

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS,
Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE *PARVOCAULIS* SP. (CHLOROPHYTA, DASYCLADALES) SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS DE CULTURA

Katyuscya Ferreira Barreto¹; Carlos Wallace do Nascimento Moura²

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: katybarreto@gmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: carloswallacemoura@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Chlorophyta, Dasycladales, *Parvocaulis*, cultura in vitro.

INTRODUÇÃO

Dasycladales (Chlorophyta) é uma das ordens mais antigas de algas verdes, com registros desde o Cambriano (Van den Hoek *et AL.*, 1995). A ampla documentação fóssil das Dasycladales mostra que esse grupo floresceu através de vários períodos geológicos produzindo uma rica flora, com cerca de 180 gêneros, dos quais muitos já extintos (Berger & Keaver 1992; Berger *et al.* 2003).

Os representantes atuais apresentam distribuição na zona de entre marés e infralitoral de áreas tropicais e subtropicais do globo, sendo agrupados em duas famílias: Dasycladaceae e Polyphysaceae (Guiry & Guiry, 2010).

Os representantes de Polyphysaceae são organismos altamente diferenciados e apresentam o mesmo plano básico do corpo. Estes apresentam talo unicelular, sifonáceo, originados da fusão de gametas biflagelados formando um zigoto que, após fixar-se ao substrato, desenvolve um pedúnculo delgado que na porção apical forma um verticilo de raios (gametóforos), que em conjunto, originam um disco, cuja forma é própria de cada espécie (Berger & Keaver 1992). Na família, os gêneros e espécies têm sido tradicionalmente reconhecidos com base nas características morfológicas do pedúnculo e dos atributos dos gametóforos (Bailey *et al.*, 1976). Segundo Berger *et al.* (2003), o grupo que inclui os representantes de *Parvocaulis* é caracterizado pela presença de pedúnculo corrugado e ausência de corona inferior nos raios gametangiais.

Atualmente são reconhecidas cinco espécies de *Parvocaulis*, porém apenas duas foram referidas para o Brasil (Horta 2000): *P. pusillus* ocorrendo em Pernambuco, Paraíba, Espírito Santo e Bahia (Labanca 1967-9, Kanagawa 1984, Pereira & Accioly 1998, Barata 2004, Moura, dados não publicados) e *P. parvulus* apenas na Bahia (Moura, dados não publicados).

Segundo Moura (comunicação pessoal), *Acetabularia myriospora* A.B. Joly & Cordeiro-Marino, espécie descrita para a Bahia a partir de coleta realizada na praia de Amaralina (Joly *et al.* 1965), também pertence ao gênero *Parvocaulis*, entretanto como não foi formalmente transferida para o gênero (Moura, dados não publicados), será tratada neste estudo como *Parvocaulis* sp. Estudos sobre o desenvolvimento de Polyphysaceae em cultura de laboratório no Brasil é restrito ao trabalho de Yoneshigue-Braga (1980), que acompanhou o desenvolvimento do talo de *Acetabularia calyculus* J.V.Lamouroux in Quoy & Gaimard utilizando dois meios cultura: água do mar (superfície e upwelling) e meio Erdschreiber.

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS,
Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

Diante disso e visando contribuir com conhecimento sobre as Polyphysaceae no litoral da Bahia, o presente plano visou estudar o desenvolvimento *in vitro* de *Parvocaulis* sp. (Dasycladales, Chlorophyta) sob condições controladas de cultura.

MATERIAL E MÉTODO

O material estudado foi coletado no recife costeiro da praia da Penha, região de entre marés, durante as baixas marés diurnas, no período de abril de 2009 a janeiro de 2010. Os espécimes obtidos foram lavados com água do mar, acondicionados em frascos de polietileno com tampa e colocados em recipiente térmico com gelo, até chegar no laboratório. No laboratório, estes foram transferidos para frascos de vidro tipo “baby food” (5,5 x 5,5 cm), contendo água do mar esterilizada, aclimatados por 72 horas e selecionados talos com gametóforos (raios gametangiais férteis), com auxílio de estereomicroscópio.

