

ZENILDA LAURITA BOUZON

Aspectos Histoquímicos e Ultra-estruturais da Porção
Vegetativa e Reprodutiva de Estiquídios de
Hypnea musciformis (Gigartinales - Rhodophyta)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Morfologia, área de concentração em Biologia Celular, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

CURITIBA

1993

Para:

Soraya, Emanuel, Gustavo e Marina

**Dissertação realizada sob orientação de:
VÂNIA BEATRIZ VIEIRA DE SOUZA
Profa Dra do Depto de Biologia Celular**

UFPr

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Laurita pelo apoio dado durante todos estes anos, principalmente, nos momentos de minha ausência.

Ao Túlio, que na minha ausência foi pai e mãe dos nossos filhos e sem o qual dificilmente este trabalho se realizaria.

A minha orientadora Vânia Beatriz Vieira de Souza pelo apoio, orientação sempre proveitosa e firme, e exemplo de trabalho no decorrer destes anos.

Ao Dr. Aldo Avanzini, *in memoriam*, que me mostrou o mundo das algas na visão de um biólogo celular e por ter me dado a oportunidade de estagiar no Laboratório de Citofisiologia Vegetal da Universidade de Trieste, Itália.

Ao Dr. Eurico Cabral de Oliveira Filho, do Instituto de Biociências da USP, pela leitura crítica e sugestões dadas ao manuscrito.

Ao Dr. Peter Brian Gahan, do Queen Elizabeth College da Inglaterra, pela confirmação dos resultados obtidos nas análises histoquímicas.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Biologia Celular e do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPr pelo incentivo e colaboração durante o decorrer do curso de Pós-graduação.

A Vera Regina F. Pionteke, do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPr, pelo ajuda na preparação do material fotográfico.

A Célia Regina Franco pelo auxílio constante na obtenção dos cortes ultra-finos e na utilização do microscópio eletrônico.

Aos professores Carlos F. Míguez e José Marino Neto, do Centro de Ciências Biológicas da UFSC, pelo auxílio no uso do fotomicroscópio.

As amigas Neci Moraes e Roseli de Souza Mosimann pelo incentivo constante e companheirismo de todos os dias.

Em especial aos amigos Berenice, Gert, Betina e Dalton pelo carinho e amizade que sempre me dedicaram.

Ao meus filhos Gustavo e Soraya pela ajuda na digitação, formatação e leitura do manuscrito.

A todos os amigos da pós-graduação pela amizade e entusiasmo contagiante em todos os dias de convivência.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa pelos recursos financeiros concedidos na forma de bolsa de pós-graduação.

Os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas e instituições que, de uma forma ou de outra , colaboraram para que o presente trabalho se realizasse.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
3 MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 MICROSCOPIA DE LUZ E HISTOQUÍMICA.....	9
3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	15
4 RESULTADOS	21
4.1 ASPECTOS GERAIS.....	21
4.2 CÉLULAS MEDULARES.....	22
4.3 CÉLULAS SUBCORTICAIS.....	23
4.4 CÉLULAS CORTICAIS.....	25
4.5 TETRASPORÂNGIOS E TETRASPOROGÊNESE.....	26
4.6 TETRÁSPOROS LIVRES.....	29
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÕES	43
ANEXOS	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

RESUMO

Aspectos estruturais e histoquímicos dos estiquídeos da alga vermelha *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux foram estudados por meio de microscopia de luz de rotina, histoquímica, e microscopia eletrônica. Algumas técnicas de preparo das amostras para estudo de microscopia eletrônica de transmissão são apresentadas neste trabalho. Em cortes transversais dos estiquídeos, três regiões distintas foram identificadas: a região medular, composta de células grandes e vacuolizadas; a região subcortical, composta de células menores que as medulares, também vacuolizadas; e a região cortical, compostas de células pequenas, dotadas de vacúolos pouco evidentes. Estas últimas originam os tetrásporângios. Todos os tipos celulares, com exceção dos tetrásporos recém-liberados, apresentam uma parede celular composta de um material finamente fibrilar imerso em uma matriz amorfa. Para determinar a natureza dos polissacarídeos e a distribuição das proteínas no conteúdo citoplasmático e nas paredes celulares, foram empregadas várias reações histoquímicas. O uso de azul de toluidina (AT-O) resultou em uma intensa reação metacromática a nível da parede celular, indicando que esta apresenta em sua composição grande quantidade de polissacarídeo ácido, que sugerimos ser carragenana, polissacarídeo sulfatado evidenciado pelo corante alcian blue (AB). O uso de PAS indicou no citoplasma das células a presença de grande quantidade de um polissacarídeo neutro, correspondente aos grãos de amido das florídeas. As proteínas totais, demonstradas com a reação de ninhidrina-Schiff, distribuíram-se homogêaneamente no citoplasma de todas as células, mas não foram evidenciadas nas paredes celulares de todos os tipos celulares analisados. Ao microscópio eletrônico de transmissão, verificou-se que os plastídeos apresentam a estrutura típica das rodofíceas, com tilacóides longos, simples e paralelos, envoltos por um tilacóide circular, periférico. As mitocôndrias, que freqüentemente se encontravam localizadas junto aos cloroplastos, apresentaram cristas tubulares.

As demais organelas mostraram-se semelhantes àquelas observadas em outras algas macroscópicas já descritas. Uma série de modificações sub-celulares, tais como o aumento do número de plastídeos e de grãos de amido, e a produção das *cored vesicles*, foram observadas durante os estágios de diferenciação, maturação e liberação dos tetrásporos. Os tetrásporos nascentes apresentaram-se envolvidos por uma camada de mucilagem celular fina, que auxilia na sua fixação ao substrato, e esta é substituída por uma parede celular fina, cerca de vinte horas após a liberação dos tetrásporos da planta-mãe.

O presente trabalho apresenta pela primeira vez aspectos celulares da alga *H. musciformis* que acreditamos possam servir como base para estudos dirigidos ao aproveitamento econômico da espécie que é produtora de um importante ficocolóide industrial.

ABSTRACT

Some structural and histochemical aspects of the stichidia of *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux were investigated with the aid of light and electron microscopy. A series of techniques employed to process the samples for the ultrastructural studies are described. In transverse sections, three different regions could be distinguished in the stichidia: the medullary region, composed of large, vacuolated cells; the sub-cortical region, with smaller vacuolated cells; and the cortical region, with the smallest cells. The later give rise to the tetrasporangia. All types of cells, except the just released tetraspores, presented a cell wall composed of a fine fibrillar material immersed in an amorphous matrix. To determine the basic chemical composition of cells and cell walls, we used a series of histochemical staining techniques. The cell walls showed an intense metachromatic reaction when stained with toluidine blue (AT-O), indicating the presence of acidic polysaccharides. We suggest that the acid polysaccharides are the carrageenans, a phycocolloid that is commercially extracted from *H. musciformis*. The use of the PAS technique indicated the presence of abundant neutral polysaccharides in the cytoplasm, corresponding to the floridean starch grains. The plastids revealed the internal structure typical of the Rhodophyceae, showing long, parallel, discrete thylakoids, surrounded by a circular thylakoid running under the external membrane of the plastid. The mitochondria, often seen near the plastids, presented tubular cristae. The other organelles are similar to those observed in the other macroscopic red algae described date. The differentiation, maturation, and liberation of the tetraspores from the tetrasporangia brought about a number of cell activities as observed under both the light and electron microscopes. These include an increase in the quantities of starch grains and plastids, and the productions of cored vesicles. Mucilage was deposited around each individual tetraspore, in early stages. This mucilage, which helps the fixation of the spore on the substrate, was replaced by a thin cell wall about twenty hours after the spore is released from the mother plant. These paper

presents some new aspects about the structure of *H. musciformis*, with can be used as basis for other research applied to the commercial use of this species.

INTRODUÇÃO

As algas desempenham um importante papel na economia direta de muitos países. Quatro produtos principais são comercialmente derivados das algas: ágar, carragenana, ácido algínico e diatomito. Os dois primeiros são extraídos das Rhodophyta marinhas (ROUND, 1983), sendo que as carragenanas são polissacarídeos sulfatados que ocorrem em inúmeros gêneros da ordem Gigartinales (GORDON-MILLS & MCCANDLESS, 1975).

Devido a sua importância econômica e ecológica, as algas marinhas bentônicas são objeto de numerosos estudos. O microscópio eletrônico tem sido o instrumento utilizado em muitas destas pesquisas e tem contribuído grandemente para o entendimento da estrutura subcelular e suas correlações com características macroscópicas no desenvolvimento e diferenciação (PHILLIPS & SCOTT, 1981).

O gênero *Hypnea* Lamouroux (Rhodophyta, Gigartinales) é largamente distribuído pelas costas tropicais e subtropicais. Os representantes deste gênero reproduzem-se sexuada e assexuadamente. A fase de divisão sexuada é seguida por duas gerações assexuadas que produzem esporos, denominadas de geração carposporofítica e tetrasporofítica.

A espécie *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux é a mais conhecida do gênero *Hypnea*, e já foi encontrada em muitas regiões tropicais e subtropicais do Oceano Atlântico (TAYLOR, 1960), Oceano Índico (MSHIGENI & LORRI, 1977 e RAMARAO, 1970) e Oceano Pacífico (MSHIGENI & LORRI, 1977 e CHAPMAN, 1971). Esta espécie apresenta ampla distribuição ao longo do litoral brasileiro (OLIVEIRA, 1977). A principal característica diagnóstica desta espécie é a presença de processos em forma de ganchos no final dos eixos principais, cuja função é fixar, como gavinhas, a alga sobre outras algas suporte ou outros substratos (FRITSCH, 1965).

Esta espécie é economicamente importante como produtora de kappa-carragenana, um ficocolóide industrial, utilizado como gel estabilizante, espessante ou agente emulsionante na alimentação moderna, na indústria farmacêutica, têxtil e de cosméticos (MSHIGENI, 1976c).

Visando ampliar os conhecimentos sobre esta espécie, e fornecer subsídios para pesquisas aplicadas, o presente trabalho contribui com informações sobre alguns aspectos ultra-estruturais e histoquímicos das células vegetativas, da tetrasporogênese, e dos tetrásporos recém liberados de *H. musciformis*.

REVISÃO DA LITERATURA

O gênero *Hypnea* tem sido bastante pesquisado sob vários aspectos. RAMARAO (1968) e RAMARAO & KRISHNAMURTHY (1969) estudaram o ciclo de crescimento e o conteúdo de ficocolóide (κ -carragenana) em *H. musciformis*. MSHIGENI (1976 a, b, c, 1977) realizou vários trabalhos com reprodução, produção de carragenana e destino dos estiquídios depois da liberação dos tetrásporos em *Hypnea*. O teor de ficocolóide em *H. musciformis* também foi analisado por FREIDLANDER & ZELIKOVITCH (1984). No Brasil, estudos sobre a produção de carragenana em *H. musciformis* foram feitos por MATSUBARA (1989), BERCHEZ & OLIVEIRA (1990) e SAITO & OLIVEIRA (1990). Aspectos referentes a condições de cultura, anatomia e reprodução de algumas espécies do gênero, foram realizados por SCHENKMAN (1986). Entretanto até o presente permanecem desconhecidos os aspectos histoquímicos e ultra-estruturais desta espécie.

Muitas pesquisas de histoquímica tem demonstrado a presença de polissacarídeos em diferentes porções celulares, em algas pertencentes a vários grupos. PARKER & DIBOLL (1966) localizaram polissacarídeos ácidos em algumas espécies de algas. Estudos empregando a reação de PAS e azul de toluidina registraram a presença de polissacarídeos em diversos tipos celulares no gênero *Fucus* Linnaeus (FEDER & O'BRIEN, 1968). Outros estudos sobre polissacarídeos em algas marinhas foram desenvolvidos por MCCULLY (1970), TRIPODI (1971) e TRIPODI & DE MASI (1975) utilizando outros métodos histoquímicos. A localização histológica de carragenana em *Chondrus crispus* (Linnaeus) Stackhouse, foi determinada por GORDON & MCCANDLESS (1973), GORDON-MILLS & MCCANDLESS (1975) e GORDON-MILLS *et alii* (1978). Com técnicas histoquímicas e autoradiográficas, EVANS *et alii* (1973) identificaram os sítios de síntese, as vias de transporte e a localização final de polissacarídeos sulfatados como a carragenana, em algumas Phaeophyta. LA CLAIRE &

DAWES (1976) evidenciaram, histoquimicamente, polissacarídeos em *Euclima nudum* J. Agardh (Rhodophyta) e sugeriram que parte da sulfatação das moléculas de carragenana ocorreria extracelularmente. PERCIVAL (1979) investigou a estrutura básica, a biossíntese e a função dos polissacarídeos nas Rhodophyta. Segundo KLOAREG (1981), os polissacarídeos da parede celular atuam como osmorreguladores durante as variações de salinidade. Em outras duas Rhodophyta, *Gigartina teedii* (Roth) Lamouroux e *Chondria tenuissima* (Goodenough and Woodward) C. Agardh, os polissacarídeos neutros e sulfatados foram localizados com reação de PAS e azul de toluidina (TSEKOS, 1983 e 1985). ZABLACKIS & SANTOS (1986) demonstraram a presença de carragenana na parede celular de *Catenella nipae* Zanardini, (Rhodophyta).

Os polissacarídeos são componentes estruturais e funcionais da parede celular e da matriz intercelular das algas (ZABLACKIS, 1991). A parede celular das algas tem sido objeto de muitas pesquisas. DAWES *et alii* (1961) descreveram a parede celular das Phaeophyta e Rhodophyta. A formação da parede celular em carpósporos de *Polysiphonia* Greville está relacionada com material produzido pelo complexo de Golgi (KONRAD-HAWKINS, 1973 e 1974). CHAMBERLAIN & EVANS (1973) e YOUNG (1980) observaram que as paredes celulares de *Ceramium rubrum* (Hudson) C. Agardh e *Anthithamnion defectum* Kylin, respectivamente, são estruturadas em camadas. MARIANI *et alii* (1990) descreveram a localização catiônica de polissacarídeos sulfatados e a ultra-estrutura da parede celular de várias algas marinhas bentônicas, não incluindo o gênero *Hypnea*.

Os inúmeros trabalhos sobre a morfofisiologia do complexo de Golgi revelam um crescente interesse no papel desempenhado por esta organela nos diferentes estágios de reprodução e diferenciação das algas. As modificações que sofrem os dictiossomas durante a tetrasporogênese, em diferentes espécies de Rhodophyta, foram descritas por PEYRIÈRE (1970), KUGRENS & WEST (1972), e ALLEY & SCOTT (1977). Segundo TRIPODI (1971), e TSEKOS *et alii* (1985), as vesículas dictiossômicas são os locais de formação dos grãos de

amido citoplasmáticos em *Polysiphonia sertularioides* (Grateloup) J. Agardh (Rhodophyta). Vesículas derivadas dos dictiossomos atuam na formação da parede celular de várias Rhodophyta, tais como *Ceramium rubrum* Roth (CHAMBERLAIN & EVANS, 1973), *Callithamnion roseum* (Roth) Lyngbye (KONRAD-HAWKINS, 1974), *Polysiphonia* sp. (WETHERBEE & WEST, 1977) e em *G. teedii* e *C. tenuissima* (TSEKOS, 1981 e 1985). As *cored vesicles*, relacionadas com os dictiossomos e envolvidas na adesão dos tetrásporos ao substrato, são bem evidentes durante a carposporogênese e tetrasporogênese de diversas Rhodophyta (KUGRENS & WEST 1972, CHAMBERLAIN & EVANS 1973 e DELIVOPOULOS & TSEKOS 1986). A variação morfológica dos dictiossomos foi utilizada para caracterizar estágios de desenvolvimento durante a tetrásporogênese em *Erythrocladia saccata* (KUGRENS & WEST, 1974), *G. teedii* (TSEKOS, 1983) e *Porphyra gardneri* (Smith e Hollenberg) Hawkes (HAWKES 1980).

As conexões intercelulares, conhecidas como *pit connections*, representam importante característica taxonômica nas Rhodophyta. A morfologia e a ultra-estrutura dos *pit connections* em *Cryptomenia* sp. foi descrita por WETHERBEE & KRAFT (1981). Em três espécies de *Hildenbrandia* Nardo, PUESCHEL (1986b) descreveu a predominância de *pit connections* secundários, isto é, formados após a divisão celular. O *pit plug* (estrutura que oclui o *pit connection*) e suas camadas externas foram utilizados como característica taxonômica por PUESCHEL & COLE (1982 e 1985), e TRICK & PUESCHEL (1991). Estes *pit plug* são de natureza protéica conforme demonstrado por TRICK & PUESCHEL (1990) em *Bossiella californica* (Decaisne) Silva.

A organização ultra-estrutural dos plastídeos é um caracter de grande valor na taxonomia das diferentes divisões de algas (TRIPODI & GARGIULO, 1984). Estudos sobre a formação dos tilacóides e a reprodução destas organelas foram realizados por TSEKOS (1982 e 1983), PUESCHEL (1988a) e OATES & COLE (1989).

As células vegetativas das algas foram estudadas sob vários aspectos. MCBRIDE & COLE (1969) caracterizaram ultra-estruturalmente as células vegetativas de *Smithora naiadum* (Anderson) Hollenberg. YOUNG (1979) descreveu a ultra-estrutura e a histoquímica de células jovens e maduras de *A. defectum*. PELLEGRINI & PELLEGRINI (1985) descreveram as células vegetativas de *Alsidium helminthochorton* (La Tourette) Kutzing e demonstraram que estas apresentam inclusões fibrilares no citoplasma. APT & GIBOR (1991) evidenciaram que *Gracilaria epihippisor* Hoyle apresenta uma organização dos tilacóides das células vegetativas aparentemente alterada pela presença de estruturas semelhantes a vírus.

Em relação à divisão celular de algas bentônicas, destacam-se os trabalhos de SCOTT *et alii* (1980) e PHILLIPS & SCOTT (1981) sobre mitose e diferenciação celular em plantas masculinas de *Polysiphonia* sp. e *Dasya baillouviana* (Gmelin) Montagne. Aspectos ultra-estruturais da meiose em *D. baillouviana* foram descritos por BROADWATER *et alii* (1986a e b).

São poucas as contribuições sobre a ultra-estrutura da monosporogênese das Rhodophyta, destacando-se, entretanto, os trabalhos de MCBRIDE & COLE (1971), os quais descreveram alguns aspectos ultra-estruturais da diferenciação e liberação de monósporos em *S. naiadum*. HYMES & COLE (1983) descreveram a citologia a nível ultra-estrutural da monosporogênese de *Audouiniella hermanii* (Roth) Duby .

O modo como se desenvolve o zigoto na pós-fertilização é de fundamental importância na determinação taxonômica das ordens das Rhodophyta RAMM-ANDERSON & WETHERBEE (1982). Estudos ultra-estruturais dos aspectos da carposporogênese de *Nemalion helminthoides* (Velley) Batters da ordem Nemalionales foram feitos por RAMM-ANDERSON & WETHERBEE (1982). Em *Gloiosiphonia verticillaris* Farl. (Criptonemiales), segundo DELIVOPOULOS e KUGRENS (1985), durante a carposporogênese formam-se grandes quantidades de *cored vesicles* e numerosos grãos de amido. Em relação às Gigartinales, destacamos os trabalhos de DELIVOPOULOS & TSEKOS (1983 e 1986) sobre o

desenvolvimento do carposporófito e a ultra-estrutura da carposporogênese de *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss; de TSEKOS (1983), e TSEKOS & DIANNELIDIS (1985) sobre os carpósporos e a carposporogênese em *G. teedii* e de KUGRENS & DELIVOPOULOS (1986) sobre a ultra-estrutura do carposporófito de *Plocamiocolax pulvinata* Setchell. Nas Rhodymeniales destacam-se os trabalhos de DELIVOPOULOS & KUGRENS (1984 e 1985) sobre a carposporogênese de *Faucheocolax attenuata* Stechell. Nas Ceramiales a ultra-estrutura da carposporogênese de algumas espécies de algas foi descrita por vários autores, dos quais destacamos WETHERBEE & WINNE (1973), sobre *Polysiphonia novae-angliae* Taylor, TRIPODI (1974) a respeito de *Polysiphonia sertularioides* (Grateloup) J. Agardh e TRIEMER & VASCONCELOS (1977) sobre *Caloglossa leprieurii* (Montagne) J. Agardh.

A ultra-estrutura da tetrasporogênese foi estudada em inúmeras Rhodophyta: *Levringiella gardneri* (Setchell) Kylin (KUGRENS & WEST, 1972), *Ptilota hypnoides* (SCOTT & DIXON, 1973), *C. rubrum* (CHAMBERLAIN & EVANS, 1973), *Palmaria palmata* (L.) O. Kuntze (PUESCHEL, 1979 e 1980), *Erythrocytis montagnei* (Derbès and Solier) Silva (SANTISI & DE MASI, 1981), *Hildenbrandia rubra* (Sommerf.) Meneghini (PUESCHEL, 1982), *Gastroclonium clavatum* (Roth) Ardissome (GORI, 1982), *C. tenuissima* (TSEKOS *et alii*, 1985) e *Halimniona curvata* (Lamouroux) Johansen and Silva (VESK & BOROWITZKA, 1984). Entretanto não encontramos trabalhos referentes a tetrasporogênese de nenhuma espécie do gênero *Hypnea*.

Pelo descrito anteriormente, observamos que a maioria dos trabalhos a respeito da ultra-estrutura dos tetrásporos das algas vermelhas se refere, principalmente, a aspectos da tetrasporogênese. São poucos os trabalhos feitos utilizando-se tetrásporos liberados: MCBRIDE & COLE (1972) relatam as observações ultra-estruturais sobre a germinação de carpósporos em *S. naiadum*; AVANZINI & HONSELL (1982) e AVANZINI *et alii* (1982) analisaram os tetrásporos livres e germinados de *Nitophyllum punctatum* (Stackhouse) Greville;

AVANZINI *et alii* (1984) forneceram algumas informações sobre a ultra-estrutura dos carpósporos livres de *Batrachospermum moniliformes* Roth.; PUESCHEL & COLE (1985) forneceram dados sobre a ultra-estrutura dos carpósporos liberados, fixos e germinados de *Porphyra variegata*. Uma revisão sobre a ultra-estrutura dos tetrásporos livres das Rhodophyta foi feita por AVANZINI (1989).

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas tetraspóricas de *H. musciformis* foram coletadas nas praias dos Ingleses (20/11/91 e 25/02/92) e Ponta do Sambaqui (05/05, 10/07 e 16/10/92) - Florianópolis - SC (Fig. 1), durante a maré baixa. O material coletado foi acondicionado em sacos plásticos e transportado para o laboratório de Citologia e Embriologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os estiquídios (porções férteis) foram separadas do restante da planta com auxílio de lâminas de barbear e pinças, e foram fixadas imediatamente para a microscopia de luz de rotina, histoquímica e microscopia eletrônica. Porções vivas foram levadas ao laboratório para liberação dos tetrásporos.

Por ser o presente trabalho pioneiro na área de ultra-estrutura e histoquímica de algas marinhas bentônicas no Brasil, fez-se necessário o detalhamento da metodologia empregada, o que possivelmente facilitará estudos posteriores.

I. Preparação do material para a microscopia de luz de rotina e histoquímica

. Fixação

Os estiquídios permaneceram na solução fixadora durante 4 h à temperatura de 4°C. Após a fixação, o material foi lavado em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,2, duas vezes, por 10 min cada.

Solução fixadora

A solução fixadora de formaldeído foi feita a partir de paraformaldeído preparado da seguinte forma:

Paraformaldeído	0,5 g
-----------------	-------

Tampão fosfato	25 ml
Sol. saturada de NaOH	10 ml
Cloreto de cálcio	25 mg
Água destilada	20 ml

Modo de preparar

1. A água com o paraformaldeído foi aquecida até 60°C.
2. A solução foi retirada do fogo e foram acrescentadas 2 gotas de hidróxido de sódio concentrado; a solução foi agitada até se tornar cristalina.
3. Acrescentou-se cloreto de cálcio dissolvido no tampão fosfato.
4. A solução foi filtrada e usada no mesmo dia.

. Desidratação

A desidratação foi feita em uma série de soluções de etanol em concentrações crescentes de 50% a 100%, tendo sido feitas 2 trocas de 15 min em cada concentração, à temperatura ambiente.

. Infiltração e inclusão

O material foi infiltrado e incluído em historesina plástica glicolmetacrilato (GMA) Tecnovit 7100 (ARNOLD *et alii*, 1975).

Após a desidratação, o material foi submetido a uma pré-infiltração, usando-se uma mistura 1:1 de etanol 100% e solução de infiltração, durante 2 h à temperatura ambiente. A seguir, o material foi transferido para a solução de infiltração pura, por 12 h.

Solução de infiltração

- Historesina	50 ml
- Ativador	0,5 g

Os estiquídios foram transferidos para cápsulas de gelatina contendo 1 ml da solução de inclusão assim constituída:

- solução de infiltração 15 ml
- acelerador 1 ml

A resina foi polimerizada à temperatura ambiente por 1 - 2 h.

. Preparo dos cortes

Para a elaboração dos cortes foram utilizados micrótomo manual de parafina modelo Reichert e navalhas de aço. Após a remoção da cápsula gelatinosa, os blocos foram fixados em suportes metálicos e cortados com espessuras de 2 e 5 μm . Os cortes assim obtidos foram distendidos em placa de Petri com água à temperatura ambiente, coletados com lâminas de vidro e colocados a secar em estufa a 37°C por 30 min.

