



Dirce Mithico Yamaoka Yano

Morfogênese em *Acetabularia calyculus* (Quoy e Gaimard):

Fatores Relacionados com a Diferenciação do Chapéu

Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida pela candidata
DIRCE MITHICO YAMAOKA YANO e aprovada
pela Comissão julgadora.

UNICAMP, 04 DEZ 90

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para a obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Avelino Rodrigues de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira

Campinas

1990

Y17m

13315/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

CLASSIF.	T
AUTOR.	y17m
V.	EX
TOMBO	BC/13315

CM000 10784-9

1. The first part of the document is a list of names and dates. The names are written in a cursive script, and the dates are in a standard font. The list is organized into two columns, with names on the left and dates on the right. The names are: [illegible], [illegible], [illegible], [illegible], [illegible], [illegible], [illegible], [illegible], [illegible], [illegible]. The dates are: [illegible], [illegible], [illegible], [illegible], [illegible], [illegible], [illegible], [illegible], [illegible], [illegible].

[illegible signature]

Ao Tomomasa,

A Dirce Maria, Ana

Martha, Tatiana e

Cynthia

Agradecimentos

Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira pela orientação, dedicação e incentivo durante todos estes anos.

Prof. Dra. Ikuko Shihira-Ishikawa - Tokyo Gakugei University pela amizade, orientação e valiosas sugestões durante a execução da parte experimental deste trabalho.

Prof. Dr. Kanji Yashika - College of Biomedical Technology - Osaka University pelo treinamento no campo da microscopia eletrônica, esclarecimentos e críticas.

Prof. Dra. Reiko Nagai - Osaka University pelas críticas e sugestões.

Prof. Dr. Yutaka Koshida - Diretor do College of General Education - Osaka University pela acolhida e orientação no período da pesquisa.

Prof. Dr. Toshiteru Morita - Osaka University pela orientação e treinamento nas pesquisas com radio-isótopos.

Research Center for Ultra High Voltage Electron Microscopy, Osaka University pela orientação no uso dos equipamentos de microscopia eletrônica de alta voltagem.

Radioisotopes Laboratory, Cancer Center of Aichi Prefecture, Nagoya pelo treinamento e uso de equipamentos.

A Universidade Estadual de Campinas pela oportunidade de realização deste curso.

CAPES - Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Nível Superior pela concessão de bolsa de Doutorado e bolsa "sandwich".

Ao colega Celso Eduardo Benedetti pelo estímulo, sugestões e críticas na elaboração deste trabalho.

A Sra. Ana Gagliardi, Diretora Técnica da Biblioteca do Instituto de Biologia - UNICAMP, pela orientação e correção final do trabalho.

Aos colegas Gilson Paulo Manfio e Maeve Brito de Mello pela execução da redação final deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Nomenclaturas

AD	= actinomicina D
C	= cloroplastos
CB	= citocalasina B
CG	= complexo de Golgi
CH	= cromossomos
CI	= corona inferior
CP	= citoplasma
CR	= cromatina
CS	= corona superior
D	= dictiossomos
DAPI	= 4'6-diamidino,2-fenilindol
DMSO	= dimetil sulfoxido
DNA	= ácido desoxiribonucleico
dpm	= desintegração por minuto
M	= mitocôndria
MF	= microfilamentos
MP	= membrana plasmática
mRNA	= RNA mensageiro
MTs	= microtúbulos
N	= núcleo
NE	= envelope nuclear
NO	= nucléolos
np	= núcleo primário
NP	= núcleoplasma
PC	= parede celular

PCS	= "phase combining system"
pg	= picograma
PN	= poro nuclear
rDNA	= DNA ribossômico
RE	= retículo endoplasmático
REL	= retículo endoplasmático liso
RER	= retículo endoplasmático rugoso
Ri	= rifampicina
RNA	= ácido ribonucleico
RNP complexo	= complexo ribonucleoproteico
rRNA	= RNA ribossômico
μ Ci	= micro Curie
V	= vacúolo
VE	= vesículas
VS	= vesícula secretora

Conteúdo

01.	Introdução	1
01.1.	Revisão da Literatura	5
01.1.1.	Sistemática e Ocorrência	5
01.1.2.	Interação Núcleo-Citoplasma - Regulação da Morfogênese	7
02.	Materiais e Métodos	11
02.1.	Coleta e Cultura de <i>Acetabularia calyculus</i>	11
02.2.	Isolamento e fixação do núcleo primário de <i>Acetabularia calyculus</i>	15
02.3.	Método de preparação de células vegetativas de <i>Acetabularia calyculus</i> para observação ultra- estrutural	17
02.4.	Método de preparação de células vegetativas de <i>Acetabularia calyculus</i> para observação ultra- estrutural (modificado)	19
02.5.	Incorporação de [³ H]-uridina nas células vegetativas de <i>Acetabularia calyculus</i>	21
02.6.	Observação dos efeitos da Actinomicina D (AD) sobre a formação de chapéus nas células nucleadas e anucleadas de <i>Acetabularia calyculus</i>	23
02.7.	Observação dos efeitos da Citocalasina B sobre a diferenciação do chapéu nas células de <i>Acetabularia calyculus</i>	24

02.8. Microscopia	25
02.9. Fotografias	26
03. Resultados	27
03.1. Correlações entre ciclo de vida e variações morfológicas da alga <i>Acetabularia calyculus</i>	32
03.2. Correlação entre comprimento de células anucleadas e a capacidade de formação do chapéu	34
03.3. Variações morfológicas do núcleo durante o ciclo de vida da <i>Acetabularia calyculus</i> observadas ao microscópio de fluorescência	38
03.4. Filamentos cromossômicos observados ao microscópio eletrônico de alta voltagem	51
03.5. Efeito do antibiótico Actinomicina D (AD) sobre a formação de chapéus em células nucleadas e anucleadas de <i>Acetabularia calyculus</i>	53
03.6. Efeito do inibidor Citocalasina B (CB) sobre a diferenciação do chapéu	58
03.7. Ultraestrutura das células vegetativas de <i>Acetabularia calyculus</i>	67
03.8. Incorporação do marcador radioativo [³ H]-uridina nas células vegetativas de <i>Acetabularia</i> <i>calyculus</i>	79

04.	Discussão	83
05.	Conclusões	113
06.	Resumo	117
07.	Summary	119
08.	Referências Bibliográficas	121

01. INTRODUÇÃO

A alga marinha *Acetabularia calyculus* (Quoy e Gaimard) pertence à família Dasycladaceae, ordem Sifonales, classe Chlorophyceae. Estas algas são encontradas nas regiões costeiras de mares tropicais e subtropicais, desenvolvendo-se sobre conchas de animais marinhos (ARASAKI, 1966; SANO *et al.*, 1981).

As várias espécies do gênero *Acetabularia* são os membros mais conhecidos da família Dasycladaceae devido ao uso extensivo como modelos biológicos nas áreas de estudos da biologia celular (SCHWEIGER, 1969).

Hämmerling (1931) nos seus trabalhos pioneiros descreveu a alga como sendo uma única célula que, durante a fase vegetativa, possui um único núcleo localizado no rizóide. Essa propriedade, juntamente com seu tamanho anormal (alcançando até alguns centímetros de comprimento dependendo da espécie) permitiu a fragmentação da célula em parte nucleada e anucleada e isolamento do núcleo para estudos da interrelação núcleo-citoplasma (HAMMERLING, 1940, 1958).

As investigações sobre interações núcleo-citoplasma estão principalmente relacionadas com a influência do núcleo sobre o citoplasma e vice-versa. Entretanto os mecanismos reguladores podem também operar exclusivamente dentro do núcleo ou do citoplasma (FRANKE *et al.*, 1974).

A morfogênese distinta e a viabilidade de técnicas para enucleação e troca de núcleos entre as células foram as bases para o uso da alga *Acetabularia calyculus* para estudos detalhados sobre o mecanismo da regulação da morfogênese (YAMAOKA, 1980; SHIHIRA-ISHIKAWA *et al.*, 1982).

A pesquisa sobre o núcleo primário em *Acetabularia* progrediu muito nos últimos 30 anos, tanto fisiologicamente quanto citologicamente. Os estudos fisiológicos originaram-se a partir do conceito de "substância morfogenética" elaborados por Hämmerling (1940). Hoje é aceito por todos que a substância morfogenética postulada por Hämmerling é uma família de RNAs mensageiros sintetizados no núcleo, manifestando uma grande estabilidade no citoplasma em contraste com os RNAs bacterianos (BRACHET, 1987).

O gênero *Acetabularia* exhibe ao longo de sua fase vegetativa um desenvolvimento drástico no seu núcleo primário. O resultado deste processo é a formação de um núcleo gigante e esse aumento nuclear está relacionado com o desenvolvimento de um agregado de estruturas nucleolares (FRANKE *et al.*, 1974).

Recentemente, a observação visual do comportamento nuclear desta alga tornou-se possível com o emprego do microscópio de fluorescência e o corante fluorescente DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindol) (SHIHIRA-ISHIKAWA, 1982). Esta técnica foi extremamente útil para a observação do comportamento dos cromossomos no núcleo primário (SHIHIRA-

ISHIKAWA, 1984).

No presente trabalho, variações estruturais do núcleo foram acompanhadas durante o ciclo de vida da *Acetabularia calyculus*, usando-se o método de colaração com DAPI. Foram observadas correlações entre a diferenciação celular e transição estrutural do núcleo com especial atenção para o desenvolvimento nucleolar.

Escolheu-se a espécie *A. calyculus* (Quoy e Gaimard) porque o seu ciclo de vida em condições de laboratório é obtido em um período de tempo menor que a espécie *A. mediterranea* (Lamouroux), espécie geralmente usada nas pesquisas com *Acetabularia* (YAMAOKA, 1980).

Estudos citológicos revelaram que o RNA nas células da *Acetabularia* é distribuído ao longo de um gradiente ápico-basal (WERZ, 1960). Postulou-se que este gradiente poderia ser resultado de uma transferência polar do RNA do núcleo e conseqüente acúmulo na zona de crescimento (PUISEUX-DAO, 1970).

No presente trabalho estudou-se possíveis fatores que contribuem para a formação de um gradiente ápico-basal dos RNAs, a saber: transferência do RNA nuclear para o citoplasma, migração e concentração na zona de crescimento. Para tanto, foi estudada a incorporação do [³H]-uridina a fim de elucidarmos se o núcleo desenvolve mudanças na capacidade de formação de RNA ribossômico e mensageiro durante a diferenciação.

Paralelamente, foram realizados estudos ultra-

estruturais do citoplasma de regiões apicais, intermediárias e basais das estruturas nucleares. O efeito de inibidores de transcrição foi também estudada.

01.1. Revisão da Literatura

01.1.1. Sistemática e Ocorrência

A classificação sistemática do gênero *Acetabularia* não está bem determinada. Muitos autores consideraram como sendo uma subfamília da família Dasycladaceae, ordem Syphonales, classe Chlorophyceae (SCHWEIGER, 1969).

Atualmente, o critério de classificação está baseado nos estudos ultra-estruturais da alga e testes bioquímicos como a caracterização da isoenzima desidrogenase málica (BERGER *et al.*, 1974).

Uma das características importantes da família é a incrustação de carbonato de cálcio. Sendo algas calcáreas, participaram como elementos importantes nos depósitos de rochas calcáreas na litosfera.

Com a descoberta de estruturas calcáreas, a idade cronológica da *Acetabularia* foi determinada em torno de 500 milhões de anos. Assim, estruturas calcificadas de diferentes idades revelaram informações sobre a evolução das subfamílias. Existem atualmente dez subfamílias de Dasycladaceae com 43 espécies (BERGER *et al.*, 1987).

A primeira descrição da alga *Acetabularia* foi com a espécie *mediterranea* (Lamouroux, 1816) por Bary e Strasburger (1877).

O nome *Acetabularia mediterranea* (Lamouroux) foi usada por Bary e Strasburger e também em literaturas mais recentes (PUISEUX-DAO, 1970; BONOTTO *et al.*, 1980). Entretanto, sob o Código Internacional de Nomenclatura Botânica o nome correto é *Acetabularia acetabulum* (L.) Silva (SILVA, 1952).

Com a publicação da Monografia de *Acetabularia* pela Linnean Society de Londres, Solms-Laubach (1895) descreveu pela primeira vez o núcleo da alga. Neste trabalho, o núcleo foi descrito como "pontos brancos" que ocorrem nos cistos dentro dos raios do chapéu (gametângios), sendo que a descrição correta sobre o núcleo ocorreu com o trabalho de Hämmerling (1931).

O botânico Joachim Hämmerling recebeu em 1926 amostras da espécie *mediterranea* coletadas por Max Hartman na baía de Nápoles, próximo à Rovigno D'Istria, Itália, estabelecendo pela primeira vez cultura das algas em condições artificiais no laboratório e iniciando os trabalhos morfo-fisiológicos (SCHWEIGER, 1970).

Os vários membros da família Dasycladaceae são encontrados em regiões costeiras de mares tropicais e subtropicais em profundidades variadas (SANO *et al.*, 1978) e amplamente distribuídas geograficamente (ARASAKI, 1942; VALET, 1969; ARASAKI & SHIHARA-ISHIKAWA, 1979; CINELLI, 1979).

01.1.2. Interação Núcleo-Citoplasma

- Regulação da Morfogênese -

O emprego da *Acetabularia* para investigações na biologia celular resultou de uma importante descoberta por Hämmerling (1931). Durante a fase vegetativa do ciclo de vida esta alga é unicelular e o núcleo, localizado na região basal da célula.

A condição unicelular e a localização do núcleo em uma parte bem definida da célula possibilitou o desenvolvimento de uma técnica simples de remoção do núcleo por simples amputação da parte basal da célula.

As células anucleadas foram capazes de sobreviver por várias semanas nestas condições e ainda apresentaram a capacidade desenvolver a morfogênese (HAMMERLING, 1932, 1934).

O segundo experimento clássico envolveu a enxertia da parte basal de uma célula em uma anucleada de uma outra célula. Este processo resultou numa combinação do citoplasma e rizóide (núcleo) de células diferentes. Tais combinações sobreviveram e desenvolveram a capacidade morfogênética com a formação do chapéu específico da espécie do rizóide. As enxertias podem ser homólogas ou heterólogas (HAMMERLING, 1932, 1935, 1943).

No terceiro experimento o rizóide foi removido e o núcleo da célula isolado (HAMMERLING, 1953, 1963a). Os núcleos isolados implantados nas células anucleadas de *Acetabularia*

resultaram no sucesso da operação, significando que o citoplasma e o núcleo sobrevivem permanecendo funcionais.

O sistema de membrana do núcleo, nessas situações, era altamente resistente, provavelmente devido a uma fina camada citoplasmática que encobria o núcleo quando da operação no procedimento do isolamento.

A partir desses três trabalhos clássicos Hämmerling antecipou uma boa parte dos conhecimentos sobre biologia molecular e postulou a existência de um gradiente intracelular de substâncias responsáveis pela morfogênese.

Sobre a capacidade morfogênética das células anucleadas, Hämmerling concluiu que deveria haver estádios intermediários entre a atividade nuclear (via informação genética do núcleo da célula) e morfogênese (via expressão da informação genética no citoplasma). Mais tarde concluiu que estes estádios intermediários eram representados por substâncias quimicamente definidas que foram chamadas de substâncias morfogênicas. A regeneração dos fragmentos anucleados estava na dependência da distribuição dessa substância morfogênica.

No citoplasma da célula foi encontrada uma distribuição gradual da substância morfogênica, com alta concentração no ápice da célula e baixa concentração na base. Schweiger (1969) demonstrou que células mantidas por um período de 10 dias no escuro apresentavam uma diminuição no conteúdo do

RNA. Estas células após o tratamento no escuro foram anucleadas e cultivadas na presença de luz. A parte anucleada apresentou um aumento no conteúdo do RNA. Pelos dados Hämmerling concluiu que durante o tratamento no escuro, precursores do RNA devem ser liberados do núcleo e acumulados no citoplasma das células. Estes precursores, quando na presença de luz, transformaram-se em RNA citoplasmático. Como este RNA apresentava as mesmas atividades que a substância morfogenética, Hämmerling (1963b) chegou à conclusão que a substância morfogenética era um tipo de RNA.

Segundo Brachet (1970) a substância morfogenética deve ser um tipo de RNA estável de longa vida. Segundo Schweiger (1977), as informações genéticas podiam permanecer no citoplasma das células de *Acetabularia* até por três meses.

Nos últimos anos, vários processos morfogenéticos estão sendo reexaminados ou estudados com maiores detalhes (BRACHET, 1987). Novas evidências foram reveladas mostrando a importância da luz azul no controle do crescimento e morfogênese segundo trabalhos iniciados por Clauss (1970), (VANDEN-DRIESSCHE & CAUBERGS, 1985).

Sobre o núcleo da alga, importantes revelações foram obtidas sobre a organização do núcleo primário gigante, seus cromossomos plumosos, núcleos secundários (PUISEUX-DAO, 1970; SPRING *et al.*, 1974; TRENDLENBURG *et al.*, 1974).

Pesquisas ecológicas que refletem interesse geral

para com o meio ambiente marinho também têm sido reveladas recentemente (BANNWARTH *et al.*, 1985; BONOTTO *et al.*, 1985; BONOTTO, 1985; PEREZ-RUZAFÁ *et al.*, 1985; SOSA, 1985).

02. MATERIAIS E MÉTODOS

02.1. Coleta e cultura de *Acetabularia calyculus*

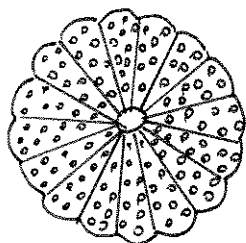
As algas foram coletadas na baía de Toyama, península de Noto, prefeitura de Ishikawa, na profundidade de quatro metros (SANO et al., 1981).

As algas foram colocadas em placas de Petri (90 x 15 mm) com meio Müller (MÜLLER, 1962) (tabela 1 e 1a) e mantidas a 22°C, 2.000 lux e fotoperíodo de 12 horas. O meio de cultura foi renovado semanalmente (esquema 1).

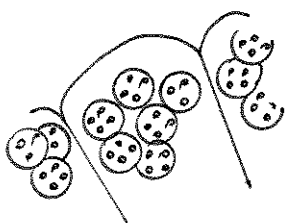
Nessas condições de cultura, 7 a 10 semanas são suficientes para a passagem de um ciclo de vida (figura 2).

As células utilizadas neste estudo foram os descendentes das várias gerações de culturas mantidas no laboratório de Biologia da Universidade de Osaka.

Esquema 1) Preparo da alga *Acetabularia calyculus* para cultura em laboratório.



Separação do chapéu contendo cistos do talo. Lavagens sucessivas com meio de cultura para retirada de microorganismos contaminantes.



Amadurecimento dos cistos.



Liberação de gametas biflagelados. Lavagens sucessivas com meio de cultura utilizando-se micropipetas.



Transferência dos gametas biflagelados para placas de Petri (90 x 15 mm).



Fusão dos isogametas (+) e (-).



Germinação do zigoto dentro de 2 a 3 dias.

Tabela 1) Meio de cultura para *Acetabularia calyculus*.

Meio Müller (MÜLLER, 1962).

Soluções	Sais	Concentração
		(g/5 l)
A	NaCl	138,80
	NaHCO ₃	1,00
	NaNO ₃	0,50
	KCl	3,65
	pH 7.8	
B	A + MgSO ₄ .7H ₂ O	32,80
		(g/100 ml)
C	CaCl ₂ .2H ₂ O	15,00
D	MgCl ₂ .6H ₂ O	48,80
E	50 ml C + 50 ml D	
F	B + E	

Tabela 1a) Soluções estoque: as soluções foram preparadas na concentração de 1.000 vezes. Para cada 5,0 litros de solução F adicionaram-se 5,0 ml de soluções estoque.

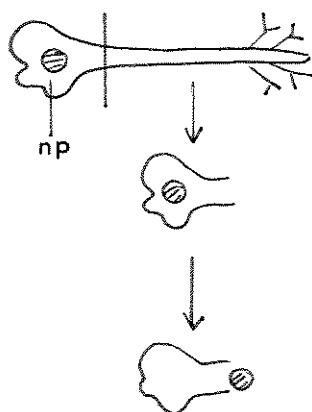
Solução estoque	Sais	Concentração (g/l)	Observações
1	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	24,920	- estocada a -20°C
2	$\text{Na}_2\text{Si} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	19,890	- aquecida a 50°C - pH 2,0
3	$\text{Fe}(3)$ citrato $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,402 6,663	- fervida durante 10 minutos. - pH 7,0
4	ZnCl $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ CuSO_4	1,908 13,326 0,642 0,201 0,010 0,001	- fervida durante 10 minutos. - pH 8,0
5	H_3BO_3	1,980	
6	NaBr $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ RbCl LiCl	19,040 3,730 0,050 0,016 0,006	- pH 8,0
7	KI	0,020	- pH 8,0
8	Vitaminas Tiamina-HCl p-aminobenzoato Ca-pantotenato biotina vitamina B_{12}	(mg/l) 300 20 10 5 4	- estocada a -20°C

As soluções 2 a 7 foram estocadas a 4°C . A solução final do meio de cultura foi esterilizada com membranas estéreis de $0,45\mu\text{m}$ (Millipore), mantida à temperatura ambiente ($22^\circ - 25^\circ\text{C}$).

02.2. Isolamento e fixação do núcleo primário de *Acetabularia calyculus*

Os núcleos primários de células vegetativas de *A. calyculus* foram isolados manualmente sob a lupa (Olympus, Tokyo), cortando-se a região do rizóide das células com a tesoura Weckel. Segurando-se a extremidade do rizóide, o núcleo primário foi puxado para fora com o auxílio de uma pinça (esquema 2).

Esquema 2)



Separação do rizóide da célula.

Obtenção da região basal com núcleo primário.

Retirada do núcleo primário com auxílio de uma pinça.

np = núcleo primário

O núcleo primário isolado foi fixado com uma gota de solução 0,5% de glutaraldeído em 0,1 M tampão fosfato (SHIHIRA-ISHIKAWA, 1984) e marcado com igual quantidade de solução de

4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). [1 ug/ml de DAPI dissolvida em água deionizada e tampão S (1 M sacarose, 1 mM EDTA, 0,6 mM espermidina, 0,005% mercaptoetanol, 10 mM Tris-HCl, pH 7,6)] por 10 a 20 minutos para uma concentração final de 1% (NISHIBAYASHI & KUROIWA, 1982).

Em seguida o núcleo primário fixado e corado foi coberto com uma laminula de vidro pressionando-se levemente.

02.3. Método de preparação de células vegetativas de *Acetabularia calyculus* para observação ultra-estrutural (MAEKAWA *et al.*, 1986).

Células vegetativas em diferentes estádios de crescimento foram fixadas e incluídas.

As amostras foram cortadas em duas partes a fim de facilitar a penetração de fixadores e resina.

O tratamento com ácido tânico visa a obtenção de um aumento geral de contraste de estruturas celulares.

A. Fixação:

- 2 h com solução 8% de glutaraldeído e 2% de ácido tânico em 100 mM tampão cacodilato pH 7,0 a 22°C.

B. Pós-fixação:

- 1 h com solução 5% tetróxido de ósmio em 100 mM tampão cacodilato pH 7,0 a 4°C.

C. Lavagens:

- com 50 mM de tampão cacodilato pH 7,0, 3 x 10 min.

D. Desidratação:

- série gradual de álcool etílico:
10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100% (1 x 10 min).
- 100%: 4 x 30 min.
- 100%: "overnight" (14 h) a 4°C.

E. Inclusão (Spurr, 1969 e Polyscience, 1973):

- série gradual com álcool etílico e resina:
10, 30, 50, 90 e 100% (1 x 1 h).
- 100% resina: 4 x 10 min.
- "overnight" (14 h) a 4°C.
- substituição da resina (2 vezes).
- resina pura: 70°C por 18 h.

02.4. Método de preparação de células vegetativas de
Acetabularia calyculus para observação ultra-
estrutural (modificado)

A. Fixação:

- 2 h com solução 8% de glutaraldeído + 2% de ácido tânico em 100 mM tampão cacodilato pH 7,0 e 2% de paraformaldeído numa proporção de 5:1 à temperatura ambiente (22° - 25°C).

B. Lavagem:

- 4 x 15 min a 4°C em 50 mM de tampão cacodilato pH 7,0.

C. Pós-fixação:

- 1 h com solução 5% tetróxido de ósmio em 100 mM tampão cacodilato pH 7,0 a 4°C.

D. Lavagem:

- 2 x 15 min a 4°C em 30% de álcool etílico.

E. Contrastação:

- "in bloco" em 5% de acetato de uranila e 99,5% álcool etílico (1:1) por 2 h a 4°C.

F. Lavagem:

- 1 x 10 min em 50% álcool etílico a 4°C.

G. Desidratação:

- 2 x 15 min em série gradual de álcool etílico 70%, 90% e 99,5% a 4°C.

H. Lavagem:

- 4 x 15 min em 100% álcool etílico à temperatura ambiente (22° - 25°C).
- 3 x 10 min em óxido de propileno à temperatura ambiente (22° - 25°C).

I. Embebição:

- "overnight" (14 ~ 16 h) em Epon 812 (GLAUERT, 1975) e óxido de propileno (1:1) sob agitação rotativa à temperatura ambiente (22° - 25°C).

J. Inclusão:

- Epon 812: - 12 h a 37°C
- (3:7) - 12 h a 45°C
- 48 h a 70°C

02.5. Incorporação da [^3H]-uridina nas células vegetativas de *Acetabularia calyculus*.

Experimentos sobre a incorporação da [^3H]-uridina foram realizados à temperatura ambiente (22° ~ 25°C) com células de 8 e 12 mm de comprimento incubadas na presença de [^3H]-uridina.

A. Pré-incubação:

- 2 h em 20 $\mu\text{g/ml}$ de rifampicina.

B. Incubação:

- 30 min e 2 h em solução 20 $\mu\text{g/ml}$ de rifampicina e 20 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^3H]-uridina (JCN).

C. Lavagem:

- 3 x 5 min em 50% de álcool etílico + 25% de ácido acético e 1 mM de uridina não radioativa.

D. Período de caça:

- "overnight" (14 ~ 16 h) e 48 h em solução 1 mM de uridina não radioativa e 20 $\mu\text{g/ml}$ de rifampicina.

E. Fixação:

- 1 h em solução 5% de glutaraldeído em 0,1 M de tampão fosfato pH 7,0.