Os gametóforos foram limpos com papel toalha, colocados em tubos eppendorf lavados em solução de 1,3-bis [tris(hidroximetil-metilamino)propano (BTP), incubados em solução de proteína de prata e, posteriormente, em solução de antibióticos (0,2 mg.mL⁻¹ de Neomicina, 0,2 mg.mL⁻¹ de Clorofenicol, 2mg.ml⁻² de Estreptomicina, 0,1 mg.mL⁻¹ de Ampicilina), em 100ml de meio de cultura Provasoli Enriched Seawater (PES), por cinco dias, no escuro, a 14° C, para auxiliar a descontaminação, maturação e liberação de gametângios. O desenvolvimento dos talos de *Parvocaulis* sp. foi acompanhado a partir de talos cultivados em água do mar esterilizada ou água do mar enriquecida com solução PES, ambas com salinidade de 40UPS e pH 7,8, em condições controladas de cultivo: temperatura de 21 ± 1°C, irradiância de 40 ± 5 μmol de fótons. m⁻².s⁻¹ fornecida por tubos de luz branca fria fluorescentes, dispostos horizontalmente em relação aos recipientes, e fotoperíodo de 12:12h (claro:escuro). O crescimento dos talos foi analisado e fotografado através de estereomicroscópio (marca Kyowa Coleman) e microscópio (Carl Zeiss) acoplado à máquina fotográfica Sony (modelo Cyber-Shot DSC-W7).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, com exceção da fusão dos gametas e das fases iniciais de desenvolvimento do zigoto, foi possível acompanhar a maior parte da morfogênese do talo de *Parvocaulis* sp. a partir de plantas cultivadas em meio contendo água do mar enriquecida com solução PES.

Segundo Berger e Kaefer (1992), logo após a fusão dos gametas, o zigoto originado desenvolve um sifão, que se alonga e forma um pedúnculo não ramificado, delgado. Este, observado nos primeiros 10 dias de cultura, apresenta fototropismo positivo, com uma das extremidades formando rizóides e a outra, verticilos de pêlos e de gametóforos (raios gametangiais), alternadamente. O crescimento em *Parvocaulis* é interrompido periodicamente para dar lugar à formação de morfogênese de pelos (Berger *et al.* 2003).

Nos espécimes estudados, a formação de pêlos foi observada após 30 dias. No ápice do sifão desenvolve uma coroa de pêlos estéreis, dispostos em verticilo. Segundo Gibor (1973), os pêlos contribuem no processo fotossintético e absorção de nutrientes necessários para o crescimento vegetativo, mas são perdidos cerca de duas semanas após a sua formação, deixando suas cicatrizes no pedúnculo. Estas cicatrizes muitas vezes são difíceis de serem visualizadas uma vez que ficam obscurecidas devido à corrugação do pedúnculo em talos adultos. Este enrugamento é característico das espécies do gênero (Berger *et al.* 2003). Após

50 dias, observou-se o surgimento dos gametóforos e estruturas adjacentes (corona superior). Estes são originados a partir do primórdio primário (Berger *et al.* 2003), que forma uma coroa de 7-11 projeções no ápice do pedúnculo. Estas projeções se expandem e originam, concomitantemente, os gametóforos (raios gametangiais), que inicialmente são arredondados e na maturidade assumem a forma característica da espécie e a corona superior na base dos gametóforos, que possui formato circular, protuberante e porta cerca de 6-7 pêlos diminutos localizada que ao caírem, deixam cicatrizes.