Para a microscopia de luz de rotina foram feitas colorações com hematoxilina e eosina para monitoração dos cortes.

. Histoquímica

Além dos procedimentos de rotina, o material foi submetido a testes histoquímicos, descritos a seguir:

A. PAS (Ácido Periódico de Schiff). Este teste, que identifica a presença de polissacarídeos neutros, foi usado de acordo com a modificação de GERLACK (1977).

As lâminas contendo os cortes foram submetidas ao seguinte tratamento:

- 1- Ácido periódico a 1% durante 15 min
- 2- Água corrente durante 10 min
- 3- Água destilada (lavagem rápida)
- 4- Reativo de Schiff durante 45 min

C. Alcian blue (AB) e alcian yellow (AY). Este teste, que evidencia a presença de polissacarídeos ácidos sulfatados e carboxilados, foi usado segundo o método de RAVETTO (1964).

- 1- Coloração durante 1 h em alcian blue 8GX, pH 0,5
- 2- Lavagem por 30 s em água acidificada, pH 0,5
- 3- Lavagem em água destilada por 10 min
- 4- Coloração durante 1 h com alcian yellow 0,5%, pH 2,5
- 5- Lavagem em água destilada por 10 min
- 6- Desidratação em etanol
- 7- Montagem em bálsamo do Canadá.

Os controles foram feitos mergulhando-se as lâminas na solução de metilação, durante 5 h em estufa a 60°C, sendo que em seguida, foram lavadas em água corrente e coradas conforme acima descrito em alcian blue.

Solução de metilação:

Álcool metílico	100,0 ml
Ácido clorídrico concentrado	0,8 ml

D. Ninhidrina - Schiff. Este teste, que evidencia a presença de proteínas totais, foi usado segundo o método de YASUMA & ICHIKAWA (1953), descrito a seguir.

Os cortes foram submetidos aos seguintes tratamentos:

- 1- Solução de Ninhidrina a 0,5% em etanol absoluto por 24 h a 37°C
- 2- Lavagem rápida em etanol absoluto puro (2 vezes)
- 3- Lavagem em água destilada
- 4- Reativo de Schiff por 30 min
- 5- Lavagem em água destilada por 5 min

- 6- Bissulfito de sódio em solução aquosa a 2% durante 15 min
- 7- Lavagem em água corrente por 15 min
- 8- Desidratação em etanol 95% seguido de etanol 100% (1 min cada)
- 9- Xilol diafanizador
- 10- Montagem em bálsamo do Canadá.

Os controles foram feitos deixando as lâminas na solução de desaminação (citada abaixo) durante 18 h à temperatura ambiente antes de iniciar o procedimento de coloração descrito acima.

Solução de desaminação:

Nitrito de sódio	12 g
Água destilada	20 ml
Ácido acético 1%	60 ml

Todas as técnicas de coloração foram utilizadas sem a remoção do meio de infiltração, o que torna estas técnicas mais fáceis e recomendáveis por reduzir os passos de processamento.

O material corado pelas diferentes técnicas foi analisado em microscópio de luz modelo Olympus BH-2, equipado com um retículo micrometrado para fazer as medições dos diferentes tipos celulares. Para a obtenção dos valores referentes aos diâmetros, foram feitas 10 medidas de cada tipo celular analisado.

As fotomicrografias foram feitas utilizando-se o mesmo modelo de microscópio, equipado com câmara fotográfica modelo Olympus C-35AD. Os desenhos foram feitos a partir de observações em câmara clara, adaptada em microscópio estereoscópico modelo Micronal 27844 VM.

II. Preparação do material para análise em microscopia eletrônica.

Para os estudos ao Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) e ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), usou-se tecido dos estiquídios e tetrásporos já liberados.

II A. Preparação e análise de cortes de tecidos

Na preparação do material para análise ao MET, várias técnicas foram testadas e empregadas, modificando-se os tempos de fixação, as concentrações dos fixadores, as soluções desidratantes e os tempos de infiltração.

Técnica I¹

Os estiquídios foram fixados por 18 h a 4°C em glutaraldeído a 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,0, contendo sacarose a 0,1 M como osmorregulador (concentrações finais). A fixação foi seguida por uma série de 4 lavagens no mesmo tampão, onde a concentração original de sacarose (0,1 M) foi reduzida em 25% em cada lavagem sucessiva, de 10 min cada.

Depois de duas lavagens em tampão puro sem sacarose, os espécimens foram pós-fixados em OsO₄ a 2% em tampão cacodilato 0,2M, pH 7,0 (1:1), durante 3 h e 30 min à temperatura ambiente.

Após duas lavagens de 15 min cada com tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,0, o material foi lavado em água destilada contendo cloreto de sódio a 0,1 M durante 15 min.

A seguir foi submetido a uma contrastação em bloco com uranila a 1% em água destilada durante 12 h, a 4°C.

¹ As técnicas de I a IV foram desenvolvidas de acordo com a metodologia utilizada no laboratório de Citofisiologia Vegetal da Universidade de Trieste - Itália.

Posteriormente, o material foi lavado em água destilada com cloreto de sódio a 0,1 M e desidratado em uma série de soluções de concentrações crescentes de etanol de 50% a 100%, sendo 30 min em cada etapa; o etanol 100% foi trocado 3 vezes.

A infiltração foi feita em duas etapas, usando-se inicialmente resina Spurr (SPURR, 1969) mais etanol 100% (1:1) durante 12 h, a 4°C, e em seguida resina pura durante 2 dias. O material foi polimerizado em moldes horizontais em estufa a 70°C por 24 h.

Técnica II

A fixação dos estiquídios foi feita em glutaraldeído diluído inicialmente em água do mar para uma concentração de 5%. A esta solução adicionou-se tampão cacodilato de sódio 0,2M, pH 7,2 na proporção de 1:1, originando uma concentração final de glutaraldeído 2,5% e de cacodilato 0,1M. O material permaneceu neste fixador durante 4 h à temperatura ambiente. Em seguida foram feitas 2 lavagens, de 15 min cada, em tampão cacodilato 0,2 M mais água do mar (1:1). A pós-fixação foi feita com OsO_4 a 1% (concentração final) em água destilada durante 2 h, à temperatura ambiente. Depois de lavado em tampão cacodilato, o material foi desidratado em uma série de soluções de concentrações crescentes de etanol de 30% a 100%, sendo cada etapa de 30 min, seguido de etanol 100% 4 vezes.

A infiltração foi feita em 4 etapas, usando-se resina Spurr. Inicialmente foi usada resina mais etanol na proporção de 1:1 durante 12 h, seguido de resina mais etanol na proporção de 2:1 durante 1 h, e 2 trocas de resina pura de 12 h cada. A polimerização foi feita em estufa a 70°C durante 20 h.

Técnica III

Esta técnica foi feita segundo a técnica II, apenas substituindo-se o etanol por acetona.

Técnica IV

Os estiquídios foram fixados por 4 h à temperatura ambiente numa solução constituída de partes iguais de: glutaraldeído 5% em água do mar filtrada, vermelho de rutênio 0,15% em água destilada, e tampão cacodilato 0,2 M, pH 7,2 em água destilada. Após a fixação o material foi lavado 3 vezes em tampão cacodilato 0,1 M preparado em água do mar (15 min cada), e 2 vezes em tampão cacodilato a 0,1M preparado em água destilada (15 min cada). Após a pós-fixação foi feita numa mistura de partes iguais de: OsO_4 a 3%, vermelho de rutênio a 0,15% e tampão cacodilato a 0,2 M, durante 1 h e 30 min à temperatura ambiente.

Após 2 lavagens em tampão cacodilato a 0,1 M em água destilada, e 3 lavagens em água destilada (30 min cada), foi feita a desidratação em um série de soluções de concentrações crescentes de acetona 30% a 100%, sendo a última repetida 3 vezes, durante 30 min cada.

A infiltração foi feita em 4 etapas, em resina Spurr. Inicialmente foi usada a resina mais acetona na proporção de 1:1 durante 30 min, seguido de resina mais acetona na proporção de 3:1 por 30 min, resina pura durante 12 h, e resina pura recém preparada durante 1 h e 30 min.

A polimerização foi feita em estufa a 70°C por 20 h.

Técnica V (BUCHI & SOUZA, 1992)

Os estiquídios foram fixados durante 4 h à temperatura ambiente na seguinte solução: glutaraldeído a 2%, paraformaldeído 4%, cloreto de cálcio 5 mM, tampão cacodilato 0,1 M (concentrações finais). Após 3 lavagens em tampão cacodilato, de 15 min cada, o material foi pós-fixado em OsO_4 a 1% em tampão cacodilato a 0,05 M, ao qual foi adicionado ferrocianeto de potássio a 0,8% (concentrações finais) durante 2 h, à temperatura ambiente. Após 3 lavagens, de 15 min cada, em tampão cacodilato, o material foi desidratado em uma série de soluções

crescentes de acetona (50% a 100%), por 20 min em cada etapa, sendo a acetona 100% trocada 3 vezes.

A infiltração foi feita em resina Epon em concentrações crescentes da mesma em acetona: 1:2 por 24 h, 1:1 por 24 h, 2:1 por 24 h e Epon puro por 48 h. A emblocagem foi feita em moldes horizontais, em estufa a 60°C, durante 3 dias.

Técnica VI (KOSLOWSKY & WAALAND, 1987)

A fixação foi feita por 2 h à temperatura ambiente numa solução de glutaraldeído diluído a 2,5% em tampão cacodilato a 0,1 M, pH 7,4, contendo 30 mg/ml de cloreto de sódio, e 20 mg/ml de cloreto de cálcio. O material foi lavado 3 vezes (20 min cada etapa) no mesmo tampão. A pós-fixação foi em OsO₄ a 2% em água destilada, durante 2 h a 4°C. Após a lavagem em água destilada, o material foi desidratado e infiltrado conforme a técnica II.

Técnica VII (PUESCHEL, 1979)

Neste caso, foram fixadas porções maiores do talo contendo vários estiquídios. A fixação foi feita, imediatamente após a coleta, em glutaraldeído a 5% diluído em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 ao qual foi adicionada sacarose 0,2 M. Após 2 h, os estiquídios foram separados do restante do talo e transferido para fixador similar mas cuja concentração de glutaraldeído foi reduzida para 3%, tendo permanecido neste fixador por 24 h a 4°C. A seguir, o material foi lavado em tampão cacodilato (4°C) 0,1 M mais sacarose a 0,2 M. A concentração inicial de sacarose foi gradativamente reduzida em 25% em cada etapa, e finalmente o material foi lavado 2 vezes em tampão puro (20 min cada lavagem). A pós-fixação foi feita em OsO₄ a 2% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2, durante 8 h a 4°C, seguido de duas lavagens em água destilada. A desidratação foi feita em uma série de soluções de concentrações crescentes de acetona conforme as técnicas descritas anteriormente. A infiltração foi feita durante 4 dias em

resina Spurr diluída em acetona nas seguintes proporções: 1:2 por 24 h, 1:1 por 24 h, 2:1 por 24 h, seguida de resina pura por 24 h. A polimerização foi feita em estufa a 70 por 24 h.

Técnica VIII (SCOTT & DIXON, 1973)

Estiquídios foram fixados durante 2 h em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,6, mais sacarose a 0,25 M, à temperatura ambiente. Após 3 lavagens de 10 min em tampão com concentrações decrescentes de sacarose, o material foi pós-fixado por 2 h em OsO₄ a 0,2% em tampão fosfato, pH 6,6, contendo sacarose a 0,25 M, à temperatura ambiente. Lavado 3 vezes (15 min cada) no mesmo tampão, o material foi transferido rapidamente para acetona a 50%, e então foi feita a contrastação em bloco com uranila a 2% em acetona 70%, durante 24 h a 4°C. A desidratação, infiltração e polimerização seguiram as técnicas II.

Obtenção e observação dos cortes

Os cortes foram feitos em ultramicrotômo Sorvall Porter-Blum MT2-B com auxílio de navalhas de vidro e de diamante. Para monitoramento ao microscópio de luz foram feitos cortes semi-finos (0,5 - 1,5 µm de espessura) os quais foram corados com azul de toluidina-O a 1% em solução de bórax a 1%. Para estudos ao MET, cortes ultra-finos, dourados e prateados, foram coletados em telas de cobre de 200 mesh. Os cortes foram contrastados por solução aquosa de uranila a 1% durante 30 min, no escuro, e em seguida por citrato de chumbo a 1% durante 7 min, e então examinados e fotografados em um MET Phillips EM-300.

II B. Preparação e análise de cortes dos tetrásporos liberados

Os tetrásporos liberados foram processados para análise ao MET e ao MEV.

a) Para estudos ao MET, porções férteis da planta tetráspórica contendo vários estiquídios foram separadas e colocadas em placas de Petri contendo água do mar filtrada. No fundo da placa haviam sido previamente colocadas várias lamínulas para servirem de substrato para os tetrásporos liberados. A liberação dos tetrásporos foi monitorada de hora em hora, sob microscópio estereoscópico, e começou cerca de 12 h após a primeira observação. Tanto os tetrásporos livres como os fixos no substrato foram coletados separadamente; a coleta foi feita com o auxílio de uma pipeta Pasteur sob microscópio estereoscópico Micronal 27844 VM, e em seguida os tetrásporos foram transferidos para tubos de ensaio. Os tetrásporos coletados foram imediatamente centrifugados e os *pellets* assim obtidos foram transferidos para tubos do tipo Eppendorf, onde os tetrásporos foram fixados segundo a técnica V. Após cada etapa do processamento, o material foi submetido a uma centrifugação de 2000 rpm, durante 10 min para concentrar os tetrásporos. A infiltração e polimerização do material foi feita em cápsulas *Beem*. Os blocos foram cortados como descrito anteriormente para as porções férteis da planta. Cortes semi-finos (0,5 - 1,0 μm de espessura), obtidos com navalha de vidro, foram montados em lâminas de vidro sobre pequenas gotas de água destilada, e deixados secar na estufa a 40°C até a total evaporação da água. Estas lâminas foram utilizadas para investigações histoquímicas de polissacarídeos, utilizando-se as mesmas técnicas de coloração feitas para os cortes em historesina, descritas no item "histoquímica", exceto alcian blue e alcian yellow.

b) Para análise ao MEV, os tetrásporos liberados e aderidos nas lamínulas foram fixados e processados com a mesma metodologia utilizada para a microscopia eletrônica de transmissão descrita no item anterior, até a etapa de desidratação. No final da desidratação, as lamínulas com os tetrásporos foram submetidas ao ponto crítico, e metalizadas em ouro. O material foi observado e fotografado no MEV modelo Phillips SEM-500.

RESULTADOS

Aspectos gerais

A planta tetraspórica de *H. musciformis* consiste de um talo cilíndrico, de organização pseudoparenquimatosa, abundantemente ramificado, com eixos principais dissecados por numerosos ramos curtos espinescentes (Fig. 2). Nestes ramos curtos diferenciam-se os tetrasporângios, quando então, estes ramos especializados, passam a ser chamados de estiquídios. Como os tetrasporângios crescem muito, esta região se torna dilatada (Fig. 3) e adquire pigmentação avermelhada, que ao ML e MET se verifica ser devido à concentração de cloroplastos que ocorrem nos tetrásporos. Em corte transversal examinado ao ML, um estiquídio mostra 3 regiões que, do centro para a periferia, são: a medular, a subcortical e a cortical (Fig. 4). A região medular é constituída por um grupo de células grandes, vacuolizadas, e envolvidas por uma parede celular espessa. A região medular é envolvida pela região subcortical que tem 2 a 3 camadas de células menores que as medulares. A região cortical é formada por pequenas células pigmentadas, das quais se diferenciam os tetrasporângios; esta região pode se apresentar mono ou biestratificada. Uma cutícula espessa reveste todo o estiquídio. Os tetrásporos são liberados pela ruptura da porção apical do tetrasporângio.

Das técnicas utilizadas para análise ao MET, os melhores resultados foram obtidos com as técnicas: I para observação da tetrasporogênese e células vegetativas, V observação dos tetrásporos liberados e VII observação somente das células vegetativas. Nestas técnicas empregou-se tempos de fixação e infiltração maiores do que o utilizados nas demais técnicas usadas neste trabalho.

Observações sobre o estiquídio

Os resultados dos estudos feitos ao ML e ao ME a respeito das células medulares, células subcorticais, células corticais, tetrasporogênese e tetrásporos liberados são descritos a seguir.

a) Células medulares

Microscopia de luz e histoquímica. São as maiores células encontradas em um corte transversal de um estiquídio, e estão localizadas na região central. Seu diâmetro varia entre 55-87 μm , não incluindo a parede (Fig. 5). Seu formato é arredondado de contorno um pouco irregular. As células são separadas entre si por uma espessa parede celular de aspecto lenticulado (Fig. 6). O vacúolo ocupa a maior parte do espaço citoplasmático.

Estas células reagem metacromaticamente quando tratadas com AT-O, evidenciando principalmente a parede celular (Fig. 5). Existe uma banda metacromática mais intensa na parte interna da parede celular próxima ao citoplasma. O citoplasma apresenta-se levemente metacromático revelando alguma basofilia citoplasmática (Fig. 5).

Quando submetidas à reação de PAS, o citoplasma destas células apresenta reação positiva, revelando um conteúdo granular (Fig. 7). Isto se deve à presença de grãos de amido das florídeas, que são perfeitamente individualizáveis nos aumentos observados.

Quando submetidas à reação com AB, os cortes revelam um padrão de coloração similar ao encontrado com AT-O, no que se refere à parede celular (Fig. 6). Nenhuma reação é observada neste tipo celular quando tratados com AY.

Quando submetidas à reação com ninhidrina-Schiff, as células medulares coram-se levemente na região do citoplasma periférico e nos *pit connections*, incluindo os *pit plugs* (Fig. 8).

Microscopia eletrônica. Em todos os cortes observados, os plastídeos aparecem pequenos, tendo o maior eixo entre 0,8 e 21,5 μm . Apresentam contorno circular-elíptico e

tilacóides paralelos, separados, não constituindo pilhas; estes são envolvidos por um tilacóide circular periférico. O plastídeo é limitado por uma dupla unidade de membrana. Poucos glóbulos osmiofílicos são observados, distribuídos entre os tilacóides (Figs. 9 e 10).

O vacúolo apresenta-se delimitado pelo tonoplasto e circundado por uma fina camada de citoplasma parietal onde encontramos as organelas celulares.

Em todos os cortes analisados, as mitocôndrias aparecem menores do que os cloroplastos (0,4- 0,6 μm de diâmetro), e mostram contorno circular com cristas tubulares bem desenvolvidas (Figs. 9 e 10). Estas organelas encontram-se sempre próximas aos cloroplastos.

Nas células medulares ocorrem poucos grãos de amido, e estes são de tamanhos variados e de formato lenticulado (Fig. 11).

Pelo fato destas células serem muito grandes, poucas vezes os núcleos são observados no microscópio eletrônico. Quando presentes, mostram um contorno levemente retangular com material granular constituindo o nucleoplasma (Fig. 12).

Ao microscópio eletrônico, a parede celular pode apresentar duas distribuições diferentes para as microfibrilas (Figs. 13 e 14). Na primeira, a região mais interna, adjacente à membrana plasmática, é formada por microfibrilas elétron-densas, compactadas, organizadas paralelamente, e mergulhadas em uma matriz amorfa elétron-transparente. A região mais externa se continua com o material amorfo intercelular, é mais fina, e formada por microfibrilas elétron-densas com aspecto ondulado (Figs. 9 e 13). Na segunda, a distribuição das microfibrilas ocorre de forma concentrada na região intercelular (Fig. 14).

b) Células subcorticais

Microscopia de luz e histoquímica. Estas células são menores que as anteriores (21,0 - 29,0 μm de diâmetro) e estão separadas umas das outras por uma espessa parede celular que não apresenta espessamento lenticulado (Fig. 5). Estão localizadas entre a região medular e a cortical.

Os *pit connections* aparecem entre células subcorticais e também entre células subcorticais e corticais, ocupando uma posição central quando se localizam entre as duas células derivadas da mesma célula mãe (Fig. 8).

Os resultados da reação histoquímica com ninhidrina-Schiff revelam a presença de material proteináceo no interior dos *pit connections* (Fig. 8).

Os resultados das demais técnicas histoquímicas são semelhantes aos obtidos para as células medulares. Os grãos de amido PAS-positivos são discóides porém, em vista lateral, apresentam forma lenticulada (Figs. 15 e 16).

Microscopia eletrônica. Em cortes transversais dos estiquídios, as células subcorticais mostram ao MET muitos plastídeos distribuídos periféricamente (Figs. 18 e 19). Estes plastídeos apresentam a mesma organização interna dos plastídeos das células medulares, porém são muito maiores do que os observados naquelas células, e tem formas variadas, embora predominem os alongados (Figs. 20 e 21). Estes plastídeos também apresentam glóbulos osmiófilos, às vezes arranjados em grupos de 2 ou 3 entre os tilacóides (Fig. 21).

As mitocôndrias estão distribuídas periféricamente nas células subcorticais e freqüentemente próximas dos cloroplastos (Fig. 20). Elas apresentam um contorno elíptico-arredondado, com o maior diâmetro entre 0,5 - 0,7 μm . As cristas são tubulares como as observadas nas mitocôndrias das células medulares.

Os grãos de amido, em algumas células, são observados associados a depressões periféricas do cloroplasto, porém estes grãos estão localizados no citoplasma (Fig. 18).

Os vacúolos apresentam aspectos variados nas células observadas (Figs. 18 e 19). Ocasionalmente dentro destes vacúolos são observadas estruturas esféricas elétron-densas. Não foi possível determinar se tais estruturas se encontram envolvidas por membrana. Quando estes glóbulos estão presentes, os grãos de amido não são observados.

A parede celular apresenta-se constituída por material amorfo e material microfibrilar semelhantes àqueles das células medulares, porém a organização e a distribuição das fibrilas é

muito variada, como pode ser observado nas figuras 19, 20 e 22. Entre algumas células é possível observar uma camada elétron-densa pouco espessa atravessada por regiões elétron-transparentes semelhantes a plasmodesmos (Fig. 21), cuja natureza ou função não conseguimos determinar.

Ao microscópio eletrônico, os *pit connections* aparecem formados pela continuidade entre as células, porém a abertura é obstruída por uma substância elétron-densa correspondente ao *pit plug*; nesta região, a parede celular é interrompida (Figs. 19, 23 e 24).

c) Células corticais

Microscopia de luz e histoquímica. Como o nome indica, as células corticais localizam-se mais externamente e são as menores células vegetativas do talo (9 - 12 μm de diâmetro por 18 - 19 μm de comprimento), sendo envolvidas por uma parede celular espessa. Estas células apresentam morfologia variada, e dependendo do ângulo de corte, podem se apresentar alongadas ou esféricas (Fig. 5). Na microscopia de luz não são observados vacúolos neste tipo celular.

As células corticais são encontradas unidas entre si ou a células subcorticais através de *pit connections* (Fig. 8), que se coram de róseo pelo teste de ninhidrina-Schiff, demonstrando a presença de proteína nesta região. Os demais testes histoquímicos revelam um resultado semelhante aos das células descritas anteriormente.

A reação de PAS foi muito intensa neste tipo celular, indicando a presença de grande concentração de grãos de amido (Figs. 7 e 16).

Microscopia eletrônica. Devido a redução no tamanho dos vacúolos, ao microscópio eletrônico, observa-se que estas células apresentam o citoplasma preenchido por organelas.

Os plastídeos estão presentes em grande quantidade, e apresentam morfologia variada e distribuição parietal como nas células anteriormente descritas (Fig. 25).

As mitocôndrias, dependendo do corte, podem se apresentar alongadas ou esféricas (Figs. 25 e 28).

O núcleo é central ou parietal e tem nucléolo grande (Figs. 25, 26 e 28). O envelope nuclear pode estar parcialmente associado com uma grande quantidade de retículo endoplasmático (Figs. 27 e 28)

A parede celular pode se apresentar pouco espessa, constituída por uma granulação elétron-densa, ou mais espessa, formada por microfibrilas organizadas paralelamente, mergulhadas numa matriz amorfa (Figs. 25 e 28).

Numerosos grãos de amido são vistos por todo o citoplasma. Estes apresentam formato lenticular como o observado nas figuras 25 e 28.

Gotas, possivelmente de natureza lipídica, são observadas no citoplasma deste tipo celular (Fig. 26).

As células corticais estão unidas às subcorticais por meio de *pit connections*, como o observado na figura 29, o que confirma o resultados observados ao ML.

d) Tetrasporângios e tetrasporogênese

Microscopia de luz e histoquímica. O tetrasporângio diferencia-se a partir de células corticais, com as quais mantém contato por meio de *pit connections* por algum tempo (Fig. 30). Durante o seu desenvolvimento, o tetrasporócito sofre duas divisões sucessivas que resultam em 4 células-filhas, os tetrásporos (Figs. 31, 32 e 34).

A matriz extracelular e o componente microfibrilar da parede celular do tetrasporângio em *H. musciformis* coram metacromaticamente com AT-O, mostrando uma coloração vermelho violácea (Figs. 35 a 38), que revela a natureza polissacarídica sulfatada desta região. A região da parede celular mais próxima ao tetrasporângio é mais compacta e aparece mais intensamente corada do que as demais regiões extracelulares (Figs. 37 e 38).

