuro durante 12 horas (Bisgrove *et al.*, 2003). Para acompanhar o processo de embriogênese em laboratório, este estudo foi realizado três vezes, duas vezes durante o verão (2010/2011) e uma vez no inverno (2011). Durante o primeiro experimento, para caracterizar o processo de embriogênese, os zigotos e embriões "in vivo" foram fotografados com auxílio de microscópio estereoscópico. Em ambos os seguintes experimentos (verão e inverno), os zigotos e embriões foram fixados a cada hora após a fecundação durante as primeiras 20 horas, seguido de processamento para microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e observação da auto-fluorescência dos cloroplastos e compostos fenólicos.

2.4. Microscopia de luz (ML)

Os zigotos e embriões foram fixados em 2,5% de paraformaldeído em tampão fosfato 0,1 M a pH 7,2. Após 12 horas de fixação a 4°C , as amostras foram lavadas 3 vezes em tampão fosfato a pH 7,2, seguido por desidratação em soluções crescentes de etanol (Bouzon *et al.*, 2000). Pré-infiltração e infiltração das amostras foram realizadas com historesina glicolmetacrilato (modificado a partir de Arnold *et al.*, 1975). Após a infiltração, os blocos foram montados em historesina glicolmetacrilato. Endurecedor foi adicionado para a polimerização, e seções de $0,3 \mu\text{m}$ de espessura foram realizadas usando micrótomo Leica RM 2125. Os cortes foram então colocados em

lâminas para aplicar as seguintes técnicas de coloração: azul de Toluidina O – ATO marcação de componentes ácidos, com a reação metacromática e marcação dos componentes neutros com a reação ortocromática (Gordon e McCandless, 1973), ácido periódico de Schiff – PAS, identificação dos componentes neutros (Gahan, 1984) e azul brilhante de Coomassie – CBB, o qual reage com os componentes proteicos (Gahan, 1984).

2.5. Microscopia de varredura a laser – Confocal

Zigotos e os embriões de *S. cymosum* foram analisados “in vivo” em microscópio Leica DMI6000 B (CONFOCAL). Para a análise dos compostos fenólicos, estes foram excitados com laser com comprimento de onda de 405 nm, e com um espectro de emissão de 510 nm a 600 nm. A autofluorescência dos cloroplastos foi excitada com laser de comprimento de onda de 488 nm, com espectro de emissão de 600 nm a 700 nm (Schoenwaelder e Clayton, 1998b). Para identificar os diferentes compostos foram realizadas as sobreposições das imagens destes. Assim como, os dois compostos analisados foram excitados separadamente, para melhor identificá-los.

2.6. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As amostras foram fixadas em glutaraldeído a 2,5%, 2,0 % de paraformaldeído, 5 mM de CaCl_2 , e 75 mM de tampão de cacodilato de sódio, a pH 7,2, durante 12 horas à 4°C. Após a fixação o material foi lavado três vezes, 30 minutos cada, com o mesmo tampão. Seguido por uma pós-fixação em 2,0 % de tetróxido de ósmio e CaCl_2 5 mM em tampão de cacodilato de sódio 75 mM durante 4 horas à temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas lavagens no mesmo tampão, seguido por desidratação em série crescente de acetona (30 minutos cada). As amostras foram então infiltradas em série graduada de acetona e resina de Spurr, durante 3 dias, seguido por duas infiltrações em resina pura (12 horas cada), e polimerizado em estufa a 70°C durante 24 horas. Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila 1% e citrato de chumbo a 1%

(Ouriques e Bouzon, 2008). Posteriormente, os cortes foram observados e fotografados em um microscópio eletrônico de transmissão JEM 2100 pertencente ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina. A análise por MET teve como objetivo analisar comparativamente o comportamento das organelas celulares durante as diferentes fases de maturação de embriões *S. cymosum*.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos demonstram uma influência significativa da temperatura sobre a libertação ($F=20,3862$, $p=0,00008$) e de crescimento ($F=375,85$, $p=0,000$) nos zigotos de *S. cymosum* (fig. 1). Receptáculos nas temperaturas em 14°C e 18°C não liberaram os gametas, e como resultado, não apresentaram a formação de zigotos. À 30°C, os receptáculos morreram no segundo dia do experimento. Liberação de gametas e formação do zigoto ocorreu em 22°C e 26°C, sendo significativamente maior a 22°C, com 2.133 indivíduos ($p=0,002583$), seguido de 26°C, com 598 indivíduos. A taxa de crescimento foi significativamente maior ($p=0,000245$) para embriões mantidos a 26°C, com 8,89% por dia em relação a embriões mantidos a 22°C, os quais atingiram uma taxa de crescimento de 6,43% por dia. Os resultados mostraram que a melhor temperatura para a liberação de gametas e taxa de fertilização foi de 22°C, mas uma taxa de crescimento mais elevada foi observada a 26°C (Fig. 1). Assim, os seguintes experimentos sobre o desenvolvimento de *S. cymosum*, foram conduzidos a 22°C.

Figura 01: a) Quantidade de zigotos de *S. cymosum* formados nas diferentes temperaturas. b) Taxa de crescimento dos zigotos de *S. cymosum* nas diferentes temperaturas. Os valores são apresentados como média ($n = 3$), e as barras verticais mostram o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A formação dos zigotos foi observada, nas algas incubadas em condições laboratoriais, apenas três dias após o início da cultura (Fig. 2a). A fertilização dos gametas muitas vezes ocorreu no final da tarde cerca de 10 horas à exposição à luz. Zigotos com aproximadamente 10h após a fecundação permaneceram ligados aos receptáculos por uma mucilagem espessa secretada juntamente com os gametas femininos (Fig. 2b).

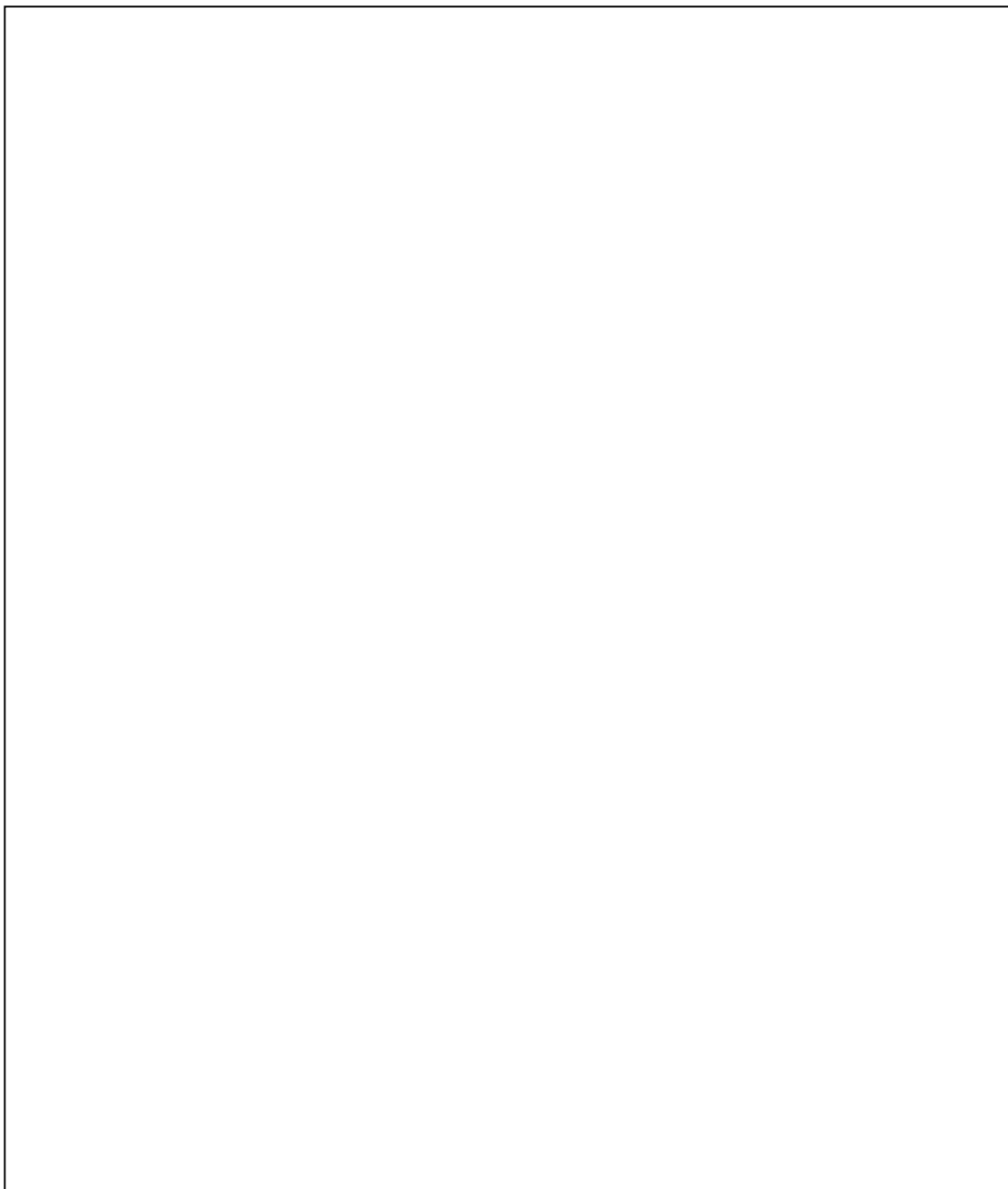


Figura 02: Estrutura reprodutiva de *S. cymosum* observada em microscópio estereoscópio. a: Visão geral de receptáculos de *S. cymosum*. b: Receptáculos com os zigotos formados e aderidos à sua superfície através de mucilagem transparente. c: Zigoto de *S. cymosum*. Escala: a - b) 0,5 cm; c) 200 μ m.

3.1. Caracterização de desenvolvimento *in vivo* sob microscopia de luz (ML)

Durante as três primeiras horas após a fecundação (AF), o zigoto está envolto por uma mucilagem aderente e é ligeiramente arredondado (Fig. 2c, 3a) e com um diâmetro de aproximadamente 200 μm . Quatro horas AF, o zigoto apresentou dois pólos distintos, o pólo de apical e o basal (Fig. 3b). A primeira divisão celular, equatorial, ocorreu após 6 horas de desenvolvimento, dando origem a um embrião de duas células morfologicamente distintas, polarizadas: a célula apical obtusa e uma pequena célula basal (Fig. 3c). No embrião de 8 AF, a segunda divisão celular foi observada na parte superior da célula basal, transversal em relação ao maior eixo do embrião, resultando em um corpo com três células, a célula basal pequena irá formar os rizóides (Fig. 3d). Nove horas após a fertilização, a terceira divisão celular ocorreu na célula apical, longitudinal em relação ao maior eixo do embrião (Fig. 3e). Em cerca de 10 horas após a fertilização, a quarta e quinta divisões celulares foram observadas no embrião. No eixo mais longo do embrião, a quarta divisão celular foi localizada longitudinalmente na célula acima da pequena célula basal (Fig. 3f), e a quinta divisão celular foi transversal e ocorreu nas duas células apicais (Fig. 3g). Após 11 a 17 horas de desenvolvimento, por meio de divisões celulares subsequentes, um embrião multicelular já está formado (Figs. 3 h – i).

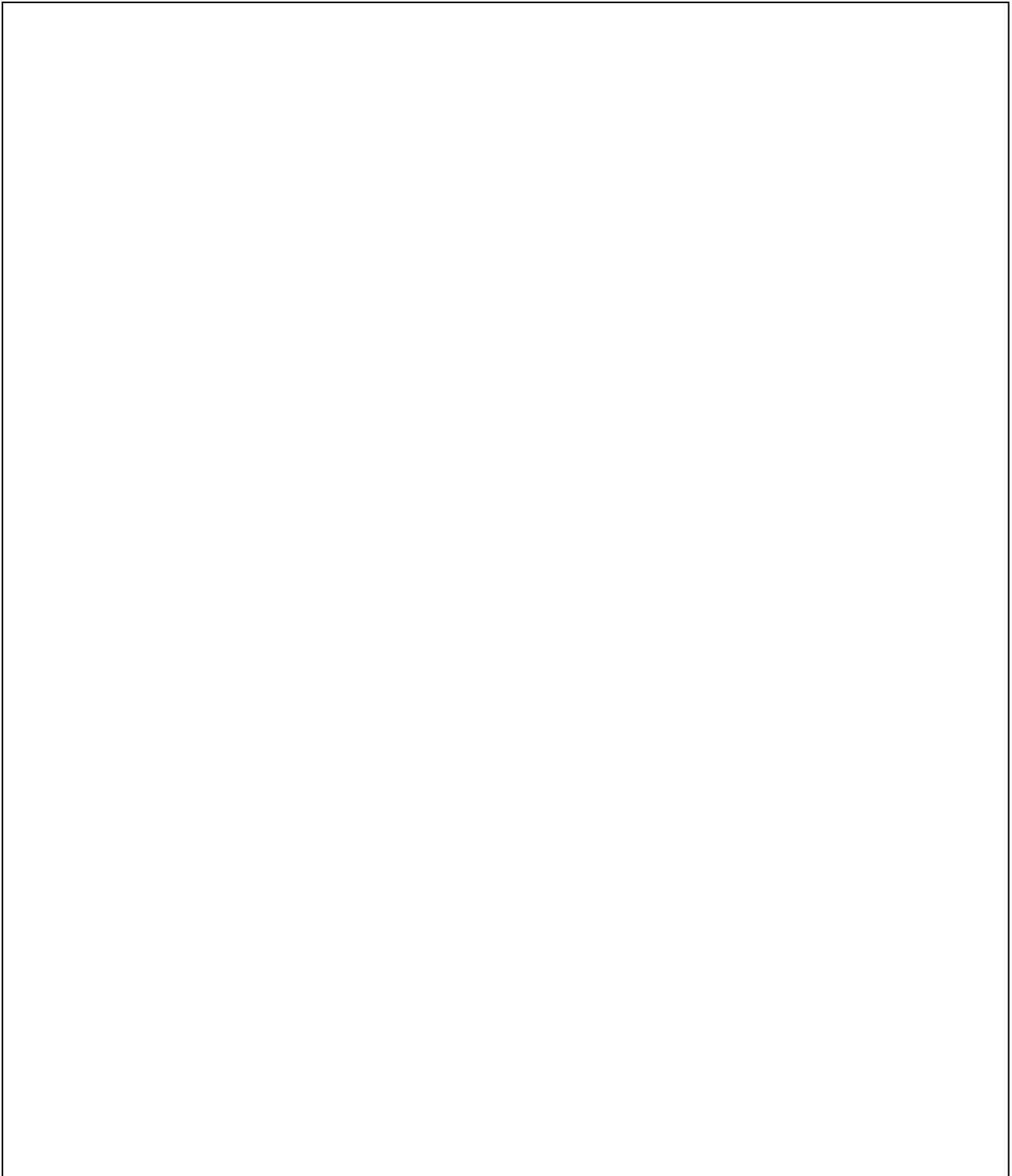


Figura 03: Zigotos e embriões de *S. cymosum* observados em microscópio estereoscópio. a) Zigoto com 3 horas. b) Zigoto com 4 horas, e com dois pólos (setas). c) Embrião de 6 horas e a primeira divisão celular (setas). d) Embrião de 8 horas, a primeira divisão celular (setas) e a segunda divisão celular (ponta da seta). e) Embrião de 9 horas, com a primeira divisão celular (setas), segunda a divisão celular (seta) e a terceira divisão celular (asterisco). f) Embriões com 10 horas, com a quarta divisão celular (setas). g) Embriões de 10 horas com a quinta divisão celular (setas). h - i) Embrião com 11 horas. Escala: 20 um.

A célula basal que dá origem aos rizóides inicia suas divisões aproximadamente 13h AF, e 20 h AF observou-se o alongamento destas células rizoidais. Em 26 horas, os rizóides estavam completamente individualizados (Fig. 4a). Após 48 horas de desenvolvimento, o embrião está fixado ao substrato e cresce como resultado de proliferação celular na extremidade apical voltada para a luz, o que gerou a nova plântula (Fig. 4b).

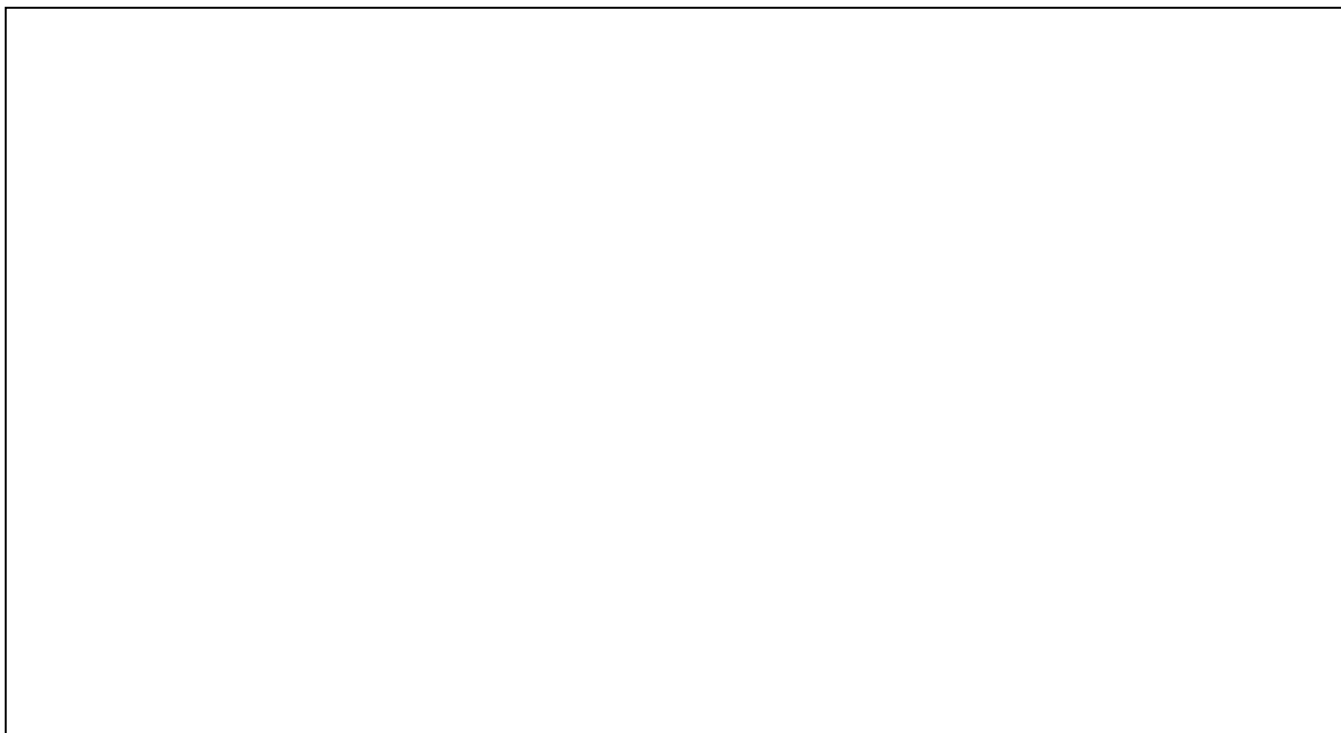


Figura 04: Embriões de *S. cymosum*. a) Embrião de aproximadamente 20 horas de desenvolvimento. b) Embrião com cerca de 48 horas de desenvolvimento. Escala: 200 μ m.

3.2. Caracterização de desenvolvimento com testes citoquímicos observados em microscopia de luz (ML)

Três horas após a fertilização, os zigotos corados com ATO mostraram vesículas ortocromáticas distribuídas por todo o citoplasma. Estas são maiores quando localizadas perto da parede celular, mas, menores quando localizadas na região central da célula. Uma parede celular fina pode ser identificada por reação metacromática, indicando a presença de polissacarídeos ácidos (Fig. 5a). O teste CBB revelou um pequeno núcleo, em relação ao volume da célula, rodeado por um material protéico altamente denso. Vesículas compostas de materiais protéicos foram observadas

em todo o citoplasma (Fig. 5b). Na reação de PAS, o zigoto apresentou vesículas, em todo o citoplasma, que reagiram positivamente, indicando a presença de polissacarídeos neutros. A parede celular também reagiu positivamente ao PAS (Fig. 5c) revelando a composição celulósica.

Após 4 horas de desenvolvimento do zigoto, vesículas verde-azuladas foram observadas com a reação de ATO. Essas vesículas foram distribuídas ao longo dos eixos apical e basal, indicando a presença de fisóides. Neste estágio observou-se espessamento da parede celular por meio da reação metacromática (Fig. 5d). Dois pequenos núcleos foram observados nestas células, e um aumento de pequenas vesículas com material protéico, distribuídas por toda a célula, foram identificadas com o uso de CBB. No mesmo teste, o zigoto também mostrou vesículas esverdeadas a marrom, o que demonstra a presença de fisóides (Fig. 5e). Nesta fase, as vesículas que foram observadas por reação positiva para PAS mostraram uma redução no tamanho e foram encontradas distribuídas por todo o citoplasma da célula. As vesículas também foram visualizadas na região nuclear (Fig. 5-F). Em 6 horas de desenvolvimento, o embrião apresentou espessamento da parede celular voltada para o exterior das células, ou seja, a parede que envolve externamente o embrião, por meio de reação com ATO, indicando a deposição contínua de componentes ácidos. Nesta fase de desenvolvimento, após a primeira divisão celular uma parede celular fina foi formada (Fig. 5g). Em amostras tratadas com CBB, o material protéico foi observado em vesículas justapostas à nova parede celular que divide internamente o embrião. Estas vesículas também foram observadas na região perinuclear (Fig. 5h). As vesículas resultantes da reação positiva para PAS foram observadas, em maior quantidade, sendo nas regiões perinucleares nas duas células do embrião (Fig. 5i).

Com 7 a 8 horas de desenvolvimento, no embrião corado com ATO, uma acumulação de vesículas esverdeadas e ortocromáticas foram observadas, concentradas, principalmente, nas regiões perinucleares (Fig. 5j), além de um aumento na concentração de vesículas marrons claras (fisóides), conforme identificado pela reação CBB (Fig. 5k), e um aumento da quantidade de vesículas positivas ao PAS (Fig. 5d).

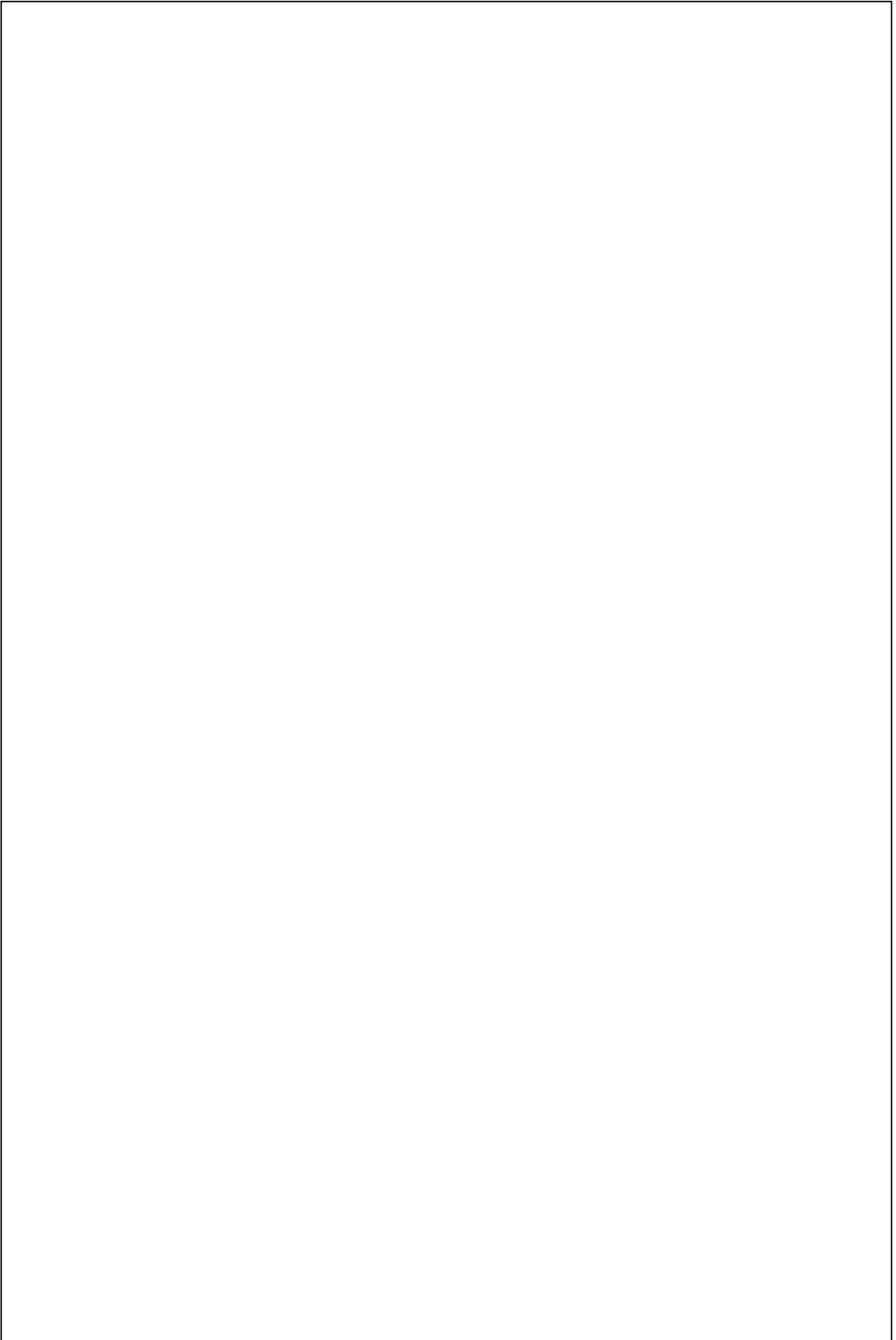


Figura 05: Zigotos e embriões de *S. cymosum* em secções transversais de 3 um observados em ML . a-c) Zigotos de 3 horas AF. a) coloração ATO mostra vesículas ortocromáticas no citoplasma (setas) e reação metacromática na parede celular estreita no exterior da célula; b) Coloração CBB mostra a presença de um núcleo (asterisco) e material protéico com vesículas (setas); c) Coloração PAS mostra a presença de vesículas com polissacáridos neutros (seta). d-f) Zigotos de 4 horas AF corados com ATO , CBB e PAS, respectivamente, com o estreitamento do pólo basal (seta) e presença de dois núcleos (cabeça de seta) corados com CBB. g-i) Embriões de 6 horas AF g) corado com ATO e com a primeira divisão (seta), h) núcleo (asterisco) e vesículas (cabeça de seta) corados com CBB , contornando a primeira divisão celular (seta), i) aglomerados de vesículas (seta) e a primeira divisão celular (seta) marcada com PAS. j-l) Embriões de 8 a 9 horas AF, j) processado com ATO indicando a presença da segunda divisão celular (seta) com grupos de vesículas azuis esverdeadas (ponta de seta), e k) corados com CBB mostrando a segunda divisão celular (seta) e com várias vesículas azuis e marrons próximas da região do núcleo, bem como a presença de dois núcleos (ponta de seta). l) segunda divisão celular (seta) corados com PAS. Escala: 20 µm.

Depois de 10 horas de desenvolvimento, uma menor quantidade de vesículas foi observada pela reação ortocromática com ATO (Fig. 6d). Com CBB, pequenas vesículas com material protéico foram observadas nas paredes de células que estavam dividindo internamente o embrião (Fig. 6e). Estas vesículas apresentaram uma distribuição similar à de vesículas observadas com PAS na etapa anterior (fig. 6f).

Após 13 horas de desenvolvimento, o crescimento da extremidade apical do embrião foi objeto de sucessivas divisões celulares, e no pólo basal, divisões celulares longitudinais ocorreram, formando duas ou três células que deram origem aos rizóides (Fig. 6g-i). Em aproximadamente 20 h AF, a reação metacromática com ATO revelou um espessamento da parede celular, que divide o embrião internamente (fig. 6j), e o início do alongamento das células basais em forma de raiz (Fig. 6k). Neste momento, as células apicais mostraram um padrão irregular, e as vesículas coradas com PAS foram observadas em maior quantidade nas células superficiais, corticais, do embrião (Fig. 6l).

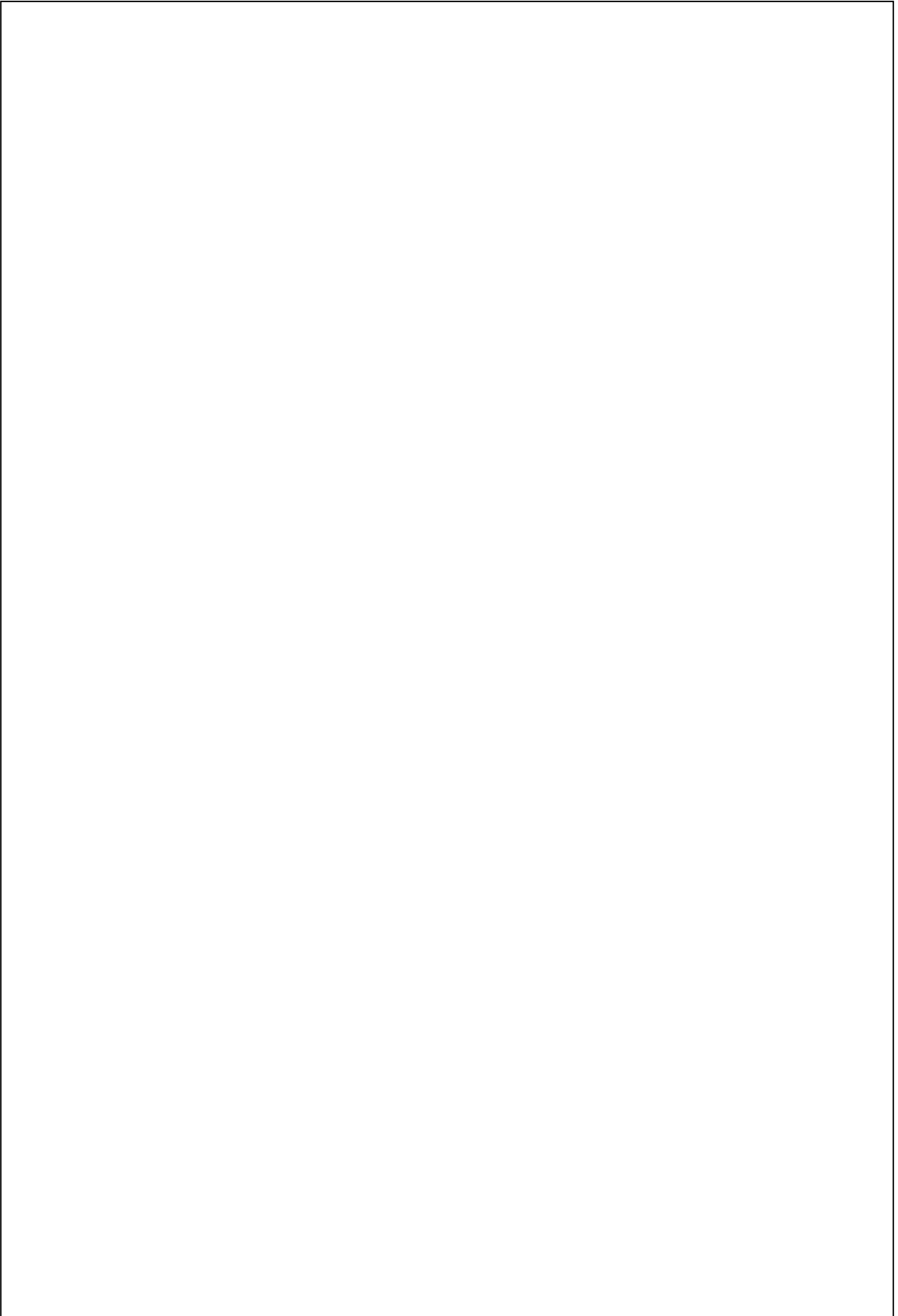


Figura 06: Embriões de *S. cymosum* processados com ATO, CBB e PAS. a-c) Embriões de 8 a 9 horas AF corados com ATO, CBB e PAS, respectivamente, com a terceira divisão celular (setas), a) aglomerados de vesículas azuis-esverdeadas (cabeça de seta), b) vesículas azuis perto da parede celular interna (ponta de seta), c) aglomerados de vesículas, mostrando reação PAS-positivo, centralizadas em cada célula do embrião (ponta de seta). d-f) Embriões de 10 horas AF processados com ATO, CBB e PAS, respectivamente, d) quarta divisão celular (seta), e) quarta e quinta divisão celular (seta) mostrando aglomerados de vesículas marrons (setas), f) sexta divisão celular (seta). g-i) Embriões de 13 horas AF processados com ATO, CBB e PAS, respectivamente, com divisões na célula basal (setas). j-l) Embriões de 20 horas AF processados com ATO, CBB e PAS, respectivamente, indicando as células do rizóide alongadas (setas) e j-) as paredes celulares internas mostrando o aumento de sua espessura. Escalas: 20 um.