F. Lavagens:

- 10 min em solução 50% álcool etílico e 25% ácido acético.
- 30 min em solução 50% álcool etílico e 25% ácido acético.
- 10 min em 50% álcool etílico.
- 10 min em 25% álcool etílico.
- 10 min em água deionizada.

G. Secagem:

- células estendidas sobre lâminas de vidro.

A incorporação da [3 H]-uridina foi determinada pelo Método de Liquid Scintillation Counting com emprego de Beckman Liquid Scintillation System (USA) e Microprocessador LS 7500 (USA). Para cada amostra colocou-se 4 ml de PCS (Amersham).

As contagens em dpm (desintegração por minuto) foram feitas com células inteiras e células fragmentadas em duas partes: rizóide e citoplasma.

02.6. Observação dos efeitos da Actinomicina D (AD) sobre a formação de chapéus nas células nucleadas e anucleadas de *Acetabularia calyculus*.

Vinte células vegetativas com 12 e 15 mm de comprimento respectivamente foram pré-incubadas durante 48 horas em meio de cultura contendo 10 µg/ml do antibiótico actinomicina D.

Após rápida lavagem, as células foram anucleadas e transferidas para meio de cultura normal e observadas quanto à capacidade de formação de chapéu no período de 3 semanas.

02.7. Observação dos efeitos da Citocalasina B sobre a diferenciação do chapéu nas células de *Acetabularia calyculus*.

Citocalasina B (CB) foi inicialmente dissolvida em DMSO (dimetil sulfóxido) para uma concentração final de 1%. Subsequentemente foi diluída com solução de meio de cultura para uma concentração de 50 ug/ml.

Células vegetativas apresentando início de formação de chapéu foram pré-incubadas em meios de cultura contendo 50 ug/ml de CB por 2 horas.

Após o tratamento as células foram lavadas (3 x 5 min.) e transferidas para meio de cultura normal e sendo observadas quanto à capacidade de diferenciação do chapéu.

02.8. Microscopia.

A. Microscópio de fluorescência.

Os núcleos primários marcados com DAPI e fixados em glutaraldeído foram observados com microscópio de fluorescência BH2-RFK (Olympus, Tokyo) equipado com lâmpada de vapor de mercúrio de alta pressão (HBO, 100 W) usando-se filtro de excitação de 340 nm com combinação de filtro de supressão de 420 nm.

B. Microscópio eletrônico

As observações dos cortes ultrafinos foram realizadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão Hitachi H-300 operado a 75 kV.

C. Microscópio eletrônico de alta voltagem

Observações dos ultracortes do núcleo primário foram examinados com Microscópio Eletrônico de Alta Voltagem Hitachi HV 3000 operado a 2,0 MV x 7.200 vezes (90° e 270°).

02.9. Fotografias.

A. Microscópio fluorescente

As fotografias foram tiradas com filmes Tri-X-PAN da Fuji films, asa 400 preto e branco e Ektachrome asa 400 da Kodak.

B. Microscópio eletrônico

As micrografias foram tiradas com filmes da Fuji Electron Microscopic Film FG, ortocromático.

03. RESULTADOS

A morfogênese celular em *Acetabularia* pode ser resumida nas seguintes etapas:

- a) início com zigoto, resultando em um talo cilíndrico vertical com rizóide na porção basal;
- b) polaridade bem determinada com crescimento restrito na região apical do talo;
- c) desenvolvimento com formação de verticilos laterais estéreis;
- d) formação do chapéu reprodutivo, subdividido em um número variável de raios do chapéu, cada qual funcionando como um gametângio.

O volume celular, particularmente do talo, é delimitado por uma parede celular fina e um grande vacúolo central. O citoplasma que está localizado adjacente à membrana plasmática forma meandros que estão interconectados num padrão semelhante a uma rede contendo cloroplastos, mitocôndrias e dictiossomos.

Todos os componentes necessários para o crescimento e para a morfogênese estão presentes no citoplasma.

As informações para os diferentes graus de diferenciação são transferidas do núcleo para o citoplasma. A informação morfogenética pode ser armazenada no citoplasma sob uma forma estável. O citoplasma é capaz de sintetizar proteínas específicas no momento exato da sua necessidade e nas quantidades necessitadas (figuras 1, 1a, 1b).

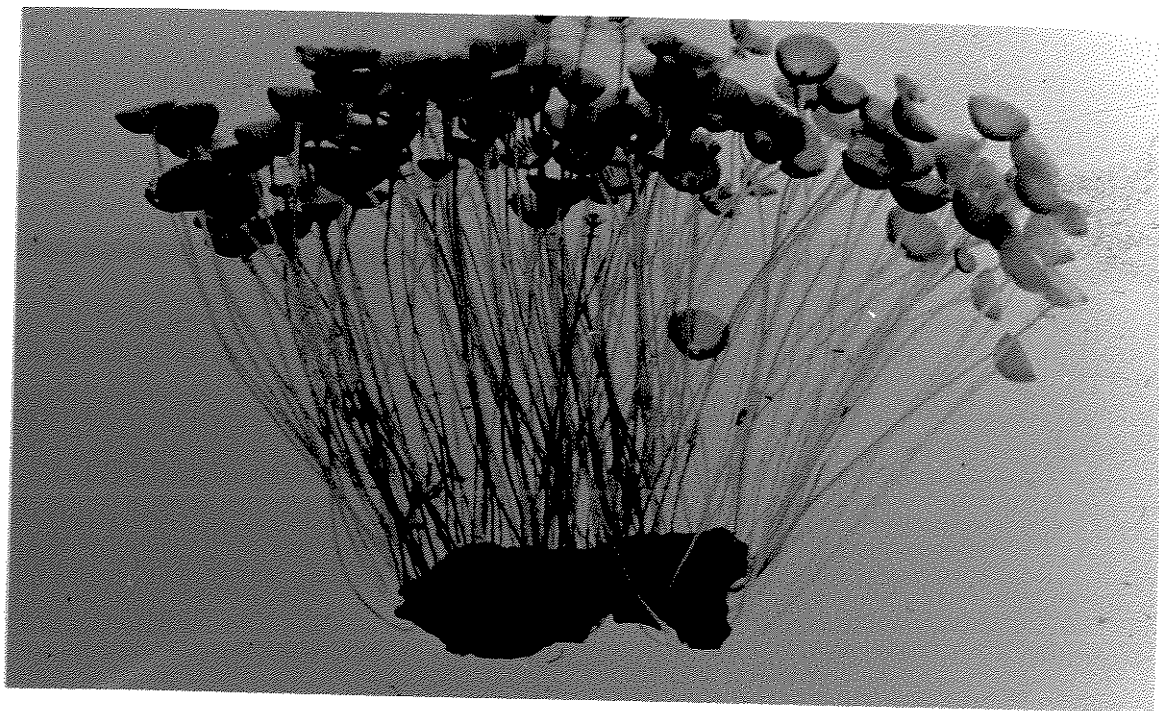


Figura 1) *Acetabularia calyculus* (Quoy et Gaimard) coletado na península de Noto, Japão. (x2).



Figura 1a) *Acetabularia calyculus* cultivada em laboratório.
(x5).

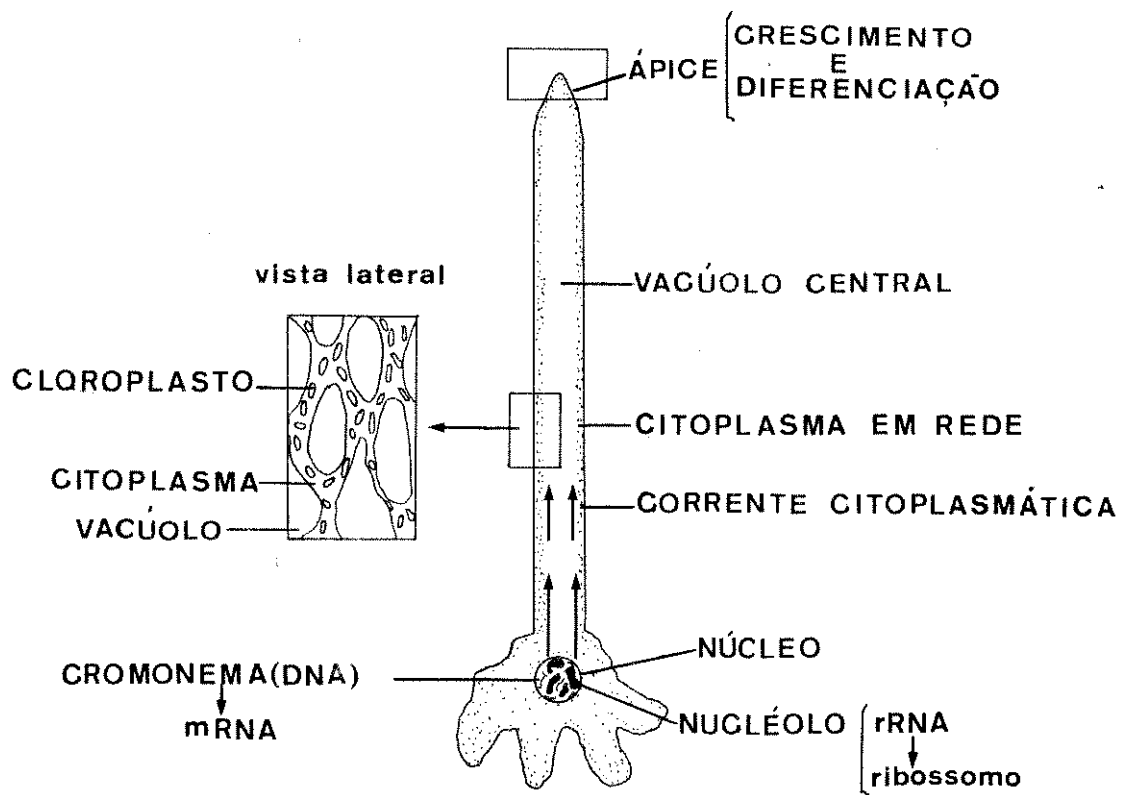


Figura 1b) Desenho esquemático da alga *Acetabularia*.

03.1. Correlações entre ciclo de vida e variações morfológicas da alga *Acetabularia calyculus* (Quoy e Gaimard) (figura 2).

- A. Liberação de isogametas de um cisto.
- B. Fusão dos isogametas (+) e (-).
- C. Transformação em zigotos imóveis.
- D. Elongação do zigoto. Em uma semana, a célula alcança um comprimento em torno de 100 μ m.
- E. Observa-se uma distinção entre a porção do talo e a região basal onde se localiza o núcleo.
- F - J. O núcleo permanece na base do rizóide, enquanto o talo cresce com a formação de verticilos estéreis, culminando com a formação do chapéu. Os verticilos estéreis vão sendo destacados do talo à medida que surgem novos verticilos.
Após a iniciação do chapéu, observa-se somente cicatrizes deixadas pelos verticilos.
- K - L. O chapéu alcança seu tamanho máximo em uma semana após a sua formação. Logo em seguida ocorre a diferenciação de cistos no interior dos raios do chapéu.
- M. Gametas são produzidos no interior dos cistos e uma semana depois são liberados através de uma abertura circular.

Crescimento Celular e Diferenciação

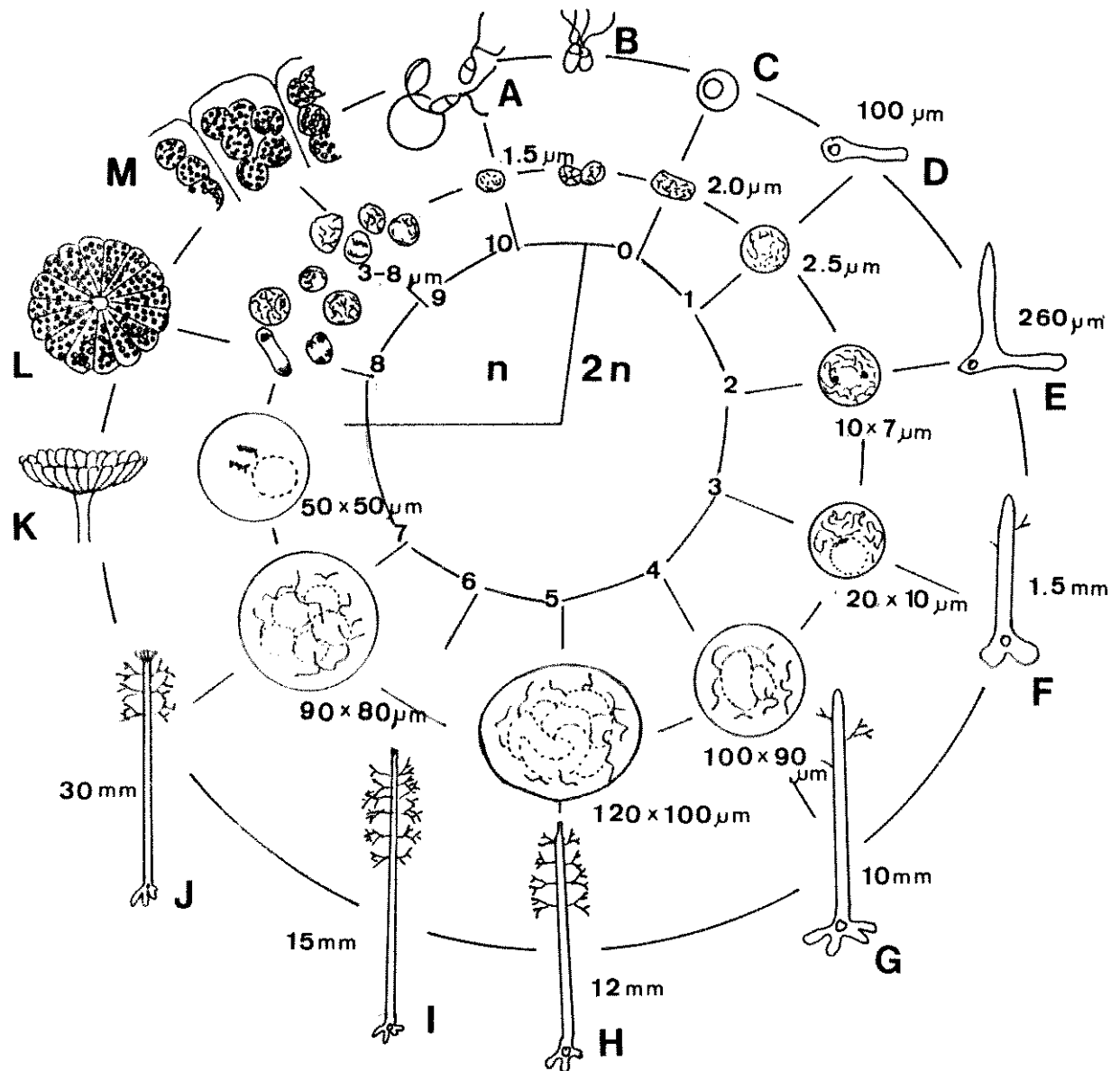


Figura 2) Representação esquemática do ciclo de vida da *Acetabularia calyculus*, apresentando a correlação entre tempo de cultura e variações morfológicas da célula (círculo externo) e do núcleo (círculo do meio). Números do círculo interno indicam o número de semanas após a formação do zigoto. Números do círculo do meio indicam o tamanho do núcleo em μm .

03.2. Correlação entre comprimento de células anucleadas e a capacidade de formação do chapéu

Células vegetativas de comprimentos variáveis de 5 a 10 mm quando anucleadas, não apresentaram iniciação e formação de chapéus. Estas células conseguiram sobreviver e desenvolver crescimento durante 4 semanas, morrendo após este período. A morte das partes anucleadas foi acompanhada com a contração do protoplasto e degeneração dos cloroplastos.

Todas as células apresentaram ápices arredondados que são formações típicas que indicavam parada do crescimento.

Células com mais de 10 mm de comprimento quando anucleadas apresentaram crescimento e diferenciação celular com a formação de chapéus durante o período de 4 semanas após a anucleação. Estas células, mesmo anucleadas, apresentaram todas as potencialidades de uma célula nucleada com crescimento do talo associado à formação de verticilos estéreis que são produzidos em intervalos curtos ao longo do eixo do talo e terminando com a diferenciação de um chapéu no ápice do talo (figuras 3, 3a; tabela 2).

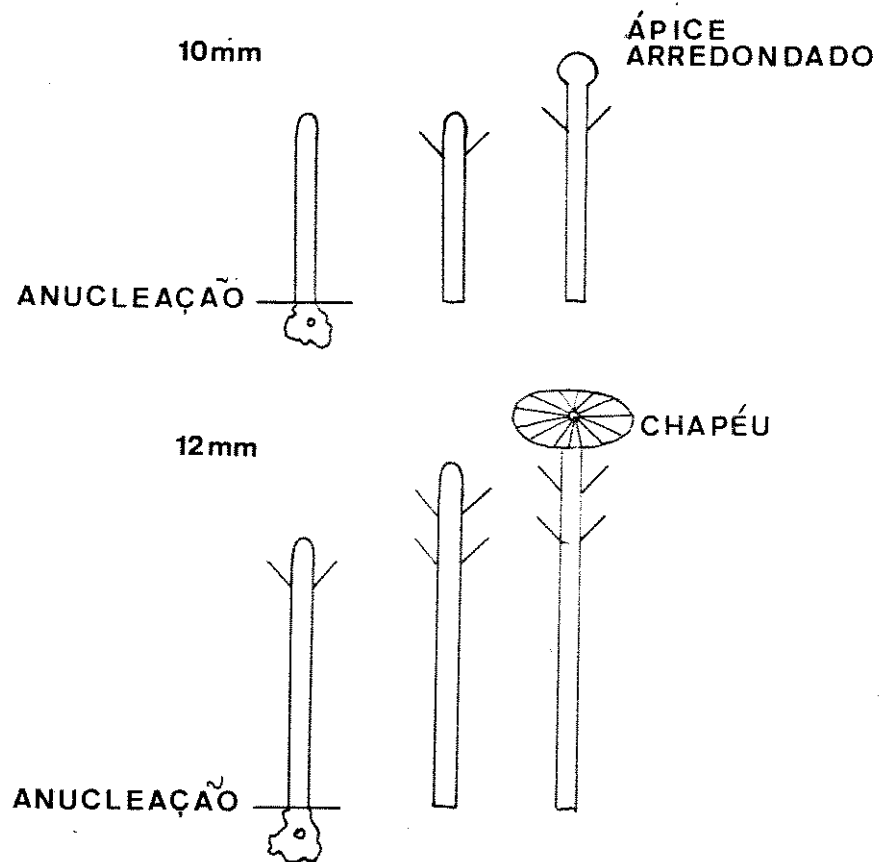


Figura 3) Correlação entre comprimento de células anucleadas e a capacidade de formação de chapéu.

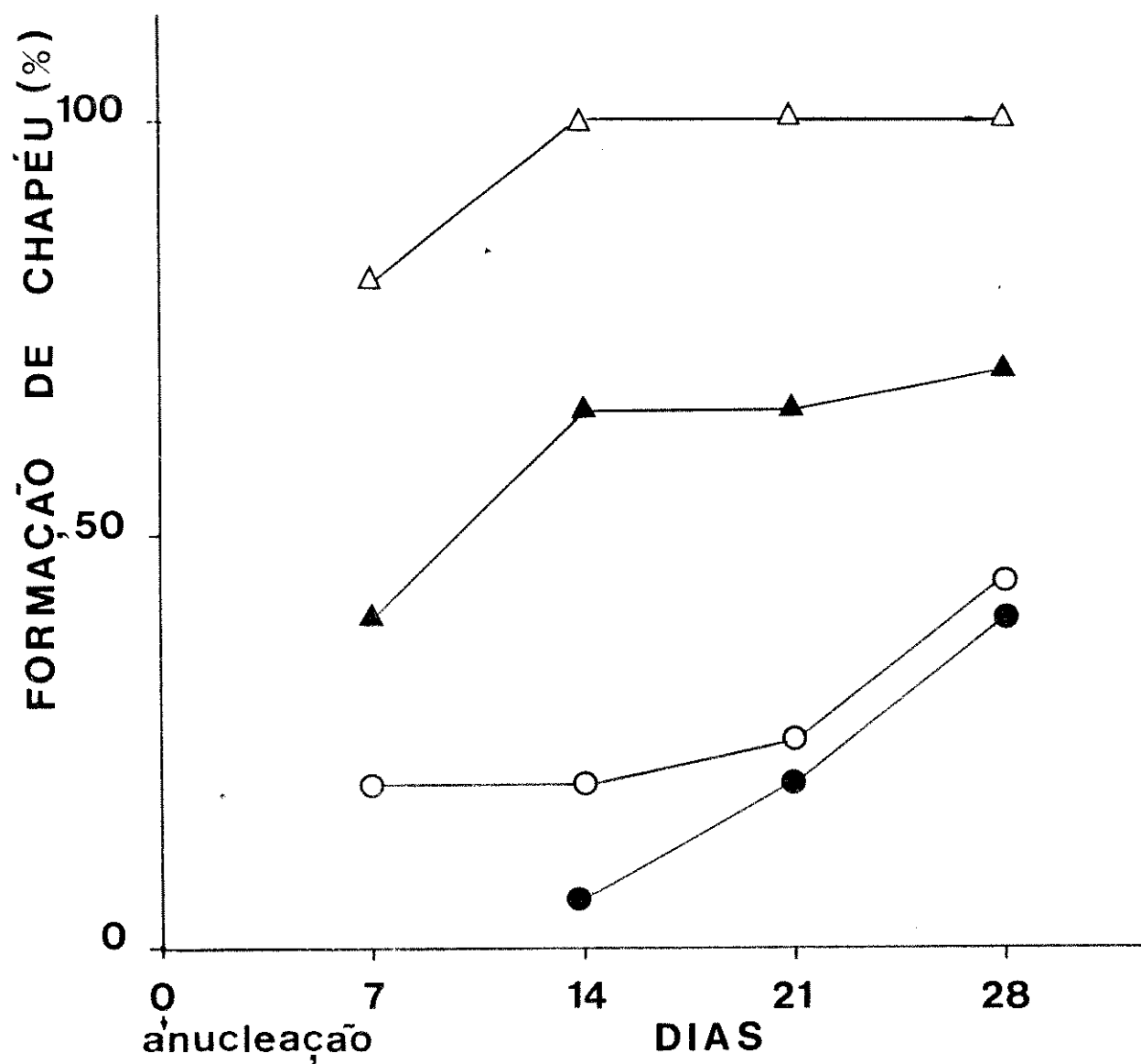


Figura 3a) Porcentagem de formação de chapéus em células anucleadas de diferentes estádios de crescimento. Total de 20 células de uma cultura sincronizada.

●—● 12 mm; ○—○ 13 mm; ▲—▲ 14 mm; △—△ 15 mm.

Tabela 2) Porcentagem de formação de chapéus em células anucleadas de diferentes estádios de crescimento de uma cultura sincronizada observada durante um intervalo de 4 semanas.

Comprimento de célula anucleada (mm)	Tempo de observação (dias)			
	7	14	21	28
11	0	0	0	0
12	0	5	20	40
13	20(*)	20	25	45
14	40	65	65	70
15	80	100	100	100

(*) Formação de chapéu (%).

03.3. Variações morfológicas do núcleo durante o ciclo de vida da *Acetabularia calyculus* (Quoy et Gaimard) observadas com microscopia de fluorescência

a) Desenvolvimento dos nucléolos

No estágio de 3-4 semanas de desenvolvimento quando as células atingem comprimentos de 5-10 mm, o nucléolo começa a ser visível, com matriz acumulada numa zona clara, sugerindo que as fibras de DNA ribossômico estão mais soltas em vez de empacotadas e espalhadas na matriz (SHIHARA-ISHIKAWA & KUROIWA, 1984).

Esta região da matriz contendo DNA ribossômico vai acumulando e desenvolvendo pequenas esferas com o aumento do volume nuclear (figura 4).

No estágio de 12 mm de comprimento, o volume nuclear chega a aumentar até em torno de 10^3 vezes. Nesse estágio, os nucléolos, matriz contendo DNA ribossômico em desenvolvimento, assumem estruturas semelhantes a "salsichas" (sausage-like-shapes) (SPRING et al., 1974) ocupando cerca de 80% do núcleo (figuras 5, 5a).

O núcleo primário gigante com 100 a 120 μ m de diâmetro (figura 6) permanece por cerca de 2 semanas até a formação do chapéu.

A partir da 6ª semana, quando há início da formação

do chapéu, os nucléolos imediatamente iniciam o processo de degeneração, decompondo-se em várias unidades esféricas. Ao mesmo tempo ocorre o início da meiose.

Durante a meiose, as unidades nucleolares esféricas fundem-se entre si, tornando-se uma única esfera vacuolada, que mais tarde degenera e finalmente desaparece com o rompimento do envelope nucleolar primário (figura 7).

b) Nucléolos observados ao microscópio eletrônico de transmissão (figura 8)

Cada componente nucleolar é caracterizado por uma região central (A) relativamente mais clara correspondendo a DNA ribossômico. Às vezes aparece subdividida em sistemas de cavidades (vacuolização). Este aspecto é observado especialmente após o isolamento do nucléolo em subunidades. Esta região central (A) é envolta por materiais mais densos granulofibrilares (B).

A região B por sua vez encontra-se circundada por materiais empacotados densamente que são constituídos de grânulos maiores com cerca de 50 nm (SPRING *et al.*, 1974; TIKHOMIROVA *et al.*, 1979) que correspondem a subunidades de RNA ribossômico.