Nos tetrasporócitos jovens não é observada metacromasia no conteúdo citoplasmático (Fig. 35). Já o citoplasma dos tetrásporos reage ortocromaticamente com AT-O pH 4,0, porém mostra granulações metacromáticas quando tratado com AT-O pH 3,0 (Figs. 37 e 38).

Quando submetidos à coloração de ninhidrina-Schiff, os tetrásporos reagem positivamente evidenciando grandes quantidades de proteínas citoplasmáticas (Fig. 39) porém, ausentes na parede celular .

Os tetrasporócitos jovens apresentam reação levemente positiva quando tratados pelo método de PAS, sugerindo um início da síntese de grãos de amido (Fig. 30). Nos tetrásporos maduros, a reação de PAS é fortemente positiva, sendo possível observar um numeroso acúmulo de grânulos PAS-positivos por todo o citoplasma (Fig. 31). Por outro lado, todo o material extracelular apresenta reação PAS-negativa, indicando a ausência de polissacarídeos neutros na parede celular. Os controles não oxidados e os controles oxidados porém, bloqueados por acetilação, não apresentam reação positiva em nenhum dos tipos celulares estudados (Fig. 17).

No material tratado com AB pH 0,5, observa-se uma intensa coloração em torno do tetrasporângio a qual aparece como uma fina camada contínua; este resultado sugere a presença de polissacarídeos sulfatados envolvendo todo o tetrasporângio e também cada tetrásporo isoladamente. O padrão de coloração obtido após o uso de AB é similar ao obtido com o uso do AT-O, porém com a coloração AB o halo em torno da célula é bem mais delgado (Figs. 32, 33 e 34). O citoplasma dos tetrásporos também segue os mesmos padrões de metacromasia observados com AT-O em pH 3,0. Cortes tratados com AY em pH 2,5 permitem identificar no citoplasma dos tetrásporos uma coloração amarelada, sugerindo a presença de polissacarídeos carboxilados (Figs. 32 e 33).

Microscopia eletrônica. Nos tetrasporócitos jovens, os grãos de amido são pequenos e ocorrem em quantidade reduzida; com a maturação do tetrasporângio, o tamanho e a quantidade destes grãos aumentam. Simultaneamente, os plastídeos aumentam em número,

preenchendo todo o espaço citoplasmático (Figs. 40 e 41). Os grãos de amido podem ocorrer próximo ao núcleo e são também observados em íntima associação à face trans das cisternas do Golgi, sugerindo que a origem destes grãos esteja relacionada com os dictiossomos (Figs. 42 e 43).

Os cloroplastos, durante a tetrasporogênese, mostram a típica organização estrutural dos plastídeos das demais células descritas, com tilacóides simples, paralelos, envolvidos por um tilacóide circular periférico, e revestido pela membrana do cloroplasto. Poucos grânulos osmiófilos são observados entre os tilacóides (Figs. 40 e 41). Paralelamente ao aumento na quantidade destas organelas, invaginações do plasmalema começam a crescer de forma centrípeta até dividirem o tetrasporângio zonadamente em quatro esporos uninucleados (Fig. 44). Neste estágio, os dictiossomos são numerosos e estão distribuídos por todo o citoplasma (Fig. 41). As invaginações do plasmalema não ocorrem ao mesmo tempo nos quatro esporos; primeiro formam-se duas células que posteriormente se dividirão em outras duas, sincronicamente ou não (Fig. 44). Nestas células o núcleo pode ser visto na periferia celular, apresentando nucléolo elétron-denso com pequenas áreas elétron-transparentes (Figs. 44 e 45). O retículo endoplasmático rugoso pode ocorrer paralelo ao envelope nuclear.

Na periferia do plasmalema surgem pequenos espessamentos com aspecto irregular como projeções da membrana, possivelmente envolvidos com a produção do material microfibrilar (Fig. 41). Antes que se complete a divisão, o sulco de clivagem contém somente material microfibrilar irregularmente distribuído e mergulhado em uma matriz amorfa elétron-transparente (Fig. 41). A clivagem do tetrasporângio em tetrásporos é inicialmente incompleta, permanecendo por algum tempo uma continuidade citoplasmática entre os tetrásporos (Figs. 41 e 44). Estes diferem das células vegetativas, nas quais um *pit plug* é depositado na região de intercomunicação celular; já nos tetrasporângios maduros os septos são completos conforme observado na figura 44.

Uma camada irregular de material mucilaginoso é depositada em torno dos tetrásporos em divisão (Fig. 46), isto ocorre desde o início da formação dos septos de divisão.

Vesículas revestidas de membrana, e apresentando uma região central elétron-densa cercada por um halo claro, aparecem distribuídas por todo o citoplasma, sendo mais abundantes nas proximidades das regiões de clivagem (Figs. 40, 41 e 46).

A formação da parede celular do tetrásporo começa antes que toda a citocinese se complete (Fig. 44). O tetrasporângio maduro é envolvido por uma parede celular constituída por 3 camadas de microfibrilas mergulhadas em uma matriz amorfa (Fig. 47). A camada mais externa da parede é a menos densa, reticulada. A camada intermediária é formada por fibrilas orientadas paralelamente ao plasmalema. A camada interna, adjacente à membrana plasmática, consiste de material de aspecto grânulo-fibrilar muito compactado. As três camadas acima podem ser referidas como externa, média e interna da parede celular do tetrasporângio.

e) Tetrásporos livres

Microscopia de luz e histoquímica. Uma vez liberados, os tetrásporos assumem forma esférica, perdendo o seu contorno angular. Os tetrásporos são envolvidos por uma camada de mucilagem.

Foram analisados 2 estágios diferentes de desenvolvimento nos tetrásporos: o primeiro estágio foi considerado como sendo logo após a liberação, quando ainda não houve adesão do tetrásporo ao substrato; foi considerado um segundo estágio quando o tetrásporo já se encontrava fixado ao substrato.

Os resultados dos testes de reação com PAS revelam muitos grânulos PAS- positivos no interior dos tetrásporos em ambos os estágios, porém menos abundante no segundo estágio. É possível reconhecer nos tetrásporos uma área com coloração mais intensa, indicando uma certa polarização dos grãos (Fig. 48).

O tratamento dos tetrásporos com AT-O resulta numa intensa coloração ortocromática de aspecto granular no conteúdo citoplasmático, (Figs. 49 e 50), nos dois estágios de desenvolvimento dos tetrásporos analisados. Por outro lado, a camada mucilaginosa não se cora com AT-O no estágio inicial (Fig. 49), logo após a liberação do tetrásporo, porém aqueles que já estavam fixados ao substrato apresentam reação metacromática na presença de AT-O, revelando uma coloração violácea no componente mucilaginoso (Fig. 50). A coloração metacromática revela a presença de polissacarídeos sulfatados, característicos da parede celular, indicando que a mesma está começando a se formar.

Microscopia eletrônica. Ao microscópio eletrônico, a mucilagem que envolve todo o tetrásporo apresenta aspecto amorfo, de elétron-densidade variável. No citoplasma ocorrem vesículas elétron-transparentes pequenas (Fig. 51). O citoplasma mostra-se claramente menos compactado do que o observado nos tetrásporos maduros. Os grandes cloroplastos apresentam tanto tilacóides paralelos quanto distribuídos mais ou menos irregularmente (Fig. 52).

No primeiro estágio, logo após a liberação, os tetrásporos são envolvidos por uma espessa camada de mucilagem pouco elétron-densa, com aspecto amorfo (Fig. 51). Neste estágio, os tetrásporos assumem forma esférica, com diâmetro entre 21,9 - 24,3 μm . Grupos de plastídeos com organização variada dos tilacóides, encontram-se preferencialmente em grupos no centro da célula e mostram contorno elíptico ou irregular, raros corpos osmiófilos são encontrados no interior dos plastídeos. Regiões elétron-transparentes, contendo material fibrilar são observadas entre os tilacóides (Fig. 51).

Os grãos de amido, de tamanhos variáveis, são vistos distribuídos por todo o citoplasma, sem mostrarem relação espacial com os plastídeos (Fig. 51).

As mitocôndrias, distribuídas por todo o citoplasma, concentram-se mais na periferia celular ou entre grupos de cloroplastos. Apresentam-se numerosas e variáveis em tamanho e forma (Fig. 52).

No segundo estágio, os tetrásporos já estão depositados sobre o substrato, apresentando um certo grau de adesão; isto ocorre a cerca de vinte horas após a liberação dos tetrásporângios.

Cortes de tetrásporos, nesta fase mostram que os cloroplastos estão espalhados por todo o citoplasma, não formando grupos como no estágio anterior. A organização dos tilacóides é a mesma já descrita para os outros tipos celulares. Poucos grânulos osmiófilos são observados, porém muitas regiões claras são visíveis entre os tilacóides (Figs. 53 e 54). Grãos de amido são encontrados em menor quantidade.

As mitocôndrias apresentam a mesma distribuição e aspecto observados no estágio anterior.

Neste estágio, inicia-se a formação da parede celular, que mostra organização semelhante à parede celular dos demais tipos celulares.

Observações feitas ao microscópio eletrônico de varredura mostram que a superfície do tetrásporo é irregular, e que este se fixa ao substrato por meio de grande quantidade de mucilagem (Fig. 55 e 56).

DISCUSSÃO

As técnicas empregadas para os estudos de ML de rotina e histoquímica mostraram-se adequadas à realização dos objetivos propostos neste trabalho, fornecendo resultados claros desde as primeiras tentativas; entretanto para os estudos de microscopia eletrônica, que requerem uma melhor preparação do material, foi necessário testar uma série de técnicas até encontrar uma que permitisse a obtenção de cortes ultra-finos, de boa qualidade, para as observações ao MET. Após a análise dos resultados, acreditamos que as dificuldades encontradas, inicialmente, podem ser atribuídas à estrutura e talvez, também, à natureza do material estudado, conforme discutido abaixo.

Todos os tipos celulares descritos para o estiquídio são revestidos por paredes extremamente espessas, e além disso, o próprio estiquídio ainda é revestido por uma espessa cutícula; parede e cutícula parecem dificultar a penetração dos líquidos fixadores, desidratadores, e resinas de inclusão, observações também realizadas em vegetais superiores por COETZEE (1985). Desta forma, confirma-se o fato de que as técnicas que requerem maiores tempos de fixação e infiltração, como as descritas nos itens I, V e VII, foram as que apresentaram melhores resultados. As camadas anteriormente citadas dificultam também, direta e indiretamente, a obtenção de cortes ultra-finos, mesmo quando navalhas de diamante são empregadas. Dois fatos podem agravar ainda mais esta situação: 1. As células corticais são muito pequenas, o que resulta numa proporção parede/célula maior do que aquela das camadas mais internas, gerando regiões que oferecem diferentes resistências aos procedimentos da preparação; e, 2. Estas mesmas células periféricas têm o citoplasma denso e compactado com organelas, o que por si só já oferece uma maior resistência à penetração dos agentes químicos empregados na preparação do material, dificultando a sua chegada até as células medulares; estas últimas, por sua vez, sendo grandes e altamente vacuolizadas, precisam ser muito bem

fixadas e impregnadas de modo que possam oferecer suficiente apoio ao tecido como um todo, para que não colapse com a pressão da navalha no momento do corte.

Não descartamos a possibilidade de que a composição química das paredes, que é de polissacarídeos principalmente sulfatados, venha de alguma forma dificultar a preparação do material, embora desconheçamos a maneira como isso ocorreria. Finalmente, temos a mencionar o fato de que essa é a primeira descrição da ultra-estrutura e histoquímica de *H. musciformis*, pois não existem trabalhos feitos com essa espécie, que pudessem servir de subsídios para estudos metodológicos.

Os resultados das observações feitas aos microscópio de luz e eletrônico permitem afirmar que as células vegetativas de *H. musciformis* são ultra-estruturalmente semelhantes às de *S. naidum*, conforme a descrição de MCBRIDE & COLE (1969); diferem, entretanto, das de outra rodoficea, *A. helminthochorton* que, segundo PELLEGRINI & PELLEGRINI (1985), possui células corticais dotadas de grande vacúolo central, envolto por uma fina camada de citoplasma; este arranjo é o oposto do encontrado em *H. musciformis*, cujas células corticais são pequenas e raramente vacuolizadas, enquanto que as células medulares são as que apresentam grande vacúolo. Estas diferenças estruturais são suficientes para demonstrar que a organização dos talos das algas rodofíceas não é única, podendo apresentar variações entre as espécies, predominando, entretanto, o tipo de organização observado em *H. musciformis*.

A ultra-estrutura dos plastídeos é hoje considerada uma característica de grande valor taxonômico nas algas, depois que TRIPODI & GARGIULO (1984) verificaram que a classificação baseada no arranjo dos tilacóides, nos diferentes PHYLA, coincidia com a taxonomia clássica de DODGE (1973). Nas rodofíceas, os tilacóides não se associam uns aos outros, e devido a esta organização, a posição filogenética deste grupo é controvertida (TRIPODI & GARGIULO, 1984). Esta organização de lamelas isoladas, constituindo os tilacóides das rodofíceas, é observada também, nos cloroplastos de alguns tipos celulares de plantas superiores do tipo C4, porém seu significado funcional é desconhecido (HOLTZMAN &

NOVIKOFF, 1985). Em todos os tipos celulares descritos neste trabalho, os plastídeos mostram a estrutura típica das rodofíceas, sendo que seu tamanho apresenta variações nos diferentes tipos celulares; também varia a forma, ainda que predomine a alongada.

Como em *P. hypnoides* (SCOTT & DIXON, 1973), os plastídeos de *H. musciformis* apresentam localização predominantemente periférica em todos os tipos de células vegetativas, inclusive nas células corticais, onde se poderia esperar que as organelas se distribuíssem por toda a célula, em virtude do fato destas apresentarem vacúolos pequenos; vacúolos grandes poderiam ser a causa das organelas se localizarem periféricamente nos demais tipos de células.

As gotas lipídicas elétron-densas, descritas entre os tilacóides de *H. musciformis*, são comparáveis aos "plastiglóbulos" descritos por WETHERBEE & WYNNE (1973) em *P. novae-angliae*, por GORI (1980) em *G. clavatum*, por RAMM-ANDERSON & WETHERBEE (1982) em *N. helminthoides*, e por PUESCHEL (1988a) em *H. rubra*. Similarmente, as pequenas áreas fibrilares, que são observadas entre os tilacóides de *H. musciformis*, são idênticas às descritas por BISALPUTRA & BISALPUTRA (1967), TRIPODI (1971), CHAMBERLAIN & EVANS (1973), e PUESCHEL (1988a), que as interpretam como sendo áreas de localização do DNA. Nas rodofíceas, os plastídeos multiplicam-se por divisão binária após constricção da organela, resultando em cloroplastos-filhos completos (GORI, 1980; TSEKOS, 1982 e 1983). Isto pode explicar a constricção observada na fig. 52, que coincide em todos os aspectos com o descrito por estes autores.

Nos diversos tipos celulares de *H. musciformis*, foi freqüente a associação espacial de cloroplastos com mitocôndrias, sendo que PUESCHEL (1979) e OATES & COLE (1989), que identificaram arranjo similar em tetrasporócitos de *P. palmata* e em células vegetativas de *P. hendryi*, interpretaram esta associação como um mecanismo que aumentaria a interação metabólica entre as organelas.

Os corpos elétron-densos encontrados nas células corticais e subcorticais de *H. musciformis* já haviam sido identificados em outras rodofíceas como *G. clavatum* (GORI, 1980)

e *P. sertularioides* (TRIPODI, 1971), tendo sido interpretados como material lipídico com função de reserva.

Em todas as células do estiquídio, a parede celular mostra uma textura microfibrilar, com microfibrilas estruturadas em camadas de diferentes graus de compactação. Esta organização estrutural foi descrita em várias outras rodofíceas (CHAMBERLAIN & EVANS, 1973; KONRAD-HAWKINS, 1974; BOROWITZKA & VESK, 1978; YOUNG, 1980; e MARIANI *et alii*, 1990), mas o mecanismo da deposição sequencial das camadas da parede não é conhecido. MACARTHUR & MOSS (1977) sugerem que, em *Enteromorpha intestinalis* (Linneaus) Link, a formação de camadas pode ser consequência das diferenças de concentração do material fibrilar que é possivelmente originado do complexo de Golgi. Também YOUNG (1980) e RAMM-ANDERSON & WETHERBEE (1982) sugerem que as vesículas provenientes do Golgi estão envolvidas na formação da parede celular de *A. defectum* e *N. helminthoides*, respectivamente.

Nas células das algas, os polissacarídeos são os principais componentes estruturais da parede celular; podem também desempenhar um importante papel de reserva citoplasmática, na forma de grãos de amido, que constituem os principais polissacarídeos neutros das rodofíceas. Quando presentes como moléculas sulfatadas na parede celular, os polissacarídeos estão envolvidos na permeabilidade seletiva das células e, em algas cujo habitat se localiza na zona entre-marés, tais polissacarídeos, supostamente, protegem-nas contra a dessecação em maré baixa (TRIPODI & DE MASI, 1975). Os polissacarídeos sulfatados da parede celular das células reprodutivas, pela sua natureza higroscópica, também desempenham um importante papel na liberação dos esporos e gametas (MCCULLY, 1968; e EVANS *et alii*, 1973). Em *H. musciformis*, tanto polissacarídeos neutros como sulfatados foram detectados em todos os tipos celulares por meio de reações histoquímicas.

A reação de PAS é utilizada para a identificação de polissacarídeos neutros porque requer a presença de grupos 1,2 glicol que são oxidados para aldeídos pelo ácido periódico

(TRICK & PUESCHEL, 1990). Grupos 1,2 glicol são abundantes em polissacarídeos neutros, como por exemplo os constituintes dos grãos de amido das florídeas, conforme estabelecido por GORDON & MACCANDLESS (1973) em *C. crispus*, LA CLAIRE & DAWES (1976) em *E. nudum*, YOUNG (1979) em *A. defectum*, e PUESCHEL (1980) em *P. palmata*. A intensa resposta das células vegetativas e reprodutivas de *H. musciformis* à reação de PAS pode ser atribuída à grande quantidade de grãos de amido citoplasmáticos, que dão um aspecto granular às células submetidas a esta reação. Embora os grãos de amido não apresentem uma localização preferencial na maioria das células vegetativas desta espécie, em várias células corticais eles se localizam junto do núcleo e/ou dos plastídeos, como também ocorreu em *Membranoptera sp.* (MCDONALD, 1972) e em *Polysiphonia sp.* (WETHERBEE & WYNNE, 1973); CHAMBERLAIN & EVANS (1973) notaram que os grãos de amido das florídeas, embora não sendo produzidos dentro dos plastídeos, podem ocorrer junto a depressões da face externa destas organelas, fato este também observado em *H. musciformis*.

Nos tetrasporângios de *H. musciformis*, os grãos de amido são observados próximos às cisternas do Golgi, sugerindo que estas organelas contribuem para a formação destes grãos. Segundo KUGRENS & WEST (1972), os dictiossomos parecem estar relacionados com a formação dos grãos de amido nos tetrásporos de *E. saccata*.

O emprego do corante azul de toluidina produz uma reação metacromática violácea nas paredes de todos os tipos celulares de *H. musciformis*, revelando a presença de grupos ácidos, como ocorreu em *C. crispus* (GORDON & MACCANDLESS, 1973) e em *C. tenuissima* (TSEKOS, 1985). Estes resultados estão de acordo com RAMARAO (1970), MSHIGENI (1976), e SAITO & OLIVEIRA (1990), que se referem à presença de carragenana, um polissacarídeo sulfatado de grande interesse comercial, em *H. musciformis*. Segundo SCOTT & DORLING (1965), as reações da parede celular com AT-O e AB diferem qualitativa e quantitativamente em diferentes frações ácidas dos polissacarídeos. Estes polissacarídeos ácidos, provavelmente sulfatados, parecem corresponder às substâncias pécticas

detectadas com vermelho de rutênio em *Bornetia* sp. (YOUNG, 1980). Estas substâncias foram posteriormente identificadas como galactanas (YOUNG, 1980). Em pH baixo, os grupos sulfatados são ionizados e por isso pode-se esperar que a área de metacromasia mais intensa, que se observa na parede celular de *H. musciformis*, seja devida à grande concentração de carragenana mais sulfatada. Esta interpretação está baseada na suposição de que a configuração terciária de cada polímero expõe os poliânions sulfatados, formando uma grande quantidade de complexos com o AT, conforme discutido por GORDON & MACCANDLESS (1973). Em *H. musciformis* os polissacarídeos sulfatados também foram observados no citoplasma, principalmente dos tetrásporos quando corados com AT-O pH 3.0, isto confirma que a sulfatação dos polissacarídeos ocorre no meio intra-celular.

As propriedades de coloração com a reação de alcian foram bem investigadas por PEARSE em 1968. A técnica, que emprega ambos os corantes (AB e AY), e que permite distinguir os polissacarídeos exclusivamente sulfatados dos exclusivamente carboxilados, foi introduzida por RAVETTO em 1964. Em pH 0,5, os grupos carboxil não se dissociam, assim o AB identifica apenas os grupos sulfatados, enquanto que o AY, em pH 2,5, reage com os grupos que não reagiram no tratamento anterior. Tal reação permitiu visualizar em *H. musciformis* uma coloração mais intensa com AB, como uma fina camada em torno de todos os tipos celulares, nas mesmas áreas em que a metacromasia com AT-O foi mais intensa, confirmando assim, a presença de grupos mais sulfatados nestas regiões. O mesmo padrão de coloração foi obtido por GORDON & MACCANDLESS (1973) e por LA CLAIRE & DAWES (1976) em outras rodofíceas, por meio das reações com azul de toluidina. Os resultados obtidos neste trabalho somados aos resultados de outros autores permitem sugerir que devido à grande quantidade de polissacarídeos sulfatados, correspondente ao que outros autores já identificaram como carragenana, encontrada nas paredes celulares de *H. musciformis*, esta espécie é uma fonte importante deste ficocolóide para fins comerciais, como já sugerido por outros autores.

Na família Florideophyceae (Rhodophyta), a citocinese total somente ocorre durante a formação das células reprodutivas, sendo que a divisão de todas as outras células é incompleta devido a permanência de uma conexão entre elas. Esta conexão, chamada *pit connection*, entretanto, é logo fechada pela deposição de uma substância de natureza proteínica que constitui o chamado *pit plug* (PUESCHEL, 1980). O termo *pit connection* foi mantido por PUESCHEL & COLE (1982) e tem sido usado pelos morfologistas para se referirem à aparente continuidade celular, embora não ocorra real continuidade citoplasmática. RAMUS (1971) estabeleceu que os *pit plugs* são permanentes nos tecidos vegetativos, porém degeneram durante a formação das células reprodutivas. Isto foi também observado na diferenciação dos tetrásporos de *H. musciformis*. No tetrásporócito jovem foi evidenciada uma continuidade citoplasmática entre este e a célula basal, e posteriormente, entre os tetrásporos recém formados. Tal continuidade citoplasmática desaparece após o amadurecimento dos tetrásporos, que ficam totalmente isolados uns dos outros, envolvidos pela parede celular recém formada.

Em *H. musciformis*, no MO, um grande número de *pit connections* é observado entre as células vegetativas, especialmente após o uso do corante histoquímico para proteínas totais, como foi também demonstrado por RAMUS (1971) em *G. pacifica* e por TSEKOS (1983) em *G. teedii*, através de diferentes reações. São várias as possíveis funções sugeridas para os *pit connections* e os *pit plugs*. Segundo RAMUS (1971) a dissolução dos *pit plugs* deve facilitar o transporte de substâncias nutritivas para os esporos. KUGRENS & WEST (1974) concordam com estas observações, porém, acrescentam que seria mais correto considerar os *pit plugs* como estruturas vestigiais sem função específica nos tecidos reprodutivos; já nos tecidos vegetativos, os *pit connections* com seus respectivos *pit plugs*, participariam da manutenção da integridade da planta, conferindo resistência estrutural ao talo de muitas algas pseudoparenquimatosas (KUGRENS & WEST, 1974).

Em *H. musciformis* observa-se que as células reprodutivas maduras são morfológica e citologicamente distintas das células vegetativas, o que está de acordo com o que estabeleceu

FRITSCH (1965) para a divisão Rhodophyta. A tetrasporogênese de *H. musciformis* seguiu os mesmos padrões descritos por TSEKOS (1985) em *C. tenuissima*. Já em *P. palmata*, cuja tetrasporogênese também se inicia com o aumento de tamanho das células da camada cortical, uma nova parede deposita-se em torno do tetrasporócito (PUESCHEL, 1979), o que não ocorre nas duas espécies mencionadas anteriormente. Uma outra diferença morfológica pode ser encontrada entre os tetrasporócitos de *H. musciformis* e *H. rubra*. Em *H. musciformis*, a célula correspondente ao tetrasporócito tem forma mais alongada e citoplasma mais denso do que as demais células corticais; em *H. rubra*, PUESCHEL (1982) demonstrou que o tetrasporócito é mais circular e tem citoplasma menos denso do que as células vegetativas.

São poucas as informações sobre a divisão meiótica das células reprodutivas das rodofíceas, mas é sabido que este processo ocorre rapidamente. Alguns trabalhos, entretanto, descrevem estágios isolados da meiose, destacando-se entre eles os de KUGRENS & WEST (1972), TRIPODI & DE MASI (1975), PUESCHEL (1980), e BROADWATER *et alii* (1986a e b); estes últimos autores tratam dos principais eventos da meiose em *D. baillouviana* do ponto de vista ultra-estrutural. Em *H. musciformis* não foram observadas as etapas da meiose, mas foi identificada e descrita a divisão do tetrasporócito em duas e depois em quatro células. Os aspectos observados e descritos coincidem com as observações de SANTISI & DE MASI (1981) sobre a clivagem do tetrasporângio de *E. montagnei*, diferindo apenas na forma de divisão dos tetrásporos, que nesta última espécie é cruciada.