3.3. Caracterização do desenvolvimento do zigoto com observação por microscopia de varredura a laser – Confocal

Usando a microscopia de varredura a laser - confocal ao longo do processo de desenvolvimento, observou-se um grande número de pequenos cloroplastos. Com a primeira divisão celular, os zigotos com 6 horas de desenvolvimento mostraram uma distribuição mais homogênea de vesículas contendo compostos fenólicos, ou seja, os fisóides, que mostraram fluorescência azul (Fig. 7a). Ao mesmo tempo, pequenos cloroplastos foram observados em todo o citoplasma, no zigoto, que mostrou fluorescência vermelha (Fig. 7b, c). Em embriões com cerca de 13 horas de desenvolvimento, os compostos fenólicos foram observados distribuídos nas células com fluorescência intensa azul (Fig. 7d). Os cloroplastos também mostraram intensa fluorescência nesta fase de desenvolvimento em todas as células (fig. 7e, f). Nesta fase, foi possível observar o início das divisões na célula basal, começando a formação dos rizóides (fig. 7 d-f). Em zigotos com 20 horas de desenvolvimento, estas células começaram a alongar-se, enquanto que, ao mesmo tempo, mantém a mesma distribuição de cloroplastos e de compostos fenólicos (Fig. 7 g-i).

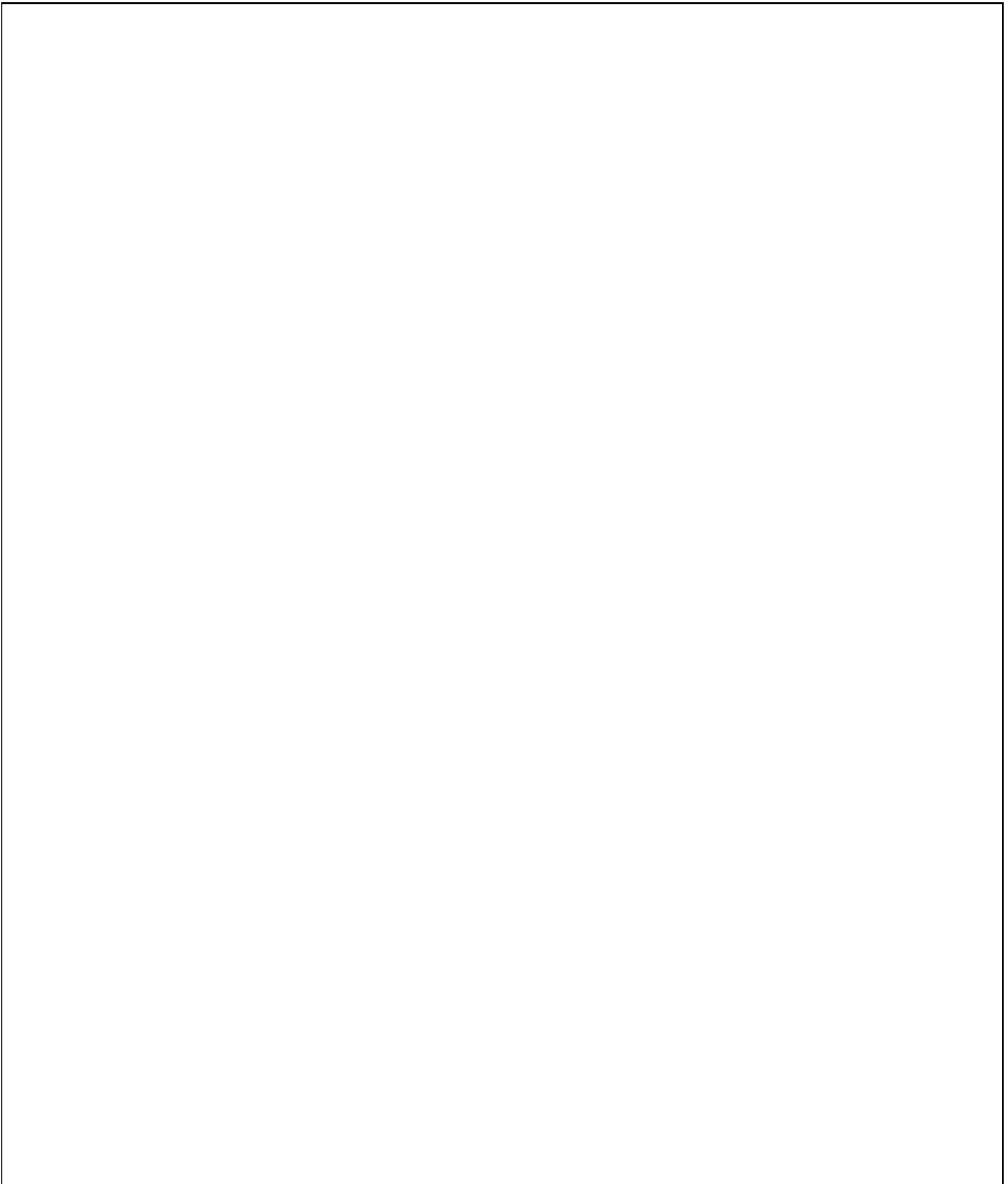


Figura 07: Zigoto e embrião de *S. cymosum* analisados em em microscopia CONFOCAL. a) Zigoto com 6 horas AF, mostrando fluorescência azul dos compostos fenólicos. b) Zigoto com 6 horas AF, mostrando fluorescência vermelha dos cloroplastos. c) Zigoto com 6 horas A, mostrando fluorescência azul de compostos fenólicos e de fluorescência vermelha dos cloroplastos. d) Embrião de 13 horas AF, mostrando fluorescência azul de compostos fenólicos. e) Embrião de 13 horas AF, mostrando fluorescência vermelha dos cloroplastos. f) Embrião com 13 horas AF, mostrando fluorescência azul de compostos fenólicos e de fluorescência vermelha dos cloroplastos. g) Embrião com 24 horas de AF, mostrando fluorescência azul de compostos fenólicos; h) embrião com 24 horas de AF, mostrando fluorescência vermelha dos cloroplastos. i) Embriões com 24 horas AF, mostrando fluorescência azul de compostos fenólicos e de fluorescência vermelha dos cloroplastos. Escalas: 40 μm .

3.4. Caracterização ultraestrutural do desenvolvimento com microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Quando observados sob microscopia eletrônica de transmissão, os zigotos exibiram vacúolos elétron-transparentes de tamanhos diferentes, organizados de forma homogênea e ocupando a maior parte do citoplasma (Fig. 8a). Entre esses vacúolos foram observados corpos osmiofílicos elétron-densos. Entre o conjunto de vacúolos, agregados de organelas celulares, tais como cloroplastos, corpos de Golgi, mitocôndrias e pequenas vesículas com conteúdos diferenciados também foram observados (Fig. 8b).

Nas fases iniciais de desenvolvimento foi possível observar a parede celular (PC), a qual é formada logo após a fertilização. Essa parede é mais espessa e composta de materiais microfibrilares imersos em uma matriz de elétron-transparente amorfa. Corpos osmiofílicos semelhantes aos observados no citoplasma periférico do zigoto ocorreram entre as microfibrilas da PC (Fig. 8c). A PC é formada pela deposição de material derivado de um segundo tipo de vesícula, a qual é menor e composta de materiais fibrilares presentes no citoplasma periférico (Fig. 8d).



Figura 08: Zigoto de *S. cymosum* em MET. a) Região central do zigoto com vesículas elétron-transparentes (asterisco) e vesículas elétron-densas (seta); algumas vesículas com material denso no interior (seta). b) Região diferenciada do citoplasma com diferentes tipos de organelas (seta) cercadas por vesículas elétron-transparentes (cabeça de seta). c) Parede celular externa ao zigoto (PC) com vesículas elétron-densas (seta) entre as fibras de celulose. d) Parede celular externa ao zigoto (PC) com vesículas próximas e cheias de material fibrilar (seta).

Nas fases iniciais, antes das divisões celulares que formam o embrião de *S. cymosum*, os corpos de Golgi estão localizados em regiões diferenciadas do citoplasma, por vezes, isolado entre vacúolos, mas em maior quantidade na região perinuclear (Figs. 9a, 9f). Foi também possível observar vesículas em torno dos corpos de Golgi, com características diferenciadas das de outras vesículas que compõem o citoplasma, incluindo a presença de material com teor pouco granular e de menores tamanhos (Fig. 9a).

Como pode ser observado sob microscopia confocal, os cloroplastos são distribuídos por

todo o citoplasma (Fig. 9b) e são tipicamente hipertrófica e, aparentemente, ainda em desenvolvimento (Fig. 9b). Os cloroplastos apresentaram uma característica de organização de algas pardas, com tilacóides agrupados em bandas de 2-3 membranas (Fig. 9c), mas com distribuição irregular ao longo do maior eixo dos cloroplastos (Fig. 9b). As mitocôndrias foram encontradas principalmente perto dos cloroplastos (Fig. 9b).

Em algumas regiões do citoplasma, e em áreas perinucleares, foi possível observar os conjuntos de membranas desorganizadas juntamente com algumas vesículas, com materiais elétron-densos e outros elétron-transparentes (fig. 9d).

O núcleo é relativamente pequeno em comparação com o tamanho inicial do zigoto, com um grande nucléolo elétron-denso (Fig. 9e). Este é preferencialmente encontrado nas regiões periféricas da célula, rodeado por diversas pequenas vesículas principalmente elétron-transparentes (Fig. 9e), além da presença de algumas organelas tais como cloroplastos, mitocôndrias e corpos de Golgi (Fig. 9F). Depois de mais de 11 horas de desenvolvimento, o embrião de *S. cymosum* apresenta uma organização multicelular, com as células formadoras de rizóides e do talo inicial do novo indivíduo já determinados. Nesta fase, as células apresentam um citoplasma caracteristicamente diferente em comparação com o do zigoto, tendo um citoplasma denso e heterogêneo com vesículas elétron-densas cheias de material fibrilar (Fig. 10a) e apresentando divisões internas com uma parede celular muito delgada (Fig. 10a e 11f). No entanto, a formação de algumas regiões do citoplasma diferenciado ainda ocorreram neste momento, com aglomerados das organelas, que também foram observados em células do zigoto (Fig. 10b e 10c).

Entre as organelas, os cloroplastos mantiveram as características semelhantes às das células zigóticas (Fig. 9c); no entanto, os corpos de Golgi foram mais hipertróficos, apresentando mais cisternas e vesículas na sua face cis (Fig. 10d), bem como vesículas de transição em algumas estruturas (Fig. 11a).

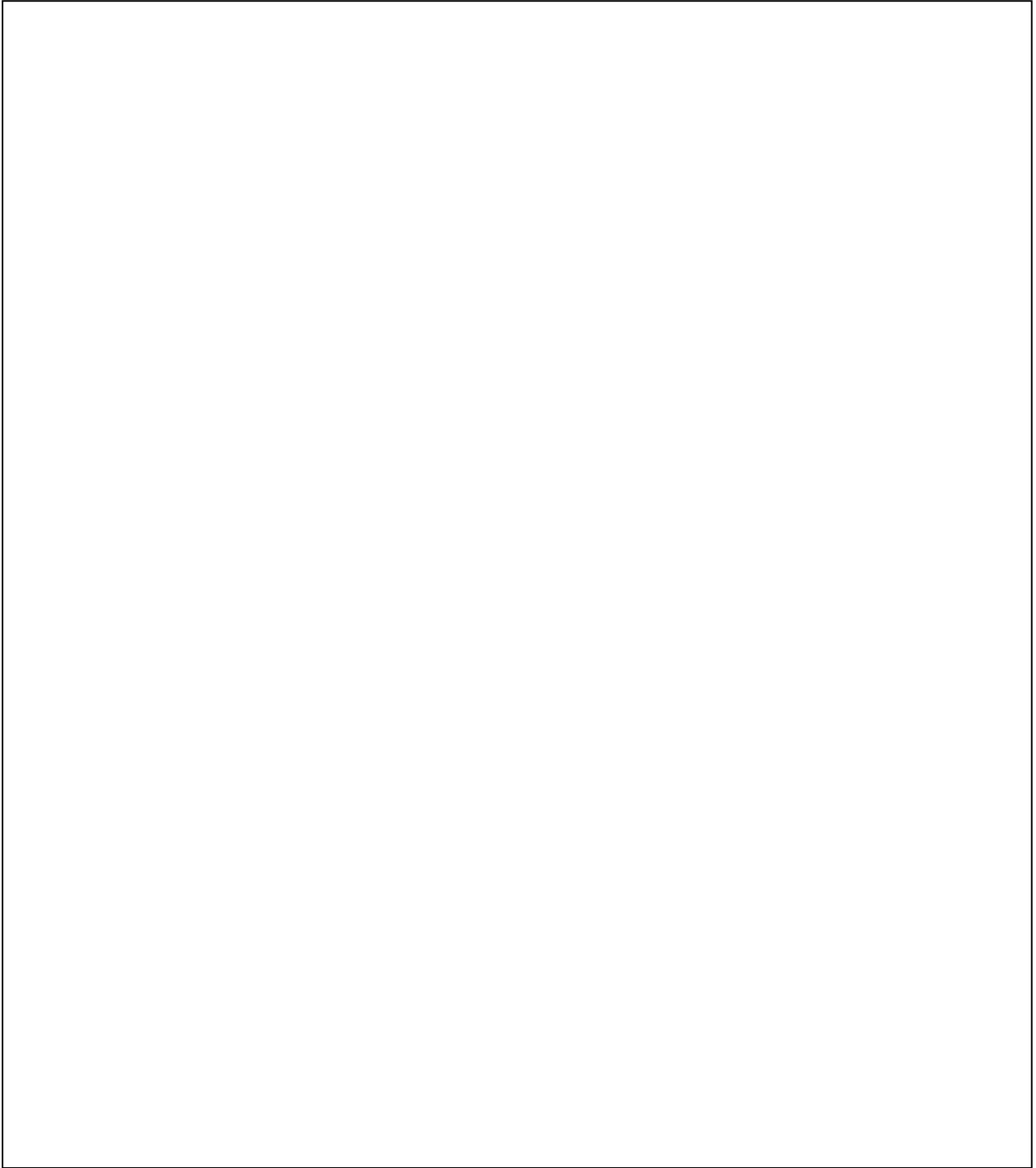


Figura 09: Zigoto de *S. cymosum* em MET. a) Corpos de Golgi (seta) com pequenas vesículas (seta) em regiões isoladas do citoplasma. b) Os cloroplastos (C) e mitocôndrias associadas (seta). c) Cloroplasto (C) detalhado com tilacoides agrupados com bandas de três membranas (seta). d) Agrupamento de membranas (ponta de seta) com vesículas elétron-densas (asterisco) e vesículas de elétron-transparentes (seta). e) Núcleo (N) com nucléolo proeminente (seta). f) Região perinuclear circundada com organelas como cloroplasto (seta branca), corpos de Golgi (seta escura) e mitocôndrias (seta).

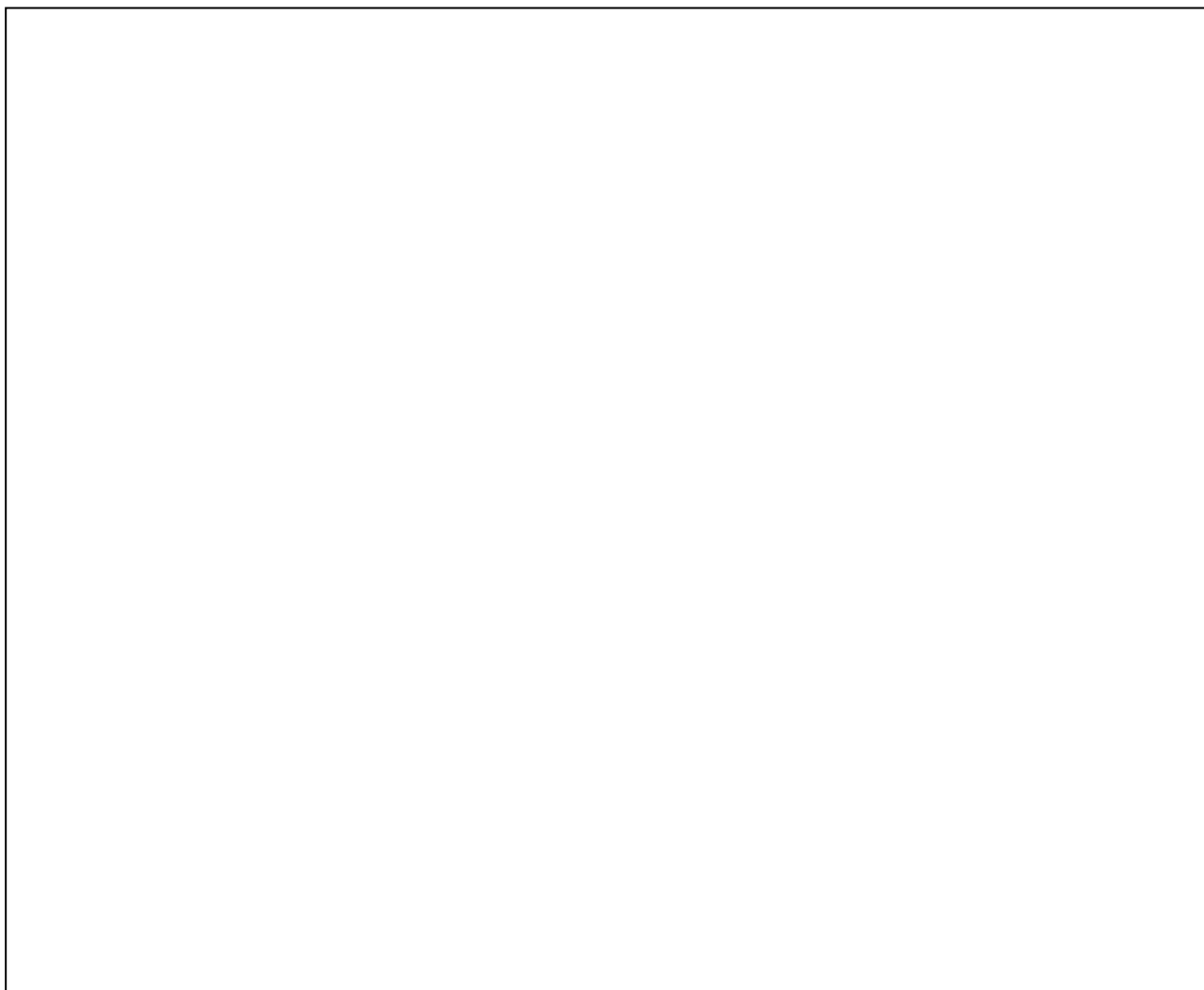


Figura 10: Embrião de *S. cymosum* em MET. a) Visão geral do citoplasma da célula do embrião, iniciando o processo de divisão celular (seta). b) Formação de citoplasma diferenciado nas células do embrião com organelas como cloroplastos (C) e mitocôndrias (setas). c) Citoplasma diferenciado com cloroplasto (C) e mitocôndrias (seta). d) Corpos de Golgi (G) individualizados no citoplasma e com a presença de um tipo diferente de vesícula (seta) na sua face cis.

Nos embriões, o núcleo estava presente nas regiões centrais das células, além de serem muito pequenos, com cerca de 6 μm de diâmetro, em relação ao tamanho das células que constituem o embrião, e com nucléolo grande (Fig. 11b). Este núcleo ainda é circundado por um conjunto de vesículas e organelas, principalmente com corpos de Golgi (Fig. 11b-d). Nesta fase de desenvolvimento, uma membrana dupla rica em complexos de poros nucleares foi observada para aumentar a troca de substâncias entre o núcleo e o citoplasma (Fig. 11C-d).

A parede celular, que delimita exteriormente o embrião, foi formada por agregados de

microfibrilas de celulose paralelos incorporados em uma matriz amorfa, ainda mais espessa do que as PCs das células internas. Durante a embriogênese, foram observadas vesículas depositando continuamente material para a formação da parede celular exterior (Fig. 11e). No entanto, as paredes celulares que se dividem as células internas do embrião eram mais finas (Fig. 11f).

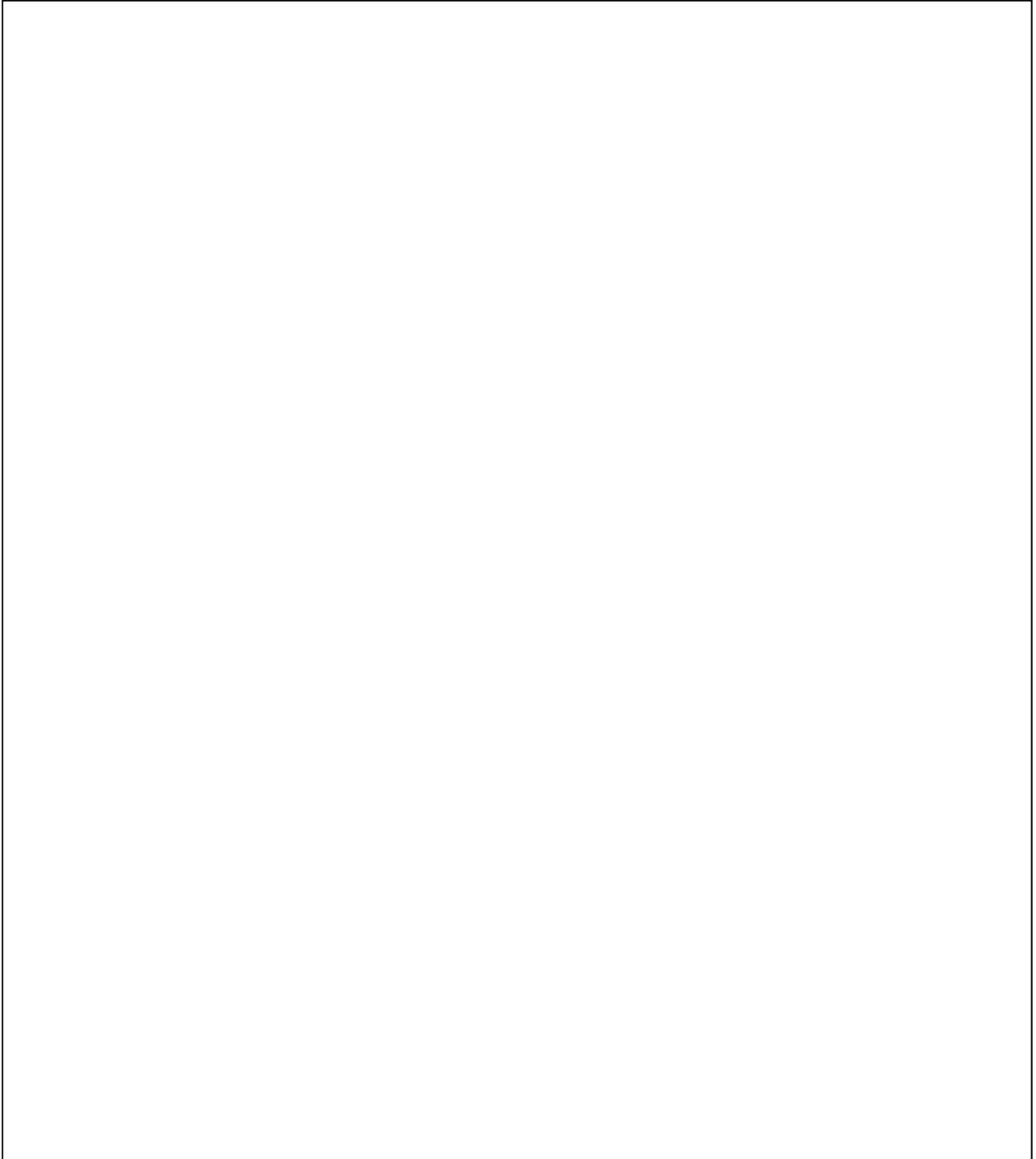


Figura 11: Embrião de *S. cymosum* em MET. a) Corpos de Golgi com vesículas de transição (setas brancas). b) Núcleo (N) com nucléolo denso (seta). c-d) Detalhe de núcleo (N) com a dupla membrana interrompida por poros (seta). e)

Parede celular na extremidade do embrião com vesículas depositando materiais associados à sua formação contínua. f)
Paredes celulares estreitas (setas) das células que dividem internamente o embrião.

4. DISCUSSÃO

Durante a cultura de *S. cymosum*, as temperaturas ótimas para produzir a maior quantidade de zigotos foi de 22°C, seguido de 26°C, e a 30°C os receptáculos morreram. Resultado semelhante foi encontrado durante a cultura de *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh, onde os embriões cresceram a 25°C, mas para aqueles mantidos a 30°C, 85% das plântulas morreram (Choi et al., 2008).

Em *S. cymosum* a maturação, liberação e fertilização dos gametas a partir de receptáculos são processos dependentes de luz, como observado para outras algas pardas, como *Fucus* e *Pelvetia compressa* (J. Agardh) Detoni (Fowler e Quatrano, 1995).

Logo após a fertilização, os zigotos de *S. cymosum* permanecem ligados na superfície do receptáculo, pelo menos, até 24 h AF, como visto em *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt, e as oosferas são fertilizados enquanto ainda mantinha na superfície dos receptáculos (Sten, 2004). Os primeiros zigotos são esféricos e com simetria radial, como no *Fucus* e *Pelvetia compressa* (Kropf et al., 1999). No entanto, os zigotos de *S. cymosum* mostraram um diâmetro maior, de cerca de 200 µm, enquanto que os gêneros mencionados acima foram de 75 e 100 µm de diâmetro (Fowler e Quatrano, 1995).

Expressão da polaridade celular nesta fase é importante para o desenvolvimento apropriado destas algas, proporcionando a transição de zigoto simétrica para a forma assimétrica. Em algas fucoídes, estímulos ambientais são necessários para estabelecer um eixo no zigoto, que orienta tanto a primeira divisão celular quanto o crescimento dos rizóides (Kropf et al., 1999). Na ausência de qualquer estímulo ambiental, os zigotos são polarizados de acordo com a posição da entrada do anterozóide (Hable e Kropf, 2000). A polaridade pode ser estabelecida intrínsecamente e

extrínsecamente durante o desenvolvimento precoce de zigotos de algas fucoides. Os factores extrínsecos são importantes na polarização inicial; mais tarde, porém, os fatores intrínsecos, ou seja, os determinantes citoplasmáticos, especificamente agem no controle e determinação das duas células iniciais de formação dos rizóides e do talo nos embriões (Kropf, 1992).

In vitro, zigotos de *S. cymosum* exigem cerca de 2 horas de luz para estabelecer a forma assimétrica que orienta o eixo talo-rizóide. Polarização também é induzida pela entrada do anterozóide que ativa a oosfera (Hable e Kropf , 2000). Em *Fucus*, após a fertilização este eixo é também estabelecido nos zigotos, mas em menos tempo, com uma hora de impulsos de luz. Isto resulta na formação de rizóides no lado sombreado em relação ao gradiente de luz (Goodner e Quatrano, 1993). Da mesma forma, em *Fucus distichus*, durante 6 a 10 h AF, o eixo é ainda lábil. Consequentemente, esta assimetria pode ser reorientada por gradientes externos que determinam a orientação do eixo original por dependência de luz. A orientação do eixo torna-se insensível a sinais externos, mas apenas entre 10 e 14 h AF, num processo denominado eixo de fixação (Fowler e Quatrano, 1995). Com base nesta evidência, acredita-se que os zigotos de *S. cymosum* não são lentos na transição para a reorientação assimétrica por diferentes factores extrínsecos, considerando que as primeiras divisões ocorrem na ausência de luz e que a fixação é determinada logo após a fertilização.

A primeira divisão celular em *S. cymosum* foi transversal ao eixo mais longo do zigoto, entre 4 a 5 horas após a fertilização, dando origem a um embrião com duas células morfologicamente distintas. Este tempo é diferente do encontrado para *Fucus*, onde o tempo requerido para a primeira divisão é de 24 horas pós-fertilização (Kropf, 1994). Sendo esta formação inicial de duas células diferentes é essencial para o desenvolvimento posterior do organismo (Bisgrove *et al.*, 2003).

A primeira divisão celular em *S. cymosum* ocorre rapidamente, com 4 h AF. Em contraste, a primeira divisão celular em *Fucus* e *Silvetia* ocorre mais lentamente, com 24 h AF. No processo de polarização, o zigoto de *S. cymosum* torna-se oval e a primeira divisão celular é equatorial. No

entanto, em *Pelvetia* e *Fucus*, após a polarização a extremidade mais fina sofre um leve alongamento, onde então ocorre a primeira divisão celular. Esta divisão vai formar duas células morfológica e fisiologicamente distintas, e a célula alongada irá dar origem aos rizóides. Esta célula acumula principalmente componentes envolvidos nos mecanismos de adesão (Quatrano, 1973; 1978).

Em *Fucus* e *Pelvetia*, a célula rizoidal, formada já com a primeira divisão celular, sofre alongamento contínuo por divisões transversais desde o início do desenvolvimento (Kropf *et al.*, 1999; Hable e Kropf, 2000; Quatrano e Mostrar, 1997; Fowler e Quatrano, 1997), enquanto que em *S. cymosum*, observou-se a formação da primeira célula rizoidal somente após a segunda divisão. Além de que em *S. cymosum* a formação de rizóides ocorre por divisões longitudinais na célula rizoidal em fases mais posteriores do desenvolvimento.

