

Fernanda Bouvie

EFEITOS DO CÁLCIO
EXTRACELULAR NA GERMINAÇÃO
DE TETRÁSPOROS DE *GELIDIUM*
FLORIDANUM

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do Grau de Mestre em
Biologia Celular e do
Desenvolvimento
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Zenilda
Laurita Bouzon
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Carmen
Simioni

Florianópolis
2018

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

Bouvie, Fernanda

EFEITOS DO CÁLCIO EXTRACELULAR NA GERMINAÇÃO DE
TETRÁSPOROS DE GELIDIUM FLORIDANUM / Fernanda

Bouvie ; orientadora, Zenilda Bouzon,
coorientadora, Carmen Simioni, 2018.

84 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2.
Gelidium floridanum. 3. Cálcio. 4. Germinação. 5.
Tetrásporos. I. Bouzon, Zenilda. II. Simioni,
Carmen. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

"Efeitos do cálcio extracelular na germinação de tetrásporos de *Gelidium floridanum*"

Por

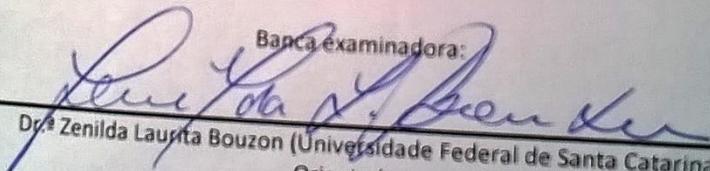
Fernanda Bouvie

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (29/PPGBCD/2017) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC.



Prof. Dr. Geison de Souza Izídio
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Banca examinadora:



Dr.ª Zenilda Laurita Bouzon (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientadora



Dr.ª Leila Hayashi (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.ª Claudia Beatriz Nedel Mendes de Agu (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 26 de fevereiro de 2018.

Eu não conheço metade de vocês como gostaria; e gosto de menos da metade de vocês a metade do que vocês merecem. (...) Sinto informá-los de que, o FIM chegou. Estou indo embora. JÁ. ADEUS!

Bilbo Bolseiro em Senhor dos Anéis, J. R. R. Tolkien

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Zenilda, pelos *brainstorms* na hora do cafezinho, pelo seu apoio e compreensão durante todo o trabalho. A senhora me fez querer ser um pouco como você, em todas as vezes que nos víamos. Muito obrigada, dificilmente te esquecerei!

À minha coorientadora, Carmen, a nossa querida mãe acadêmica, por me ensinar muito além do *Gelidium*, por compreender que a saúde mental sempre vem primeiro. Por entender e me ensinar que todos trabalham de maneiras e ritmos diferentes. Por me fazer respirar, porque no final, tudo passa né?

À minha família e seu incontestável apoio, amor bruto que morde, assopra e enche de beijos. Meu pai sempre pronto para carregar todos nós no colo, se um de nós cair, não precisamos nos preocupar porque nunca tocaremos o chão. Minha mãe, a mulher da minha vida, forte e sensível, o colo saudoso que tem reparação imediata, onde nos guarda e protege. Meu irmão, meu melhor amigo, meu quase gêmeo, é a razão e emoção, tudo junto, ele levanta a cabeça e nos leva junto aonde quer que vá. Obrigada por se preocuparem comigo e com o *Gelidium*. Eu sempre vou amar vocês como todo o meu coração.

Ao Fidel e ao seu coração enorme e bem guardado, por me ajudar nas coletas e me apoiar ao longo do mestrado deixando tudo um pouco mais leve. Obrigada, te amo! À Paola por vibrar comigo em cada conquista e pela ajuda na parte estatística. Tu és a minha irmã, te amo!

Aos meus colegas do LABCEV, sem a ajuda de vocês eu não teria conseguido, obrigada por me ensinarem a trabalhar em equipe, vocês são ótimas companhias para trabalhar e tomar café! A todos que de alguma forma ajudaram e contribuíram com esse trabalho, nada se faz sozinho!

À vida, ao *Gelidium*, aos tropeços e erros.

RESUMO

As macroalgas são de grande importância para os sistemas aquáticos, sendo produtores primários para elos subsequentes da cadeia trófica aquática e terrestre. Entretanto, poucos trabalhos tratam dos mecanismos secundários de ação do íon cálcio sobre a germinação de tetrásporos de algas vermelhas e as consequências da supressão do mesmo no meio. Fatores ambientais e antrópicos podem ter por consequência o aumento de agentes que interagem com o íon, diminuindo sua biodisponibilidade no meio, impedindo um correto influxo. O presente trabalho investigou os efeitos do bloqueador de cálcio EGTA, do ionóforo A23187, da adição de cálcio, da interação entre o ionóforo A23187 e cloreto de cálcio (CaCl_2) e do metal lantânio sobre a germinação de tetrásporos da macroalga vermelha *Gelidium floridanum*. Após os tetrásporos serem cultivados com os tratamentos EGTA, CaCl_2 e A23187, foram realizadas análises de taxa de adesão e germinação e morfologia através da microscopia de luz (ML), análise dos filamentos de actina e parede celular através microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) e análise da ultraestrutura com a microscopia eletrônica de transmissão (MET). No cultivo com cloreto de lantânio (LaCl_3) foram feitas análises de taxas de germinação, ML e MET, pigmentos fotossintetizantes e espécies reativas de oxigênio. Os tetrásporos não germinaram e reduziram a adesão quando tratados com EGTA, porém quando tratados com CaCl_2 , foi observado uma maior taxa de germinação e aceleração desse processo, indicando a dependência do cálcio na adesão e germinação. Os tetrásporos tratados com EGTA não apresentaram formação de parede celular nem polarização dos filamentos de actina, resultados contrários aos observados no tratamento de CaCl_2 . Pela MET, alterações na parede celular e citoplasma com aumento de vesículas foram observadas nos tratamentos EGTA, A23187, A23187 com CaCl_2 , indicando problemas na homeostase de cálcio intracelular e a supressão do mesmo nas organelas. Quando tratados com LaCl_3 os tetrásporos não germinaram e foram observados com o citoplasma rosáceo, indicando possível dano aos cloroplastos e extravasamento de pigmentos corroborando os dados da análise ultraestrutural e queda na quantificação dos pigmentos acessórios. Os cloroplastos estavam danificados e com tilacóides rompidos. A análise das EROs mostrou um aumento frente ao tratamento, indicando um dano oxidativo

causado pelo metal no tetráspero. Os resultados obtidos indicam que o papel do Ca^{2+} é essencial como mensageiro secundário na cascata de eventos que precedem a germinação.

Palavras-chave: Cálcio, Germinação, EGTA, *Gelidium floridanum*, Cloreto de lantânio, Tetrásperos

ABSTRACT

The seaweed has great importance in aquatic systems, being primary producers for subsequent links of the aquatic and terrestrial trophic chain. However, few studies deal with the secondary mechanisms of calcium ion action on tetraspores germination of red algae and the consequences of its suppression in the environment. Environmental and anthropic factors may result in increasing of agents that interact with the ion, reducing its bioavailability in the environment, restraining a correct influx. The present work investigated the effects of the calcium-chelator EGTA, ionophore A23187, calcium chloride CaCl_2 and the metal lanthanum LaCl_3 on tetraspores of red macroalga *Gelidium floridanum*. After tetraspores were cultured with EGTA, CaCl_2 and A23187 analyses of adhesion and germination rate were performed, together with observations of morphology with light microscopy and the arrangement of actin filaments and cell wall with laser scanning confocal microscopy in EGTA and CaCl_2 treatments. Observations of the ultrastructure were done with the transmission electronic microscopy. In the tetraspores cultivated with LaCl_3 germination rates and morphology were analysed with light microscopy, as well as observation of the ultrastructure with TEM and quantification of photosynthetic pigments and reactive oxygen species. Tetraspores did not germinate and reduced adhesion when treated with EGTA. On the other hand, when treated with CaCl_2 , a higher rate of germination and acceleration of this process was observed, indicating the calcium dependency in adhesion and germination. Tetraspores treated with EGTA showed no cell wall formation or polarization of the actin filaments, in contrary to that observed in the treatment of CaCl_2 . Abnormalities were observed in the ultrastructure with the treatments EGTA, A23187, A23187 and CaCl_2 , indicating problems in the intracellular calcium homeostasis and suppression thereof in the organelles. When treated with LaCl_3 , tetraspores did not germinate and a rosaceous cytoplasm were observed, indicating possible damage in chloroplasts and the extravasation of pigments corroborating ultrastructural analysis data. Chloroplasts were damaged and with broken thylakoids, moreover, in the analysis of the pigment rates, there was a decreasing when compared to the control. The analysis of ROS showed an increasing in treatment, indicating oxidative damage caused by the metal in the tetraspore. The results indicate that the role of calcium is essential as

a secondary messenger in the cascade of events that precede germination.

Keywords: Calcium, Germination, EGTA, *Gelidium floridanum*, Lanthanum chloride, Tetraspores

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo do ciclo de vida trifásico e isomórfico de <i>G. floridanum</i>	4
Figura 2: Taxa de adesão de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> após 6 horas de cultivo	15
Figura 3: Micrografia de luz de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> após 6 horas de cultivo.	18
Figura 4: Microscopia confocal de varredura a laser de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> após 6 horas de cultivo.....	20
Figura 5: Micrografia eletrônica de transmissão de tetrásporos controle de <i>G. floridanum</i> após 6 horas de cultivo.	23
Figura 6: Micrografia eletrônica de transmissão de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> tratados com EGTA 1 mM após 6 horas de cultivo.	24
Figura 7: Micrografia eletrônica de transmissão de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> tratados com CaCl ₂ 2 mM após 6 horas de cultivo.....	25
Figura 8: Micrografia eletrônica de transmissão de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> tratados com A23187 1 μM após 6 horas de cultivo.	26
Figura 9: Micrografia eletrônica de transmissão de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> tratados com A23187 1 μM e CaCl ₂ 2 mM após 6 horas de cultivo.	27
Figura 10: Micrografia de luz de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> após 6 horas de cultivo.....	37
Figura 11: Micrografia eletrônica de transmissão do controle de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> após 6 horas de cultivo.....	39
Figura 12: Micrografia eletrônica de transmissão de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> tratados com LaCl ₃ 2 mM após 6 horas de cultivo.	41
Figura 13: Micrografia eletrônica de transmissão de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> tratados com LaCl ₃ 8 mM após 6 horas de cultivo.....	43
Figura 14: Concentração de clorofila <i>a</i> de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> após 6 horas de cultivo.	45
Figura 15: Concentração de Alococianina de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> após 6 horas de cultivo.....	46
Figura 16: Concentração de Ficocianina de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> após 6 horas de cultivo	47
Figura 17: Concentração de Ficoeritrina de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> após 6 horas de cultivo.	47
Figura 18: Microscopia a laser confocal de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> após 6 horas de cultivo com marcador DCFH-DA.....	49

Figura 19: Porcentagem de fluorescência do DCF em tetrásporos de *G. floridanum* após 6 horas de cultivo sob influência de três concentrações de LaCl_3 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Contagem de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> após 6 horas de cultivo, sendo classificados de acordo com a morfologia.....	17
Tabela 02: Efeitos dos tratamentos na germinação <i>G. floridanum</i> após 6 horas de cultivo.	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- μM , Micromolar
ANOVA, Análise de variância fatorial
APC, Alofocianina
C, cloroplasto
 Ca^{2+} , Íon cálcio
 CaCl_2 , Cloreto de cálcio
cm, Centímetro
CW, Parede celular
DCF, 2',7'-diclorofluoresceína fluorescente
DCFH-DA, 2',7'-diclorodihidro fluoresceína diacetato
DMSO, Dimetil sulfóxido
DP, desvio padrão
EGTA, Ácido etileno glicol-bis (b-amino-etil-eter) N,N,N',N'-tetra-acético
EROs, Espécies reativas de oxigênio
F-actina, Filamentos de actina
Fig., Figura
G, corpos de Golgi
 H_2O_2 , Peróxido de hidrogênio
 La^{3+} , Íon lantânio
LABCEV, Laboratório de célula vegetal
 LaCl_3 , Cloreto de lantânio
LCME, Laboratório central de microscopia eletrônica
M, Mitocôndria
M, Molar
MCVL, Microscópio Confocal de Varredura a Laser
MET, Microscopia eletrônica de transmissão
Mg, Miligrama
 Mg^{2+} , Íons de magnésio
Min, Minuto
ML, Microscopia de luz
mL, Mililitro
mM, Micromolar
 Mn^{2+} , Íons de manganês
N, Núcleo
PC, Ficocianina
PE, Ficoeritrina

rpm, Rotações por minuto
S, Amido das florídeas
ups, Unidade padrão de salinidade
 μ L, Microlitro

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XIII
SUMÁRIO	XV
INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Macroalgas	1
1.2 <i>Gelidium floridanum</i> W.R. Taylor (1943)	1
1.2.1 Ciclo de vida de <i>G. floridanum</i>	2
1.2.2 Germinação de esporos de <i>G. floridanum</i>	4
1.3 Importância do cálcio na germinação de esporos	6
2. Objetivos	8
2.1 Objetivo Geral	8
2.2 Objetivos Específicos	8
CAPÍTULO I: EFEITO DO EGTA, IONÓFORO A23187 E ADIÇÃO DE CÁLCIO EXTRACELULAR NA GERMINAÇÃO DOS TETRÁSPOROS DE <i>GELIDIUM FLORIDANUM</i>	9
1. Introdução	9
2. Material e Métodos	10
2.1 Material algal e quantificação do cálcio na água do mar	10
2.2 Tratamentos	11
2.3 Análise da morfologia, adesão e processos de germinação	12
2.4 Análise em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (MCVL)	12
2.5 Análise em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	13
2.6 Análise Estatística	13

3. Resultados	14
3.1 Adesão dos tetrásporos	14
3.2 Morfologia e taxa de germinação	15
3.3 Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL)	19
3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	21
4. Discussão	28
CAPÍTULO II: EFEITO DO CLORETO DE LANTÂNIO NA GERMINAÇÃO DE TETRÁSPOROS DE <i>GELIDIUM FLORIDANUM</i>	
	30
1. Introdução	30
2. Materiais e Métodos	33
2.1 Algas e Germinação	33
2.2 Desenho experimental	33
2.3 Tratamentos com Cloreto de Lantânio	33
2.4 Análise da morfologia e processos de germinação	33
2.5 Análise em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	34
2.6 Análise dos Pigmentos Fotossintéticos	34
2.7 Análise das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	34
2.8 Análise Estatística	35
3. Resultados	35
3.1 Morfologia e Taxa de Germinação	35
3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	37
3.3 Pigmentos Fotossintetizantes	44
3.4 Espécies Reativas de Oxigênio	48
4. Discussão	50
CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
REFERÊNCIAS	55

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Macroalgas

As macroalgas são organismos que estão presentes nos mais variados ambientes, do habitat marinho ao terrestre, com algumas espécies epífitas (SAHOO & BAWEJA, 2015). São de grande importância nos ambientes marinhos por serem os produtores primários dos oceanos, compõem a biomassa e determinam a produtividade primária para os demais elos da cadeia trófica (NORTON *et al.*, 1996). A organização do talo e a cor, são respostadas características à natividade desses organismos à ambientes de condições adversas. Há estudos desde a década de 70 relatando a diversidade nas características morfológicas celulares das macroalgas. Características como morfologia, aparato fotossintético e ciclos de vida, são alguns dos padrões que classificam os indivíduos pertencentes às divisões Clorofita, Rodófito e Feófito (MAYANGLAMBAM & SAHOO, 2015).

Estes organismos apresentam alto valor econômico devido aos polissacarídeos encontrados na parede celular como o ágar, carragenana e alginatos (SAHOO AND YARISH, 2005). Sendo esses mundialmente usados na indústria alimentícia, cosmetológica, farmacológicas e na biotecnologia. Pela alta rentabilidade desses compostos, há um aumento próximo de 7,4 % no cultivo anual de algas, gerando um lucro de até US\$ 5,7 bilhões no ano de 2010 nos Estados Unidos (FAO, 2012).

Atualmente cerca de 221 espécies de algas são utilizadas comercialmente, sendo que dessas, 110 espécies para a produção e extração de ficocolóides da parede celular. Dentro das algas vermelhas, a família Gelidiaceae incluem algumas das espécies de algas produtoras de ágar mais importantes do mundo.

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

Os membros da família Gelidiaceae são distribuídos de forma ampla entre zonas entre-marés e sub-marés, tem ocorrência na maioria dos oceanos e são observadas em localidades com águas quentes e frias com exceção de ambientes polares (BOO *et al.*, 2014) estando presentes

ao longo da costa brasileira, do estado do Espírito Santo ao Rio Grande do Sul (GUIMARÃES, 2014).

No presente trabalho destacamos a espécie *G. floridanum*, pertencente à ordem Gelidiales, da família Gelidiaceae. Esta espécie é caracterizada pela presença de um talo com coloração vermelho vináceo com eixo principal evidente e ramificado (TAYLOR, 1997). Apresenta um crescimento apical com os ramos laterais tendo origem no eixo central que se ramificam e constituem uma região cortical de células pequenas (JOLY, 1965). Seu crescimento é dificilmente isolado, sendo encontrados formando tufos fortemente fixados ao substrato por apressórios especializados, podendo medir entre 6,0 a 15,0 cm de altura. Os talos tetrasporangiais e cistocárpicos apresentam uma maior ramificação quando comparados a talos vegetativos (IHA, 2014).