Quando a clivagem dos tetrasporângios de *H. musciformis* estava próxima ao final, observou-se, ao ME, um aumento na produção de pequenas vesículas de aspectos bem característicos, idênticas àquelas descritas por CHAMBERLAIN & EVANS (1973) nos tetrásporos e carpósporos de *C. rubrum*, e por eles denominadas *cored vesicles*; o termo *cored vesicle* é hoje de uso generalizado para designar as vesículas revestidas por uma unidade de membrana e cujo conteúdo apresenta uma região central bem elétron-densa envolvida por halo periférico claro. Em *H. musciformis*, as *cored vesicles* são observadas inicialmente espalhadas

pelo citoplasma do tetrasporócito, porém mais tarde são vistas concentradas junto às regiões de clivagem, o que permite supor que a sua atuação se dará a nível da superfície celular. Esta interpretação encontra subsídios nos trabalhos de MCBRIDE & COLE (1971), PUESCHEL (1979) e SANTISI & DE MASI (1981), que as associam à produção de material mucilaginoso ou polissacarídico depositado na superfície dos esporos e posteriormente utilizado na fixação destes ao substrato, e nos trabalhos de KRUGENS & WEST (1974), que demonstraram que as *cored vesicles* das algas vermelhas são encontradas exclusivamente nas células germinativas. Nos tetrásporos de *H. musciformis* observa-se na superfície celular a presença de um material pouco elétron-denso, PAS-negativo, que também não reage com AT-O, e que ao microscópio eletrônico de varredura permitiu verificar que atua na adesão dos tetrásporos ao substrato. Pelos resultados negativos dos testes de PAS e AT-O, supõem-se que este material seja de natureza proteinácea, por esta razão nos referimos a ela como sendo mucilagem, já identificada em muitas outras espécies.

Durante a tetrasporogênese de *H. musciformis*, observa-se inicialmente um aumento do número de organelas, principalmente de cloroplastos, fato este também observado em *G. flosculosa* (PEYRIÈRE, 1970), *L. gardneri* (KRUGENS & WEST, 1972), *P. hypnoides* (SCOTT & DIXON, 1973), e *P. palmata* (PUESCHEL, 1980). Nestas espécies, o núcleo parece envolto por uma quantidade variável de retículo endoplasmático granular (REG) durante a tetrasporogênese, conforme também descrito em *H. musciformis*. Acredita-se que REG esteja relacionado com a alta atividade metabólica do tetrasporângio, quando ocorre um grande aumento do número de organelas.

Nos tetrásporos de *H. musciformis*, o contorno do envelope nuclear é irregular, talvez devido à pressão exercida pelo grande número de organelas, uma vez que ao redor dos núcleos foram observadas numerosas mitocôndrias e grãos de amido. A ocorrência de núcleos de forma irregular não é incomum durante a esporogênese, tendo sido verificada em diferentes espécies de rodofíceas, tais como: *P. sertularioides* (TRIPODI, 1971), *L. gardneri* (SCOTT &

DIXON, 1973). A presença dos grandes nucléolos observados nos núcleos dos tetrásporos de *H. musciformis* sugere que estas células apresentam grande atividade sintética, o que encontra apoio nas observações de WETHERBEE & WYNNE (1973) de que os tetrásporos são células muito ativas.

Durante a tetrasporogênese de *H. musciformis*, poucas variações são observadas na estrutura fina dos plastídeos; também durante a tetrasporogênese de *G. flosculosa* e *Ceramium* sp. foram pequenas as mudanças descritas nos plastídeos por PEYRIÈRE (1970), e CHAMBERLAIN & EVANS (1973), respectivamente. No tetrasporócito jovem, bem como nos tetrásporos maduros, os plastídeos mostram um grau de diferenciação comparável ao dos carpósporos maduros de *N. helminthoides*, conforme a descrição de RAMM-ANDERSON & WETHERBEE (1982). Em *H. musciformis*, neste estágio da diferenciação, observa-se abundantes cloroplastos espalhados por todo o citoplasma, numa organização coincidente com a observada por TSEKOS (1985) nos carpósporos de *G. tenuissima*.

Em material não fixado, foi possível observar ao ML que os tetrásporos maduros apresentam intensa pigmentação. Esta pigmentação pode ser explicada pelos resultados da reação de PAS e dos estudos ao ML e MET, que revelam a presença de grande número de grãos de amido e de plastídeos, que nas algas vermelhas, contêm pigmentos do tipo ficobilinas, justificando a designação destas algas como vermelhas. TSEKOS (1973) também observou intensa reação com PAS nos carpósporos maduros de *G. teedii*, entretanto nos tetrásporos liberados de *H. musciformis*, observa-se que a quantidade de grãos de amido, que havia aumentado durante a tetrasporogênese, diminuiu vinte horas após a liberação, em comparação com os tetrásporos recém liberados. Como são estruturas de reserva energética, esta diminuição deve estar relacionada com o seu consumo para as diferentes atividades metabólicas do tetrásporo liberado, que incluem a formação da nova parede celular.

Os esporos das algas vermelhas, conforme demonstrado por AVANZINI *et alii* (1984), não possuem uma parede rígida, porém são envolvidos por uma camada mucilaginosa, o

que foi também observado em outras espécies por PUESCHEL & COLE (1975). Nos tetrásporos livres de *H. musciformis*, a superfície celular é coberta por uma camada de material semelhante a uma mucilagem como o observado em outros estudos.

CONCLUSÕES

Pelas observações feitas aos microscópios de luz, e eletrônico, podemos concluir que os estiquídios de *H. musciformis* são formados por 3 tipos diferentes de células vegetativas, e é a partir das células corticais que se diferenciam os tetrásporângios.

Para análise ultra-estrutural desta espécie são necessários tempos mais longos de fixação e infiltração para a obtenção de cortes ultra-finos de boa qualidade.

Existe uma relação direta entre o tamanho dos vacúolos e os tamanhos dos diferentes tipos de células vegetativas.

A parede celular, de todos os tipos de células estudados, é constituída por material microfibrilar, imerso numa matriz mucilaginosa. A carragenana, ficocolóide formado por polissacarídeo sulfatado, de grande importância comercial, ocorre principalmente na parede celular desta espécie.

Entre todas as células vegetativas ocorrem interligações, chamadas de *pit connections*, porém não existe continuidade citoplasmática entre as células, já que estas são obstruídas por uma substância de natureza protéica, o *pit plug*.

Os grãos de amido são citoplasmáticos e constituem o material de reserva predominante em todos os tipos celulares. A produção destes grãos aumenta durante a tetrásporogênese, porém, nos tetrásporos liberados o número diminui gradativamente.

A divisão dos tetrásporângios em tetrásporos dá-se de forma centrípeta com invaginação da membrana plasmática seguida da deposição da parede celular; esta última organiza-se em 3 camadas diferentes, somente em torno do tetrásporângio .

A tetrásporogênese em *H. musciformis* não implica em profundas variações na ultra-estrutura das mitocôndrias e dos cloroplastos, entretanto, acresce o número de dictiosomos durante a diferenciação e formação dos tetrásporos.

Nos tetrásporos estão presentes polissacarídeos sulfatados na parede celular e no meio intra-celular, determinando desta forma, que parte da sulfatação das moléculas de carragenanas deva ser citoplasmática.

Durante a tetrasporogênese, uma camada de mucilagem é depositada em torno dos tetrásporos, a qual vai auxiliar na fixação dos tetrásporos ao substrato após serem liberados da planta.

Os tetrásporos liberados não apresentam parede celular inicialmente, porém esta se forma imediatamente após a fixação do tetrásporo ao substrato.

Finalmente, sugerimos que sejam feitos estudos sobre outros aspectos, tais como imunocitoquímica para a localização dos sítios de sulfatação das carragenanas e estudos ultra-estruturais das demais fases reprodutivas desta espécie, visando ampliar os conhecimentos acadêmicos, que possivelmente darão suporte para pesquisas aplicadas.

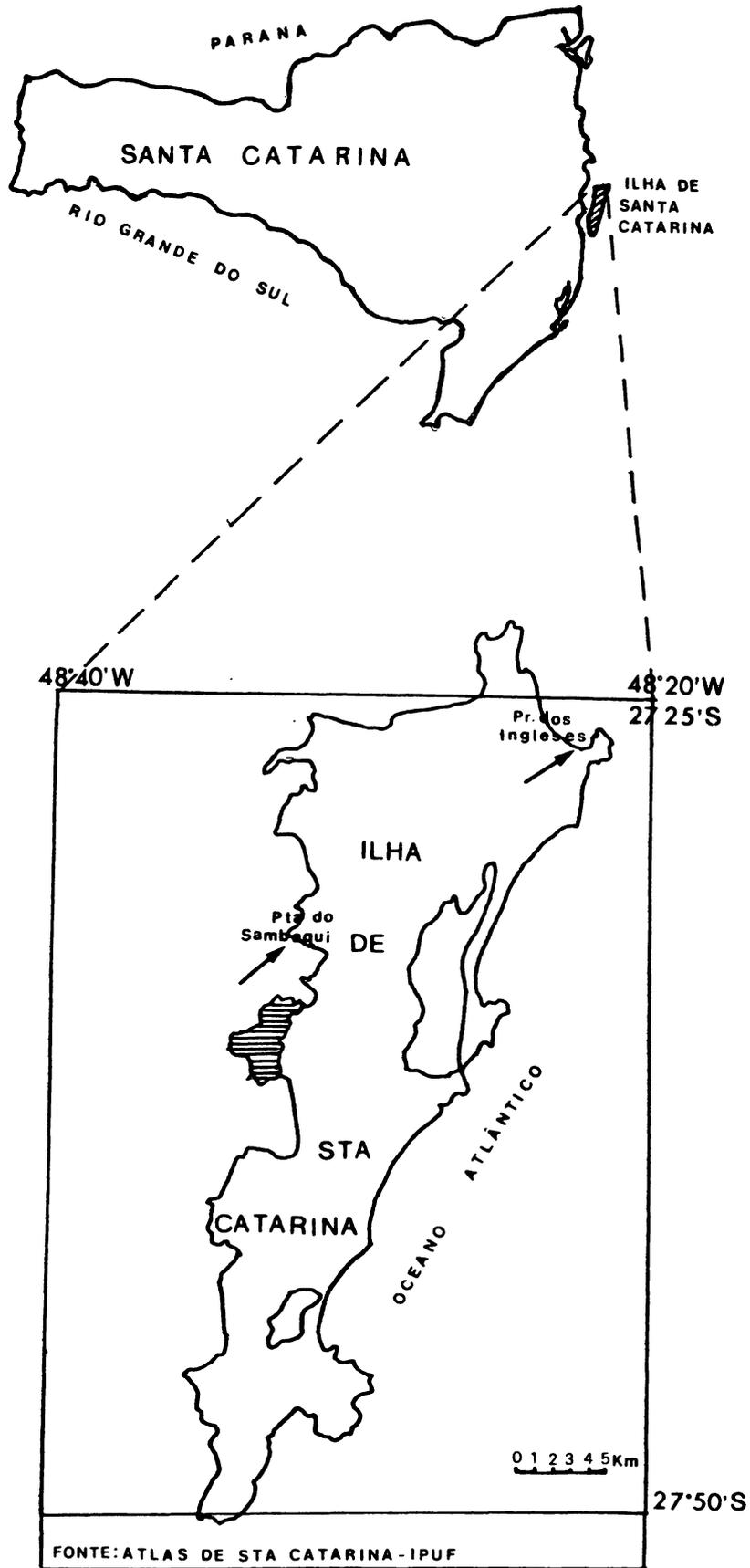
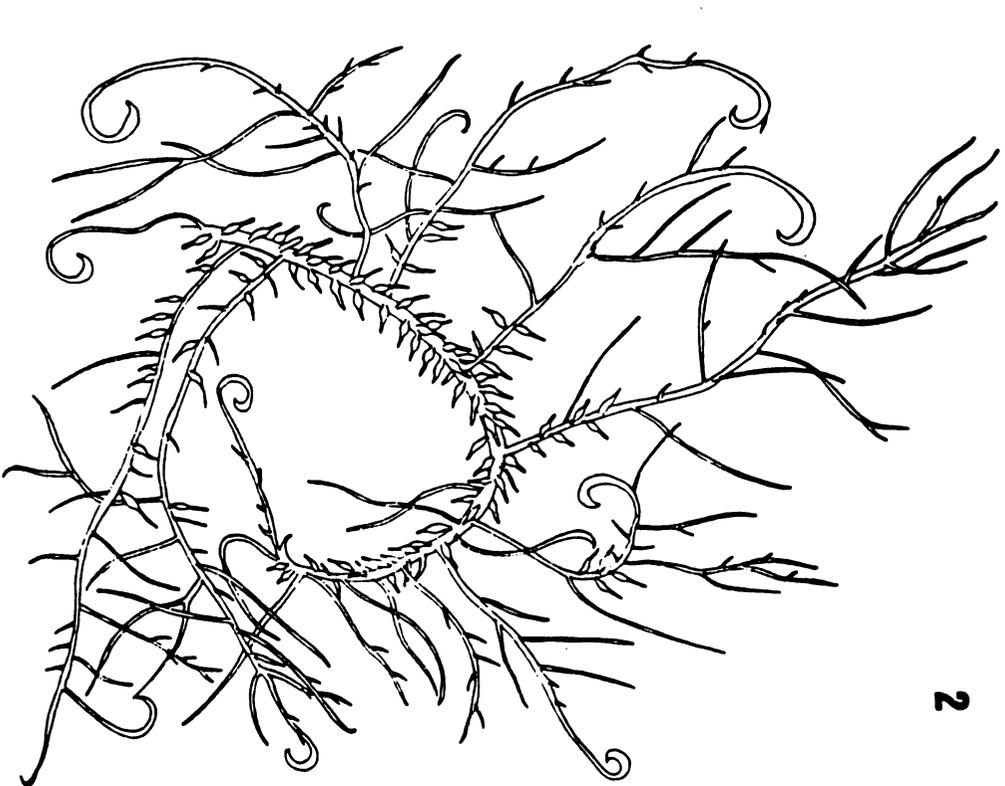


Fig.1 Loc. das estações de coleta

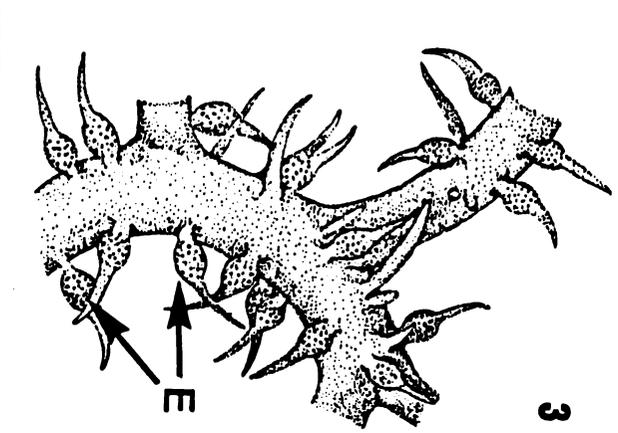
Fig. 2. Aspecto geral da planta tetraspórica de *H. musciformis*. Escala = 1 cm.

Fig. 3. Detalhe de um ramo com estiquídios (E). Escala = 5 mm.

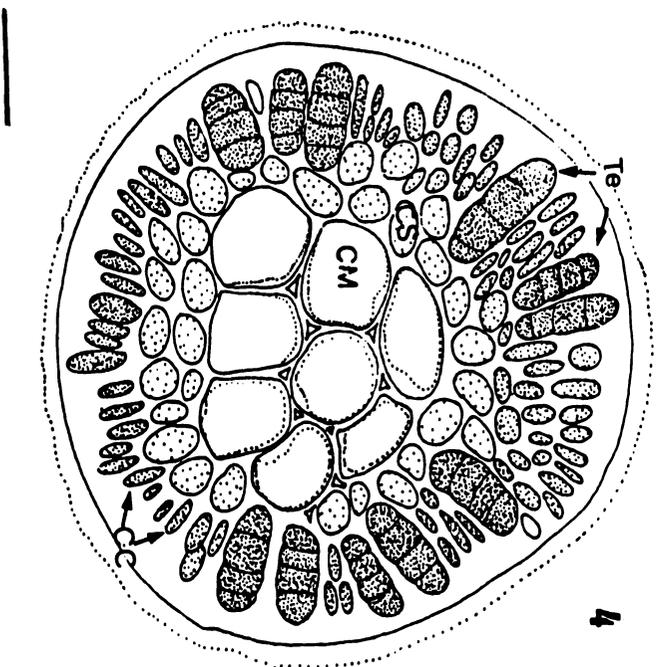
Fig. 4. Corte transversal do estiquídio com tetrasporângios (Te) distribuídos entre as células corticais (CC). Região central formada pelas células medulares (CM), envolvidas pelas células subcorticais (CS). Escala = 50 μ m.



2



3



4

Fig. 5. Detalhe de corte transversal do estiquídio, corado com azul de toluidina-O. Células medulares (CM) com *pit connections* (seta), citoplasma levemente metacromático e parede celular (PC) metacromática. Células subcorticais (CS) e células corticais (CC) com o mesmo padrão de coloração. Escala = 30 μm .

Fig. 6. Corte de estiquídio corado com alcian blue. Parede celular (PC) com coloração mais intensa próxima ao citoplasma. Parede das células medulares (CM) com espessamentos lenticulados (setas). Células subcorticais (CS), células corticais (CC) e vacúolo (V). Escala = 30 μm .

Fig. 7. Corte transversal de uma porção vegetativa do estiquídio corada com a reação de PAS. Grãos de amido PAS-positivos (setas) em todos os tipos celulares, distribuídos na periferia das células medulares (CM) e subcorticais (CS), e por todo o citoplasma das células corticais. Escala = 50 μm .

Fig. 8. Corte de estiquídio corado com ninhidrina-Schiff. Reação positiva para proteínas no citoplasma de todos os tipos celulares. *Pit connections* (setas) e *pit plug* (pp) com reação positiva. Células corticais (CC), células subcorticais (CS) e células medulares (CM). Escala = 30 μm .

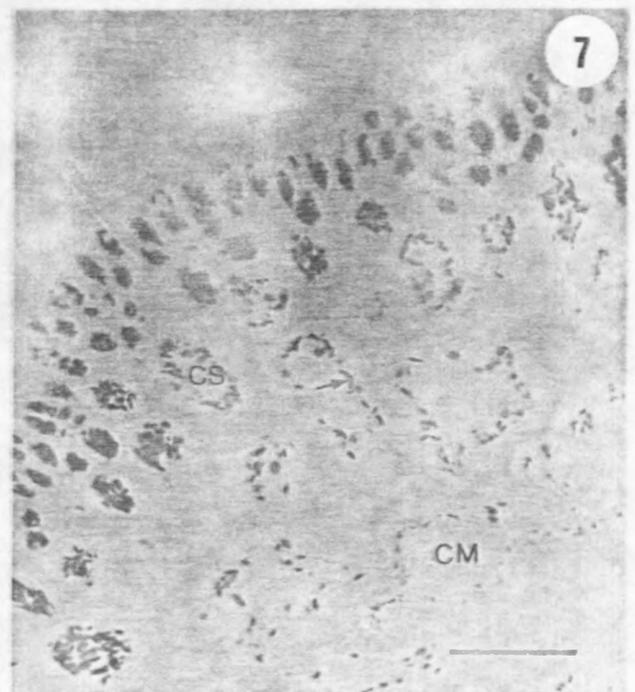
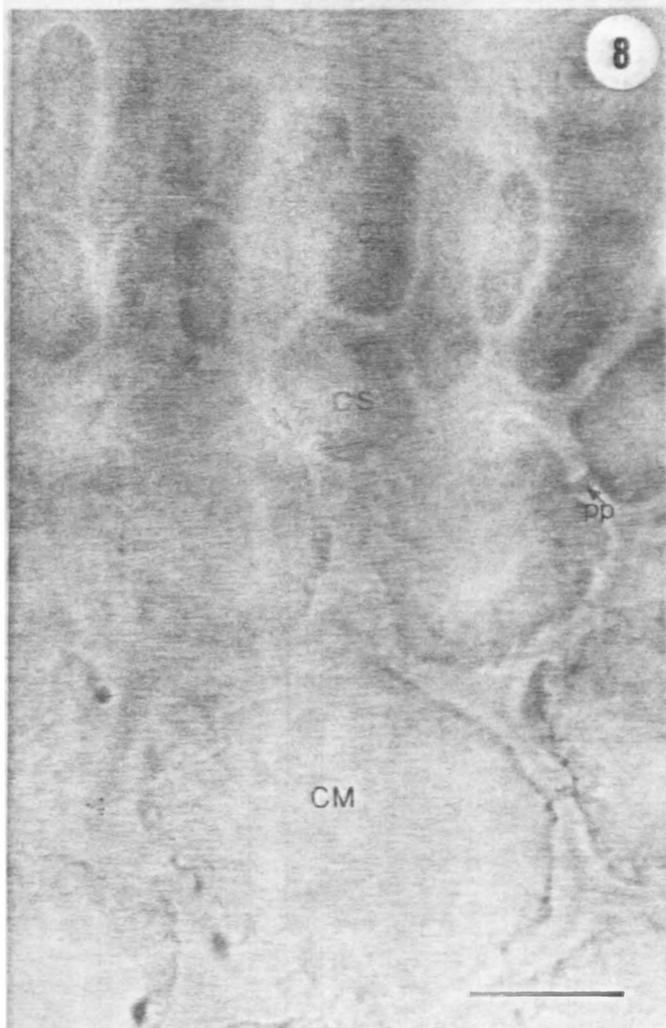
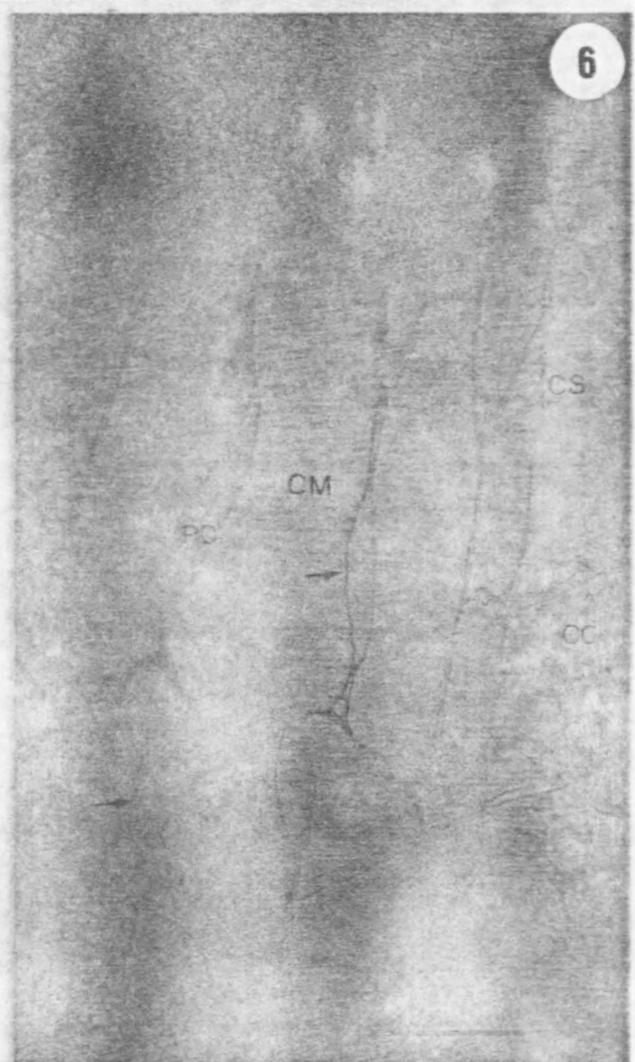
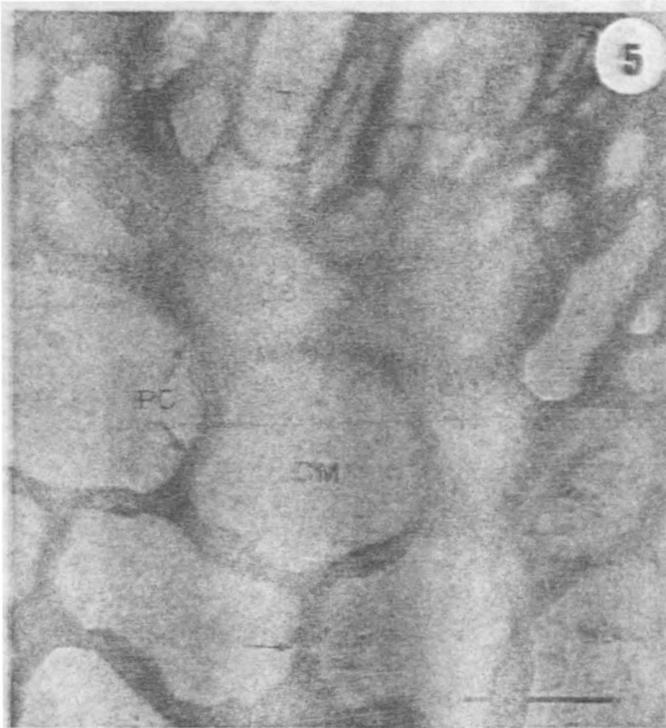


Fig. 9. Porção de uma célula medular mostrando parede celular (PC) espessa com microfibrilas onduladas (seta). Cloroplastos (C) pequenos próximos à mitocôndria (M).