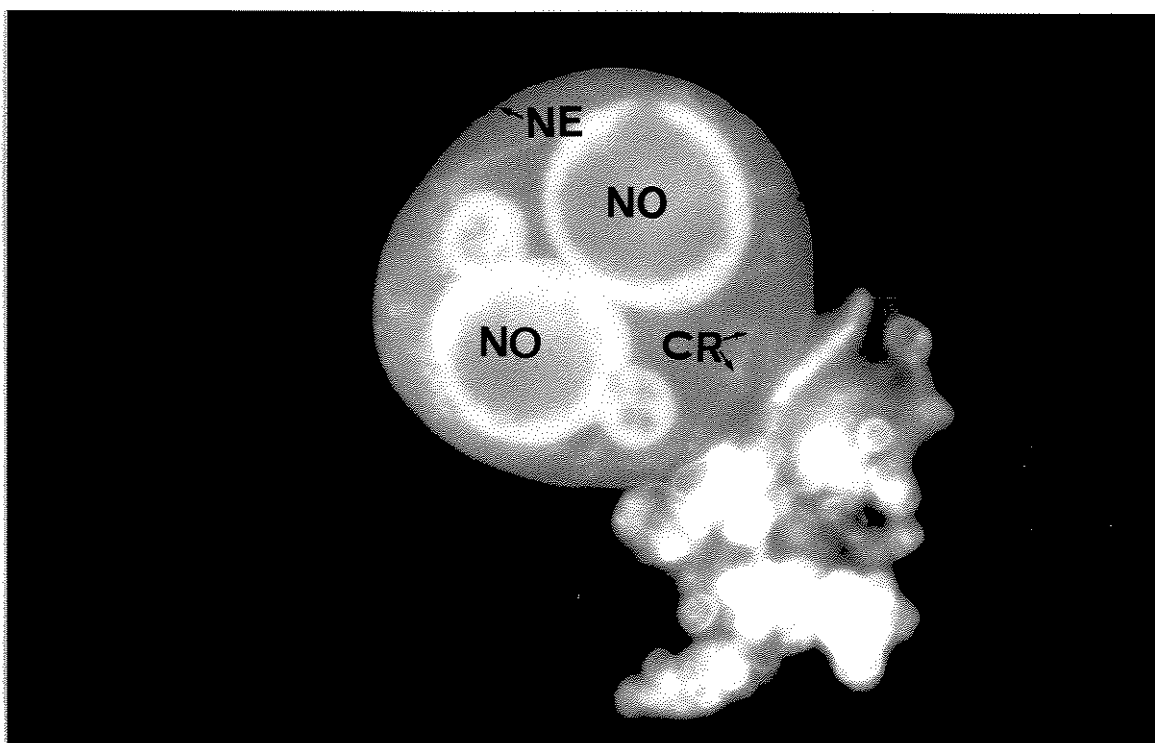


Figura 4) Núcleo de célula jovem com início de formação de nucléolos. Marcados com DAPI. (x1000).

NO = nucléolos
NE = envelope nuclear
CR = cromatina

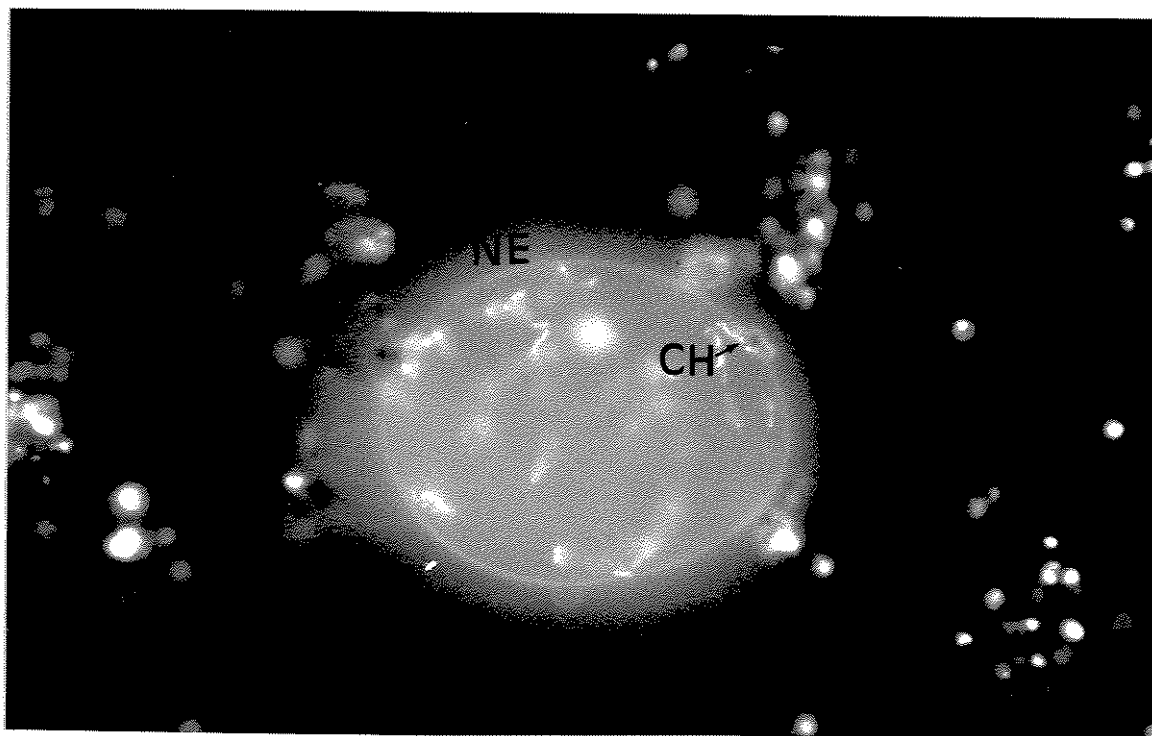


Figura 5) Núcleo primário de célula com 12 mm de comprimento.

Marcados com DAPI. (x200).

NE = envelope nuclear

CH = cromossomos

C = cloroplastos (pontos brancos correspondem ao DNA do cloroplasto)

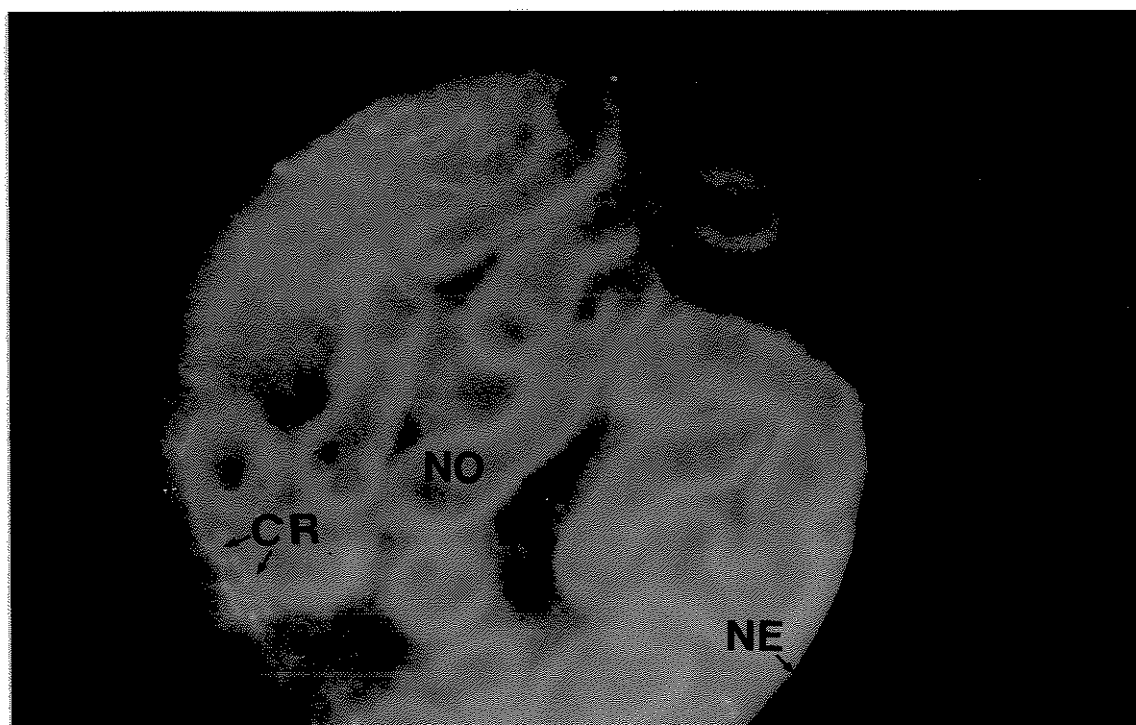


Figura 5a) Núcleo primário gigante com nucléolos em "sausage-like shape". Marcados com DAPI. (x400).

NE = envelope nuclear
NO = nucléolos
CR = cromatina ou cromonema
C = cloroplastos



Figura 6) Núcleo primário gigante observado nas células com 12 mm de comprimento. Observação dos cromossomos mais soltos, apresentando estruturas semelhantes a "lampbrush" cromossomos. Marcados com DAPI. (x400).

NE = envelope nuclear
NO = nucléolo
CH = cromossomos

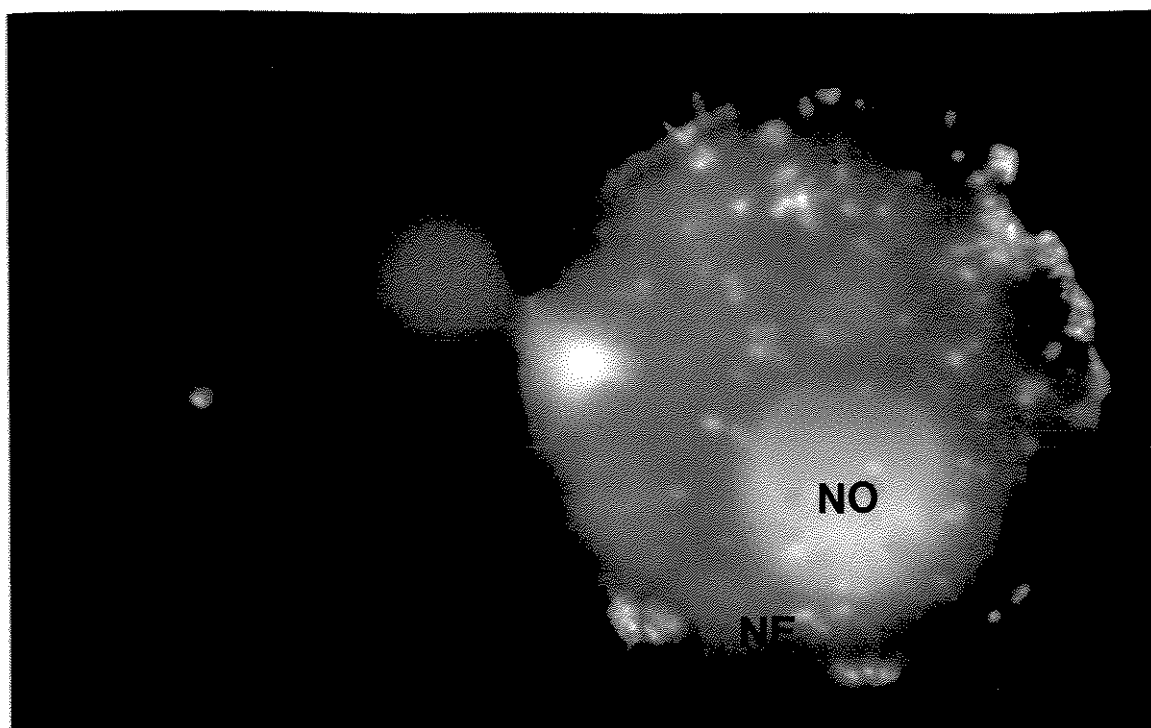


Figura 7) Núcleo da célula apresentado nucléolos em fase de degeneração. Observa-se somente um nucléolo vacuolado. Marcados com DAPI. (x400).

NE = envelope nuclear
NO = nucléolos.

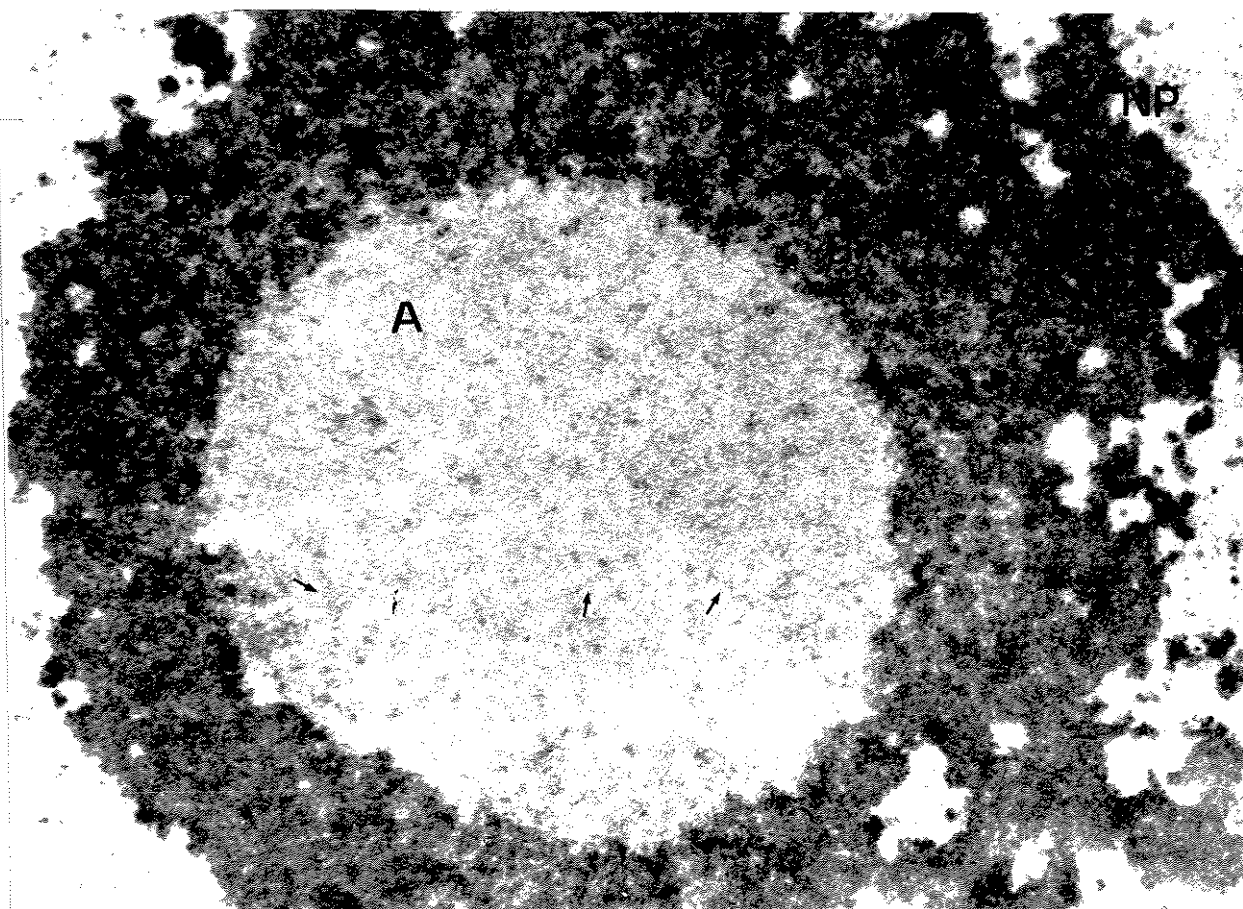


Figura 8) Secção ultrafina do núcleo mostrando as zonas do nucléolo. (x12000). Espessura do corte = 60 ~ 70 nm.

A = filamentos de rDNA (transcrição) --> (zona fibrilar). Setas = filamentos de rDNA.
B = complexo rRNA-proteína --> (zona granulosa).
NP = núcleoplasma

c) Comportamento dos cromossomos

No núcleo de 1 semana de desenvolvimento surge uma zona central livre de cromatina e esta encontra-se localizada na área mais externa, na periferia do núcleo (SHIHIRA-ISHIKAWA, 1984).

Com o crescimento do núcleo, os filamentos de cromossomos tornam-se mais visíveis.

Quando as células atingem comprimentos de 12 mm, os filamentos de cromossomos tornam-se distribuídos ao redor dos nucléolos, tornando-se de difícil observação, uma vez que neste estágio o volume nuclear é ocupado por quase 80% de nucléolos (figura 9).

Nesta fase de crescimento, os filamentos cromossômicos parecem ser mais soltos e livres e com ramificações laterais assemelhando-se aos cromossomos plumosos observados nos oócitos de certos anfíbios (MÜLLER, 1974). Muitos dos filamentos foram localizados próximos ao envelope nuclear (figuras 10, 11 e 12).

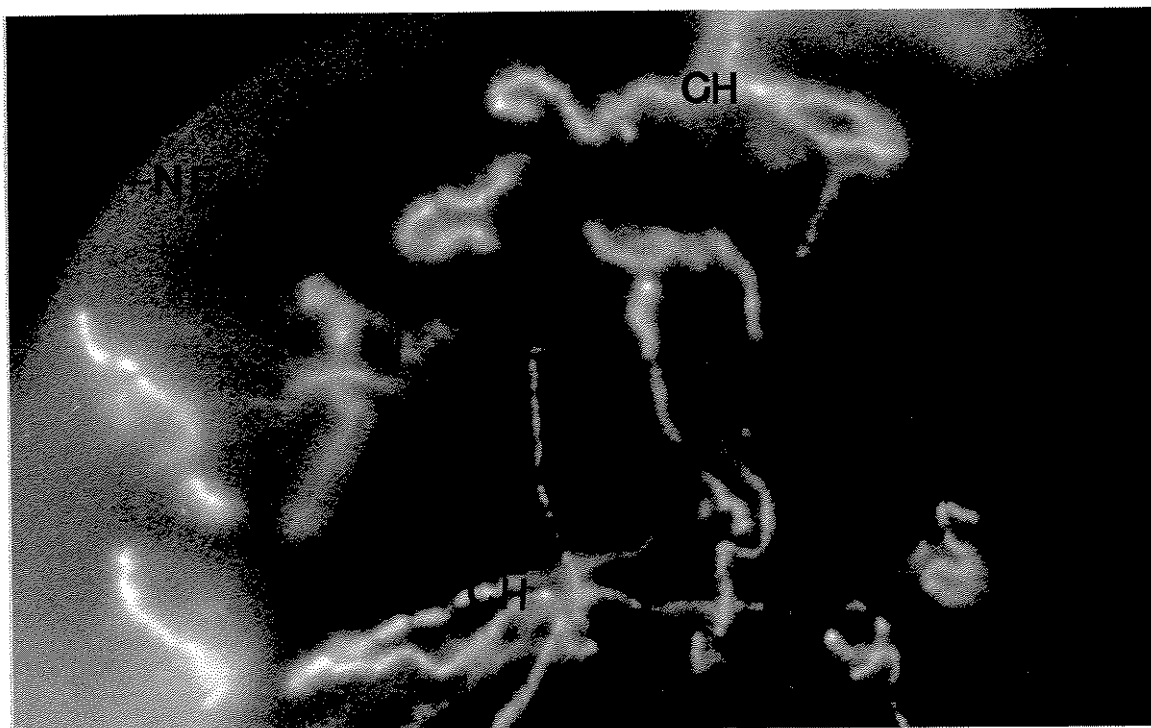


Figura 9) Cromossomos do núcleo primário gigante. Filamentos de cromossomos apresentam-se mais soltos parecendo "serrilhados". Marcados com DAPI. (x1000).

NE = envelope nuclear
CH = cromossomos

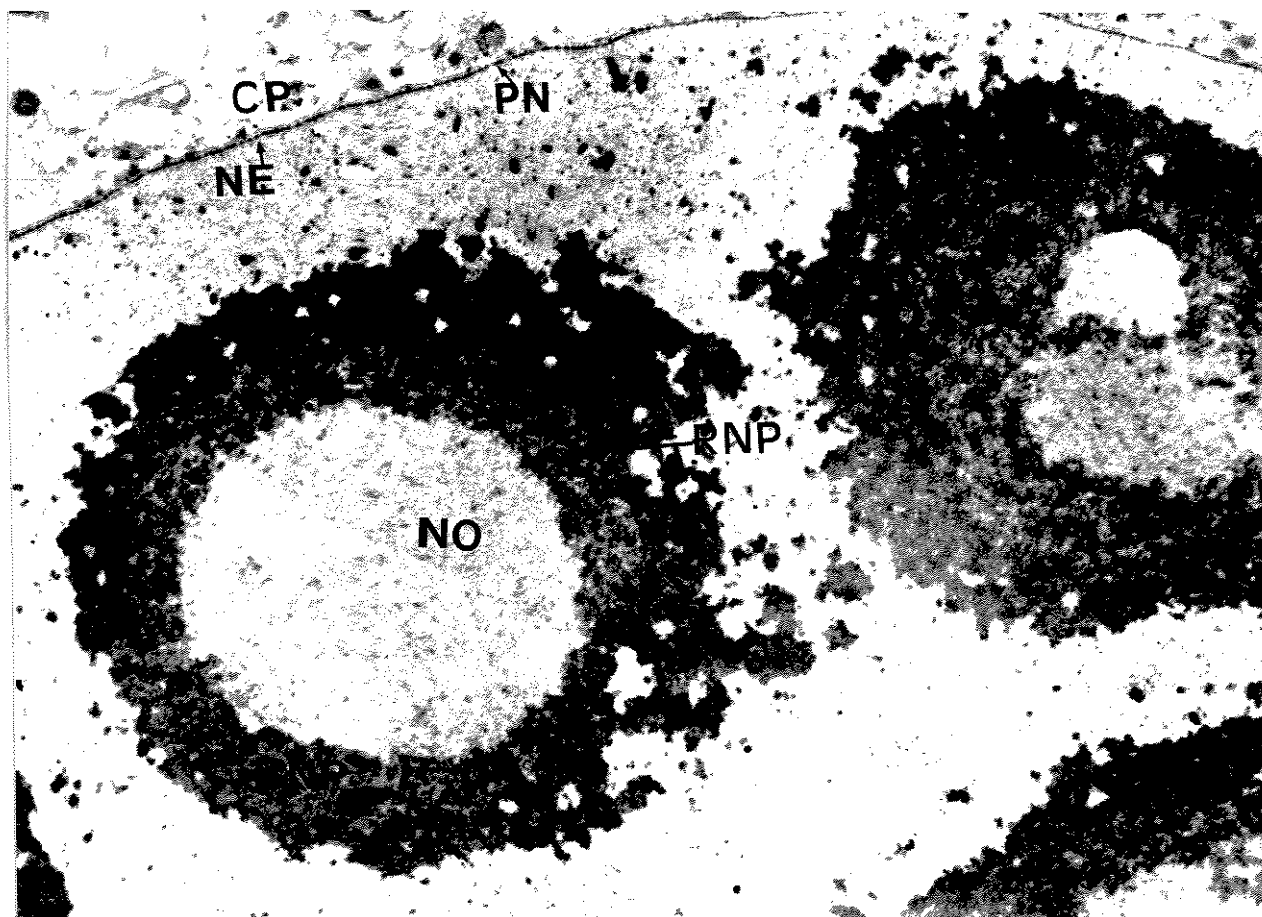


Figura 10) Secção ultrafina do núcleo. Os complexos rRNA-proteínas (RNP) são deslocados para o citoplasma através do poro nuclear. A estrutura do complexo poro nuclear revela uma organização conhecida das células eucarióticas. O envelope nuclear apresenta-se circundado por uma camada contínua de citoplasma. (x7600).

RNP = complexo RNA-proteína
 NE = envelope nuclear
 PN = poro nuclear
 NO = nucléolo
 CP = citoplasma

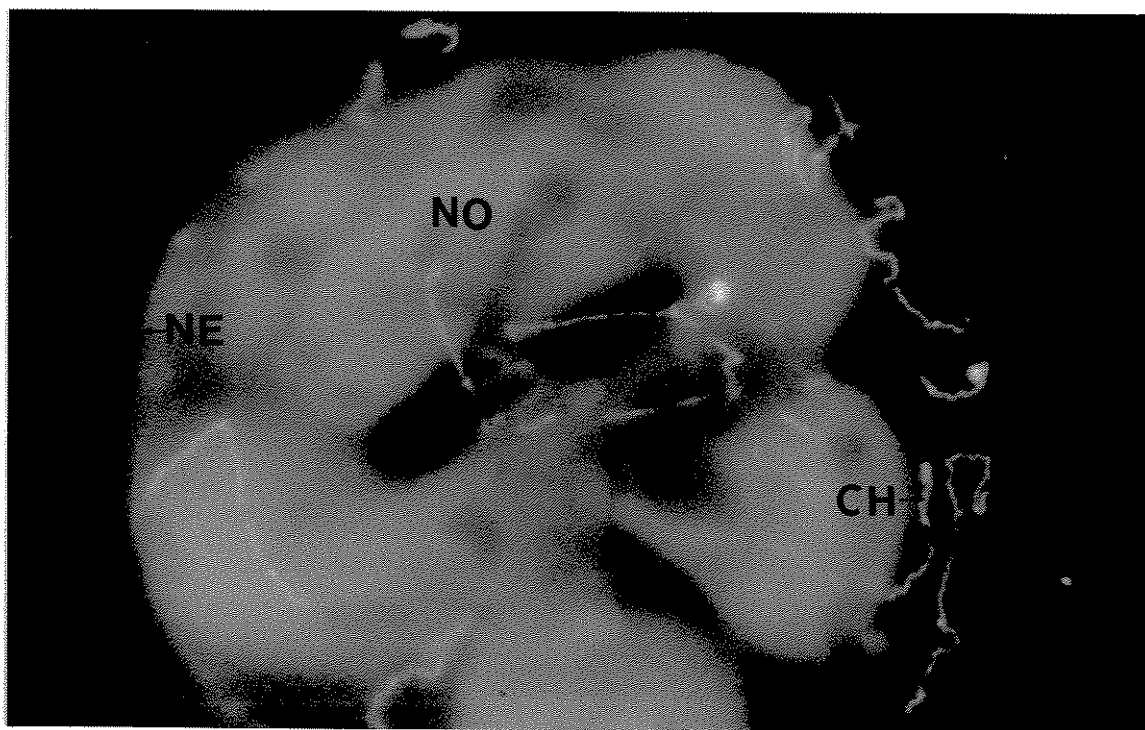


Figura 11) Núcleo primário no estágio máximo de desenvolvimento. Muitos dos filamentos cromossômicos estão localizados próximo ao envelope nuclear. Marcados com DAPI. (x1000).