Assim, os processos que envolvem a formação de células polares em *Fucus* e *Sargassum* ocorreram pelos mesmos eventos responsáveis pela formação do eixo, o qual também é determinado pela entrada dos gametas masculinos (Hable e Kropf, 2000; Quatrano, 1978) e pela localização de materiais celulares ao longo do eixo, os quais são necessários para a formação da parede celular dos pólos, rizóides e tálus (Quatrano, 1990).

Entre os componentes celulares que estão presentes em zigotos e embriões de algas pardas podemos destacar os compostos fenólicos, que reagem quando tratados com 1) ATO, em tons de azul a azul-esverdeado, e 2) CBB, em tons marrons, como também observado em outras algas pardas (McCully, 1966; Schoenwaelder e Clayton, 1998a; Schoenwaelder e Clayton, 1999). No teste de ATO, também foi possível identificar os componentes sulfatados e a parede celular, com reação metacromática em zigotos e embriões de *S. cymosum*. Em MET, os compostos fenólicos foram observados na forma de grânulos elétron-densos no citoplasma e entre as fibras da parede celular. Estes corpos de elétron-densos também têm sido observados em outras algas pardas (Schoenwaelder e Clayton, 1999; Schoenwaelder, 2002; Ouriques e Bouzon, 2008). Também foi

observado o elevado número de vacúolos elétron-transparentes encontrados em zigotos de *S. cymosum* na embriogênese inicial, assim como durante a embriogênese de *Fucus*. No curso do desenvolvimento de ambos, *S. cymosum* e *Fucus*, os conteúdos destes vacúolos são incorporados na parede celular, e os componentes citoplasmáticos dos zigotos são alterados (Pollock, 1970). Brawley et al. (1976) relataram o desenvolvimento de vacúolos na gameta não fertilizada.

O processo de formação da parede celular está relacionado com a alta densidade de vacúolos e vesículas derivadas dos corpos de Golgi. Os corpos de Golgi foram encontrados nas regiões perinucleares e citoplasma diferenciado, predominantemente hipertrófica, comprovando a intensa atividade destas estruturas nas células reprodutivas (Ouriques e Bouzon, 2008; Schoenwaelder e Clayton, 1998b). Corpos de Golgi executam funções que incluem a produção de uma matriz liberada para o citoplasma do zigoto no final do desenvolvimento e, na produção de vesículas com o material para a adesão celular e formação da parede celular (Ouriques e Bouzon, 2008).

Os cloroplastos das algas pardas apresentaram tilacóides agrupados em faixas de três a três regularmente distribuídos ao longo do eixo maior (Lee, 2008). No entanto, os cloroplastos nas células do embrião de zigoto apresentaram menos tilacóides e estavam irregulares, quando comparados com os das células vegetativas. Esta característica pode ser o resultado da intensa proliferação de organelos em células em rápida divisão (Ouriques e Bouzon, 2008).

Todos os processos celulares observados durante a formação das células reprodutivas são coordenados pelos núcleos (Ouriques e Bouzon, 2008). No desenvolvimento inicial de *S. cymosum* um grande número de poros nucleares pode ser observado, indicando a intensa mudança no núcleo e no citoplasma, características morfológicas comuns na embriogênese.

Estudos descrevendo o desenvolvimento inicial de outras espécies de *Sargassum* (*Sargassum thunbergii*, Zhao et al., 2008) e *Sargassum vachellianum* Greville, Yang e Zhang, 2014) indicam a formação de oito núcleos logo após a fertilização. Momentos antes da primeira divisão, sete deles são degradados restando apenas um núcleo. No entanto, esses autores não utilizaram qualquer

método para marcar os núcleos em uma maneira que iria provar essa alegação. Assim, quando os zigotos e embriões precoces de *S. cymosum* foram analisados utilizando testes de MET e citoquímica para marcação de núcleo, tais estruturas previamente descritas como núcleos foram identificadas como contendo somente as vesículas com uma acumulação de compostos fenólicos.

Uma variedade de métodos citoquímicos podem ser utilizados para marcar os compostos fenólicos, tais como ATO, que, em algas marcam, principalmente, nas cores rosa a violeta os polissacarídeos sulfatados e os compostos fenólicos em azul-esverdeado (Schoenwaelder e Clayton, 1999). Além disso, quando o material foi tratado com CBB, um marcador nuclear, foi possível identificar um núcleo pequeno. E com a utilização de MET, o núcleo do zigoto media aproximadamente 6 μm de diâmetro, sendo extremamente pequeno em comparação com o tamanho do zigoto recém-formado, que tem em média 200 μm de diâmetro.

Neste estudo, observou-se que o padrão inicial de desenvolvimento de algas do gênero *Sargassum* difere em alguns aspectos, quando comparado com outros gêneros da ordem Fucales. Características como, tempo após a fertilização, a ocorrência da primeira divisão celular, adesão ao substrato para começar a divisão celular, o padrão de divisão celular e formação inicial dos rizóides, são exclusivas para *Sargassum*. Com base nos resultados demonstrados no presente estudo, o comportamento de zigotos de *S. cymosum* no desenvolvimento inicial, em conjunto com os dados obtidos nas condições mais adequadas para o aumento da produção e crescimento de zigotos, podem formar a base para novos estudos para produzir grandes quantidades de "sementes" para o cultivo em massa de *S. cymosum*.

CAPÍTULO 03

**Efeitos da colchicina e citocalasina B no desenvolvimento polarizado de zigotos
de *Sargassum cymosum* (Phaeophyceae, Fucales)**

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de algas da ordem fucalis é mediado pela polarização celular dos componentes citoplasmáticos envolvidos neste processo (Katsaros *et al.*, 2006), sendo o desenvolvimento polar resultado da expansão celular em uma única direção (Kropf *et al.*, 1998).

A indução da polaridade celular em zigotos das algas fucóides é uma contínua sobreposição de eventos que ocorrem durante as primeiras 10 horas após a fecundação. Pode-se considerar que este evento ocorre em dois estágios, (1) seleção do eixo, seguido pela (2) amplificação do eixo polar (Kropf, 1997).

Zigotos da alga parda *Fucus* fornecem um modelo de estudo dos mecanismos básicos envolvidos na formação de uma célula polarizada, que ocorre através da estabilização do ápice polar e do transporte de componentes citoplasmáticos direcionado para o pólo de formação dos rizóides (Quatrano *et al.*, 1985; Quatrano, 1990; Hable e Hart, 2010).

Para a seleção do eixo polar o zigoto recebe vários sinais externos, após a percepção deste sinal ele é traduzido e então é selecionado o ápice polar na célula (Kropf, 1997). Após a seleção do ápice ocorre a sua fixação, a qual se dá antes mesmo de qualquer alteração morfológica. Uma vez fixado, inicia a acumulação localizada de componentes citoplasmáticos, resultando no início da expansão visível do polo do rizóide (Quatrano *et al.*, 1991).

Nas células vegetais os filamentos do citoesqueleto parecem estar envolvidos na determinação da polaridade do eixo das células em diferenciação celular (Lloyd *et al.*, 1987). Testes envolvendo os componentes do citoesqueleto no processo de fixação e crescimento do ápice polar comprovaram tal importância do citoesqueleto no desenvolvimento (Quatrano, 1973). Estudos utilizando o inibidor dos filamentos de actina, a citocalazina B, mostraram a interferência causada na fixação do ápice (Quatrano, 1973; Brawley e Quatrano, 1979), e em controles a rede de filamentos de actina está localizada no ápice de crescimento do rizóide, antes mesmo do início do

seu alongamento (Brawley e Robinson, 1985). Sendo uma das principais condições requeridas para a fixação do ápice polar a presença de uma rede de filamentos de actina funcional neste local (Kropf, 1992).

Estudos com *Fucus* (Quatrano, 1973) e *Pelvetia* (Nelson e Jaffe, 1973) observaram que o tratamento com citocalasina B inibe a fotopolarização. E quando o inibidor é retirado do meio, os rizóides crescem, mas de forma aleatória. Isto indica que, a actina é requerida para a formação da assimetria, provavelmente pela ação no direcionamento de componentes citoplasmáticos e de membrana nestes sítios. Além do seu envolvimento com o fluxo iônico presente nas membranas (Kropf, 1992).

Por outro lado, os microtúbulos (MT) são dispensáveis para a fixação do ápice polar. Zigotos incubados com seu inibidor fotopolarizaram e germinaram no lado sombreado da célula, e nas amostras controle, neste momento do desenvolvimento, eles não são possíveis para detecção. Entretanto, o núcleo é deslocado da sua posição central com este tratamento, o que implica que o posicionamento nuclear é um processo dependente de microtúbulos. Esta hipótese é apoiada pela localização dos microtúbulos nestes locais, em condições normais, polarizando zigotos. Os microtúbulos inicialmente estão localizados de modo uniforme sobre a superfície do envelope nuclear e com o desenvolvimento são irradiados para o córtex atuando como uma âncora no núcleo (Kropf *et al.*, 1990).

Microinjeções para a marcação da tubulina, com fluorescência, mostraram as matrizes de microtúbulos (MT) e sua reorganização durante o desenvolvimento de zigotos e embriões de *Fucus*. Esta abordagem revelou, pela primeira vez, a existência de uma matriz dinâmica de MT corticais que mostram a reorganização destes durante polarização do zigoto (Correlo *et al.*, 2005). Esta matriz cortical de MT não foi detectada por imunocitoquímica da tubulina em uma série de estudos anteriores com embriões *Fucus* (Brawley *et al.*, 1976; Kropf *et al.*, 1990; Allen e Kropf, 1992; Bisgrove e Kropf, 1998; Nagasato *et al.*, 1999; Bisgrove e Kropf, 2001a), possivelmente como

resultado de danos pela digestão da parede celular e os procedimentos de permeabilização da membrana plasmática (Brawley e Quatrano, 1979; Bisgrove *et al.*, 1997). Inicialmente os MT corticais estão distribuídos aleatoriamente na célula e depois são redistribuídos para o sítio do rizóide, bem antes do crescimento dos rizóides, para que ocorra as corretas divisões celulares (Correlo *et al.*, 2005).

Os MTs corticais são uma característica comum em células vegetais. Em células BY-2 de tabaco com a superexpressão de uma construção GFP-tubulina, em observações *in vivo* a partir da fase G1 da mitose, indica que os MTs são primeiramente nucleados no novo envelope nuclear e, posteriormente, são alongados ao córtex celular (Yoneda e Hasezawa, 2003). No entanto γ -tubulina foi vista pela primeira vez acumulando-se na superfície nuclear, mas depois é distribuída para o córtex celular, juntamente com MTs.

Estudos relatando a participação do citoesqueleto no desenvolvimento polarizado em algas pardas são encontrados para os gêneros: *Fucus* (Quatrano *et al.*, 1991; Foissner e Wasteneys, 2000a, 2000b; Corellou *et al.*, 2001) e *Silvetia* (Bisgrove e Kropf, 2001; Hable *et al.*, 2003). Sendo assim, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da citocalasina e da colchicina B durante as primeiras 12 horas de desenvolvimento dos zigotos de *Sargassum cymosum* para avaliar se os elementos do citoesqueleto são responsáveis pela polarização nesta espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultura

Para a obtenção dos zigotos foi utilizada a mesma metodologia de cultura descrita no capítulo 02, p. 40. Entretanto ao invés da utilização de placas de Petri foram utilizados Beckers, de 200 ml com forte aeração.

Após a fecundação e formação dos zigotos, estes permaneceram aderidos ao receptáculo por

uma mucilagem, então os receptáculos, contendo os zigotos, foram fracionados em pequenos pedaços e distribuídos em lâminas, onde então foram adicionadas as diferentes concentrações de colchicina e citocalasina B o desenvolvimento do experimento. Conforme os esquemas a seguir – figura 1.

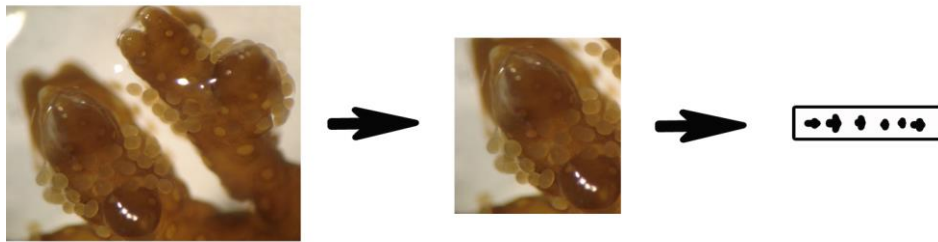


Figura 1: Esquema mostrando o fracionamento dos receptáculos com zigotos de *S. cymosum* aderidos e depois transferidos para a lâmina.

2.2. Experimentos com Colchicina e Citocalasina B

Para análise do envolvimento do citoesqueleto no processo de desenvolvimento dos zigotos foi adicionado à água do mar filtrada, inibidores de polimerização de microtúbulos e microfilamentos de actina, 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 sulfóxido (DMSO) sendo a citocalasina a concentração de 1mM e colchicina 100mM. A partir destas soluções estoque foram preparadas as concentrações finais em água do mar filtrada de 50 μ M e 100 μ M para os tratamentos com citocalasina B e 5 mM e 10 mM para colchicina (Fig.1, 2). Para realizar os tratamentos experimentais, as amostras controle foram incubadas sem o inibidor, mas com o solvente utilizado. As concentrações finais de citocalasina e colchicina foram adicionadas juntamente com os receptáculos quando colocados nas placas de Petri durante 12 horas.

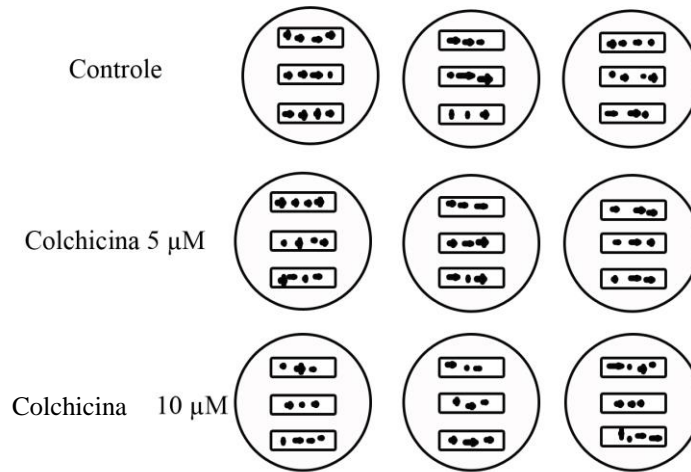


Figura 2: Esquema indicando a distribuição dos receptáculos/zigotos de *S. cymosum* nas lâminas durante o tratamento com colchicina.

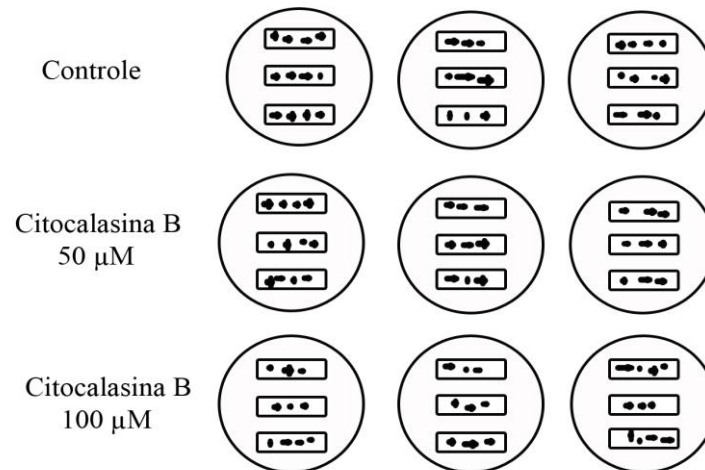


Figura 3: Esquema indicando a distribuição dos receptáculos/zigotos *S. cymosum* nas lâminas durante o tratamento com citocalasina B.

2.3. Análise da morfologia do processo de desenvolvimento

As características morfológicas do controle e das amostras tratadas de zigotos de *S. cymosum* foram analisadas e fotografadas com um microscópio epifluorescente Olympus BX 41 equipado com sistema de captura de imagens Q Capture Software 5.1 Pro. A análise foi realizada através da avaliação das seguintes características: 1) zigotos com polaridade celular, 2) zigotos inviáveis, 3) zigotos divididos e 4) zigotos não divididos.

2.4. Análises em Microscopia Varredura de Confocal a Laser

Para esta análise da autofluorescência da clorofila *a* foi seguida a metodologia descrita, para este composto, no capítulo 02, p. 40.

3. RESULTADOS

Como visto anteriormente, no capítulo 2, durante as três primeiras horas após a fecundação (AF) o zigoto é ligeiramente arredondado e, com 4 horas AF, o zigoto apresentou dois pólos distintos, o pólo de apical e o basal. Iniciando o processo de divisões celulares com 6 horas AF. Os zigotos entre 12 e 13 horas AF são embriões com várias divisões celulares, já com as células de formação dos rizóides bem definidas.

Depois de deixar as amostras controle somente em água do mar esterilizada por 12 horas, os zigotos de *S. cymosum* foram visualizados polarizados (Fig. 4A-B), com várias divisões celulares, mais de 6 divisões foram observadas (Fig. 4C). Com o início das divisões longitudinais que ocorrem na célula basal observou-se a origem aos rizóides (Fig. 4D).

Podemos observar que com o decorrer do processo de desenvolvimento a disposição dos compostos fenólicos vai sendo alterada. Como observado no capítulo 2, antes do início da polarização estes são distribuídos de forma homogênea na célula e, com o decorrer do desenvolvimento são encontrados aglomerados em pequenas porções em todas as células que estão

sendo formadas (Fig. 4 C-D).

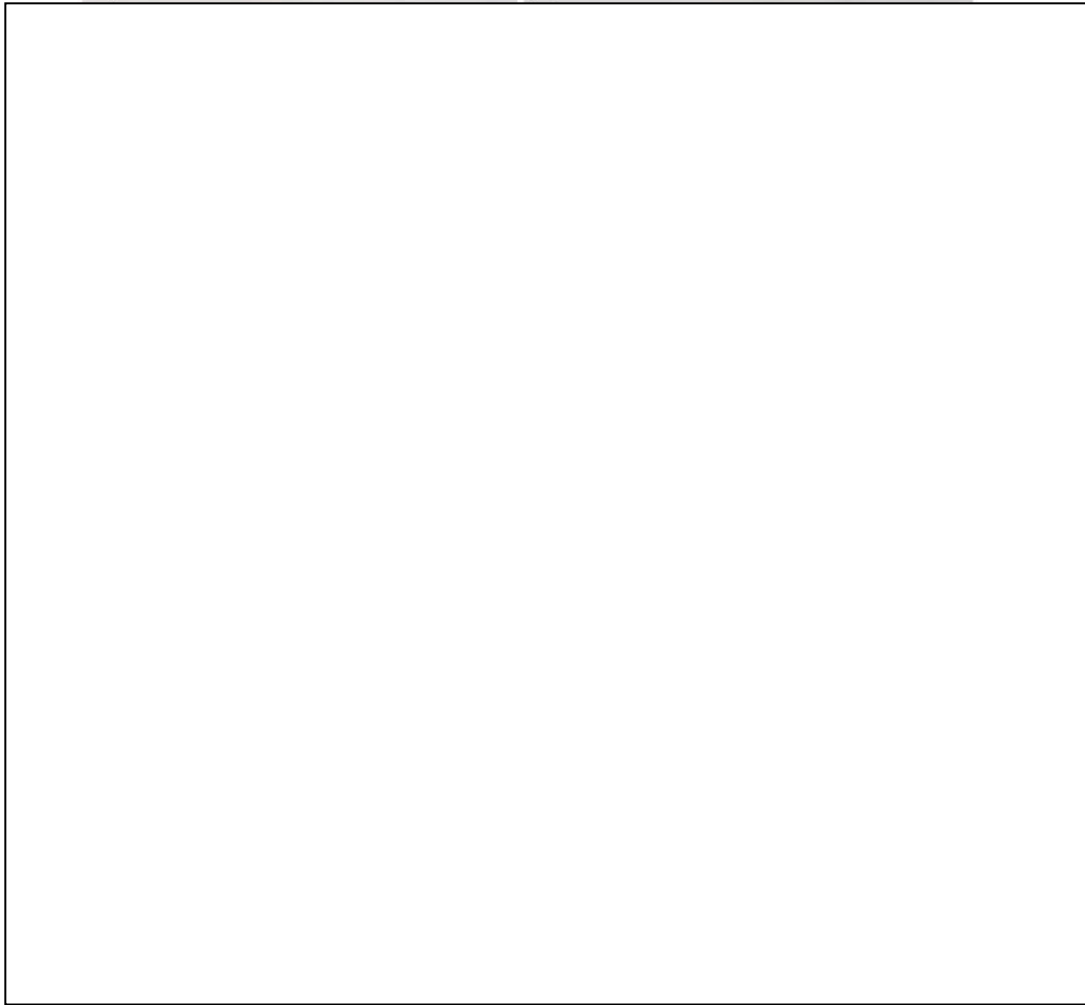


Figura 4: Zigotos de *S. cymosum* mantidos por 12 horas AF em água do mar esterelizada (controle) e observados em ML. A – B: Zigotos polarizados (setas). C – D: Zigotos polarizados (setas) e com mais de 6 divisões celulares (cabeças de setas).

As amostras de zigotos de *S. cymosum* tratadas com colchicina 5 μM e 10 μM , por 12 horas, foram visualizadas com morfologia diferenciada quando comparadas as amostras controle. No tratamento com concentração de 5 μM os zigotos apresentaram polaridade celular (Figs. 5 A-C), mas não foi possível observar a presença de divisões celulares. Estes zigotos apresentaram coloração densa, indicando que os compostos fenólicos permaneceram distribuídos de forma homogênea na célula. Entretanto, poucos zigotos foram visualizados com coloração mais clara, com aglomerados de compostos fenólicos e algumas manchas em tons esverdeado, indicando a possível inviabilidade destas células (Fig. 5D).

Os zigotos tratados com colchicina 10 μM também apresentaram a formação de polaridade celular (Figs. 5 E-F) e com coloração densa do citoplasma, como no tratamento anterior. Contudo, nesta concentração foi observado um número maior de zigotos com coloração clara/transparente (Figs. 5 G-H), indicando uma maior letalidade deste tratamento para as células.

Quando analisadas as amostras tratadas com citocalasina B os zigotos de *S. cymosum* novamente apresentaram alterações morfológicas quando comparados com o controle.

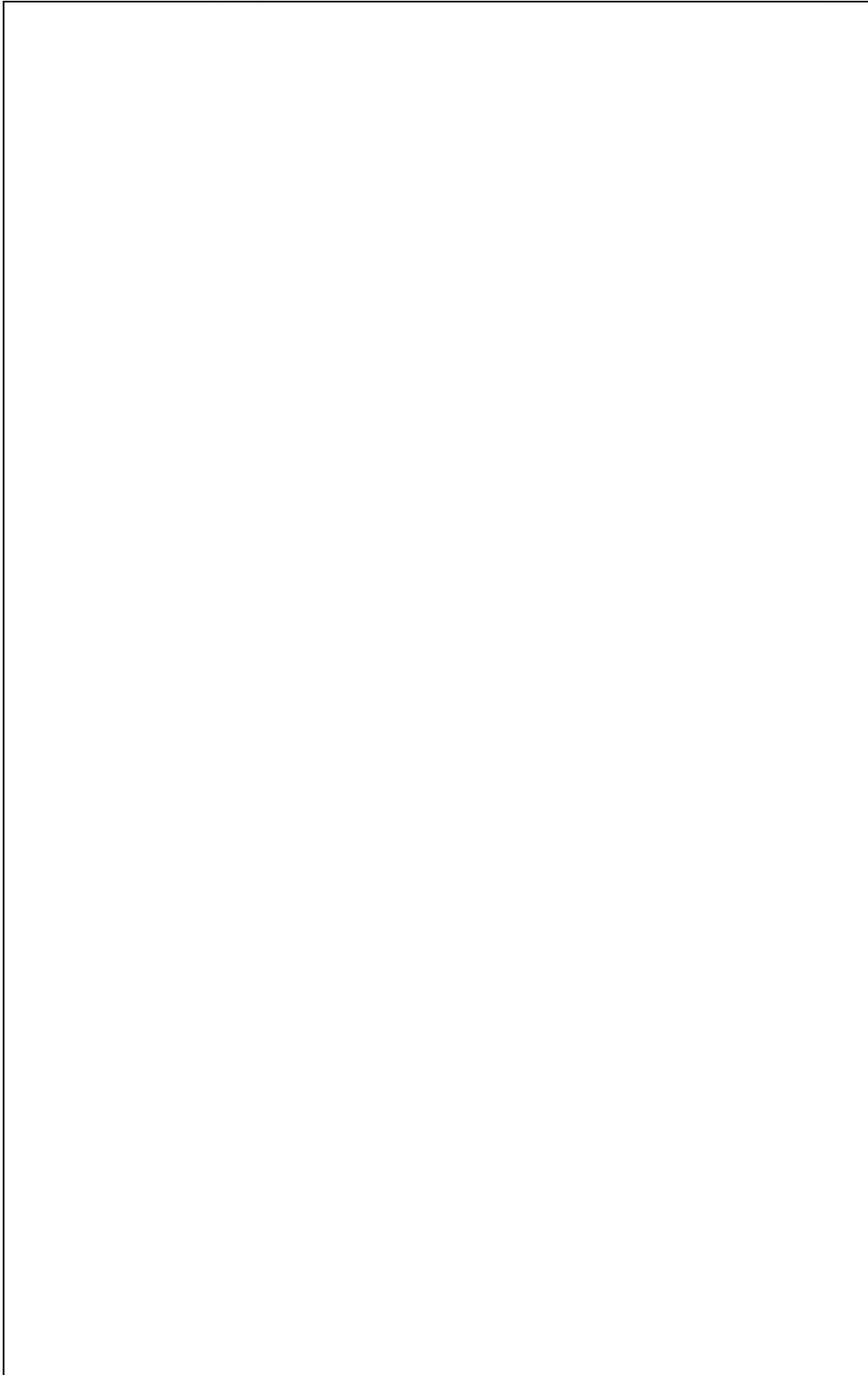


Figura 5: Zigotos de *S. cymosum* tratados com colchicina 5 μM e 10 μM por 12 horas. A-D: Zigotos tratados com colchicina 5 μM . A – C: Zigotos com polaridade celular (seta), sem divisão celular e com coloração densa. D: Zigoto sem polaridade celular, com coloração mais clara e formação de vesículas esverdeadas (cabeça de seta). E-H: Zigotos tratados com colchicina 10 μM . A-B: Zigotos com polaridade (setas) e coloração densa. G-H: Zigotos com polaridade de com coloração clara (cabeças de setas).

Após as 12 horas de tratamento com as duas concentrações de citocalasina B (50 mM e 100 mM) tanto a concentração mais baixa quanto a maior inibiram a polarização destes zigotos (Figs. 6 A-H). Entretanto, o que diferiu entre as concentrações, foi a presença de um maior número de zigotos inviáveis, com coloração clara a transparente (Figs. 5 G-H) em 100 mM.

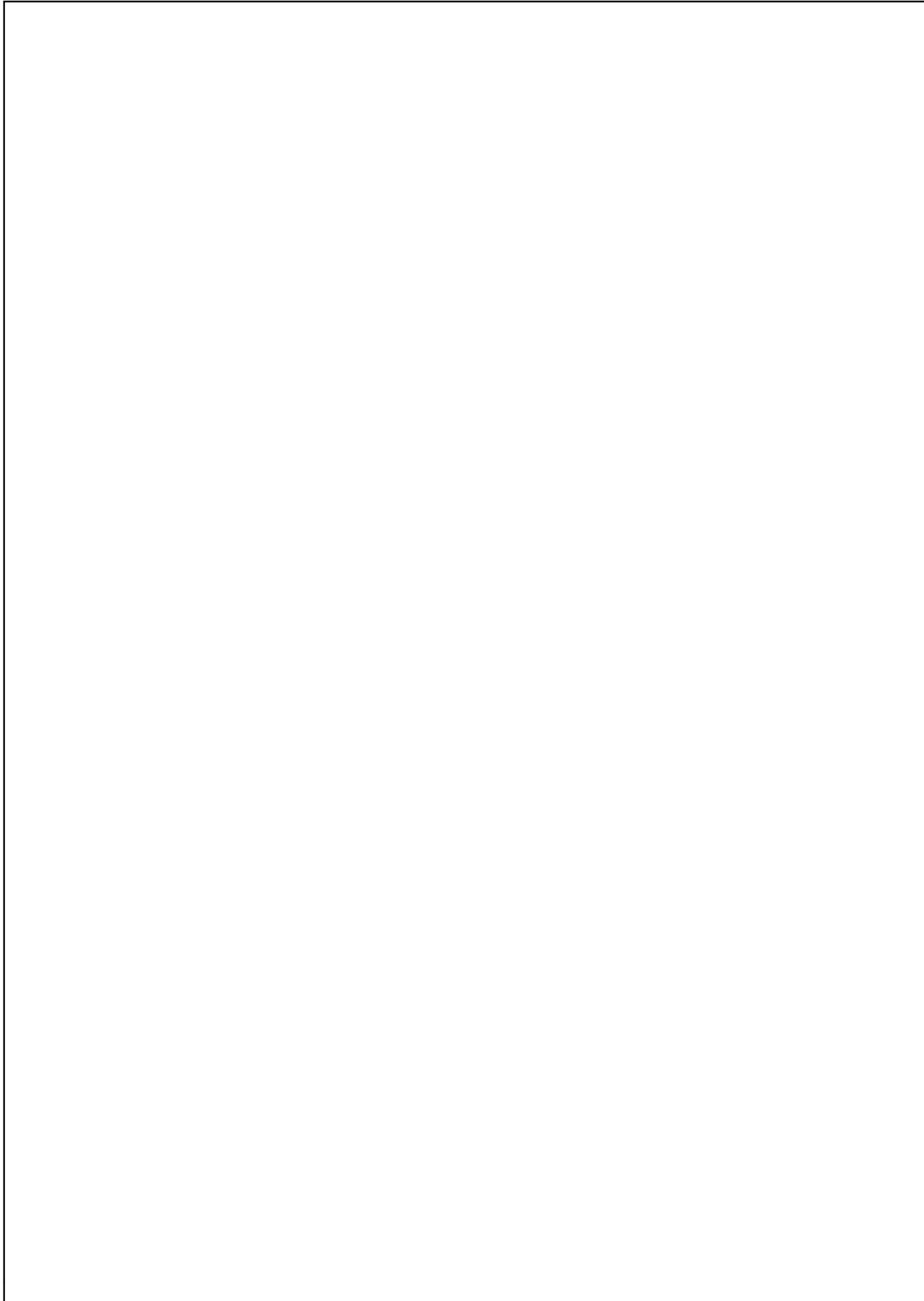


Figura 6: Zigotos de *S. cymosum* tratados com citocalasina B 50 mM e 100 mM por 12 horas. A – D: Zigotos tratados com citocalasina B 50 mM, sem polaridade celular (seta), sem divisão celular e com coloração densa. E-H: Zigotos tratados com citocalasina B 100 mM, sem polaridade celular. G-H: Além de não polarizados com coloração mais clara a transparente (cabeça de seta).