Escala = 0,5 μm .

Fig. 10. Detalhe do cloroplasto (C) de célula medular. Observe a orientação dos tilacóides (seta) e a presença de grânulos osmiófilos. Mitocôndrias (M) próximas a uma extremidade do plastídeo. Membrana plasmática evidente (cabeça de seta). Escala = 1 μm

Fig. 11. Detalhe do grão de amido (A) próximo à mitocôndria (M) em célula medular. Escala = 0,5 μm .

Fig. 12. Núcleo (N) de célula medular com envelope nuclear evidente. Cloroplasto (C) com tilacóide circular periférico (seta). Membrana plasmática (MP). Escala = 0,5 μm .

Fig. 13. Parede celular (PC) de célula medular, espessa, com microfibrilas levemente onduladas (seta), concentradas próximas a membrana plasmática. Escala = 2 μm .

Fig. 14. Parede celular (PC) espessa com microfibrilas concentradas na região central da parede. Membrana plasmática (MP) convoluta. Vacúolo (V). Escala = 1 μm .

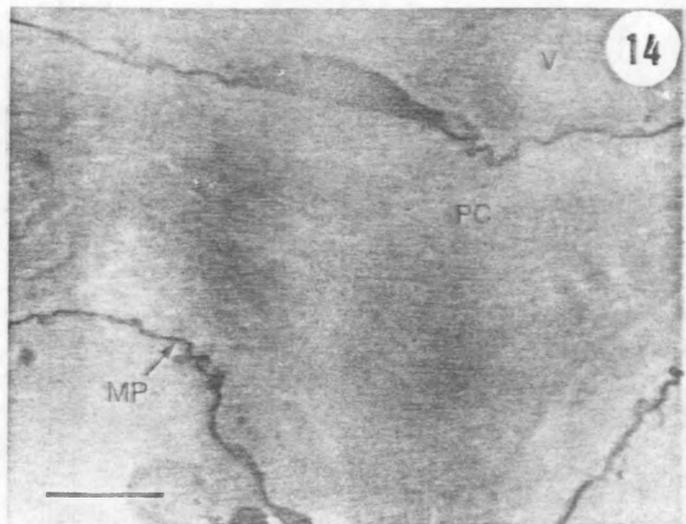
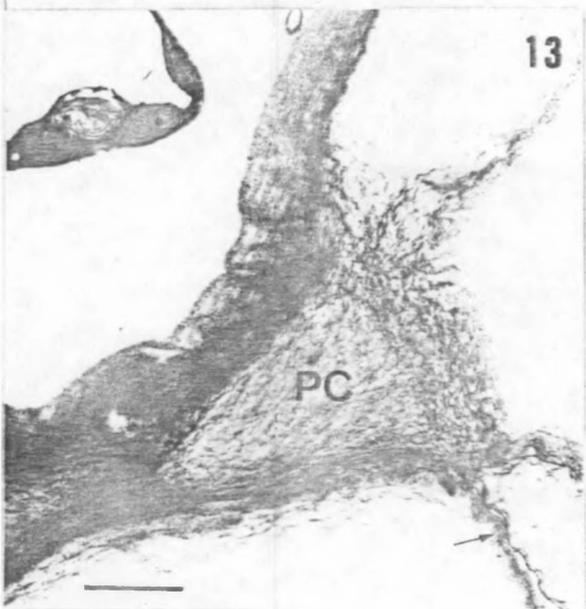
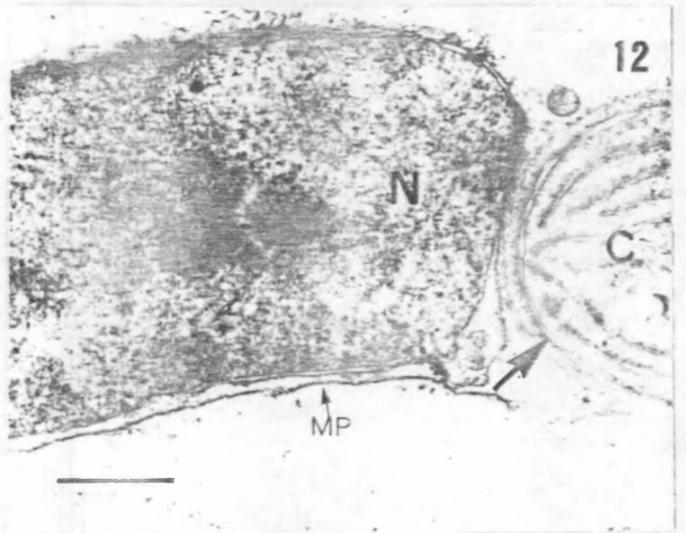
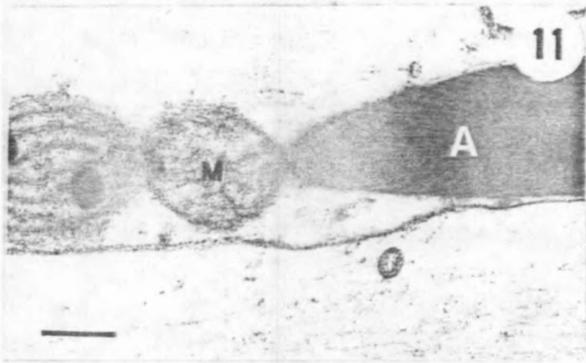
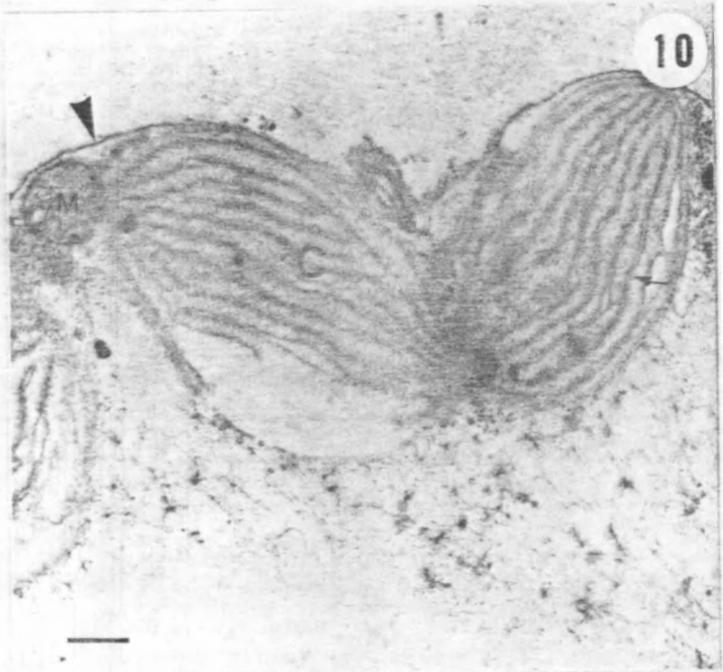
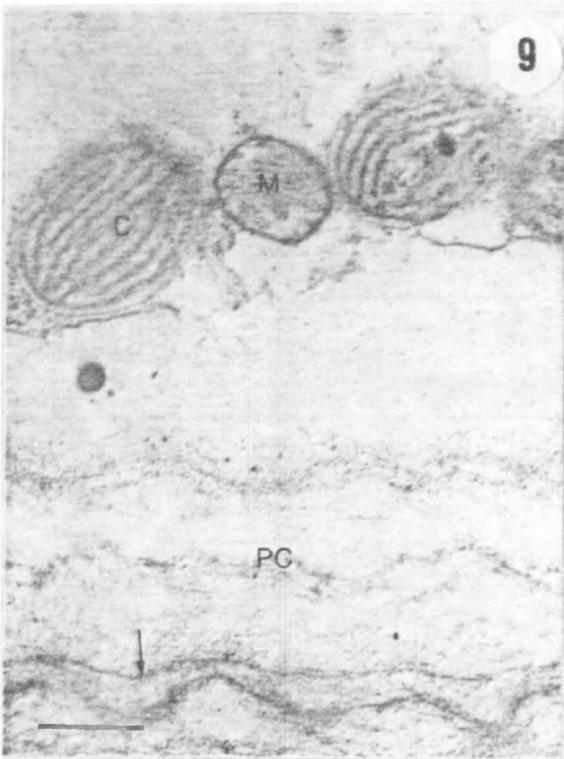


Fig. 15. Corte transversal de um estiquídio corado com PAS e contracorados com verde luz.. Observar os tetrasporângios (Te) distribuídos unilateralmente com reação PAS-positiva somente no citoplasma. Tetrasporângios jovens (Tj) levemente PAS-positivos. Cutícula (Cut). Escala = 50 μm .

Fig. 16. Células subcorticais (CS) e corticais (CC) com inúmeros grãos de amido (setas) PAS-positivos. Contracoloração com verde luz. Escala = 30 μm .

Fig. 17. Controle da reação de PAS bloqueado por acetilação. Observe que todos os tipos celulares do estiquídio são PAS-negativos. Escala = 50 μm

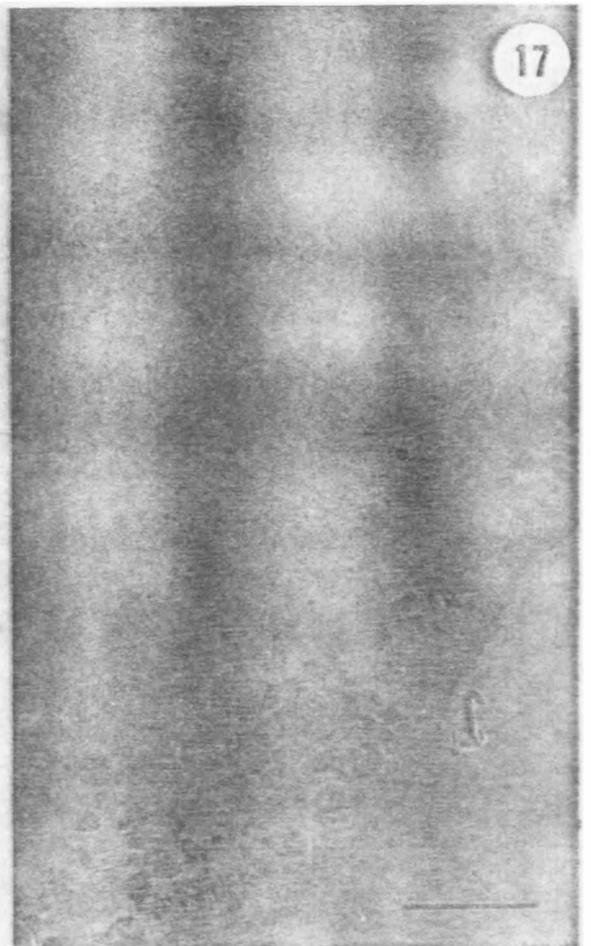
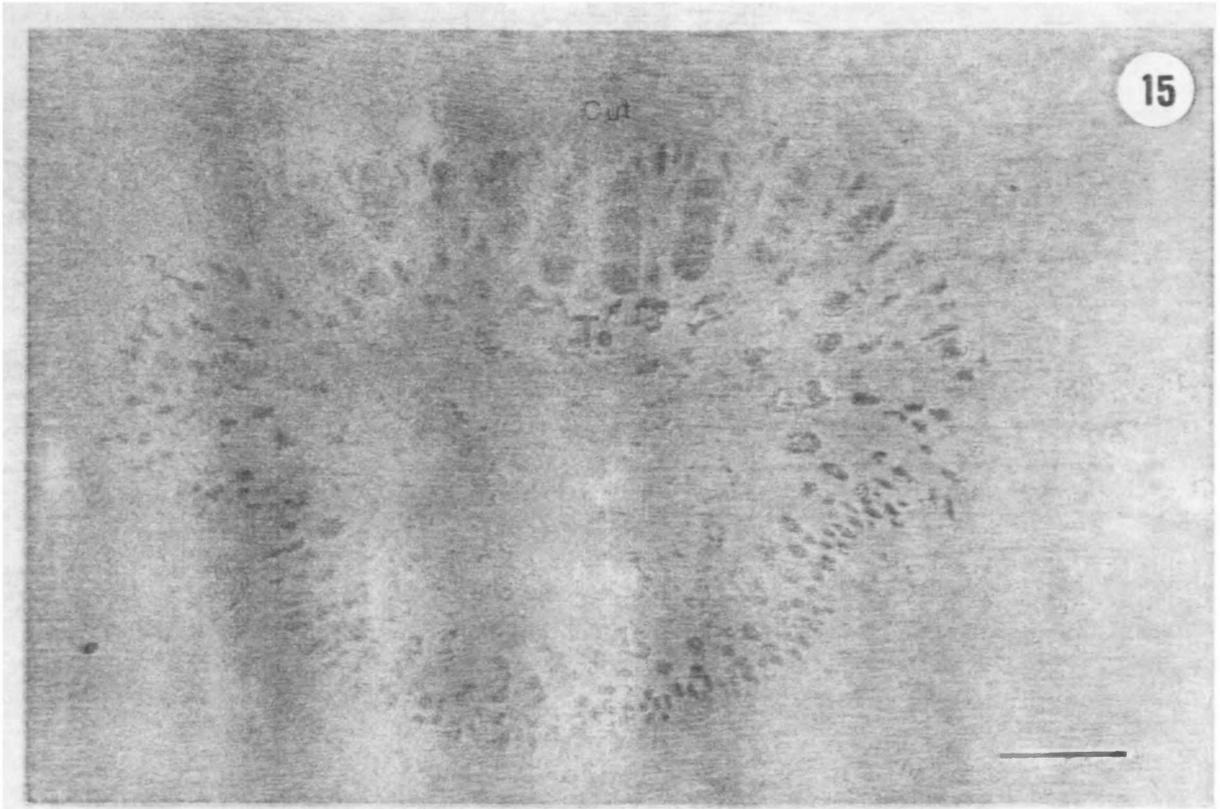


Fig. 18. Célula subcortical com grãos de amido (A) mergulhados em depressões do cloroplasto (C). Observe pequenas porções de vacúolo (V). Escala = 0,5 μm .

Fig. 19. Células subcorticals unidas por *pit connection* (pc). Cloroplastos (C) distribuídos na periferia citoplasmática. Gotas lipídicas (L) de tamanhos variados. Parede celular (PC) Escala = 1 μm .

Fig. 20. Detalhe do cloroplasto (C) de célula subcortical, com mitocôndrias (M) associadas às extremidades. Parede celular (PC) espessa com material microfibrilar evidente. Tonoplasto (t) limitando o vacúolo (V). Escala = 0,5 μm .

Fig. 21. Célula subcortical. Cloroplastos (C) alongados com gotas osmiófilas (cabeças de setas) em grupos entre os tilacóides. Parede celular pouco espessa com intervalos regulares semelhantes a plasmodesmos (setas). Vacúolo (V). Escala = 0,5 μm .

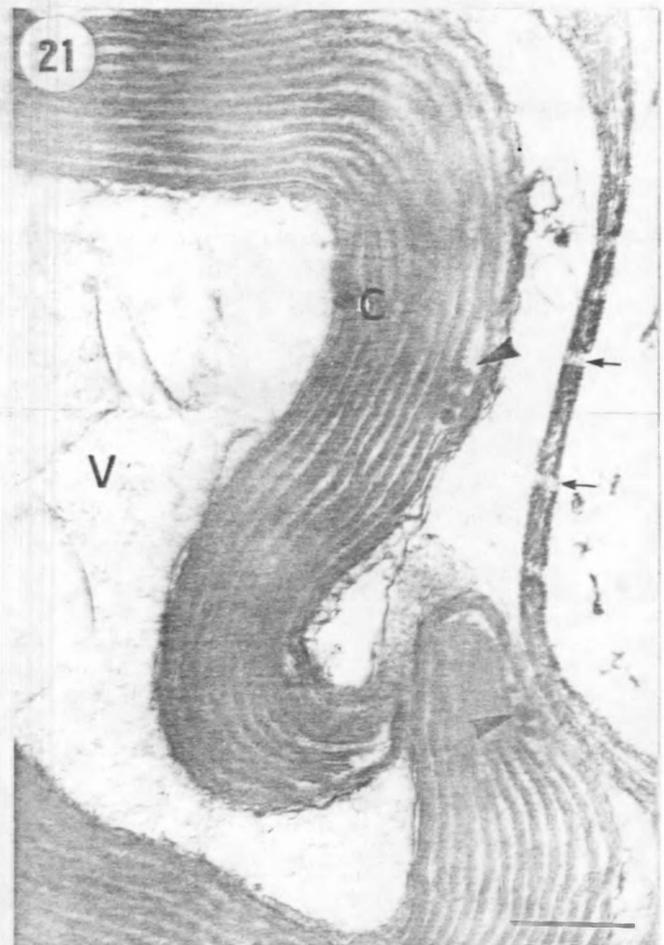
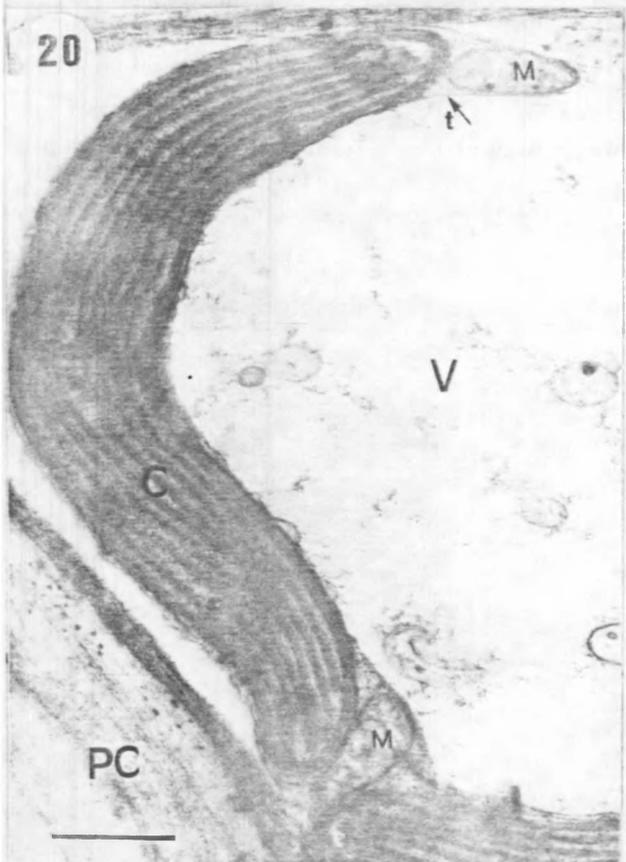
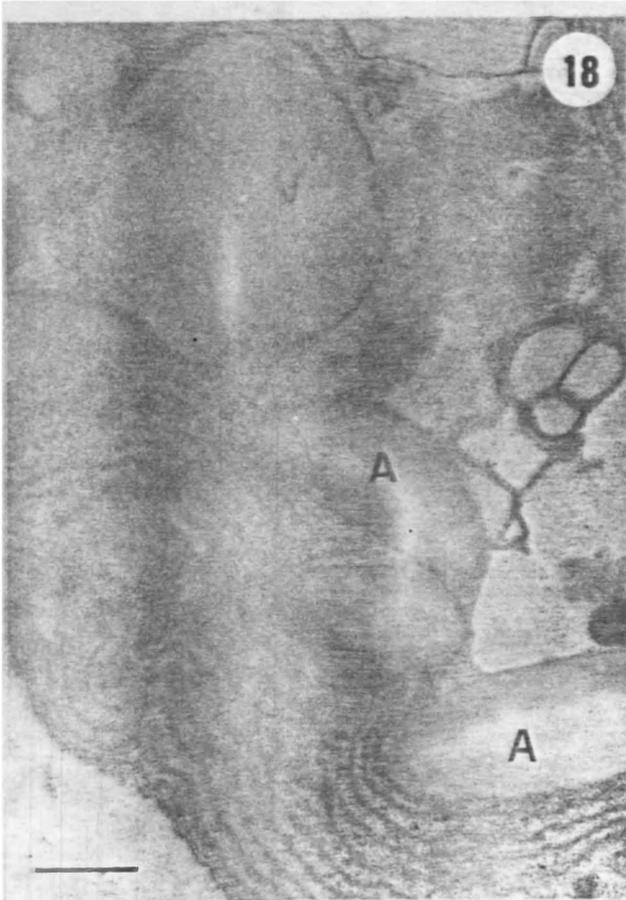


Fig. 22. Célula subcortical. Detalhe da parede celular (PC) constituída de camadas com microfibrilas (setas) organizadas de diferentes formas. Mitocôndria (M) e cloroplastos (C) parietais. Escala = 0,25 μm .

Fig. 23. Célula subcortical unida a uma cortical através de *pit connection* (pc). Parede celular (PC) espessa. Cloroplastos (C) de distribuição parietal. Grãos de amido (A) e vacúolo (V). Escala = 0,5 μm .

Fig. 24. Células subcorticais unidas por *pit connection* (pc). Vacúolo rico em substâncias elétrondensas com aspecto lipídico. Cloroplasto (C) e mitocôndria (M). Escala = 1 μm .

Fig. 25. Porção de uma célula cortical mostrando núcleo (N) excêntrico, grãos de amido (A) espalhados por todo o citoplasma, mitocôndria (M) e cloroplasto no região periférica. Parede celular (PC) microfibrilar. Escala = 0,5 μm .

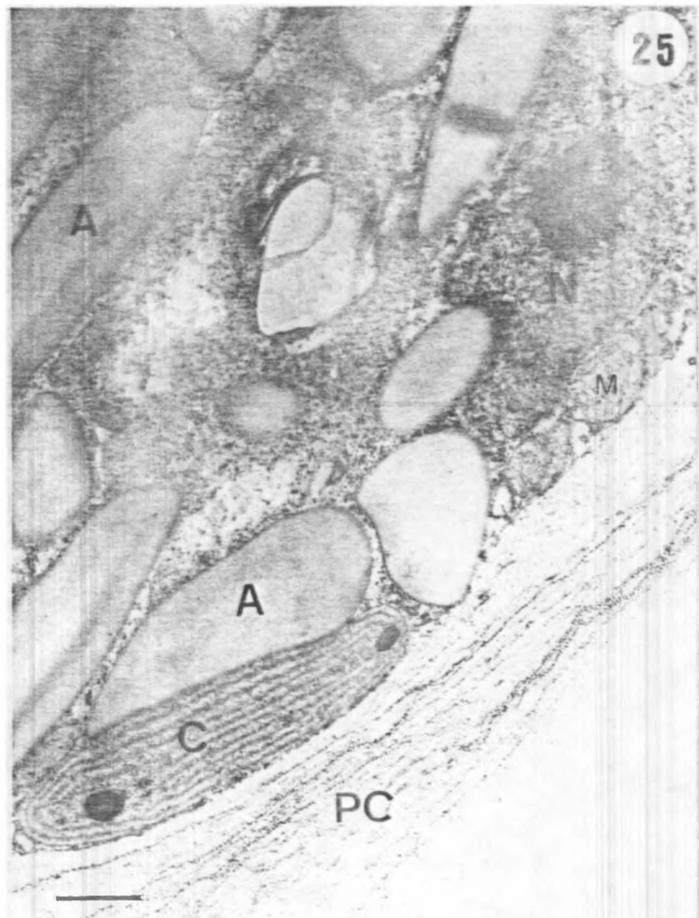
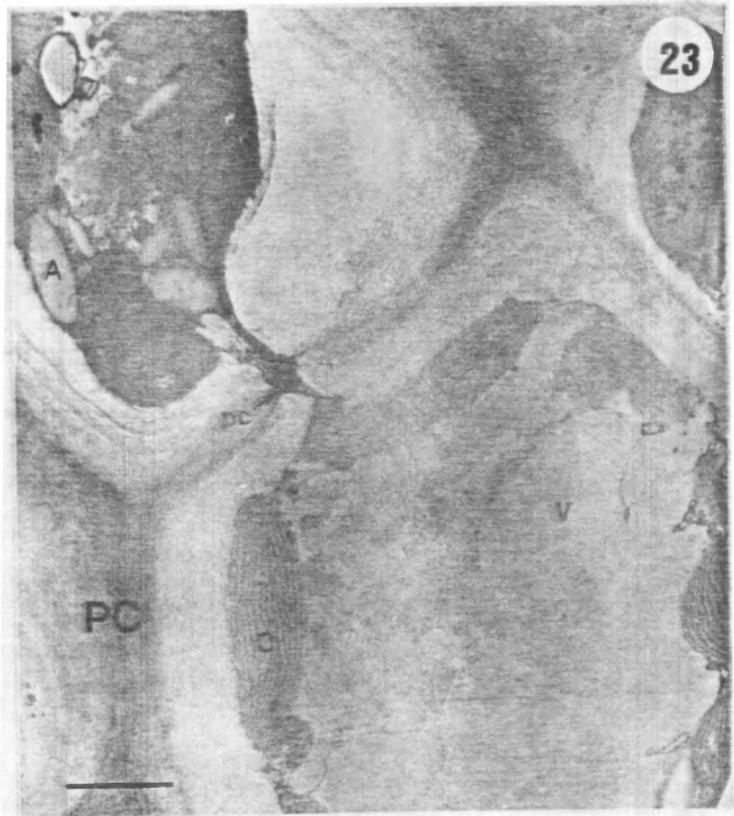
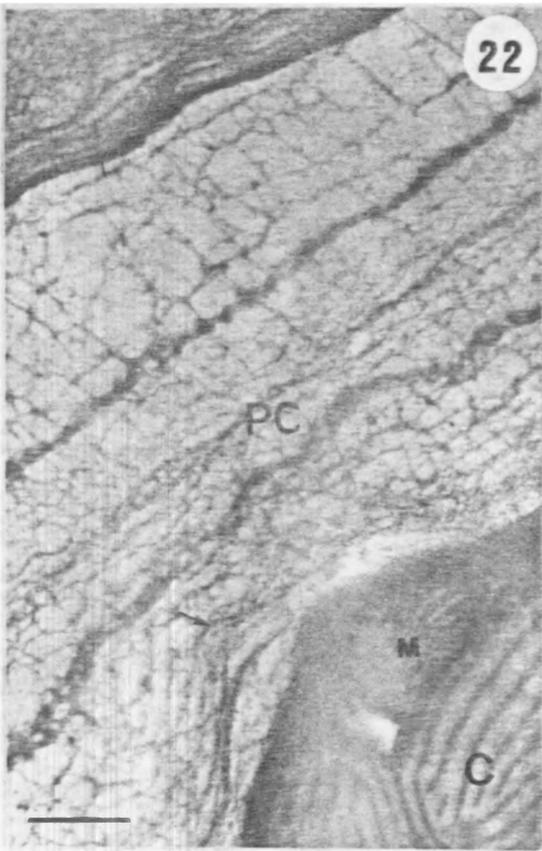


Fig. 26. Célula cortical alongada mostrando grande núcleo (N) envolvido por retículo endoplasmático, gotas lipídicas (L) espalhadas no vacúolo. Parede celular (PC) espessa com microfibrilas em camadas (cabeças de setas). Cloroplasto (C). Escala = 1 μm .