CH = cromossomos
NE = envelope nuclear
NO = nucléolos

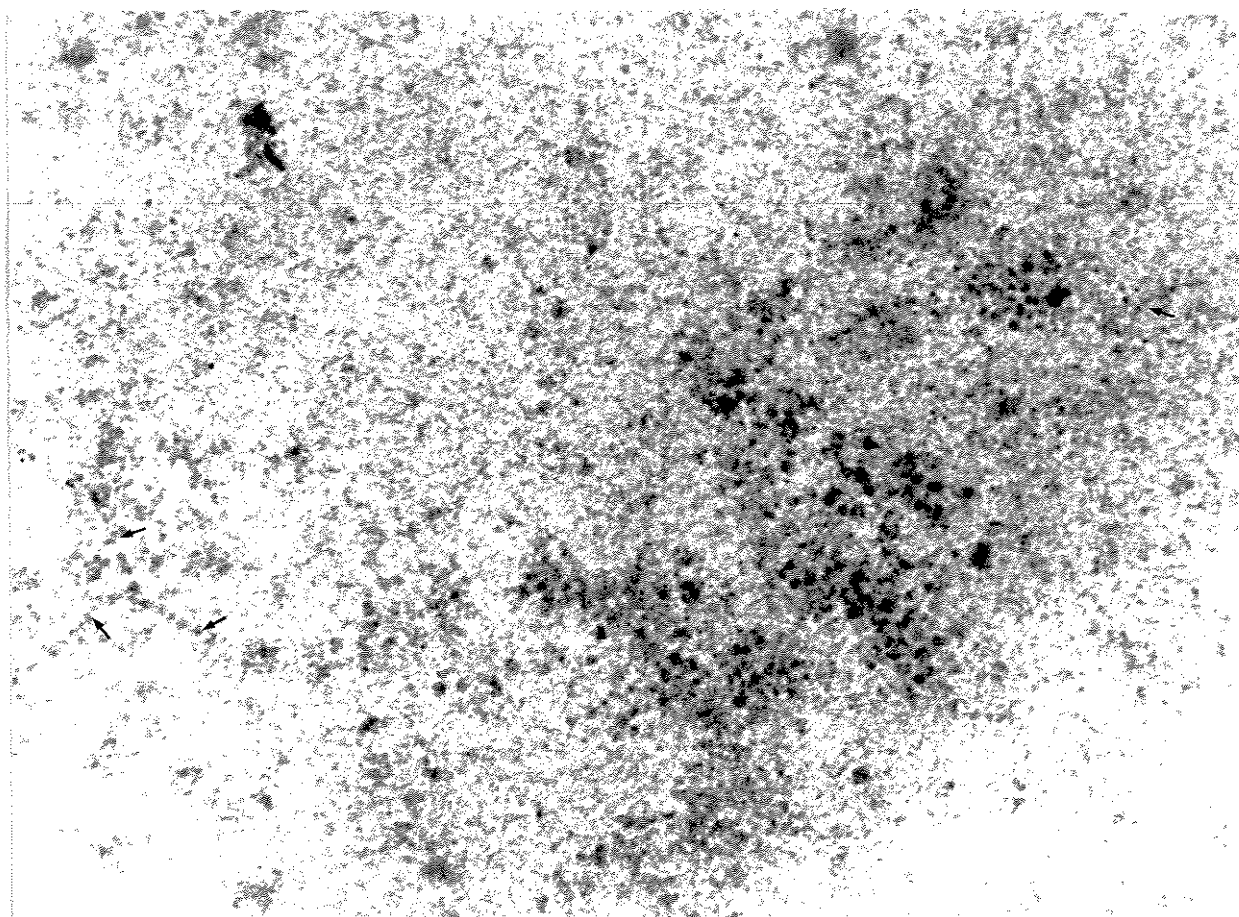
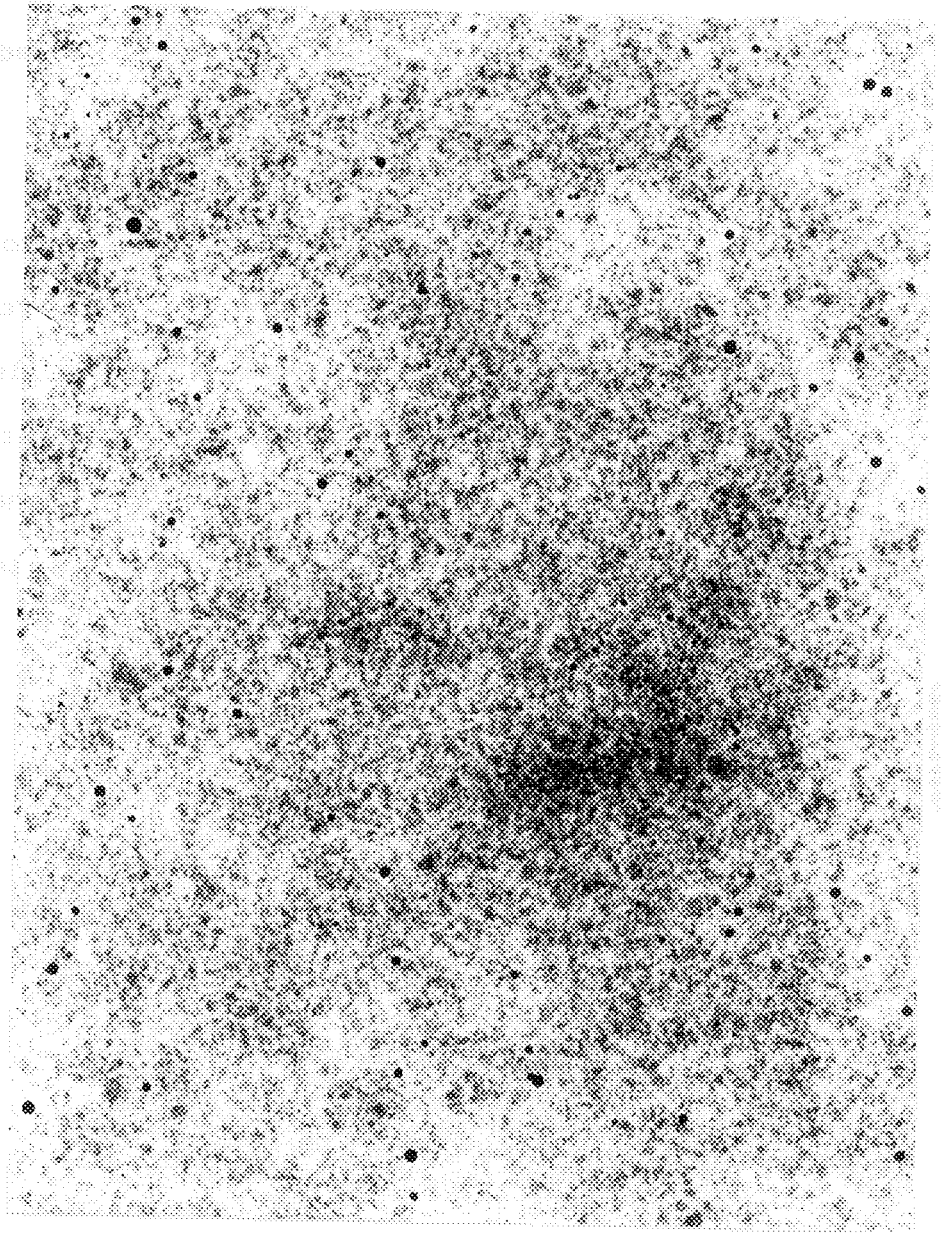


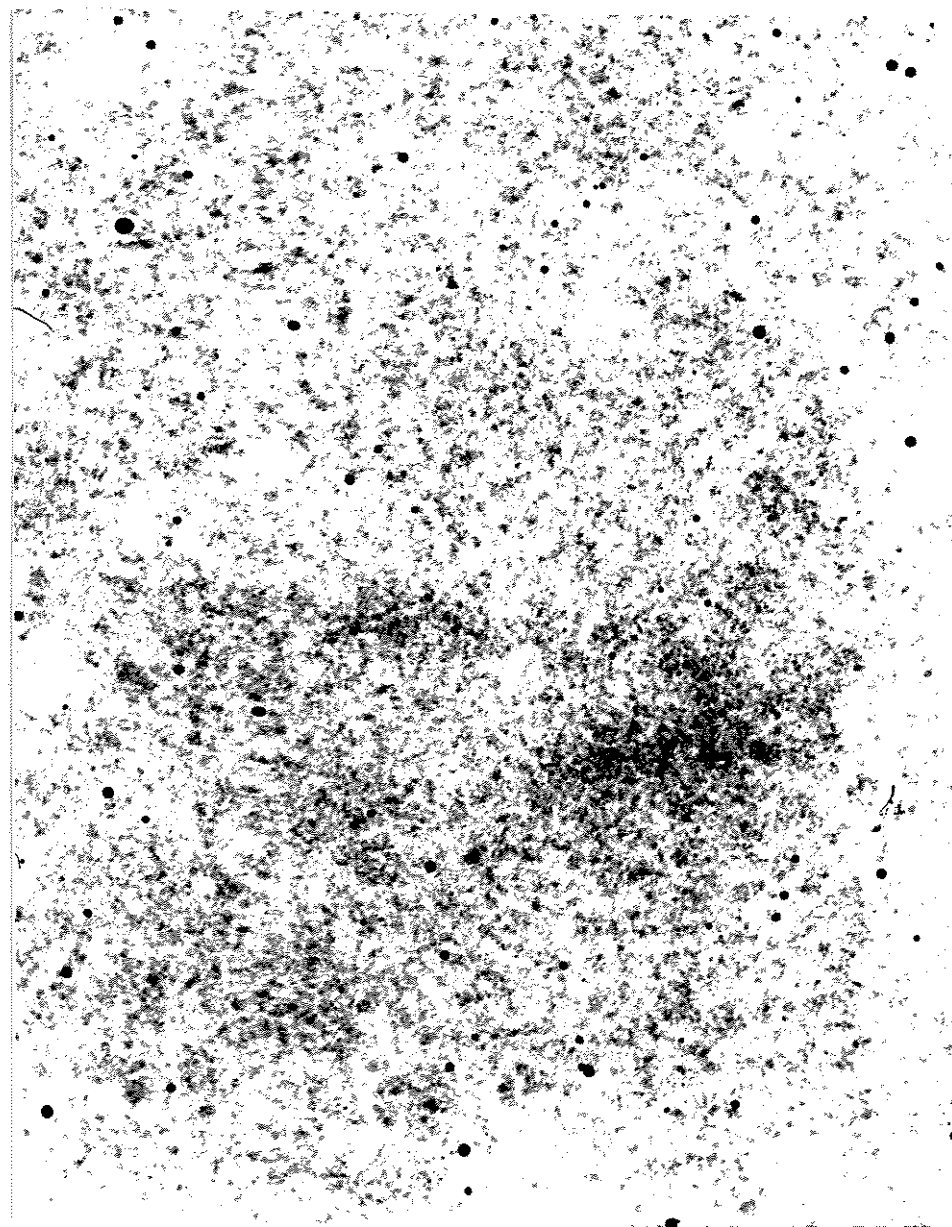
Figura 12) Secção ultrafina do núcleo gigante de células com 12 mm de comprimento. Observação de cromossomos com estruturas semelhantes a cromossomos plumosos (setas) ("lampbrush-like chromosomes"). (x30000).

03.4. Filamentos cromossômicos observados ao microscópio eletrônico de alta voltagem

O núcleo observado com emprego de microscópio eletrônico de alta voltagem apresentou cromossomos com uma organização semelhante aos cromossomos plumosos (lampbrush chromosomes) conhecidos nos estádios meióticos de certas células animais, embora sejam de tamanhos menores (comprimento) e apresentando diferenças nos graus de dispersão lateral das alças (figura 13).



a



b

Figura 13) Secção fina do núcleo primário gigante de *Acetabularia* observada com microscopia eletrônica de alta voltagem. a e b = par estéreo (90° e 270°). (x17500).

Espessura do corte = 1 μ m.

03.5. Efeito do antibiótico Actinomicina D (AD) sobre a formação de chapéus em células nucleadas e anucleadas de *Acetabularia calyculus*

As concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$ de actinomicina D no meio de cultura ocasionaram a morte das células durante o período de contato (48 horas).

Células com 12 e 15 mm de comprimento submetidas ao tratamento com 10 $\mu\text{g/ml}$ de actinomicina D e depois anucleadas, apresentaram a capacidade de formação de chapéus dentro de um período de 3 semanas. Foi observada que a capacidade de formação dos chapéus está relacionada com a idade celular ou seja o tamanho das células (figuras 14, 15; tabelas 3, 3a).

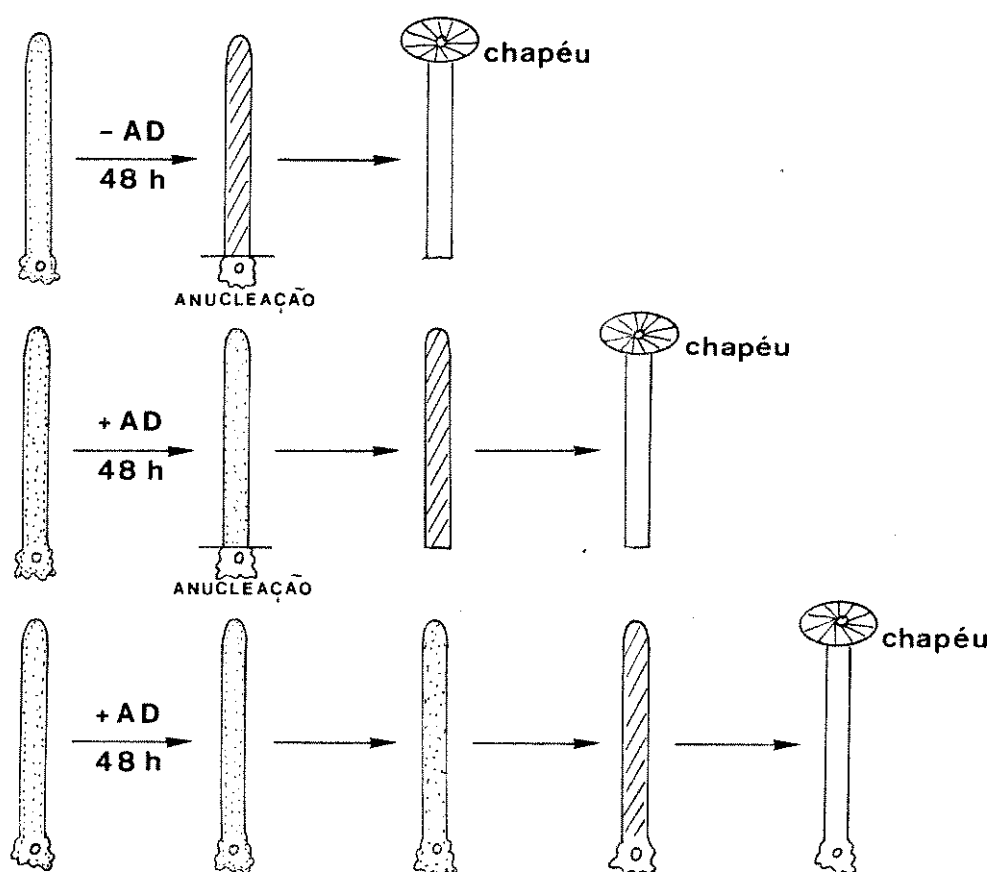


Figura 14) Efeitos do antibiótico Actinomicina D sobre a diferenciação do chapéu. AD - Actinomicina D.

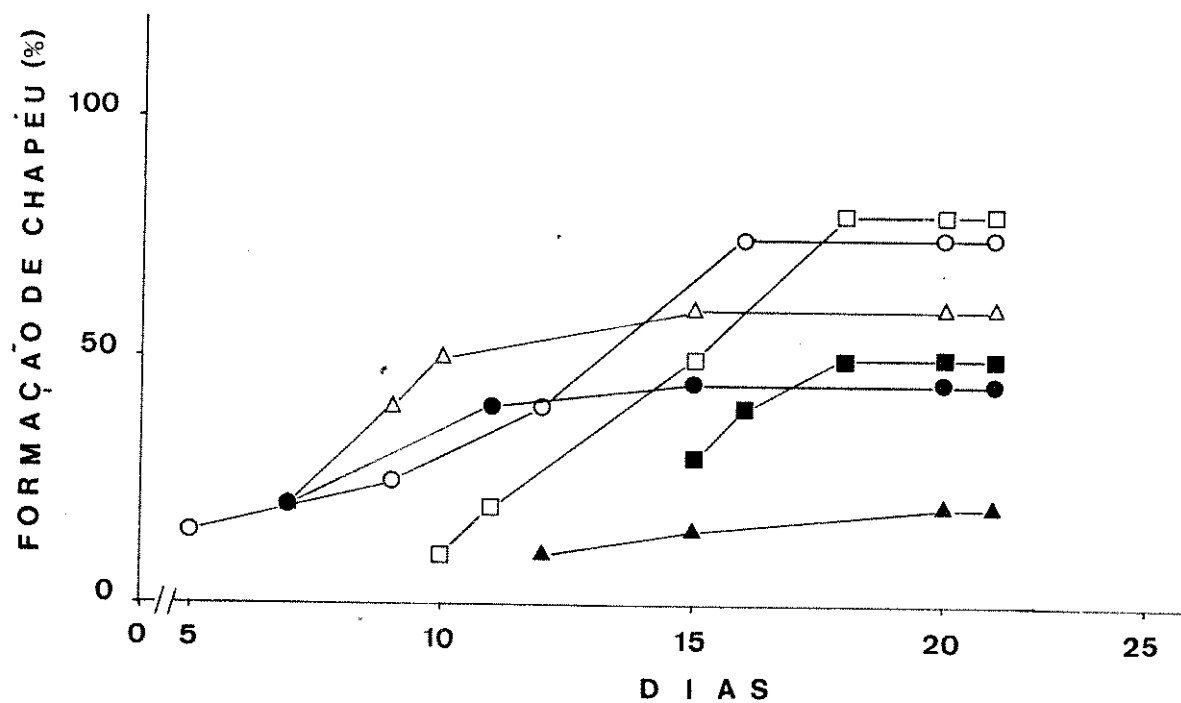


Figura 15) Porcentagem de formação de chapéus em células nucleadas e anucleadas após 48 horas de tratamento com Actinomicina D.

AD - actinomicina D

- ▲—▲ 12 mm +AD (48h); anucleada
- 12 mm -AD (48h); anucleada (controle)
- 12 mm +AD (48h); nucleada
- △—△ 15 mm +AD (48h); anucleada
- 15 mm -AD (48h); anucleada (controle)
- 15 mm +AD (48h); nucleada.

Tabela 3) Formação de chapéus nas células nucleadas e anucleadas de 12 mm de comprimento após tratamento com actinomicina D.

		Tempo de observação (dias)																
		5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
12 mm	-AD anucleado (controle)			4 (*)				8				9					9	
	+AD (48h) anucleado								2			3					4	
	+AD (48h) nucleado											6	8			10	10	
15 mm	-AD anucleado (controle)	3				5			8				15				15	
	+AD (48h) anucleado			4		8	10					12					12	
	+AD (48h) nucleado						2	4				10			16		16	

(*) nº de chapéus/20 células.

Tabela 3a) Porcentagem de formação de chapéus após 3 semanas de observação.

Comprimento da célula	- AD anucleada (controle)	+ AD anucleada	+ AD nucleada
12 mm	45	20	50
15 mm	75	60	80

03.6. Efeito do inibidor Citocalasina B (CB) sobre a diferenciação do chapéu.

O desenvolvimento do chapéu reprodutivo inicia-se com um entumescimento da região apical da célula passando-se por vários estádios até completar a morfogênese. Logo abaixo do entumescimento surge um anel com um número (específico da espécie) de protuberâncias e em seguida abaixo deste anel, surge uma outra fileira de protuberâncias. Após a formação dessas duas fileiras, na região mediana ocorre uma terceira formação de protuberâncias que serão diferenciadas em raios do chapéu (SHIHIRA-ISHIKAWA, 1987) (figuras 16, 17, 18, 19, 20).

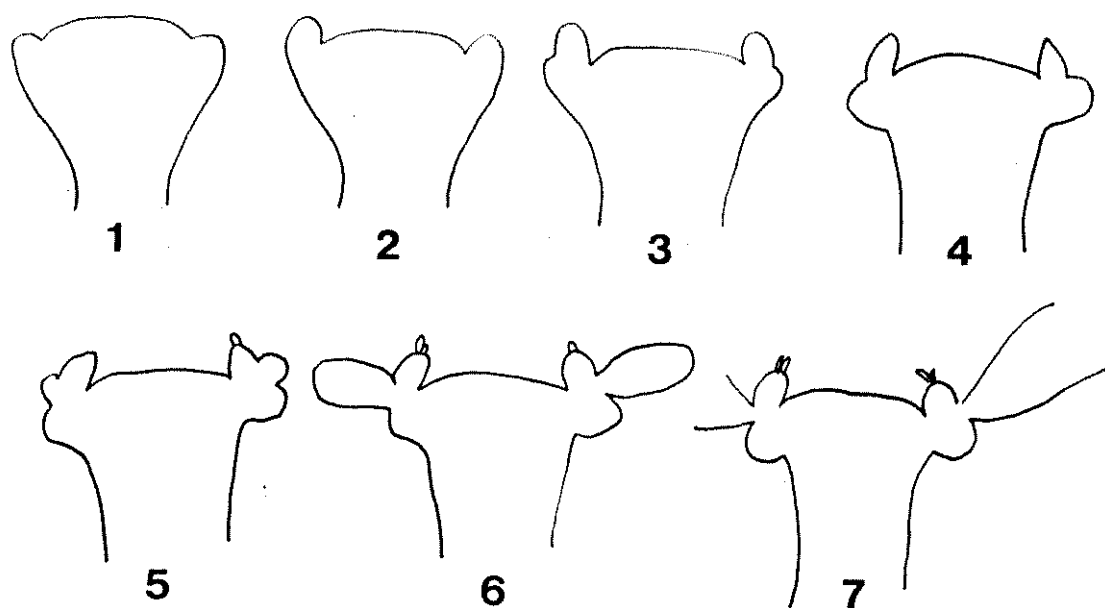


Figura 16) Representação esquemática da iniciação e formação do chapéu. O período que corresponde ao entumescimento apical até a diferenciação do chapéu está em torno de 1 semana.



Figura 17) Diferenciação do chapéu.

Formação do anel superior (corona superior) e inferior (corona inferior) (setas). x100



Figura 18) Diferenciação do chapéu.

Após a formação da coroa superior e inferior (setas) surge na região mediana a 3ª protuberância que corresponde aos raios do chapéu (*). x 100



Figura 19) Corte longitudinal da região apical com início da diferenciação do chapéu. (x200).

Microscopia óptica - espessura do corte = 60 ~ 70nm.

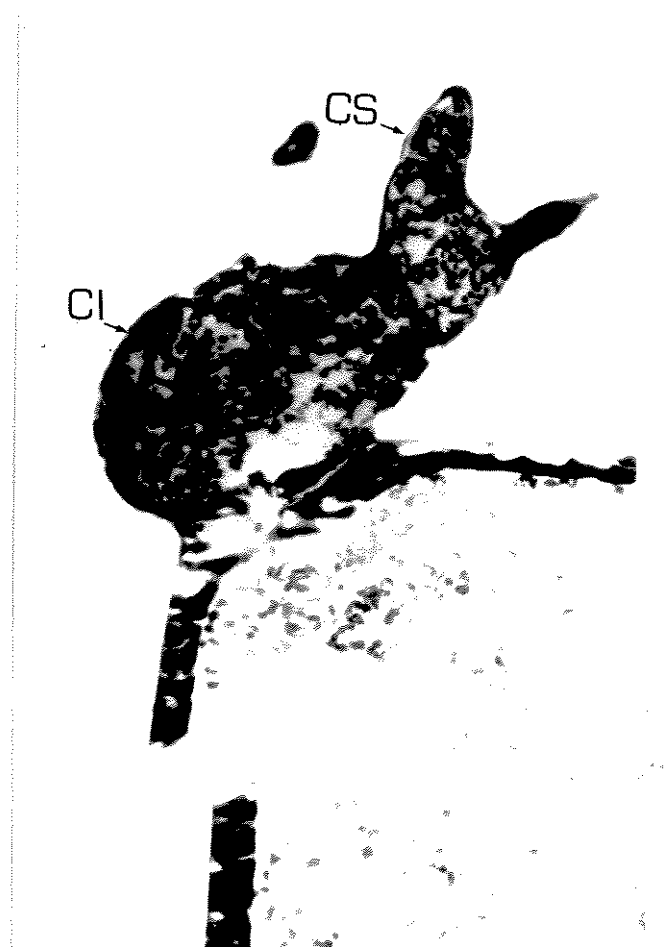


Figura 20) Corte longitudinal da região apical com início da diferenciação do chapéu. Detalhe da formação da coroa superior (CS) e inferior (CI). (x400).

Microscopia óptica - espessura do corte = 60 ~ 70nm.

A observação dos efeitos da CB (50 $\mu\text{g/ml}$) foi realizada utilizando-se células nos estádios 3, 4 e 5 da figura 16.

Após 30 minutos de contato com CB, observamos mudanças nítidas no comportamento celular com início de retração do citoplasma. Com 60 minutos de contato ocorreu a parada dos movimentos citoplasmáticos e no final de 120 minutos, além da parada dos movimentos citoplasmáticos foi observada a ocorrência de fragmentação do citoplasma análogo a uma célula plasmolisada.

Decorrido o período de tratamento com CB, após lavagens e transferência das células para meio normal de cultura, as células iniciaram lentamente o processo de recuperação com retorno dos movimentos citoplasmáticos e depois de 3 a 4 horas observou-se uma distribuição uniforme do citoplasma ao longo da célula.

Esses resultados demonstrando o efeito regressivo da CB também foram observados com células de Characeae (NAGAI, 1977), com células de *Acetabularia mediterranea* (*acetabulum* (L) Silva) (PUISEUX-DAO, 1970; KOPP & KIERMAYER, 1980a, b) e com *Acetabularia ryukyuensis* (NAGAI & FUKUI, 1981).

Nos experimentos utilizando-se células com início de formação de chapéus, o efeito da CB interrompeu a diferenciação completa do chapéu. Isto é, uma vez interrompida a diferenciação do chapéu o efeito não foi reversível,

observando-se que após 72 horas de cultura no meio Müller (1962), as células iniciaram o processo de elongação da região apical da célula, processo análogo ao crescimento celular após a germinação do zigoto (figura 21). As células controle apresentaram a diferenciação completa do chapéu após 48 horas de cultura (figura 22).