Quando observadas as amostras em microscopia confocal, a disposição dos cloroplastos não foi alterada em todos os tratamentos, com colchicina e citocalasina (Figs. 7 A-F).

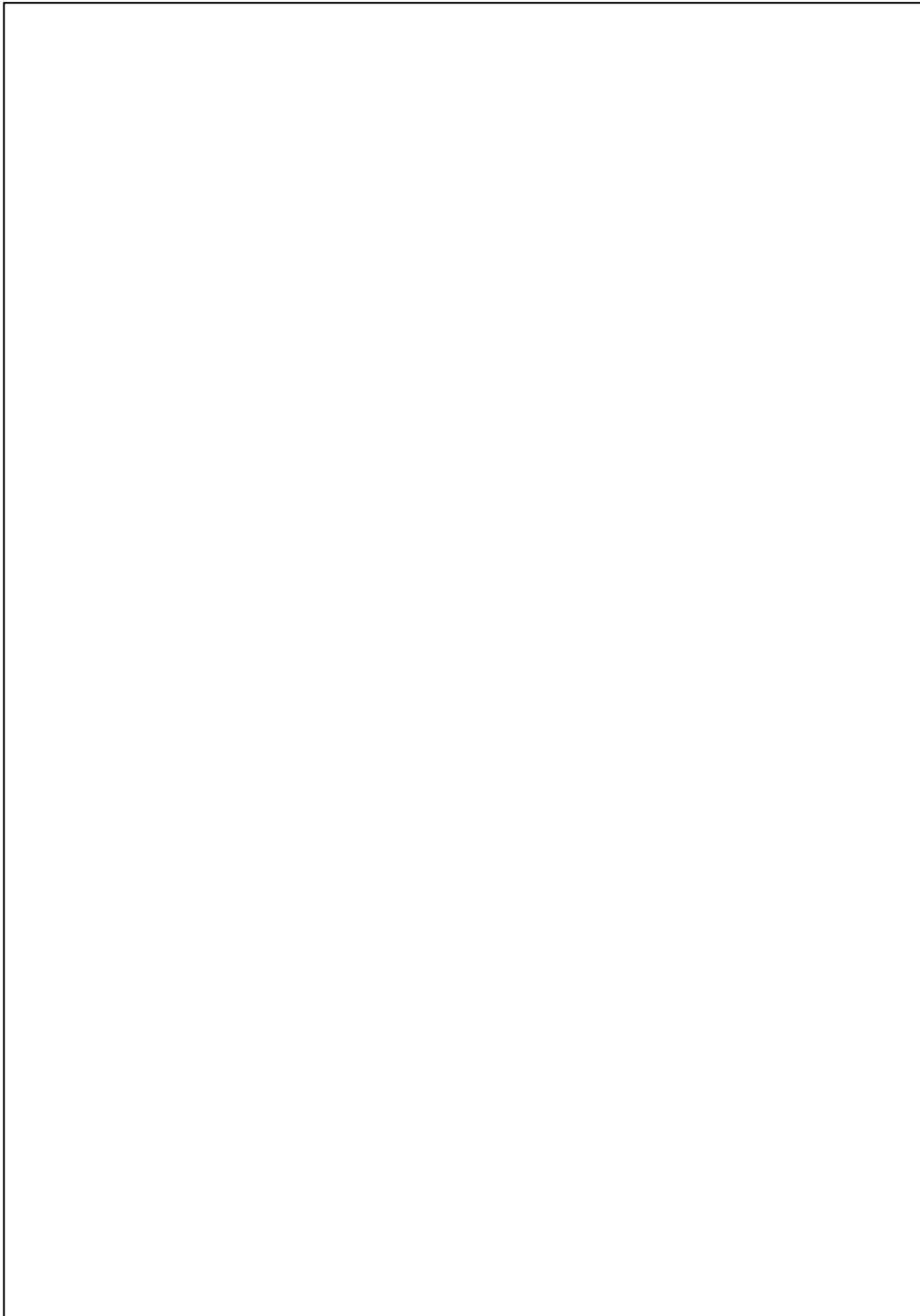


Figura 7: Zigotos de *S. cymosum* em microscopia confocal. A-F: Auto fluorescência da clorofila *a*, em vermelho. A-B: Amostras controle polarizadas (setas) e com divisões celulares (cabeças de setas). C: Zigoto tratado com colchicina 5 μ M por 12 horas com polarização (seta). D: Zigoto tratado com colchicina 10 μ M por 12 horas com polarização (seta). E: Zigoto tratado com citocalasina B 50 mM por 12 horas sem polarização (seta). F: Zigoto tratado com citocalasina B 100 mM por 12 horas sem polarização (seta).

4. DISCUSSÃO

Em zigotos de *S. cymosum*, entre os eventos iniciais do desenvolvimento observados, o principal é a permanência do zigoto aderido ao receptáculo por uma mucilagem. Isto indica que, para esta espécie não é necessária a adesão ao substrato pra iniciar os primeiros processos do desenvolvimento polarizado, como é o observado para *Fucus* e *Silvetia* (Kropf, 1992; Kropf *et al.*, 1992; Fowler e Quatrano, 1995; Kropf, 1997; Hable e Kropf, 1998).

Os eventos iniciais da polarização em *S. cymosum* ocorrem já nas primeiras horas após a fecundação, como discutido no capítulo 02. Após 12 horas de desenvolvimento o embrião já apresenta mais de 6 divisões celulares. Quando tratados com os inibidores do citoesqueleto, por 12 horas, estes zigotos não mais apresentaram este número padrão de divisões celulares, mostrando que o citoesqueleto está intimamente associado com o processo de polarização corroborando o descrito por Hable e Hart, (2010) para *Fucus* e *Silvetia*.

As amostras tratadas com colchicina, o inibidor dos microtúbulos, apresentaram polarização, mas não ocorreram as divisões celulares. Desta forma, sugere-se que os microtúbulos não estão envolvidos no processo de seleção do eixo polar, somente nas divisões e crescimento celular. Os microtúbulos são os principais componentes estruturais do fuso mitótico, e a sua organização no interior da célula determina a posição do aparelho mitótico e a colocação da placa celular durante a divisão. Nas algas fucóides os centros de organização de microtúbulos são chamados de centrossomas, que regulam a distribuição e a organização dos microtúbulos na célula (Bisgrove *et*

al., 1997; Nagasato *et al.*, 1999; Motomura e Nagasato, 2004). Assim, a localização dos centrossomas durante a divisão celular determina tanto a posição do aparelho mitótico, quanto o local posterior de deposição da placa celular (Bisgrove e Kropf, 2007).

O alinhamento do plano de divisão pode ser perturbado por tratamentos com os agentes de despolimerização dos microtúbulos como a orizalina e nocodazol (Allen e Kropf, 1992; Shaw e Quatrano, 1996). Esses agentes causam rotações nucleares anormais que resultam em eixos desalinhados e planos de divisão distorcidos. Já a colchicina inibe a divisão celular e subsequente translocação do núcleo-filho (Morejohn e Fosket, 1991). Embriões com planos de divisão levemente desalinhados podem se desenvolver normalmente, mas o desalinhamento mais grave reduz taxa de crescimento. Embriões em que o plano de divisão é deslocado 90° e divide a ponta rizóide frequentemente desenvolvem dois rizóides para *Fucus* e *Silvetia* (Shaw e Quatrano, 1996; Quatrano e Shaw, 1997).

As contribuições relativas da polaridade celular e da posição nuclear no específico plano de divisão assimétrica em zigotos de algas fucoídes foram investigados (Bisgrove *et al.*, 2003; Corellou *et al.*, 2005; Henderson e Kropf, 2001). Em zigotos com desenvolvimento normal, na telófase os núcleos foram posicionados paralelamente ao eixo de crescimento polar, e ao plano de divisão dois eixos. Correlações espaciais entre o eixo de crescimento, os núcleos na telófase e o plano de divisão foram analisados nos zigotos de *Pelvetia compressa* tratados com nocodazol e orizalina por Bisgrove e Kropf (1998). Em todos os casos, a citocinese foi orientada transversalmente em relação à matriz telófase do fuso mitótico e foi menos bem alinhado com o eixo de crescimento, afetando o desenvolvimento e crescimento dos embriões.

Entretanto o papel preciso dos microtúbulos durante o crescimento do polo, não está claro. Evidências sugerem que a mobilidade dependente de microtúbulos e pelas moléculas motoras contribuem para o crescimento polar. Cinesinas foram identificadas por imunofluorescência em tabaco e tubo polínico (Tiezzi *et al.*, 1992; Cai *et al.*, 1993), e análises genéticas identificaram

muitas proteínas relacionadas com cinesinas em *Arabidopsis* (Krishnakumar e Oppenheimer, 1999). Uma possibilidade é a função do transporte de vesículas dependentes de cinesina, ao longo dos microtúbulos, que são requeridas, junto com os filamentos de actina, para o desenvolvimento normal da célula polarizada (Hable e Hart, 2010). O que está de acordo com o observado para *S. cymosum*, já que alguns zigotos foram observados com diferenças nas distribuições de vesículas nas duas concentrações utilizadas de colchicina.

Já no tratamento com a citocalasina B os zigotos de *S. cymosum* além de não apresentarem divisões celulares também não polarizaram. Assim, como o observado em estudos com *Fucus* e *Silvetia*, sendo a polarização inibida com este reagente (Alessa e Kropf, 1999; Kropf *et al.*, 1989; Bouget *et al.*, 1996; Brawley e Robinson, 1985). Nas algas fucoídes a citocalasina B (50-100 µg/ml) inibe reversivelmente a fotopolarização pelo bloqueio do transporte de vesículas dos corpos Golgi perinucleares para o rizóide, também inibe a secreção localizada de polissacarídeos, F2 (Brawley e Quatrano, 1979; Nelson e Jaffe, 1973; Novotny e Forman, 1974; Quatrano, 1973).

Muitos estudos para determinar o envolvimento da actina no processo de fotopolarização em algas pardas, utilizando como modelo *Fucus* e *Silvetia*, foram realizados e, através da utilização de inibidores da polimerização da actina, como citocalasina e lantruculina, confirmaram a importância desta rede de filamentos de actina neste processo (Quatrano e Shaw, 1997; Hable e Kropf, 1998; Robinson *et al.*, 1999).

Nas algas com desenvolvimento polarizado a actina tem papel importante no direcionamento de componentes essenciais para a formação e crescimento dos rizóides (Fowler e Quatrano, 1995). Na oosfera não fertilizada a actina encontra-se distribuída de forma homogênea próxima ao córtex celular, entretanto, quando fertilizada esta é imediatamente ativada, seja pela luz (Alessa e Kropf, 1999) ou pela entrada do anterozóide (Hable e Kropf, 2000), então é polimerizada e direcionada para o pólo de formação dos rizóides, tornando-se um sinalizador do sítio de formação dos rizóides (Brawley e Robinson, 1985). O processo de polimerização dos filamentos de actina é requerido,

principalmente, para transportar vesículas, derivadas dos corpos de Golgi, para o novo pólo de formação dos rizóides. E a sua despolimerização é necessária para realizar a fusão do conteúdo destas vesículas à membrana plasmática no sítio de crescimento do rizoide (Hart e Hable, 2010).

O papel do citoesqueleto no processo de desenvolvimento polarizado está bem estabelecido para as algas *Fucus* e *Silvetia*, assim como já está sendo investigada a participação de determinadas proteínas reguladoras deste processo (Quatrano *et al.*, 1991; Corellou *et al.*, 2001; Hable e Kropf, 2005). Entre os estudos o papel da actina é o mais investigado e melhor entendido até o momento, sendo reduzido o conhecimento sobre o envolvimento dos microtúbulos no processo de polarização.

Para zigotos de *S. cymosum* os tratamentos com colchicina e citocalasina B afetaram o desenvolvimento polarizado, sendo assim, pode-se indicar que os microtúbulos e os filamentos de actina tem papel neste processo, mesmo com respostas diferentes. Indicando que cada componente do citoesqueleto apresenta um papel exclusivo no desenvolvimento e crescimento desta alga parda. Entretanto se faz necessário o estabelecimento de protocolos para a marcação do citoesqueleto nesta alga, que apresenta particularidades em relação ao *Fucus* e *Silvetia*, mesmo pertencendo a mesma ordem.

CAPÍTULO 04

Efeito da brefeldina A em zigotos de *Sargassum cymosum* (Phaeophyceae, Fucales) durante o seu desenvolvimento inicial: efeitos no sistema de endomembranas, nas divisões celulares e organização celular.

1. INTRODUÇÃO

As divisões celulares assimétricas são essenciais para a formação apropriada de um padrão de desenvolvimento em muitos organismos como fungos (Horvitz e Herkowitz, 1992), animais (Guo e Kemphues, 1996) e plantas (Mayer *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2005). Neste desenvolvimento polarizado, o sistema de endomembranas participa ativamente e permanece, principalmente, direcionado para os ápices de alongamento celular (Hadley *et al.*, 2006).

Estudos relatando o papel do sistema de endomembranas no desenvolvimento de algas fucóides, como *Fucus* e *Silvetia*, foram realizados, dentre os quais destacam-se Belanger e Quatrano (2000), Kropf *et al.* (1999), (2000), Fowler (2000) e Brownlee *et al.* (2001).

No desenvolvimento polarizado, inicialmente, a oosfera é simétrica, entretanto, no momento da fecundação o zigoto passa a ser assimétrico formando duas extremidades de crescimento, o pólo apical e o pólo do rizóide. O pólo do rizóide é caracterizado por uma rede de actina cortical, altamente dinâmica, que reposiciona-se rapidamente por despolimerização / repolimerização durante o alinhamento do novo eixo de crescimento (Alessa e Kropf, 1999; Hable *et al.*, 2003). Durante o processo de polarização e desenvolvimento, o sistema de endomembranas acumula-se preferencialmente no pólo do rizóide, atuando em conjunto com a rede de actina também localizada neste pólo (Belanger e Quatrano, 2000). A actina apresenta várias funções em polarização de endomembranas, incluindo a organização, formação de um local alvo para a exocitose, transporte de vesículas e especialmente restringindo o local de endocitose (Hadley *et al.*, 2006).

Uma via secretora é necessária para o crescimento polarizado em muitas células eucarióticas (Drubin e Nelson, 1996), incluindo os zigotos das algas fucóides *Fucus distichus* e *Pelvetia fastigiata* (Shaw e Quatrano, 1996, Hable e Kropf, 1998). O acúmulo localizado de materiais na superfície da célula começa antes mesmo da manifestação do crescimento assimétrico (Nuccitelli, 1978, Hable e Kropf, 1998). Um conjunto de proteínas (Wagner *et al.*, 1992) e carboidratos

(Novotny e Forman; 1974; Hable e Kropf, 1998) estão localizados especificamente dentro da parede celular e no espaço extracelular no local em que o crescimento assimétrico tem lugar no embrião em desenvolvimento. Este crescimento celular assimétrico e a estabilização do eixo polar requerem uma secreção localizada no pólo do rizóide (Shaw e Quatrano, 1996). Além disso, Berger *et al.* (1994) relatam que as diferenças na matriz extracelular, entre o rizóide e o talo, são resultado da secreção assimétrica e parecem influenciar na determinação da formação dos rizóides.

A atividade secretora em uma célula em desenvolvimento, principalmente, no pólo do rizóide para a fixação ao substrato, requer a reciclagem de material depositado na membrana plasmática. A endocitose foi documentada, já há algum tempo, como o principal mecanismo de reciclagem da membrana em muitos tipos celulares de eucariontes (Brodsky, 1988). Onde a deposição da membrana secretora nas extremidades em crescimento é necessária para a manutenção do contato com a área de superfície nas extremidades de crescimento, mantendo assim o correto alongamento celular (Belanger e Quatrano, 2000). Grande parte das membranas da endocitose é reciclada nos corpos de Golgi (Tanchak *et al.*, 1984; Hawes e Satiat – Jeunemaitre, 1996). A partir do Golgi, as membranas podem voltar ao caminho exocítico ou realizar outras funções exigidas pelas vesículas derivadas desta organela, incluindo o fornecimento de uma fonte de membrana para citocinese (Samuels *et al.*, 1995).

Os corpos de Golgi nos vegetais têm importante papel na glicosilação e classificação de proteínas, sendo também a maior organela que sintetiza grande quantidade de polissacarídeos para a parede celular (Dupree e Sherrier, 1998). Todas estas funções refletem na organização desta organela, sendo assim composta por individuais e numerosas cisternas que são distribuídas por toda a célula (Schnepf, 1986).

Em células com sítios específicos de parede celular nos pólos de crescimento, os corpos de Golgi são altamente concentrados (Dupree e Sherrier, 1997). As vesículas derivadas desta organela, contendo o material para a formação da parede celular, são direcionadas e concentradas nas

extremidades de crescimento, mostrando o papel central dos corpos de Golgi com a síntese destes materiais (Keidan *et al.*, 2009).

Além de todas as funções dos corpos de Golgi, citadas acima, Mollenhauer e Morré (1976) apresentam a forte associação desta organela com os microfilamentos de actina. Pois quando utilizado o inibidor destes filamentos de actina, citocalasina B, a movimentação dos arranjos das vesículas secretoras foi altamente comprometida. Entretanto, quando inibidos os microtúbulos, as vesículas continuaram migrando até os sítios de crescimento, entretanto não ocorreu a fusão dessas vesículas secretoras, nos sítios de crescimento.

Em estudos com o objetivo de mostrar o papel do sistema de endomembranas no desenvolvimento polarizado, através da secreção localizada de componentes adesivos e de parede celular, é utilizado o antibiótico lipofílico fúngico brefeldina A (BFA). Alguns destes demonstraram que a BFA pode bloquear os mecanismos de movimentação de vesículas em plantas (Callow *et al.*, 2001), secreção de polissacarídeos e proteínas de parede celular (Schindler *et al.*, 1994; Tsekos *et al.*, 2007; Hadley *et al.*, 2006). Este bloqueio ocorre devido a capacidade da BFA inibir o tráfego das vesículas no Golgi através da inibição na troca dos fatores do nucleotídeo guanina por fatores de GTPases de ADP-ribosilação (Donaldson e Klausner, 1994).

Nos três grandes grupos de macroalgas (Fowler *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2001) têm estudado os efeitos da BFA. Nas algas pardas, este inibidor foi utilizado para analisar diretamente o efeito do sistema de endomembranas sobre o desenvolvimento polarizado em zigotos de *Silvetia* (Hadley *et al.*, 2006). Em algas vermelhas a BFA afetou a estrutura dos corpos de Golgi, inibindo a secreção de vesículas que formam o tubo germinativo durante a germinação de tetrásporos de *Gelidium floridanum* (Simioni *et al.*, 2014). Em algas verdes este inibiu a aderência de zoósporos de *Enteromorpha* (Callow *et al.*, 2001).

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de BFA, diretamente sobre os corpos de Golgi e indiretamente na polarização e desenvolvimento de zigotos

da alga fucóide *S. cymosum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultura

Para a obtenção dos zigotos foi utilizada a mesma metodologia de cultura descrita no capítulo 02, p. 40. Entretanto ao invés da utilização de placas de Petri, foram utilizados Beckers, de 200 ml, com forte aeração, para aumentar a formação de zigotos.

Após a fecundação e formação dos zigotos, estes permaneceram aderidos ao receptáculo por uma mucilagem, então os receptáculos, contendo os zigotos, foram fracionados em pequenos pedaços e distribuídos em lâminas, onde então foi adicionada a BFA para o desenvolvimento do experimento.

2.2. Tratamento com Brefeldina A (BFA)

A solução inicial do antibiótico lipofílico fúngico brefeldina A (BFA; B-7651 Sigma Chemical, Germany) foi preparada na concentração de 5 mM em Dimetil sulfóxido (DMSO, Merck, Darmstadt, FRG). A partir desta solução estoque foram preparadas as quatro (4) concentrações finais de tratamento, 4 μ M, 8 μ M, 16 μ M e 32 μ M, em água do mar esterelizada. Para realizar os tratamentos experimentais, um controle sem BFA foi cultivado com água do mar esterelizada contendo DMSO, e então, assim como todas as concentrações de tratamento de BFA, foram adicionados individualmente logo após a formação dos zigotos (modificado Simioni *et al.*, 2014). Após o tratamento as amostras foram fixadas e processadas para microscopia eletrônica de transmissão, microscopia de varredura a laser – Confocal, microscopia de luz e para contagem das células.

Para as análises em microscopia de luz, após o tratamento com as concentrações de 4 μ M, 8

μM , 16 μM e 32 μM de BFA e o controle, as amostras foram colocadas novamente em água do mar esterelizada por mais 12 horas. Com o objetivo de observar a capacidade de recuperação das células após o tratamento com BFA.

Para a observação dos resultados as amostras foram analisadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão JEM 2100 para MET, em microscópio com epifluorescência Olympus BX 41 equipado com imagem Q Capture Software 5.1 Pro (Qimaging Corporation, Austin , TX , EUA) para ML e contagem, em microscópio confocal Leica para fluorescência. Três réplicas de lâminas de cada tratamento foram realizadas.

2.3. Microscopia de luz (ML) e contagem

Amostras de zigotos e embriões, de *S. cymosum*, do controle e dos tratamentos foram fixados em solução com paraformaldeído 2,5% e tampão fosfato de sódio 0,1M. Então, estas foram fotografadas para a análise de morfologia geral, assim como para a contagem das células.

A contagem foi realizada em 300 indivíduos com três réplicas (n=900) para cada tratamento e classificadas de acordo com:

- zigotos sem divisão;
- zigotos com uma divisão;
- zigotos com 2 – 6 divisões;
- zigotos com mais de 6 divisões;
- zigotos mortos.

Os dados foram analisados por análise de variância unifatorial (ANOVA) e teste Tukey's *a posteriori*. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando programa *Statistic* (versão 10.0), considerando $p \leq 0,05$.

2.4. Microscopia de varredura a laser - Confocal

Para esta análise foi seguida a metodologia descrita no capítulo 02, p. 40.

2.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As amostras de *S. cymosum* foram fixadas, processadas e analisadas para MET de acordo com a metodologia citada no capítulo 02, p. 40 e 41.

3. RESULTADOS

3.1. Observações em ML

Após 12 horas de tratamento com BFA, os zigotos de *S. cymosum* observados em ML apresentaram, nos diferentes tratamentos, variações nas características: número de divisões celulares, morfologia geral, coloração e distribuição dos fisóides no citoplasma.

Nas amostras controle, com 12 horas após a fecundação (AF), os embriões exibiram polarização com 6 divisões celulares e coloração mais clara, indicando a distribuição homogênea dos fisóides (compostos fenólicos) no citoplasma (Fig. 1A). Já os embriões controle com 24 horas AF apresentaram mais de 6 divisões celulares, entretanto com a mesma característica para os seus fisóides (Fig. 1B). Estas características do desenvolvimento estão de acordo com o observado no desenvolvimento padrão de *S. cymosum*, como já descrito no capítulo 01.

No tratamento com BFA 4 μ M, os embriões com 12 horas AF apresentaram 3 divisões celulares e coloração mais densa, com alguns fisóides agrupados em regiões centralizadas das células (Fig. 1C). Neste mesmo tratamento, as amostras mantidas em recuperação, após, embriões com 24 horas AF, exibiram um número maior de divisões celulares com polarização e coloração mais clara (Fig. 1D), indicando a capacidade de recuperação de alguns indivíduos pela semelhança com o observado no controle com 24 horas AF.

Quando tratados os zigotos de *S. cymosum* com BFA 8 μM , as amostras com 12 horas AF apresentaram polarização celular, entretanto, somente uma divisão celular, mas, para os fisóides, mantiveram a característica descrita no tratamento anterior (Fig. 1E). Os exemplares colocados em recuperação, neste caso, também exibiram certa capacidade de recuperação, pois alguns foram observados com 2 a 6 divisões, mas os fisóides permaneceram agrupados no citoplasma (Fig. 1F).

Já nos tratamentos com BFA 16 μM , os zigotos não apresentaram polarização e divisão celular e a mesma característica dos fisóides descritas anteriormente (Fig. 1G), entretanto, as amostras mantidas em recuperação após o tratamento, poucas foram visualizadas com divisões celulares (Fig. 1H). E no tratamento com 32 μM , tanto os zigotos com 12 horas AF, quanto os mantidos em recuperação, com 24 horas AF, a maioria foi visualizada morta. Caracterizados pela não polarização celular, fisóides altamente agrupados e ocupando grande parte do citoplasma (Fig. 1I, J).

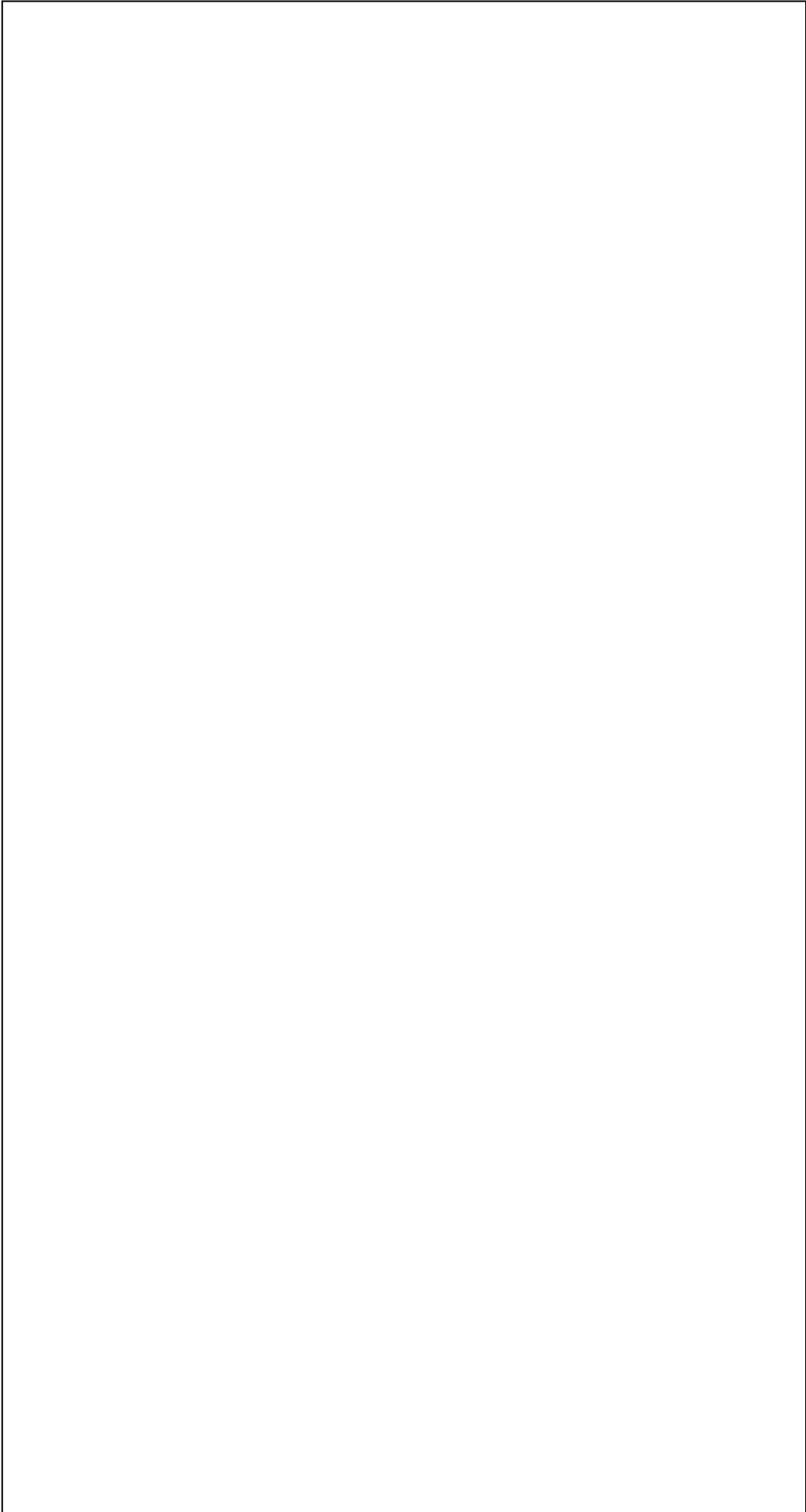


Figura 1: Zigotos de *S. cymosum* em microscopia de luz (ML). A,C,E,G,I: amostras tratadas com diferentes concentrações de brefeldina A (BFA). B,D,F,H,J: amostras colocadas em recuperação por mais 12 horas (totalizando 24 horas AF) em água do mar esterelizada, sem adição de BFA. Escalas: 20 μ m.

3.2. Contagem

Na tabela 1 foi possível observar que ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos em relação ao número de divisões celulares e a taxa de mortalidade. Conforme ocorreu o aumento da concentração de BFA, o número de divisões foi reduzido nos tratamentos em relação ao controle. Já a mortalidade foi maior no tratamento com BFA 32 μ M.

Após o período de 12 horas de recuperação, ou seja, zigotos com 24 horas, também apresentaram diferenças significativas no número de divisões celulares nas amostras em recuperação, quando comparamos com as amostras controle (Tabela 2). Mostraram capacidade de recuperação, principalmente, os tratamentos de BFA 4 μ M, 8 μ M.

Tabela 1: Contagem dos zigotos e embriões de *S. cymosum* após 12 horas de tratamento com as diferentes concentrações de BFA. Os valores são apresentados como média (n = 900), e as barras verticais mostram o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

12 Horas	Sem divis.	1 divis.	2-6 divis.	Mais de 6 divis.	Mortos
Controle	22,77 \pm 2,05d	25,00 \pm 1,63c	105,33 \pm 3,40a	147,00 \pm 6,16a	0,00 \pm 0,00d
4 μM	115,00 \pm 3,56c	17,00 \pm 1,63d	82,00 \pm 1,63b	78,00 \pm 1,63b	8,00 \pm 2,16c
8 μM	156,67 \pm 2,49b	83,00 \pm 2,16e	43,00 \pm 0,82c	4,00 \pm 0,82c	13,33 \pm 1,70c
16 μM	176,00 \pm 3,27a	51,67 \pm 1,25b	32,67 \pm 2,05d	0,00 \pm 0,00c	39,67 \pm 0,47b
32 μM	16,00 \pm 0,82d	10,67 \pm 0,94e	15,00 \pm 1,41e	0,00 \pm 0,00c	258,33 \pm 2,49a

Tabela 2: Contagem dos zigotos e embriões de *S. cymosum* com 24 horas, 12 horas em tratamento com BFA seguido de mais 12 horas de recuperação em água do mar esterelizada. Os valores são apresentados como média (n = 900), e as barras verticais mostram o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

24 horas	Sem divis.	1 divis.	2-6 divis.	Mais de 6 divis.	Mortos
Controle	0,00 ± 0,00c	0,00 ± 0,00c	49,67 ± 5,73c	250,33 ± 5,73a	0,00 ± 0,00e
4 μM	60,33 ± 2,87b	18,00 ± 0,82b	59,00 ± 0,82b	131,33 ± 1,25b	31,33 ± 2,49c
8 μM	153,33 ± 2,49a	15,00 ± 0,82b	93,00 ± 0,82a	19,00 ± 0,82d	19,67 ± 2,05d
16 μM	63,33 ± 2,49b	41,00 ± 2,16a	52,67 ± 1,70bc	91,00 ± 2,94c	52,00 ± 2,16b
32 μM	62,33 ± 5,44b	0,00 ± 0,00c	0,00 ± 0,01e	0,00 ± 0,02e	237,67 ± 5,44a

3.3. Observações com microscopia confocal

Quando analisados em microscopia confocal os zigotos de *S. cymosum*, após as 12 horas de tratamento com BFA, as amostras controle exibiram, além da polarização, corroborando com o observado em ML, uma distribuição homogênea dos cloroplastos e dos fisóides (Fig. 2A-C). Entretanto, nesta análise não foi possível observar as divisões celulares.