Fig. 27. Detalhe do núcleo (N) da célula cortical, envolvido por retículo endoplasmático (cabeça de setas). Nucléolo (Nu) grande, elétron-denso. Gotas lipídicas (L), cloroplasto (C) e amido (A). Escala = 1 μm .

Fig. 28. Corte transversal de célula cortical com núcleo (N) grande, nucléolo (Nu) central e envelope nuclear evidente (seta), associado ao retículo endoplasmático (RE). Mitocôndria (M) alongada. Parede celular (cabeças de seta). Escala = 0,5 μm .

Fig. 29. Detalhe em corte transversal de *pit connections* entre uma célula subcortical (CS) e duas corticais (CC). Observe o material elétron-denso que obstrui os *pit connections*, os *pit plug* (pp). Grãos de amido (A) lenticulados próximos a cloroplastos (C), parede celular espessa (PC). Escala = 0,5 μm .

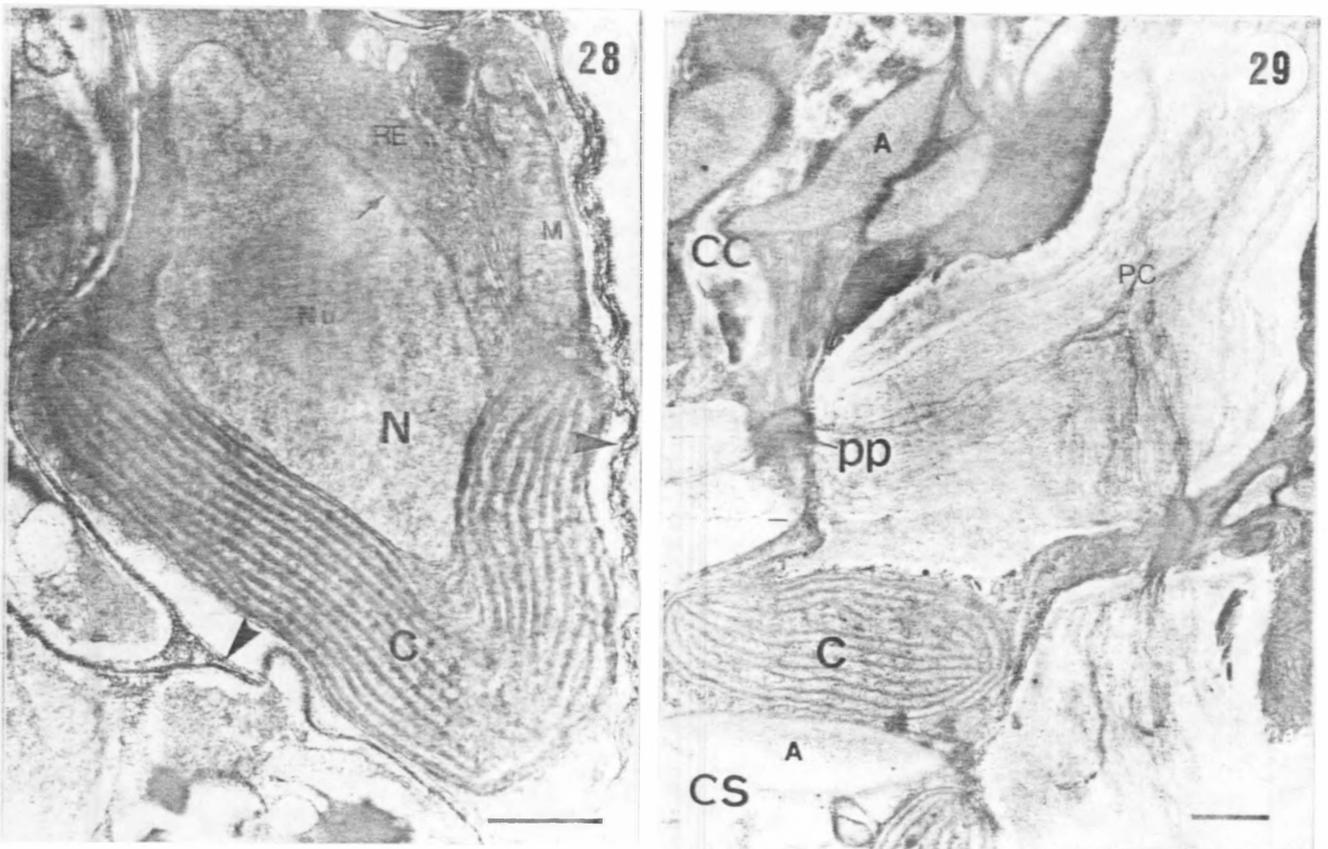
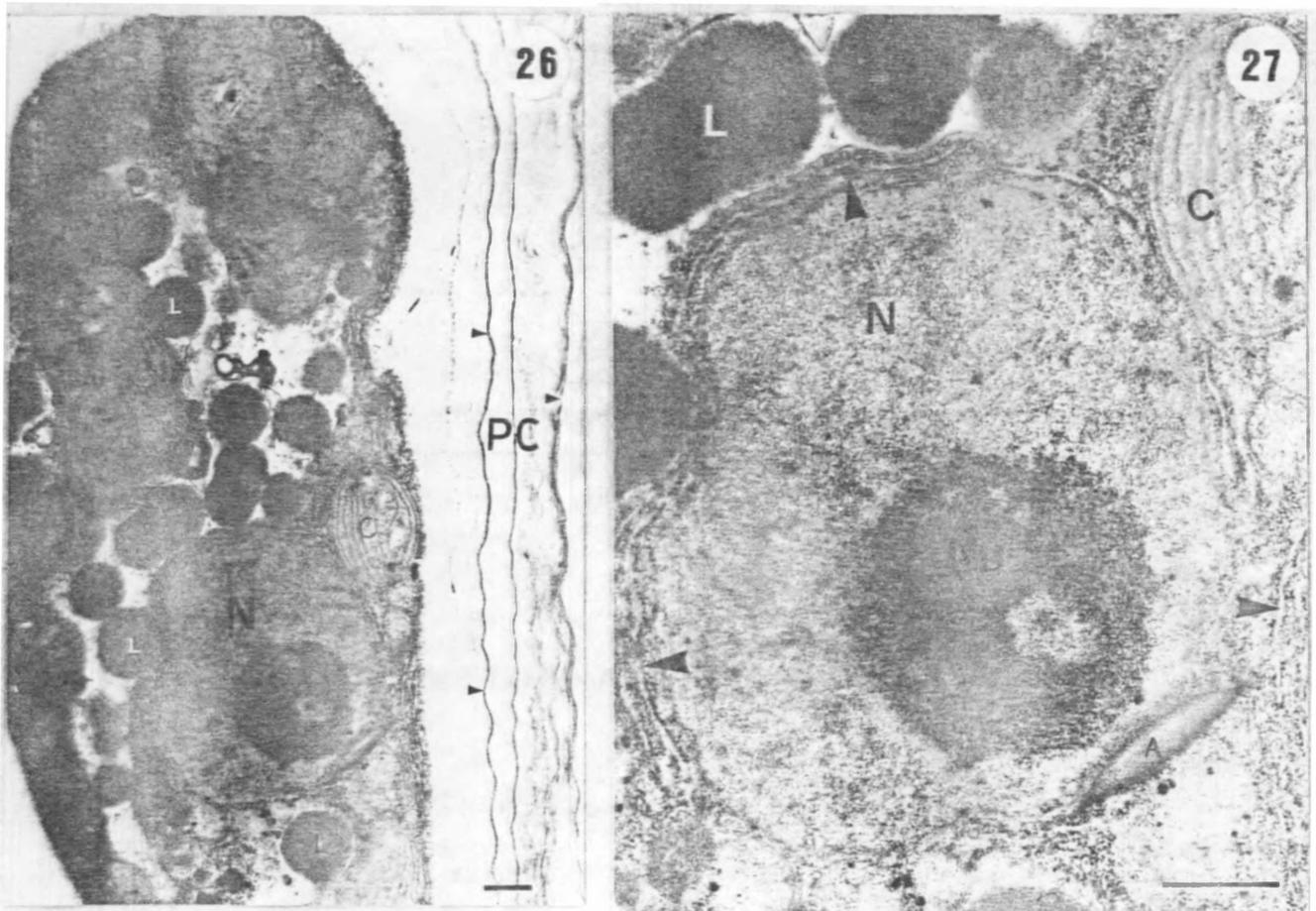


Fig. 30. Tetrasporócito jovem com poucas granulações PAS-positivas, unido à célula basal (cb) por *pit connection* (pc). Tetrásporo (T) com citoplasma rico em grânulos PAS-positivos. Contracorado com verde luz. Escala = 10 μ m.

Fig. 31. Tetrasporângios maduros corados com a reação de PAS e contracoradas com verde luz. Reação positiva restrita ao citoplasma dos tetrásporos (T). Escala = 10 μ m

Fig. 32. Tetrasporângio corado com alcian blue e alcian yellow. Parede celular positiva ao AB e citoplasma dos tetrásporos (T) positiva para AY. Observe as células corticais (CC) levemente positivas à reação com AY. Escala = 10 μ m.

Fig. 33. Porção do estiquídio corado com AB e AY . A parede celular de todos os tipos de células é levemente positiva ao AB. Escala = 50 μ m.

Fig. 34. Tetrasporângio corado com AB, parede celular com reação (PC) positiva. Tetrásporos (T) com granulações citoplasmáticas positivas. Escala = 10 μ m.

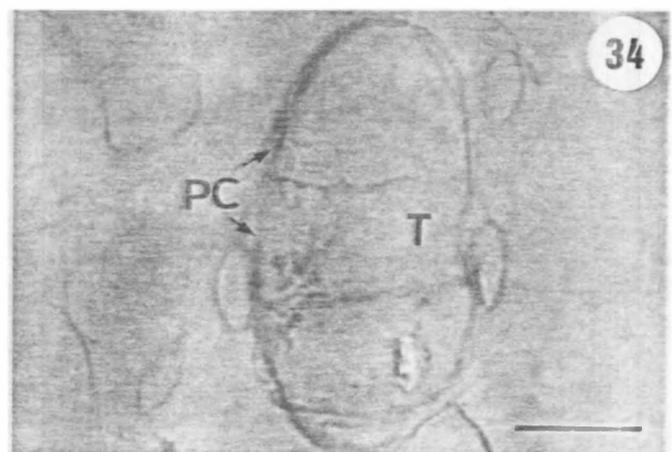
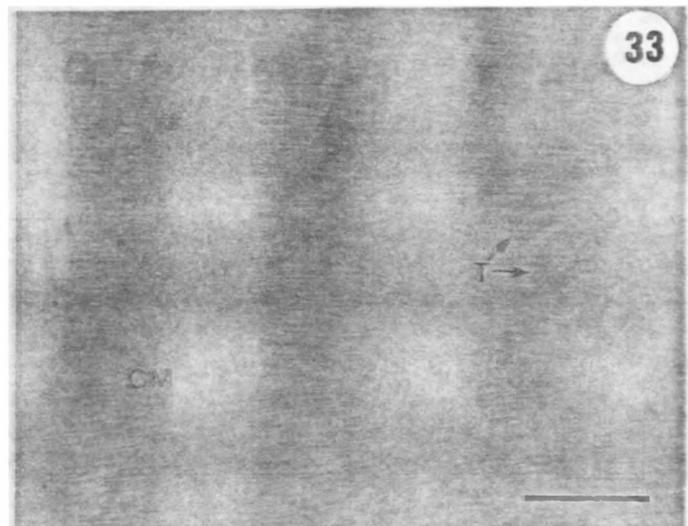
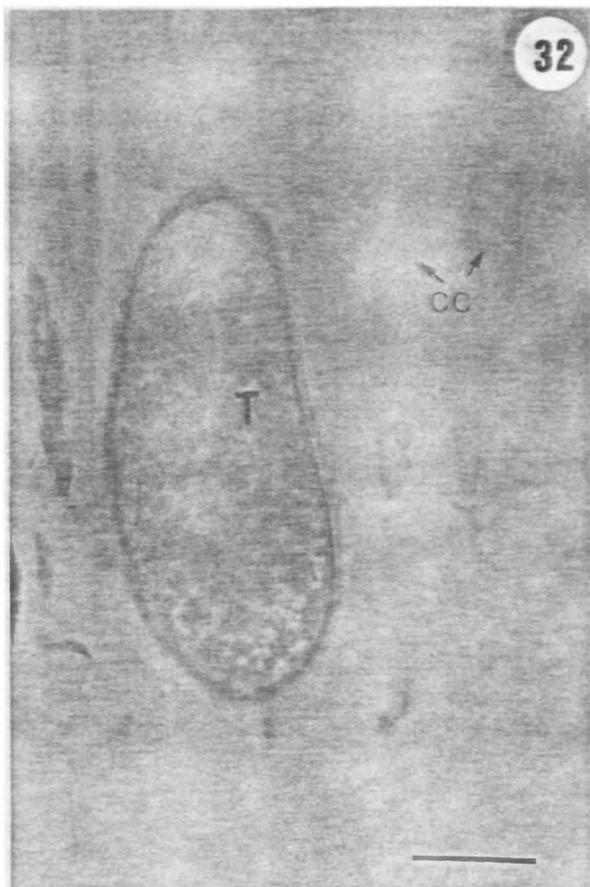
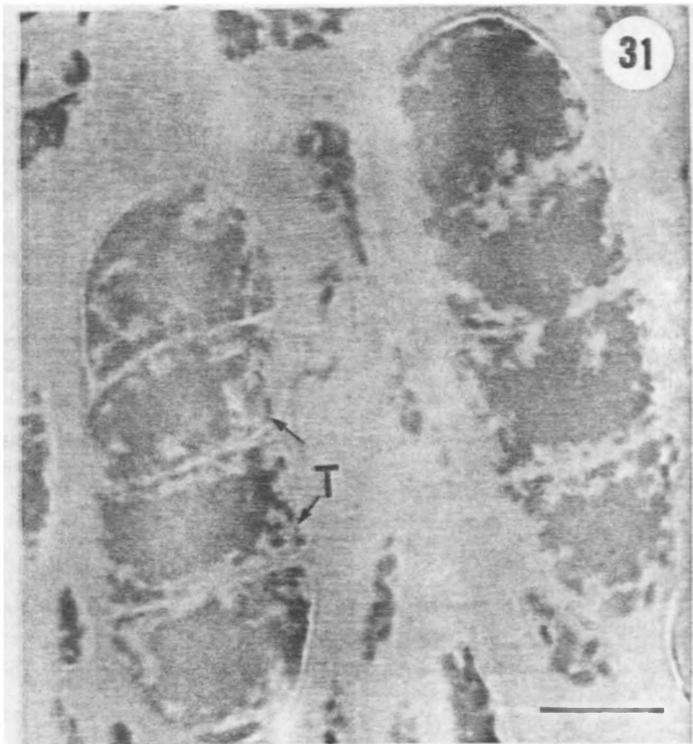
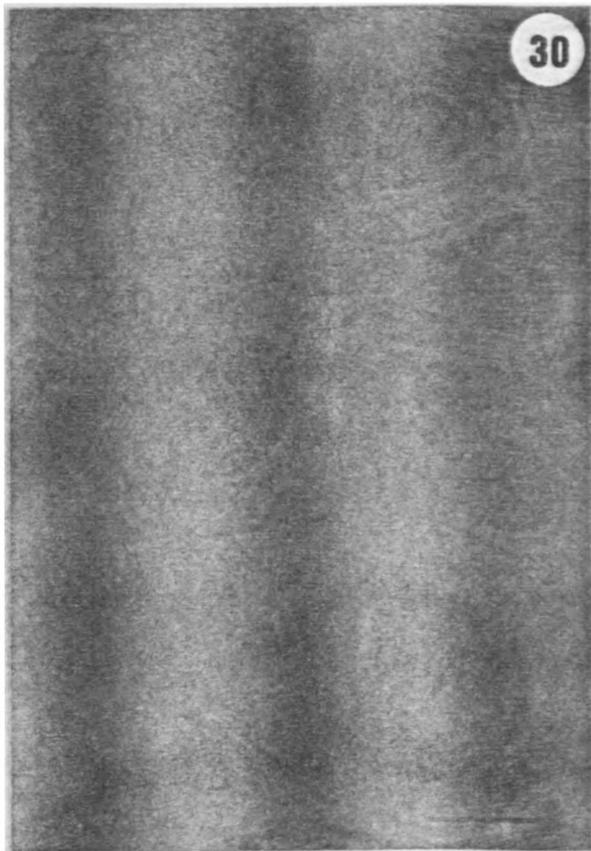


Fig. 35. Tetrasporócito jovem (Tj) com citoplasma ortocromático e parede celular (PC) metacromática. Colorado com azul de toluidina (AT-O). Escala = 10 μ m.

Fig. 36. Tetrasporócito em divisão com septação incompleta (seta). Parede celular das células corticais organizadas em camadas (cabeça de seta). Cutícula (Cut) e componentes da parede celular (PC) metacromáticos. Coloração AT-O. Escala = 10 μ m.

Fig. 37. Tetrasporângio corado com AT-O pH 3.0 . Parede celular (PC) metacromática. Citoplasma dos tetrásporos (T) com finas granulações metacromáticas (cabeça de seta). Escala = 10 μ m.

Fig. 38. Tetrasporângio corado com AT-O pH 4,0. Parede celular (PC) metacromática e citoplasma dos tetrásporos (T) ortocromático. Escala = 10 μ m.

Fig. 39. Tetrasporângio corado com ninhidrina-Schiff. Citoplasma dos tetrásporos (T) rico em proteínas, núcleo (N) evidente. Escala = 10 μ m.

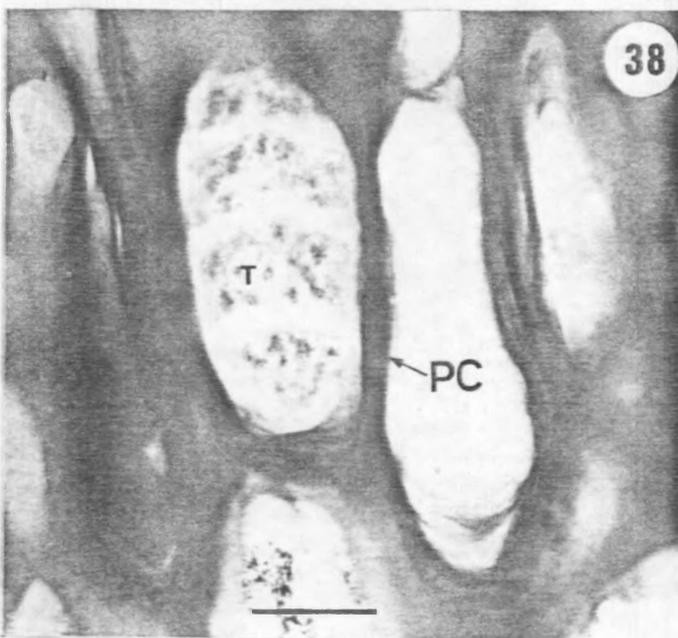
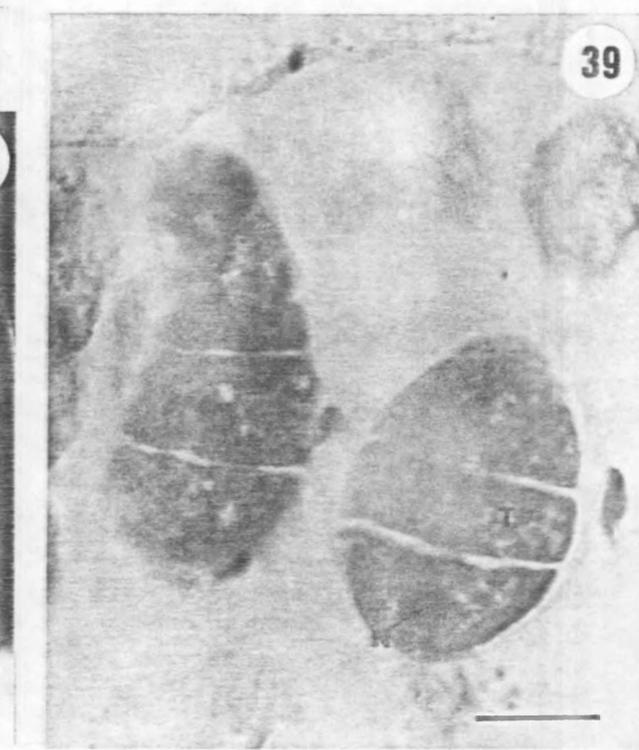
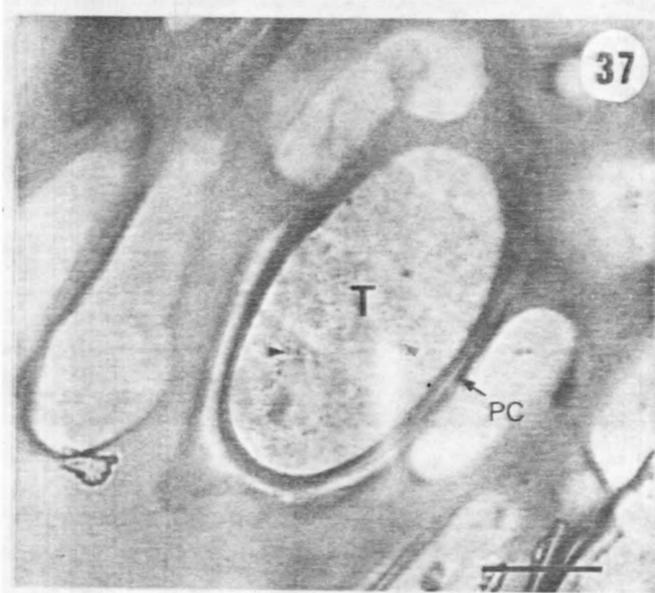
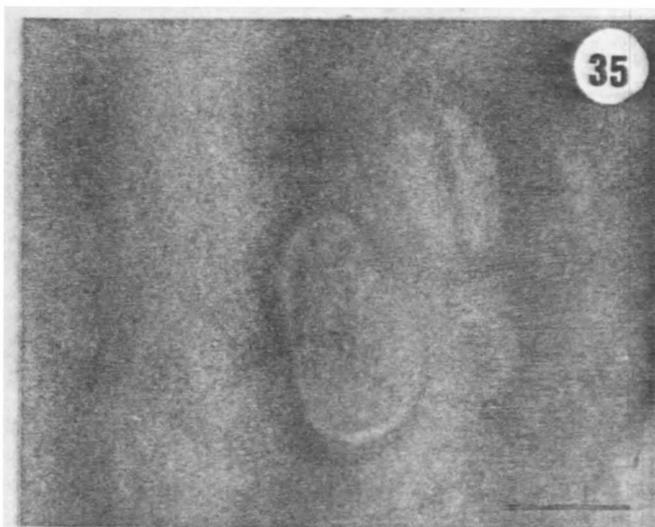


Fig. 40. Porção do tetrásporângio com parede celular (PC) constituída por microfibrilas compactas. Tetrásporos com citoplasma denso, muitos grãos de amido (A) e cloroplastos (C). *Cored vesicles* (cv) predominantemente periféricas. Escala = 1 μm .

Fig. 41. Detalhe da clivagem de um tetrásporócito (setas). Citoplasma rico em organelas, contendo principalmente cloroplastos (C), e grãos de amido (A). Dictiossomos (G) próximos aos grãos de amido. Escala = 1 μm .

Fig. 42. Núcleo de um tetrásporo com nucléolo (Nu) periférico, nítido envelope nuclear (seta) cloroplastos (C) e grãos de amido (A) evidentes. Escala = 0,25 μm .

Fig. 43. Tetrásporo. Detalhe de dictiossomos (G) com cisternas da face trans próximas aos grãos de amido (A), sugerindo interação metabólica. Escala = 0,25 μm .