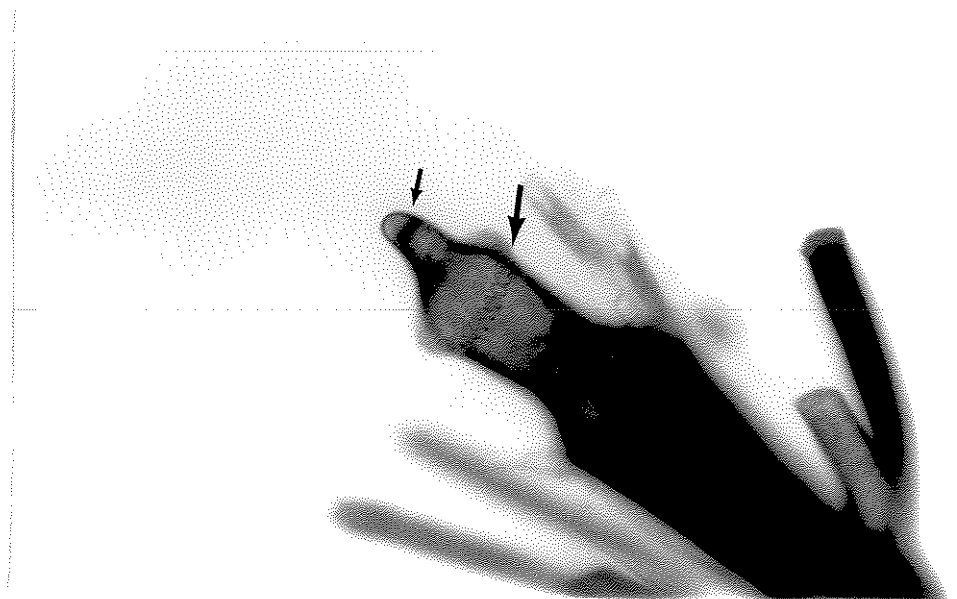


Figura 21) Diferenciação incompleta do chapéu após pré-tratamento com CB (seta >). Célula com novo alongamento apical (seta <) (x100).

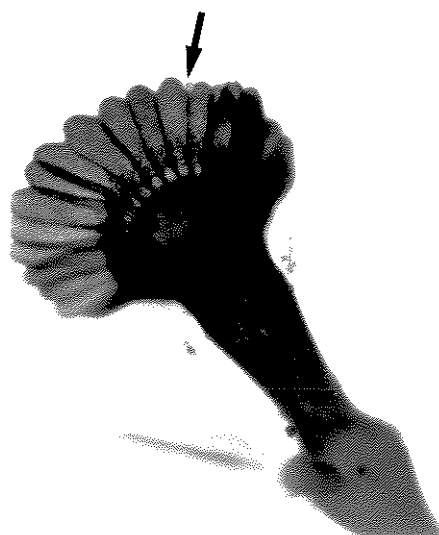


Figura 22) Diferenciação completa do chapéu (controle) (x50).

03.7. Ultraestrutura das células vegetativas de *Acetabularia calyculus*.

1) Corte transversal do ápice das células vegetativas em crescimento (figura 23).

Na região apical onde ocorre o crescimento celular observou-se grande quantidade de estruturas vesiculares. Essas vesículas provavelmente fazem parte como estruturas transportadoras das substâncias precursoras da parede celular e também do suco vacuolar.

Os cloroplastos observados apresentaram estruturas morfollogicamente alteradas.

Sendo a região apical a zona de crescimento portanto com metabolismo celular ativo, observou-se poucos ribossomos livres e retículo endoplasmático rugoso. (figura 23a).

2) Corte transversal de células vegetativas de 12 mm de comprimento com iniciação da formação de chapéu (figura 24).

Na região apical da célula quando está ocorrendo a iniciação da formação do chapéu, foi observada presença maciça de ribossomos livres bem como estruturas do retículo endoplasmático rugoso. Estas estruturas evidenciaram que no momento da diferenciação do chapéu, a célula se encontra em intensa atividade de síntese proteica produzindo substâncias precursoras necessárias para a formação do chapéu (figuras 24a,

24b, 24c).

3) Corte transversal da região apical de células anucleadas com 10 mm de comprimento (figura 25).

Observamos que no ápice de células com paradas de crescimento e portanto sem a formação de chapéus, a ausência de ribossomos e a presença somente de estruturas do retículo endoplasmático do tipo liso. A parede celular apresenta-se mais espessa e cloroplastos com estruturas alteradas quase que degenerados (figura 25a).

4) Corte transversal da região mediana da célula com iniciação da formação do chapéu (figura 26).

Nesta região da célula o citoplasma apresentou muitos cloroplastos com estruturas morfológicamente definidas, indicando fotossíntese ativa. Observamos também a presença de ribossomos livres possivelmente sendo transportados pela corrente citoplasmática (figura 26a).

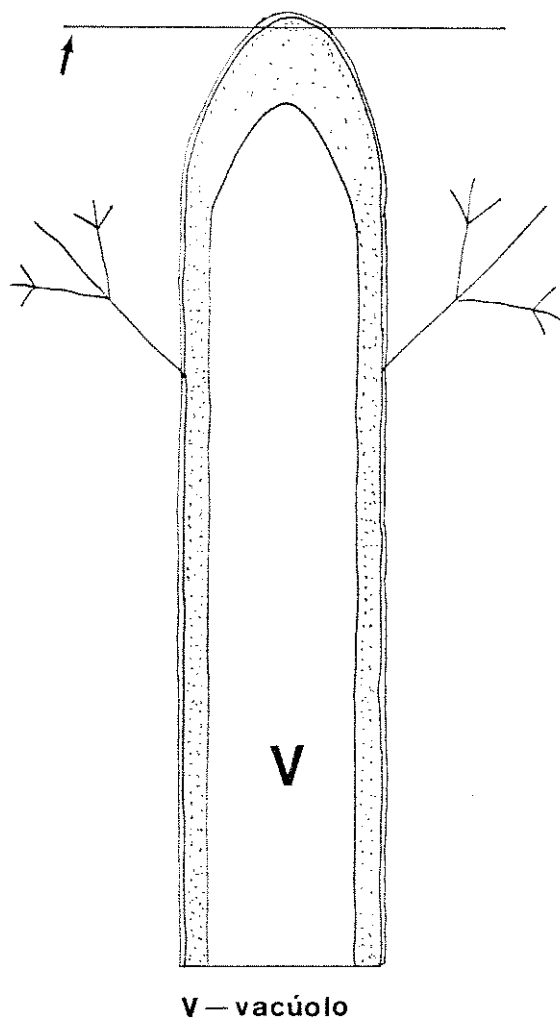


Figura 23) Corte transversal (seta) do ápice de células vegetativas em desenvolvimento.

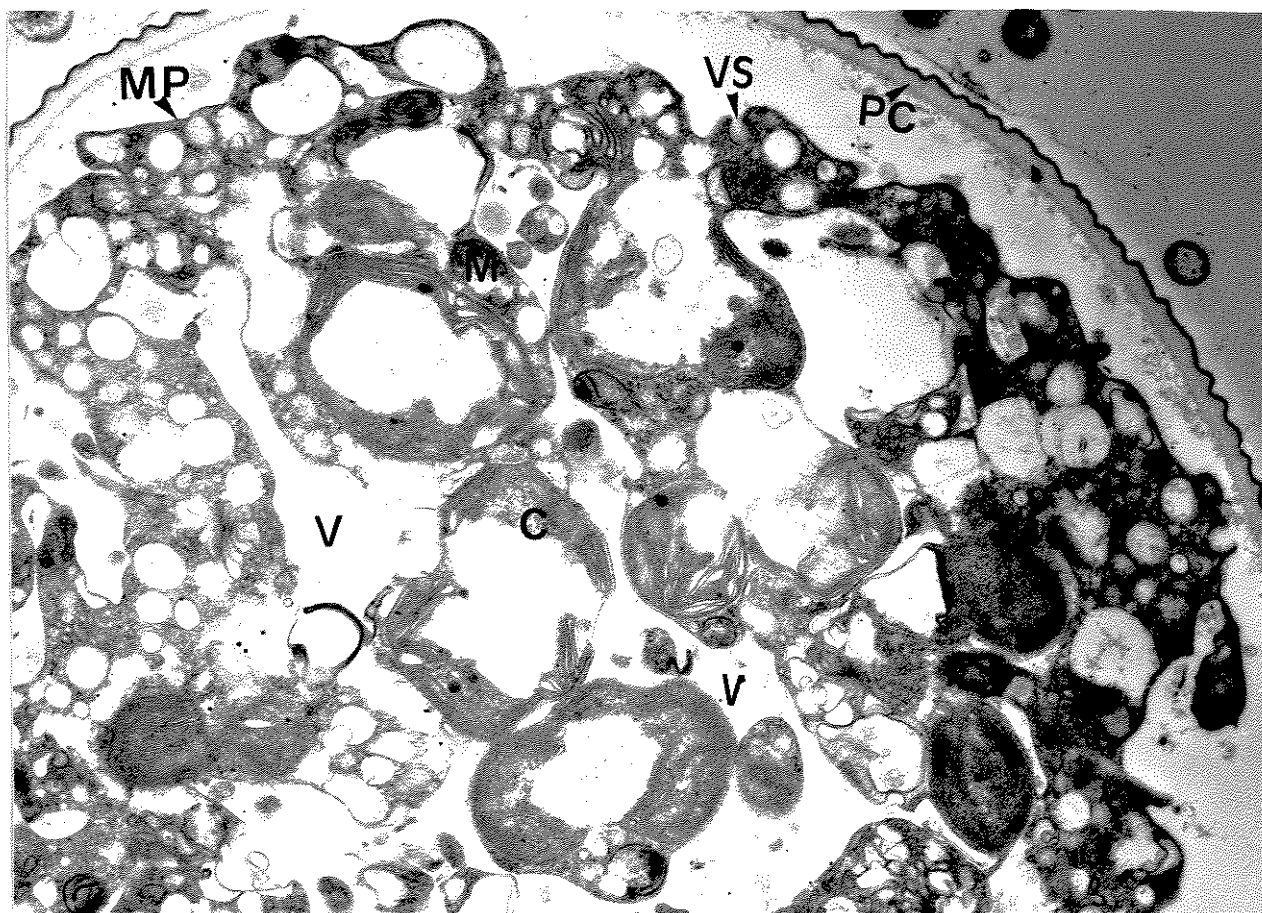


Figura 23a) Secção ultrafina da região apical em crescimento.
(x18000).

Presença de inúmeras vesículas. Cloroplastos alterados morfológicamente. Ausência de ribossomos livres e RER.

C = cloroplasto; M = mitocondria; VS = vesícula secretora; V = vacúolo; PC = parede celular; MP = membrana plasmática.

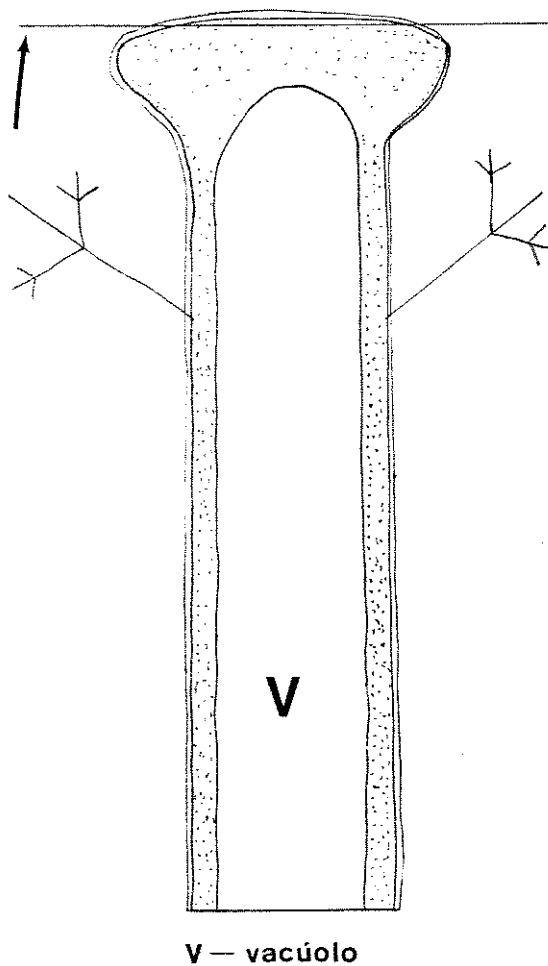


Figura 24) Esquema do corte transversal (seta) da região apical com início de formação do chapéu.

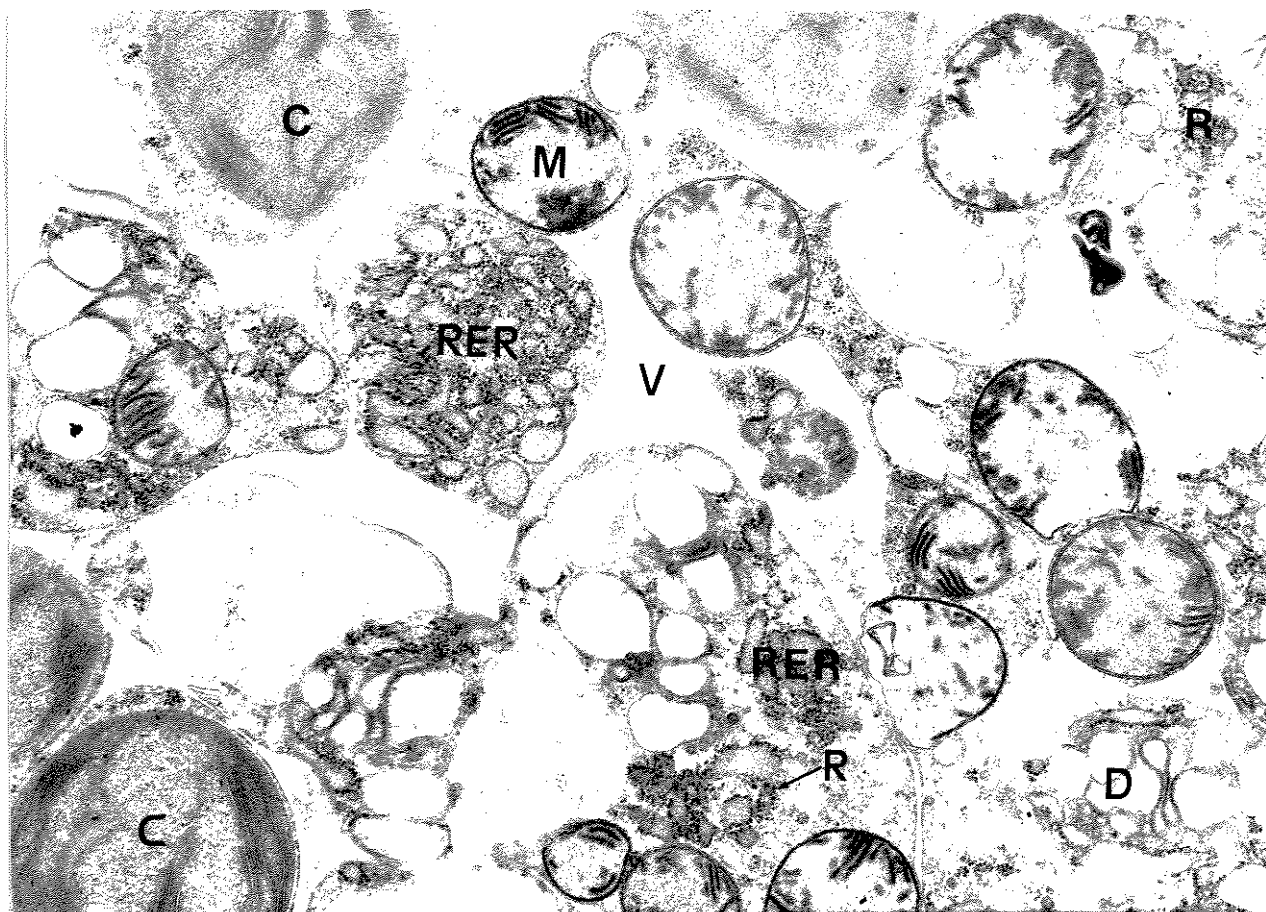


Figura 24a) Secção ultrafina da região no momento da iniciação da formação do chapéu. (x17500).

Presença de ribossomos livres e ligados às membranas do retículo endoplasmático.

D = dictiossomo; C = cloroplasto; M = mitocôndria;
R = ribossomos; RER = retículo endoplasmático rugoso; V = vacúolo.

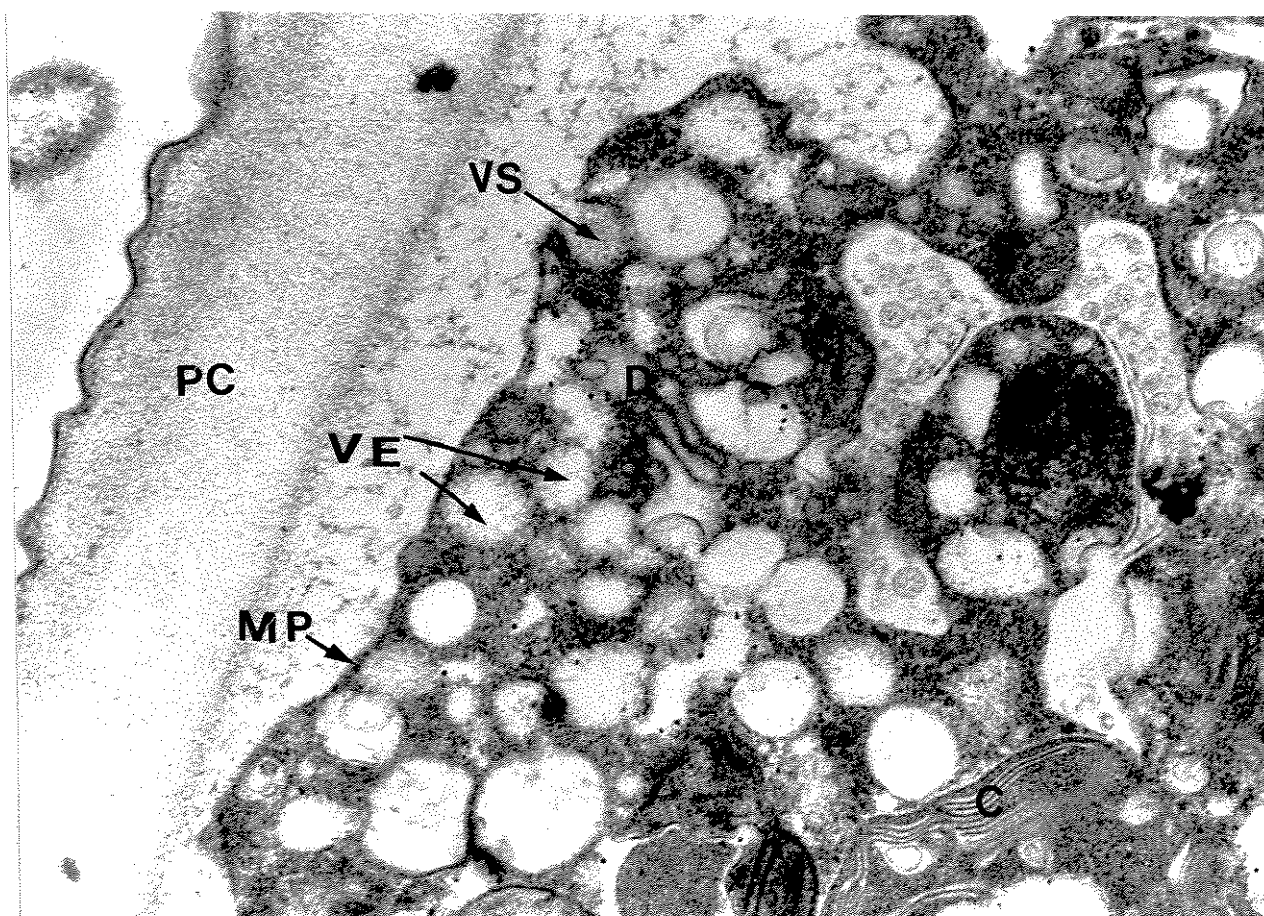


Figura 24b) Secção ultrafina da região apical com início de formação do chapéu.

Presença de inúmeras vesículaas secretoras encarregadas do transporte dos precursores da parede celular (x32000).

VS = vesícula secretora; D = dictiossomo; C = cloroplasto; PC = parede celular; MP = membrana plasmática; VE = vesículas.

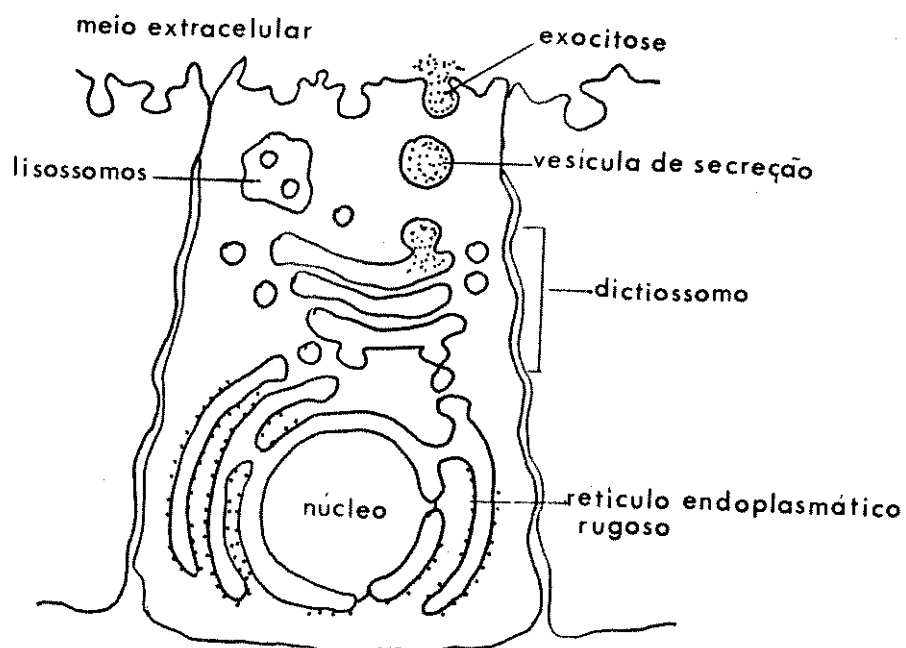


Figura 24c) Desenho esquemático do mecanismo de secreção dos precursores da parede celular no momento que antecede a diferenciação do chapéu.

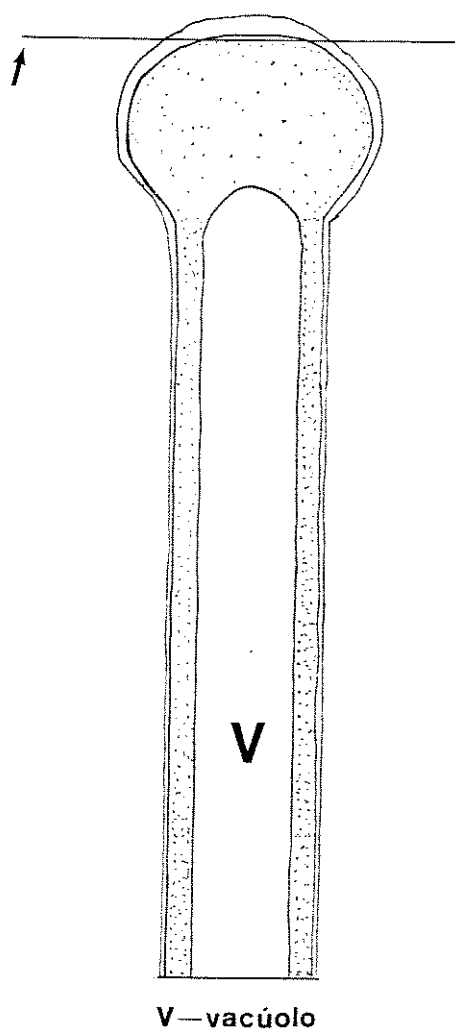


Figura 25) Esquema do corte transversal (seta) da região apical sem crescimento.

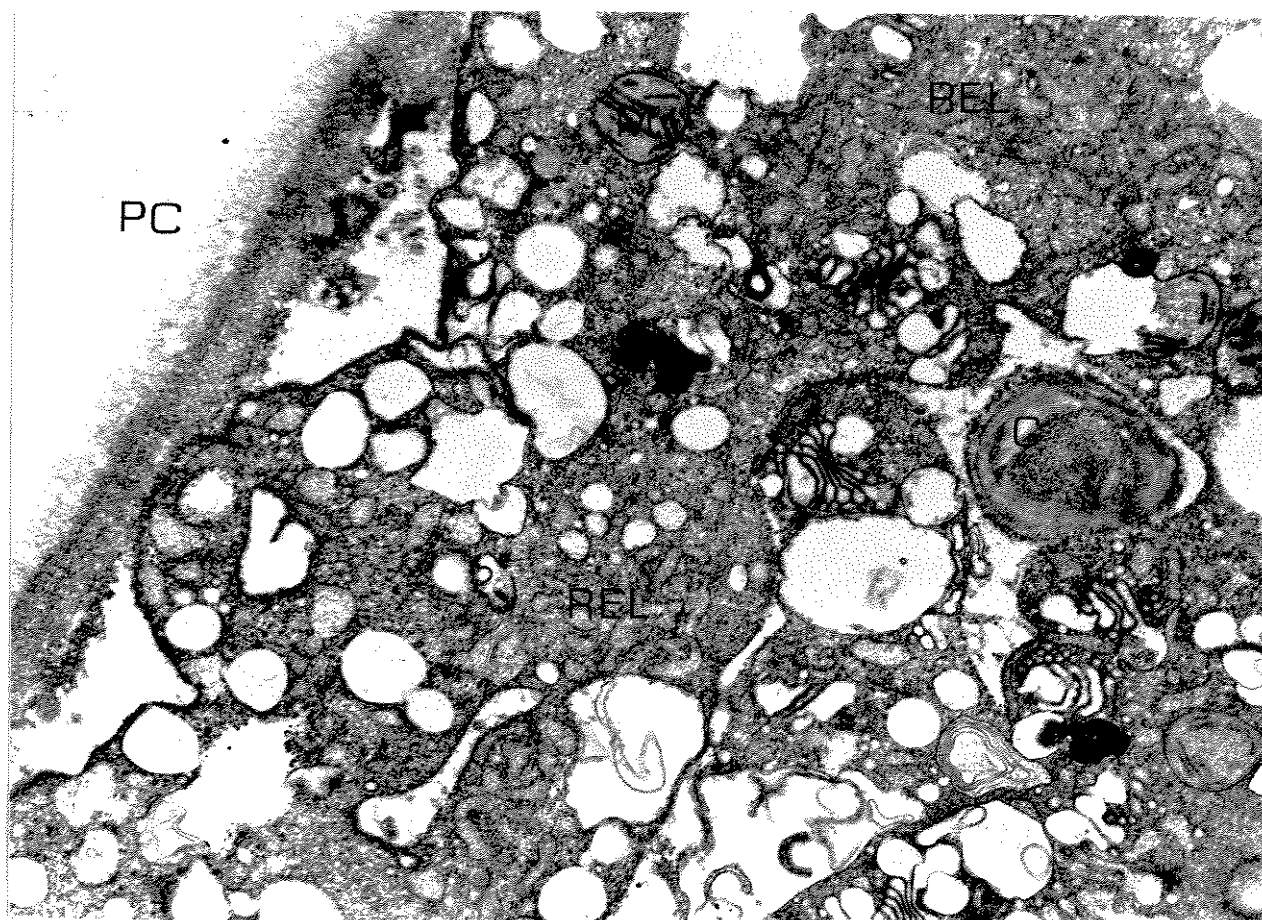
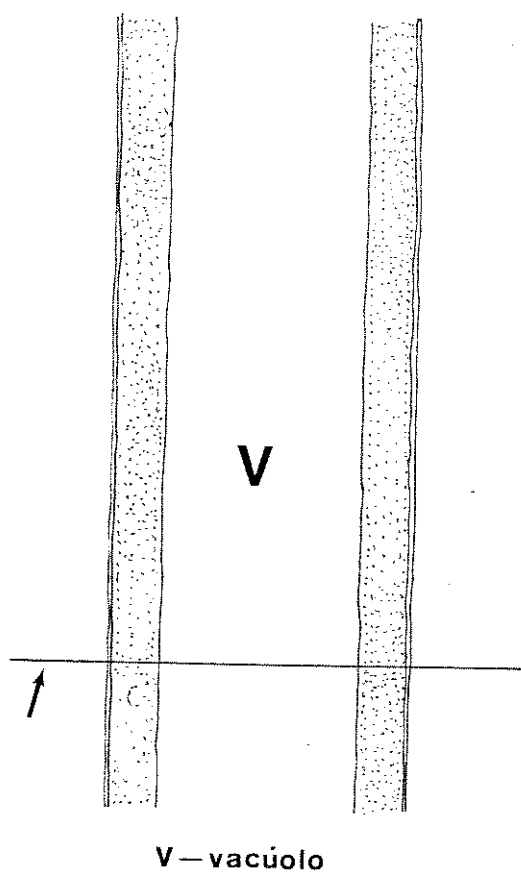


Figura 25a) Secção ultrafina da região apical sem crescimento.
(x18900).