Já os tratamentos apresentaram diferentes reações; em BFA 4μM foi visualizado uma distribuição irregular dos cloroplastos e fisóides no citoplasma (Fig. 2D-F) com regiões ora mostrando agrupamento de fisóides ora agrupamentos de cloroplastos (Fig. 2F); já em BFA 8 μM, além da distribuição heterogênea dos cloroplastos e fisóides, exibiram retração no citoplasma, alterando a morfologia geral do zigoto (Fig. 2G-I); nos tratamentos de BFA 16 μM e 32 μM, além da heterogeneidade dos componentes no citoplasma, apresentaram rompimento da membrana plasmática e parede celular (Fig. 2J-O).

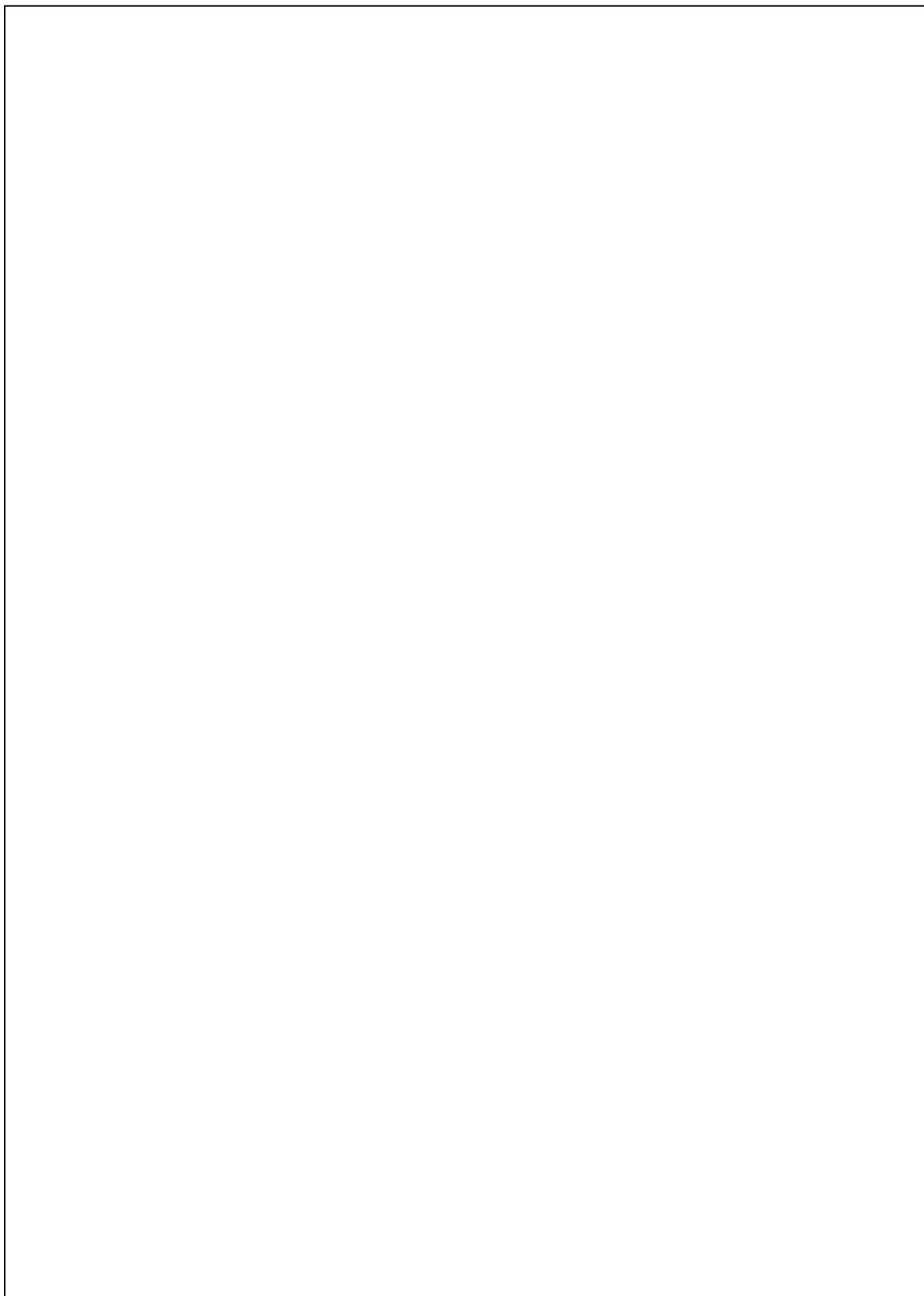


Figura 2: Zigotos de *S. cymosum* em microscopia confocal após 12 horas de tratamento com BFA. A-O: autofluorescência da clorofila *a* (cloroplastos) em vermelho e autofluorescência dos compostos fenólicos (fisóides) em azul. A-C: amostras controle. D-F: amostras tratadas com BFA 4 μ M. G-I: amostras tratadas com BFA 8 μ M. J-L: amostras tratadas com BFA 16 μ M. M-O: amostras tratadas com BFA 32 μ M. Escalas: 40 μ m.

3.4. Observações em MET

Os zigotos controle de *S. cymosum* analisados em microscopia eletrônica de transmissão (MET), apresentaram o citoplasma com grande número de vesículas elétron-transparentes intercaladas com vesículas com compostos fenólicos, os fisóides (Fig. 3A). Assim como o descrito no capítulo 2, foi possível observar a formação de regiões diferenciadas entre estas vesículas com o agrupamento de diferentes organelas entre elas, os cloroplastos e as mitocôndrias (Fig. 3B-C). . Nestas regiões foi observado grande número de corpos de Golgi (Fig. 3D-E), os quais são hipertróficos, frequentemente com 4 a 6 cisternas e com muitas vesículas bem próximas ou sendo formadas nas cisternas (Fig. 4F). Com esta análise foi possível, também, observar que os fisóides estão distribuídos homogeneamente tanto no citoplasma geral, quanto nas regiões diferenciadas com organelas (Figs. 3A-F).

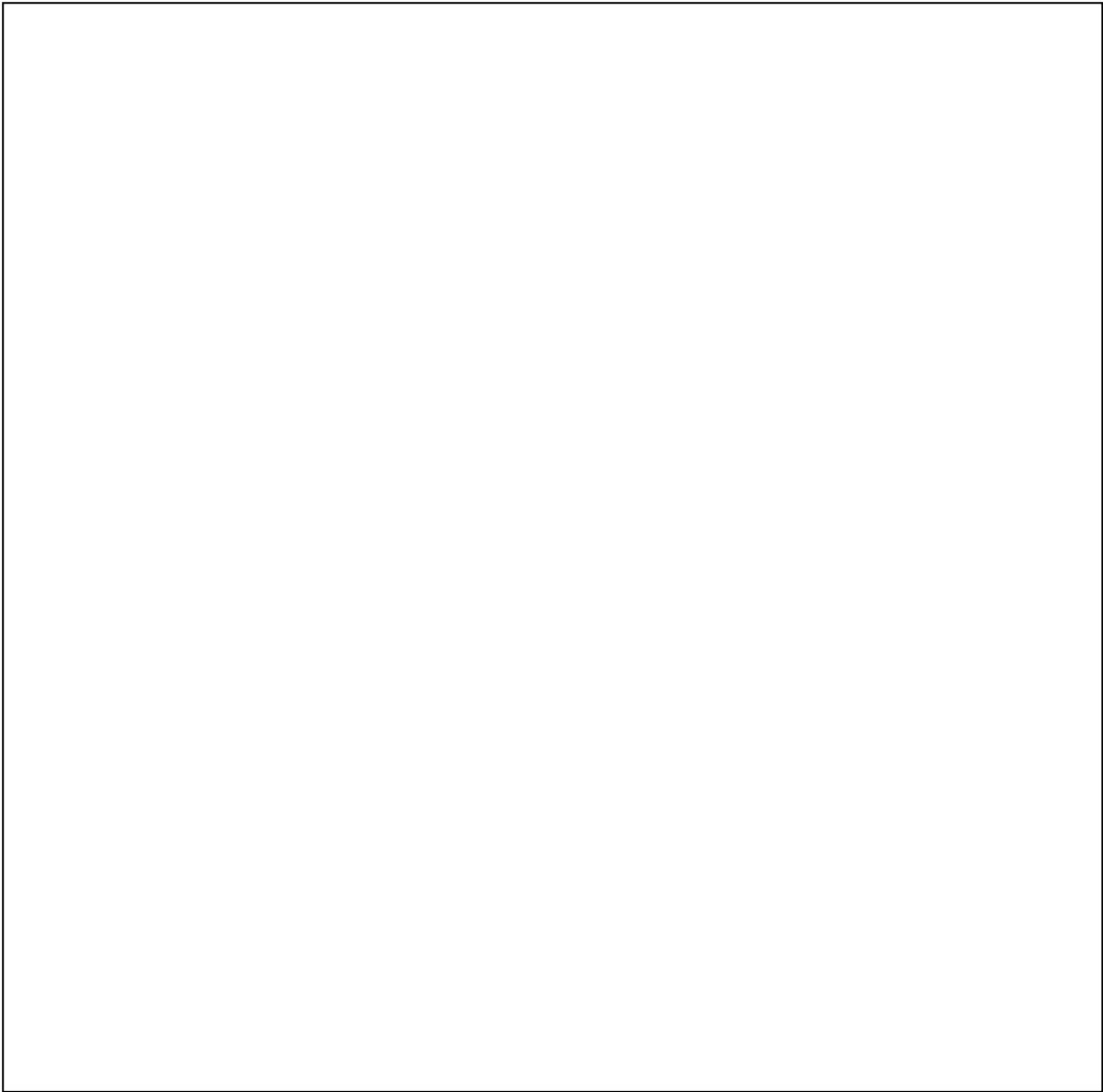


Figura 3: Zigotos controle de *S. cymosum* em microscopia eletrônica de transmissão (MET). A: Visão geral do citoplasma com vesículas elétron-transparentes (V) e fisóides (F). B: Cloroplasto (C) com membranas de tilacóides (setas) ao lado de uma mitocôndria (M). C: Mitocôndrias próximas de fisóides (F) e vesículas elétron-transparentes (V). D-E: Região diferenciada do citoplasma contendo diversas organelas, entre elas os corpos de Golgi (G) e fisóides (F). F: Detalhe de um corpo de Golgi, com várias cisternas e vesículas, próximo de fisóides (F).

As amostras tratadas com BFA 4 μM já apresentaram alterações ultraestruturais quando comparadas com o controle. O padrão de vesículas elétron-densas, de fisóides, descrito no controle, já não foi mais visualizado. Os fisóides apresentaram-se de forma degradada e dispersos entre os outros componentes citoplasmáticos, ou seja, sem a formação das vesículas elétron-densas padrão

observadas nos controles (Figs. 4A-F). Entretanto, ainda foi possível observar a formação dos corpos de Golgi, com a presença de menor número de cisternas, mas formando algumas vesículas (Figs. 4C-F). Organelas como os cloroplastos e mitocôndrias não apresentaram maiores alterações na ultraestrutura (Figs. 4A, B, E), somente uma leve retração nas membranas dos tilacóides nos cloroplastos (Fig. 4A).

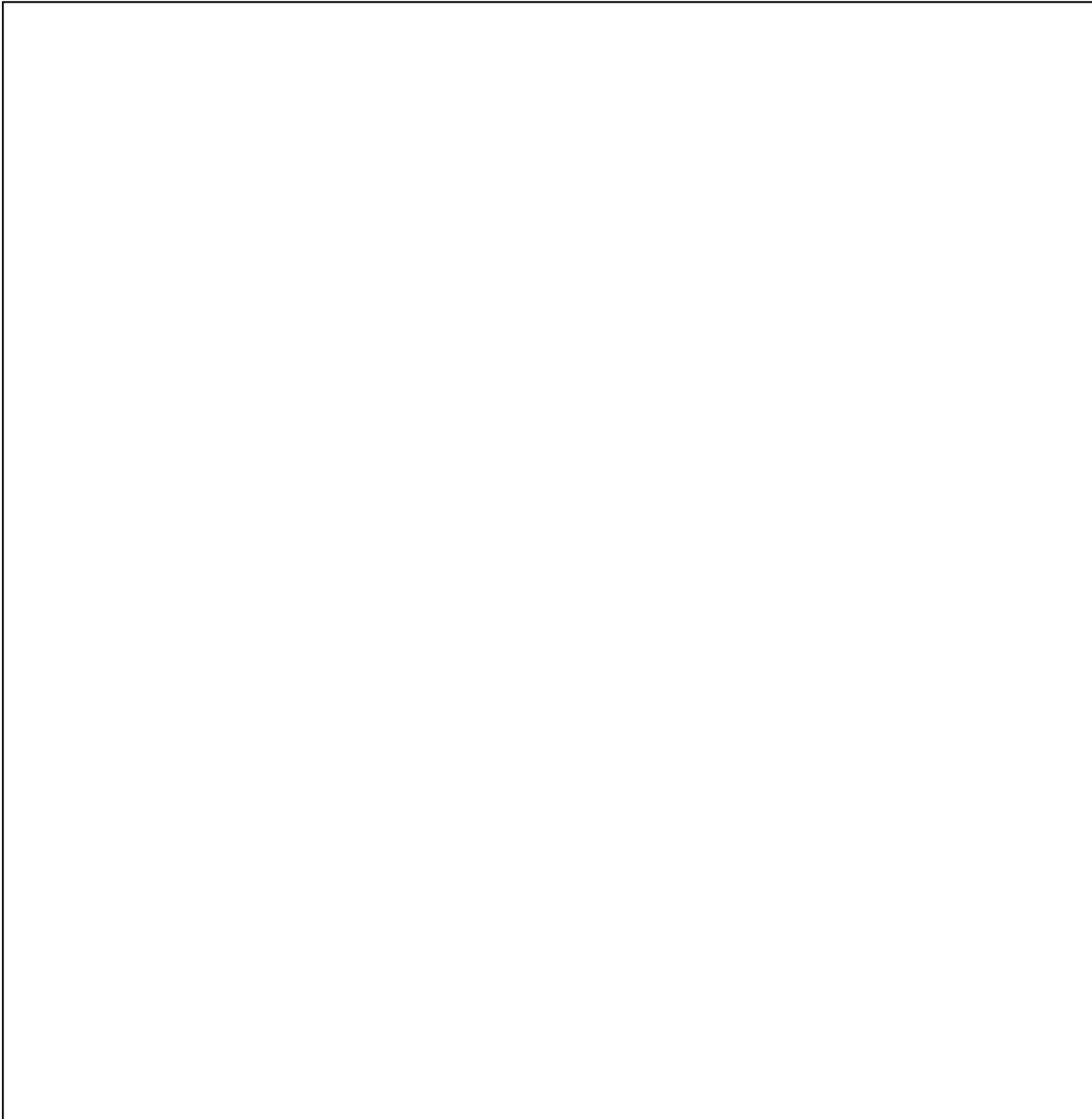


Figura 4: Zigotos de *S. cymosum* tratado com BFA 4 μ M por 12 horas em microscopia eletrônica de transmissão (MET). A-D: Visão geral do citoplasma mostrando a presença de muitas vesículas (V-colocar), cloroplastos (C) com tilacóides (setas), mitocôndria (M), muitos fisóides e resquícios de corpos de Golgi (G). E-F: Detalhe de alguns corpos de Golgi (G), com alterações, próximos de muitas vesículas (V-colocar), mitocôndrias (M) e fisóides (F).

Com o tratamento de BFA 8 μM além da degradação de alguns dos fisóides (Fig. 5A), foram visualizadas a fusão de vesículas com compostos fenólicos, os fisóides, ocupando regiões centralizadas do citoplasma (Fig. 5B-D). Mitocôndrias e cloroplastos mantiveram as características expressas no tratamento anterior (Fig. 5E-F). Contudo, este tratamento apresentou número extremamente reduzido de formação dos corpos de Golgi (Fig. 5A), sendo possível observar muitas cisternas e vesículas individualizadas dispersas no citoplasma (Fig. 5A, E, F).



Figura 5: Zigotos de *S. cymosum* tratado com BFA 8 μM por 12 horas em microscopia eletrônica de transmissão (MET). A-B: Visão geral do citoplasma mostrando muitas vesículas (V), fisóides (F) e corpos de Golgi com número de cisternas extremamente reduzido (G). C-D: Aglomerados de fisóides (F), ocupando parte do citoplasma, com presença

de vesículas (V). E: Cloroplasto (C) com tilacóides (setas) e fisóides (F). F: Muitos fisóides (F) e vesículas (V) dispersas, resquícios de cisternas dos corpos de Golgi (G).

Já nas amostras tratadas com BFA 16 μ M, os fisóides foram visualizados em agregados maiores ocupando maior espaço no citoplasma (Fig. 6A, E, F). Entretanto, quando comparado com o tratamento anterior, as amostras exibiram menor número de cisternas dos corpos de Golgi individualizadas dispersas no citoplasma (Fig. 6B, C). As mitocôndrias não apresentaram alterações e os cloroplastos foram observados com os tilacóides mais desorganizados do que os observados no tratamento com 16 μ M de BFA (Fig. 6D).

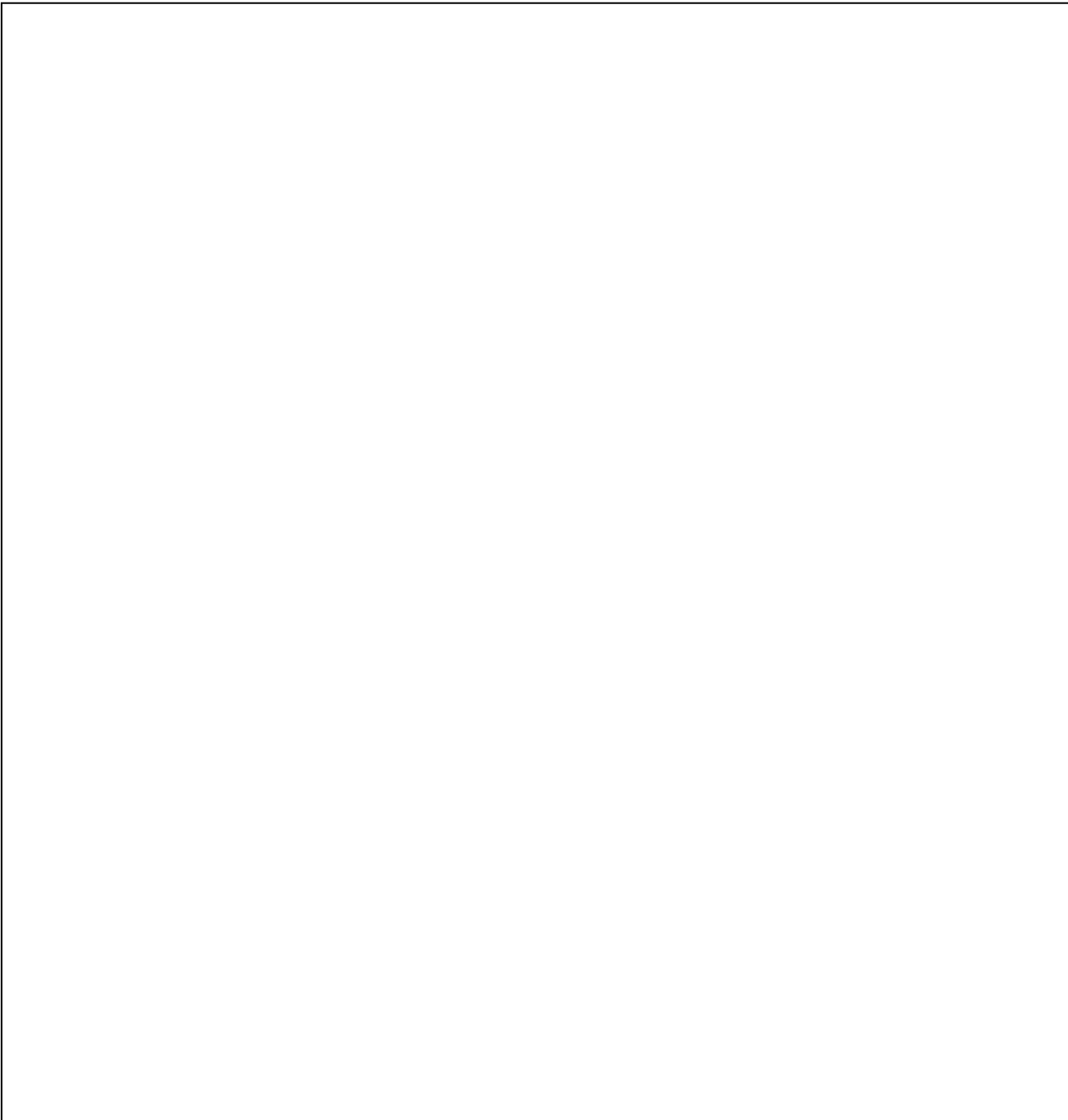


Figura 6: Zigotos de *S. cymosum* tratado com BFA 16 μ M por 12 horas em microscopia eletrônica de transmissão (MET). A: Visão geral do citoplasma com muitos fisóides (F). B: Detalhe de uma região diferenciada do citoplasma com mitocôndria (M), fisóides (F) e resquícios de cisternas dos corpos de Golgi (G). C-D: Detalhe de uma região próxima a parede celular (PC) com vesículas (V), cisternas dos corpos de Golgi (G) individualizadas, fisóides (F) e cloroplasto (C) com tilacóides (seta) alterados.

Por outro lado, os zigotos de *S. cymosum* tratados com BFA 32 μM , apresentaram apenas a formação de inúmeras vesículas contendo diferentes materiais (Fig. 7A). Os citoplasmas destas células foram visualizados com predomínio da fusão dos fisóides, que ocuparam praticamente todo o espaço citoplasmático (Fig. 7B-D). Estas vesículas agrupadas exibiram, ao seu redor, a formação de inúmeras membranas desorganizadas (Fig. 7B, C).



Figura 7: Zigotos de *S. cymosum* tratado com BFA 32 μM por 12 horas em microscopia eletrônica de transmissão (MET). A: Visão geral do citoplasma com muitas vesículas (V) e grandes agregados de fisóides (F). B-C: Detalhe de um agregado de fisóides (F) com a formação de muitas membranas ao redor (setas). F: Agregado de fisóides (F) ocupando a maior parte do espaço mostrado.

4. DISCUSSÃO

Durante o início do desenvolvimento de *S. cymosum* o zigoto permanece simétrico, tornando-se assimétrico somente 4 horas AF. Estes quando tratados com diferentes concentrações de BFA, por 12 horas, apresentaram alterações na assimetria, período de divisão celular, organização ultraestrutural e distribuição de compostos fenólicos. Estas alterações devem estar diretamente relacionadas ao tráfico de vesículas derivadas dos corpos de Golgi

Com estes tratamentos a não adesão das células aos substratos não foi o fator que impediu as divisões celulares nesta fase de desenvolvimento. Como observado nos resultados do capítulo 1, e para *Sargassum vachellianum* Greville (Yan e Zhang, 2014), todo o desenvolvimento inicial do zigoto do gênero *Sargassum* ocorre aderido ao receptáculo por uma muscilagem liberada juntamente com as oosferas. Não corroborando com o encontrado para *Silvetia* (Hadley *et al.*, 2010), *Fucus* (Belanger e Quatrano, 2000) e em tetrásporos de *Gelidium floridanum* (Bouzon *et al.*, 2006; Simioni *et al.*, 2014), nas quais o desenvolvimento e germinação são dependentes da adesão ao substrato, o que foi altamente afetado pelo tratamento com BFA.

O atraso do desenvolvimento nos zigotos tratados com BFA, neste estudo, pode estar relacionado com a dificuldade do direcionamento das vesículas com os materiais necessários para a formação das novas paredes celulares que irão dividir internamente o zigoto. Segundo Tsekos (2007), estruturas precursoras do complexo enzimático, as membranas tetraédricas, são responsáveis pela formação da parede celular e foram observadas em: (1) membranas das cisternas do Golgi antes mesmo da formação das vesículas, (2) nas membranas de vesículas derivadas do Golgi próximas a face trans, (3) em membranas de vesículas citoplasmáticas antes da fusão com a membrana plasmática e (4) nas depressões da membrana plasmática que devem ser resultantes de fusão de vesículas. Sendo que, o transporte e a exocitose das membranas tetraédricas é uma função primária dos corpos de Golgi, principalmente durante a síntese da parede celular (Tsekos, 1999).

A fixação do eixo polar de crescimento inicia uma série de alterações, principalmente ultraestruturais, que irão conduzir todas as divisões celulares para o correto desenvolvimento. Para a fixação deste eixo de crescimento é necessária à secreção de compostos específicos para adesão e para a parede celular, principalmente, na região de crescimento dos rizóides (Bisgrove e Kropf, 2007). Como visto neste estudo, as mais baixas concentrações de BFA (4 μM e 8 μM) ainda permitiram uma leve polarização celular, mas afetaram o tempo correto das divisões celulares retardando o seu desenvolvimento. Entretanto, estas células permaneceram viáveis, pois quando colocadas para recuperação em água do mar esterelizada, muitos zigotos apresentaram a continuação do desenvolvimento. Resultados também encontrados por Shaw e Quatrano (1996) e por Belanger e Quatrano (2000) em zigotos de *Fucus*, onde a BFA inibiu principalmente a secreção das vesículas, mas não impediu a citocinese.

Os zigotos de *S. cymosum* apresentaram diferenças nas respostas decorrentes dos tratamentos. Dentre as concentrações utilizadas neste estudo a de 32 μM foi mais letal para os zigotos analisados. Já as demais concentrações afetaram, principalmente, a divisão celular, ou seja, os zigotos permaneceram com simetria celular, o que permitiu a recuperação de alguns zigotos após o tratamento, conforme dados estatísticos. Dados também encontrados em concentrações semelhantes de BFA e utilizadas em *Fucus* (Shaw e Quatrano, 1996) e *Pelvetia* (Hable e Kropf, 1998), inibiram completamente a polarização destas algas.

Os corpos de Golgi nos zigotos de *S. cymosum* foram afetados pela BFA, principalmente nos tratamentos de 8 μM , 16 μM e 32 μM , resultando na fusão dos fisóides, as vesículas contendo os compostos fenólicos, principal efeito da BFA observado. Este fato pode ser atribuído a capacidade de bloqueio pela BFA nas proteínas sinalizadoras para a formação e direcionamento das vesículas. Além deste fato, ocorreu o aumento da formação de outros tipos de vesículas. A elevada formação de vesículas também foi observada para tetrásporos de *G. floridanum*, onde o tratamento com BFA bloqueou os corpos de Golgi, mas continuou a produzir membranas, entretanto estas não foram

distribuídas corretamente, resultando em um aumento de volume celular e formação de regiões vesiculares no citoplasma (Simioni *et al.*, 2014). Tais resultados são semelhantes aos encontrados em cultura de células embrionárias de plantas, além das alterações causadas na estrutura dos corpos de Golgi e no retículo endoplasmático (Capitano *et al.*, 1997). O tratamento com BFA afeta todo o processo de produção de vesículas, que ocorre devido a inibição do transporte de proteínas do retículo endoplasmático (RE) (Henderson *et al.*, 1994), além de diminuir o número de cisternas dos corpos de Golgi (Caloow *et al.*, 2001; Tsekos *et al.*, 2007). Assim como o observado, em outras plantas, na fusão de membranas do Golgi e RE, resultando em cisternas híbridas de Golgi-RE (Ritzenthaler *et al.*, 2002). Esta fusão de membranas do Golgi com ER pode ser mediada pelas moléculas SNARE presentes nas cisternas do Golgi, as quais podem mediar a fusão inversa Golgi para ER (Elazar *et al.*, 1994). O bloqueio induzido pela BFA na formação da capa de COPI parte das moléculas SNARE expostas na periferia das cisternas do Golgi e das livres para unirem-se com os seus homólogos nas membranas do RE, para fazer contato com o Golgi. Isto implica em uma mistura de componentes de membrana após a rápida fusão, consistindo com a alta mobilidade de lipídio e proteínas do Golgi (Cole *et al.*, 1996), assim proporcionando a alta taxa de fusão das diversas vesículas presentes nas células (Sciaky *et al.*, 1997) como também o observado em zigotos de *C. cymosum* após o uso de BFA.

Além do mais, os principais alvos da BFA são as proteínas GEFs, as quais estão envolvidas na ativação de ARFs, que são fatores da ribosilação de ADP pertencentes a uma família de proteínas de baixo peso molecular de ligação com GTP (Klausner *et al.*, 1992; Robinson *et al.*, 2008). De acordo com Donaldson *et al.* (1992), BFA interage com os ARFs de ligação ao GTP para evitar a catálise de GTP em GDP-ARF. Resultando assim no não revestimento necessário para a formação das vesículas. Usando tanto BFA e análogos de BFA em plantas de tabaco e *Arabidopsis*, Langhans *et al.* (2011) demonstraram que o local de ARF-GEFs influencia o padrão de respostas morfológicas após a adição de BFA.

Para zigotos com desenvolvimento polarizado é necessária a deposição de GDM – F2 (galactanos sulfatados) na parede celular no pólo sombreado, ou seja, no sítio de desenvolvimento dos rizóides. Este evento está correlacionado com a fixação do eixo polar e com a localização de FL-DHP e de F-actina na membrana plasmática do pólo rizoidal, assim sendo, os receptores DHP e F-actina indicam a deposição dos F2 para a formação dos rizóides (Kropf et al., 1989). No estudo com zigotos de *Fucus* tratados com BFA, a marcação com ATO (marcador de F2) foi extremamente reduzida, indicando que a sulfatação do F2 nos corpos de Golgi foi reduzida, além da não formação da assimetria celular e crescimento polar (Shaw e Quatrano, 1996). Assim, mostrando a capacidade da BFA como inibidor do processo de fixação e crescimento do eixo polar, o que impede ou dificulta o desenvolvimento das algas da ordem fucales, como em *S. cymosum*.