Durante os estágios iniciais de desenvolvimento dos gametóforos estes ficam recobertos por um *velum* (membrana péctica delicada e delgada, de difícil visualização), que na maturidade rompe-se. Os gametóforos quando totalmente expandidos são mantidos unidos pela deposição de carbonato de cálcio entre os raios. Nos espécimes estudados foram contabilizados cerca de 300 cistos por raio gametangial. Depois de liberarem os cistos (gametângios), os gametóforos caem deixando cicatrizes no pedúnculo e um novo disco pode ser formado a partir do ápice de pedúnculo. A diferenciação dos gametas ocorre dentro dos cistos e foram observados após 90 dias. De acordo com Schweiger *et al.* (1974), o núcleo secundário se divide várias vezes até a produção de cerca de 100 gametas.

No presente estudo seguiu-se o protocolo proposto por Berger & Kaever (1992) e Hunt & Mandole (1992), modificados, visando a descontaminação dos gametóforos e o aumento da viabilidade de maturação dos gametângios de *Parvocaulis*. Os gametóforos maduros foram obtidos a partir de plantas cultivadas *in vitro* (com meio de cultura PES), os quais foram incubados em solução de proteína de prata (30 minutos) e depois em coquetel de antibióticos (5 dias). A este processo, acrescentou-se duas etapas do protocolo proposto por Hunt & Mandole (1992), limpeza mecânica dos gametóforos com guardanapos e incubação destes em BTP, o que lhe conferiu maior descontaminação.

O tempo de 2 horas de incubação em proteína de prata proposto por Berger e Kaever (1992) não funcionou nos espécimes estudados; após o período proposto, constatou-se que os cistos se apresentaram descoloridos e não houve liberação dos gametas. Hunt e Mandoli (1992) propuseram um período de incubação bem inferior, 5 minutos, neste tempo de incubação os gametângios ficaram viáveis e liberaram gametas.

Após a descontaminação dos gametóforos, estes foram acondicionados em placas de petri contendo meio de cultura PES, a uma temperatura $21 \pm 1^\circ\text{C}$, irradiância de $40 \pm 5 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16:8h (claro:escuro) e monitorados durante o período de 3, 5, 10, 14 e 17 dias, para acompanhar o processo de liberação dos gametas. Hunt & Mandoli (1992) relataram a liberação de gametas entre 3-14 dias. No presente trabalho foi possível observar a abertura do opérculo para liberação dos gametas entre 10 e 17 dias. Embora tenha sido observado a liberação dos gametas não foi possível observar a fusão destes bem como as fases iniciais de desenvolvimento do zigoto.

No campo, o ciclo de vida dos representantes de Polyphysaceae, como por exemplo, de *Acetabularia acetabulum* (L.) Silva, leva de dois a três anos (Berger & Keaver 1992), podendo ser reduzido a cerca de seis meses em condições favoráveis de cultura (Hunt & Mandoli, 1992; Zeller & Mandoli, 1993), fato este comprovado neste estudo.

Talos cultivados apenas em água do mar esterelizada não apresentaram resultados satisfatórios já que o crescimento destes foi limitado e não desenvolveram talos férteis. Após um mês este ficaram amarelados e morreram. Segundo Yoneshigue-Braga (1980), que estudou o desenvolvimento de *Acetabularia calyculus* a partir de três meios de cultivos diferentes (Erdschreiber, água de upwelling e água do mar superficial), a água do mar

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS,
Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

superficial é pobre em nitrogênio, fósforo e substâncias quelantes, sendo desfavorável ao desenvolvimento destes organismos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, com exceção da fusão dos gametas e das fases iniciais de desenvolvimento do zigoto, foi possível acompanhar a maior parte da morfogênese do talo de *Parvocaulis* sp. a partir de plantas cultivadas *in vitro* utilizando água do mar enriquecida com solução PES. Os talos cultivados apenas em água do mar não apresentaram crescimento satisfatório e morreram. As seguintes condições de cultura permitiram o desenvolvimento de *Parvocaulis* sp. *in vitro*: temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, irradiância de $40 \pm 5 \mu\text{mol de fótons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12:12h (claro:escuro), salinidade de 40 UPS, pH 7,8. O surgimento de gametóforos e estruturas adjacentes (corona superior) foram observados após 50 dias, ao passo que gametóforos maduros, contendo gametângios, foram registrados após 90 dias de cultivo em laboratório. A lavagem dos gametóforos maduros em solução BTP, incubação em solução de proteína de prata e, posteriormente, em solução de antibióticos permitiu a descontaminação, maturação e liberação de gametângios dos gametóforos; a diferenciação de gametas dentro dos gametângios foi observada após 90 dias. A partir deste estudo observou-se que o histórico de vida de *Parvocaulis* sp. é similar aos relatados para os membros de Polyphysaceae e, em laboratório, é fechado em cerca de 90-120 dias, contados desde a fase de formação de gametóforos com gametângios.