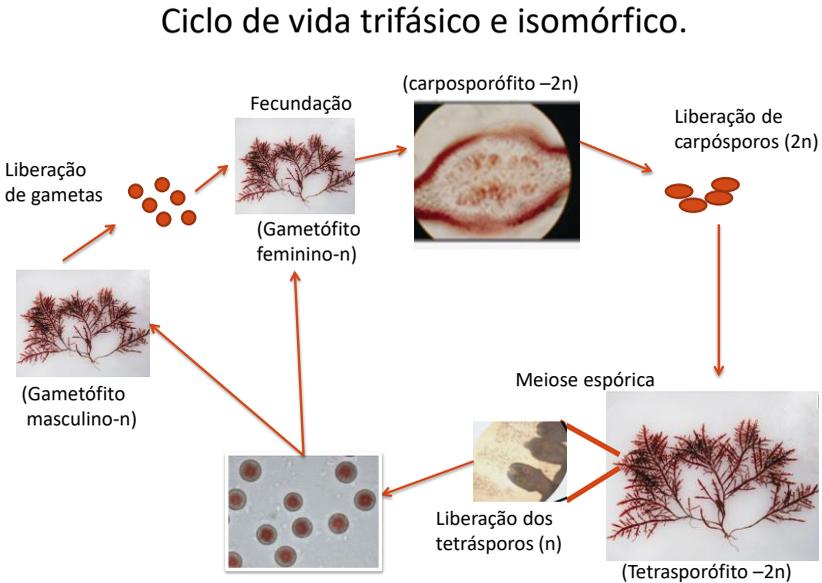
Esta espécie apresenta na parede celular o polissacarídeo coloidal ágar, com função biológica análoga a hemicelulose em plantas terrestres (LEE *et al.*, 2017). Devido ao seu habitat, o ágar confere uma maior flexibilidade e proteção, permitindo que o talo suporte ondas e correntezas marítimas (RAMAWAT & MERILLON, 2015). Além de conferir proteção contra ações mecânicas, o ágar presente na parede celular de algas vermelhas, concede uma maior proteção contra patógenos (LAHAYE & ROCHAS, 1991), ajuda na manutenção do equilíbrio iônico celular (DENIAUD-BOUËT *et al.*, 2014), na proteção contra dissecação e extremos de salinidade, pH e temperatura (CHOJNACKA & KIM, 2015). Este ficocolóide, por suas propriedades químicas, torna-se atrativo do ponto de vista econômico, podendo ser empregados na indústria alimentícia, como estabilizantes e emulsificantes na fabricação de balas, merengues, comidas congeladas; na área da microbiologia, como géis de cultura bacterianas e fungais e na indústria farmacêutica na fabricação de supositórios e cápsulas de fármacos (SAHOO & YARISH, 2005).

1.2.1 Ciclo de vida de *G. floridanum*

Esta espécie possui ciclo de vida trifásico e isomórfico, apresentando três fases no ciclo de vida: gametófito, carposporófito e tetrasporófito sendo que a morfologia externa do gametófito e do esporófito não são diferenciáveis (SANTELICES, 1990). O gametófito masculino haplóide libera gametas (espermácios) aflagelados que fertilizarão o carpogônio, o qual após ser fecundado, permanece aderido ao gametófito feminino haplóide. O desenvolvimento deste caracteriza a fase intermediária diplóide do ciclo, conhecida como carposporofítica.

Esta fase desenvolve-se fixa sobre o gametófito feminino, como uma estrutura denominada cistocarpo. O tecido externo do cistocarpo, o pericarpo, é haplóide enquanto que o tecido interno do carposporófito é diplóide. O carposporófito maduro libera carpósporos diplóides aflagelados originados por mitose que, ao fixarem ao substrato, se estabelecem e desenvolvem em tetrasporófitos diplóides. Estes são sempre mais abundantes na natureza quando comparados com os gametófitos (SANTELICES, 1990). Estes tetrasporófitos sofrem meioses em suas áreas reprodutivas, denominadas tetrasporângios, para originar tetrásporos haplóides do tipo cruciado. Quando estes tetrásporos se fixam em um substrato, cada esporo se desenvolve para formar um novo gametófito feminino ou masculino.

Figura 1 - Esquema representativo do ciclo de vida trifásico e isomórfico de *G. floridanum*



Fonte: Simioni, 2014

1.2.2 Germinação de esporos de *G. floridanum*

O padrão de germinação de esporos de *G. floridanum* é do tipo “Gelidium”. Os tetrásporos, quando liberados, não possuem parede celular, apresentando-se envoltos por uma matriz mucilaginosa, a qual provavelmente é responsável pela rápida adesão do esporo ao substrato. Depois de estabelecido no substrato, o tetrásporo inicia uma sequência de mudanças na morfologia celular. Inicialmente, o esporo sofre uma desorganização polarizada do conteúdo citoplasmático, que permite a expansão celular, possibilitando a rápida formação de uma protuberância, denominada tubo germinativo. O tubo germinativo inicia uma série de sucessivas divisões celulares, primeiramente oblíquas e, depois em vários planos (OURIQUES, 2002; BOUZON *et al.*, 2005). Antes da germinação, a polaridade é estabelecida dentro da célula do esporo para a diferenciação dos eixos de crescimento responsáveis pelo desenvolvimento basal e ereto (FLETCHER & CALLOW, 1992).

A germinação bem sucedida dos tetrásporos de *G. floridanum* conta com eventos iniciais bem caracterizados. Quando os tetrásporos são liberados, eles são isentos de parede celular e são recobertos por uma mucilagem transparente, composta por glicoproteínas e polissacarídeos sulfatados (BOUZON *et al.*, 2006). A mucilagem adesiva é secretada pelo esporo através de inúmeras vesículas periféricas advindas de um complexo de Golgi hipertrófico. Iniciado o evento de fixação ao substrato, as inúmeras vesículas carregadas de material glicoprotéico, começam a liberar seu conteúdo na superfície da membrana plasmática, dando origem a nova parede celular (TARAKHOVSKAYA, 2013).

Após a fixação ao substrato e a formação da parede celular o tetrásporo iniciará os processos metabólicos iniciais aos eventos de germinação. Após, é observado a polarização do conteúdo citoplasmático do tetrásporo (FERARU *et al.*, 2011). A polaridade é estabelecida dentro da célula do esporo para a diferenciação dos eixos de crescimento responsáveis pelo desenvolvimento basal e ereto (FLETCHER & CALLOW, 1992). A polarização das organelas citoplasmáticas ocorre a partir da polimerização de filamentos de actina que proverá suporte e deslocamento para as mesmas, sendo que a polimerização será influenciada por mensageiros secundários que direcionará esse processo a partir de estímulos externos, como a radiação solar. Os mecanismos utilizados pelas células para dar origem a uma polaridade celular podem ser facilmente explicados, conceitualmente, pela organização polar dos seus componentes moleculares, tais como os filamentos de actina e microtúbulos (GELDNER, 2009). Nas plantas, os elementos do citoesqueleto estão envolvidos na determinação da morfologia das células e na polaridade do eixo das células durante a diferenciação celular (LLOYD *et al.*, 1987). O citoesqueleto é responsável por funções essenciais nas células das plantas, incluindo polaridade, transporte intracelular, orientação das microfibrilas da parede celular, alongamento celular, diferenciação e divisão celular (PETERS *et al.*, 2007).

A partir da polarização do conteúdo citoplasmático, ocorre uma expansão celular derivando uma protuberância no polo apical do tetrásporo. Logo após ocorre a migração das organelas, com o apoio do citoesqueleto, em direção ao tubo germinativo, acarretando em uma força mecânica, facilitando o crescimento do mesmo (OURIQUES, 2002).

1.3 Importância do cálcio na germinação de esporos

Há poucos trabalhos sobre os mecanismos que regulam a germinação de esporos, principalmente em relação à sinalização do cálcio para a organização dos filamentos de actina (F-actina) envolvidos na adesão, polarização e conseqüente formação do tubo germinativo. O conhecimento do comportamento destes mecanismos favorece o sucesso no desenvolvimento dos esporos e o desenvolvimento em talo adulto (SIMIONI, 2014).

Em plantas terrestres, durante a formação do tubo polínico, os íons cálcio (Ca^{2+}) desempenham um papel-chave no crescimento e sua inibição causa interrupção deste crescimento (DERKSEN, 1995). O Ca^{2+} entra no meio intracelular através de canais específicos aumentando seu gradiente de concentração na região de formação do tubo e, é responsável pela regulação da polimerização dos filamentos de actina (DERKSEN, 1995). Em macroalgas, o papel do Ca^{2+} é fundamental na polarização de zigotos de algas fucóides (ROBINSON, 1996), como também na formação do tubo germinativo durante o desenvolvimento de esporos de *Porphyra yezoensis* (LI *et al.*, 2009).

Para a inibição do Ca^{2+} , muitos trabalhos utilizam o EGTA (ácido etileno glicol-bis (b-amino-etil-eter) N,N,N',N'- tetra-acético) que atua como agente quelante formador de complexos moleculares estáveis e hidrofílicos, a partir de ligações com íons metálicos via troca de íon, isolando de modo central um íon metálico (MCAINSH & PITTMAN, 2009). Esse mecanismo de ação impede que haja um transporte de cálcio extracelular através da membrana, para o meio citosólico por meio de barreira física (BELYAVSKAYA, 2001). Comparando sua eficácia com outro agente quelante, o EDTA, o EGTA demonstra mais afinidade e seletividade com íons de cálcio quando comparado com íons de magnésio (Mg^{2+}) (KROEGER *et al.*, 2008).

Em macroalgas, trabalhos com monósporos da alga vermelha *P. yezoensis*, após tratamento com EGTA, apresentou alteração na simetria de F-actina (LI *et al.*, 2009). Em algas pardas, ancoragem dos zigotos da alga *Fucus* sp. sob um substrato é totalmente suprimida na presença do quelante de cálcio, EGTA (TARAKHOVSKAYA, 2013).

Outro agente químico utilizado como inibidor é o Cloreto de Lantânio (LaCl_3). Este agente é um composto inorgânico que integra os elementos de terra rara frequentemente usados no trabalho do mecanismo de influxo de Ca^{2+} (FRIEDMAN *et al.*, 1998; ROH *et al.*, 1998). Love *et al.* (1997) aplicou LaCl_3 em cultura de zigotos de *Fucus serratus* e

observou uma redução de 15 % na fotopolarização dos zigotos, além de não ocorrer a adesão e polarização dos mesmos. Na microalga alga verde *Micrasterias torreyi*, o LaCl_3 inibiu a divisão celular (LEHTONEN, 1983).

Para demonstrar a ação do cálcio extracelular, muitos trabalhos utilizam o ionóforo (A23187), de cátions-divalentes, que tem como característica o transporte de íons Manganês (Mn^{2+}), Ca^{2+} , Mg^{2+} , através da membrana celular (REED & LARDY, 1972). É caracterizado por ser uma molécula lipossolúvel carreadora iônica móvel que configura complexos estáveis com cátions divalentes encapsulando-os em um centro polar, onde o exterior é lipofílico (CRAGG, 2015). A literatura evidencia que complexos estáveis são formados entre unidades monovalentes de A23187 e íons cálcio em uma proporção de 2:1, respectivamente (VERMA *et al.*, 2011). Li e colaboradores (2009), nos trabalhos da germinação de esporos de *P. yezoensis*, demonstraram através da utilização do ionóforo A23187 juntamente com a inserção de cloreto de cálcio na água ocorreu a aceleração da migração do conteúdo citoplasmático na formação do tubo germinativo.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar a participação do cálcio extracelular nos processos de germinação de tetrásporos da alga vermelha *G. floridanum*, como também compreender os possíveis efeitos biológicos do cloreto de lantânio.

2.2 Objetivos Específicos

- Quantificar a adesão dos tetrásporos após os tratamentos com EGTA, cloreto de cálcio e o ionóforo A23187;
- Verificar a germinação dos tetrásporos após os tratamentos com EGTA, cloreto de cálcio, ionóforo A23187, e cloreto de lantânio;
- Analisar a formação da parede celular, organização dos filamentos de actina e dos cloroplastos, durante o desenvolvimento dos tetrásporos, após os tratamentos com EGTA e cloreto de cálcio;
- Caracterizar as alterações estruturais e ultraestruturais durante o desenvolvimento dos tetrásporos após os tratamentos;
- Determinar as concentrações dos pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a* e ficobiliproteínas) dos tetrásporos após 6 horas de cultivo com o tratamento com cloreto de lantânio;
- Quantificar as espécies reativas de oxigênio (EROs) após o tratamento com cloreto de lantânio.

CAPÍTULO I: EFEITO DO EGTA, IONÓFORO A23187 E ADIÇÃO DE CÁLCIO EXTRACELULAR NA GERMINAÇÃO DOS TETRÁSPOROS DE *GELIDIUM FLORIDANUM*

1. Introdução

Gelidium floridanum WR Taylor é uma macroalga vermelha, distribuída ao longo da costa brasileira do Espírito Santo até o Rio Grande do Sul, Brasil. Apresenta grande importância econômica, sendo fonte de extração de ágar em todo o mundo, utilizado em diversos produtos com propriedades de gelificação (BOO *et al.*, 2014; POLTRONIERI FILIPIN *et al.*, 2016). Apresenta um ciclo de vida trifásico e isomórfico, onde os tetrásporos, ao serem liberados, não possuem parede celular, mas são envolvidos por uma matriz mucilaginosa que é responsável pela rápida adesão ao substrato. A germinação só ocorre após a adesão e é caracterizada pela reorganização do conteúdo citoplasmático, com o deslocamento das organelas a um polo da célula para a formação do tubo germinativo (BOUZON *et al.*, 2006).

A distribuição assimétrica de moléculas intracelulares define a polaridade celular, direcionando a migração celular, alongamento e diferenciação celular (LI *et al.*, 2009). Os processos iniciais da germinação, em tetrásporos de *G. floridanum*, iniciam com a distribuição assimétrica das organelas que culminam na formação do tubo germinativo e, é dependente, de forma direta e indireta, do citoesqueleto. Sabe-se que os filamentos de actina (F-actina) são elementos integrantes do citoesqueleto, tanto de células vegetais quanto animais e estes são regulados, em vários aspectos do funcionamento celular, por influxos de cálcio extracelular (SATO *et al.*, 2001).

Íons, em especial o cálcio, participam de forma ativa no controle da estrutura e atividade do citoesqueleto sendo considerado um íon essencial em muitas etapas da germinação que são dependentes do citoesqueleto (ANDERHAG *et al.*, 2000; HEPLER, 2016). A partir de canais de Ca_2^+ , ocorre o influxo do íon extracelular aumentando, ou diminuindo, a concentração de Ca_2^+ livre no citoplasma, permitindo que ocorra uma regulação de sistemas de sinalizações dependentes de Ca_2^+ nas plantas (BERRIDGE *et al.*, 2000).

Os filamentos de actina são elementos de suma importância para o crescimento direcionado e morfogenia celular (HIMSCHOOT *et al.*, 2015). Em tetrásporos de *G. floridanum* (BOUZON *et al.*, 2006),

monósporos de *P. yezoensis* (LI *et al.*, 2009) e zigotos de alga fucóide (HABLE & HART, 2010) a partir da dinâmica de polimerização da F-actina, as vesículas secretoras, presentes nos processos de germinação, são movimentadas intracelular ou em direção extracelular, para a organização e formação da parede celular.

Em zigotos de algas fucóides a polaridade celular é estabelecida a partir de influxos de Ca^{2+} localizados (HABLE & HART, 2010). A mesma necessidade da presença de Ca_2^+ extracelular é vista na germinação de tubos polínicos em plantas, onde gradientes de Ca_2^+ podem gerar cascatas sinalizadoras, responsáveis pelo estabelecimento da polaridade celular (MALHO *et al.*, 1994), movimentações de organelas e polarização celular através da polimerização e despolimerização de F-actina (BERRIDGE *et al.*, 2000).

Assim, o presente trabalho foi realizado para identificar a necessidade do Ca_2^+ extracelular para os eventos iniciais da germinação que são dependentes do citoesqueleto e as possíveis consequências de um ambiente pobre na concentração de Ca_2^+ disponível.

2. Material e Métodos

2.1 Material algal e quantificação do cálcio na água do mar

Talos tetrasporofíticos de *G. floridanum* foram coletados na praia de Sambaqui (27° 29'18.8" S e 48° 32'12.9" W), Florianópolis, Santa Catarina. As amostras de algas foram coletadas no costão rochoso e transportadas à temperatura ambiente em recipientes escuros até o LABCEV-UFSC (Laboratório de Biologia Celular Vegetal – Universidade Federal de Santa Catarina).

Foram limpos e selecionados talos férteis, livres de microepífitas e invertebrados, e colocados para liberação de tetrásporos (*overnight*). Para este procedimento, os talos férteis foram dispostos em uma rede presa sobre um funil inserido em um béquer de 1 L, completos de água do mar filtrada (32 ups). Na base do funil foi colocado um tubo plástico para que os tetrásporos liberados fossem coletados. A liberação ocorreu no escuro, por um período de 12 horas em temperatura de 24 °C (SIMIONI *et al.*, 2014). Após o período de liberação, os tetrásporos foram dispostos em lâminas dentro de placas de Petri para a germinação, e foram cultivados em temperatura de 24 °C (± 1 °C), irradiância de 40 (± 10) μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Todas as análises foram realizadas após 6 horas de cultivo, momento em que se inicia o processo de formação do tubo germinativo.

Para quantificar o Ca^{2+} na água do mar, uma amostra de água proveniente do local da coleta das algas, foi acidificada com HNO_3 para o $\text{pH} \leq 2$. A amostra foi analisada no espectrofotômetro de absorção atômica (FAAS) (SpectrAA 50-B, Varian, Australia). Esse procedimento foi baseado no método de USEPA sendo feitas algumas modificações. A água do mar do local da coleta apresentou uma concentração de Ca^{2+} de 374.7 ± 8.0 mg/L.

2.2 Tratamentos

Para quelar o Ca^{2+} , foi utilizado o quelante ethylene glycol-bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA, E-4378, Sigma-Aldrich, Alemanha). A solução estoque de EGTA foi preparada a uma concentração de 100 mM em água esterilizada. A partir desta solução estoque, foram preparadas três concentrações finais: 1 mM, 2 mM e 4 mM.

Para inserir Ca^{2+} foram realizados tratamentos com adição de cloreto de cálcio (CaCl_2 , 32410, Synth, Brasil). A solução estoque de CaCl_2 foi preparada a uma concentração de 0,5 M em água destilada. A partir desta solução estoque, foram preparadas três concentrações finais: 2 mM, 4 mM e 8 mM, diluídas em água do mar esterilizada.