Portanto, com base nos resultados analisados do tratamento com BFA em zigotos de *S. cymosum*, podemos concluir que os corpos de Golgi são responsáveis pela produção e secreção de moléculas relacionadas com a formação da parede celular, formação de membranas para a polarização e crescimento celular e para o correto direcionamento dos fisóides. O efeito causado pelo tratamento com BFA resultou na perda da organização dos corpos de Golgi, o que ocasionou a formação de vesículas e na fusão dos fisóides. Esta fusão dos fisóides ocupou grande parte do citoplasma impedindo os demais processos citoplasmáticos, afetando diretamente o desenvolvimento desta alga.

CAPÍTULO 05

Efeitos da radiação ultravioleta sobre plântulas da macroalga parda *Sargassum cymosum* (Phaeophyceae, Fucales): alterações nas taxas de crescimento, nos pigmentos fotossintetizantes, na citoquímica e na organização ultraestrutural

1. INTRODUÇÃO

A radiação solar atmosférica contém uma quantidade significativa de radiação com comprimentos de onda mais curtos, por conseguinte, mais energia do que a luz visível (400-700 nm). Radiação com comprimentos entre 100-400 nm é denominada radiação ultravioleta (RUV). O menor destes comprimentos de 100-280 nm (UVC), está completamente bloqueado pela camada de ozônio (O₃). Os comprimentos na faixa de 280-315 nm (UVB) são absorvidos eficientemente, mas não completamente, pelo O₃, enquanto os comprimentos de 315-400 nm (UVA) não são absorvidos pelo O₃, e são, portanto, mais facilmente transmitidos à superfície da Terra (Madronich *et al.*, 1998).

A camada de ozônio está localizada entre 10 e 30 km na estratosfera e é composta pela ação da radiação solar com comprimento mais curto e de moléculas de oxigênio (Madronich, 1993).

Entre todos os organismos, as algas têm um papel importante na manutenção da biodiversidade, são os principais produtores primários nos ambientes costeiros, agem como habitats para muitas espécies de peixes importantes nos seu estágio larval e ajudam na estabilização dos sedimentos (Duarte, 1995). Portanto, as macroalgas são organismos importantes para avaliar os efeitos, em níveis elevados, de RUV que afetam o ambiente em sua maioria na zona entremarés.

Diferentes níveis de sensibilidade à radiação ultravioleta durante o ciclo de vida podem ser relacionados com a própria morfologia (Roleda *et al.*, 2007). Em fases da vida, com redução do número de células a radiação penetra mais facilmente, enquanto que nas fases adultas, muitas algas desenvolvem alguma capacidade de proteção, principalmente por meio da estrutura de talo (Altamiro *et al.*, 2003b). Assim, quando considera-se o menor tamanho e uma maior simplicidade morfológica das fases iniciais de desenvolvimento das algas, qualquer tipo de tensão, mesmo um pequeno impacto, afeta a biologia das espécies e podem ter efeitos mais evidentes, uma vez que são mais sensíveis do que os adultos (Wiencke *et al.*, 2000). No entanto, para os estudos de predição de fatores de estresse ambiental, como a RUV, o conhecimento detalhado sobre o estágio de

desenvolvimento inicial é fundamental, uma vez que o recrutamento dessas espécies dependem da sobrevivência desta fase (Altamiro *et al.*, 2003a).

O impacto causado pela RUV não se limita apenas às macroalgas, mas estende-se a muitos organismos aquáticos. Os efeitos negativos da radiação podem ocorrer a partir do nível celular ao nível de comunidade e, estão relacionados com as propriedades de alta energia da radiação UVB. Os efeitos da radiação UVA executam outras funções, por exemplo, estão correlacionados positivamente com a formação de gametângios durante o ciclo de desenvolvimento (Bartsch *et al.*, 2008).

As algas fucóides compõem um grupo dominante na zona entre marés, enquanto que em costões rochosos protegidos as espécies de *Sargassum* podem ser encontradas formando extensos bancos na zona sub-litoral (Veloza e Széchy, 2008). No entanto, o conhecimento sobre os efeitos causados pelo impacto direto da RUV, que facilmente atingem a região costeira, nos zigotos e embriões de *Sargassum*, não são conhecidos. Sendo o estabelecimento destes estágios iniciais de desenvolvimento importantes para todas as gerações futuras, o qual afeta diretamente o desempenho da população adulta (Schoenwaelder *et al.*, 2003).

Entre os mecanismos de proteção das algas pardas à RUV estão, por exemplo, a reparação enzimática (Karentz *et al.*, 1991) e a produção de certas substâncias com a ação de proteção, tais como aminoácidos e fluorotaninos, estes principalmente nas algas pardas compondo a parede celular (Pavia *et al.*, 1997; Swanson um e Druehl, 2002; Schoenwaelder, 2002; Polo *et al.*, 2014). Os compostos fenólicos são encontrados em algas e plantas superiores. Em plantas superiores, estão localizados nas células da epiderme, com a função de proteção dos organismos como um todo, através da absorção de raios ultravioletas (Bachereau *et al.*, 1998). Muito semelhante ao encontrado em plantas superiores, nas algas pardas, estes compostos fenólicos são encontrados dentro dos fisóides, localizados principalmente nas células do córtex, na superfície da estrutura de algas, quer nas fases iniciais de desenvolvimento, como em adultos (Schoenwaelder *et al.*, 2003).

Alguns estudos, que foram realizados sobre a ação da RUV, em embriões de algas pardas, são principalmente encontrados com diferentes espécies de *Fucus*, onde se destacam os estudos Altamiro *et al.* (2002) com *Fucus serratus*, Altamiro *et al.* (2003b) com *F. spiralis*, *F. vesiculosus* e *F. serratus*. Entretanto, poucos estudos estão relacionados com o impacto da RUV, principalmente, com as espécies de *Sargassum*, macroalgas encontradas com maior biomassa em ambientes costeiras tropicais. Destaca-se o trabalho do Polo *et al.* (2014), que avaliaram os efeitos da RUV no talo de plantas adultas de *S. cymosum*, onde foi observado diferentes aspectos decorrentes do estresse com a RUV. Entretanto, estes autores destacaram que a taxa de crescimento e a concentração de pigmentos, não foram drasticamente alteradas pela RUV. Porém, todas as plantas tratadas apresentaram um aumento da quantidade de fisóides, provavelmente como um mecanismo fotoprotetor. Bem como, apresentaram espessamento da parede celular como uma barreira contra os efeitos nocivos da radiação UV.

Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da RUV sobre o crescimento, as respostas fisiológicas e organização celular em plântula da alga fucóide *S. cymosum* cultivados por 7 dias, com diferentes tratamentos de radiação (PAR, PAR + UVA, PAR + UVB e UVA + PAR + UVB).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultura

Para a obtenção dos zigotos foi seguida a metodologia de cultura citada no Capítulo 02. Entretanto, para os experimentos de exposição a RUV em embriões, os zigotos formados foram aclimatados/mantidos por 15 dias, com o objetivo de formar as plântulas jovens, em meio de cultura com água do mar filtrada e enriquecida com solução von Stosch (VSES) com concentração 50% (VSES/2), com as condições laboratoriais controladas com $24 \pm 2^\circ\text{C}$, aeração contínua, iluminação

com lâmpadas fluorescentes PAR com $70 \pm 10 \text{ umol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Li-cor light meter 250, USA) e com fotoper\u00edodo de 12 h .

2.2. Experimentos de radia\u00e7\u00e3o UV

No laborat\u00f3rio, foram selecionados pl\u00e2ntulas jovens de *S. cymosum* ($\pm 2,60 \text{ g}$) e cultivados durante 7 dias em b\u00e9quers com 250 mL de \u00e1gua do mar esterilizada (30 psu) mais VSES/2, aera\u00e7\u00e3o cont\u00ednua, e as mesmas condi\u00e7\u00f5es controladas descrito acima, sendo estas condi\u00e7\u00f5es os tratamentos controle (com PAR). O tratamento PAR+ UVA + UVB diferiu do tratamento PAR, pelo acr\u00e9scimo de lâmpadas Vilber Lourmat (VL-6LM, Marne La Vall\u00e9e, Fran\u00e7a), com comprimentos de onda de 312 nm para radia\u00e7\u00e3o UVB e com comprimentos de onda de 365 nm para radia\u00e7\u00e3o UVA. A intensidade da radia\u00e7\u00e3o UVB foi de $0,35 \text{ W m}^{-2}$ e $0,70 \text{ W m}^{-2}$ para radia\u00e7\u00e3o UVA (Radiometer modelo IL 1400A, International Light, Newburyport, MA, EUA), com exposi\u00e7\u00e3o de 2 horas por dia durante sete dias. Tr\u00eas repeti\u00e7\u00f5es foram feitas para cada grupo experimental (PAR, PAR + UVA, PAR+UVB e PAR + UVA + UVB). As doses totais de irradi\u00e2ncia PAR, UVA e UVB foram $657,40 \text{ k.J m}^{-2}$, $7,56 \text{ k.J m}^{-2}$ e $3,78 \text{ k.J m}^{-2}$, respectivamente.

2.3. Taxas de crescimento (TC/GR)

As taxas de crescimento foram calculadas utilizando a seguinte equa\u00e7\u00e3o: $\text{GR} [\% \text{ dia}^{-1}] = [(\text{peso} / \text{Wi}) - 1] * 100 / t$, onde Wi = massa inicial \u00famida, PM = massa \u00famida ap\u00f3s sete dias, e t = tempo em dias (Penniman *et al.*, 1986).

2.4. An\u00e1lise dos pigmentos

Pigmentos fotossint\u00e9ticos (clorofilas *a* e *c*; Chl *a* e Chl *c*) de *S. cymosum* foram analisados a partir de amostras frescas que foram congeladas ($n = 4$) e mantidas a -40°C at\u00e9 o uso. As clorofilas foram extra\u00eddas a partir de cerca de 225 mg de peso fresco (PF) em 3 mL de acetona pura PA

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) durante 10 min em gelo e protegidas da luz. Em seguida, os extratos foram centrifugados durante 5 min a 10.730 rpm e os pigmentos foram quantificados por espectrofotometria (Hitachi, modelo 100-20,. (Hitachi Co., Japão)), as concentrações de pigmentos foram calculados de acordo com Jeffrey e Humphrey (1975).

Os carotenóides foram analisados por extração exaustiva de 1,0 g de amostras de peso fresco (n = 4) em 10 ml de metanol PA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os extratos brutos metanólicos foram evaporados para concentrar os extratos. A absorvância específica foi determinada com um espectrofotômetro de microplacas Tecan (Infinito ® M200 PRO, Männedorf, Suíça) a 450 nm. Concentrações de carotenóides totais foram calculados com base em curva padrão β -caroteno ($1-300 \mu\text{g mL}^{-1}$, $y = 0.00365x$; $r^2 = 0,999$).

2.5. Compostos fenólicos

A análise dos compostos fenólicos foi feita usando o método de espectrofotometria de Folin - Ciocalteu com base em Waterman e Mole (1994). Este método permite identificar compostos fenólicos diferentes, como fenóis totais e taninos hidrolisados nas Phaeophyceae. Os compostos fenólicos foram extraídos de amostras de 400 mg de peso fresco (n = 4) utilizando 4 mL de metanol a 80% aquoso. Os extratos foram centrifugados durante 10 minutos a 4.000 rpm. Aliquotas de 50 ml dos extratos brutos do sobrenadante foram adicionados a 180 ml de água destilada, 10 mL de Folin e 30 mL de carbonato de sódio a 20% w/v de solução concentrada e então incubadas à temperatura ambiente durante 1 h. A absorção da mistura de reação foi medida em 750 nm usando um espectrofotômetro de microplacas (Tp Leitor; Thermoplate, Nanshan District, Shenzhen, China). Floroglucinol foi utilizado como padrão em concentrações de 5 a 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($y = 0.0575x$; $r^2 = 0,999$). Todas as medições foram realizadas em triplicata. Os compostos fenólicos extrusados pelas algas para o meio de cultura de água do mar também foram avaliadas medindo o espectro de absorção (300-700 nm) do meio de cultura de água do mar filtrada de cada tratamento.

2.6. Capacidade de varredura de radicais por DPPH

Para determinar a capacidade de eliminação de radicais, foi utilizado o método descrito por Zacarias *et al.* (2007). Resumidamente, 2,9 mL de solução à 0,1 mM de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) em 80% solução aquosa de metanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram adicionados a uma alíquota de extratos de compostos fenólicos (0,1 mL) e incubados durante 30 min. A absorbância da reação antioxidante foi medida a 517 nm utilizando um espectrofotômetro de microplacas (leitor de TP NM, Thermoplate). A percentagem de inibição (%) foi determinada utilizando a seguinte fórmula: $\text{Inibição (\%)} = (\text{Abs Controle} - \text{Abs Amostra}) / \text{Abs Controle} * 100\%$, onde Abs controle é a absorbância de controle de DPPH e Abs amostra é a absorbância das amostras tratadas. O antioxidante sintético terc-butil-hidroxitolueno (BHT), foi utilizado como controle positivo. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

2.7. Microscopia de luz (ML)

Foi utilizada a metodologia de processamento para ML citada no Capítulo 02, p. 39 e 41, entretanto o teste de citoquímica utilizado neste caso foi somente o Azul de Toluidina – ATO.

2.8. Medidas de células corticais

Para determinar o tamanho das células corticais, 30 células foram medidas em cada tratamento e no controle (30 de largura e 30 de altura).

2.9. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Foi utilizada a metodologia de processamento para ML citada no Capítulo 02, p. 40 e 41.

2.10. Análise dos dados

Os dados foram analisados por análise de variância unifatorial (ANOVA) e teste de Tukey a posteriori. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote de software Statistica

(versão 10.0), considerando-se $p > 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Taxas de crescimento (TCs)

Depois de sete dias de cultivo, os tratamentos com radiação e o controle, das plântulas de *S. cymosum*, foram comparados e uma diferença significativa nas TCs (ANOVA, $P < 0,002$) foi observada (Fig. 1). As plântulas de *S. cymosum* cultivada com PAR+UVB foram influenciadas negativamente pela radiação ultravioleta, com redução de 16% nas TCs, em comparação com plantas controle (PAR). Assim como foi possível observar diferenças na morfologia geral (Figs. 3A-H; Figs. 4A-F, Figs. 5A-E; Figs. 6A-D; Figs. 7A-E) entre os tratamentos. Onde que, e possível visualizar plântulas com tamanhos menores, principalmente no tratamento PAR-UVB (Figs. 2A-E).



Figura 1: Taxas de crescimento (TCs) de plântulas de *S. cymosum* após 7 dias de exposição aos tratamentos de radiação ($n = 4$, média \pm DP). Letras indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

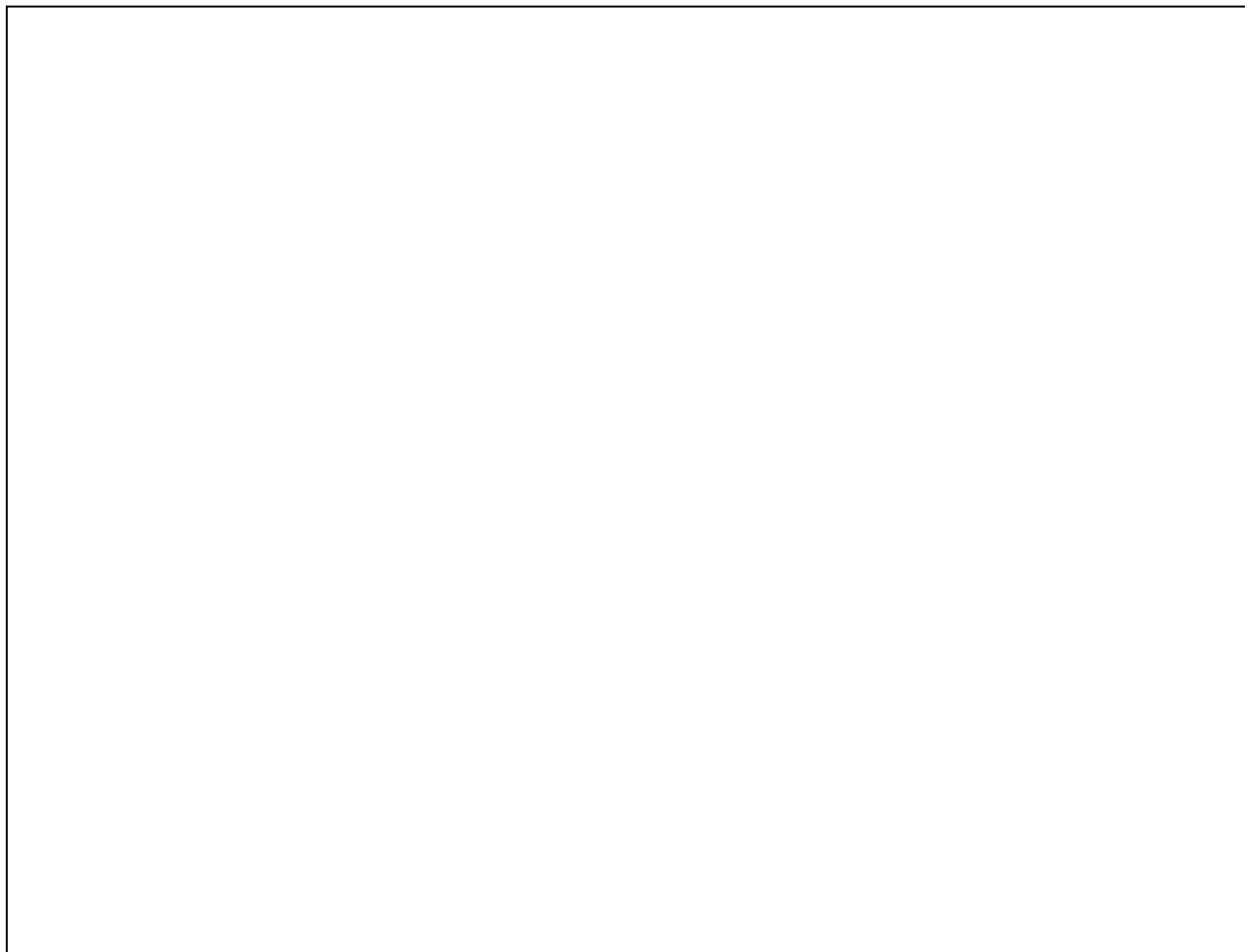


Figura 2: Morfologia geral de plântulas *S. cymosum* após o tratamento com radiação UV. A: Amostras antes serem usadas no experimento. B-E: as amostras após 7 dias de tratamento com radiação ultravioleta. B: Amostras controle. C: Amostras PAR + UVA. D: Amostras PAR + UVB. E: Amostras PAR + UVA + UVB.

3.2. Pigmentos e compostos fenólicos totais

A quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *c* e teor de carotenóides totais), compostos fenólicos e atividade antioxidante DPPH em plântulas de *S. cymosum*, foram significativamente afetadas pela RUV (Tabela 1 e 2).

A concentração de clorofila *a* mostrou uma redução significativa após exposição aos tratamentos PAR+UVA e PAR+UVA+UVB, em 34,7% e 20,5%, respectivamente, porém não mostrou alteração significativa com PAR+UVB. No entanto, a clorofila *c* aumentou após exposição à PAR+UVA, PAR+UVB, e PAR+UVA+UVB, em comparação com as plantas de controle (Tabela 1).

A quantidade total de carotenóides aumentou 9,7% após a exposição ao PAR+UVA+UVB, quando comparada ao controle e aos outros tratamentos. Nas plântulas tratadas com PAR+UVA e PAR+UVA+UVB os compostos fenólicos totais de não apresentaram diferenças estatísticas, quando comparados com o controle, com exceção de plantas cultivadas com PAR+UVB, apresentaram uma redução no teor de compostos fenólicos. A atividade radical DPPH também apresentaram valores inferiores em plântulas expostas à PAR+UVB (Tabela 1).

Tabela 1: Pigmentos fotossintetizantes (clorofilas e carotenóides totais), teores de compostos fenólicos e capacidade de varredura de radicais por DPPH em plântulas *S. cymosum* após 7 dias de exposição aos tratamentos de radiação (n = 4, média ± DP).

TRATAMENTO	Clor. <i>a</i>	Clor. <i>c</i>	Carotenóides	Compostos fenólicos	DPPH
PAR	a 225.50 ±1.30	d 75.22±5.30	b 19.12±0.37	a 10.51 ±1.21	a 58.12 ±8.01
PAR+UVA	c 166.77 ±1.00	c 127.66±3.24	ab 19.71±0.75	a 10.66 ±2.13	a 55.37 ±10.61
PAR+UVB	a 233.06 ±5.11	a 156.45 ±3.66	a 19.99±0.46	b 6.53 ±0.24	b 21.39 ±0.79
PAR+UVA+UVB	b 202.87 ±2.60	b 142.76±0.54	ab 21.17 ±1.16	a 9.97 ±0.73	a 53.80 ±2.50

Tabela 2: ANOVA análise de pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenóides totais), teores de compostos fenólicos e capacidade de varredura de radicais por DPPH em plântulas *S. cymosum* após 7 dias de exposição aos tratamentos de radiação (n = 4, média ± DP).

PIGMENTOS	<i>F</i>	<i>P</i>
Clorofila <i>a</i>	57.36	0.000000
Clorofila <i>c</i>	386.40	0.000000
Carotenóides	5.29	0.014810
Compostos fenólicos	9.16	0.001986
DPPH	26.03	0.000015

3.3. Observações em ML e citoquímica

Secções transversais de plântulas controle de *S. cymosum*, quando observadas sob microscopia luz (ML), apresentaram morfologia caracterizada pela presença de uma camada homogênea de pequenas células corticais (CC), estas são menores em relação as células medulares (Figs. 3A-B). Porém, na região medular, as células não estão dispostas ordenadamente, e mostraram diversos tamanhos e formas (Fig. 3A).

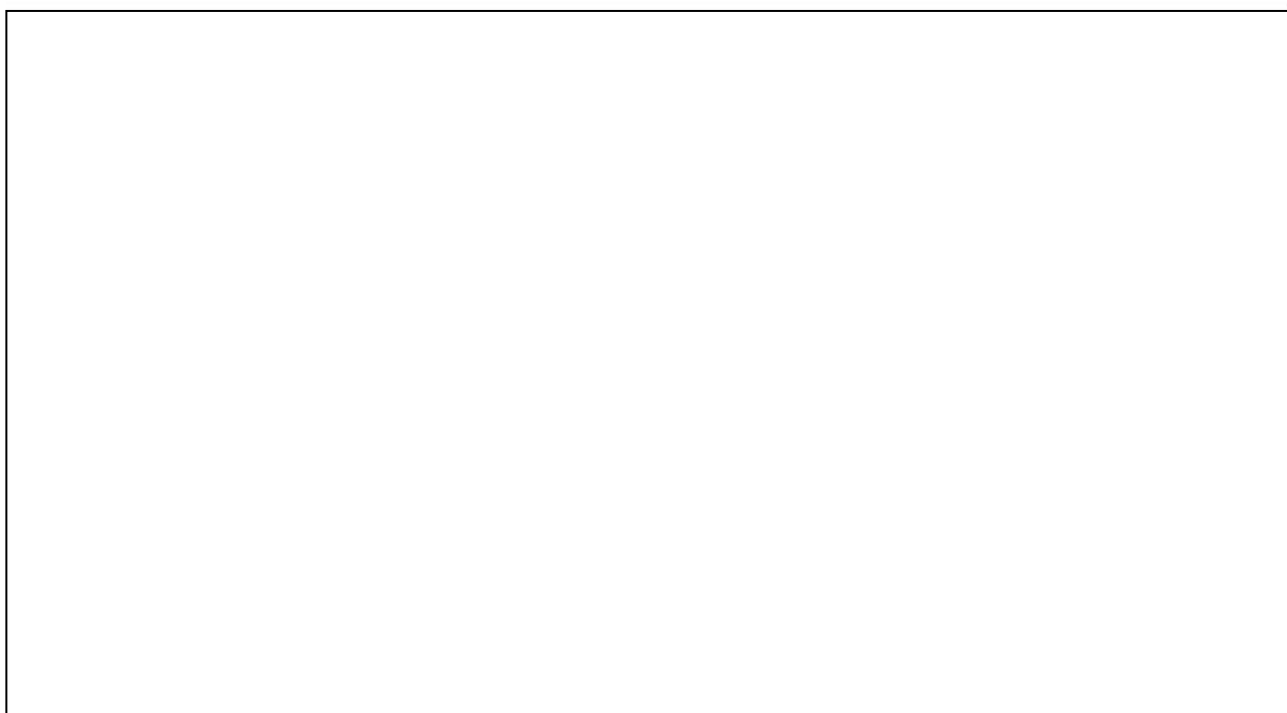


Figura 3: Microscopia de luz de plântulas de *S. cymosum* após exposição aos tratamentos de radiação ultravioleta durante 2 horas por dia ao longo de um período de 7 dias, coradas com ATO. A-B: Amostras controle, detalhes de células corticais (CC), parede celular (CW) e da presença de poucos fisóides (setas). C-D: Amostras tratadas com PAR + UVA; E-F: As amostras tratadas com PAR + UVB; Detalhe das células corticais (CC) mais espessas, maior presença de fisóides (setas). G-H: Amostras tratadas com PAR + UVA + UVB, células corticais (CC), parede celular não espessada (CW) e a presença de fisóides (setas).

As células corticais apresentaram variações de tamanhos nos diferentes tratamentos com UV. As células com menor área foram observadas no tratamento PAR+UVB (114.72 μm) e, com a maior área no tratamento PAR+UVA (241.94 μm), ainda menores quando comparadas com o PAR

(316.05 μm) (Tabela 03). Já nas células medulares nos tratamentos PAR+UVA e PAR+UVA+UVB foi possível observar redução em seus tamanhos (Fig. 3C, G).

Tabela 3: Medidas das células corticais (CC) das plântulas de *S. cymosum* após 7 dias de exposição aos tratamentos de radiação (n = 30, média \pm DP).

TRATAMENTOS	Largura	Comprimento	Área
PAR	18.32 \pm 4.08 ^a	17.09 \pm 4.63 ^b	316.05 \pm 129.37 ^a
PAR+UVA	12.12 \pm 3.03 ^c	22.12 \pm 6.15 ^a	241.94 \pm 124.22 ^{ab}
PAR+UVB	12.30 \pm 2.46 ^c	8.88 \pm 2.20 ^c	114.72 \pm 41.72 ^c
PAR+UVA+UVB	15.18 \pm 3.29 ^b	12.76 \pm 4.92 ^{bc}	189.47 \pm 99.44 ^b

Amostras controle, PAR, de plântulas de *S. cymosum* quando coradas com ATO mostraram uma reação metacromática na parede celular (PC), o que indica a presença de polissacarídeos sulfatados (Fig. 3A-B). No citoplasma das células das plântulas de *S. cymosum* das amostras PAR, foram observados fisóides em tons de azul e amarelo escuro (Fig. 3A-B, seta).

As amostras tratadas com PAR+UVA (Fig. 3C-D), PAR+UVB (Fig. 3E-F), e PAR+UVA+UVB (Fig. 3G-H), quando coradas com ATO apresentaram uma reação de forma semelhante na parede celular ao que foi observado nas amostras controle. No entanto, no citoplasma foi possível observar um aumento dos fisóides, principalmente nos tratamentos PAR+UVA e PAR+UVA+UVB (Figs. 3D, F, H, setas). A parede celular, das amostras que foram tratadas com PAR+UVA e PAR+UVB apresentaram regiões espessadas (Figura 3D, F).

3.4. Observações em MET

Quando observadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), secções das plântulas controle de *S. cymosum* (PAR) (Figs. 4A-F), apresentaram, nas células da camada cortical e nas células do interior, o citoplasma com alguns grânulos de fisóides, os quais estavam mais próximos da parede celular (Figs. 4A-B). Os cloroplastos das células corticais aparecem dispostos de forma parietal exceto na refração superficial destas células (Fig 4B). Muitos cloroplastos, com membranas dos tilacóides dispostas em faixas de três a três, algumas vezes dilatados (Fig. 4C). Já os cloroplastos das células internas não apresentam dilatações (Fig. 4A). No entanto, em ambos os tipos de cloroplastos foi possível visualizar a presença de plastoglóbulos (Fig. 4C). Estes cloroplastos apareceram em associação com as mitocôndrias (Fig. 4D).

Os núcleos das células controle apresentaram nucléolos com cromatina em intensa atividade, que é uma característica importante das células em desenvolvimento (Fig. 4E). Também em associação com o núcleo foi encontrado a presença de corpos de Golgi liberando muitas vesículas com diferentes materiais, além da presença de vacúolos que armazenam componentes da reserva (Fig. 4F).

Figura 4: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) imagens de plântulas de *S. cymosum* controle (PAR). A: Secção de células corticais (CC) e medulares (CM) -B: Detalhe de células cortical com parede celular (PC), a presença de cloroplastos (C) com tilacóides desorganizados e fisóides (pH). C: Os cloroplastos das células do interior com tilacóides organizados e plastoglóbulos. D: cloroplastos (C) de células corticais associados com mitocôndrias (M). E: Núcleo (N), com nucléolo (Nu), associado a corpos de Golgi (G) e vesículas (V).

Em plântulas tratados com PAR+UVA, as células corticais apresentaram espessamento da parede celular (Fig. 5A-B) corroborando o observado na ML. Nestas células também se observou um ligeiro aumento na quantidade de fisóides dispostos ao longo da periferia da célula, especialmente na porção superficial (Fig. 5A-B). Os cloroplastos das células corticais e as células internas mostraram alteração significativa, com tilacóide e também alteração na disposição espacial destas organelas quando comparado as das plântulas controle (Fig. 5A-C). Com este tratamento, foi possível observar o aumento da formação e da degradação dos fisóides (Fig. 5D). As mitocôndrias não apresentaram alterações quando comparadas com as células controle (Fig. 5E).