Observa-se a presença de retículo endoplasmático liso e cloroplastos alterados morfológicamente. Ausência de ribossomos.

C = cloroplasto; REL = retículo endoplasmático liso; M = mitocôndria; PC = parede celular.



V—vacúolo

Figura 26) Esquema do corte transversal (seta) da região mediana do talo.

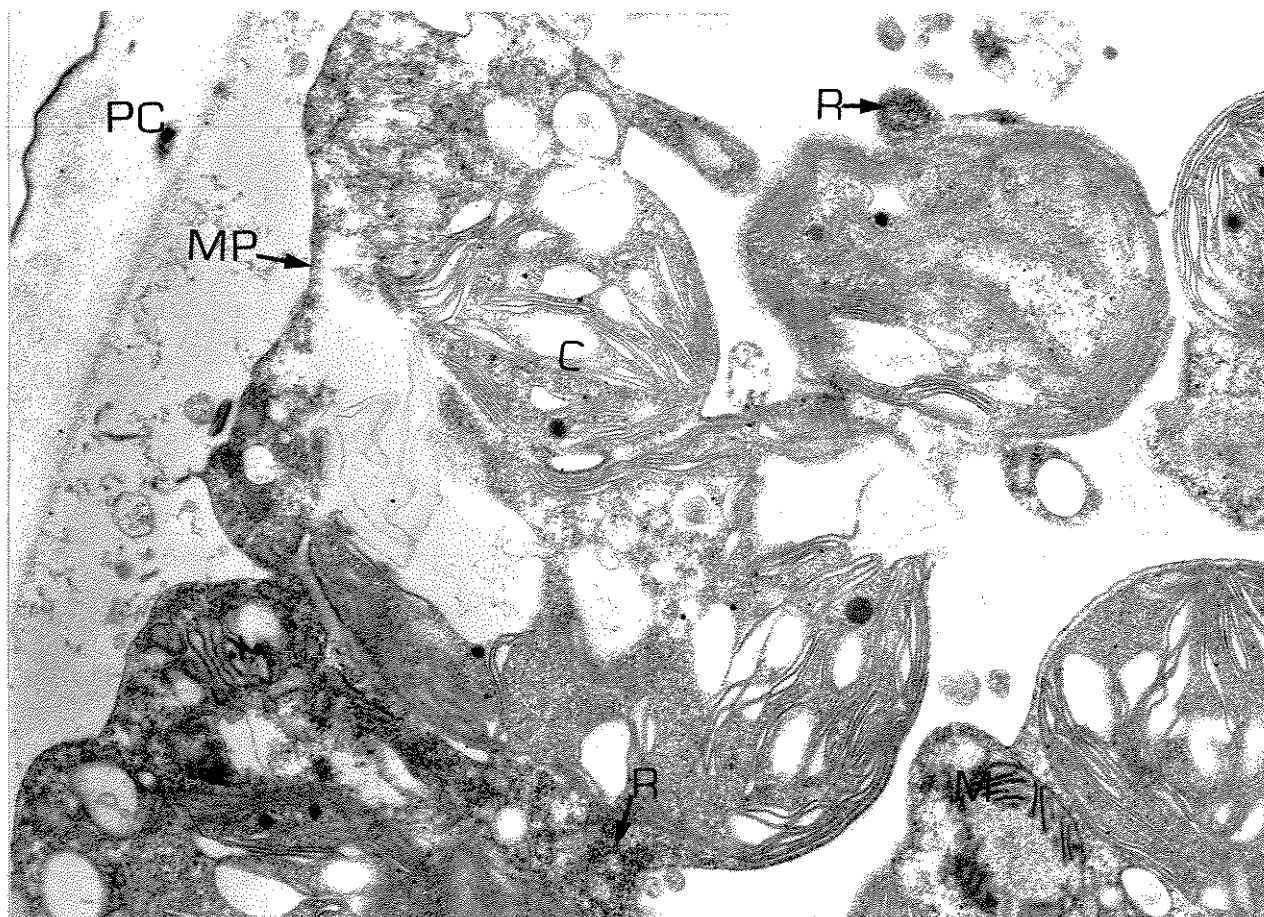


Figura 26a) Secção ultrafina da região mediana do talo. (x19250).

Observa-se: C - cloroplastos com estruturas bem definidas indicando atividade fotossintética; R - ribossomos livres na corrente citoplasmática; MP - membrana plasmática deslocada da parede celular provavelmente durante a fixação com glutaraldeído; PC - parede celular; M - mitocôndria.

03.8. Incorporação do marcador radioativo [^3H]-uridina nas células vegetativas de *Acetabularia calyculus*.

A contagem dos valores de incorporação da [^3H]-uridina foi realizada sobre o total de RNA nuclear, sendo a contagem apresentada em dpm (desintegração por minuto).

A pré-incubação com rifampicina e a sua adição nos meios de tratamento foi para evitar a incorporação do marcador radioativo nos RNAs das organelas (BONOTTO *et al.*, 1972).

Os resultados da incorporação da [^3H]-uridina foram analisados em separado ou seja a célula dividida na região do rizóide que contém o núcleo e do talo que corresponde ao citoplasma.

A experiência usando marcador radioativo [^3H]-uridina em células de 8 e 12 mm de comprimento apresentaram resultados correspondentes ao estado metabólico das células.

A exposição das células por períodos de 30 a 120 minutos com [^3H]-uridina não demonstrou diferenças quanto à atividade celular das algas como já foram observados anteriormente. Células com 8 mm de comprimento apresentavam ainda pouca atividade nuclear ou pouca produção de precursores de rRNA bem como a transcrição ativa do DNA na produção do mRNA. Já as células com 12 mm apresentavam o núcleo bastante ativo, com nucléolos produzindo ativamente precursores do rRNA. A presença dos cromossomos semelhantes aos plumosos indica alta

taxa de transcrição de DNA.

Analisando-se o período de incubação com marcadores radioativos de RNA e o período de perseguição (incubação no meio não radiativo) observamos que 30 minutos de contato e após períodos de perseguição por "overnight" (14 a 16 h) e 48 h o núcleo das células de 8 mm não apresentaram diferenças marcantes na contagem dos isótopos, porém após 48 h de perseguição foi observada maior marcação no citoplasma. Células com 12 mm de comprimento, após ambos períodos de perseguição [{"overnight" (14 e 16 h) e 48 h}] contagem maior dos isótopos radioativos incorporados foi verificada na porção do citoplasma.

Com período de contato por 120 minutos, as células de 8 mm apresentaram maior incorporação na parte do núcleo enquanto que nas células de 12 mm de comprimento foram verificadas maior contagem de isótopos radioativos na parte correspondente ao citoplasma sendo que os resultados foram semelhantes em ambos períodos de perseguição "overnight" (14 e 16 h) e 48 h. (figura 27 e tabela 4).

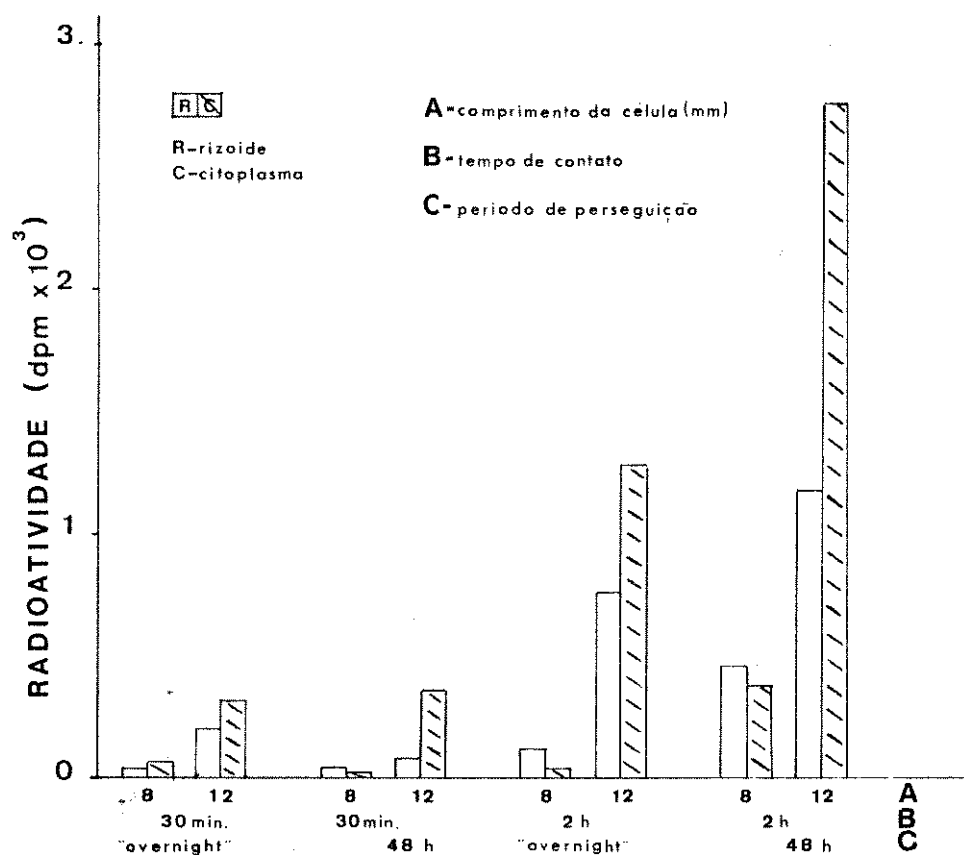


Figura 27) Incorporação do isótopo radioativo [³H]-uridina nas células de 8 e 12 mm de comprimento.

Tabela 4) Incorporação do isótopo radioativo [^3H]-uridina nas células de 8 e 12 mm de comprimento.

tempo de		comprimento da célula (mm)	dpm	
contato com [^3H]-uridina	perseguição		rizóide	citoplasma
30 minutos	"overnight"	8	38,83	58,80
		12	64,36	317,35
	48 h	8	43,35	22,42
		12	91,16	364,16
2 horas	"overnight"	8	116,43	47,76
		12	767,39	1293,10
	48 h	8	457,83	383,55
		12	1198,19	2765,09

dpm = desintegração por minuto.
background - rizóide = 27,31
 citoplasma = 28,81

04. DISCUSSÃO

A eliminação do rizóide nas *Acetabularia* produz células anucleadas. Estas podem sobreviver por um longo período, de semanas até meses, não só apresentando sobrevivência mas também exibindo grandes variações nas capacidades morfogênicas. A posição do local da anucleação influi largamente na regeneração da célula. Os fragmentos próximos ao ápice da célula apresentaram maior capacidade morfogênica do que fragmentos próximos ao rizóide.

Nas culturas sincronizadas, onde as potencialidades das células são homogêneas, a anucleação de células 1 mm acima do rizóide dentro de vários estádios de crescimento demonstrou diferenças evidentes na capacidade de formação de chapéu.

Os resultados obtidos demonstraram que a capacidade morfogênica está na dependência da idade celular ou do tamanho da célula no momento da anucleação. Quanto maior a parte anucleada, mais rápida foi a resposta na diferenciação morfológica (figura 3a e tabela 2).

Experimentos clássicos de Hämmerling (1963a) com *A. wittsteinii*, as algas quando anucleadas sobreviveram em torno de 7 meses; com *A. mediterranea* (*acetabulum* (L) Silva) porções anucleadas com 10 mm de comprimento permaneceram vivas por 70 dias, com células crescendo de 3 a 5 mm após anucleação e 77% das partes anucleadas foram capazes de formar chapéus.

A manutenção das partes anucleadas no escuro diminuía o período de sobrevivência demonstrando que a fotossíntese continuava após a anucleação e determinava a extensão da sobrevivência da célula, com a realização de todas as atividades de uma célula normal. A razão para esta diferença considerável no período de sobrevivência deveria ser a alta susceptibilidade da parte anucleada à influência do meio externo.

Nos nossos experimentos (YAMAOKA, 1980), células anucleadas podiam sobreviver por um período longo ou curto, mas sempre dentro de um período limitado, enquanto que células nucleadas podiam manter-se vivas por um período ilimitado, desde que as condições de cultura fossem adequadas.

Segundo Hämmerling (1963a), em condições normais de luz (2000 lux), células anucleadas com 10 mm de comprimento não manifestavam atividade morfogênética, no entanto, células nucleadas de mesmo comprimento mantidas no escuro por 5 dias e depois anucleadas e transferidas para a luz exibiram alta capacidade morfogênética, conduzindo à formação de chapéus. No escuro o crescimento celular é interrompido e além disso a célula e o material nuclear entravam em degradação com redução do núcleo, especialmente dos nucléolos. Entretanto, a supressão da fotossíntese não resultava na supressão da atividade fundamental do núcleo, que é a transferência para o citoplasma da substância nuclear que induzia a morfogênese quando a célula

era exposta na presença de luz. Assim, segundo Hämmerling (1963a), a capacidade morfogenética das células anucleadas dependia da quantidade das substâncias morfogenéticas presentes no núcleo no momento da anucleação; da extensão do período no escuro onde essas substâncias eram liberadas do núcleo para o citoplasma e posterior acúmulo na região apical da célula. Isto tornou evidente que precursores da substância morfogenética eram liberados no escuro e que no citoplasma eram convertidos na presença de luz para a forma ativa, ocorrendo a síntese de proteínas mesmo na ausência do núcleo. A parte essencial da capacidade morfogenética portanto localizava-se na parte apical da célula, onde as substâncias morfogenéticas eram acumuladas.

Nos nossos experimentos, as células anucleadas não foram mantidas e nem submetidas a um pré-tratamento no escuro antes da anucleação, mas apresentaram resultados semelhantes quanto à capacidade morfogenética. Dos resultados também concluiu-se que quanto mais jovem a célula (menor comprimento) menor a capacidade morfogenética, sendo que todo o processo da morfogênese está fortemente relacionado com o desenvolvimento nuclear e que variações na capacidade morfogenética das partes anucleadas não eram devidas às mudanças nas atividades do substrato protoplasmático, mas a uma consequência de mudanças na atividade do núcleo durante o desenvolvimento normal da célula. Essas variações não eram autônomas, dependiam das condições do sistema celular, sendo que nas células idosas o

núcleo é menos ativo que nas células jovens.

A duração de vida de uma célula anucleada pode ser calculada segundo o tempo do qual o fragmento anucleado mantém sua capacidade para formar chapéu e sintetizar proteínas. Este período pode durar de 2 a 3 semanas.

O núcleo da *Acetabularia* controla o padrão de organização celular, especialmente do chapéu, via produção de substância morfogénica.

Uma célula idosa é definida como uma célula que já formou e diferenciou um chapéu com diâmetro máximo, enquanto que uma célula é jovem quando se encontra no estágio antes da formação do chapéu (em *A. calyculus* está em torno de 10 a 12 mm de comprimento). Ao lado dessas modificações macroscópicas um número diferente de variações estruturais do núcleo foi observado junto ao microscópio eletrônico e de fluorescência. Essas variações morfológicas foram mais evidentes nos nucléolos e as observações foram fixadas nessas estruturas.

Já foi observado por Spring *et al.* (1974) e Shihira-Ishikawa e Kuroiwa (1984) que durante a fase vegetativa o núcleo primário da *Acetabularia* passa por uma série de modificações estruturais.

O aumento do tamanho nuclear correspondia ao desenvolvimento dos nucléolos, que resultava num aumento na síntese dos ribossomos. Por outro lado, a degeneração dos nucléolos e a ocorrência da divisão meiótica correspondia à

cessação da atividade nuclear do núcleo primário.

Trendelenburg *et al.* (1974) e Spring *et al.* (1978), nos seus estudos com microscópio eletrônico usando a técnica de espalhamento da cromatina, observaram que os nucléolos no estágio de máximo desenvolvimento do núcleo primário contém um número grande de genes pré-rRNA dispostos um após outro, em "tandem" (cabeça-cauda), demonstrando a atividade de transcrição do DNA, que contém cistrons para precursores do rRNA (rDNA).

A taxa de síntese de rRNA e o fluxo de informações do núcleo para o citoplasma eram afetados pelo "envelhecimento" da célula, revelados pelas mudanças nucleolares.

Nos nossos experimentos em células jovens com 12 mm de comprimento, o material nucleolar apresentou um arranjo de várias unidades nucleolares com aspecto característico de "sausage-like nucleolus", observados por Spring *et al.* (1974).

O número de unidades nucleolares por núcleo primário foi difícil de determinar devido à sua associação formando uma estrutura conhecida como "sausage-like-shapes" intrinsicamente agregadas. Estudos feitos por Spring *et al.* (1974) revelaram a média de nucléolos em *A. mediterranea* (*acetabulum* (L) Silva) em torno de 32 unidades. Ainda, segundo Spring *et al.* (1974), em *A. calyculus* foi calculada uma média de 20 unidades.

Células idosas apresentavam somente um nucléolo específico e vacuolado, sendo o núcleo envolto por uma

pronunciada camada citoplasmática e ausência de vacúolos enquanto que célula jovem com máximo desenvolvimento dos nucléolos exibe uma alta atividade na produção de precursores de rRNA. O envelope nuclear é envolto por uma fina camada citoplasmática altamente vacuolizada (Schweiger *et al.*, 1974).

A partir dessas observações células jovens e idosas podem ser facilmente distinguidas com base na estrutura do núcleo.

A taxa de síntese de proteínas citoplasmáticas através do núcleo e nucléolos está primariamente regulada pela produção de energia citoplasmática. A célula mantendo-se ativa, isto é, crescendo e diferenciando, a produção de energia também vai aumentando, porém o que se observa após o alcance do máximo desenvolvimento do núcleo, a célula entra num estado estacionário, isto é, uma vez formado o chapéu o volume nuclear não sofre mais aumento, mesmo com o total de atividade fotossintética aumentando. Não é fácil de compreender esta situação, uma vez que um aumento de energia citoplasmática certamente tenderia a aumentar o metabolismo celular (BRACHET, 1987).

A observação dos nucléolos nos núcleos primários com 100 a 120 μ m de diâmetro resultaram que estes formam agregados de numerosas subunidades ocupando uma boa parte do volume nuclear. Cada uma dessas subunidades é caracterizada por zonas facilmente identificáveis (figura 5a).

Evidências de autorradiografia mostraram que os nucléolos são locais de intensa síntese de rRNA. Estudos citoquímicos e de fracionamento celular indicam que pelo menos 10% do nucléolo é RNA, o restante é principalmente proteína. Preparações de nucléolos isolados contém algum DNA derivado principalmente da cromatina associada ao nucléolo. Quando os cromossomos se tornam visíveis na divisão celular, os nucléolos são vistos freqüentemente associados com específicas regiões organizadoras do nucléolos (HOLTZAMANN & NOVIKOFF, 1985).

Vistos à microscopia eletrônica, os nucléolos se dividem em zonas de estruturas diferentes (figura 8). Além de filamentos de cromatina, existem áreas ricas em grânulos e regiões que são fibrilares ou amorfas (A). Alguns pesquisadores sugerem que o DNA da cromatina pode se estender até algumas das zonas fibrilares (SPRING *et al.*, 1974).

Zonas fibrilares (A) são locais onde o RNA está sendo transcrito a partir dos moldes específicos de DNA e as zonas granulosas (B) contém produtos desta transcrição que formam complexos com proteínas formando grânulos (complexo rRNA-proteína). Zona A contém grandes moléculas precursoras de rRNA, recém-transcritas do rDNA e que à medida que estas são modificadas passam para as zonas granulosas.

Embora não haja uma membrana que delimite o nucléolo, são vistos contatos entre estes e os envoltórios nucleares, provavelmente facilitando a passagem dos produtos nucleolares

para o citoplasma. Os complexos rRNA-proteína assim formados são exportados do núcleo via poro nuclear (figura 10).

O estudo dos nucléolos possibilitou a identificação do momento da produção ativa de rRNA que coincidia também com o período de intensa transcrição do DNA na produção de mRNA sugerindo que os cromossomos observados nesta etapa fossem semelhantes aos cromossomos plumosos.

Numerosos estudos com o emprego de microscopia eletrônica revelaram que a síntese de RNA está localizada na cromatina dispersa nos compartimentos nucleolares e não nucleolares (MILLER E HAMKALO, 1972).

Spring *et al.* (1975) observaram no nucleoplasma do núcleo primário de *A. mediterrânea* (*acetabulum* (L) Silva) estruturas semelhantes a uma organização de cromossomos plumosos conhecidos no estágio meiótico de algumas células animais. Estes cromossomos apresentavam algumas variações morfológicas como diferenças no tamanho (comprimento) e no grau de dispersão das alças laterais.

Cromossomos plumosos típicos com um eixo cromossomal definido, cromômeros e extensões de alças laterais foram descritas de maneira convincente somente no estágio meiótico de células animais em particular nos oócitos de alguns peixes, moluscos, insetos e anfíbios (MILLER & HAMKALO, 1972; MÜLLER, 1974 e SPRING *et al.*, 1975).

Grun (1958) descreveu a ocorrência de estruturas

semelhantes a cromossomos plumosos no estágio de diplóteno da cebola *Allium cernueira* e Lu e Raju (1970) nos fungos basidiomicetos. Entretanto, estes trabalhos não revelaram uma estrutura clara e definida dos cromossomos plumosos.

O aparecimento de estruturas semelhantes a cromossomos plumosos durante um período curto no ciclo de vida da *Acetabularia*, permanece objeto de interesse muito amplo.

Núcleos isolados de células com 12 mm de comprimento marcados com DAPI e observados ao microscópio fluorescente, apresentaram filamentos cromossômicos emaranhados aparentando fios levemente soltos com projeções laterais semelhantes a alças (figura 9). Se estes cromossomos são realmente plumosos ou se são artefatos no preparo do material não há evidências concretas pois no aspecto geral são bem menores do que àqueles observados nos oócitos de certos anfíbios. Apesar disso existem grandes possibilidades de que sejam mesmo do tipo plumosos uma vez que Sring et al. (1975) descreveram a estrutura dos cromossomos de *A. mediterranea* como do tipo plumosos.

Os cromossomos observados no estágio de máximo desenvolvimento nucleolar comparados com os outros estádios são mais grossos e soltos talvez pela formação de dobraduras de DNA para permitir maior taxa de transcrição de mRNA.

A semelhança dessas estruturas de cromossomos observados no núcleo de *Acetabularia* com os de células de vários tipos animais todos exclusivamente na prófase meiótica

pode ser descrita como a possível relação desses cromossomos com as fases de crescimento vegetativo definida da alga, sugerindo que a formação de um núcleo gigante na *Acetabularia* é correlacionada com a enorme ampliação da atividade do DNA na formação dos precursores de mRNA sendo que é nesse estágio que o núcleo deve estar transcrevendo informações genéticas necessárias para a diferenciação do chapéu reprodutivo.

O uso do microscópio eletrônico de transmissão de alta voltagem veio reforçar a identificação dos cromossomos como sendo de configuração plumosa pois reflete um estado relativamente descondensado dos cromossomos e extensa ativação dos genes (figuras 12 e 13).

A identificação dos cromossomos como sendo plumosos indica também que o núcleo primário gigante está na fase diplóide e representa um estado análogo à maturação do zigoto.

Boloukhère (1970) e Berger *et al.* (1975) observaram ocasionalmente no nucléoplasma de *A. mediterranea*, grupos semelhantes a hastes felpudas de ("rodlike fuzzy") filamentos finos. Estas estruturas assemelhavam-se a imagens de sinapses de cromossomos descritos nos estádios de prófase meiótica de algumas variedades de plantas. Nas nossas observações não foram observadas estas estruturas que pudessem ser identificadas como típicas estruturas do complexo sineptonêmico.

A identificação destas estruturas seriam importantes para observação da ocorrência da meiose no ciclo de vida da alga. Tikhomiròva *et al.* (1979) sugerem que a ocorrência da estrutura sineptonêmica reforça a hipótese da presença de cromossomos plumosos no estágio de máximo desenvolvimento nuclear e nucleolar.

De acordo com Spring *et al.* (1978) os gametas e o zigoto de *Acetabularia* contém 0,9 e 1,8 pg de DNA respectivamente, enquanto que o núcleo vegetativo gigante contém 2,6 pg de DNA. Assim, apesar do tamanho anormal o núcleo não é poliplóide.

O aumento moderado em conteúdo do DNA do zigoto comparado ao do núcleo de máximo desenvolvimento provavelmente é devido a aumento dos genes extracromossomais (nucleolares).

Os resultados obtidos sobre o efeito da AD na formação de chapéus com algas de 12 e 15 mm de comprimento demonstraram novamente uma relação restrita entre a capacidade morfogênética e a produção da substância morfogênética pelo núcleo.