REFERÊNCIAS

- BAILEY, G.P.; REZAK, R. & COX, E.R. 1976. An revision of generic concepts of living members in the subfamily Acetabularae (Dasycladaceae, Dasycladales) based on scanning electron microscopy. *Phycologia* 15:7-18.
- BARATA, D. 2004. Clorofíceas marinhas bentônicas do estado do Espírito Santo. Dissertação Mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria do Estado do Meio Ambiente.
- BERGER, S. & KAEVER, M.J.1992. Dasycladales: an illustrated monograph of a fascinating algal order. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 247p.
- BERGER, S.; FETTWEISS, U.; GLEISSBERG, S.; LIDDLE, L.B.; RICHTER, U.; SAWITSKY, H. & ZUCCARELLO, G.C.2003. 18S rDNA phylogeny and evaluation of cap development in Polyphysaceae (formerly Acetabulariaceae; Dasycladales, Chlorophyta). *Phycologia*42:506-561.
- GIBOR, A.1973 Observations on the sterile whorls of *Acetabularia*. *Protoplasma*78:195-202.
- GUIRY, M.D. & GUIRY, G.M.2010. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. www.algaebase.org.
- JOLY, A.B., CORDEIRO-MARINO, M., UGADIM, Y., YAMAGUISHI-TOMITA, N. & PINHEIRO, F.C.(1965). New marine algae from Brazil. *Arquivos da Estação de Biologia Marinha da Universidade Federal do Ceará* 5: 79-92.
- HORTA, P.A.2000. Macroalgas do Infralitoral do sul e sudeste do Brasil: Taxonomia e Biogeografia. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- HUNT, B. E. & MANDOLI, D.F.(1992). Axenic cultures of *Acetabularia* (Chlorophyta): a decontamination protocol with potential application to other algae. *Journal of Phycology*28:407-414.

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS,
Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

- KANAGAWA, A. I. 1984. Clorofíceas Marinhas Bentônicas do Estado da Paraíba – Brasil. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- LABANCA, L. 1967-69. Contribuição ao conhecimento da flora algológica marinha do nordeste brasileiro. Trabalhos Oceanográficos da Universidade Federal de Pernambuco 9/11:325-435.
- PEREIRA, S.M.B. & ACCIOLY, M.C. 1998. Clorofíceas marinhas bentônicas da Praia de Serambi, Pernambuco, Brasil. Acta Botanica Brasílica 12: 25-52.
- SCHWEIGER, H. G., BERGER, S., KLOPPSTECH, K., APEL, K. & SCHWEIGER, M. 1974 Some fine structural and biochemical features of *Acetabularia major* (Chlorophyta, Dasycladaceae) grown in the laboratory. Phycologia 13:11-20.
- VAN DEN HOEK, C.; MANN, D.G. & JAHNS, H.M. 1995. Algae. An introduction to phycology. 2ª edição. Cambridge: University Press. 627p.
- YONESHIGUE-BRAGA, Y. 1980. Growth of *Acetabularia calyculus* in three different media. Marine Ecology. Progress Series, 3(2):157-161.
- ZELLER, A. & MANDOLI, D. F. 1993. Growth of *Acetabularia acetabulum* (Dasycladales, Chlorophyta) on solid substrata at specific cell densities. Phycologia 32:136-142