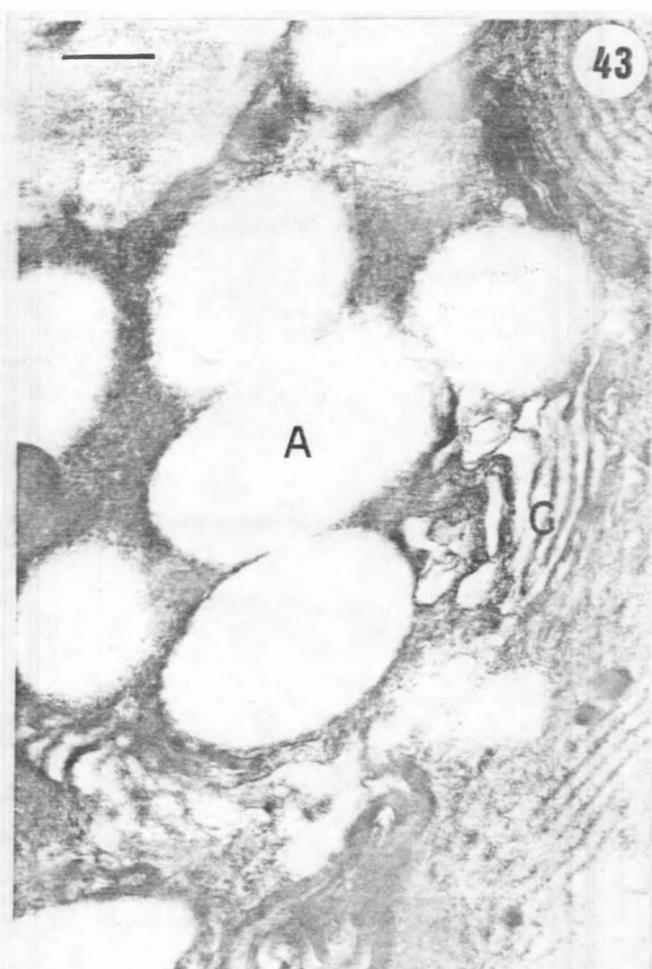
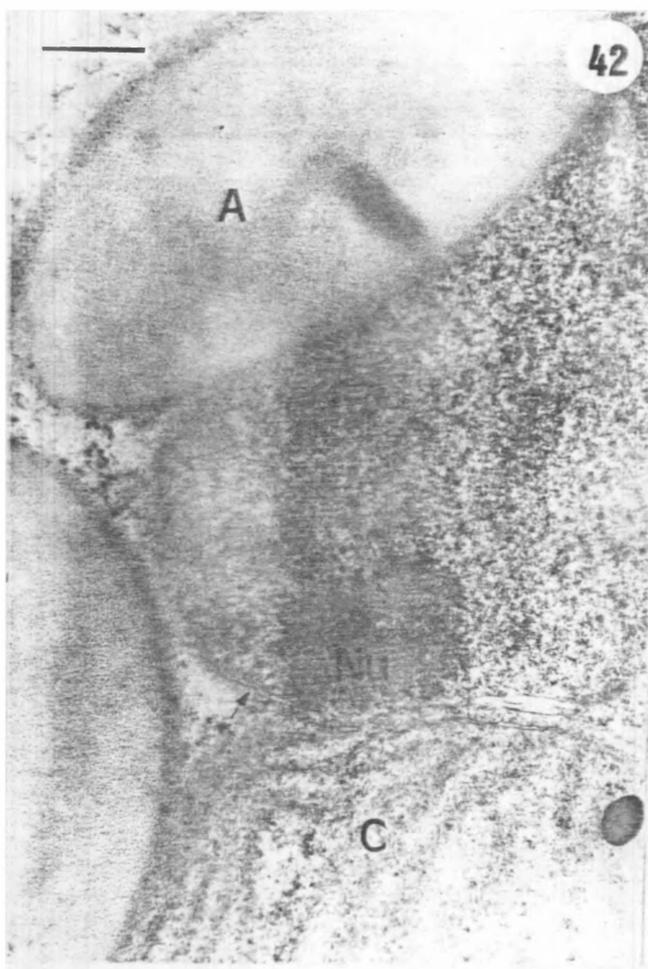
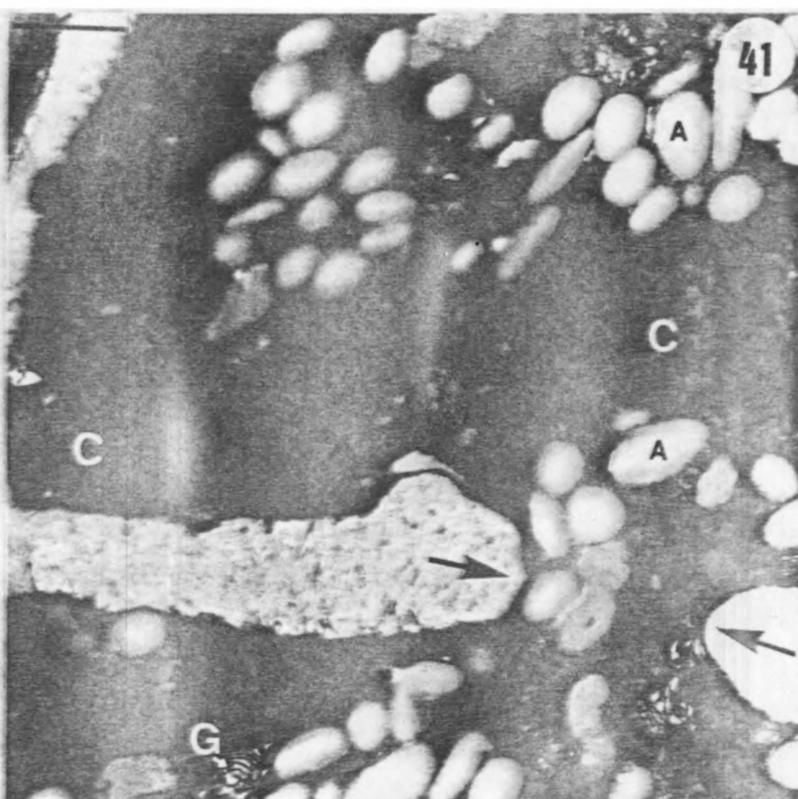
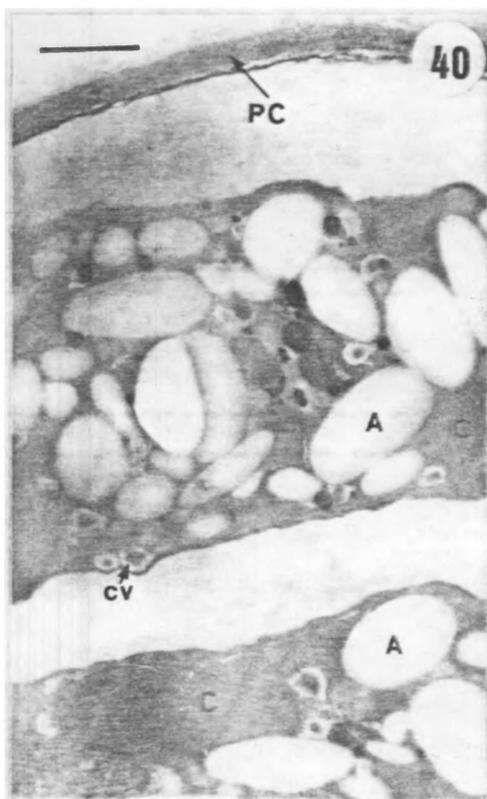


Fig. 48. Tetrásporo livre com granulações PAS- positivas (seta). Coloração restrita ao citoplasma. Escala = 10 μm .

Fig. 49. Tetrásporo livre corado com AT-O. Citoplasma com grânulos ortocromáticos (seta). Escala = 10 μm .

Fig. 50. Tetrásporo observado vinte horas após a liberação, corado com AT-O, mostrando a parede celular metacromática (seta). Escala = 10 μm .

Fig. 51. Tetrásporo após a liberação . Citoplasma rico em grãos de amido (A) e cloroplastos (C) concentrados na região central da célula, neste ângulo de corte. Observe as regiões fibrilares entre os tilacóides (setas). Mucilagem espessa (Mu). Escala = 1 μm .

Fig. 52. Detalhe de um tetrásporo livre. Observe um cloroplasto (C) com constricção, sugerindo divisão por fissão binária (seta). Nota-se a presença de mitocôndria (M) e grãos de amido. Escala = 1 μm .

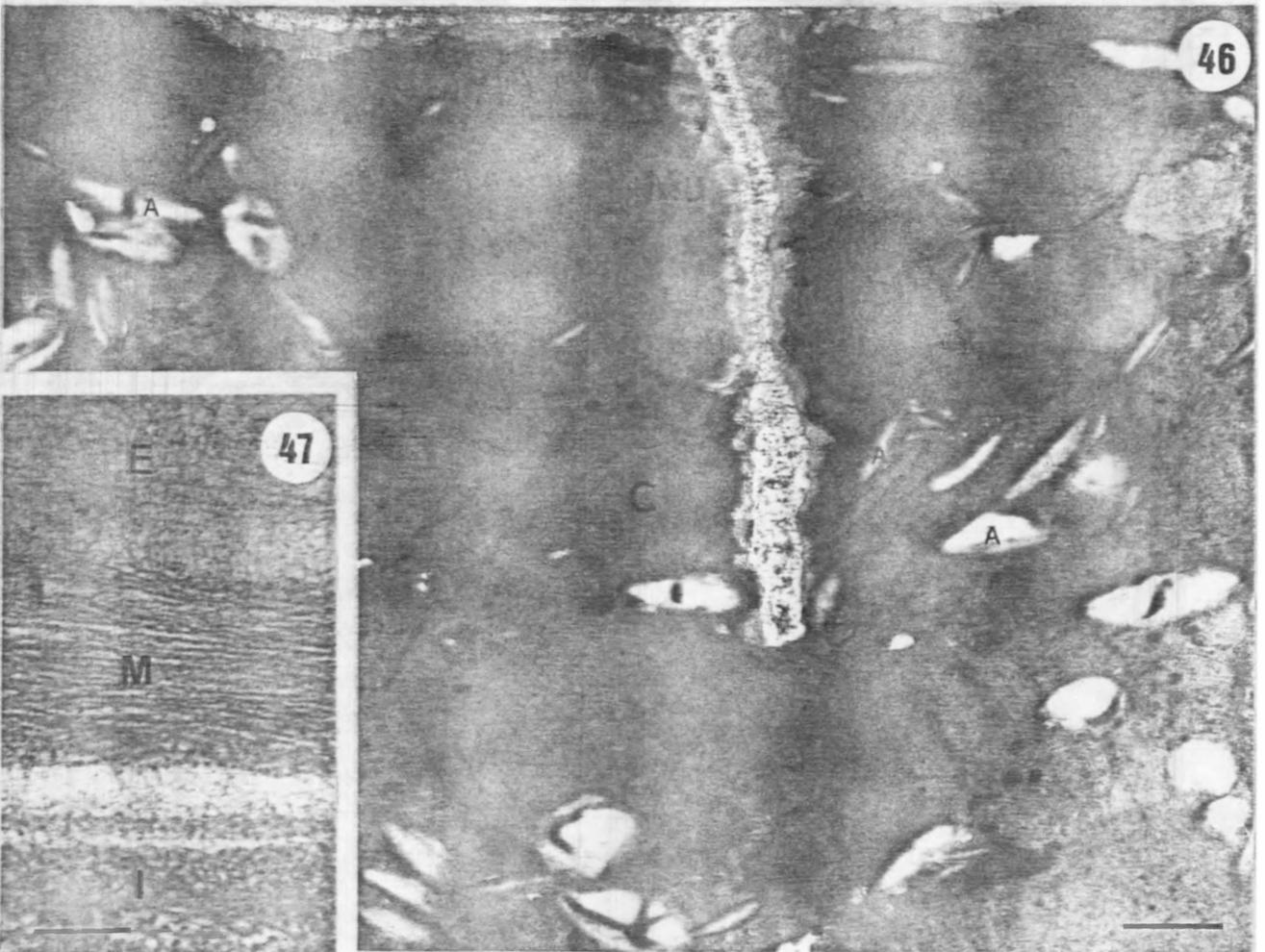
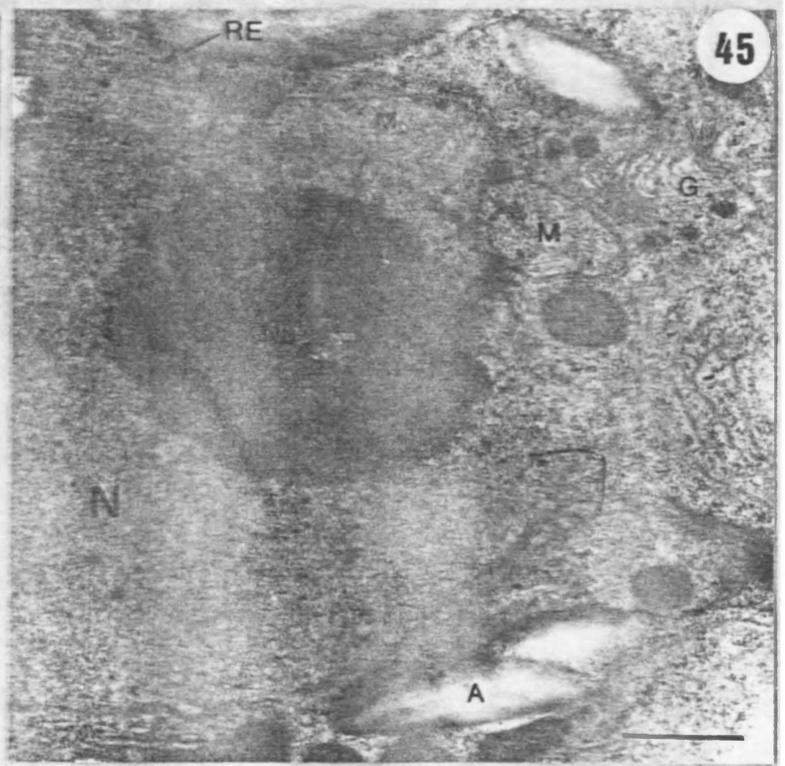


Fig. 44. Tetrasporângio dividido parcialmente em tetrásporos (T). Observe a clivagem incompleta (setas) e completa com parede celular (PC) entre dois tetrásporos. Núcleo (N) excêntrico. Escala = 2 μm .

Fig. 45. Tetrásporo. Detalhe do núcleo (N) com nucléolo (Nu) grande. Observe mitocôndria (M) nas proximidades do dictiossomo (G). Reticulo endoplasmático (RE), e grãos de amido (A). Escala = 0,5 μm .

Fig. 46. Detalhe do sulco de clivagem de um tetrasporócito mostrando deposição de mucilagem (Mu) adjacente à membrana plasmática. *Cored vesicles* (cv) próximas a periferia celular. Cloroplastos (C) e grãos de amido (A) Escala = 1 μm .

Fig. 47. Parede celular do tetrasporângio organizada em três camadas microfibrilares distintas. Regiões externa (E), média (M) e interna (I). Escala = 0,25 μm .

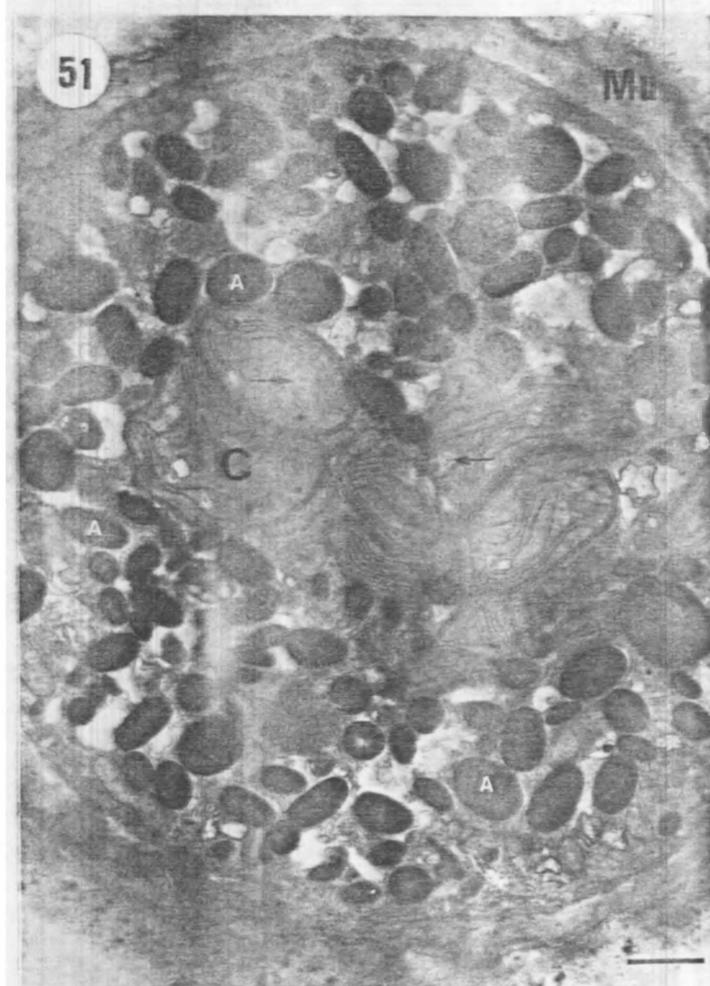
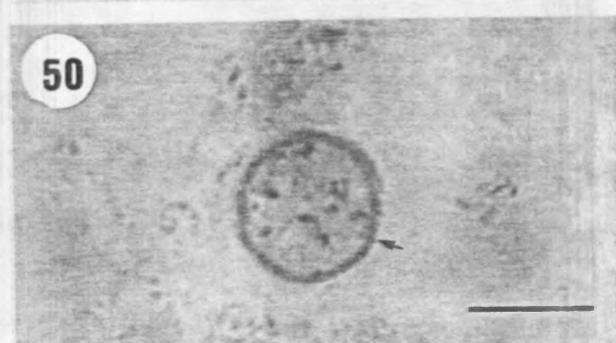
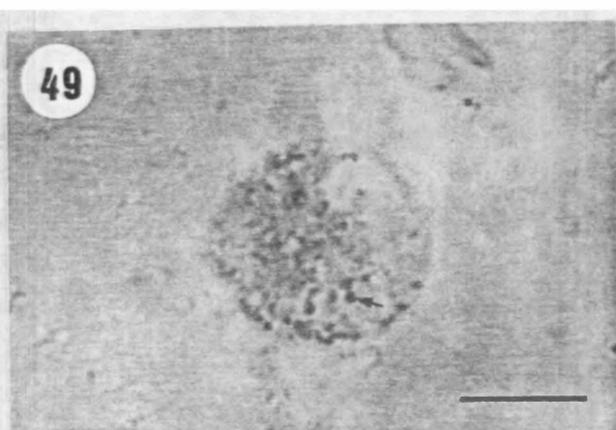
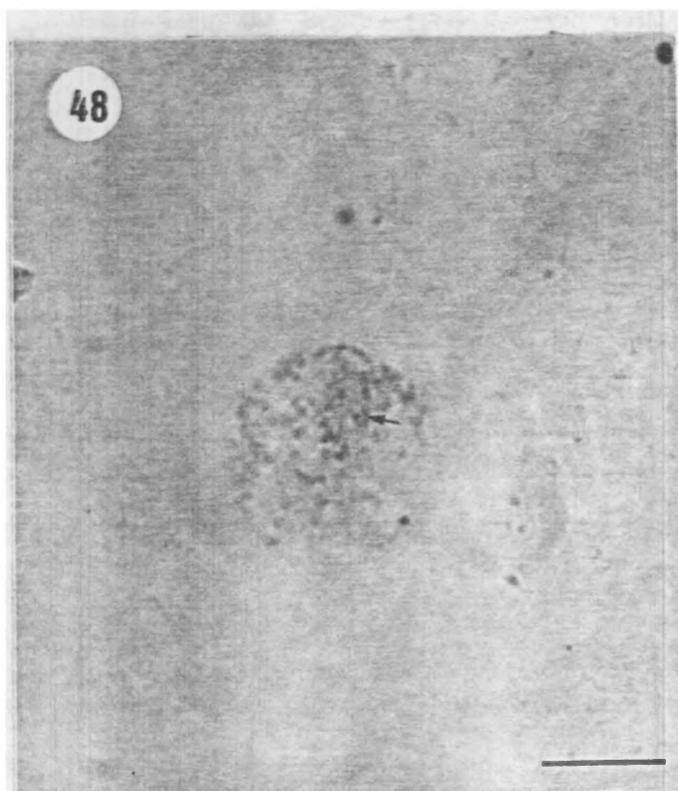
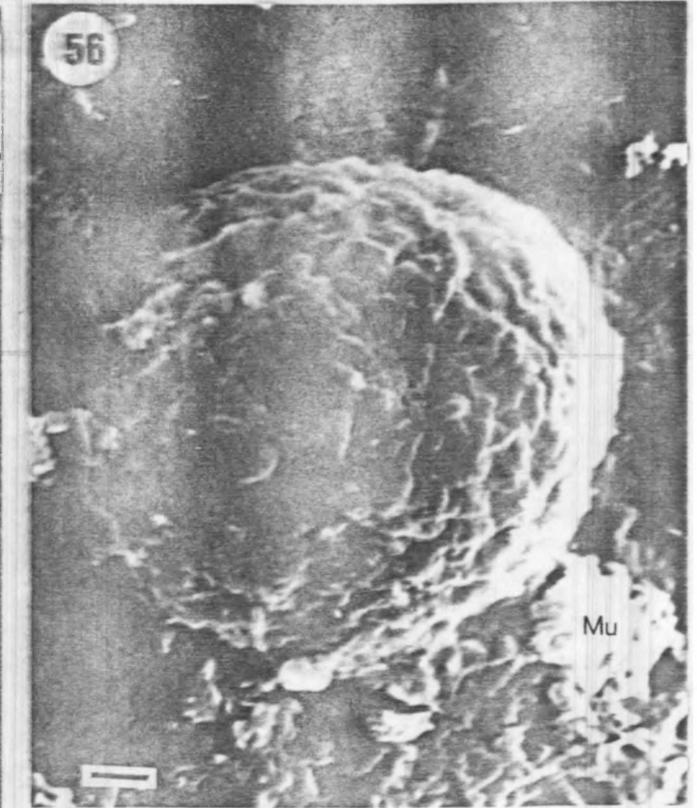
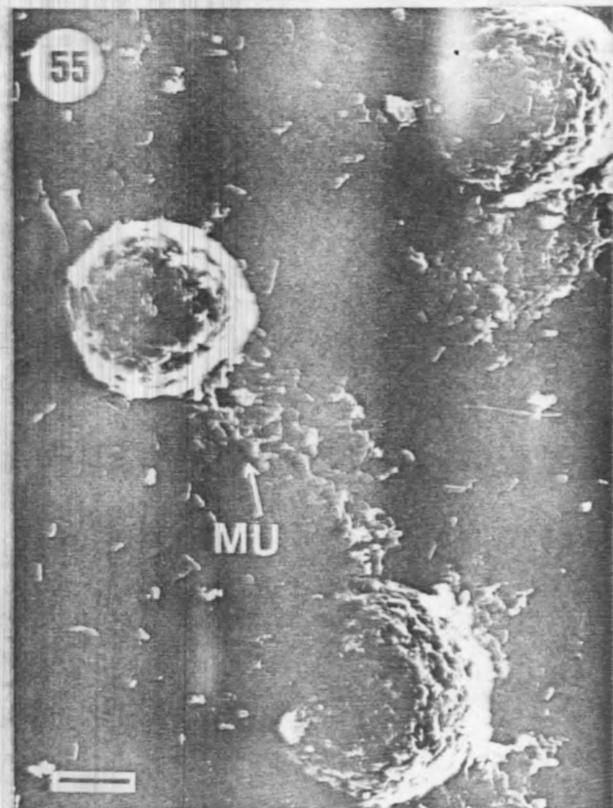
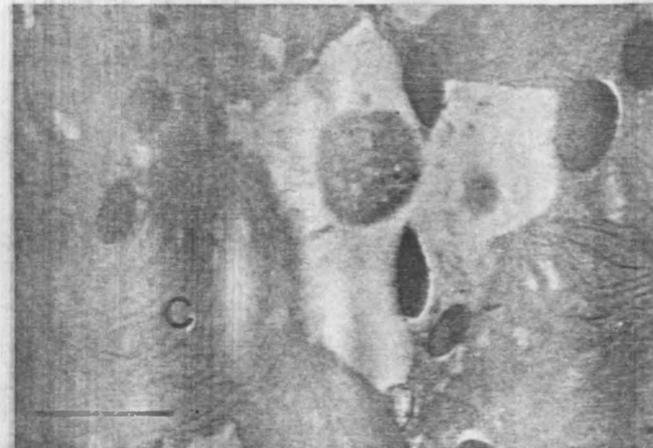
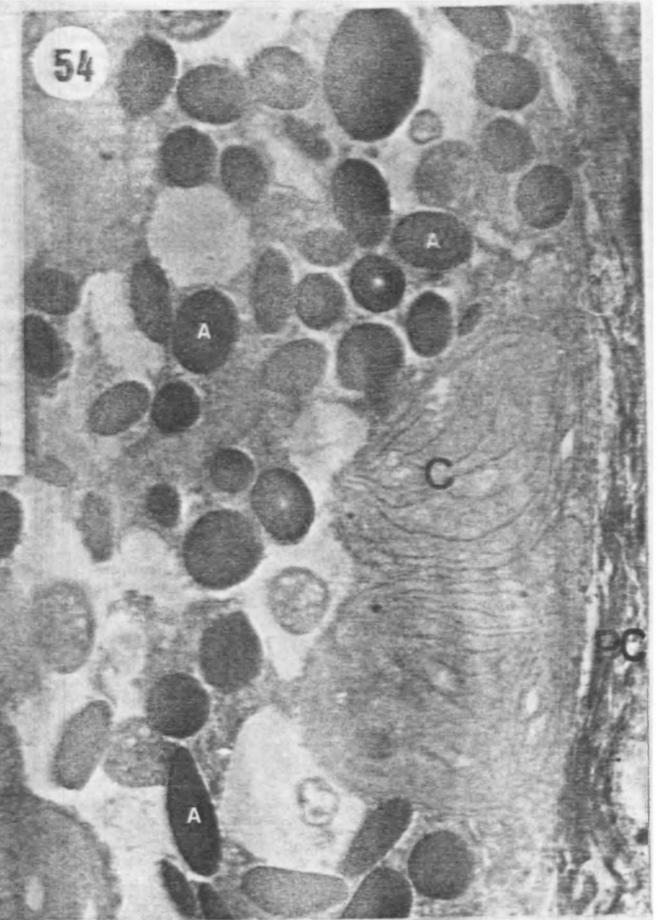


Fig. 53. Corte de um tetrásporo (T) com vinte horas após a liberação visto ao MET. Observe a parede celular (PC). Escala = 1 μ m.