Para aumentar os níveis intracelulares de Ca^{2+} foi utilizado o Ionóforo A23187 (Sigma-Aldrich, Alemanha). A solução estoque do Ionóforo A23187 foi preparada a uma concentração de 1,9 mM em DMSO. A partir desta solução estoque, foram preparadas três concentrações finais: 1 μM , 2 μM e 3 μM , diluídas em água do mar esterilizada. As concentrações finais preparadas, não excederam 0,15 % de DMSO.

Amostras também foram incubadas em uma solução contendo o Ionóforo A23187 (1 μM) combinado a CaCl_2 (2 mM).

Para realizar os tratamentos experimentais, as amostras controle foram incubadas sem nenhum tipo de tratamento, somente com água do mar proveniente do local de coleta. Quatro repetições foram realizadas para cada grupo experimental e o tempo de encubação dos tetrásporos em cada tratamento foi de 6 horas.

2.3 Análise da morfologia, adesão e processos de germinação

As características morfológicas do controle e das amostras tratadas de tetrásporos de *G. floridanum* foram analisadas e fotografadas com o auxílio do microscópio Leica DM500 e do software OPTHD 3.7. Após 6 horas de desenvolvimento, inicialmente para a adesão, quatro pontos aleatórios em quatro diferentes lâminas foram analisados. Em seguida, tetrásporos não aderidos foram removidos com a água do mar, e tetrásporos foram recontados novamente no mesmo ponto.

A análise da germinação foi realizada através da avaliação das seguintes características: 1) tetrásporos com formação do tubo germinativo (germinados), 2) tetrásporos inviáveis, com pigmentação verde (mortos) e 3) tetrásporos não germinados, mas viáveis. As características morfológicas foram analisadas em 100 tetrásporos por lâmina para os diferentes tratamentos e em quadruplicata (n=400 tetrásporos).

2.4 Análise em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (MCVL)

Os filamentos de actina foram marcados com Rodamina-faloidina seguindo a metodologia proposta por Wilson e colaboradores. (2002). As amostras foram fixadas com paraformaldeído (3,7 %) em tampão fosfato salino (PBS) durante 5 minutos, logo após, foram lavadas e permeabilizadas com Triton X-100 (1 %) e incubadas com Rodamina-faloidina com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (30 μ M). A fluorescência dos filamentos de actina foi observada em um comprimento de onda de excitação com laser de 488 nm com um espectro de emissão de 500 a 580 nm.

Para analisar a parede celular, as amostras foram fixadas com paraformaldeído (3,7 %) em PBS durante 5 minutos. Após a fixação as amostras foram lavadas e permeabilizadas com Triton X-100 (1 %) e incubadas com Calcofluor (10 μ M). A fluorescência da parede celular foi observada com excitação do comprimento de onda com laser 405 nm com um espectro de emissão de 410 a 580 nm. A autofluorescência dos cloroplastos foi observada em um comprimento de onda de excitação com laser de 488 nm (violeta) com um espectro de emissão de 510 a 750 nm (ZITTA *et al.*, 2013).

2.5 Análise em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para o processamento, as amostras foram pré-fixadas em solução de glutaraldeído 2,5 % tamponada com cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) a 4 °C por 12 h. A pré-fixação foi seguida por quatro lavagens de 30 minutos cada, no mesmo tampão. Posteriormente, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (1:1), durante 4 h à temperatura ambiente (BOUZON *et al.*, 2006). Após esse período, o material foi lavado duas vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, sendo mantido por 30 minutos em cada lavagem. A desidratação foi realizada em uma série de soluções aquosas de concentrações crescentes de acetona (30 %, 50 %, 70 %, 90 % e 100 %), sendo o material mantido 30 minutos em cada etapa. A última série de acetona 100 % foi trocada duas vezes. O material foi infiltrado com resina Spurr em séries graduais de acetona-resina Spurr durante cinco dias, seguido de duas infiltrações em resina pura por 24 horas, e polimerizados em estufa a 70 °C por 24 horas. Os cortes ultrafinos foram feitos com navalha de diamante em ultramicrotomo e, posteriormente, contrastados com acetato de uranila 1 % e citrato de chumbo 1 %, por 10 min cada. Os cortes foram observados e fotografados no microscópio eletrônico de transmissão JEM 2100 do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

2.6 Análise Estatística

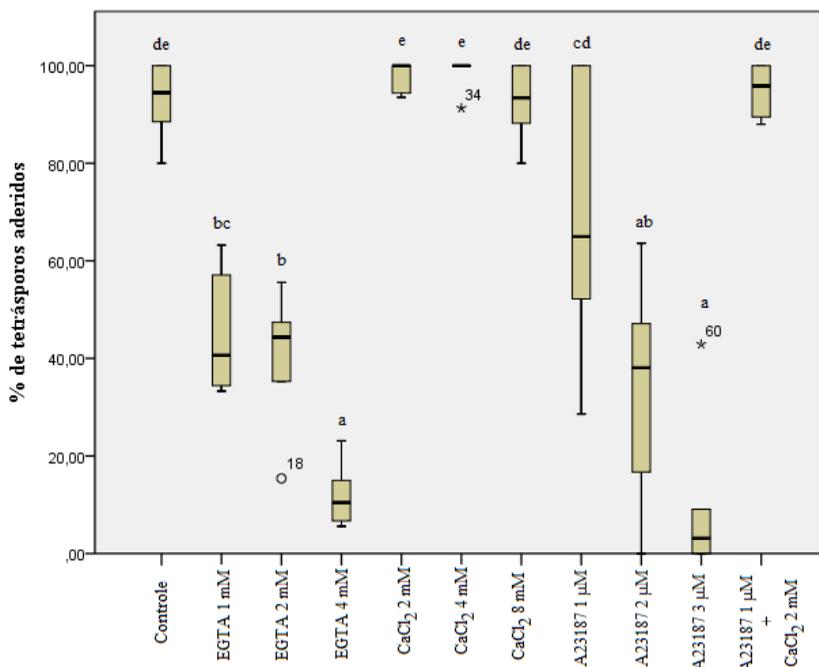
Nos dados obtidos foram feitas análises descritivas: normalidade, média e desvio padrão. Conforme a normalidade e homogeneidade das variâncias, foram feitos testes não-paramétricos usando o teste de Kruskal-Wallis e posteriormente Wilcoxon-Mann-Whitney para identificar a existência de diferenças estatísticas; já para os dados com a distribuição paramétrica foi realizado Análise de Variância (ANOVA) de uma via. Para a identificação de diferentes grupos foi usado o teste comparativo *Post Hoc*, Tukey. As análises estatísticas foram feitas com o auxílio do programa *IBM SPSS STATISTICS 22*, considerando $p \leq 0.05$ como estatisticamente significante.

3. Resultados

3.1 Adesão dos tetrásporos

A porcentagem de tetrásporos aderidos quando tratados com CaCl_2 2, 4 e 8 mM não obteve oscilações estatisticamente significantes na mediana quando comparados com tetrásporos controle, assim como os tratados com A23187 $1 \mu\text{M}$ + CaCl_2 2 mM que tiveram um aumento de apenas 1,5 % em relação ao controle. Ao observar a porcentagem das medianas dos tetrásporos aderidos tratados com EGTA 1, 2 e 4 mM, nota-se alterações significativas quando comparados a tetrásporos controle, uma queda de 57 % e 53 % nas primeiras concentrações do tratamento e uma queda de 89 % nos tetrásporos aderidos tratados com EGTA 4 mM, sendo a última concentração de EGTA equivalente estatisticamente aos tetrásporos tratados com A23187 $3 \mu\text{M}$ (Fig. 2).

Figura 2 - Taxa de adesão de tetrásporos de *G. floridanum* após 6 horas de cultivo (n=4). As letras indicam diferenças estatísticas conforme o teste não paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney seguido pelo teste de Kruskal-Wallis.



3.2 Morfologia e taxa de germinação

Os tetrásporos controle de *G. floridanum* apresentaram uma taxa de germinação de 50 % após 6 horas de cultivo (Tabela 1), sendo possível observar a formação do tubo germinativo, junto com a migração do conteúdo citoplasmático para o tubo (Fig. 3 a, b setas). Destes tetrásporos não germinados, 34 % apresentaram cloroplastos na coloração avermelhada típica da espécie, aparentemente viáveis, mas sem a formação do tubo germinativo e uma taxa de 18,1 % de tetrásporos com cloroplastos esverdeados, sendo considerados inviáveis (Fig. 3 a, Tabela 1).

Quando os tetrásporos foram tratados com EGTA, não apresentaram formação do tubo germinativo em nenhuma das concentrações (Fig. 3 c, d). Diferindo-se estatisticamente dos tetrásporos

controle e dos tratados com CaCl_2 2, 4 e 8 mM e A23187 $1 \mu\text{M}$ + CaCl_2 2 mM onde os tetrásporos formavam tubo germinativo com taxas de germinação altas em relação aos tratamentos com EGTA. Nas amostras com EGTA, conforme mostra a tabela 1, observou-se um maior índice de tetrásporos viáveis entre os tratados, mostrando em concentrações crescentes de EGTA, os percentuais 86,1 %; 49,6 %; 36,3 %. A inviabilidade foi maior nas maiores concentrações do quelante.

Quando os tetrásporos foram tratados com CaCl_2 , a formação do tubo germinativo parece ter sido favorecida, ocorrendo a formação do tubo germinativo em apenas 4 horas de cultivo (dados não mostrados) em comparação a amostra controle. As três concentrações usadas de CaCl_2 apresentaram os maiores índices de germinação, tendo um percentual de 56,9 % (2 mM), 66,4 % (4 mM) e 61,3 % (8 mM) de tetrásporos germinados (Fig. 3e, f, Tabela 1). Como consequência também apresentaram baixos índices de viabilidade (sem a formação de tubo germinativo) e inviáveis (Tabela 01).

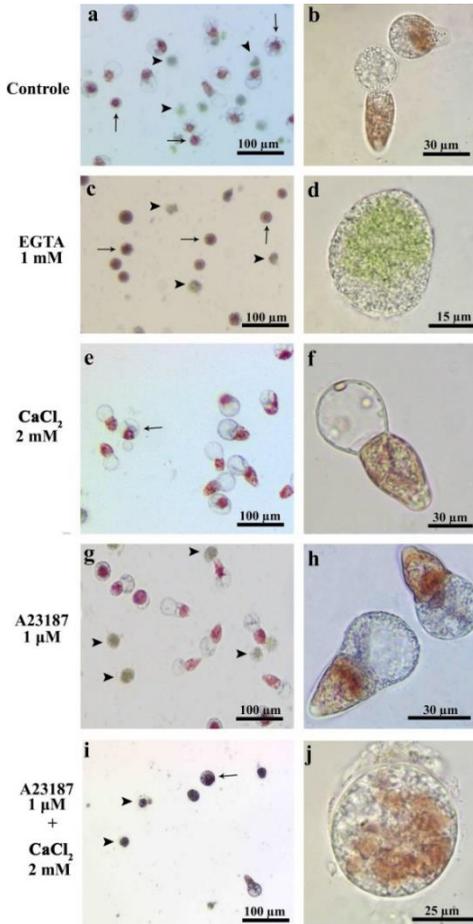
A utilização do ionóforo A23187, não apresentou altas taxas de germinação e somente as menores concentrações (1 e $2 \mu\text{M}$) apresentaram a formação de tubo germinativo (Fig. 3 g, h) em 34,5 e 13,6 % dos tetrásporos, respectivamente (Tabela 01). Na maior concentração, $3 \mu\text{M}$, praticamente não houve germinados e a maioria dos tetrásporos se encontravam inviáveis (Tabela 01).

No cultivo com A23187 $1 \mu\text{M}$ + CaCl_2 2 mM, os tetrásporos apresentaram baixas taxas de germinação com apenas 37,2 % (Fig. 3 i, j), diferindo dos tratamentos com somente o CaCl_2 . Além disso a formação do tubo germinativo ocorreu somente após as 6 horas de cultivo como no controle, diferentemente das amostras cultivadas com CaCl_2 .

Tabela 01 - Contagem de tetrásporos de *G. floridanum* após 6 horas de cultivo, sendo classificados de acordo com a morfologia. Valores representados por média \pm erro padrão (n=4). As letras indicam diferenças significativas de acordo com o teste ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* Tukey.

<i>Tratamentos</i>	Germinados	Viáveis	Inviáveis
Controle	50 \pm 7,4bf	34 \pm 7,3a	18,1 \pm 9,3a
EGTA 1 mM	0 \pm 0,3a	86,1 \pm 6,4e	13,5 \pm 6,4a
EGTA 2 mM	0a	49,6 \pm 13,1ac	50,4 \pm 13,1cd
EGTA 4 mM	0a	36,3 \pm 11a	63,7 \pm 11d
CaCl₂ 2 mM	56,9 \pm 4,3bc	9,1 \pm 3,1b	33,4 \pm 4,9bc
CaCl₂ 4 mM	66,4 \pm 3,8c	6,8 \pm 2,6b	28,3 \pm 3,4ab
CaCl₂ 8 mM	61,3 \pm 15,8bc	7,3 \pm 3,9b	31,1 \pm 12,7b
A23187 1 μM	34,5 \pm 8,5e	17,2 \pm 2,5a	49,3 \pm 10,1a
A23187 2 μM	13,6 \pm 9,6d	19,3 \pm 2,9d	64 \pm 10,9ab
A23187 3 μM	0 \pm 2,1ad	36,3 \pm 10,6cd	62,7 \pm 11,7b
A23187 1 μM + CaCl₂ 2 mM	37,2 \pm 4,2ef	39,8 \pm 7,1a	23,1 \pm 7,7ab

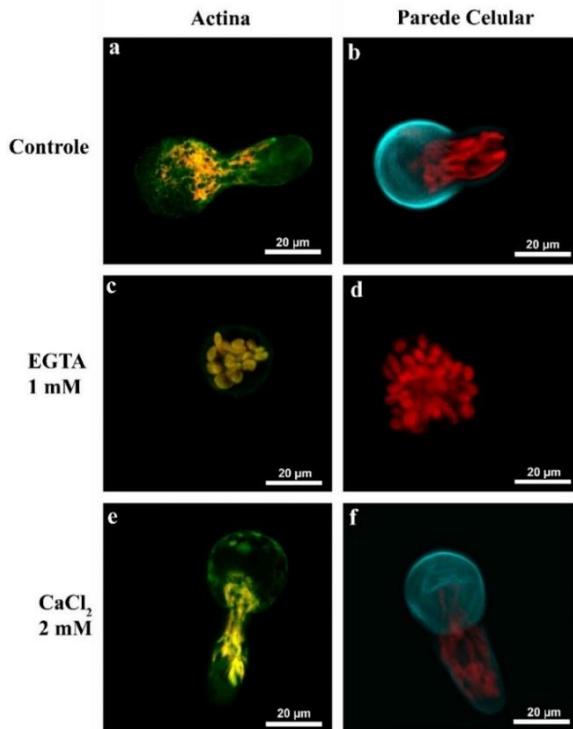
Figura 3 - Micrografia de luz de tetrásporos de *G. floridanum* após 6 horas de cultivo. **a-b.** Tetrásporos controle. **c-d.** Tetrásporos tratados com EGTA 1 mM. **e-f.** Tetrásporos tratados com CaCl_2 2 mM. **g-h.** Tetrásporos tratados com A23187 1 μM . **i-j.** Tetrásporos tratados com A23187 1 μM + CaCl_2 2 mM. Setas, tetrásporos viáveis. Cabeça de seta, tetrásporos inviáveis.



3.3 Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL)

No MCVL foi possível observar que, após 6 horas de cultivo, os tetrásporos controle apresentavam microfilamentos de actina (Fig. 4 a) os quais se mostram mais proeminentes na base do prolongamento do tubo germinativo. Logo após a formação do tubo germinativo, uma nova parede celular começa a ser sintetizada conferindo proteção à nova estrutura (Figura 4 b), a migração dos cloroplastos em direção ao tubo germinativo também foi observada. Quando os tetrásporos foram tratados com EGTA 1 mM, após 6 horas de cultivo, observou-se que não há formação do tubo germinativo e finos filamentos de actina circundavam o tetrásporo estruturalmente esférico (Fig. 4 c). Estes tetrásporos não apresentaram formação de parede celular e notou-se que os cloroplastos estavam helicoidais localizados no centro da célula, não ocorrendo os movimentos de migração destas organelas (Fig. 4 d). Ao analisar os tetrásporos tratados com CaCl_2 2 mM, observou-se um padrão semelhante ao controle, onde filamentos de actina estão presentes ao longo de toda estrutura do tetrásporo ficando mais evidente ao longo do tubo germinativo recém-formado (Fig. 4 e). A parede celular também evidente no tetrásporo e circundando o tubo germinativo, observou-se também a migração dos cloroplastos em direção ao tubo germinativo (Fig. 4 f).

Figura 4 - Microscopia confocal de varredura a laser de tetrásporos de *G. floridanum* após 6 horas de cultivo. **a.** Tetrásporos controle com finos F-actina em verde e cloroplastos (amarelo). **b.** Tetrásporos controle com parede celular (azul) e cloroplastos (vermelho) migrando em direção ao tubo germinativo. **c-d.** Tetrásporos tratados com EGTA 1 mM com a F-actina não polarizada e ausência de parede celular, cloroplastos helicoidais centrais (amarelo e vermelho, respectivamente). **e-f.** Tetrásporos tratados com CaCl_2 2 mM com F-actina polarizada, presença de parede celular (azul) e cloroplastos em amarelo (Fig. e) e vermelho (Fig. f) migrando em direção ao tubo germinativo.



3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os tetrásporos da amostra controle, após 6 horas de cultivo, apresentaram o tubo germinativo sendo formado. Característico dessa etapa da germinação, há uma grande quantidade de vesículas e grandes vacúolos na base do tetrásporo com polarização de organelas para a ponta do tubo germinativo, ajudando no processo de polarização e formação deste tubo (Fig. 5 a). No tetrásporo germinado a parede celular é espessa constituída por duas camadas elétrons transparentes e uma camada irregular, periférica mais elétrons densa (Fig. b). No citoplasma, é possível observar grande quantidade de mitocôndrias, essas bem características, com dupla membrana e cristas mitocondriais bem organizadas (Fig. 5 b). Corpos de Golgi são abundantes e hipertróficos (Fig. 5 c) sendo observado o fusionamento das vesículas na membrana celular (Fig. 5 d). Os cloroplastos apresentam-se bem desenvolvidos e com a estrutura organizacional dos tilacóides característica do filo (Fig. 5 e).