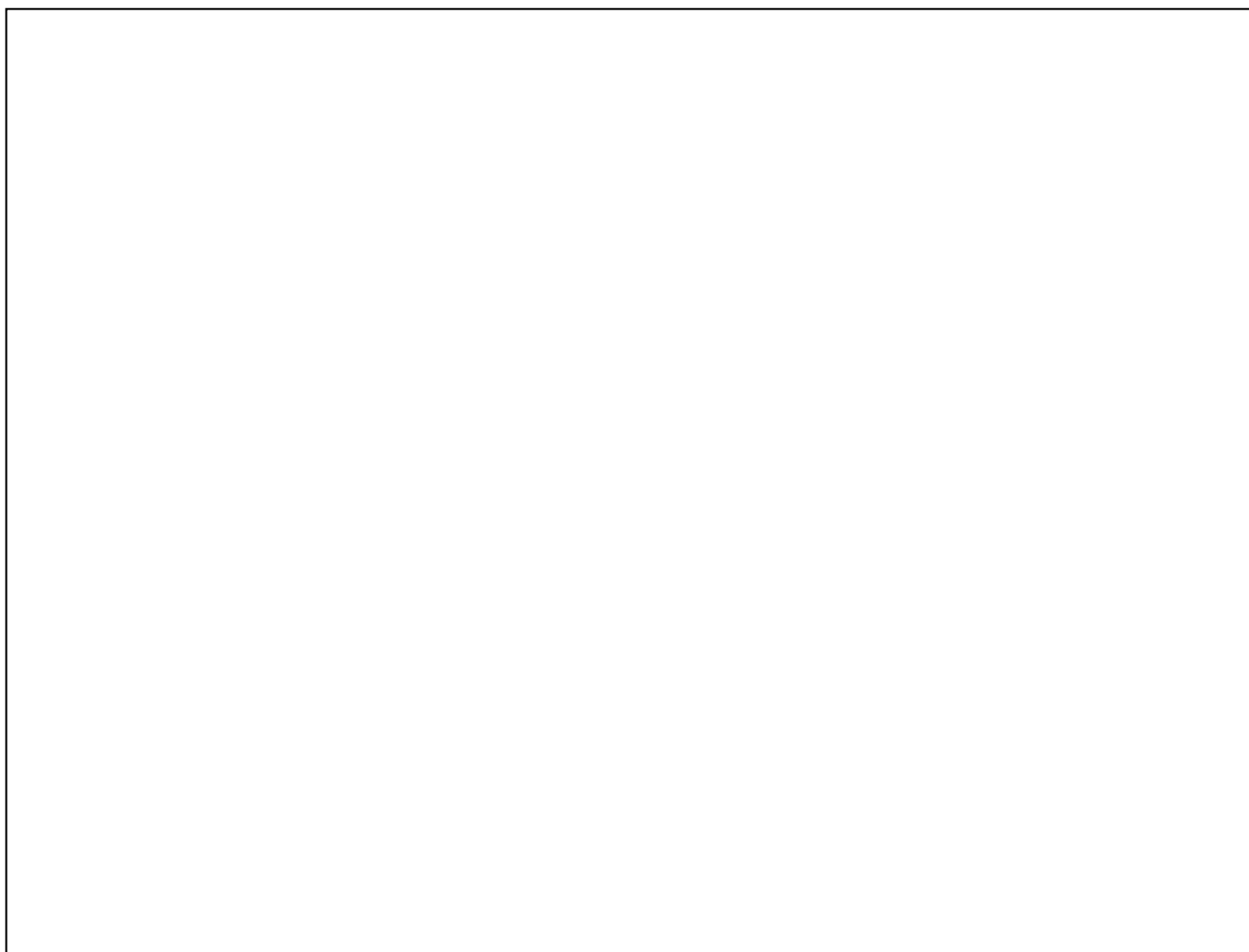


Figura 5: Microscopia eletrônica de transmissão (MET), imagens microscópicas de plântulas de *S. cymosum* tratadas com PAR + UVA. A-C: células corticais (CC) com paredes celulares (PC). Cloroplastos (C) com plastoglobulos e fisóides (Ph) dispostos ao longo da célula e na periferia, respectivamente. D: fisóides (Ph) ligeiramente degradados nas regiões diferenciadas no citoplasma. G: Mitocôndrias (M) com numerosas cristas.

Plântulas de *S. cymosum* quando tratados com PAR+UVB mostraram leve espessamento da parede celular nas células corticais (Fig.6A), e os cloroplastos ainda mantiveram a característica estrutural descrita para PAR+UVA, com tilacoides desorganizados (Fig. 6B). No entanto, observou-se a presença de grandes quantidades de resquícios de fisóides degradados em torno destas estruturas (Fig. 5B, C). O núcleo, em associação com os corpos de Golgi e também mostrou grande nucléolo e cromatina muito ativa, (Fig. 6C).

Uma das principais diferenças observadas neste tratamento, quando comparado com PAR e PAR+UVA, foi a presença de muitos grânulos elétron-densos, provavelmente, os fisóides que foram sendo degradados (Figs. 6C-D), distribuídos principalmente próximo as organelas, tais como as mitocôndrias e cloroplastos (Fig. 6D).

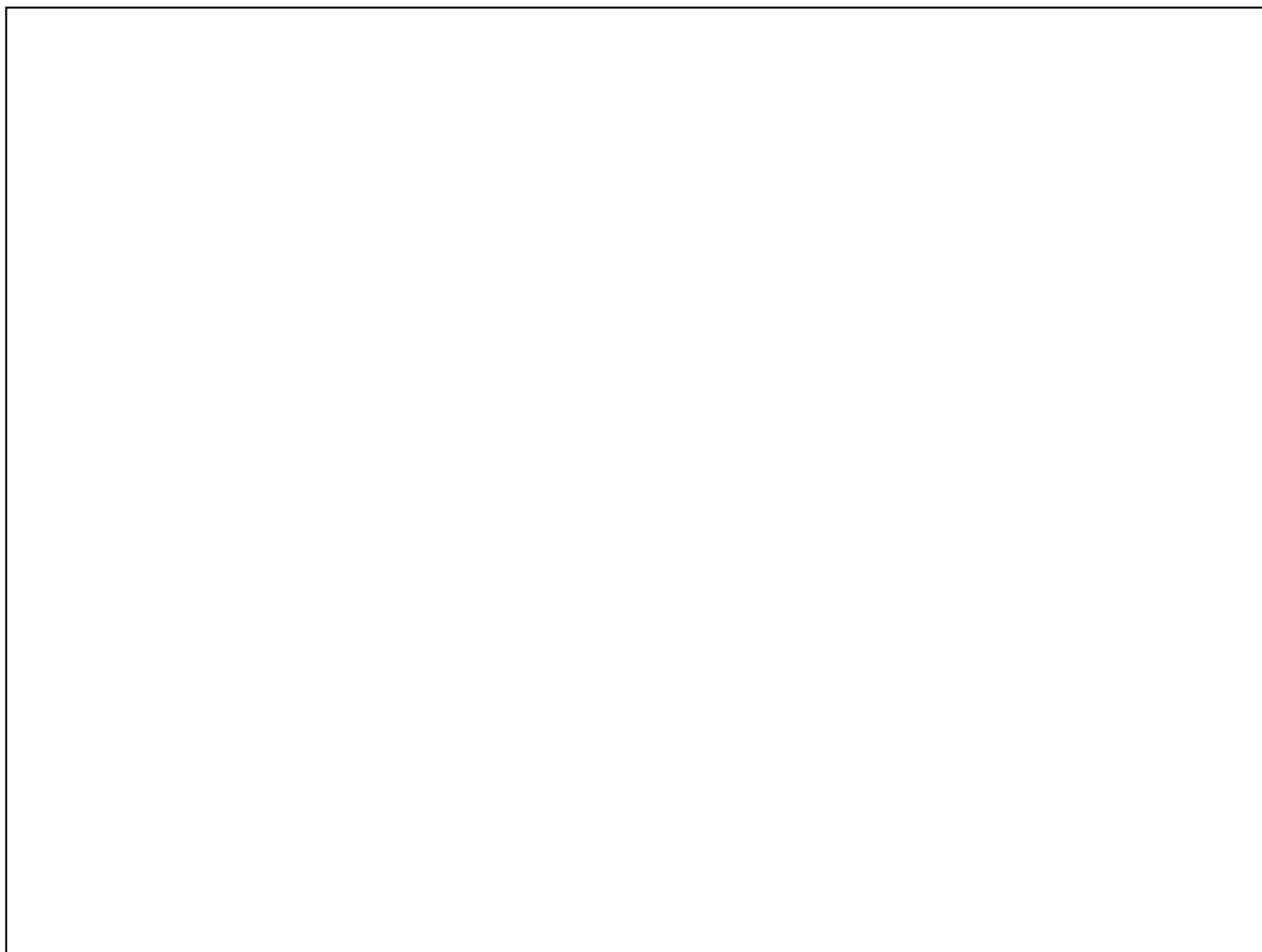


Figura 6: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) plântulas de *S. cymosum* tratadas com PAR + UVB. A: células corticais com a parede celular (PC) ligeiramente mais espessa e vários cloroplastos (C). B: Os cloroplastos (C) com tilacóides desorganizados e hipertróficos (seta), cercado por vários grânulos de fisóides (setas). C: Núcleo (N), próximo dos corpos de Golgi (G) e fisóides degradados (cabeça de seta), com nucléolo (Nu) evidente. D: e fragmentos de fisóides degradados (pH) perto de mitocôndrias (M) e de cloroplastos (C).

Nas amostras de *S. cymosum* tratadas com PAR + UVA + UVB, foi possível visualizar, nas células corticais, grande espessamento da parede celular (Fig. 7A). Os cloroplastos destas células continuaram apresentando ruptura de tilacóides, sendo assim, com menor número (Fig. 7B). Já os cloroplastos das células internas permaneceram com as mesmas características do PAR (Figuras 7C-D). O núcleo, associado com corpos de Golgi hipertróficos, apresentou cromatina difusa revelando uma intensa atividade de transcrição (Fig. 7E). Além da presença de grânulos de fisóides próximos

ao núcleo (Fig. 7E), estes também foram observados, na maioria das amostras, degradados e perto dos plasmodesmos das paredes celulares (Fig. 7E).

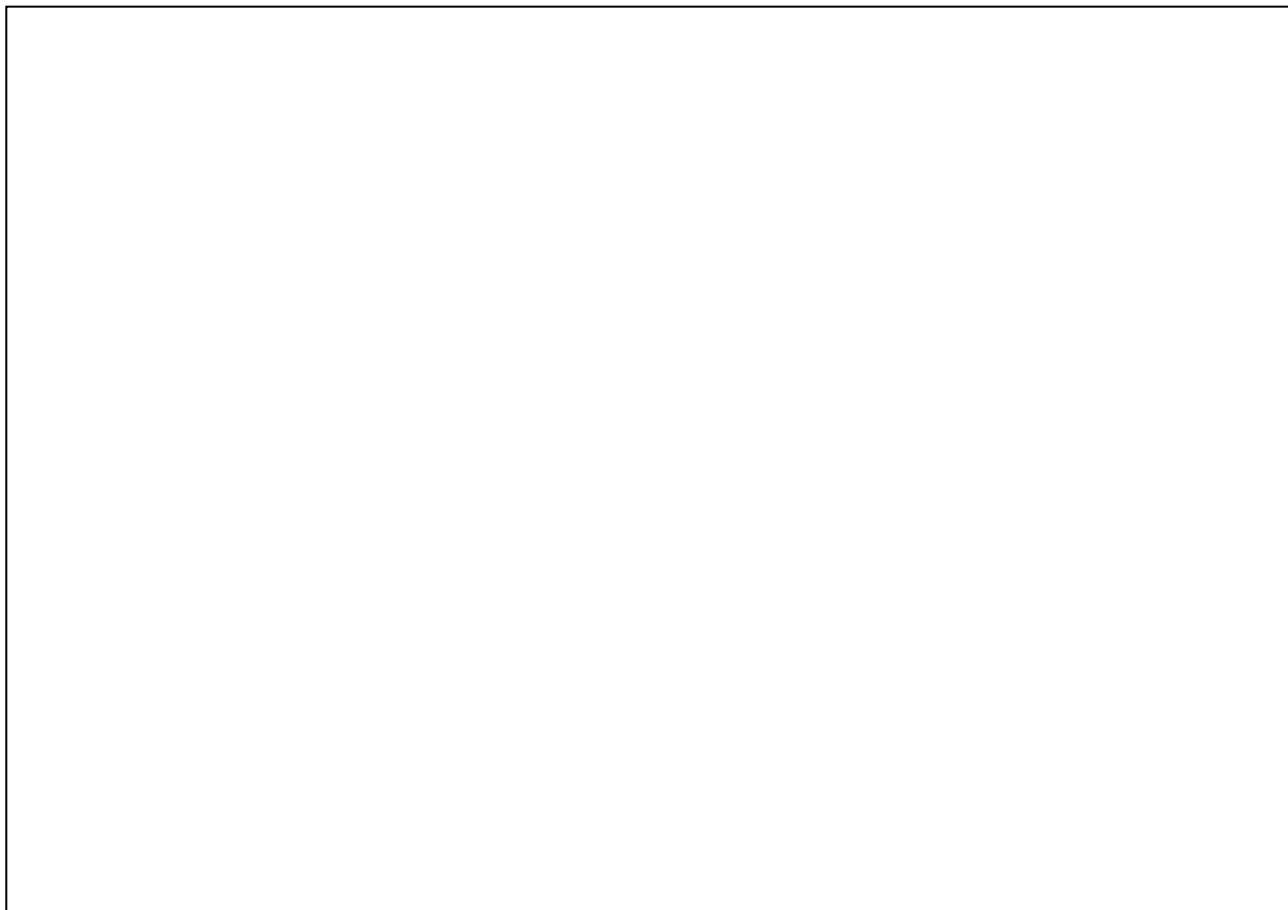


Figura 7: Microscopia eletrônica de transmissão (MET), plântulas tratadas de *S. cymosum* com PAR + UVA + UVB. A: células corticais com parede celular espessa (PC) e a presença de fisóides (Ph). B: Os cloroplastos (C) das células corticais, com menor número de tilacóides e com plastoglóbulos (P), associados com as mitocôndrias (M). C-D: Os cloroplastos das células do interior da plântula, com tilacóides bem organizados (setas) e plastoglóbulos (P), também em associação com mitocôndrias (M). E: Núcleo (N) extremamente próximo aos corpos de Golgi (G) e cercados por fisóides degradados (Ph) e por vesículas (V).

4. DISCUSSÃO

Plântulas de *Sargassum cymosum* mostraram sensibilidade à exposição à RUV, principalmente no que se refere as TCs das amostras tratadas com PAR+UVB. Em todos os tratamentos as alterações nas concentrações de pigmentos, compostos fenólicos, DPPH e a morfologia superficial das plântulas apresentaram alguma sensibilidade e, contudo, foram mais prejudiciais principalmente em embriões expostos a radiação PAR+UVB. Desta forma, evidenciando que a radiação PAR+UVB de forma isolada é mais nociva a estas algas do que as demais combinações.

Depois de sete dias de tratamento em plântulas de *S. cymosum*, na análise da taxa de crescimento foi observado alterações nas amostras tratadas com radiação PAR+UVB, onde foi somente de 11% ao dia⁻¹, baixa quando comparada com as amostras de PAR e PAR+UVA+UVB, onde ambas foram de 14% ao dia⁻¹. No entanto, amostras da radiação PAR+UVA apresentaram um aumento significativo na sua TC, 15.3% ao dia⁻¹, indicando ser esta radiação adequada para este período de desenvolvimento. Altamiro *et al.* (2003a) mostraram resultados semelhantes, onde as TC de plântulas foram elevadas apenas no tratamento de radiação UVA. Porém, talo de plantas adultas de *S. cymosum* quando tratadas com radiação UV não mostraram diminuição na TC, indicando que este fator não foi estressante para a planta adulta (Polo *et al.*, 2014). Este aumento na TC em talos de *S. cymosum* pode estar relacionado com a maior quantidade de mitocôndrias que mantém a produção de energia e, a não alteração nos tilacóides dos cloroplastos, o que afetaria a produção fotossintética. Assim, a possível ativação de mecanismos fotoprotetores contribuiu para neutralizador ou minimizar os efeitos nocivos dos raios UV, proporcionando crescimento e maior taxa fotossintética (Polo *et al.*, 2014). No entanto, em algumas algas verdes a radiação UVB afeta o crescimento de plantas adultas, como resultado de efeitos negativos sobre processos metabólicos e nas divisões celulares (Grobe e Murphy, 1998; Altamirano *et al.*, 2000).

Mas quando consideramos a ação direta dos raios ultravioletas em diferentes fases da vida de

um organismo, não podemos extrapolar esses fatos anteriores, de plantas adultas, ao que acontece com os estágios iniciais do ciclo de vida de uma alga. Altamiro *et al.* (2003a) sugerem que a tolerância à RUV depende do estágio de vida das macroalgas pardas, com maior sensibilidade encontrados em estágios microscópicos. Estas diferenças podem ser explicadas pela simplicidade estrutural que facilmente permite a entrada de raios ultravioletas em moléculas celulares altamente sensíveis, justificando as alterações sofridas pelas plântulas de *S. cymosum* neste estudo.

A análise de pigmentos mostrou alterações nas plântulas de *S. cymosum* tratados com radiação UV. As reduções na concentração de clorofila *a* em PAR+UVA poderia estar associada com o maior crescimento nas amostras, e o destino de energia para a síntese de outro composto estrutural, o que provavelmente também ocorreu o tratamento PAR+UVA+UVB. No entanto, em talos adultos de *S. cymosum*, Polo *et al.* (2014), além da redução de clorofila *a*, também encontraram uma redução de clorofila *c* quando tratados com radiação UVA, contrário ao encontrado nas plântulas de *S. cymosum*, onde em todos os tratamento ocorreu aumento na concentração da clorofila *c*. Para o autores, a redução da clorofila *c* pode estar relacionada com um mecanismo de fotoproteção, em que o nível de pigmentos acessórios diminui para aliviar o excesso de energia dirigida para o centro de reação da fotossíntese, impedindo assim, o dano oxidativo do aparelho fotossintético em amostras tratadas. Mas, em talos adultos de *Laminaria ochroleuca* também foi observado, além da diminuição da clorofila *c*, baixos níveis de clorofila *a*, β -caroteno e fucoxantina. Estes resultados sugerem que a fotossíntese é um processo dinâmico, que pode aclimatar-se a variações na intensidade da luz e a qualidade do espectro. Esses mecanismos que podem ter sido envolvidos na aclimação à RUV, incluem o estabelecimento de uma barreira física que protege o aparelho fotossintético contra a radiação prejudicial, ou indução e síntese de fluorotaninos que têm sido usados como filtros UV em algas pardas (Roleda *et al.*, 2004).

Para o conteúdo de carotenóides, foi relatado na literatura que estes compostos têm um papel importante nos danos oxidativos decorrentes de fatores de estresse, como a radiação UV. O presente

estudo não mostrou um aumento significativo do conteúdo de carotenóides nas amostras tratadas com PAR+UVA, PAR+UVB e PAR+UVA+UVB, sendo assim, estas algas podem ter evitado os danos oxidativos, decorrentes à exposição à RUV, através de outras rotas metabólicas. Porém, lantãs adultas de *S. Cymosum*, tratadas com PAR+UVA, mostraram um aumento no teor de carotenóides, sugerindo que o tratamento induziu a produção de carotenóides antioxidantes nas células para a defesa, quando comparado com o tratamento PAR (Polo *et al.*, 2014). Desta forma, podemos inferir que as respostas na mesma espécie depende do estágio de vida.

A exposição à radiação UV induz a produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), proporcionando uma condição de estresse oxidativo em biomoléculas, incluindo lipídios totais de membrana, proteínas, enzimas e DNA (Estevez *et al.*, 2001). Se a acumulação de ROS exceder à capacidade dos sistemas enzimáticos e de antioxidantes não enzimáticos, o aparelho fotossintético será danificado pela destruição de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, conduzindo a apoptose (Sarojini *et al.*, 2012). Sendo assim, a maior produção de carotenóides em plantas sob estresse com radiação UV pode auxiliar no controle do estresse oxidante nas células.

Da mesma forma, a concentração dos compostos fenólicos apresentaram médias semelhantes quando comparados com amostras PAR, um indicativo de que outros mecanismos, contra o excesso de radiação, foram utilizados e com a menor síntese destes compostos. O aumento esperado na produção de compostos fenólicos em todos os tratamentos como uma defesa para evitar os danos provocados pelos raios ultravioleta, não foi observada neste estudo. Porém, a organização do ponto de vista ultraestrutural sofreu alteração com os tratamentos. Esta fragmentação dos fisóides pode funcionar como um mecanismo fotoprotetor. No entanto, a leve redução na concentração de compostos fenólicos presentes no tratamento PAR+UVB pode ser relacionada com uma alteração da via metabólica, ou pode estar relacionado com a alta degradação dos fisóides, o que pode ser observado em MET. Os polifenóis são comumente encontrados em células corticais e meristemáticas de algas pardas, para que eles possam proteger as células da excessiva exposição à

RUV (Figuroa *et al.*, 2009 e Polo *et al.*, 2014). Finalmente, radicais DPPH tiveram a variação mais significativa entre os tratamentos, com baixa produção no tratamento UVB, quando comparada com o controle. Este comportamento pode estar relacionado com a maior capacidade em sintetizar estes compostos para evitar o estresse oxidativo do que outros compostos. Flores-Moya *et al.* (1999) sugeriram que a radiação UVA desempenha um papel importante na fotoinibição e UVB pode ser envolvida em ambas as perdas e recuperação da fotossíntese. UVB não apenas causa efeitos negativos sobre a fotossíntese, como pode até mesmo auxiliar na recuperação de processos de algas adaptadas a ambientes com alta radiação UV em contraste com habitats com menor exposição a radiação UV natural.

Os resultados observados na ML, em plântulas tratadas com RUV, mostraram uma redistribuição dos fisóides em comparação com PAR. Estes fisóides foram direcionados principalmente para as células corticais e às células internas mais próximas da região cortical. Estes dados também foram observadas em MET, onde foi possível observar a intensa degradação e redistribuição dos fisóides, principalmente, através das células corticais. Este padrão de distribuição de compostos fenólicos nas Phaeophyceae, perto das células corticais e paredes celulares, é um forte indício de sua importância para a função de proteção contra a oxidação, sugerindo ser esta uma característica importante responsável pelo sucesso evolutivo do grupo (Abdala-Díaz *et al.*, 2006).

Além dos mecanismos fisiológicos que podem prevenir danos causados pela radiação UV podem-se citar os mecanismos físicos, tais como espessamento da parede celular. A parede celular de células tratadas com RUV mostraram uma pequena espessura em comparação com as amostras de controle. No entanto, em adultos talo de *S. cymosum* ocorreu um espessamento considerável (Polo *et al.*, 2014), confirmando este fenômeno como um fator de defesa física, encontrado com maior expressão, principalmente, em estágios adultos de *S. cymosum*.

Os cloroplastos das plântulas controle de *S. cymosum* mostraram uma estrutura típica das algas pardas, com tilacóides agregadas em bandas de três a três. No entanto, em PAR, células

corticais mostraram uma morfologia diferenciada nos cloroplastos, quando comparados com as células internas. Em células corticais mostraram bandas dos tilacóides dilatadas. O que não foi observado nas células internas, mas organização semelhante ao encontrado em talos adultos (Polo *et al.*, 2014). No entanto, após o tratamento com RUV, as organelas que mais afetadas foram os cloroplastos presentes nas células corticais, principalmente com a degradação das bandas de tilacóides. Estes dados não corroboram com os dados encontrados nos talos adultos de *S. cymosum* (Polo *et al.*, 2014). Mas estão de acordo com Holzinger *et al.* (2011), onde que os cloroplastos do tecido vegetativo da alga parda *Saccharina latissima*, expostas a PAR+UVA+UVB, apresentaram alterações na morfologia, como dobras e dilatações nos cloroplastos.

Como o observado em plântulas de *C. cymosum*, alguns estudos relataram, em algas vermelhas expostas a RUVB alterações ultraestruturais em cloroplastos são comuns, com dilatações, desorganização dos tilacóides e formação de vesículas translúcidas entre os tilacóides. Estas espécies incluem *Kappaphycus alvarezii* (Schmidt *et al.*, 2009; e 2010;), *Gelidium floridanum* (Schmidt *et al.*, 2009 e 2010), *Chondracanthus teedei* (Schmidt *et al.*, 2012), *Hypnea musciformis* (Schmidt *et al.*, 2012) e *Porphyra acanthophora* var. *brasiliensis* (Bouzon *et al.*, 2012).

Já as diferentes organelas, como as mitocôndrias, os corpos de Golgi e o núcleo, nas plântulas de *S. cymosum*, não apresentaram alterações significativas quando tratados com RUV. Assim como, não foram afetadas as relações entre os cloroplastos e mitocôndrias, e entre os corpos de Golgi com o núcleo. Estes resultados também foram encontrados nos adultos de *S. cymosum*, mostrando boa adaptação das plântulas à radiação solar presente no ambiente (Polo *et al.*, 2014).

Com presente estudo conclui-se que as radiações UVA, UVB e associação destas radiações afetam de forma diferentes as plântulas de *S. cymosum*, com alterações nas taxas de crescimento, concentração de pigmentos e morfologia ultraestrutural especialmente nas células corticais. As amostras apresentaram uma interferência maior quando expostos ao UVB do que à radiação UVA, sendo estes espectros os mais nocivos para a morfologia e fisiologia das algas. Desta forma, as

alterações nas condições naturais observadas, especialmente com as variações e aumentando da incidência da radiação UV, poderia afetar o recrutamento de *S. cymosum* em leitos naturais, com mudanças na estrutura da comunidade e redução da abundância da espécie no ambiente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo estabeleceu:

1. Os primeiros relatos sobre os parâmetros celulares envolvidos no processo de desenvolvimento polarizado da alga parda *S. cymosum*.

2. Que na sequência dos eventos iniciais do desenvolvimento desta alga, a fixação do eixo polar ocorre em até 2 a 3 horas após a fecundação na presença de luz, diferindo dos gêneros *Fucus* e *Silvetia*. Assim como, a segunda divisão celular é o evento que determina a formação da célula que dará origem ao rizóide.

3. Que os elementos do citoesqueleto estão envolvidos no processo de desenvolvimento polarizado. Entretanto, para confirmar a participação destes neste processo, se faz necessário à estabilização dos protocolos para imunomarcagem dos microtúbulos e filamentos de actina, a partir dos protocolos existentes para as Fucales do gênero *Fucus* e *Silvetia*.

4. A participação do sistema de endomembranas em *S. cymosum* atua de forma diferente do que foi observado em *Fucus* e *Silvetia*. Em *S. cymosum* o zigoto permanece aderido ao receptáculo, através da mucilagem liberada com a oosfera, até aproximadamente 24 a 30 horas AF, não sendo necessária a adesão ao substrato para iniciar os processos de desenvolvimento.

5. As plântulas de *S. cymosum* apresentaram maior suscetibilidade quando expostas a radiação UVB e UVA, principalmente alterações nas taxas de crescimento. Sendo assim, este fator pode ser considerado como estressor no recrutamento dos estágios jovens nas populações de *S. cymosum*.

Pelo exposto, se fazem necessários estudos mais detalhados sobre os fatores celulares (morfogênese), subcelulares (citoesqueleto e sistema de endomembranas) e bioquímicos envolvidos no processo de desenvolvimento polarizado de *S. cymosum*. Entretanto, com este trabalho, podemos concluir que o padrão de germinação previamente estabelecido para a ordem Fucales, utilizando como modelo os gêneros *Fucus* e *Silvetia*, não se aplica para as espécies do gênero *Sargassum*. Desta forma, podemos inferir que esta ordem apresenta mais de um padrão de embriogênese.

REFERÊNCIAS

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

ALESSA, L.; KROPF, D. L. 1999. F-actin marks the rhizoid pole in living *Pelvetia compressa* zygotes. *Development*, 126: 201-209.

ALLEN, V. W.; KROPF, D. L. 1992. Nuclear rotation and lineage specification in *Pelvetin* embryos. *Development*, 1: 15873-83.

ALTAMIRANO, M.; FLORES-MOYA, A.; CONDE, F.; FIGUEROA, F. L. 2000. Growth seasonality, photosynthetic pigments, and carbon and nitrogen content in relation to environmental factors: a field study of *Ulva olivascens* (Ulvales, Chlorophyta). *Phycologia*, 39: 50–58.

ALTAMIRANO, M.; FLORES-MOYA, A.; KUHLENKAMP, R.; FIGUEROA, F. 2003a. Stage-dependent sensitivity to ultraviolet radiation in zygotes of the brown alga *Fucus serratus*. *Zygote*, 11: 101-106. DOI: 10.1017/S0967199403002132.

ALTAMIRO, M.; FLORES-MOYA, A.; FIGUEROA, F. 2003b. Effects of UV radiation and temperature on growth of germlings of three species of *Fucus* (Phaeophyceae). *Aquatic Botany*, 75: 9-20.

ARNOLD, W.; MITRENGA, D.; MAYERSBACH, H. 1975. Gefriertrocknung und einbsttung in

glycolmethacrylat (GMA) – ergebnisse histochemischer reaktion. *Acta Histochemistry*, 14:271-277.

BARTSCH, I.; WIENCKE, C.; BISCHOF, K.; BUCHHOLZ, C. M.; BUCK, B. H.; EGGERT, A.; FEUERPFEIL, P. 2008. The genus *Laminaria sensulato*: recent insights and developments. *European Journal of Phycology*, 43:1–86.

BELANGER, K. D.; QUATRANO, R. S. 2000. Polarity: the role of localized secretion. *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 67–72.

BERGER, F.; TAYLOR, A.; BROWNLEE, C. 1994. Cell fate determination by the cell wall in early *Fucus* development. *Science*, 263:1421–23.

BISGROVE, S. R.; HENDERSON, D. C.; KROPF, D. L. 2003. Asymmetric division in Fucoid zygotes in positioned by telophase nuclei. *The Plant Cell*, 15: 854-862.

BISGROVE, S. R.; KROPF, D. L. 1998. Alignment of centrosomal and growth axes is a late event during polarization of *Pelvetia compressa* zygotes. *Developmental Biology*, 194: 246–256.

BISGROVE, S. R.; KROPF, D. L. 2001. Asymmetric cell division in fucoid algae: a role for cortical adhesions in alignment of the mitotic apparatus. *Journal Cell Science*, 114: 4319–4328.

BISGROVE, S. R.; KROPF, D. L. 2007. Asymmetric cell divisions: zygotes of fucoid algae as a model system. *Plant Cell Monographs*. DOI: 10.1007/7089_2007_134.

BISGROVE, S. R.; NAGASATO, C.; MOTOMURA, T.; KROPF, D. L. 1997. Immunolocalization

of centrin during fertilization and the first cell cycle in *Fucus distichus* and *Pelvetia compressa* (Fucales, Phaeophyceae). *Journal of Phycology*, 33: 823–829.

BIXLER, H. J.; PORSE, H. 2010. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *Journal Applied Phycology*, 23: 321–335.

BRAWLEY, S. H.; QUATRANO, R. S. 1979. Effects of microtubule inhibitors on pronuclear migration and embryogenesis in *Fucus distichus* (Phaeophyta). *Journal of Phycology*, 15: 266–272.

BRAWLEY, S. H.; ROBINSON, K. R. 1985. Cytochalasin treatment disrupts the endogenous currents associated with cell polarization in furoid zygotes: studies of the role of F-actin in embryogenesis. *Journal Cell Biology*, 100: 1173-1184.

BRAWLEY, S. H.; WETHERBEE, R.; QUATRANO, R. S. 1976. Fine-structural studies of the gametes and embryo of *Fucus vesiculosus* l. (Phaeophyta) H: The cytoplasm of the egg and young zygote. *Journal Cell Science*, 20: 255-271.

BRODSKY, F. M. 1988. Living with clathrin: its role in intracellular membrane traffic. *Science*, 242:1396-1402.

BROWNLEE, C.; BOUGET, F-Y.; CORELLOU, F. 2001. Choosing sides: establishment of polarity in zygotes of furoid algae. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 12: 345–351.

BOUGET, F-Y.; GERTTULA, S.; SHAW, S. L.; QUATRANO, R. S. 1996. Localization of actin mRNA during the establishment of cell polarity and early cell divisions in *Fucus* embryos. *Plant*

Cell, 8: 189–201.

BOUZON, Z.; CHOW, F.; ZITTA, C.; SANTOS, R.; OURIQUES, L.; FELIX, M.; POLO, L. K.; GOUVEIA, C.; MARTINS, R.; LATINI, A.; RAMLOV, F.; MARASCHIN, M.; SCHMIDT, E. 2012. 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 Microana*, 18:1467-1479.