Fig. 54. Detalhe do tetrásporo mostrando grãos de amido (A) e muitos cloroplastos (C) com tilacóides evidentes. Parede celular (PC) presente neste estágio. Escala = 1 μ m.

Fig. 55. Tetrásporos livres fixos ao substrato por grande quantidade de mucilagem (Mu). Escala = 3 μ m.

Fig. 56. Tetrásporo fixo ao substrato, note como sua superfície é irregular. Mucilagem (Mu). Escala = 1 μ m.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEY, C. D.; SCOTT, J. L. Unusual dictyosome morphology and vesicle formation in tetrasporangia of the marine red alga *Polysiphonia denudata*. *J. Ultrastruct. Res.*, Orlando, v. 58, p. 289-298, 1977.
- APT, K. E.; GIBOR, A. The ultrastructure of galls on the red alga *Gracilaria epihippisor*. *J. Phycol.*, Lawrence, v. 27, p. 409-413, 1991.
- ARNOLD, W.; MITRENGA, D.; MAYERSBACH, H. Gefriertrocknung und einbettung in glycolmethacrylat (GMA) - Ergebnisse Histochemischer Reaktionen. *Acta histochem.*, Kyoto, v. 14, p. 271-277, 1975. Supplement.
- AVANZINI, A.; HONSELL, G. Some aspects of germination and cell wall formation in tetraspores of *Nitophyllum punctatum* (Rhodophyta). *Caryologia*, Firenze, v. 35, n. 3, p. 351-353, 1982.
- _____. Membrane tubules in the tetraspores of a red alga. *Protoplasma*, Vienna, v. 119, p. 156-158, 1984.
- AVANZINI, A.; HONSELL, G.; GARDONIO, S. Some aspects of germination in tetraspores of *Nitophyllum punctatum* (Rhodophyta). *Cariologia*, Firenze, v. 35, p. 351-353, 1982.
- _____. Some aspects of carpospore ultrastructure in *Batrachospermum moniliforme* (Rhodophyta). *G. Bot. Ital.*, Firenze, v. 118, n. 1-2, p. 80-81, 1984.
- AVANZINI, A. La ultraestructura de las esporas de Rhodophyta. *Insula*, Florianopolis, v. 19, n. 7-14, 1989.
- BERCHEZ, F. A. S.; OLIVEIRA, E. C. Maricultural essays with the carragenophyte *Hypnea musciformis* in S. Paulo Brazil. In: OLIVEIRA, E. C., KAUTSKY, N. (Ed.). *Cultivation of seaweed in Latin America*. São Paulo: Universidade de São Paulo, p. 89-94, 1990.
- BISALPUTRA, T.; BISALPUTRA, A. A. The occurrence of DNA fibrils in chloroplasts of *Laurencia spectabilis*. *J. Ultrastruct. Res.*, Orlando, v.17, p. 14-22, 1967.
- BORAWITZKA, M. A.; VESK, M. Ultrastructure of the corallinaceae. I. The vegetative cells of *Corallina officinalis* and *C. cuvierii*. *Mar. Biol.*, New York, v. 46, p. 295-302. 1978.
- BROADWATER, S.; SCOTT, J.; POBINER, B. Ultrastructure of meiosis in *Dasya baillouviana* (Rhodophyta) I. Prophase I. *J. Phycol.*, Lawrence, v. 22, p. 460-500, 1986a.

- _____. Ultrastructure of meiosis in *Dasya baillouviana* (Rhodophyta). II Prometaphase I - Telophase II and post-division nuclear behavior. *J. Phycol.*, Lawrence, v. 22, p. 501-512, 1986b.
- BUCHI, D. F.; SOUZA, W. Internalization of surface components during ingestion of *Saccharomyces cerevisiae* by macrophages. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* v. 24, n.11, p.135-139, 1992.
- CAMARGO, M. L. Z. *Guia de técnicas citológicas e histoquímicas*. Curitiba: [s. n.] 1979. 21p. Apostila mimeografada.
- CHAMBERLAIN, A. H. L.; EVANS, L. V. Aspects of spore production in the red alga *Ceramium*. *Protoplasma*, Vienna, v. 76, p. 138-159, 1973.
- CHAPMAN, V. J. The marine algae of Fiji. *Revue Alg.*, v. 10, p. 164-171, 1971.
- COETZEE, J. Fixation of plant cell for electron microscopy. In: ROBARDS, A. W. (Ed.) *Botany microscopy*. Oxford: Oxford University Press, p. 17-38, 1985.
- DAWES, C. J.; SCOTT, F. M.; BOWLER, E. A light and electron microscopic survey of algal cell wall. I. Phaeophyta and Rhodophyta. *Amer. J. Bot.*, Columbus, v. 48, p. 925-934, 1961.
- DELIVOPOULOS, S. G.; TSEKOS, I. A light microscope study of carposporophyte development in *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss. *Ann. Bot.*, London, v. 52, p. 317-323, 1983.
- DELIVOPOULOS, S.; KUGRENS, P. Ultrastructure of carposporogenesis in the parasitic red alga *Faucheocolax attenuata* Stch. (Rhodymeniales, Rhodymeniaceae). *Amer. J. Bot.*, Columbus, v. 71, n. 9, p. 1245-1259, 1984.
- _____. Ultrastructure of carposporophyte development in the red alga *Gloiosiphonia verticillaris* (Criptonemiales, Gloisiphoniaceae). *Amer. J. Bot.*, Columbus, v. 71, n. 12, p. 1926-1938, 1985.
- DELIVOPOULOS, S.; TSEKOS, I. Ultrastructure of carposporogenesis in the red alga *Gracilaria verrucosa* (Gigartinales, Gracilariaceae). *Bot. Mar.*, Berlin, v. 29, p. 27-35, 1986.
- DODGE, J. D. *The fine structure of algal cells*. London: Academic press. 1973. 165 p.
- EVANS, L. V.; SIMPSON, M.; CALLOW, M. E. Sulphated polysaccharide synthesis in brown algae. *Planta*, Heidelberg, v. 110, p. 237-252, 1973.
- FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and methods. *Amer. J. Bot.*, Columbus, v. 55, n. 1, p. 123-142, 1968.
- FREIDLANDER, M.; ZELIKOVITCH, N. Growth rates, phycocolloid yield and quality of the red seaweeds, *Gracilaria* sp, *Pterocladia capillacea*, *Hypnea musciformis* and *H. cornuta* in field studies in Israel. *Acquaculture*, v. 40, p. 57-66, 1984.

- FRITSCH, F. E. 1965. *The structure and reproduction of the algae*. Cambridge: Cambridge University Press, 1945. 939 p. v. 2.
- GERLACH, D. *Botanische microtechnik*. Stuttgart: Georg - Thiess Verlag., 1977. 311p.
- GORDON, E. M.; MCCANDLESS, E. L. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stack. *Proc. Nova Scot. Inst. Sci.*, v. 27, p. 111-133, 1973. Supplement.
- GORDON-MILLS, E. M.; MCCANDLESS, E. L. Carrageenans in the cell walls of *Chondrus crispus* Stack. (Rhodophyceae, Gigartinales). I. Localization with fluorescent antibody. *Phycologia*, Oxford, v. 14, n. 4, p. 275-281, 1975.
- GORDON-MILLS, E. M.; TAS, J.; MCCANDLESS, E. L. Carrageenans in the cell walls of *Chondrus crispus* Sack. (Rhodophyceae, Gigartinales). III. Metachromasia and the topotical reaction. *Phycologia*, Oxford, v. 17, n. 1, p. 95-104, 1978.
- GORI, P. Ultrastructure of carpospores in *Gastroclonium clavatum* (Roth) Ardissona (Rhodymeniales). *Protoplasma*, Vienna, v. 103, p. 263-271, 1980.
- _____. An investigation of tetrasporogenesis in the marine red alga *Gastroclonium* (Roth) Ardissona (Rhodymeniales). *Ann. Bot.*, London, v. 50, p. 451-457, 1982.
- HAWKES, M. W. Ultrastructure characteristics of monospore formation in *Porphyra gardneri* (Rhodophyta). *J. Phycol.*, Lawrence, v. 16, p. 192-196, 1980.
- HOLTZMAN, E. ; NOVIKOFF, A. B. *Células e estruturas celulares*. Interamericana. Rio de Janeiro. 1985. 630p.
- HYMES, B. J.; COLE, K. M. The cytology of *Audouinella hermannii* (Rhodophyta, Florideophyceae). II. Monosporogenesis. *Can. J. Bot.*, Ottawa, v. 61, p. 3377-3385, 1983.
- KLOAREG, B. Structure et rôle écophysiological des parois des algues littorales: contribution à la résistance aux variations de salinité. *Physiol. Vég.*, Montrouge, v. 19, n. 3, p. 427-441, 1981.
- KONRAD-HAWKINS, E. Golgi vesicles of uncommon morphology and wall formation in the red alga, *Polysiphonia*. *Protoplasma*, Vienna, v. 80, p. 1-14, 1974a.
- _____. Growth and differentiation of the Golgi apparatus in the red alga *Callithamnion roseum*. *J. Cell Sci.*, Cambridge, v. 14, p. 635-655, 1974b.
- KOSLOWSKY, D. J.; WAALAND, S. D. Ultrastructure of selective chloroplast destruction after somatic cell fusion in *Griffithsia pacifica* Kylin (Rhodophyta). *J. Phycol.*, Lawrence, v. 23, p. 638-648, 1987.

- KUGRENS, P.; WEST, J. A. Ultrastructure of tetrasporogenesis in the parasitic red alga *Levringiella gardneri* (Setchell) Kylin. *Phycologia*, Oxford, v. 8, p. 370-383, 1972.
- _____. The ultrastructure of carposporogenesis in the marine hemiparasitic red alga *Erythrocytis saccata*. *J. Phycol.*, Lawrence, v. 10, p. 139-147, 1974.
- KUGRENS, P.; DELIVOPOULOS, S. G. Ultrastructure of the carposporogenesis in the parasitic red alga *Plocamiocolax pulvinata* Stch. (Gigartinales, Plocamiaceae). *J. Phycol.*, Lawrence, v. 22, p. 8-21, 1986.
- LA CLAIRE, J. W.; DAWES, C. An autoradiographic and histochemical localization of sulfated polysaccharides in *Eucheuma nudum* (Rhodophyta). *J. Phycol.*, Lawrence, v. 12, p. 368-375, 1976.
- MARIANI, P.; TOLOMIO, C.; BALDAN, B.; BRAGHETTA, P. Cell wall ultrastructure and cation localization in some benthic marine algae. *Phycologia*, Oxford, v. 29, p. 253-262, 1990.
- MACARTHUR, D. M.; MOSS, B. L. The ultrastructure of cell walls in *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. *Br. Phycol. J.*, London, v. 12, p. 359-368, 1977.
- MACDONALD, K. The ultrastructure of mitosis in the marine red alga *Membranoptera platyphylla*. *J. Phycol.*, v. 8, p. 156-166, 1972.
- MATSUBARA, R. M. S. As carragenanas. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FICOLOGIA, 4, 1989, Florianópolis. *Resumos...* Florianópolis, 1989. p. 9.
- MCBRIDE, D. L.; COLE, K. Ultrastructural characteristics of the vegetative cell of *Smithora naiadum* (Rhodophyta). *Phycologia*, Oxford, v. 8, n. 3/4, p. 177-186, 1969.
- _____. Electron microscopic observations on the differentiation and release of monospores in the marine red alga *Smithora naiadum*. *Phycologia*, Oxford, v. 10, n. 1, p. 49-61, 1971.
- _____. Ultrastructural observations on germinating monospores in *Smithora naiadum* (Rhodophyceae, Bangiophycidae). *Phycologia*, Oxford, v. 11, n. 2, p. 181-191, 1972.
- MCCULLY, M. Histological studies on the genus *Fucus*. *Protoplasma*, Vienna, v. 62, n. 4, p. 20-40, 1968.
- MSHIGENI, K. E. The histological localization of the structural polysaccharides of seaweeds. *Ann. Acad. Sci.*, New York, v. 175, p. 702-711, 1970.
- _____. Field cultivation of *Hypnea* (Rhodophyta) spores for carrageenan: Prospects and problems. *Bot. Mar.*, Berlin, v. 19, p. 227-230, 1976a.

- _____. A note on the fate of tetrasporangial stichidia in *Hypnea* Lamouroux after spore release. *Bot. Mar.*, Berlin, v. 19, p. 313-315, 1976b.
- _____. Studies on the reproduction of selected species of *Hypnea* (Rhodophyta, Gigartinales) from Hawaii. *Bot. Mar.*, Berlin, v. 19, p. 341-346, 1976c.
- MSHIGENI, K. E.; LORRI, W. S. M. Spore germination and early stages of development in *Hypnea musciformis* (Rhodophyta, Gigartinales). *Mar. Biol.*, Berlin, v. 42, p. 161-164, 1977.
- OATES, B. R.; COLE, K. M. Organelle associations in developing trichoblasts of *Polysiphonia hendryi* (Rhodophyta, Ceramiales). *Br. Phycol. J.* London, v. 24, n.4, p. 339-346, 1989.
- OLIVEIRA, E. C. *Algas marinhas bentônicas do Brasil*. São Paulo, 1977. Tese de livre-docência - Inst. Bioc. Univ. S. Paulo.
- PARKER, B. C., DIBOLL, A. G. Alcian stains for histochemical localization of acid and sulfated polysaccharides in algae. *Phycologia, Oxford*, v. 6, n. 1, p. 37-46, 1966.
- PEARSE, A. G. E. *Histochemistry theoretican and applied*. 3 ed. Boston: Little Brown. V. L., 1968. 1055 p.
- PELLEGRINI, M.; PELLEGRINI, L. On the occurrence of twisted fibrillar structure in the cytoplasm of the red alga *Alsidium helminthochorton* (La Tourette) Kütz., ultrastructure and cytochemical observations. *Protoplasma*, Vienna, v. 126, p. 54-61, 1985.
- PERCIVAL, E. The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: their basic structure, biosynthesis and function. *Br. Phycol. J.*, London, v. 14, p. 103-117, 1979.
- PEYRIÈRE, M. Evolution de l' appareil de Golgi au cours de la tétrasporogenèse de *Griffithsia flosculosa* (Rhodophyceae). *C. R. Acad. Sci. Paris*, Paris, Ser.D. v. 270, p. 2071-2074, 1970.
- PHILLIPS, D.; SCOTT, J. Ultrastructure of cell division and reproductive differentiation of male plants in the Florideophyceae (Rhodophyta). Mitosis in *Dasya baillouviana*. *Protoplasma*, Vienna, v. 106, p. 329- 341, 1981.
- PUESCHEL, C. M. Ultrastructure of tetrasporogenesis in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *J. Phycol.*, Lawrence, v. 15, p. 409-424, 1979.
- _____. Evidence for two classes of microbodies in meiocytes of the red alga *Palmaria palmata*. *Protoplasma*, Vienna, v. 104, p. 273-282, 1980.
- _____. Ultrastructural observations of tetrasporangia and conceptacles in *Hildenbrandia* (Rhodophyta: Hildenbrandiales). *Br. Phycol. J.*, London, v. 17, p. 333-341, 1982.

- _____. Cell sloughing and chloroplast inclusions in *Hildenbrandia rubra* (Rhodophyta, Hildenbrandiales). *Br. Phycol. J.*, London, v. 23, p. 17-23, 1988a.
- _____. Secondary pit connections in *Hildenbrandia* (Rhodophyta, Hildenbrandiales). *Br. Phycol. J.*, London, v. 23, p. 25-32, 1988b.
- PUESCHEL, C. M.; COLE, K. M. Rhodophycean pit plugs: an ultrastructural survey with taxonomic implications. *Amer. J. Bot.*, Columbus, v. 69, n. 5, p. 703-702, 1982.
- _____. Ultrastructure of germinating carpospores of *Porphyra variegata* (Kjellm.) Hus. (Bangiales, Rhodophyta). *J. Phycol.*, Lawrence, v. 21, p. 146-154, 1985.
- RAMARAO, K. R.; KRISHNAMURTHY, U. Study of the preparation and properties of the phycocolloid from *Hypnea musciformis* (Wulf) Lamouroux from Veraval Gujarat coast. *Bot. Mar.*, Berlin, v. 11, n. 4, p. 129-133, 1968.
- RAMARAO, K. R. Studies on growth cycle and phycocolloid content in *Hypnea musciformis* (Wulf) Lamouroux. *Bot. Mar.*, Berlin, v. 13, n. 2, p. 163-165, 1970.
- RAMM-ANDERSON, S. M.; WETHERBEE, R. Structure and development of the carposporophyte of *Nemalion helminthoides* (Nemalionales, Rhodophyta). *J. Phycol.*, London, v. 18, p. 133-141, 1982.
- RAMUS, J. Properties of septal plugs from the red alga *Griffithsia pacifica*. *Phycologia*, Lawrence, v. 10, p. 99-103, 1971.
- RAVETTO, C. Alcian blue - alcian yellow: a new method for the identification of different acidic groups. *J. Histochem. Citochem.*, New York, v. 12, p. 44-45, 1964.
- ROUND, F. E. *Biologia das algas*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1983. 263p.
- SAITO, R. M.; OLIVEIRA, E. C. Chemical screening of Brazilian marine algae producing carrageenans. *Hydrobiologia*, Dordrecht, v. 204\205, p. 585-588, 1990.
- SANTISI, S.; DE MASI, F. An electron microscopic study on tetrasporogenesis of the parasitic red alga *Erythrocytis montagnei* (Derb. and Sol.) Silva. *Cytobios.*, Cambridge, v. 31, p. 163-178, 1981.
- SCHENKMAN, R. P. F. *Cultura de Hypnea (Rhodophyta) in vitro como subsidio para estudos morfológicos, reprodutivos e taxonômicos*. São Paulo, 1986. Dissertação (Doutorado em Ciências) - Inst. Bioc. Univ. S. Paulo.
- SCOTT, J. E.; DORLING, J. Differential staining of acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) by alcian blue in salt solutions. *Histochemie*, Berlin, v. 5, p. 221-233, 1965.

- SCOTT, J.; DIXON, P. S. Ultrastructure of tetrasporogenesis in the marine red alga *Ptilota hypnoides*. *J. Phycol.*, London, v. 9, p. 29-46, 1973.
- SCOTT, J.; BOSCO, C.; SCHORNSTEIN, K.; THOMAS, J. Ultrastructure of cell division and reproductive differentiation of male plants in the florideophyceae (Rhodophyta): Cell division in *Polysiphonia*. *J. Phycol.*, London, v. 16, p. 507- 524, 1980.
- SPURR, A. R. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruc. Res.*, Orlando, v. 26, p. 31-43, 1969.
- TAYLOR, W. R. *Marine algae of the eastern tropical and subtropical coasts of the Americas*. Ann. Arbr, USA, 1960. 870p.
- TRICK, H. N.; PUESCHEL, C. M. Cytochemistry of pit plugs in *Bossiella californica* (Corallinales, Rodophyta). *Phycologia*, Oxford, v. 29, p. 403-409, 1990.
- _____. Cytochemical evidence for homology of the outer cap layer of red algal pit plugs. *Phycologia*, Oxford, v. 30, n. 2, p. 196-204, 1991.
- TRIEMER, R. E.; VASCONCELOS, A. C. The ultrastructure of carposporogenesis in *Caloglossa leprieurii* (Delesseriaceae, Ceramiales). *Amer. J. Bot.*, Columbus, v. 64, n. 7, p. 825-834, 1977.
- TRIPODI, G. The fine structure of the cytocarp in the red alga *Polysiphonia sertularioides* (Grat.) J. Ag. *J. Submicrosc. Cytol.*, Bologna, v. 3, p. 71-79, 1971.
- _____. Ultrastructural changes during carpospore formation in the red alga *Polysiphonia*. *J. Submicrosc. Cytol.*, Bologna, v. 6, p. 275-286, 1974.
- TRIPODI, G.; DE MASI, F. Cytological localization of polysaccharidic molecules in some red algae. *J. Submicrosc. Cytol.*, Bologna, v. 7, p. 197-209, 1975.
- TRIPODI, G.; GARGIULO, G. M. Relationships among membranes in plastids of the red alga *Nitophyllum punctatum* (Stackh.) Grev. *Protoplasma*, Vienna, v. 119, p. 55-61, 1984.
- TSEKOS, I. Growth and differentiation of the Golgi apparatus and wall formation during carposporogenesis in the red alga *Gigartina teedii* (Roth) Lamour. *J. Cell Sci.*, Cambridge, v. 52, p. 71-84, 1981.
- _____. Plastid development and floridean starch grain formation during carposporogenesis in the red alga *Gigartina teedii*. *Cryptogam. Algol.*, Paris, v. 3, n. 2, p. 91-103, 1982.
- _____. The ultrastructure of carposporogenesis in *Gigartina teedii* (Roth) Lamour. (Gigartinales, Rhodophyceae): Gonimoblast cells and carpospores. *Flora*, Jena, 174, p. 191-211, 1983.

- _____. The endomembrane system of differentiating carposporangia in the red alga *Chondria tenuissima*: occurrence and participation in secretion of polysaccharidic and proteinaceous substances. *Protoplasma*, Berlin, v. 129, p. 127-136, 1985.
- TSEKOS, I.; SCHNEPF, E.; MAKRANTONAKIS, A. The ultrastructure of tetrasporogenesis in the marine red alga *Chondria tenuissima* (Good. et Woodw.) (Ceramiaceae, Rhodomelaceae). *Ann. Bot.*, London, v. 55, p. 607-619, 1985.
- TSEKOS, I. ; DIANNELIDIS, B. E. The ultrastructure of carposporogenesis in *Gigartina teedii* (Roth) Lamour (Gigartinales, Rhodophyceae): Carpospores. *ΠΡΑΚΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ*, p. 721-725, 1985.
- VESK, M.; BOROWITZKA, M. Ultrastructure of tetrasporogenesis in the coralline alga *Haliptilon cuvieri* (Rhodophyta). *J. Phycol.*, Lawrence, v. 20, p. 501-515, 1984.
- WETHERBEE, R.; WYNNE, M. The fine structure of the nucleus and nuclear associations of developing carposporangia in *Polysiphonia novae - angliae* (Rhodophyta). *J. Phycol.*, Lawrence, v. 9, p. 402-407, 1973.
- WETHERBEE, R.; WEST, J. A. Golgi apparatus of unique morphology during early carposporogenesis in a red alga. *J. Ultrastruct. Res.*, Orlando, v. 58, p. 119-133, 1977.
- WETHERBEE, R.; KRAFT, G. T. Morphological and fine structural features of pit connections in *Cryptonemia* sp, a highly differentiated marine red alga from Australia. *Protoplasma*, Vienna, v. 106, p. 167-172, 1981.
- YASUMA, A.; ICHIKAWA, T. Ninhydrin-Schiff and alloxan-Schiff staining. A new staining method for protein. *J. Lab. Clin. Med.*, St. Louis, v. 41, p. 296-299, 1953.
- YOUNG, D. N. Ontogeny, histochemistry and fine structure of cellular inclusions in vegetative cells of *Anthithamnion defectum* (Ceramiaceae, Rhodophyta). *J. Phycol.*, Lawrence, v. 15, p. 42-48, 1979.
- _____. Unusual cell wall ultrastructure in *Anthithamnion* (Rhodophyta). *Br. Phycol. J.*, London, v. 15, p. 119-124, 1980.
- ZABLACKIS, E.; SANTOS, G. A. The carrageenan of *Catenella nipae* Zanard., a marine red alga. *Bot. Mar.*, Berlin, v. 29, n. 4, p. 319-322, 1986.
- ZABLACKIS, E.; VREELAND, V.; DOBOSZEWSKI, B.; LAETSCH, W. Differential localization of carrageenan gelling in *Kappaphycus alvarezii* var. *tambalang* (Rhodophyta) with FITC conjugated carrageenan oligosaccharides. *J. Phycol.*, Lawrence, v. 27, n. 2, p. 241-248, 1991.