Os tetrásporos de *G. floridanum* tratados com EGTA não germinados, foram visualizados sem formação de parede celular, com grande quantidade de grãos de amido e de vesículas espalhadas pelo citoplasma, como também cloroplastos com tilacóides dilatados (Fig. 6 a-c). O citoplasma desses tetrásporos apresenta corpos de Golgi pouco desenvolvidos e grande quantidade de retículo endoplasmático liso (Fig. 6 d, e)

Quando tratados com CaCl_2 , os tetrásporos já estão germinados com todo conteúdo citoplasmático deslocado para a região do tubo germinativo (Fig. 7 a). A primeira divisão celular com formação de uma parede celular entre o tetrásporo de origem e a região do tubo germinado é visualizada (Fig. 7 b). Na parede celular pode-se observar a presença das microfibrilas de celulose (Fig. 7 d). O citoplasma do tubo germinativo é extremamente denso com grande quantidade de grãos de amido e presença de cloroplastos na região periférica (Fig. 7 c). E neste tratamento os corpos de Golgi também são hipertróficos (Fig. 7 e).

As amostras tratadas com A23187 1 μM , nos tetrásporos germinados, pode-se observar divisão entre o tetrásporos de origem e o tubo germinativo (Fig. 8 a). A estrutura externa visualizada estava desorganizada com uma fina camada mais externa de parede celular e uma camada de mucilagem entre a membrana celular e a parede celular propriamente dita (Fig. 8 b). No citoplasma a presença de corpos hipertróficos podem ser visualizados como também grande quantidade de

retículo endoplasmático liso (Fig. 8 c). Nessas amostras os cloroplastos estavam íntegros sem alterações morfológicas (Fig. 8 d).

Quando tratados com CaCl_2 2 mM + A23187 1 μM , na maioria dos tetrásporos em germinação ainda é possível observar a migração de organelas para a ponta do tubo germinativo (Fig. 9 a). Na ponta do tubo germinativo observou-se inúmeros corpos de Golgi (Fig. 9 b). A parede celular nos tetrásporos em germinação apresenta-se espessa e bem formada (Fig. 9 c, d), já nos tetrásporos não germinado não foi possível observar a formação de parede celular e no citoplasma inúmeras vesículas com granulações eletrondensas foram observadas (Fig. 9 e).

Figura 5 - Micrografia eletrônica de transmissão de tetrásporos controle de *G. floridanum* após 6 horas de cultivo. **a.** Visão geral de um tetrásporo com o tubo germinativo em formação e conteúdo citoplasmático migrando em direção a ponta do tubo. **b-c.** Detalhes da parede celular formada (b) e, corpos de Golgi com cisternas hipertróficas (c). **d.** Detalhe de vesículas derivadas dos corpos de Golgi fusionando-se na membrana celular. **e.** Detalhe dos tilacóides íntegros presentes nos cloroplastos. C, cloroplasto. CW, parede celular. M, mitocôndria. S, amido das florídeas. G, corpos de Golgi. *, vesículas.

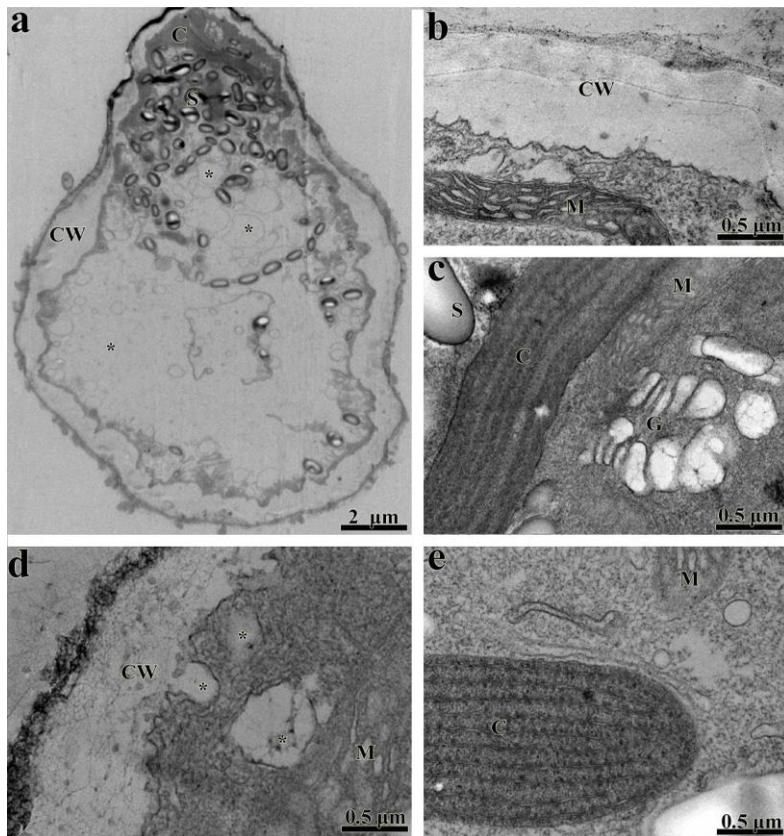


Figura 6 - Micrografia eletrônica de transmissão de tetrásporos de *G. floridanum* tratados com EGTA 1 mM após 6 horas de cultivo. **a-c.** Visão geral do tetrásporo com grande quantidade de grãos de amido, citoplasma vesiculoso e desorganizado com cloroplastos alterados localizados na região mais central da célula. **d-e.** Detalhes do citoplasma vesiculoso, com mitocôndria, corpos de Golgi com cisternas pouco desenvolvidas e grande quantidade de retículo endoplasmático liso. C, cloroplasto. CW, parede celular. M, mitocôndria. S, amido das florídeas. G, corpos de Golgi. *, vesículas. ER, retículo endoplasmático liso

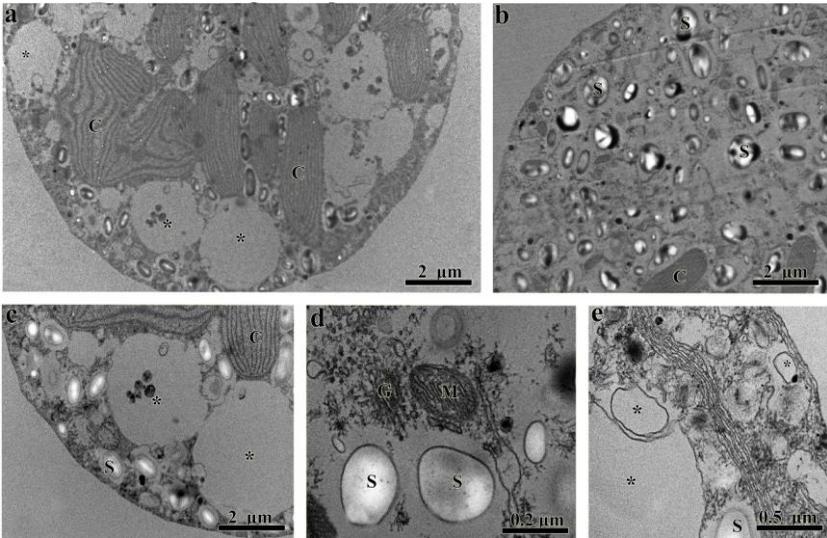


Figura 7 - Micrografia eletrônica de transmissão de tetrásporos de *G. floridanum* tratados com CaCl_2 2 mM após 6 horas de cultivo. **a-b.** Visão geral longitudinal de tetrásporos com tubo germinativo formado e com divisão (cabeça de seta). **c.** Detalhe da divisão do tubo germinativo com a parede celular sendo estabelecida, grande quantidade de grãos de amido e cloroplastos periféricos. **d-e.** Detalhe da parede celular, cloroplastos, corpos de Golgi e presença de mitocôndrias. GT, tubo germinativo. C, cloroplasto. CW, parede celular. M, mitocôndria. S, amido das florídeas. G, corpos de Golgi. *, vesículas.

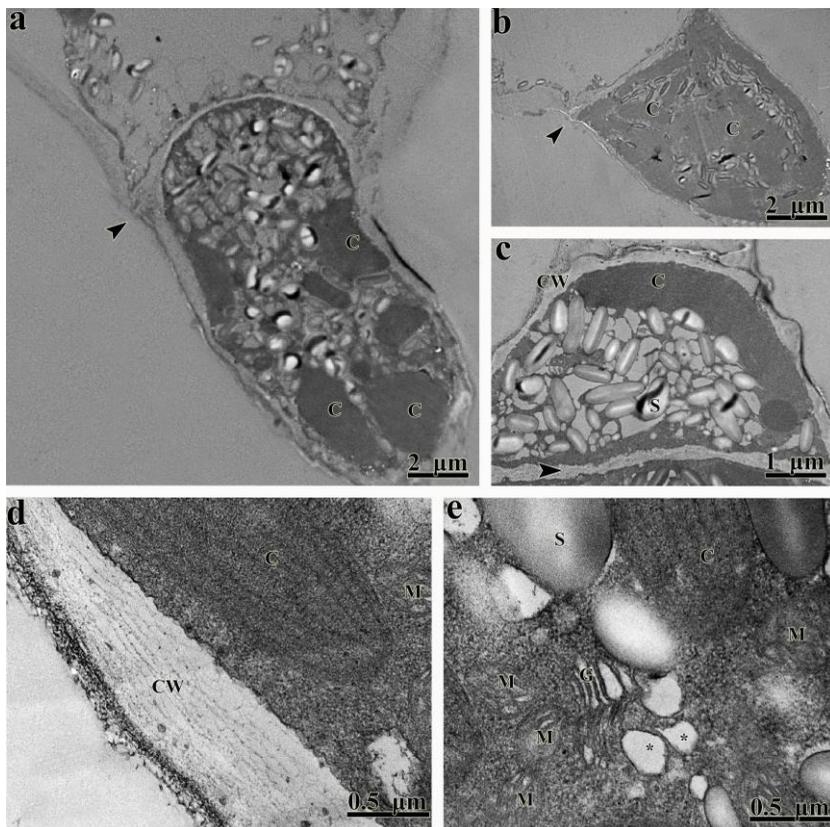


Figura 8 - Micrografia eletrônica de transmissão de tetrásporos de *G. floridanum* tratados com A23187 1 μ M após 6 horas de cultivo. **a.** Visão geral longitudinal do tetrásporo com o tubo germinativo já formado e dividido (cabeça de seta). **b.** Detalhes da parede celular fina na região mais externa e mucilagem na região mais interna e, citoplasma com grande quantidade de retículo endoplasmático liso periférico, corpos de Golgi e mitocôndrias. **c.** Detalhe do cloroplasto com tilacóide íntegros. GT, tubo germinativo. C, cloroplasto. CW, parede celular. M, mitocôndria. S, amido das florídeas. G, corpos de Golgi. Mu, mucilagem.

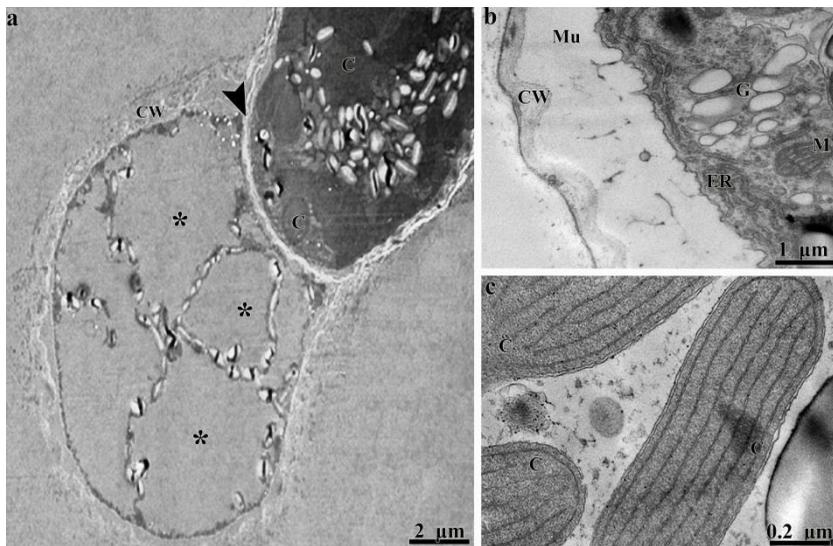
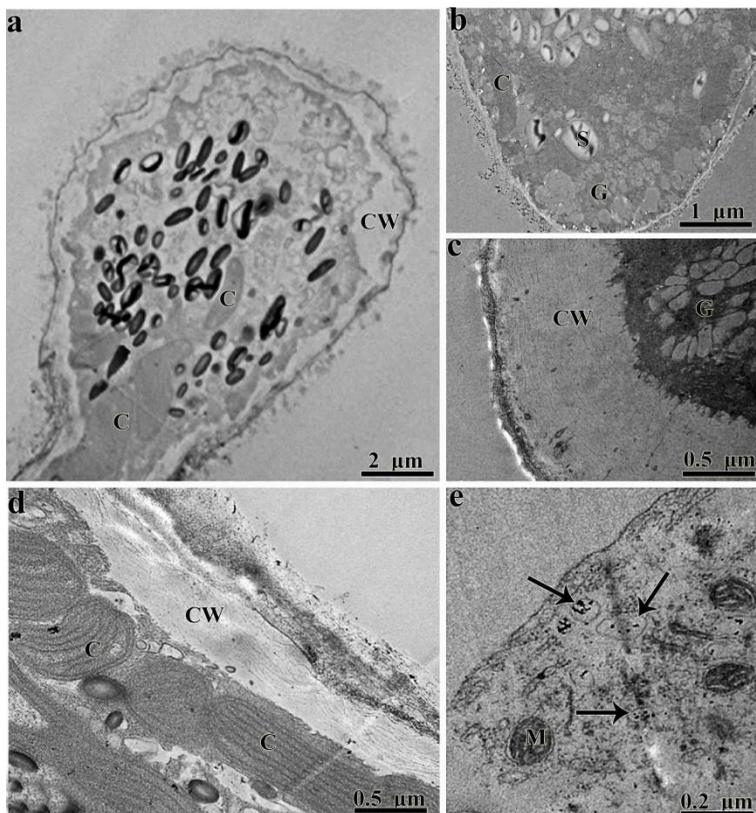


Figura 9 - Micrografia eletrônica de transmissão de tetrásporos de *G. floridanum* tratados com A23187 $1 \mu\text{M}$ + CaCl_2 2mM após 6 horas de cultivo. **a.** Visão geral longitudinal de um tetrásporo com o tubo germinativo em formação sendo possível observar as organelas migrando em direção ao tubo. **b-c.** Detalhes da ponta do tubo germinativo com uma grande quantidade de corpos de Golgi, parede celular espessa, cloroplastos e grãos de amido. **d.** Detalhe de tetrásporo com cloroplastos periféricos e parede celular. **e.** Detalhe de um tetrásporo não germinado com presença de diversas vesículas com conteúdo eletrodenso (setas) e mitocôndrias. GT, tubo germinativo. C, cloroplasto. CW, parede celular. M, mitocôndria. S, amido das florídeas. G, corpos de Golgi.



4. Discussão

Para que os eventos de germinação aconteçam, a adesão dos tetrásporos ao substrato é fundamental ao desenvolvimento e etapas subsequentes (BOUZON *et al.*, 2006). Esta adesão depende de mucilagem secretada por vesículas provenientes de corpos de Golgi. Os tetrásporos de *G. floridanum* são liberados desprovidos de parede celular e revestidos por uma mucilagem transparente. Este padrão de ausência de parede celular nos esporos recém liberados é característica das algas vermelhas (AVANZINI, 1989).

O íon Ca^{2+} é um importante mensageiro secundário para os eventos relacionados à germinação de tetrásporos de *Gelidium floridanum*. Quando os tetrásporos foram tratados com EGTA, houve uma queda de mais de 50 % nas taxas de adesão quando comparados ao controle, presumindo-se que a adesão eficiente dos tetrásporos é dependente de cálcio, sendo ele um componente secundário dos eventos. O influxo do íon extracelular é requerido para que ocorra o aumento da concentração do mesmo a nível intracelular. A sua entrada se dá a partir de canais permeáveis de membrana, específicos ou não, permitindo a regulação do influxo conforme o sistema de sinalização (HEPLER, 2016; HIMSCHOOT *et al.*, 2015). Como agente secundário o Ca^{2+} é responsável pela polarização e nucleação de F-actina, sendo essencial para a migração de organelas conforme a polarização celular e deposição de vesículas advindas do Golgi. Nos esporos recém liberados foram observados números corpos de Golgi na periferia celular com fusão das vesículas derivadas com a membrana plasmática, indicando a liberação de mucilagem adesiva.

Quando em contato com o substrato, o tetrásporo dá início a secreção dos componentes adesivos que são transportados ao exterior celular através de vesículas providas dos corpos de Golgi, sendo que esse transporte é facilitado pelo citoesqueleto de actina previamente sinalizado (HABLE, 2014). Segundo Homblé & Léonetti (2007), para a formação de rizoides em algas fucóides é essencial o influxo de cálcio para a polarização celular, assim como é necessário à germinação do tubo polínico em plantas vasculares (ANDERHAG *et al.*, 2000; HIMSCHOOT *et al.*, 2015).