Actinomicina D, inibidor da RNA polimerase, portanto inibe a transcrição do DNA para RNA e conseqüente inibição da síntese proteica apenas retardou a manifestação da capacidade morfogênética nas células pré-tratadas.

O emprego do antibiótico AD nos experimentos trouxe resultados semelhantes aos dos experimentos sobre a anucleação das células. A produção e liberação da substância morfogênética estava relacionada com a idade celular e para a formação do chapéu há a necessidade de síntese de proteínas específicas codificadas no núcleo.

Células com 12 e 15 mm de comprimento que não sofreram um pré-tratamento com AD quando anucleadas demonstraram a capacidade de diferenciação morfológica com a formação de chapéus, porém em tempos diferentes de acordo com a idade celular (figura 15 e tabela 3).

As células com 12 e 15 mm de comprimento pré-tratadas com 10 $\mu\text{g/ml}$ de AD, quando anucleadas e transferidas para meio de cultura normal, apresentaram um efeito reversível manifestando, após um período de recuperação, a capacidade morfogênética. A intensidade da capacidade morfogênética dessas

células também apresentaram o efeito da idade celular como foram observados nas células controle, porém o tempo que essas células levaram para manifestar a iniciação da formação do chapéu foi mais longo, ou seja, houve um atraso de alguns dias em relação ao controle.

Com relação às células nucleadas pré-tratadas com AD o efeito foi também reversível, apresentando também um atraso na iniciação dos chapéus que foi maior do que células anucleadas pré-tratadas com a AD. Porém, analisando-se o total de formação de chapéus no decurso de 21 dias observamos que não houve muita diferença em relação aos resultados das células do controle. Esses resultados permitiram concluir que a integridade dos RNAs pré-existentes é necessária para a morfogênese na parte anucleada, portanto a habilidade para regeneração e produção de chapéus é devido aos mRNAs estáveis presentes no citoplasma das células antes do tratamento com AD.

O efeito retardatário das células nucleadas sugere que gradiente de síntese de proteínas é dependente em parte síntese "de novo" de moléculas de mRNA, posterior liberação para o citoplasma e distribuição ápico-basal. Gradiente ápico-basal também pode resultar da análise de proteínas do citosol e das organelas porém trabalhos com emprego da puomicina e cloranfenicol demonstraram que somente síntese de proteínas citoplasmáticas e não cloroplástico é requisitada para crescimento e diferenciação morfológica (BRACHET, 1987).

Segundo Brachet (1967) fragmentos anucleados podem sintetizar proteínas específicas codificadas pelo núcleo; durante 2 a 3 semanas a rede de síntese de proteínas estava correlacionada com a iniciação e desenvolvimento do chapéu. Tanto DNA como RNA aumentavam até 2 vezes nos fragmentos anucleados com chapéus. A explicação para isto era que o DNA do cloroplasto podia replicar na ausência do núcleo.

Inibidores da transcrição do DNA e RNA do cloroplasto e da síntese de proteínas não afetavam a iniciação e formação de chapéus nos fragmentos anucleados somente retardavam a completa diferenciação do chapéu. Enquanto que inibidor da síntese do RNA nuclear, AD, impedia a regeneração somente da parte nucleada, tendo pouco efeito na parte anucleada (BRACHET, 1987).

Vários estudos indicam que cloroplastos contém informações suficientes e todo o mecanismo para transcrição e tradução, determinando um certo grau de autonomia (CRAIG & GIBOR, 1970; LÜTTKE, 1981; BERGER *et al.*, 1987).

Vanden Driessche *et al.* (1970) observaram que a adição de 20 $\mu\text{g/ml}$ de AD no meio de cultura progressivamente inibia o ritmo da fotossíntese nas células integras no decorrer de uma semana, enquanto nas células anucleadas não era observado o efeito do inibidor. O efeito da AD foi interpretado como o resultado da inibição da síntese do mRNA de longa vida. Também, Mergenhagen e Schweiger (1975) verificaram que o

tratamento das células nucleadas e anucleadas com 5 $\mu\text{g/ml}$ de AD causou a inibição da expressão do ritmo circadiano da evolução de O_2 apenas nas células nucleadas.

A interpretação dos resultados sobre o efeito retardatório na formação do chapéu ocasionado pelo tratamento com AD possivelmente foi devido a uma diminuição da atividade fotossintética. Segundo Craig e Gibor (1970), o tratamento com AD (20 $\mu\text{g/ml}$) nas células anucleadas e anucleadas previamente incubadas no escuro apresentavam diminuição na atividade fotossintética. Quando estas células eram transferidas para a luz, recuperavam a atividade fotossintética. A adição de 20 $\mu\text{g/ml}$ de AD impedia a recuperação completa da atividade fotossintética das células.

Portanto, as células após o tratamento com inibidor, necessitavam de um período de recuperação das atividades metabólicas uma vez que a capacidade morfogenética está fortemente ligada na integridade da atividade celular e também sugerindo que o gradiente de síntese de proteínas está na dependência em parte de novas moléculas de RNA sintetizadas.

Citocalasina B foi usada como um inibidor de movimentos intracelulares numa grande variedade de organismos incluindo algas (CARTER, 1967; WESSELS *et al.*, 1971).

Nagai e Kamiya (1977) utilizando células de Characeae observaram que uma concentração de 100 ug/ml de CB inibia reversivelmente a corrente citoplasmática. Os mesmos efeitos foram observados nos nossos experimentos com a *Acetabularia*, sugerindo que nas células de *Acetabularia*, tal como em outros organismos, microfilamentos devem estar envolvidos no movimento intracelular.

As células com início de formação do chapéu, após o tratamento com CB, recuperavam os movimentos citoplasmáticos mas não foram capazes de prosseguir com a diferenciação normal do chapéu, ocorrendo um nova alongação do talo e formação de verticilos estéreis (figura 21).

Shihira-Ishikawa *et al.* (1985) observaram que dependendo das condições de cultura, uma alga que está iniciando a formação do chapéu, num dado momento pode retornar ao estado de morfogênese anterior ou seja a diferenciação dos verticilos estéreis ou mesmo o alongamento do talo, começando de novo a morfogênese seguindo o processo normal.

Os resultados obtidos com CB sugerem um envolvimento dos microfilamentos em todo o movimento intracelular, uma vez que Puisseux-Dao (1979), Koop e Kiermayer (1980a) sugeriram que microfilamentos e microtúbulos participam como elementos ativos na corrente citoplasmática da alga.

Nos nossos resultados sobre a não diferenciação do chapéu podemos considerar duas alternativas: o efeito irreversível da CB sobre os microfilamentos e a não participação dos microfilamentos no citoplasma da alga. Porém a presença de microfilamentos e microtúbulos citoplasmáticos foram observados e descritos para esta alga em diferentes estádios de desenvolvimento (WOODCOCK, 1971; MENZEL, 1986).

Menzel (1986) observou e definiu a presença da actina na fase vegetativa da *Acetabularia* seguindo uma distribuição em estruturas como "cabos"; o citoplasma parietal é percorrido por feixes maciços de filamentos de actina correndo regularmente espaçados ao longo da célula formando arranjos paralelos.

Baseados sobre evidências farmacológicas Koop e Kiermayer (1980a, b) propuseram o envolvimento da actina no transporte de cloroplastos, e actina e MTs no segundo mecanismo de transporte denominado "headed streaming bands". Esse segundo tipo move pequenas vesículas, grupos de grânulos de polifosfato e núcleos secundários numa velocidade calculada de 3 a 11 $\mu\text{m} \times \text{seg}^{-1}$.

O sistema de microfilamentos é encontrado durante todo os estádios de desenvolvimento e sob esta rede os cloroplastos movem a uma velocidade de 1 a 2 $\mu\text{m} \times \text{seg}^{-1}$.

Os MTs participam com a principal função de transporte dos núcleos secundários (MENZEL, 1986). Entretanto tal configuração não foi encontrada nos estádios precoces do desenvolvimento vegetativo.

Em nossos estudos os testes com imunofluorescência indireta não detectaram a presença de MTs no estágio de iniciação do chapéu. É possível que a célula expresse tipos de tubulinas imunologicamente diferentes durante estádios precoces de desenvolvimento ou que os MTs no "headed streaming bands" (KOOP & KIERMAYER, 1980a, b) estejam presentes somente em quantidades diminutas sendo impossível a detecção por este método.

Os mecanismos de interação entre MTs e actina na *Acetabularia* ainda são desconhecidos, mas são sugeridos que o envolvimento coordenado de ambos os elementos do citoesqueleto no movimento de organelas é um aspecto considerado típico nas algas verdes *Sifonales* pela variável extensão da organização celular (MENZEL & SCHLIWA, 1986b).

Quanto ao mecanismo dos movimentos citoplasmáticos bem como sua regulação, Puiseux-Dao (1979) propôs uma regulação iônica, pois CBs são moléculas lipossolúveis e provavelmente são armazenadas na membrana celular, sendo a membrana plasmática o local escolhido uma vez que CB é conhecida como modificadora da permeabilidade celular.

Em condições normais, a composição iônica do citoplasma deve ser responsável pelo movimento normal do citoplasma. O uso do inibidor possivelmente alterou a composição iônica que também influe nos microfilamentos e como consequência no movimento citoplasmático.

Com as mudanças hidrodinâmicas do citoplasma a construção e o funcionamento de diferentes níveis de MF foram modificadas influenciando o transporte intracelular das moléculas que podem se acumular ou não onde foram sintetizadas, alcançando ou não os alvos, isto é, as organelas ou vesículas de Golgi que contém substâncias necessárias para o aumento da parede celular e consequentemente formação do chapéu.

Estudos citológicos revelaram que RNA nas células de *Acetabularia* estão distribuídos num gradiente ápico-basal e foi postulado que este gradiente pode ser um resultado de uma transferência polar do RNA do núcleo e posteriormente acúmulo na zona de crescimento onde ocorre o evento morfogênético (NAUMOVA *et al.*, 1976).

Dazy *et al.* (1983) observaram que CB inibe a migração do rRNA sugerindo que para este processo há o envolvimento dos microfilamentos.

Como nas algas cenocíticas que desenvolveram exemplos notáveis de movimento intracelular envolvendo MTs e actina (MENZEL & SCHLIWA, 1986a, b) igualmente no caso da *Acetabularia* que passa por uma diferenciação citoplasmática induzindo

mudanças na forma celular ao longo do seu ciclo de vida, a inibição da corrente citoplasmática por CB consequentemente levou a uma inibição do transporte dos RNAs nucleares para a síntese de proteínas específicas para a diferenciação do chapéu. Portanto mesmo o efeito sendo reversível com a retomada dos movimentos intracelulares, uma vez o processo morfogênético sendo desligado, a célula deve apresentar algum mecanismo que faz com que ela volte para processos morfogênicos anteriores ao chapéu, isto é, crescimento e formação de verticilos laterais estéreis.

Desde que a corrente citoplasmática possa ser a chave do transporte do RNA, o fluxo dinâmico do citoplasma participa com uma função importante da regulação da morfogênese celular e os efeitos da CB fazem uma ligação entre a corrente intracelular e processos morfogênicos.

Morfogênese é o resultado de um mecanismo regulatório complexo. Na *Acetabularia* esta regulação ocorre ao nível citoplasmático embora a informação genética para morfogênese esteja armazenada no DNA nuclear (HAMMERLING, 1934, 1953, 1963a). A síntese de todas as enzimas envolvidas na morfogênese principalmente da parede celular do chapéu é regulada dentro do citoplasma a nível de tradução (WERZ, 1970) e isto está de acordo pelo fato de que a morfogênese ocorre também com as células anucleadas.

Células anucleadas foram capazes de formar verticilos estéreis e chapéus espécie-específicos, portanto a possibilidade de a regulação fundamental ocorrer a nível de transcrição pode ser excluída, considerando-se que os mecanismos reguladores da morfogênese operam no citoplasma.

A participação dos cloroplastos na morfogênese é indireta pela produção de monossacarídeos para a síntese da parede celular (WERZ, 1970a). O citoplasma está envolvido diretamente na fabricação dos precursores polissacarídeos da parede celular e determinando a forma da célula.

Nas células de *Acetabularia* a síntese do material espécie-específico da parede celular para o crescimento do talo e a formação do chapéu ocorrem dentro de estruturas no citoplasma possivelmente nas estruturas que constituem o complexo de Golgi, os dictiossomos. Estes sistemas altamente organizados estão intimamente relacionados com o retículo endoplasmático e são responsáveis pela polimerização do material da parede celular.

As células de *Acetabularia* exibem crescimento apical. Em concordância com este fato está a observação que os dictiossomos e as vesículas que contêm os precursores da parede celular são acumuladas no ápice dos talos em crescimento, como é indicado pelo seu aspecto estrutural com as vesículas terminais largas (figura 24b). Os dictiossomos são considerados elementos ativamente envolvidos no crescimento celular.

Nos locais onde não está ocorrendo crescimento observam-se poucos dictiossomos e estruturas vesiculares (figura 26a) indicando um relacionamento íntimo entre a função dos dictiossomos e a capacidade de crescimento das células.

Observamos também que as células anucleadas em estádios muito jovens não apresentaram a capacidade de formação de chapéus. Com o crescimento bloqueado, as observações ultraestruturais revelaram somente estruturas do retículo endoplasmático liso, com ausência de ribossomos e cloroplastos morfológicamente alterados indicando possivelmente a parada do metabolismo celular (figura 25a).

Dictiossomos geralmente são encontrados relacionados com retículo endoplasmático. Este relacionamento estrutural faz também com que exista um interrelacionamento funcional entre os dois sistemas de membranas. Além disto, é bem sugestivo assumir que através dos canais do retículo endoplasmático, as informações morfogenéticas migram do núcleo para o sistema de dictiossomos. Sugere-se também que o fluxo de enzimas necessárias para a polimerização dos carboidratos devem passar pelo caminho semelhante.

As observações ultraestruturais da região apical em crescimento, bem como ápice de células com iniciação da formação do chapéu, trouxeram evidências quanto à atuação dos sistemas de retículo endoplasmático complexo de Golgi (figuras 23a e 24a).

O início do desenvolvimento do chapéu ainda permanece pouco elucidado. Num determinado ponto de crescimento da alga, observa-se um entumescimento da zona apical e em volta o surgimento de uma série de protuberâncias e logo abaixo desse anel surge um outro anel de protuberâncias e após a formação dessas duas fileiras, surgem os raios do chapéu entre esses dois anéis (figuras 16 e 17). É evidente que com os primeiros "sintomas" da formação do chapéu, o citoplasma já tenha recebido a mensagem de parar com o crescimento para dar início à formação do chapéu. Como podemos observar pelas figuras 24b e c, para a célula produzir novas estruturas celulares, deve haver uma produção ativa de componentes do citoesqueleto como microtúbulos, estes dando orientações provavelmente através da habilidade de ligarem em polissacarídeos pré-fabricados especificamente. No entanto, nas células de *Acetabularia* nesse estágio bem como no estágio anterior à formação do chapéu, não foi observada a presença de microtúbulos, indicando que a organização de novas estruturas não é dirigida pelos microtúbulos, mas certamente por um outro elemento, similar ao constituinte citoplasmático. Pelos nossos resultados com o emprego de CB no início da formação do chapéu, podemos dizer que provavelmente os filamentos de actina devem estar envolvidos na organização dos chapéus.

Baseados nos resultados das observações ultraestruturais, bem como do núcleo em estágio de máximo desenvolvimento, a produção ativa da síntese de proteínas deve ser para a produção de síntese de precursores da parede celular. Para a formação do chapéu haveria a necessidade de alta produção da parede celular.

A formação da parede celular depende de um funcionamento coordenado de vários sistemas de membranas endoplasmáticas. Eles são os locais de síntese de polissacarídeos da parede celular e operam no transporte dos materiais precursores da parede para aquelas regiões da célula onde é necessitada.

Como foi observada na figura 24b, há a ocorrência de inúmeras vesículas e algumas delas voltadas para o local de formação da nova parede celular. Estas vesículas estão envolvidas na secreção de materiais pré-fabricados da parede e nas suas específicas deposições durante a morfogênese. Também trabalham com alto nível de cooperação com outros sistemas como retículo endoplasmático, Golgi, cloroplastos e mitocôndrias, durante diferentes estádios de diferenciação celular. Todos estes processos são governados pela ação nuclear.

Evidências favorecem um modelo (figura 24c) do qual o retículo endoplasmático de um lado está conectado diretamente com o núcleo via membrana nuclear e por outro lado é capaz de controlar a síntese de diferentes espécies de precursores do material utilizado na formação da parede celular.

A membrana plasmática contém certas enzimas complexas que podem participar na deposição do material da parede celular devido à sua capacidade de conduzir a ligação primária dos carboidratos como o primeiro passo na formação da parede celular (WERZ, 1970a).

A composição química da parede celular das algas foi analisada por diversos autores apresentando certa diversidade nas substâncias constituintes.

As paredes celulares de vários elementos estruturais em uma célula da *Acetabularia* (talo, verticilos estéreis e chapéus) são diferentes na estrutura e na composição de monossacarídeos (WERZ, 1968). Em geral consistem principalmente de manose e com os outros polissacarídeos presentes em menor quantidade (ZETSCHE *et al.*, 1970).

Miwa *et al.* (1961) classificou os principais constituintes da parede celular das algas *Sifonales* como sendo grupo de xilose e de manose. Estes polissacarídeos eventualmente substituem a celulose que ocorre como principal elemento da parede celular de outras plantas. Para o chapéu, Nisizawa *et al.* (1974) encontraram como principal elemento

manose, em contraste com a parede celular dos cistos, que é de celulose.

Backmann e Zetsche (1979) observaram a relação entre a síntese da manose e a atividade de guanosina difosfato manose pirofosforilase e manose sintetase. Ambas enzimas estão com atividade alta quando as células estão em fase de crescimento. E com o termino do crescimento as atividades de ambas enzimas caem, principalmente a manose sintetase que cai para valores bem baixos. Observaram também que nas células nucleadas a atividade de manose sintetase é alta enquanto que nas células anucleadas principalmente quando param de crescer, diminui a atividade da enzima. No momento, a localização da manose sintetase não é certa, mas provavelmente deve ser nos dictiossomas onde ela é sintetizada, inclusive pelo fato que dictiossomas ativos se localizam na região apical da célula.

O interesse especial do estudo da interrelação núcleo-citoplasma na *Acetabularia* está dirigido ao controle da expressão do gene. O núcleo da alga contém o genoma nuclear e todos os componentes para a replicação e transcrição do DNA, ao passo que os produtos da transcrição, as mensagens, são traduzidas no citoplasma sobre o ribossomo 80S.

Mitocôndrias e os cloroplastos contêm sistemas sintetizadores de proteínas que envolvem ribossomos 70S. As organelas também apresentam DNA específico e seus próprios sistemas de replicação e transcrição.

As primeiras evidências que rRNA do ribossomo 70S era codificado pelos cloroplastos foram demonstradas com as células de *Acetabularia*. Por outro lado, foi demonstrado também que várias proteínas dos ribossomos dos cloroplastos são codificadas pelo núcleo (KLOPPSTECH & SCHWARGER, 1973a, b).

A síntese dos ribossomos depende altamente do estágio de desenvolvimento das células. A taxa de síntese aumenta durante a diferenciação da célula.

Cistrons de rRNA de *Acetabularia* foram apresentados como sendo altamente redundantes. A redundância parece estar correlacionada com o comprimento da célula, indicando que amplificação tem lugar pelo menos em grande parte da fase vegetativa (BERGER & SCHWEIGER, 1975b; KLOPPSTECH & SCHWEIGER, 1977).

Nos nossos experimentos as células de 8 mm de comprimento apresentaram valores maiores de incorporação de precursores radioativos na parte basal enquanto que as células de 12 mm de comprimento os valores maiores foram observados na parte do citoplasma. Estes dados confirmaram a atividade do núcleo nesses estádios das células.

Com experimentos de autorradiografia, Janowski e Bonotto (1970) demonstraram que precursores de RNA marcados são incorporados no núcleo e então tornam-se distribuídos ao longo de um gradiente de concentração ápico-basal.

Os ribossomos são levados diferentemente para várias regiões da célula de acordo com as necessidades morfológicas. Schweiger *et al.* (1975) calcularam a velocidade média da taxa de migração de 2 a 4 mm por dia, mais rápido que a taxa de crescimento, que é de 1 a 3 mm por dia de acordo com a espécie e condições de cultura.

A migração, bem como o acúmulo dos ribossomos na parte apical das células foram evidenciados nos cortes ultrafinos de diferentes estádios da célula, confirmando a atividade do núcleo e a sua ligação com a diferenciação do chapéu.

Experimentos sobre diferenciação celular na *Acetabularia* trouxeram a questão sobre a natureza molecular da substância morfogenética postulada por Hämmerling (1932, 1934). Atualmente essa substância morfogenética é representada por uma subfamília de mRNA (KLOPPSTECH & SCHWEIGER, 1975), porém resta ainda uma análise conclusiva.

A identificação da substância morfogenética como sendo mRNA foi apresentada por Kloppstech e Schweiger (1974, 1976), com frações de poli(A) RNA. Eles observaram que em sistemas livres de células, poli(A) RNA estimulava a síntese peptídica tão eficientemente como outros mRNAs. Além disso a síntese de poli(A) RNA somente nas células nucleadas, a sua estabilidade no citoplasma e o transporte através da célula num gradiente ápico-basal.

Durante o desenvolvimento a alga *Acetabularia* passa por uma morfogênese espécie-específica. Nos diferentes estádios da morfogênese, uma população característica de RNAs específicos da espécie reflete a atividade de diferentes genes responsáveis para a expressão das características da espécie.

Nas observações dos cortes ultrafinos, o ápice de célula que está iniciando a formação do chapéu apresentou quantidades altas de ribossomos ligados a membranas formando estruturas típicas do retículo endoplasmático rugoso e também ribossomos livres. Podemos analisar estes resultados como sendo a fase de intensa atividade na síntese proteica para a produção de substâncias precursoras do chapéu (figura 24a). Observando-se o citoplasma da célula nesse mesmo estágio, a presença de mitocôndrias, cloroplastos e aparelhos de Golgi, servem de suporte a essa intensa atividade proteica.

No entanto, células com parada de crescimento, sem formação de chapéu, não apresentaram ribossomos, os cloroplastos alterados, morfologicamente e estruturas do retículo endoplasmático liso, resultando num estágio quase sem atividade de síntese protéica (figura 25a).

Regulação da expressão do gene ao nível de pós-transcrição foi demonstrada nas *Acetabularia* durante a formação do chapéu, por meio de "Northern" hibridização.

Li-Weber & Schweiger (1985) analisando o total de RNA nuclear por "Northern" hibridização detectaram variações significantes na quantidade de RNAs hibridizáveis durante diferentes estádios de diferenciação celular. A quantidade de mensagens específicas da espécie presente na célula era constante nos diferentes estádios de desenvolvimento, mas elas eram traduzidas nos estádios específicos do desenvolvimento, ou seja, no estado que antecede a formação do chapéu.

A presença de quantidades altas de ER rugoso foi observado somente no curto período que antecede a formação do chapéu e isto foi mais uma evidência que atividade de síntese de proteínas está relacionada diretamente com a formação do chapéu.

É de grande interesse a análise dessas proteínas a nível molecular para verificação do tipo de proteínas que estão envolvidas na diferenciação do chapéu.

05. Conclusões

Podemos concluir que:

Nas células com 10 mm de comprimento as informações genéticas liberadas pelo núcleo eram somente para o crescimento a célula, uma vez que quando estas células eram anucleadas, elas não foram capazes de diferenciação morfológica do chapéu. Os nucleolos também ainda se encontravam em fase de maturação com pouca produção de rRNA. Portanto as células anucleadas neste estágio cresciam um pouco, logo formando ápices arredondados.

Células com 12 mm de comprimento apresentavam um núcleo com intensa atividade nucleolar, produzindo precursores do rRNA necessários para a síntese proteica bem como a presença de cromossomos semelhantes a plumosos indicando alta taxa na transcrição dos precursores do mRNA. A medida que estas substâncias vão sendo formadas, são liberadas para o citoplasma e transportadas em direção a região apical onde ficam acumuladas.

As células anucleadas neste estágio conseguiram regenerar porque os RNAs formados no citoplasma a partir dos precursores são codificados de acordo com as informações do núcleo para a síntese específica de proteínas, conduzindo à atividade celular que resultava na formação de chapéu

específico da espécie.

Com esses dados podemos estabelecer que a liberação das informações genéticas necessárias para a formação e diferenciação do chapéu na *Acetabularia* ocorre num intervalo muito curto, cerca de 1 a 2 dias do seu ciclo de vida, que gira em torno de 60 dias (figura 28).

As observações ultraestruturais confirmaram que os nucléolos no estágio que antecede a formação do chapéu, apresentavam-se altamente desenvolvidos produzindo em grande escala os precursores de ribossomos.

A microscopia eletrônica de alta voltagem tornou mais evidente a presença de cromossomos semelhantes a plumosos neste estágio de diferenciação morfológica.

Cortes ultrafinos de ápices de células com início de formação de chapéu observados ao microscópio eletrônico evidenciaram presença maciça de ribossomos livres e ligados às membranas do retículo endoplasmático, mitocôndrias e aparelho de Golgi sugerindo a ocorrência de síntese ativa de proteínas que são necessárias para a diferenciação do chapéu.

Foram observadas também a presença de vesículas secretoras que possivelmente estão encarregadas do transporte de substâncias sintetizadas no RE e no CG em direção aos locais de síntese de novas paredes celulares.

O emprego do isótopo radioativo [^3H]-uridina trouxe resultados satisfatórios evidenciando a migração dos produtos

sintetizados no núcleo e posterior distribuição ao longo da célula. Esses resultados mostraram estar de acordo com as observações ultraestruturais.