BOUZON, Z. L.; MIGUENS, F.; OLIVEIRA, E. C. 2000. Male gametogenesis in the red algae *Gracilaria* and *Gracilariopsis* (Rhodophyta, Gracilariales). *Cryptogamie Algologie*, 21: 33-47.

BOUZON, Z. L.; OURIQUES, L. C.; OLIVEIRA, E. C. 2006. Spore adhesion and cell wall formation in *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Gelidiales). *Journal Applied Phycology*, 18:287-94.

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

CAI, G.; BARTALESI, A.; DEL CASINO, C.; MOSCATELLI, A.; TIEZZI, A.; CRESTI, M. 1993. The kinesin-immunoreactive homologue from *Nicotiana tabacum* pollen tubes: biochemical properties and subcellular localization. *Planta*, 191: 496–506.

CALLOW, M. E.; EVANS, L.V.; BOLWELL, G. P.; CALLOW, J. A. 1978. Fertilization in brown algae. I. SEM and other observations on *Fucus serratus*. *Journal Cell Science*, 32: 45-54.

CAPITANO, 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*, 203:121-8.

CHAPMAN, A. R. O. 1995. Functional ecology of furoid algae: twenty-three years of progress. *Phycologia*, 34: 1-32.

CHOI, H. G.; LEE, K. H.; YOO, H. I.; KANG, P. J.; KIM, Y. S.; NAM, K. W. 2008. Physiological differences in the growth of *Sargassum horneri* between the germling and adult stages. *Journal Applied Phycology*, 20: 729-735.

COIMBRA, C. S. 1998. Caracterização ecológica das comunidades bentônicas da região entre-marés no costão da Praia do Itaguá, São Paulo. Dissertação (Mestrado), Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica 136p.

COIMBRA, C. 2006. Inferências filogenéticas na ordem Fucales (Phaeophyceae), com ênfase no gênero *Sargassum* C. Agardh do Atlântico Sul. Tese (Doutorado), Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica, São Paulo.

COIMBRA, C. S.; BERCHEZ, F. A. S. 2000. Habitat heterogeneity on tropical rocky shores: a seaweed study in southern Brazil. *Journal of Phycology*, 36 (3): 14.

CORELLOU, F.; BROWNLEE, C.; DETIVAUD, L.; KLOAREG, B.; BOUGET, F-Y. 2001. Cell cycle in the *Fucus* zygote parallels a somatic cell cycle but displays a unique translational regulation of cyclin-dependent kinases. *Plant Cell*, 13: 585–598.

CORELLOU, F.; COELHO, S. M.; BOUGET, F. Y.; BROWNLEE. 2005. Spatial re-organisation of cortical microtubules in vivo during polarisation and asymmetric division of *Fucus* zygotes. *Journal Cell Science*, 118: 2723-2734.

DEYSHER, L.; NORTON, T. A. 1982. Dispersal and colonization of *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, 56: 179-195.

DONALDSON, J.G.; FINAZZI, D.; KLAUSNER, R. D. 1992. Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature*, 360:350-2.

DONALDSON, J. G.; KLAUSNER, R. D. 1994. ARF: a key regulatory switch in membrane traffic and organelle. *Current Opinio in Cell Biology*, 6:527-32.

DRUBIN, D. G.; NELSON, W. J. 1996. Origins of cell polarity. *Cell*, 84: 335-344.

DRUPEE, P.; SHERRIER, D. J. 1998. The plant Golgi apparatus. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1404: 259-270.

DUARTE, C. M. 1995. Submerged aquatic vegetation in relation to different nutrient regimes. *Ophelia*, 41: 87-112.

ESTEVEZ, M.; MALANGA, G.; PUNTARULO, S. 2001. Iron-dependent oxidative stress in *Chlorella vulgaris*. *Plant Science*, 161: 9-17.

ESTON, V. R.; BUSSAB, W. O. 1990. An experimental analysis of ecological dominance in a rocky subtidal macroalgal community. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 136:170-195.

ESTON, V.R.. MIGOTTO, A. E.; OLIVEIRA FILHO, E. C.; RODRIGUES, S. A.; FREITAS, J. C. 1986. Vertical distribution of benthic marine organisms on rocky coasts of the Fernando de Noronha Archipelago (Brazil). *Boletim do Instituto Oceanográfico de São Paulo*, 34:37-53.

FARMER, J. B.; WILLIAMS, J. L. 1898. Contributions to our knowledge of the Fucaceae: their life-history and cytology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 190: 623-645.

FIGUEROA, F. L.; KORBEE, N.; CARRILLO, P.; MEDINA-SANCHES, J. M.; MATA, M.; BONOMI, J. SANCHES-CASTILLO, P. The effects of UV radiation on photosynthesis estimated as chlorophyll fluorescence in *Zygnemopsis decussata* (Chlorophyta) growing in a high mountain lake (Sierra Nevada, Southern Spain). *Journal of Limnology*, 68: 206-216.

FLORES-MOYA, A.; HANELT, D.; FIGUEROA, F.L.; ALTAMIRANO, M.; VIÑEGLA B.; SALLES, S. 1999. Involvement of solar UVB radiation in recovery of inhibited photosynthesis in the brown alga *Dictyota dichotoma* (Hudson) Lamouroux. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 49: 129-135.

FOISSNER, I.; WASTENEYS, G. O. 2000a. Actin in characean internodal cells. In *Actin: A dynamic framework for multiple plant cell functions*. Edited by Staiger, C.; Baluska, D. F.; Volkmann, D.; Barlow, P. 259–274. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

FOISSNER, I.; WASTENEYS, G. O. 2000b. Microtubule disassembly enhances reversible cytochalasin-dependent disruption of actin bundles in characean internodes. *Protoplasma*, 214: 33–44.

FOWLER, J. E. 2000. Cell polarity in algae and vascular plants. IN: *Frontiers in Molecular Biology*, Oxford University Press, New York, 141-180.

FOWLER, J. E.; QUATRANO, R. S. 1995. Cell polarity, assymmetric division, and cell fate determination in brown algal zygotes. *Developmental Biology*, 6: 347-358.

FOWLER, J. E.; QUATRANO, R. S. 1997. Plant cell morphogenesis: plasma membrane interactions with the cytoskeleton and cell wall. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13: 697–743.

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.

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

GHILARDI, N. P.; FUJII, M. T.; ROSSO, S.; HADEL, V. F.; BERCHEZ, F. A. S. 2006. Utilização do método dos povoamentos na caracterização de comunidades bentônicas em trecho do infralitoral consolidado da Enseada das Palmas, Ilha Anchieta, Ubatuba (SP). IN: XI Congresso Brasileiro de Ficologia, Itajaí (SC), resumos p.90.

GOODNER, B.; QUATRANO, R. S. 1993. *Fucus* embryogenesis: a model to study the establishment of polarity. *The Plant Cell*, 5: 1471-1481.

GORDON, E. M.; MCCANDLESS, E. L. 1973. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stack. *Proceedings of Nova Scotia Institute Science*, 27: 11-133.

GROBE, C. W., MURPHY, T. M. 1998. Solar ultraviolet-B radiation effects on growth and pigment composition of the intertidal alga *Ulva expansa* (Setch.) S. and G. (Chlorophyta). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 225: 39-51.

GUO, S.; KEMPHUES, K. J. 1996. A non-muscle myosin required for embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 382: 455-58.

HABLE, W. E.; HART, P. 2010. Signaling mechanisms in the establishment of plant and fucoid algal polarity. *Molecular Reproduction and Development*, 77: 751-758.

HABLE, W. E.; KROPF, D. L. 1998. Roles of secretion and the cytoskeleton in cell adhesion and polarity establishment in *Pelvetia compressa* zygotes. *Development Biology*, 198: 45-56.

HABLE, W. E.; KROPF, D. L. 2000. Sperm entry induces polarity in fucoid zygotes. *Development*, 127: 493-501.

HABLE, W. E.; KROPF, D. L. 2005. The Arp2/3 complex nucleates actin arrays during zygote polarity establishment and growth. *Cell Motility Cytoskeleton*, 61: 9-20.

HABLE, W. E.; MILLER, N. R.; KROPF, D. L. 2003. Polarity establishment requires dynamic actin in furoid zygotes. *Protoplasma*, 221:193–204.

HADLEY, R.; HABLE, W. E.; KROPF, D. L. 2006. Polarization of the endomembrane system is an early event in furoid zygotes development. *Bio Med Central Plant Biology*, 6 (5).

HAWES, C.; SATIAT-JEUNEMAITRE, B. 1996. Stacks of questions: how does the plant Golgi work? *Trends of Plant Science*, 1: 395-401.

HENDERSON, D. C.; KROPF, D. L. 2001. Microtubule arrays in furoid zygotes are sensitive to cytoplasmic pH. *Phycological Research*, 49: 35-41.

HENDERSON, J.; SATIAT-JEUNEMAITRE, B.; NAPIER, R.; HAWES, C. 1994. Brefeldin A-induced disassembly of the Golgi bodies is followed by disruption of the endoplasmic reticulum in plant cells. *Journal Experimental Botany*, 45:1347–51.

HORVITZ, H. R.; HERSKOWITZ, I. 1992. Mechanisms of asymmetric cell division: two Bs or not two Bs, that is the question. *Cell*, 68:237–55

HOLZINGER, A.; ROLEDA, M.; LÜTZ, C. 2009. The vegetative arctic freshwater green alga *Zygnema* is insensitive to experimental UV exposure. *Micron*, 40:831–838.

JAFFE, L. 1968. Localization in the developing *Fucus* egg and the general role of localizing currents. *Advance Morphogenes*, 7: 295-328.

JEFFREY, S. W.; G. F. HUMPHREY. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, cl and c in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemistry Physiology Pfl.*, 167, 191-194 ()

KATSAROS, C.; KARYOPHYLLIS, D.; GALATIS, B. 2006. Cytoskeleton and morphogenesis in brown algae. *Annals of Botany*, 97: 679-693.

KEIDAN, M.; FRIEDLANDER, M.; ARAD, S. M. 2009. Effect of Brefeldin A on cell wall polysaccharide production in the red microalga *Porphyridium* sp. (Rhodophyta) through its effect on the Golgi bodies. *Journal Applied Phycology*, 21: 707–17.

KIM, G. H; KLOTCHKOVA, T. A.; LEE, B-C.; KIM, S. H. 2001. FITC-phalloidin staining of F-actin in *Aglaothamnion oosumiense* and *Griffithsia japonica* (Rhodophyta). *Botanica Marina*, 44: 501-508.

KLAUSNER, R. D.; DONALDSON, J. G; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. 1992. Brefeldin A: Insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *The Journal of Cell Biology*, 116: 1071-1080.

KRISHNAKUMAR, S.; OPPENHEIMER, D. 1999. Extragenic suppressors of the *Arabidopsis* zwi-3 mutation identify new genes that function in trichome branch formation and pollen tube growth. *Development*, 126: 3079–3088.

KROPF, D. 1992. Establishment and expression of cellular polarity in fucoid zygotes.

Microbiological, 56 (2): 316-339.

KROPF, D. L. 1994. Cytoskeletal control of cell polarity in a plant zygote. *Development Biology*, 165: 361–71.

KROPF, D. L. 1997. Induction of polarity in fucoid zygotes. *The Plant Cell*, 9: 1011-1020.

KROPF, D. L.; BISGROVE, S. R.; HABLE, W. E. 1998. Cytoskeletal control of polar growth in plant cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 10: 117–122

KROPF, D. L.; BERGE, S. K.; QUATRANO, R. S. 1989. Actin localization during *Fucus* embryogenesis. *Plant Cell*, 1: 191-200.

KROPF, D. L.; MADDOCK, A.; GARD, D. L. 1990. Microtubule distribution and function in early *Pelvetia* development. *Journal of Cell Science*, 97: 545–552.

KROPF, D. L.; BISGROVE, S. R.; HABLE, W. E. 1999. Establishing a growth axis in fucoid algae. *Trends Plant Science*, 4: 490-494.

KROPF, D. L.; JORDAN, J. R.; ALLEN, V. W.; GIBBON, B. C. 1992. Cellular polarity in *Pelvetia* zygotes: Studies of intracellular pH and division alignment. *Current Top. Plant Biochem. MOI. Biol. Physiol*, 11, 143-1 52.

LANGHANS, M.; FORSTER, S.; HELMCHEN, G.; ROBINSON, D. G. 2011. Differential effects of the brefeldin A analogue (6R)-hydroxy-BFA in tobacco and Arabidopsis. *Journal Experimental*

Botany, 62: 2949-57.

LEE, R. E. 2008. Phycology. 4^a ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

LEVRING, T. 1952. Remarks on the submicroscopical structure of eggs and spermatozoids of *Fucus* and related genera. *Physiology Plantarum*, 5: 528-539.

LIN, C.; YU, S. G.; GUO, D. S.; WEI, Y. X.; AI, G. H. 2006. The antibacterial activity of phlorotannins from *Sargassum thunbergii* O. Kuntze. *Marine Science*, 30: 94–97.

LLOYD, C. W.; PEAROE, K. J.; RAWLINS, D. J.; RIDGE, R. W.; SHAW, P. J. 1987. Endoplasmic microtubules connect the advancing nucleus to the tip of legume root hairs, but F-actin is involved in basipetal migration *Cell Motd. Cytoskeleton*, 8: 27-36.

MADRONICH, S. 1993. UV radiation in the natural and perturbed atmosphere, In *UV-B Radiation and Ozone Depletion*. . Tevini, M. ed. Lewis Publisher, p. 17-69.

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

MASUDA, S.; NAGAO, M.; TAKAHATY, K.; KONOSHI, Y.; GALLYAS, F.; TABIRA, T.; SASAKI, R. 1993. Functional erythropoietin receptor of the cells with neuronal characteristics. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 11208-11216.

MATTIO, L.; PAYRI, C. E. 2010. 190 Years of *Sargassum* taxonomy, facing the advent of DNA phylogenies. *Botany Review*, 77: 31-70. DOI: 10.1007/s12229-010-9060-x.

MAYER, U.; BUTTNER, G.; JURGENS, G. 1993. Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis embryo*: studies on the role of the *gnom* gene. *Development*, 117: 149–62.

MCCULLY, M. E. 1966. Histological studies on the genus *Fucus* I. light microscopy of the mature vegetative plant. *Protoplasma*, 62: 287-305.

MCLACHLAN, J. 1973. Growth media-marine. In *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements* (J.R. Stein, ed.). Cambridge University Press, Cambridge.

MOREJOHN, L. C.; FOSKET, E. D. 1991. The biochemistry of compounds with anti-microtubule activity in plant cells. *Pharmacology and Therapeutics*, 51: 217–30.

MOLLENHAUER, H. H.; MORRÉ, D. J. 1976. Cytochalasin B, but not colchicine, inhibits migration of secretory vesicles in root tips of maize. *Protoplasma*, 87: 39-48.

MONTES, R. C. 2012. Estudo fitoquímico da alga marinha *Sargassum vulgare* var. *nanum* E. De Paula (Sargassaceae) do litoral paraibano. Dissertação de mestrado, UFPB, João Pessoa, Brasil.

MOSS, B.; SHEADER, A. 1973. The effect of light and temperature upon the germination and growth of *Halidrys siliquosa* (L.) Lyngb. (Phaeophyceae, Fucales). *Phycologia*, 12: 63-68.

NAGASATO, C.; MOTOMURA, T.; ICHIMURA, T. 1999. Influence of centriole behavior on the

first spindle formation in zygotes of the brown alga *Fucus distichus* (Fucales, Phaeophyceae). *Developmental Biology*, 208: 200–209.

NAGASATO, C.; MOTOMURA, T. 2004. Influence of the centrosome in cytokinesis of brown algae: polyspermic zygotes of *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, Phaeophyceae). *Journal of Cell Science*, 115: 2541– 2548.

NELSON, D. R.; JAFFE L. F. 1973. Cells without cytoplasmic movements respond to cytochalasin. *Developmental Biology*, 30: 206-208. Novotny

NORTON, T. A.; FETTER, R. 1981. The settlement of *Sargassum muticum* propagules in stationary and flowing water. *Journal of the Marine Biological Association UK*, 61: 929-940.

NOVOTNY, A. M.; FORMAN, M. 1974. The relationship between changes in cell wall composition and the establishment of polarity in *Fucus* embryos. *Developmental Biology*, 40: 162–73.

NUCCITELLI, R. 1978. Ooplasmic segregation and secretion in *Pelvetia* egg is accompanied by the membrane-generated electrical current. *Developmental Biology*, 62:13–33.

OLIVEIRA, E. C. 1997. Algas Marinhas: um recurso ainda pouco explotado pelo Brasil. *Panorama da Aqüicultura*, 7: 24–26.

OLIVEIRA, E. C. 2003. *Introdução à biologia vegetal*. 2^a ed. EDUSP, São Paulo, SP, Brasil.

OLIVEIRA FILHO, E. C.; PAULA, E. J. 1979. Potentiality for algin production in the São Paulo (Brazil) littoral region. In: IX th International Seaweed Symposium. JENSEN, A.; STEIN, J. R.(Eds.) Princeton. pp. 479- 486.

OKUNO, E.; NAKAKIMA, T.; YOSHIMURA, E. M.; HIODO, F.; FAUSTO, A. M. F.; PAES, W. S.; UMISED, N. K.; OTSUBO, S. 1996. Radiação ultravioleta solar em S. Paulo, Chiba, Calafeta e Ilha de Pascoa. RBE-Cuaderno de Engenharia Biomedica, 12: 143-153.

OURIQUES, L. C.; BOUZON, Z. L. 2008. Organização estrutural e ultra-estrutural das células vegetativas e da estrutura plurilocular de *Hinckesia mitchelliae* (Harvey) P. C. Silva (Ectocarpales, Phaeophyceae). Rodriguésia, 54: 673-685.

PAULA, E. J. 1984. Estudos experimentais de cultivo e hibridação em *Sargassum* (Phaeophyta, Fucales) em condições de laboratório. Dissertation, University of São Paulo.

PAULA, E. J. 1989. Zonação nos costões rochosos: região entre- marés. In Anais do 1º Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul-Sudeste Brasileira: síntese dos conhecimentos. Academia de Ciências do Estado de São Paulo, São Paulo, 1: 266-288.

PAULA, E. J.; ESTON, V. R., 1987. Are there other *Sargassum* species potentially as invasive as *S. muticum*? *Botanica Marina*, 30, 405-410.

PANG, S. J; GAO, S. Q.; SUN, J. Z. 2006. Cultivation of the brown alga *Hizikia fusiformis* (Harvey) Okamura: controlled fertilization and early development of seedlings in raceway tanks in

ambient light and temperature. *Journal Applied Phycology*, 18:723–731.

PENNIMAN, C. A.; MATHIESON, A. C.; PENNIMAN, C. E. 1986. Reproductive phenology and growth of *Gracilaria tikvahiae* McLachlan (Gigartinales, Rhodophyta) in the Great Bay Estuary, New Hampshire. *Botanica Marina*, 24: 147– 154.

PETERS, N. T.; KROPF, D. L. 2010. Asymmetric microtubule arrays organize the endoplasmic reticulum during polarity establishment in the brown alga *Silvetia compressa*. *Cytoskeleton*, 67: 102–111.

POLLOCK, E. G. 1970. Fertilization in *Fucus*. *Planta*, 93: 85-99.

POLO, L.; FELIX, M.; KREUSCH, M.; PEREIRA, D.; COSTA, G.; SIMIONI, C.; CHOW, F.; RAMLOV, F.; MARASCHIN, M.; OURIQUES, L.; BOUZON, Z.; SCHMIDT, E. 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: 560-573.

QUATRANO, R. S. 1968. Rhizoid formation in *Fucus* zygotes: Dependente on protein and ribonucleic acid syntheses. *Science*, 162: 468-470.

QUATRANO, R. S. 1973. Separation of processes associated with differentiation of two-celled *Fucus* embryos. *Development Biology*, 30: 209-213.

QUATRANO, R. S. 1978. Development of cell polarity. *Annual Review Plant Physiology*, 29: 487-

510.

QUATRANO, R. S.; GRLFFLNG, L. R.; HUBER-WALCHLL, V.; DOUBET, S. 1985. Cytological and biochemical requirements for the establish- ment of a polar cell. *Journal Cell Science*, 2: 129-141.

QUATRANO, R. S. 1990. Polar axis fixation and cytoplasmic localization in *Fucus*. In *Genetics of Pattern Formation and Growth Control*. A. Mahowald, New York.

QUATRANO, R. S.; BRIAN, L.; ALDRIDGE, J.; SCHULTZ, T. 1991. Polar axis fixation in *Fucus* zygotes: components of the cytoskeleton and extracellular matrix. *Development Supplement*, 1: 11-16.

QUATRANO, R. S.; SHAW, S. L. 1997. Role of the cell wall in the determination of cell polarity and the plane of cell division in *Fucus* embryos. *Plant Science*, 2 (1):15-21.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. 2001. *Biologia Vegetal*. 6^a ed. Coordenação de Tradução J. E. Kraus. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

REVIERS, B. 2006. *Biologia e filogenia das algas*. 1^a ed. Artmed, São Paulo, SP. Brasil

RIVIERA, M.; SCROSATI, R. 2006. Population dynamics of *Sargassum lapazeanum* (Fucales, Phaeophyta) from the Gulf of California, Mexico. *Phycologia*, 45 (2): 178-189.

RITZENTHALER, C.; NEBENFÜHR, A.; MOVAFEGHI, A.; STUSSI-GARAUD, C.; BEHNIA,

L.; PIMPL, P.; STAEHELIN, L. A.; ROBINSON, D. G. 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. *Plant Cell*, 14:237-61.

ROBINSON, D.G.; LANGHANS, M.; SAINT-JORE-DUPAS, C.; HAWES, C. 2008. BFA effects are tissue and not just plant specific. *Trends in Plant Science*, 13:405-8.

ROBINSON, K. R.; WOZNIAK, M.; PU, R.; MESSERLI, M. 1999. Symmetry breaking in the zygotes of the furoid algae: controversies and recent progress. *Current Topics in Developmental Biology*, 44: 101–125.

ROLEDA, M. Y.; VAN DE POLL, W. H.; WIENCKE, C.; HANELT, D. 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 Science*, 281: 37–50.

ROLEDA, M. Y.; WIENCKE, C.; HANELT, D.; BISCHOF, K. 2007 Sensitivity of the early life stages of macroalgae from the northern hemisphere to ultraviolet radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 83:851–862.

RUAN, J. H.; XU, L. G. 2001. A preliminary study on the reproductive and development biology of *Sargassum fusiforme* (Harvs) Setch. *Journal Zhejiang University Science Edn.*, 28: 315–320.

SAMUELS, A. L.; GIDDINGS, T. H.; STAEHELIN, L. A. 1995. Cytokinesis in tobacco BY-2 and root tip cells: a new model of cell plate formation in higher plants. *Journal of Cell Biology*,

130:1345–57.

SAROJINI, N.; MANJARI, S.; KANTI, C. 2012. Phytochemical screening and antibacterial activity study of *Saraca indica* leaves extracts. *International Research Journal of Pharmacy*, 2:176-179.

SCHINDLER, T.; BERGFELD, R.; HOHL, M.; SCHOPFER, P. 1994. Inhibition of Golgi-bodies function by brefeldin A in maize coleoptiles and its consequences on auxin-mediated growth, cell-wall extensibility and secretion of cell-wall proteins. *Planta*, 192:404-13.

SCHMIDT, E.; SCARIOT, L. ROVER, T.; BOUZON, Z. 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, E.; DOS SANTOS, R.; HORTA, P. 2010. Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales): Changes in cell organization, growth and photosynthetic performance. *Micron*, 41:919-930.

SCHMIDT, E.; MARASCHIN, M.; BOUZON, Z. 2010. Effects of UVB radiation on the carragenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales): changes in ultrastructure, growth, and photosynthetic pigments. *Hydrobiology*, 649:171-182.

SCHMIDT, E.; PEREIRA, B.; SANTOS, R.; GOUVEIA, C.; COSTA, G.; FARIA, G.; SCHERNER, F.; HORTA, P.; PAULA, M.; RAMLOV, F.; MARASCHIN, M.; BOUZON, Z. 2012.

Responses of the macroalgae *Hypnea musciformis* after in vitro exposure to UV-B. *Aquatic Botany*, 100: 8-17.

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

SCHMIDT, E.; SANTOS, R.; FAVERI, C.; HORTA, P.; PAULA, M.; LATINI, A.; RAMLOV, F.; MARASCHIN, M.; BOUZON, Z. L. 2012. Response of the agarophyte *Gelidium floridanum* after in vitro exposure to ultraviolet radiation B: changes in ultrastructure, pigments, and antioxidant systems. *Journal Applied Phycology*, 24:1341–1352.

SCHNEPF, E. 1986. Cell polarity. *Annual Review of Plant Physiology*, 37: 23-47.

SCHOENWAELDER, M. E. A.; CLAYTON, M. N. 1998a. The secretion of phenolic compounds following fertilization in *Acrocarpia paniculata* (Fucales, Phaeophyta). *Phycologia*, 37: 40-46.

SCHOENWAELDER, M. E. A.; CLAYTON, M. N. 1998b. Secretion of the phenolic substances into the zygote wall and cell plate in embryos of *Hormosira* and *Agrocarpia* (Fucales, Phaeophyceae). *Journal of Phycology*, 34: 969-980.

SCHOENWAELDER, M. E. A.; CLAYTON, M. N. 1999. The presence of phenolic compounds in isolated cell walls of brown algae. *Phycologia*, 38: 161-166.

SCHOENWAELDER, M. E. A. 2002. The occurrence and cellular significance of physodes in brown algae. *Phycologia*, 41: 125-139.

SCHOENWAELDER, M. E. A.; WIENCKE, C.; CLAYTON, M. N.; GLOMBITZA, K. W. 2003. The effect of elevated UV radiation on *Fucus* spp. (Fucales, Phaeophyta) zygote and embryo development. *Plant Biology*, 5: 366–377.

SHAW, S. L.; QUATRANO, R. S. 1996. The role of targeted secretion in the establishment of cell polarity and the orientation of the division plane in *Fucus* zygotes. *Development*, 122: 2623-2630.

SHEADER, A.; MOSS, B. 1975. Effects of light and temperature on germination and growth of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. *Estuarine Coastal Marine Science*, 3: 125-32

SIMIONI, C.; ROVER, T.; SCHMIDT, E. C.; FELIX, M. R. L.; POLO, L. K.; SANTOS, R. W.; COSTA, G. B.; KREUSCH, M.; PEREIRA, D. T.; OURIQUES, L. C.; BOUZON, Z. L. 2014. Effects of brefeldin A on the endomembrane system and germ tube formation of the tetraspore of *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Florideophyceae). *Journal of Phycology*, 50 (3): 577-587.

STEN, H. 2004. Effects of reduce salinity on reproduction and germling development in *Sargassum muticum* (Phaeophyceae, Fucales). *European Journal Phycology*, 39: 293-299.

SZÉCHY, M. T. M.; PAULA, É. J. 2000. Padrões estruturais quantitativos de bancos de *Sargassum* (Phaeophyta, Fucales) do litoral dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 23(2): 121-132.

SZÉCHY, M. T. M.; GALLIEZ, M.; MARCONI, M. 2006. Quantitative variables applied to

phenological studies of *Sargassum vulgare* C. Agardh (Phaeophyta-Fucales) from Ilha Grande Bay, State of Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Botânica*, 29 (1): 27- 37.

TANCHAK, M. A.; GRIFFING, L. R.; MERSEY, B. G.; FOWKE, L. C. 1984. Endocytosis of cationized ferritin by coated vesicles of soybean protoplasts. *Planta*, 162:481-486.

THOMAS, P. C.; SUBBARAMAIAH, K. 1991. Studies on shedding of tetraspores in *Gracilaria edulis* (Gmel.) Silva. *Phykos*, 29: 141–147.

TIEZZI, A.; MOSCATELLI, A.; CAI, G.; BARTALESI, A.; CRESTI, M. 1992. An immunoreactive homolog of mammalian kinesin in *Nicotiana tabacum* pollen tubes. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 21:132–137.

TRONO, JR. G. C.; LLUISMA, A. O. 1990. Seasonality of standing crop of a *Sargassum* (Fucales, Phaeophyta) bed in Bolinao, Pangasinan, Philippines. *Hydrobiology*, 204:,331-338.

TSEKOS, I. 1999. The sites of cellulose synthesis in algae: diversity and evolution of cellulose-synthesizing complexes. *Journal of Phycology*, 35: 635–655.

TSEKOS, I.; OROLOGAS, N.; DIMOPOULOU, A. 2007. Effect of brefeldin A on the structure and function of the Golgi bodies in the marine red algae. *Journal Biological Research*, 7:29-39.

UCHIDA, T. 1993. The live cycle of *Sargassum horneri* (Phaeophyta) in laboratory culture. *Journal of Phycology*, 29 (2): 231-235.

VELOZO, A. P. A.; SZÉCHY, M. T. M. 2008. Variações espaciais e temporais no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da macroalga *Sargassum* C. Agardh (Fucales, Phaeophyceae) – síntese do conhecimento. *Oecologia Brasiliensis*, 12 (2): 275-290.

VOLESKY, B.; WEBER, J.; PARK, J.M. 2003. Continuous-flow metal biosorption in a regenerable *Sargassum column*. *Water Research*, 37: 297–306,

WAGNER, V.; BRIAN, L.; QUATRANO, R. 1992. Role of a vitronectin-like molecule in embryo adhesion of the brown alga *Fucus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 3644-3648.

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: 1692–703.

WATERMAN, P.; MOLE, S. 1994. Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Great Britain.

WIENCKE, C.; GÓMEZ, I.; PAKKER, H.; FLORES-MOYA, A.; ALTAMIRANO, M.; HANELT, D.; BISCHOF, K.; FIGUEROA, F.-L. 2000. Impact of UV radiation on viability, photosynthetic characteristics and DNA of brown algal zoospores: implications for depth zonation. *Marine Ecology Progress Series*, 197: 217–229.

WILLIAMS, A.; FEAGIN, R. 2010. *Sargassum* as a natural solution to enhance dune plant growth. *Environmental Management*, 46: 783-747.

YAKOVLEVA, I. M.; DRING, M.; TITLYANOV, E. A. 1998. Tolerance of North Sea algae to UV and visible radiation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 45: 45–54.

YANG, J.; VOLESKY, B. 1999. Biosorption of uranium on *Sargassum* biomass. *Water Research*, 33: 3357-3363.

YAN, X.; ZHANG, J. 2014. Embryology of zygote and development of germling in *Sargassum vachellianum* Greville (Fucales, Phaeophyta). *Journal Applied Phycology*, 26: 577-585. DOI. 10.1007/s10811-013-0102-8

ZHAO, Z.; ZHAO, F.; YAO, J.; LU, J.; ANG JR, P. O.; DUAN, D. 2008. Early development of germlings of *Sargassum thumbergii* (Fucales, Phaeophyta) under laboratory conditions. *Journal Applied Phycology*, 20: 925-931.