Quando observados na MET, os tetrásporos tratados com EGTA apresentaram o citoplasma bem vesiculado, evidenciando a ineficiência no depósito dessas vesículas secretórias na membrana por uma deficiência nos níveis de cálcio envolvidos na polarização e nucleação da

F-actina. Estes dados são corroborados aos dados de Callow e colaboradores (2001) no trabalho com zoósporos de alga verde *Enteromorpha linza*. Estes resultados, também são confirmados nas observações em MCVL, onde a falta de arranjos polarizados de F-actina e a não deposição da parede celular foram observadas, em decorrência da redução de Ca^{2+} intracelular. Resultados semelhantes foram vistos pelo grupo Li e colaboradores (2009), onde monósporos da alga vermelha *P. yezoensis*, tratados com EGTA 1 mM tiveram como resultados a descontinuação da germinação dos monósporos afetando a polarização do conteúdo citoplasmático assim como a deposição da parede celular. Segundo Tsekos (1996) e Michel e colaboradores (2010) na síntese da parede celular de algas vermelhas, os polissacarídeos não cristalinos da matriz e outras moléculas, como as proteínas da parede, são direcionadas à membrana plasmática por vesículas derivadas do Golgi, assim como as enzimas necessárias à produção de celulose, corroborando estes dados ao observado no presente trabalho onde não foi observado uma organização da F-actina nem a formação da parede celular.

Quando os tetrásporos foram tratados com CaCl_2 2, 4 e 8 mM as taxas de adesão e germinação foram superiores ao grupo controle. A formação do tubo germinativo aconteceu de forma mais acelerada, bem como os processos de divisão celular do tubo germinativo. Nestes tetrásporos há a presença de corpos de Golgi hipertróficos, parede celular bem desenvolvida no tubo germinativo e uma polarização dos componentes citoplasmáticos, assim como um citoesqueleto de actina bem estruturado nos leva a enfatizar a importância do Ca^{2+} extracelular para o correto desenvolvimento do tetrásporo. A quantificação do Ca^{2+} da água do mar proveniente da coleta resultou em 374 mg/L do íon. A concentração mais baixa (2 mM) de CaCl_2 aplicada como tratamento durante às 6 horas de cultivo dos tetrásporos, equivale ao valor de 79 mg/L de Ca^{2+} . Comparando com a quantificação média do íon disponível no local da coleta, a adição do Ca^{2+} exógeno mostrou-se eficaz no aceleração da germinação. A partir desses dados sugere-se que a água do mar proveniente do local de coleta é pobre em cálcio ou agentes presentes nesta água estão interagindo e modificando a biodisponibilidade desse íon para os indivíduos em desenvolvimento.

O ionóforo A23187 é uma molécula hidrofóbica que se liga, seletivamente, ao íon metálico Ca^{2+} facilitando sua entrada no meio intracelular, porém poucos trabalhos analisam os efeitos do A23187 em organismos marinhos em período inicial do desenvolvimento. Entretanto,

quando os tetrásporos foram tratados com o ionóforo A23187 1, 2 e 3 μM as taxas de adesão, germinação e inviabilidade foram menores quando comparadas ao controle. Porém os tetrásporos tratados com A23187 1 μM não apresentaram danos ultraestruturais na maioria das organelas mas anormalidades foram detectadas na região entre a membrana e a parede celular, bem como uma grande quantidade de retículo liso periférico. Sugere-se que a ineficiência do A23187 neste trabalho, principalmente nas concentrações mais altas, em relação à germinação correta do tubo germinativo, se dá por um possível desequilíbrio iônico intracelular gerado pela falta de gradiente na concentração do íon Ca^{2+} citosólico (VERMA *et al.*, 2011). O aumento da quantidade retículo endoplasmático liso na periferia celular pode ser devido a uma tentativa de homeostase de Ca^{2+} e desintoxicação celular, embora não se tenha observado trabalhos da atividade desintoxicante do retículo liso em esporos de algas. A anormalidade encontrada na região da parede celular pode ser devido à desorientação da exocitose de vesículas excretoras, observando-se uma deposição de material de forma desorganizada (DEDKOVA *et al.*, 2000).

Outro resultado observado foi que o cultivo com o Ionóforo A23187 1 μM e a adição de CaCl_2 2 mM, apresentou as mesmas características do controle, porém ultraestruturalmente resultou em um acúmulo de vesículas com conteúdo eletrondenso, sugerindo que as mesmas sejam resultado do excesso de Ca^{2+} intracelular e a vesiculação torna-se uma maneira de bioacumulação e proteção da homeostase celular corroborando com os trabalhos de De Oliveira e colaboradores (2015), que relata o acúmulo de íons metálicos em vesículas como uma forma de proteção.

Concluimos que a germinação de tetrásporos de *Gelidium floridanum* é dependente de cálcio extracelular e a supressão do mesmo inibe a adesão e conseqüentemente a formação do tubo germinativo. O cálcio extracelular acelera o processo germinativo, e indiretamente é responsável pela polarização da actina e formação da parede celular nesta fase de desenvolvimento.

CAPÍTULO II: EFEITO DO CLORETO DE LANTÂNIO NA GERMINAÇÃO DE TETRÁSPOROS DE *GELIDIUM FLORIDANUM*

1. Introdução

O metal lantânio (La^{3+}), incluído com mais 17 elementos com propriedades físico-químicas semelhantes e com números atômicos de 57 a 71, integram o grupo chamado de lantanídeos também denominados de elementos de terra rara (ETRs) (US-EPA, 2012). O grupo ETRs, apesar da nomenclatura, são encontrados com frequência na crosta terrestre, porém de uma forma menos concentrada (HOLDEN & COPLEN, 2004) e com um processo complexo e caro de refinaria (HAQUE *et al.*, 2014).

Os lantanídeos possuem uma baixa solubilidade e fácil precipitação, ligando-se com íons complexos (GOECKE *et al.*, 2015). O La^{3+} é encontrado predominantemente na forma estável oxidativa e, como em outros grupos de metais, a sua estabilidade é fortemente influenciada pelo pH e pela presença de outros íons cátions no ambiente (REZANKA *et al.*, 2016).

Desde a década de 70, os lantanídeos são utilizados na agricultura, mas não se tinha o conhecimento sobre o correto uso dos mesmos e seus possíveis resultados (REDLING, 2006). Esses elementos eram utilizados como estimulantes de crescimento de plantas terrestres e protetor de estresse ambiental (XIE *et al.*, 2014). Os ETRs, hoje, são amplamente usados pela indústria aeroespacial, química, eletrônica e farmacêutica (CASTOR & HEDRICK, 2006). Com o aumento do uso de lantanídeos na agricultura e em âmbito industrial, causou-se uma grande acumulação desses elementos em solos (BIASIOLI *et al.*, 2012), águas (MORENO *et al.*, 2008) e na atmosfera (KATO *et al.*, 2011).

A distribuição e biodisposição dos lantanídeos em ambientes aquáticos, tanto na água como em sedimentos, depende de características físico-químicas do elemento que serão influenciadas por parâmetros químicos como o pH, alcalinidade, força iônica e a presença de complexos orgânicos e inorgânicos (MOERMOND *et al.*, 2001).

Os ETRs são elementos não essenciais, não tendo relatos de processos metabólicos nos quais estão envolvidos (MCGEER *et al.*, 2004). Sabe-se que esse grupo induz facilmente respostas fisiológicas negativas, mas por outro lado, quando usados sob condições específicas, pode haver respostas benéficas ao indivíduo (GOECKE *et al.*, 2015).

Já está bem estabelecido o papel do La^{3+} como bloqueador mecânico de canais iônicos específicos (LOVE *et al.*, 1997; PALASZ & CZEKAJ, 2000) O bloqueio de canais iônicos e a quelação com sítios de ligação proteica e iônica pode resultar em uma alteração na permeabilidade da membrana celular, acarretando em diferenças na concentração iônica intracelular (FRIEDMAN *et al.*, 1998; WANG *et al.*,

2014). Segundo Ono (2000), o La^{3+} possui uma grande afinidade por sítios ativos de Ca^{2+} , gerando uma competição pelos mesmos a partir da disponibilidade dos íons.

Respostas negativas foram observadas em trabalhos como de Zeng e colaboradores (2001), em plantas, mostrando que La^{3+} afeta os mecanismos fisiológicos através da regulação dos níveis de Ca^{2+} . Gao e colaboradores (2003) mostrou que La^{3+} entra na célula vegetal por meio de canais de Ca^{2+} e liga-se a membrana do cloroplasto e mitocôndria.

Em algas, no trabalho conduzido por Nultsch (1979) na microalga verde *Phormidium uncinatum* mostrou que La^{3+} no meio de cultivo bloqueia os canais de transporte de Ca^{2+} na membrana. Em algas pardas, LOVE e colaboradores (1997) aplicou LaCl_3 em cultura de zigotos de *F. serratus* e observou um decaimento de 15 % na fotopolarização dos zigotos, além de prejudicar a adesão e polarização dos mesmos. Já para algas vermelhas, Li e colaboradores (2009) aplicaram La^{3+} em monósporos recém liberados de *P. yezoensis* para que os canais de cálcio fossem bloqueados e o influxo de Ca^{2+} inorgânico cessasse durante o tratamento e observou um baixo índice de germinação entre os monósporos e uma deposição assimétrica de F-actina.

Já efeitos benéficos do uso de La^{3+} foram relatados por Rezanka e colaboradores (2016) que verificou um aumento na taxa fotossintética quando a microalga verde *Desmodesmus quadricauda* era tratada com La^{3+} a uma intensidade de luz baixa. Chen e colaboradores (2000) propôs em seu trabalho com plantas de tabaco, que quando aplicado, *in vivo*, tratamentos com LaCl_3 a uma concentração relativamente baixa, acelera as taxas de reações fotossintéticas e ativa a ribulose bifosfato carboxilase (RuBPase) em plantas de tabaco. O grupo propôs um mecanismo explicando o aumento na taxa fotossintética quando o indivíduo é exposto a tratamentos com La^{3+} , inferindo uma substituição, *in vivo*, do magnésio (Mg^{2+}) central da molécula porfirina, constituinte da clorofila, por metais como os lantanídeos devido sua similaridade físico-químicas.

Assim, o presente trabalho visa um maior conhecimento sobre os efeitos dos lantanídeos, em específico o La^{3+} , frente ao desenvolvimento de tetrásporos da alga vermelha *G. floridanum*. Reconhecendo a importância do uso de ETRs no meio tecnológico e na agricultura e seus possíveis impactos ambientais no ambiente marinho, tendo como modelo de trabalho a alga vermelha com a sua grande importância econômica e ambiental no nicho em que habita.

2. Materiais e Métodos

2.1 Algas e Germinação

A obtenção dos talos férteis e o cultivo dos tetrásporos estão descritos no item 2.1 do capítulo I.

2.2 Desenho experimental

Experimentos iniciais foram feitos com tetrásporos recém liberados tratados com LaCl_3 em concentrações de 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 e 0,8, 2, 4, 8, 16 e 30 mM. Indivíduos tratados com as concentrações abaixo de 2 mM não mostraram diferenças estatísticas em relação ao número de germinados, viáveis, inviáveis e anormais quando as taxas eram comparadas aos resultados obtidos com os tetrásporos controle, sendo assim, não foram utilizadas nos experimentos sequenciais. A concentração de 30 mM de LaCl_3 , apresentou-se como uma dose letal para os tetrásporos, com taxas de inviabilidade permeando 100 %, portanto, também não foi utilizada em experimentos posteriores.

2.3 Tratamentos com Cloreto de Lantânio

A solução estoque de Cloreto de Lantânio (LaCl_3 , S-13743, Fisher Chemical, Bélgica) foi preparada a uma concentração de 100 mM diluída em água do mar esterilizada. A partir da solução estoque, foram feitas três diluições finais em concentrações de 2 mM, 4 mM e 8 mM.

As amostras controle foram incubadas sem nenhum tipo de tratamento, somente com água do mar proveniente do local de coleta.

O tempo de incubação de cada tratamento foi de 6 horas e quatro repetições foram realizadas para cada grupo experimental.

2.4 Análise da morfologia e processos de germinação

As características morfológicas do controle e das amostras tratadas de tetrásporos de *G. floridanum* foram analisadas e fotografadas com um microscópio (Leica DM500). A análise foi realizada através da avaliação das seguintes características: 1) tetrásporos com formação do tubo germinativo (germinados), 2) tetrásporos inviáveis, com pigmentação verde (inviáveis), 3) tetrásporos não germinados, mas

viáveis (viáveis) e 4) tetrásporos com o citoplasma na pigmentação rosácea (anormais). As características morfológicas foram analisadas em 100 tetrásporos por lâmina para os diferentes tratamentos e em quadruplicata (n=400 tetrásporos).

2.5 Análise em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A metodologia para a MET está descrita no item 2.5 do capítulo I e foi realizada das concentrações de 2 mM e 8 mM de LaCl_3 .

2.6 Análise dos Pigmentos Fotossintéticos

Para extrair pigmentos fotossintéticos (clorofila), foram coletadas amostras de esporos de lâminas contendo aproximadamente 0,5 mL (n= 47.000) para o controle e todos os tratamentos. Clorofila *a* (*Chla*) foi extraído em 2 mL de dimetil sulfóxido (DMSO, Merck, Darmstadt, FRG) a 40 ° C, durante 30 min, usando um homogeneizador de tecidos (Hiscox e Israelstam 1979; Schmidt et al. 2010), e quantificado por espectrofotometria (UV / VIS, Hitachi, modelo 100-20; Hitachi Co., Japão) de acordo com Wellburn (1994).

Para quantificar o teor de ficobiliproteínas, esporos foram coletados usando o mesmo processo descrito acima. No entanto, a extração foi realizada em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,4, a 4 ° C no escuro, seguido por centrifugação a 7000 rpm durante 4 min Depois de um segundo ciclo de centrifugação a 4000 rpm durante 3 min, um *pellet* foi obtido a partir do qual 0,200 µL foi pipetado para cada poço da placa. Níveis de ficobiliproteína [aloficocianina (APC), ficocianina (PC) e ficoeritrina (PE)] foram determinadas por espectrofotometria e calculados utilizando as equações de Kursar e colaboradores (1983).

2.7 Análise das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

A solução estoque da molécula DCFH-DA (2',7'-diclorodihidro fluoresceína diacetato, Sigma- Aldrich, Alemanha) foi preparada a uma concentração de 10 mM diluída em DMSO. A partir da solução estoque foi preparada uma solução a 50 µM, diluída em água do mar esterilizada. A quantificação da fluorescência da molécula de DCF (2'-7'-diclorofluoresceína fluorescente) foi feita em placas de 24 poços com réplicas independentes para cada amostra, junto com um controle

positivo (H₂O₂ puro) e negativo (água MiliQ). Uma leitura inicial da fluorescência foi feita antes dos tetrásporos serem incubados com a solução do DCFH-DA, sendo que essa leitura primária foi considerada o branco. Foram incubados 0,5 mL (n = 47.000) de tetrásporos de cada amostra juntamente com 1 mL do DCFH-DA 50 µM por 1 hora, protegidos da luminosidade com o auxílio de papel alumínio. As leituras de fluorescência foram feitas a partir da espectofotometria excitando em 488 nm e emitindo em 525 nm, realizando uma subtração da fluorescência final pela intensidade de fluorescência inicial (branco), sendo que o controle equivale a 100 %. As imagens da molécula fluorescente DCF foram obtidas com o auxílio do MCVL - DMI6000B (Leica TCS SP-5, Alemanha) do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME). Após 6 horas de cultivo dos tetrásporos controle e tratados sobre a lâmina, os mesmos foram incubados com 1 mL do DCFH-DA 50 µM por 1 hora e foram visualizados no MCVL com excitação em 488 nm e emissão de 500 a 550 nm.

2.8 Análise Estatística

Nos dados obtidos foram feitas análises descritivas: normalidade, média e desvio padrão. Conforme a normalidade e homogeneidade das variâncias, foram feitos testes não-paramétricos usando o teste de Kruskal-Wallis e posteriormente Wilcoxon-Mann-Whitney para identificar a existência de diferenças estatísticas; já para os dados com a distribuição paramétrica foi realizado Análise de Variância (ANOVA) de uma via. Para a identificação de diferentes grupos foi usado o teste comparativo *Post Hoc*, Tukey. As análises estatísticas foram feitas com o auxílio do programa *IBM SPSS STATISTICS 22*, considerando $p \leq 0.05$ como estatisticamente significante.

3. Resultados

3.1 Morfologia e Taxa de Germinação

Após 6 horas de cultivo, os tetrásporos controle de *G. floridanum* atingiram um índice percentual de 46,8 % de germinação, com tubo germinativo formado e com deslocamento das organelas citoplasmáticas na direção do tubo (Fig. 10 a-c, Tabela 02). Também foram visualizados

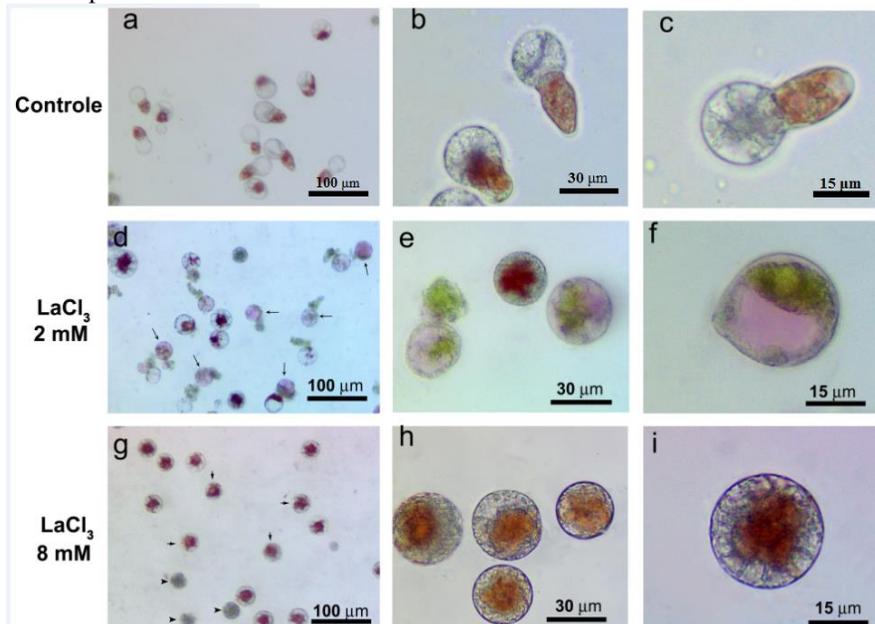
42 % dos tetrásporos viáveis, com coloração avermelhada típica da espécie, porém sem formação do tubo germinativo (Fig. 10 a, Tabela 02). A taxa de tetrásporos não viáveis foi baixa contabilizando 9,6 % do total (Tabela 02).