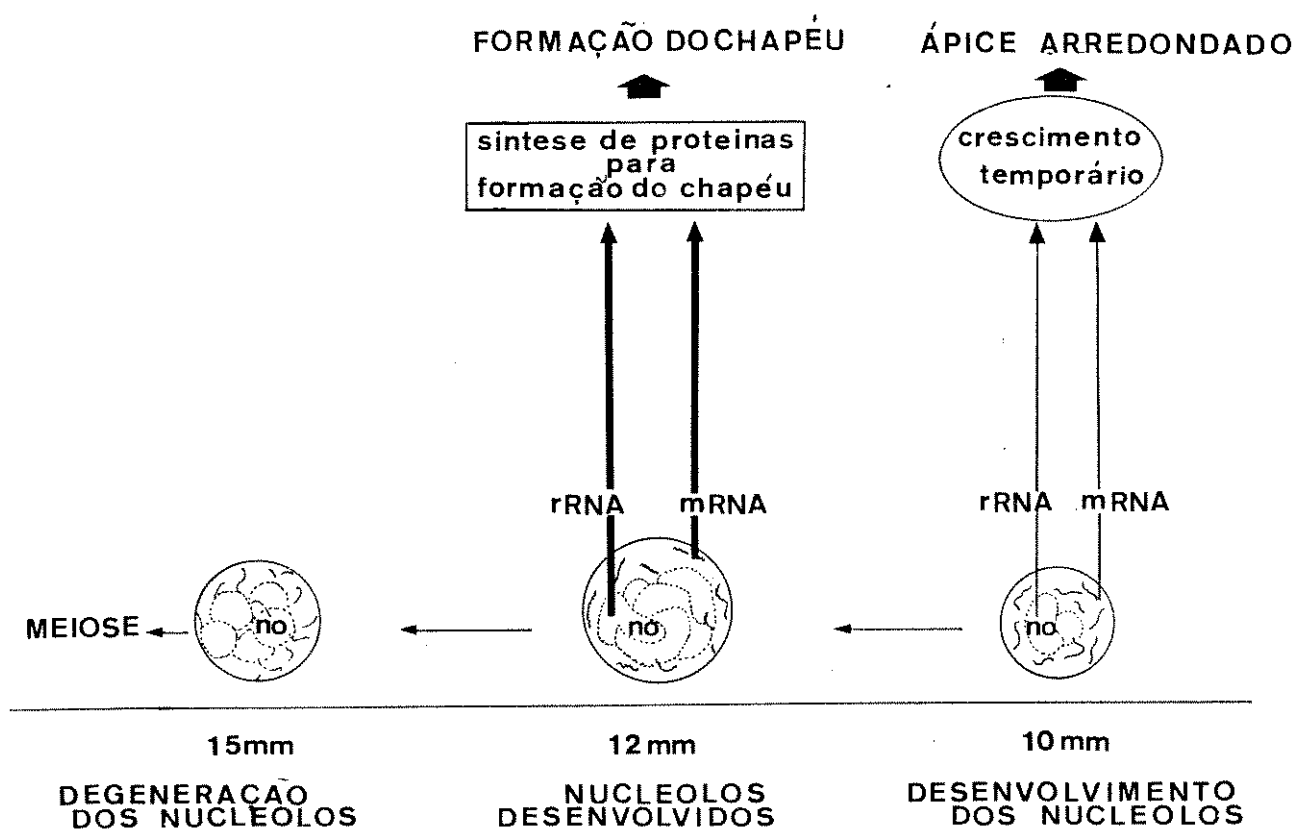


Figura 28) Representação esquemática da relação entre maturação do núcleo e a diferenciação celular.

06. RESUMO

Variações morfológicas do núcleo da alga marinha *Acetabularia calyculus* (Quoy e Gaimard) foram analisadas com emprego do marcador fluorescente DAPI em células de diferentes estágios de crescimento dentro de uma cultura sincronizada.

Os resultados indicaram que o aumento do volume nuclear correspondia à um grande desenvolvimento dos nucléolos durante o crescimento celular. No estágio que antecede a formação de chapéu (12 mm de comprimento) os nucléolos chegavam a ocupar quase que 80% do núcleo, apresentando estruturas típicas conhecidas como "sausage-like shapes"; indicando que neste estágio está ocorrendo a síntese de precursores de rRNA em grande escala.

Paralelamente, os cromossomos apresentavam-se mais soltos, descondensados, assemelhando-se a cromossomos plumosos, sendo que neste estágio observou-se alta taxa de síntese de mRNA.

Esses resultados foram confirmados com as observações ultraestruturais de células com ápices em crescimento e ápices com início de diferenciação do chapéu. Foram observadas formações de ribossomos ligados às membranas do retículo endoplasmático, ribossomos livres, aparelho de Golgi, vesículas secretoras, cloroplastos e mitocôndrias, indicando grande

metabolismo celular, resultando na intensa síntese de proteínas.

A diferenciação do chapéu está relacionada com a formação de novas paredes celulares. Para tanto há uma necessidade de produção maciça de substâncias precursoras da parede celular.

As observações ultraestruturais de ápices de células com início de formação de chapéu evidenciaram a presença de vesículas secretoras voltadas em direção aos locais de síntese de novas paredes celulares. Essas substâncias precursoras necessárias para síntese de novas paredes celulares, sintetizadas no retículo endoplasmático e no Golgi, são provavelmente transportadas via vesículas secretoras.

A análise dos RNAs sintetizados no núcleo e posterior transporte ao longo de célula, com emprego do isótopo radioativo [^3H]-uridina, apresentou resultados que corroboram com os demais resultados obtidos nas observações ultraestruturais.

07. SUMMARY

Morphological variations in the nucleus of the marine algae *Acetabularia calyculus* (Quoy e Gaimard) were analysed by the use of the fluorescent dye DAPI in cells from different stages of growth in a synchronized culture.

The results indicated that the increase in the nuclear volume corresponded to a great development of nucleoli during the cell growth. In the stage before to cap formation (12 mm length) the nucleoli occupied almost 80% of the nucleus, presenting characteristic structures known as "sausage-like shapes"; indicating that there is abundant synthesis of rRNA precursors in this stage.

At the same time, the chromosomes were unpacked, uncondensed, similar to lampbrush chromosomes, as we observed a high mRNA synthesis in this fase.

These results were confirmed by the ultrastructural observations of growing cell tips and cell tips in the beginning of cap differentiation. Endoplasmatic reticulum membrane-attached ribosomes structures, free ribosomes, Golgi apparatus, secretion vesicles, chloroplasts and mitochondria were visualized at this stage indicating a high cellular methabolism, resulting in the intense protein synthesis.

The cap differentiation is related to the formation of new cellular walls. For that to happen there is a need for an intense production of precursor substances of the cell wall. The ultrastructural observations of cell tips at the beginning of cap differentiation showed the presence of secretion vesicles at the sites of formation of new cell wall. These precursor substances for new cell wall synthesis, produced in the endoplasmatic reticulum and Golgi apparatus, were probably being transported by means of secretion vesicles.

The analysis of the radioactive [^3H]-uridine RNA's synthesised in the nucleus and transported along the cell body presented further support for the ultrastructural observations.

08. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ARASAKI, S. 1942. On the life history of *Acetabularia calyculus* Quoy et Gaimard. Bot. Mag., 56(668): 383-90.
- ARASAKI, S. 1966. Ryokuso kasanori rui Dasycladales no seibutsugaku. Kaiyogaku, 8: 1-38.
- ARASAKI, S. & SHIHIRA-ISHIKAWA, S. 1979. Distribution and ecology of *Acetabularia* in Japan. In: BONOTTO, S.; KEFELI, V. & PUISEUX-DAO, S. eds. Developmental biology of Acetabularia. Amsterdam, Elsevier-North-Holland Biomedical Press. p.15-18.
- BACHMANN, P. & ZETSCHKE, K. 1979. A close temporal and spatial correlation between cell growth, cell wall synthesis and the activity of enzymes of mannan synthesis in *Acetabularia mediterranea*. Planta, 145: 331-7.
- BANNWARTH, H. et al. 1985. Damages on *Acetabularia mediterranea* cell grown in culture caused by the marine water-flea *Elasmopus rapax* Costa (Melitidae, Gammaridae, Amphipoda). In: BONOTTO, S.; CINELLI, F. & BILLIAU, R. eds. Acetabularia 1984. Belgium Nuclear Center, p. 53-65.
- BARY, A. de & STRASBURGER, E. 1877. *Acetabularia mediterranea*. Bot. Zeitung., 35: 713-58.
- BERGER, S.; SANDAKHCHIEV, L. & SCHWEIGER, H.G. 1974. Fine structural and biochemical markers of Dasycladaceae. J. Microsc., Paris, 19: 86-104.
- BERGER, S. & SCHWEIGER, H.G. 1975. 80S ribosomes in *Acetabularia major* redundancy of rRNA cistrons. Protoplasma, 83: 41-50.

- BERGER, S. et al. 1975. Morphology of the nucleo-cytoplasmic interactions during the development of *Acetabularia* cells. II. The generative phase. Protoplasma, 84: 223-56.
- BERGER, S. et al. 1987. *Acetabularia*: a giant single cell organism with valuable advantages for cell biology. Eur. J. Cell. Biol., 44: 349-370.
- BOLOUKHERE, M. 1970. Ultrastructure of *Acetabularia mediterranea* in the course of formation of secondary nuclei. In: BRACHET, J. & BONOTTO, S. eds. Biology of Acetabularia. New York, Academic.
- BONOTTO, S. 1985. *Acetabularia* as a link in the marine foodchain. In: BONOTTO, S.; CINELLI, F. & BELLIAU, R. eds. Acetabularia 1984. Belgium Nuclear Center, p. 67-79.
- BONOTTO, S. et al. 1972. Réversibilité des effets de la rifampicine sur la différenciation morphologique d'*Acetabularia mediterranea*. Bul. Soc. R. Bot. Bel., 105: 35-43.
- BONOTTO, S. & LÜTTKE, A. 1980. List of references on Acetabularia and other Dasycladaceae for the period 1960-1980. Belgium Nuclear Center, p. 1-333.
- BONOTTO, S.; SANTULLI, A. & CINELLI, F. 1985. Preliminary investigations on "red" *Acetabularia acetabulum* found in Sicily. In: BONOTTO, S.; CINELLI, F. & BELLIAU, R. eds. Acetabularia 1984. Belgium Nuclear Center, p. 21-33.
- BRACHET, J. 1967. Protein synthesis in the absence of the nucleus. Nature, 18: 650-655.

- BRACHET, J. 1970. Proceedings of the First International Symposium on *Acetabularia*. In. BRACHET, J. & BONOTTO, S. eds. Biology of Acetabularia, New York, Academic, p. 1-300.
- BRACHET, J. 1987. Nucleoplasmic interactions in morphogenesis. Int. Rev. Cytol., 100: p. 249-318.
- CARTER, S.B. 1967. Effects of cytochalasin on mammalian cells. Nature, 213: 261-4.
- CRAIG, I.W. & GIBOR, A. 1970. Biosynthesis of proteins involved with photosynthetic activity in enucleated *Acetabularia* sp. Biochim. Biophys. Acta, 217: 488-95.
- CINELLI, F. 1979. *Acetabularia acetabulum* (L.) Silva, *Acetabularia parvula* Solms-Laubach e *Dasycladus vermicularis* (Scopoli) Krasser (Chlorophyta, Dasycladaceae): Ecology and distribution in the Mediterranean sea. In.: BONOTTO, S.; KEFELI, V. & PUISEUX-DAO, S. eds. Developmental Biology of Acetabularia. Amsterdam, Elsevier, vol. 3, p. 3-14.
- CLAUSS, H. 1970. Effect of red and blue light on morphogenesis and metabolism of *Acetabularia mediterranea*. In. BRACKET, J. & BONOTTO, S. (eds.). Biology of Acetabularia. New York, Academic, p. 177-191.
- DAZY, A.C.; BORGHI, H. & PUISEUX-DAO, S. 1983. RNA migration in *Acetabularia mediterranea* effects of cytochalasin B, cycloheximide and prolonged dark periods. Plant Sci. Lett., 30: 285-96.
- FRANKE, W.W. et al. 1974. Morphology of the nucleo-cytoplasmic interactions during the development of *Acetabularia* cells. I. The vegetative phase. Protoplasma, 82: 249-82.

- GLAUERT, A.M. 1975. Embedding. In. GLAUERT, A.M. ed. Practical methods in electron microscopy. Amsterdam, North Holland. vol 3, p. 133-57.
- GRUN, P. 1958. Plant lampbrush chromosomes. Exp. Cell. Res., 14: 619-21.
- HAMMERLING, J. 1931. Entwicklung und formbildungs-vermögen von *Acetabularia mediterranea*. I. Die normale entwicklung. Biol. Z., 51: 633-47.
- HAMMERLING, J. 1932. Entwicklung und formbildungs-vermögen von *Acetabularia mediterranea*. II. Das formbildungs vermögen kernhaltiger und kernloser teilstücke. Biol. Z., 52: 42-61.
- HAMMERLING, J. 1934. Ueber formbildende substanzen bei *Acetabularia mediterranea* ihre räumliche und zeitliche verteilung und ihre herkunft. Arch. Entwicklungsmech., 131: 1-81.
- HAMMERLING, J. 1935. Ueber genomwirkungen und formbildungs fähigkeit bei *Acetabularia*. Arch. Entwicklungsmech., 132: 424-62.
- HAMMERLING, J. 1940. Transplantations versuche zwische *Acetabularia mediterranea* und *Acetabularia crenulata*. Note 1st. Biol. Mar. Rovigno, 2: 1.
- HAMMERLING, J. 1943. Ein-und zweikernige transplantate zwischen *Acetabularia mediterranea* und *Acetabularia crenulata*. Z. Vererblehre., 81: 114-80.
- HAMMERLING, J. 1953. Nucleo-cytoplasmic relationships in the development of *Acetabularia*. Intern. Rev. Cytol., 2: 475-98.

- HAMMERLING, J. *et al.* 1958. Growth and protein synthesis in nucleate and anucleated cells. Exp. Cell Res., 6: (Suppl.), 210-26.
- HAMMERLING, J. 1963a. Nucleo-cytoplasmic interactions in *Acetabularia* and other cells. Ann. Rev. Plant Physiol., 17: 27-46.
- HAMMERLING, J. 1963b. The role of the nucleus in differentiation in *Acetabularia*. Symp. Soc. Exp. Biol., 17; 127-37.
- HOLTZMANN, E. & NOVIKOFF, A.B. 1965. Células e estrutura celular. 3ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 630p.
- JANOWSKI, M. & BONOTTO, S. 1970. A stable RNA species in *Acetabularia mediterranea*. In: BRACHET, J. & BONOTTO, S. (eds.). Biology of Acetabularia. New York, Academic, London, p. 17-28.
- KLOPPSTECH, K & SCHWEIGER, H.G. 1973a. Nuclear genome codes for chloroplast ribosomal proteins in *Acetabularia*. I. Isolation and characterization of chloroplast ribosomal particles. Exp. Cell Res., 80: 63-8.
- KLOPPSTECH, K & SCHWEIGER, H.G. 1973b. Nuclear genome codes for chloroplast ribosomal proteins in *Acetabularia*. II. Nuclear transplantation experiments. Exp. Cell Res., 80: 69-78.
- KLOPPSTECH, K & SCHWEIGER, H.G. 1974. Polyadenylated RNA from *Acetabularia*. Differentiation, 4: 115-23.
- KLOPPSTECH, K & SCHWEIGER, H.G. 1975. 80S ribosomes in *Acetabularia major*, distribution and transportation within the cell. Protoplasma, 83: 27-40.

- KLOPPSTECH, K & SCHWEIGER, H.G. 1976. *In vitro* translation of poly (A) RNA from *Acetabularia*. Cytobiologie, 13: 394-400.
- KLOPPSTECH, K & SCHWEIGER, H.G. 1977. Maturation of ribosomal RNA in *Acetabularia*. Cytobiologie, 14: 301-9.
- KOOP, H.U. & KIERMAYER, O. 1980a. Protoplasmic streaming in the giant unicellular green alga *Acetabularia mediterranea*. I. Formation of intracellular transport system in the course of cell differentiation. Protoplasma, 102: 147-66.
- KOOP, H.U. & KIERMAYER, O. 1980b. Protoplasmic streaming in the giant unicellular green alga *Acetabularia mediterranea*. II. Differential sensitivity of movement systems to substances acting on microfilaments and microtubule. Protoplasma, 102: 295-306.
- LAMOUREUX, J. 1816. Histoire des polypiers coralliflexibles, vulgairement nommés zoophytes. Caen, 216-317.
- LI-WEBER, M. & SCHWEIGER, H.G. 1985. Evidence for and mechanism of translational control during cell differentiation in *Acetabularia*. Eur. J. Cell Biol., 38: 73-8.
- LUTTKE, A. 1981. Heterogeneity of chloroplasts in *Acetabularia mediterranea*. Heterogeneous distribution and morphology of chloroplast DNA. Exp. Cell Res., 131: 483-488.
- LU, B.C. & RAJU, N.B. 1970. Meiosis in *Coprinus*. II. Chromosome pairing and the lampbrush diplotene stage of meiotic prophase. Chromosoma, 29: 305-16.
- MAEKAWA, T.; TSUTSUI, I & NAGAI, R. 1986. Light-regulated translocation of cytoplasm in green alga *Dichotomosiphon*. Plant Cell Physiol., 27(5): 837-51.

- MENZEL, D. 1986. Visualization of cytoskeletal changes through the life cycle in *Acetabularia*. Protoplasma, 134: 30-42.
- MENZEL, D. & SCHLIWA, M. 1988a. Motility in the siphonous green alga *Eryopsis*. I. Spatial organization of the cytoskeleton and organelle movements. Eur. J. Cell Biol., 40: 275-85.
- MENZEL, D. & SCHLIWA, M. 1986b. Motility in the siphonous green alga *Eryopsis*. II. Chloroplast movement requires organized arrays of both microtubules and actin filaments. Eur. J. Cell Biol., 40: 286-95.
- MERGENHAGEN, D. & SCHWEIGER, H.G. 1975. The effect of different inhibitors of transcription and translation of the expression and control of circadian rhythm in individual cells of *Acetabularia*. Exp. Cell Res., 94: 321-6.
- MILLER, O.L.Jr. & HAMKALO, B.A. 1972. Visualization of RNA synthesis on chromosomes. Inter. Rev. Cytol., 33: 1-25.
- MIWA, T.; IRIKI, Y & SUZUKI, T. 1961. Mannan and xylan as essential cell wall constituents of some siphonous green algae. Colloq. Int. Nat. Rech. Sci., 135-144.
- MULLER, M. 1962. Über jahres und lunar-periodische erscheinungen bei einigen braunalgen. Bot. Mar., 4; 140-55.
- MULLER, W.P. 1974. The lampbrush chromosomes of *Xenopus laevis* (Daudin). Chromosoma, 47(3): 283-96.
- NAGAI, R. 1977. Differential treatment of *Chara* cells with CB with special reference to its effect on cytoplasmic streaming. Exp. Cell Res., 108: 231-7.

- NAGAI, R. & KAMIYA, N. 1977. Differential treatment of *Chara* cells with cytochalasin B with special reference to its effect on cytoplasmic streaming. Exp. Cell Res., 108: 231-7.
- NAGAI, R. & FUKUI, S. 1981 Differential treatment of *Acetabularia* with cytochalasin B and N-ethylmaleinide with special reference to their effects on cytoplasmic streaming. Protoplasma, 109: 79-89.
- NAUMOVA, L.P.; PRESSMAN, E.K. & SANDAKCHEIV, L.S. 1976. Gradient of RNA distribution in the cytoplasm of *Acetabularia mediterranea*. Plant Sci. Lett., 6: 231-5.
- NISHIBAYASHI, S. & KUROIWA, T. 1982. Behavior of leucoplast nucleoids in the epidermal cell of onion (*Allium cepa*) bulb. Protoplasma, 110: 177-84.
- NISIZAWA, K. et al. 1974. Main cell wall constituents of the cysts of *Acetabularia*. Bot. Mar., 17: 16-9.
- PEREZ-RUFAZA, I. & GABRIEL, J.L. 1985. Notas sobre ecologia de Dasycladales en el S.E. de España. In. BONOTTO, S; CINELLI, F. & BILLIAU, R. eds. Acetabularia 1984. Belgium Nuclear Center, p. 45-51.
- POLYSCIENCES, Inc. 11/73 Spurr Low - viscosity embedding media.
- PUISEUX-DAO, S. 1970. Acetabularia and cell biology. PUISEUX-DAO, S. ed. London, Logos, p. 1-159.
- PUISEUX-DAO, S. et al. 1979. Cytoplasmic streaming and chloroplast differentiation in *Acetabularia*. In.: BONOTTO, S.; KEFELI, V & PUISEUX-DAO, S. eds. Developmental Biology of Acetabularia. Amsterdam, Elsevier, p. 141-53.

- SANO, O.; IKEMORI, M. & ARASAKI, S. 1978. Distribution and ecology of *Acetabularia calyculus* and *Halophila ovalis* along the coast of Toyama bay in Noto Peninsula. J. Geobot., 31(2): 49-61.
- SANO, O.; IKEMORI, M. & ARASAKI, S. 1981. Distribution and ecology of *Acetabularia calyculus* along the coast of Noto Peninsula. Japan. J. Phycol., 29: 31-8.
- SCHWEIGER, H.G. 1969. Cell biology of *Acetabularia*. Curren. Top. Microbiol. Immunol., 50: 1-36.
- SCHWEIGER, H.G. 1970. Regulatory problem in *Acetabularia*. In.: BRACHET, J. & BONOTTO, S. Biology of Acetabularia. New York, Academic, p. 3-12.
- SCHWEIGER, H.G. et al. 1974. Some fine structural and biochemical features of *Acetabularia major* (Chlorophyta, Dasycladaceae) grown in the laboratory. Phycologia, 13(1): 11-20.
- SCHWEIGER, H.G. et al. 1975. *Acetabularia*: a cellular model for the study of nucleoplasmic interactions. In.: PUISEUX-DAO, S. ed. Molecular biology of nucleo-cytoplasmic relationships. Amsterdam, Elsevier, p. 203-15.
- SCHWEIGER, H.G. 1977. Transcription of the nuclear genome of *Acetabularia*. In.: BOGORAD, L. & WEIL, J.H. eds. Nucleic acids and protein synthesis in plants. New York, Plenum, p. 65-83.
- SHIHIRA-ISHIKAWA, I. 1982. Gigantic primary nucleus in *Acetabularia*. Japan. J. Phycol., 30: 241-55.

- SHIHIRA-ISHIKAWA, I. 1984. Chromosome behavior in the primary nucleus of *Acetabularia calyculus* as revealed by epifluorescent microscopy. Protoplasma, 122: 27-34.
- SHIHIRA-ISHIKAWA, I. 1987. Kasanori no kutai. Jden, 41(11): 50-6.
- SHIHIRA-ISHIKAWA, I. & KUROIWA, T. 1984. Morphological transition of the nucleus during the whole life cycle of *Acetabularia calyculus* Quoy et Gaimard. Japan. J. Phycol., 32: 147-57.
- SHIHIRA-ISHIKAWA, I.; YANO, D.M.Y. & IMAHORI, K. 1982. An interspecific graft between two species of *Acetabularia*. Japan. J. Phycol., 30: 1-7.
- SHIHIRA-ISHIKAWA, I.; YANO, D.M.Y. & IMAHORI, K. 1985. Morphological variability and plasticity in cultured cells of *Acetabularia calyculus* (Chlorophyceae). In.: HARA, H. ed. Origin and evolution of diversity in plants and plant communities. Tokyo, Academia Scientific Book, p. 245-56.
- SILVA, P.C. 1952. A review of nomenclatural conservation in the algae from the point of view of the type method. Univ. Calif. Publ. Bot., 25: 241-323.
- SOLMS-LAUBACH, H.G. 1895. Monography of the Acetabulariae. Trans. Linn. Soc. Lond. Bot., 2.5: 1-39.
- SOSA, E.H. 1985. Contribution to the knowledge of the Cuban Dasycladales. In.: BONOTTO, S.; CINELLI, F. & BILLIAU, R. eds. Acetabularia 1984. Belgium Nuclear Center, p. 35-43.
- SPRING, H. et al. 1974. Structural and biochemical studies of the primary nucleus of two green algae, *Ac. mediterranea* and *Ac. major*. Cytobiologie., 10(1): 1-65.

- SPRING, H. et al. 1975. Lampbrush-type chromosomes in the primary nucleus of the green alga *Acetabularia mediterranea*. Chromosoma, 50: 25-43.
- SPRING, H. et al. 1978. DNA contents and numbers of nucleoli and pre-rRNA-genes in nuclei of gametes in vegetative cells of *Acetabularia mediterranea*. Exp. Cell Res., 114: 203-15.
- SPURR, A. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res., 26: 31-43.
- TIKHOMIROVA, et al. 1979. The ultrastructure of the nucleus and the perinuclear zone during cell development in *Acetabularia*. In.: BONOTTO, S.; KEFELI, V & PUISEUX-DAO, S. eds. Developmental Biology of Acetabularia. Amstercam, Elsevier. p.103-13.
- TRENDELENBURG, M.F. et al. 1974. Morphology of nucleolar cistrons in a plant cell, *Acetabularia mediterranea*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 71(9): 3626-30.
- VALET, G. 1969. Contribution à l'étude des Dasycladales. Nova Hedwigia., 17: 552-637.
- VANDEN-DRIESSCHE, T.; BONOTTO, S. & BRACHET, J. 1970. Inability of rifampicin to inhibit rythmicity in *Acetabularia* despite inhibition of RNA synthesis. Biochim. Biophys. Acta, 224: 631-4.
- VANDEN-DRIESSCHE, T. & CAUBERGS, R. 1985. Inhibiting transduction of blue light signals in *Acetabularia*. In.: BONOTTO, S.; CINELLI, F. & BILLIAU, R. (eds.). Acetabularia 1984. Belgium Nuclear Center, p. 91-100.
- WERZ, G. 1960. Anreicherung von ribonuclein-säure in der wuchszone von *Acetabularia mediterranea*. Planta, 55: 22-37.

- WERZ, G. 1968. Plasmatische form bildung als voraussetzung für die zellwandbildung bei der morphogenese von *Acetabularia*. Protoplasma: 65: 81-96.
- WERZ, G. 1970. Cytoplasmic control of cell wall formation in *Acetabularia*. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 51: 27-62.
- WERZ, G. 1970a. Mechanisms in cell wall formation in *Acetabularia*. In.: BRACHET, J. & BONOTTO, S. eds. Biology of Acetabularia. New York, Academic, p. 125-44.
- WESSELS, N. et al. 1971. Microfilaments in cellular and developmental processes. Contractile microfilament machinery of many cell types in reversibly inhibited by cytochalasin B. Science, 171: 135-43.
- WOODCOCK, C. L. F., 1971. The anchoring of nuclei by microtubules in *Acetabularia*. J. Cell Sci., 8: 611-21.
- YAMAOKA, D. M. 1980. Tese de Mestrado. Universidade de Osaka, Japão.
- ZETSCHE, K. et al. 1970. Regulation of enzyme activity during morphogenesis of nucleate and anucleate cells of *Acetabularia*. In.: BRACHET, J. & BONOTTO, S. eds. Biology of Acetabularia. New York, Academic, p. 87-110.