Com o LaCl_3 , nas concentrações testadas, tetrásporos não foram visualizados com formação do tubo germinativo (Fig. 10 d-i, Tabela 02). Na concentração de 2 mM, a viabilidade dos tetrásporos foi de 34% e, não diferiu estatisticamente das taxas encontradas no controle, mostrando-se diferentes estatisticamente das concentrações de 4 mM e 8 mM de LaCl_3 , que apresentaram uma viabilidade de 75,8 % e 83,1 %, respectivamente. A concentração de 2 mM de LaCl_3 , mostrou uma taxa de 28 % de tetrásporos considerados anormais, que apresentavam um citoplasma rosáceo e cloroplastos esverdeados (Fig. 10 d-f). Tetrásporos anormais foram observados em menor porcentagem nos tratamentos de 4 mM e 8 mM, com 1,1 % e 1,8 %, respectivamente, sem diferenças estatísticas entre eles. Também nesses tratamentos foi possível observar semelhança estatística quanto à taxa de tetrásporos inviáveis, tendo percentuais medianos de 22,1 % e 16,4 %, respectivamente. As amostras de concentração de 4 mM e 8 mM apresentaram as maiores taxas de viabilidade de tetrásporos, sendo diferentes estatisticamente dos outros tratamentos (Fig. 10 h, i).

Tabela 02 - Efeitos dos tratamentos na germinação *G. floridanum* após 6 horas de cultivo. Os dados são apresentados em quadruplicata (100 esporos cada; n = 400). Média \pm DP. Letras indicam diferenças significativas de acordo com o *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$)

<i>Tratamentos</i>	Germinados	Viáveis	Inviáveis	Anormais
Controle	46,8 \pm 6,3b	42,0 \pm 5,8a	9,6 \pm 4a	0 \pm 0a
LaCl_3 2 mM	0 \pm 0,4 ^a	34 \pm 6,3a	38,6 \pm 5,4c	28 \pm 5,1b
LaCl_3 4 mM	0a	75,8 \pm 8,0b	22,1 \pm 7,7b	1,1 \pm 1,6a
LaCl_3 8 mM	0a	83,1 \pm 4,7b	16,4 \pm 4,7ab	1,8 \pm 1,2a

Figura 10 - Micrografia de luz de tetrásporos de *G. floridanum* após 6 horas de cultivo. **a-c.** Tetrásporos controle. **d-f.** Tetrásporos tratados com LaCl_3 2 mM. **d.** Setas indicando tetrásporos com o citoplasma rosáceo, considerados anormais. **g-i.** Tetrásporos tratados com LaCl_3 8 mM.



3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Após seis horas de cultivo foi possível observar os tetrásporos controle, em sua maioria, com formação do tubo germinativo, sendo possível observar a migração dos cloroplastos partindo do tetrásporo em direção ao tubo germinativo (Fig. 11 a). Uma parede celular bem organizada e espessa circunda o tetrásporo e o tubo germinativo recém formado conferindo proteção estrutural e ao ambiente (Fig. 11 b). Próximo a parede celular do tetrásporo, foi possível visualizar a deposição de vesículas provenientes dos corpos de Golgi (Fig. 11 b, c). Os corpos de Golgi apresentavam-se hipertróficos e em grande quantidade principalmente na ponta do tubo germinativo (Fig. 11 c, d). Os cloroplastos visualizados apresentaram organização dos tilacóides característico do filo, onde o tilacóide periférico envolve os tilacóides paralelos (Fig. 11 e).

Os tetrásporos de *G. floridanum* tratados com LaCl_3 2 mM apresentaram diferenças ultraestruturais quando comparados ao controle. Depois de 6 horas de cultivo, os tetrásporos não apresentaram a polarização do conteúdo citoplasmático característico e nem, por consequência, a formação do tubo germinativo. Alguns tetrásporos apresentaram um citoplasma denso com grande quantidade de grãos de amido, presença de cloroplastos e formação de fina parede celular (Fig. 12 a). Os grãos de amido estavam dispostos por todo o citoplasma e em tamanhos variados (Fig. 12 b, c). Os cloroplastos apresentavam alterações com presença de tilacóides dilatados (Fig. 12 b, c), diferenciando-se do padrão característico. A parede celular foi observada delgada e desorganizada (Fig. 12 a d), com vesículas com conteúdo eletrtransparente sendo depositado. Próximo a essas vesículas, foi possível observar diversos corpos de Golgi estruturalmente padrão do controle (Fig. 12 e) como também grandes vesículas com material elétron-denso atípico (Fig. 12 f). Já outros tetrásporos apresentaram citoplasma vesiculado e muito degradado (Fig. 12 g-l). Presença de cloroplastos totalmente degradados com tilacóides menos aparentes e com tamanhos e espaçamentos desiguais (Fig. 12 g). É possível observar uma grande quantidade de vesículas, com origem provável nos corpos de Golgi (Fig. 12 h, i) sendo depositadas na parede celular e acumuladas no interior do citoplasma. Material eletron-denso foi observado circundando essas vesículas (Fig. 12 j-l, cabeça de seta) juntamente com mitocôndrias com cristas não definidas. Nota-se também algumas vesículas, com conteúdo eletrodense, próximas da membrana do tetrásporo (Figura 1, cabeça de seta).

Nos tetrásporos tratados com LaCl_3 8 mM as condições do estágio de desenvolvimento foram parecidas com o tratamento anterior, onde mostrou-se uma falta de polarização do conteúdo citoplasmático sem formação do tubo germinativo (Fig. 13 a-d). Esses tetrásporos, em sua maioria, permaneciam com a organização citoplasmática inicial, onde os grãos de amido se encontram na periferia e os cloroplastos na região central (Fig. 13 a). Porém os grãos de amido são visualizados em grande quantidade e os cloroplastos apresentam-se alterados com diversas dilatações entre os tilacóides (Fig. 13 b). Tetrásporos em avançado processo de degradação também foram visualizados, os quais apresentavam citoplasma com somente grãos de amido ou grande quantidade de vesículas (Fig. 13 c, d).

Figura 11 - Micrografia eletrônica de transmissão do controle de tetrásporos de *G. floridanum* após 6 horas de cultivo. **a.** Visão longitudinal de um tetrásporo com o tubo germinativo em formação. **b.** Detalhe do tetrásporo com vários corpos de Golgi e parede celular. **c.** Detalhes da parede celular, corpos de Golgi, mitocôndria, cloroplastos e grãos de amido. **d.** Detalhe do tetrásporo com vesícula depositando conteúdo na parede celular, corpos de Golgi e cloroplasto. **e.** Detalhes de vesiculações perto da parede celular e cloroplasto. GT, tubo germinativo. C, cloroplasto. CW, parede celular. M, mitocôndria. S, amido das florídeas. G, corpos de Golgi. *, vesículas.

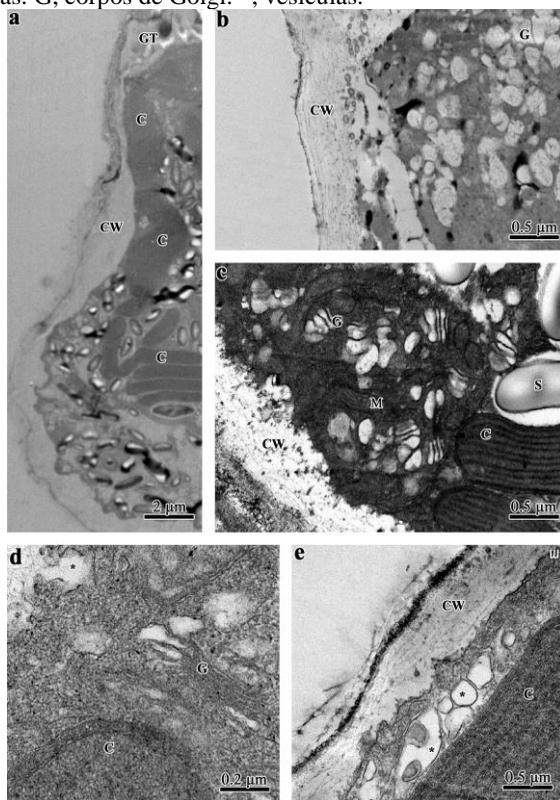


Figura 12 - Micrografia eletrônica de transmissão de tetrásporos de *G. floridanum* tratados com LaCl_3 2 mM após 6 horas de cultivo. **a-c.** Visão geral da organização citoplasmática das principais organelas, com detalhes para cloroplastos com tilacóides alterados, citoplasma granuloso e grande quantidade de grãos de amido das florídeas. **d-f.** Visão periférica do tetrásporo, com detalhes para grandes vacúolos, parede celular atípica e estruturas eletrondensas no citoplasma. **g-l.** Detalhes para o citoplasma granuloso e vesiculado, com pontuações eletrondensas circundando vesículas e membrana celular (cabeça de seta). C, cloroplasto. CW, parede celular. M, mitocôndria. S, amido das florídeas. G, corpos de Golgi. *, vesículas

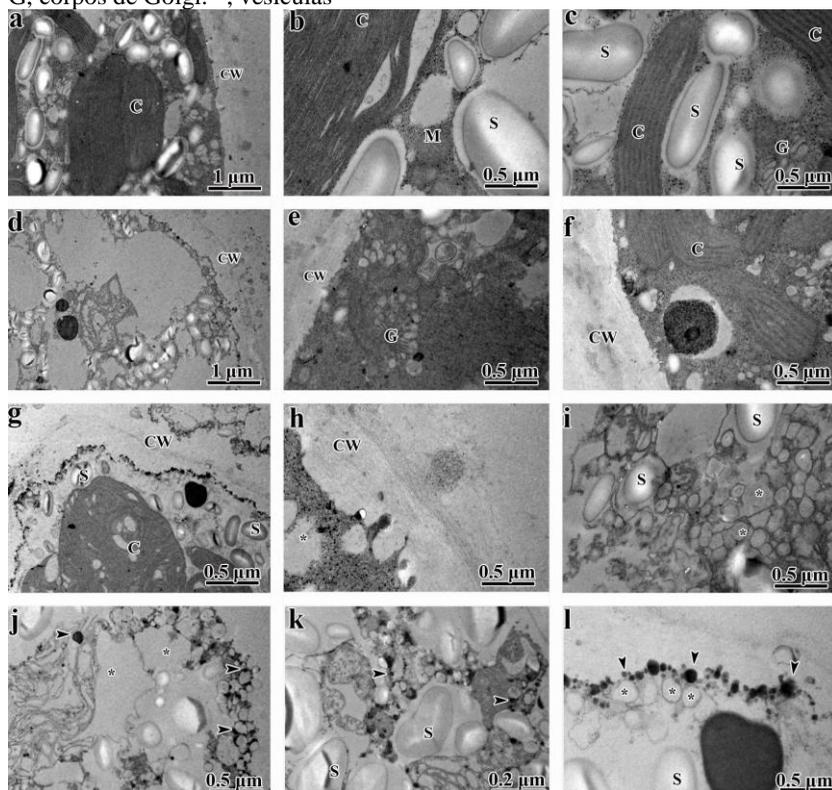
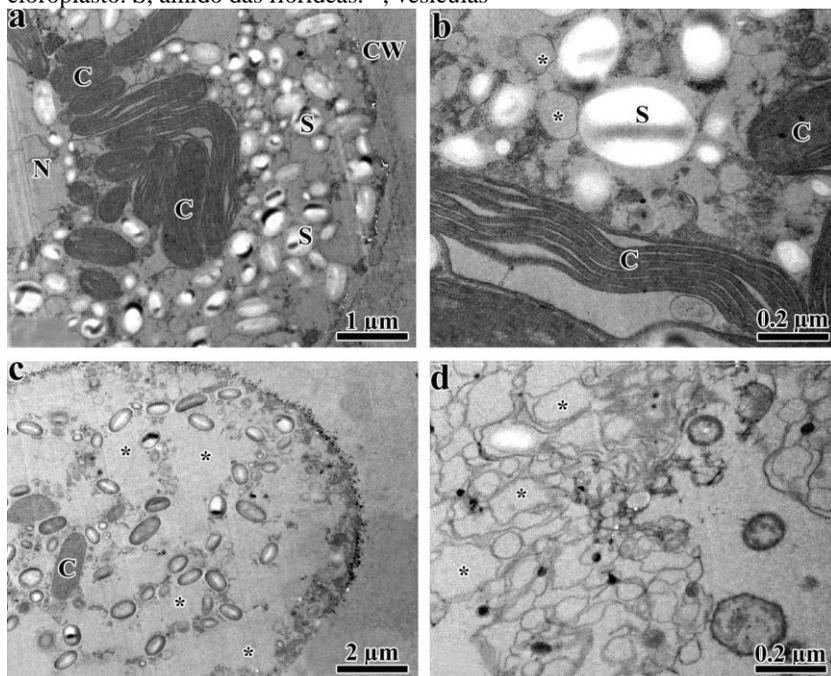


Figura 13 - Micrografia eletrônica de transmissão de tetrásporos de *G. floridanum* tratados com LaCl_3 8 mM após 6 horas de cultivo. **a.** Visão geral do tetrásporo detalhando a posição inicial dos cloroplastos, contornando o núcleo, e citoplasma repleto de grãos de amido. **b.** Detalhes do cloroplasto com tilacóides alterados. **c-d.** Tetrásporos inviáveis, com grande quantidade de vesículas. N, núcleo. C, cloroplasto. S, amido das florídeas. *, vesículas



3.3 Pigmentos Fotossintetizantes

As oscilações na concentração de clorofila entre os tetrásporos controle e os tratados com LaCl_3 não mostraram ser estatisticamente diferentes (Fig. 14).

As concentrações do pigmento aloficocianina dos tetrásporos tratados com LaCl_3 em relação aos tetrásporos controle foram significativamente alteradas, havendo uma queda nas três concentrações do tratamento. Sendo que os tratamentos com LaCl_3 2 e 8 mM apresentaram as menores concentrações significativas com uma queda de 60 % e 67 %, respectivamente, em relação aos tetrásporos controle (Fig. 15).

As concentrações do pigmento ficocianina dos tetrásporos tratados com LaCl_3 2, 4 e 8 mM tiveram uma queda de mais de 150 % em relação aos tetrásporos controle, diferindo-se estatisticamente o grupo controle e o tratado (Fig. 16).

As concentrações do pigmento ficoeritrina dos tetrásporos tratados com LaCl_3 2 e 8 mM tiveram as menores médias, com uma queda de, respectivamente, 58 % e 47 % quando comparadas a média dos tetrásporos controle (Fig. 17).

Figura 14 - Concentração de clorofila *a* de tetrásporos de *G. flordanum* após 6 horas de cultivo. Valores representados por média \pm erro padrão (n=4)

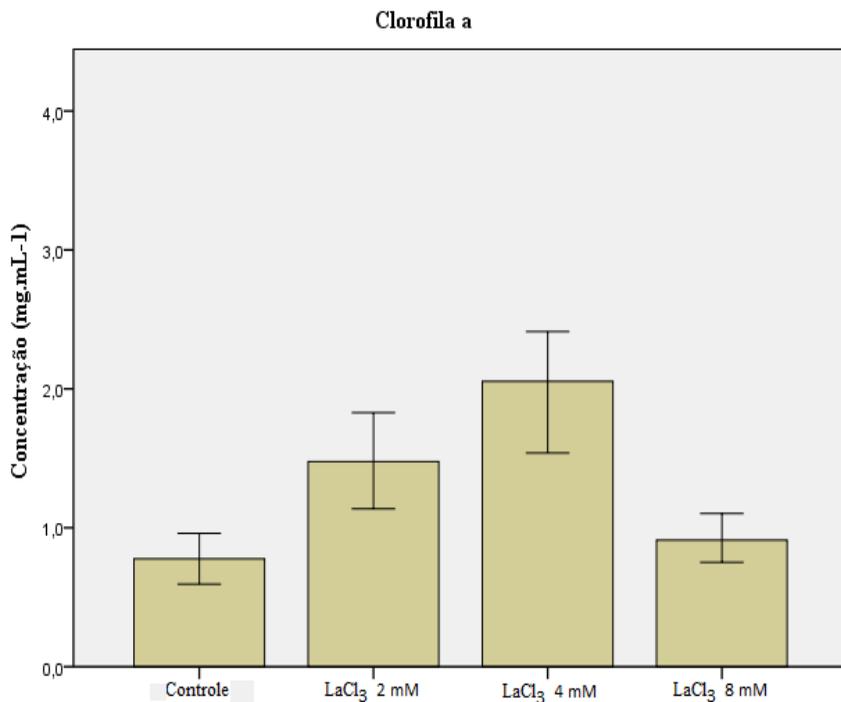


Figura 15 - Concentração de Aloficocianina de tetrásporos de *G. floridanum* após 6 horas de cultivo. Valores representados por média \pm desvio padrão (n=4). As letras indicam diferenças estatísticas conforme o teste ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* Tukey.

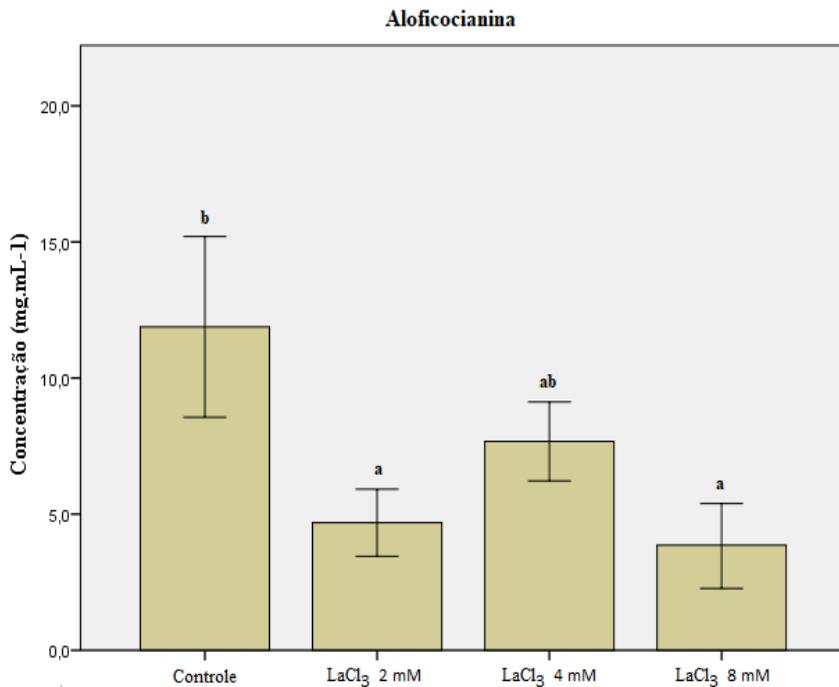


Figura 16 - Concentração de Ficocianina de tetrásporos de *G. floridanum* após 6 horas de cultivo (n=4). As letras indicam diferenças estatísticas conforme o teste não paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney seguido pelo teste de Kruskal-Wallis

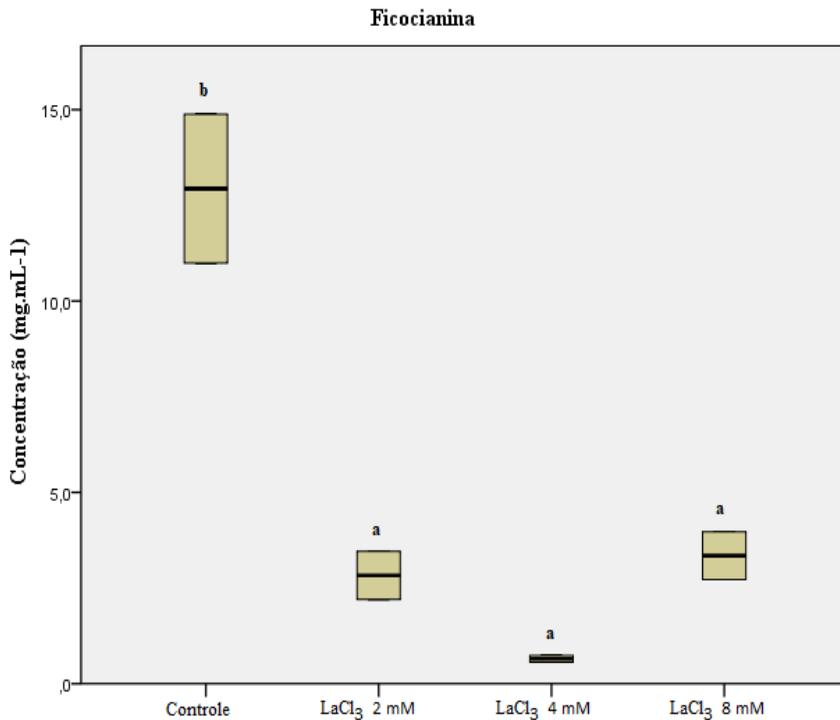
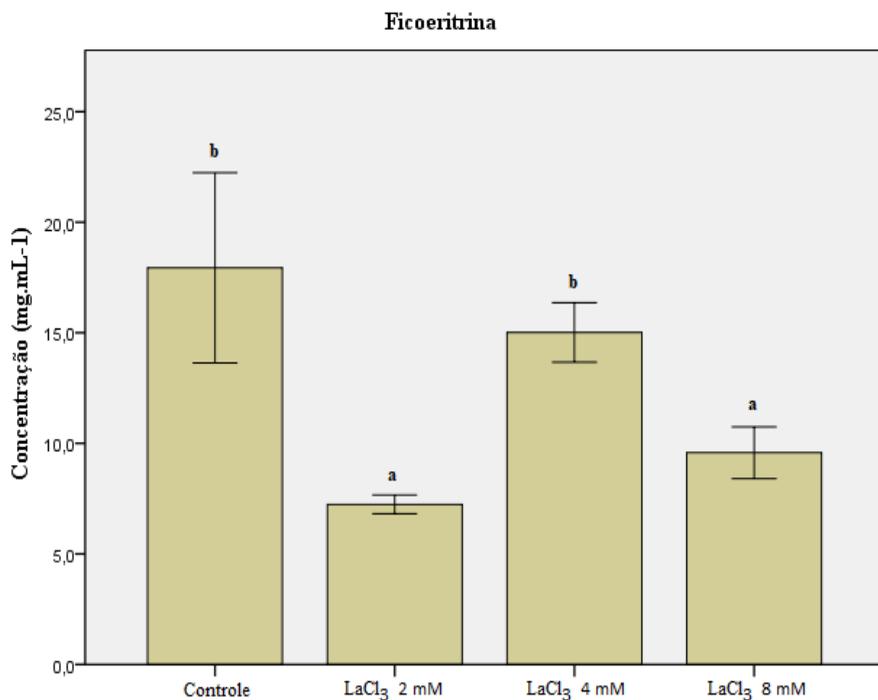


Figura 17 - Concentração de Ficoeritrina de tetrásporos de *G. floridanum* após 6 horas de cultivo. Valores representados por média \pm desvio padrão (n=4). As letras indicam diferenças estatísticas conforme o teste ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* Tukey.



3.4 Espécies Reativas de Oxigênio

A fluorescência da molécula DCF mostra-se mais intensa em tetrásporos tratados com LaCl₃ (Fig. 18 b, c) do que quando comparadas ao controle (Fig. 18 a). Em tetrásporos tratados com LaCl₃ 4 mM observou-se um aumento significativo na porcentagem de fluorescência da molécula, contabilizando 117 % a mais do que nos tetrásporos controle (Fig. 19). Já em tetrásporos tratados com LaCl₃ 8 mM observou-se uma queda de 63 % na fluorescência da molécula DCF.

Figura 18 - Microscopia a laser confocal de tetrásporos de *G. floridanum* após 6 horas de cultivo com marcador DCFH-DA. **a.** Tetrásporos controle com tubo germinativo formado e com divisões **b.** Tetrásporos tratados com LaCl_3 2 mM com cloroplastos (vermelho) localizados na região central. **c.** Tetrásporos tratados com LaCl_3 4 mM. Fluorescência da molécula de DCF em verde. Cloroplasto em amarelo (a, c) e vermelho (b).

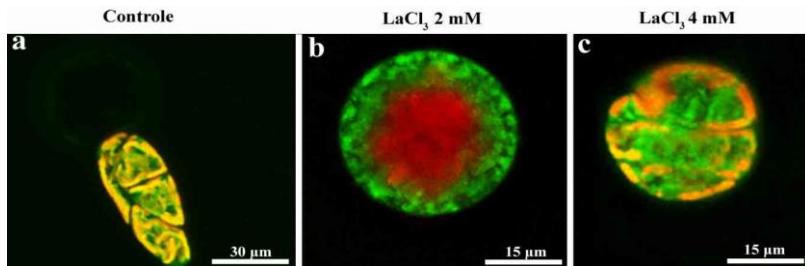
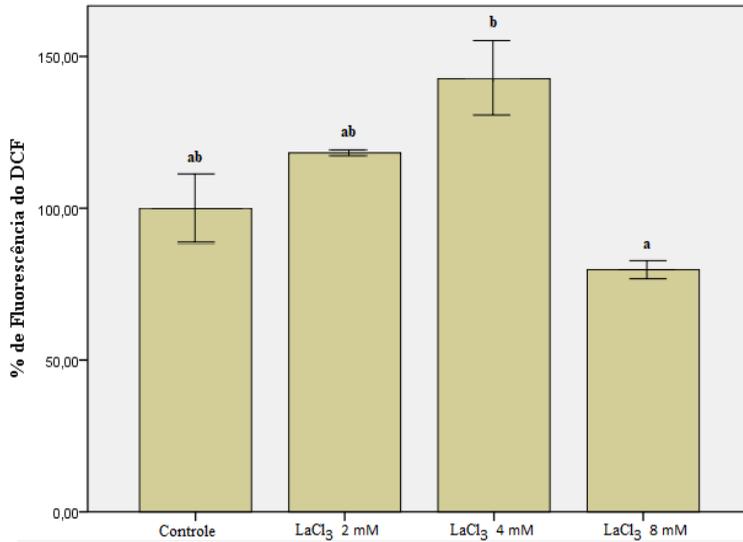


Figura 19 - Porcentagem de fluorescência do DCF em tetrásporos de *G. floridanum* após 6 horas de cultivo sob influência de três concentrações de LaCl_3 . Valores representados por média \neq desvio padrão ($n=4$). As letras indicam diferenças estatísticas conforme o teste ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* Tukey.



4. Discussão

Como consequência do minério e utilização dos elementos de terra rara na área industrial e agrícola, um acúmulo destes metais nos sistemas aquáticos e terrestre vem sendo intensificado ao longo do tempo (KHAN *et al.*, 2017). Apesar do aumento nos trabalhos avaliando os efeitos tóxicos em organismos aquáticos expostos a estes metais, ainda são

escassos os que abordam especificamente a fase inicial do desenvolvimento desses organismos. No presente trabalho, tetrásporos de *Gelidium floridanum* tratados com LaCl_3 , durante o período inicial da germinação, apresentaram mudanças morfológicas e ultraestruturais, assim como nas taxas de germinação.

Tetrásporos cultivados durante 6 horas sob o efeito dos tratamentos de LaCl_3 não apresentaram a formação do tubo germinativo. A formação do mesmo é dependente do citoesqueleto e corpos de Golgi, sendo que, de forma indireta, a eficiência desses componentes está relacionada com influxos de cálcio extracelular. Sabe-se que íons La^{3+} agem como bloqueadores de canais de Ca^{2+} , podendo também, ser competitivos quanto aos sítios de ligação do Ca^{2+} na parede celular. Pressupõem-se que o tratamento com a concentração mais baixa (2 mM) de LaCl_3 já tenha sido suficiente para que não ocorra de maneira satisfatória o influxo de Ca^{2+} não sendo possível a germinação dos tetrásporos. As taxas de viabilidades dos tetrásporos nas três concentrações de LaCl_3 foram altas em relação ao controle, podendo estar ligada as taxas nulas de germinação.

Os tetrásporos quando tratados com LaCl_3 2 mM apresentaram anormalidades em sua morfologia, apresentando um citoplasma rosáceo com cloroplastos esverdeados na periferia celular. Esta coloração provavelmente ocorre devido a desorganização dos pigmentos acessórios presentes na superfície dos tilacóides. Segundo Gao e colaboradores (2003) o íon LaCl_3 tem a capacidade de entrar na célula vegetal através de canais de íons, com propriedades semelhantes, e gerar resultados fisiológicos negativos ao se ligar na membrana do cloroplasto. No nosso trabalho, as imagens de microscopia eletrônica de transmissão corroboram as alterações observadas na microscopia de luz, onde mostram alterações ultraestruturais nos cloroplastos, com tilacóides dilatados e rompidos, induzidos pela presença do LaCl_3 . De Oliveira e colaboradores (2015) também observaram alterações ultraestruturais semelhantes nos cloroplastos e tilacóides durante as fases iniciais de *Glycine max* quando tratados com lantânio, sendo que o dano na membrana pode ter acontecido devido a peroxidação lipídica, afetando diretamente a membrana da organela. Por consequência do tratamento, a desagregação dos tilacóides e os danos gerado pelo metal na membrana da organela pode ter causado o extravasamento de pigmentos fotossintetizante secundários para o citoplasma, deixando-o rosáceo e o cloroplasto esverdeado, justificando a redução dos pigmentos acessórios.

Já nos tetrásporos tratados com LaCl_3 8 mM foram infrequentes os casos com anormalidades morfológicas e apesar das alterações ultraestruturais dos cloroplastos se mostrarem semelhante aos tratados com a menor concentração, o citoplasma não apresentou uma coloração rosácea, porém teve redução na concentração dos pigmentos acessórios indicando que o dano na superfície do tilacóide se manteve. Pressupõem-se que devido ao aumento nas concentrações do tratamento, a biodisponibilidade do LaCl_3 tenha sido alterada, atingindo um platô de saturação. A dificuldade em medir a biodisponibilidade do lantânio afeta os trabalhos com o mesmo, gerando resultados contraditórios entre concentrações de tratamentos (VAN OOSTERHOUT & LÜRLING, 2013). Quando o lantânio se apresenta na forma de íon (La^{3+}) sua biodisponibilidade é maior, podendo ser facilmente comprometida a partir de fatores como pH, temperatura e a sua capacidade de associação com ligantes orgânicos e inorgânicos (KHAN *et al.*, 2017). O La^{3+} , devido suas propriedades físico-químicas, tem a facilidade de sequestrar nutrientes essenciais no meio, como o fosfato, gerando consequências no crescimento do indivíduo (KHAN *et al.*, 2017). Estas informações sugerem que, os resultados obtidos no presente trabalho não estejam somente relacionados com bloqueios de canais de cálcio como indicado na literatura mas também por uma redução na disponibilidade de nutrientes geradas pela presença do LaCl_3 .

Outro efeito negativo observado foi a desorganização atípica da parede celular, nas duas concentrações de LaCl_3 , provavelmente devido a alteração da ligação covalente entre as microfibrilas e elementos da matriz. Como também a insuficiência da deposição do conteúdo de parede celular trazidos por vesículas provenientes do Golgi através de filamentos de actina devido a falta da cascata de sinalização dependente de cálcio (LIU *et al.*, 2012). Provavelmente, a parede celular desorganizada e atípica observada nas duas concentrações de LaCl_3 seja devido a alteração da ligação covalente entre as microfibrilas e pectinas, assim como, a insuficiência da deposição do conteúdo de parede celular trazidos por vesículas provenientes do Golgi através de filamentos de actina devido a falta da cascata de sinalização dependente de cálcio. Segundo Liu e colaboradores (2012), a competitividade do La^{3+} por sítios de Ca^{2+} , pode levar a uma substituição dos íons, ocorrendo esta mudança o La^{3+} se ligar na estrutura da membrana plasmática e lamela média, podendo mudar a orientação das microfibrilas bem como as pectinas da parede celular.

Em tetrásporos tratados com LaCl_3 2 mM foi possível observar na microscopia eletrônica de transmissão um citoplasma denso e granuloso, com um acúmulo de material eletrondenso circundando tanto

a membrana plasmática quanto vesículas mais periféricas. Sugere-se que esse acúmulo de material eletrodenso sejam depósitos de lantânio que permearam a parede celular e a membrana plasmática permanecendo livres no citoplasma ou agregados a própria membrana celular e a organelas. Já com os tetrásporos tratados com LaCl_3 8 mM essa deposição mostra-se mais acentuada na área da membrana plasmática e poucas grânulações livres no citoplasma.

Os tetrásporos tratados com LaCl_3 obtiveram um aumento significativo na fluorescência da molécula de DCF, indicando que o metal causou um aumento nas EROs, especialmente na maior concentração. Segundo Wang e colaboradores (2007) o La induz o estresse oxidativo diminuindo as atividades de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase e catalase, além de estimular a produção de espécies reativas de oxigênio, resultando em peroxidação lipídica. Corroborando a morfologia degradada dos tilacóides dos cloroplastos visto na MET, sugere-se ser consequência do aumento das EROs gerando uma peroxidação lipídica.

Pelos resultados obtidos, podemos concluir que o cloreto de lantânio interfere na fisiologia e na morfologia dos cloroplastos, bem como na organização subcelular dos esporos impedindo os processos iniciais de desenvolvimento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho mostrou-se essencial para um maior entendimento sobre o desenvolvimento dos tetrásporos de *G. floridanum*, onde o Ca^{2+} foi essencial para a germinação dos tetrásporos. Este íon é necessário para a polarização inicial na formação do tubo germinativo, influenciando a organização dos F-actina, a partir do gradiente de concentração do íon que acaba por sinalizar a polimerização dos mesmos, e consequente a polarização, o direcionamento de proteínas necessárias a formação de uma parede celular fundamental no início do processo germinativo. Outro importante resultado observado foi a aceleração do processo germinativo em um ambiente com uma maior disponibilidade de Ca^{2+} , sendo de grande importância para utilização e adaptação de novas metodologias de cultivo de esporos de *G. floridanum*.

Os tratamentos realizados com o Ionóforo A23187 e o LaCl_3 foram realizados com a única finalidade de facilitar o influxo de cálcio e bloquear os canais de cálcio, respectivamente. Mas os resultados

demonstraram que tanto o Ionóforo A23187 quanto o LaCl_3 apresentaram outros efeitos além do aumento ou diminuição do cálcio intracelular. O LaCl_3 bloqueou a germinação e interferiu no funcionamento dos cloroplastos, observado pelas alterações na sua ultraestrutura e diminuição dos seus pigmentos acessórios. Para estes dois agentes, trabalhos deverão ser realizados para entender sua possível toxicologia e efeitos celulares, como também ação quelante de nutrientes do meio.

Este trabalho traz o Ca^{2+} como agente imprescindível à germinação de tetrásporos de *G. Floridanum*, onde a adição do íon ao local de cultivo de tetrásporos resulta em uma rápida e efetiva germinação. A supressão parcial ou total do mesmo, acarreta em problemas nos processos iniciais impedindo que o tetrásporo germine.

Trabalhos deverão investigar os efeitos da adição do íon em cultivo de talos adultos da espécie e na liberação de tetrásporos, afim de estudar sobre a atuação do Ca^{2+} como regulador de outros mecanismos. A quantificação e imageamento do influxo de Ca^{2+} nos tetrásporos é um estudo que trará resultados precisos da biodisponibilidade do Ca^{2+} para esses indivíduos e concentrações mais eficazes para a adição do íon ao cultivo.

O LaCl_3 deixa em aberto questionamentos que ampliam a problemática do bloqueio e adição de Ca^{2+} , também provoca a discussão sobre a interação do lantânio com outros micronutrientes essenciais ao desenvolvimento do indivíduo, como o fósforo e alguns metais. O aparato fotossintético deverá ser avaliado em tetrásporos e talos da espécie, depois do tratamento com o metal. A quantificação da taxa fotossintética pela utilização de fluorômetro modulado (*PAM*), trará dados quantitativos a respeito da interação do lantânio com a estrutura do ficobilissoma.

REFERÊNCIAS

- ANDERHAG, P.; HEPLER, P. K.; LAZZARO, M. D. Microtubules and microfilaments are both responsible for pollen tube elongation in the conifer *Picea abies* (Norway spruce). *Protoplasma*, vol. 214, pp. 141–157, 2000.
- AKI ONO, T. Effects of lanthanide substitution at Ca²⁺-site on the properties of the oxygen evolving center of Photosystem II. *J. Inorg. Biochem.*, vol. 82, no. 1–4, pp. 85–91, 2000.
- AVANZINI, A. La ultraestructura de las esporas de Rhodophyta. *Insula* 19:7–10, 1989.
- BELYAVSKAYA, N. A. Gravicurvature loss, changes in ultrastructure and calcium balance of pea root statocytes treated with EGTA. *J. Gravit. Physiol.* 8(1), P33–34, 2001.
- BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 1, no. 1, pp. 11–21, 2000.
- BIASIOLI, M.; FABIETTI, G.; BARBERIS, R.; AJMONE-MARSAN, F. An appraisal of soil diffuse contamination in an industrial district in northern Italy. *Chemosphere*, vol. 88, no. 10, pp. 1241–1249, 2012.
- BOO, G. H.; KIM, K. M.; NELSON, W. A. Riosmena-Rodríguez, K. J. Yoon, and S. M. Boo. Taxonomy and distribution of selected species of the agarophyte genus *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.*, vol. 26, no. 2, pp. 1243–1251, 2014.
- BOUZON, Z. L.; OURIQUES L. C.; OLIVEIRA, E. C. Spore adhesion and cell wall formation in *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Gelidiales). *J. Appl. Phycol.*, vol. 18, no. 3–5, pp. 287–294, 2006.
- BOUZON Z. L.; OURIQUES L. O.; OLIVEIRA E. C.

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

CALLOW, M. E.; CRAWFORD, S.; WETHERBEE, R.; TAYLOR, K.; FINLAY, J. A.; CALLOW, J. A. Brefeldin A affects adhesion of zoospores of the green alga *Enteromorpha*. *J. Exp. Bot.*, vol. 52, no. 360, pp. 1409–1415, 2001.

CASTOR, S. B.; HEDRICK, J. B.; Rare Earth Elements. *Industrial Minerals and Rocks*, pp. 769–792, 2006.

CHEN, W. J.; GU, Y. H.; ZHAO, G. W.; TAO, Y.; LUO, J. P.; HU, T. D. Effects of rare earth ions on activity of RuBPcase in tobacco. *Plant Sci.*, vol. 152, no. 2, pp. 145–151, 2000.

CHOJNACKA K.; KIM, S. Introduction of Marine Algae Extracts. *Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications*, 1st ed., S.-K. K. and K. Chojnacka, Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 1–14, 2015.

CRAGG, P. J.; Ion Channels and Ionophores. *Encycl. Inorg. Bioinorg. Chem.*, pp. 1–20, 2015.

CONE, K. R. R. & R. Polarization of Fucoid Eggs by a Calcium ionophore Gradient. *Science* (80-.), vol. 207, no. 4426, pp. 77–78, 1980.

DAS, T.; SHARMA, A.; TALUKDER, G. Effects of lanthanum in cellular systems - A review. *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 18, no. 1, pp. 201–228, 1988.

DEDKOVA, E. N.; SIGOVA, A. A.; ZINCHENKO, V. P. Mechanism of action of calcium ionophores on intact cells: ionophore-resistant cells. *Membr. Cell Biol.*, vol. 13, no. 3, pp. 357–68, 2000.

DENIAUD-BOUËT, E.; KERVAREC, N.; MICHEL, G.; TONON, T.; KLOAREG, B.; HERVÉ, C. Chemical and enzymatic fractionation of cell walls from Fucales: Insights into the structure of the extracellular matrix of brown algae. *Ann.*

Bot., vol. 114, no. 6, pp. 1203–1216, 2014.

DERKSEN J.; RUTTEN T.; AMSTEL T. V.; WIN A.; DORIS F.;

STEER M. Regulation of pollen tube growth. *Acta Botanica Neerlandica*. 44:93-119. 1995.

FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2012. Food and Agriculture Organization, Rome, p 209. ISBN 1020-5489. 2012.

FERARU, E.; FERARU, M. I.; KLEINE-VEHN, J.; MARTINIERE, A.; MOUILLE, G.; VANNESTE, S.; VERNHETTES, S.; RUNIONS, J.; FRIML, J. PIN Polarity Maintenance by the Cell Wall in Arabidopsis. *Current Biology*. 21: 338-343, 2011.

Filho”). Rio Claro, SP. 107p. 2002.

FLETCHER, R. L.; CALLOW, M. E. The settlement, attachment and establishment of marine algal spores. *Br. Phycol. J.*, vol. 27, no. 3, pp. 303–329, 1992.

FRIEDMAN, H.; MEIR, S.; ROSENBERGER, I.; HALEVY, A. H.; KAUFMAN, P. B.; PHILOSOPH-HADAS, S. Inhibition of the gravitropic response of snapdragon spikes by the calcium-channel blocker lanthanum chloride. *Plant Physiol.*, vol. 118, no. 2, pp. 483–492, 1998.

FRIEDLANDER, M. Advances in cultivation of Gelidiales. *J. Appl. Phycol.*, vol. 20, no. 5, pp. 451–456, 2008.

GAO, Y.; ZENG, F.; YI, A; PING, S.; JING, L. Research of the entry of rare earth elements Eu³⁺ and La³⁺ into plant cell. *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 91, no. 3, pp. 253–265, 2003.

GELDNER, N. Cell polarity in plants: A PARspective on PINs. *Current Opinion in Plant Biology*. 12: 42-48, 2009.

GOECKE, F. et al., Use of lanthanides to alleviate the effects of

- metal ion-deficiency in *Desmodosmus quadricauda* (Sphaeropleales, Chlorophyta). *Front. Microbiol.*, vol. 6, no. JAN, pp. 1–12, 2015.
- GUIMARÃES, S. M. P. B. *Gelidium* in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jard Botânico do Rio Janeiro. 2014
- HABLE, W. E. Rac1 signaling in the establishment of the fucoïd algal body plan. *Front. Plant Sci.*, vol. 5, no. December, pp. 1–6, 2014.
- HABLE, W. E.; HART, P. E. Signaling mechanisms in the establishment of plant and fucoïd algal polarity,” *Mol. Reprod. Dev.*, vol. 77, no. 9, pp. 751–758, 2010.
- HAQUE, N.; HUGHES, A.; LIM, S.; VERNON, C. Rare Earth Elements: Overview of Mining, Mineralogy, Uses, Sustainability and Environmental Impact. *Resources*, vol. 3, no. 4, pp. 614–635, 2014.
- HEPLER, P. K. The cytoskeleton and its regulation by calcium and protons. *Plant Physiol.*, vol. 170, no. 1, pp. 3–22, 2016.
- HIMSCHOOT, E.; BEECKMAN, T.; FRIML, J.; VANNESTE, S. Calcium is an organizer of cell polarity in plants. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1853, no. 9, pp. 2168–2172, 2015.
- HOMBLÉ, F.; LÉONETTI, M. Emergence of symmetry breaking in fucoïd zygotes. *Trends Plant Sci.*, vol. 12, no. 6, pp. 253–259, 2007.
- HOLDEN, E., COPLEN, T. The periodic table of the elements. *Chem. Int.* 26 (1), 8–9, 2004.
- IHA, C. *Diversidade de Gelidiales (Rhodophyta) baseada em marcadores moleculares e estudos morfoanatômicos para região Sudeste do Brasil*, 2014.
- JOLY, A. B. *Flora marinha do litoral norte do Estado de São Paulo e regiões circunvizinhas*. Bol da Fac Filos Ciências e Let

Univ São Paulo, série Botânicaetim da Fac Filos Ciências e Let
Univ São Paulo, série Botânica 21, 21–294, 1965.

KARUKSTIS, K. K. et al., Spectral studies of lanthanide interactions with membrane surfaces. *J. Phys. Chem.*, vol. 99, no. 12, pp. 4339–4346, 1995.

KATO, Y. et al., Deep-sea mud in the Pacific Ocean as a potential resource for rare-earth elements. *Nat. Geosci.*, vol. 4, no. 8, pp. 535–539, 2011.

KHAN, A. M.; BAKAR, N. K. A.; BAKAR, A. F. A.; ASHRAF, M. A. Chemical speciation and bioavailability of rare earth elements (REEs) in the ecosystem: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 24, no. 29, pp. 22764–22789, 2017.

KROEGER, J. H.; GEITMANN, A.; GRANT, M. Model for calcium dependent oscillatory growth in pollen tubes, *J. Theor. Biol.*, vol. 253, no. 2, pp. 363–374, 2008.

LAHAYE, M.; ROCHAS, C. Chemical structure and physico-chemical properties of agar. *Hydrobiologia*, vol. 221, pp. 137–148, 1991.

LEE, W. K.; LIM, Y. Y.; LEOW, A. T.; NAMASIVAYAM, C.P.; ONG ABDULLAH, J.; HO, C. L. Biosynthesis of agar in red seaweeds: A review. *Carbohydr. Polym.*, vol. 169, p. 533, 2017.

LEHTONEN, J. The significance of Ca²⁺ in the morphogenesis of *Micrasterias* studied with EGTA, verapamil, LaCl₃ and calcium ionophore A23187. *Plant Sci. Lett.*, vol. 33, pp. 53–60, 1983.

LEMUS, A.; BIRD, K.; KAPRAUN, D. F.; KOEHN, F. Agar yield, quality and standing crop biomass of *Gelidium serrulatum*, *Gelidium floridanum* and *Pterocladia capillacea* in Venezuela. *Top. Catal.*, vol. 5, no. 5, pp. 469–479, 1991.

LI, L. G.; HUI, Q. T.; RUSSELL, S. D. Calcium function and distribution during fertilization in angiosperms. *Am. J. Bot.*, vol. 94, no. 6, pp. 1046–1060, 2007.

LI, L.; SAGA, N.; MIKAMI, K. Ca²⁺ influx and phosphoinositide signalling are essential for the establishment and maintenance of cell polarity in monospores from the red alga *Porphyra yezoensis*. *J. Exp. Bot.*, vol. 60, no. 12, pp. 3477–3489, 2009.

LIU, D.; WANG, X.; CHEN, X.; LIN, Y.; CHEN, Z.; XU, H. Effects of lanthanum on the change of calcium level in the root cells of rice. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, vol. 43, no. 15, pp. 1994–2003, 2012.

LOVE, J.; BROWNLEE, C.; TREWAVAS, J. Ca²⁺ and Calmodulin Dynamics during Photopolarization in *Fucus serratus* Zygotes. *Plant Physiol.*, vol. 115, no. 1, pp. 249–261, 1997.

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

MAYANGLAMBAM, A.; SAHOO, P. Red Algae. In: D. Sahoo, J. Seckbach (eds.), *The Algae World, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology* 26, 205-234, 2015.

MALHO, R.; READ, N. D.; PAIS, M. S.; TREWAVAS, A. J. Role of cytosolic free calcium in the reorientation of pollen tube growth. *Plant J.*, vol. 5, no. 3, pp. 331–341, 1994.

MCAINSH, M. R.; PITTMAN, J. K. Shaping the calcium signature. *New Phytol.*, vol. 181, no. 2, pp. 275–294, 2009.

MCGEER, J.; HENNINGSEN, G.; LANNO, R.; FISHER, N. S.; SAPPINGTON, S.; DREXLER, J. Issue paper on the bioavailability and bioaccumulation of metals p. 122, 2004.

MCNALLY, J. G.; COWAN, J. D.; SWIFT, H. The effects of the ionophore A23187 on pattern formation in the alga *Micrasterias*. *Dev. Biol.*, vol. 97, no. 1, pp. 137–145, 1983.

MICHEL, G.; TONON, T.; SCORNET, D.; COCK, J. M.; KLOAREG, B. The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. *New Phytol.*, vol. 188, no. 1, pp. 82–97, 2010.

MOERMOND, C. T. A.; TIJINK, J.; VAN WEZEL, A. P.; KOELMANS, A. A. Distribution, speciation, and bioavailability of lanthanides in the Rhine-Meuse estuary, the Netherlands. *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 20, no. 9, pp. 1916–1926, 2001.

MORENO, T. et al., Lanthanoid Geochemistry of Urban Atmospheric Particulate Matter. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, no. 17, pp. 6502–6507, 2008.

NULTSCH, W. Effect of External Factors on Phototaxis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Arch. Microbiol.*, vol. 123, pp. 93–99, 1979.

NORTON, T. A.; MELKONIAN, M.; ANDERSEN, R. A. Algal biodiversity. *Phycologia*, 35, 308–326. 1996.

OURIQUES L. C. Padrões de germinação e aspectos ultra-estruturais de esporos de Rhodophyta. Tese (Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita

OLIVEIRA, C. de et al., Bioaccumulation and effects of lanthanum on growth and mitotic index in soybean plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 122, pp. 136–144, 2015.

PALASZ, A.; CZEKAJ, P. Toxicological and cytophysiological aspects of lanthanides action *Acta Biochim. Pol.*, vol. 47, no. 4, pp. 1107–1114, 2000.

PETERS, N. T.; LOGAN, K. O.; MILLER, A. C.; KROPF, D. L. Phospholipase D signaling regulates microtubule organization in the fucoid alga *Silvetia compressa*. *Plant Cell Physiol.*, vol. 48, no. 12, pp. 1764–1774, 2007.

POLTRONIERI FILIPIN, E. et al., Evaluation of salinity effects on the release, adhesion, and germination of the tetraspores of *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Florideophyceae). *J. Appl. Phycol.*, vol. 28, no. 5, pp. 2925–2938, 2016.

RAMAWAT, K. G.; MERILLON, J. M. Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology. Cham: Springer International Publishing, 2015.

REDLING, K. Rare Earth Elements in agriculture with emphasis on animal husbandry. Universität München, 2006.

REED, P. W.; LARDY, H. A23187 : A Divalent Ionophore. *J. Biol. Chem.*, vol. 247, pp. 6970–6977, 1972.

REZANKA, T. et al., The effect of lanthanides on photosynthesis, growth, and chlorophyll profile of the green alga *Desmodesmus quadricauda*. *Photosynth. Res.*, vol. 130, no. 1–3, pp. 335–346, 2016.

ROBINSON, K. Calcium and the photopolarization of *Pelvetia* zygotes, *Planta*, vol. 198, pp. 378–384, 1996.

ROH, M.; SHINGLES, R.; CLEVELAND, M.; MCCARTY, R. Direct measurement of calcium transport across chloroplast inner-envelope vesicles. *Plant Physiol.*, vol. 118, no. 4, pp. 1447–54, 1998.

SAHOO, D.; YARISH, C. Mariculture of Seaweeds. *Algal Culturing Techniques*, 41st ed., vol. 41, no. 15, pp. 219–237, 2005.

SAHOO, D.; BAWEJA, P. General Characteristics of Algae. In: D. Sahoo, J. Seckbach (eds.), *The Algae World, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology* 26, 3–26, 2015.

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

SATO, Y.; WADA, M.; KADOTA, A. External Ca²⁺ Is Essential for Chloroplast Movement Light Stimulation. *Plant Physiol.*, vol. 127, no. October, pp. 497–504, 2001.

SECKBACH, J. *The Algae World*. The Algae World, vol. 26, pp. 307-315, 2015.

SIMIONI, C. Análise dos mecanismos reguladores dos processos de polarização e germinação de esporos e desenvolvimento de gametófitos jovens de *Gelidium floridanum* sob efeito da radiação ultravioleta e do metal pesado cádmio. Tese de doutorado, 2014.

TAYLOR, L. P.; HEPLER, P. K. Pollen Germination and tube growth. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48:461–91. 1997.

TARAKHOVSKAYA, E. R. Mechanisms of bioadhesion of macrophytic algae. *Russ. J. Plant Physiol.*, vol. 61, no. 1, pp. 19–25, 2013.

TSEKOS, I. The supramolecular organization of red algal cell membranes and their participation in the biosynthesis and secretion of extracellular polysaccharides: a review. *Protoplasma*, vol. 193, pp. 10–32, 1996.

US-EPA. Rare Earth Elements: A Review of Production, Processing, Recycling, and Associated Environmental Issues. United States Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, EPA/600/R-12/572, 2012.

VAN OOSTERHOUT, F.; LÜRLING, M. The effect of phosphorus binding clay (Phoslock®) in mitigating

cyanobacterial nuisance: A laboratory study on the effects on water quality variables and plankton. *Hydrobiologia*, vol. 710, no. 1, pp. 265–277, 2013.

VERMA, A.; BHATT, A. N.; FAROOQUE, A.; KHANNA, S.; SINGH, S.; DWARAKANATH, B. S. Calcium ionophore A23187 reveals calcium related cellular stress as ‘I-Bodies’: An old actor in a new role. *Cell Calcium*, vol. 50, no. 6, pp. 510–522, 2011.

WANG, L.; WANG, W.; ZHOU, Q.; HUANG, X. Combined effects of lanthanum (III) chloride and acid rain on photosynthetic parameters in rice. *Chemosphere*, vol. 112, pp. 355–361, 2014.

WILSON, S. M.; PICKETT-HEAPS J. D.; WEST J. A. Fertilisation and the cytoskeleton in the red algae *Bostrychia moritziana* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *European Journal of Phycology*. 37:509-522, 2002.

XIE, F.; ZHANG, T. A.; DREISINGER, D.; DOYLE, F. A critical review on solvent extraction of rare earths from aqueous solutions. *Miner. Eng.*, vol. 56, pp. 10–28, 2014.

ZENG, F. L.; SHI, P.; ZHANG, M. F.; DENG, R. W. Effect of lanthanum on ion absorption in cucumber seedling leaves *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 78, no. 1–3, pp. 265–270, 2001.

ZITTA, C. S.; ROVER, T.; HAYASHI, L.; BOUZON, Z. L. Callus ontogeny of the *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) brown tetrasporophyte strain. *J Appl Phycol* 25:615–629, 2013.