André Vinicius Fonseca de Faria

“Efeitos da irradiância na fisiologia de *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): uma abordagem intraespecífica”

São Paulo

2015

André Vinicius Fonseca de Faria

"Efeitos da irradiância na fisiologia de *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): uma abordagem intraespecífica"

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Botânica.

Orientador(a): Profª. Drª. Estela Maria Plastino

São Paulo

2015

De Faria, André Vinicius Fonseca

“Efeitos da irradiância na fisiologia de *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): uma abordagem intraespecífica” 97 páginas.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1 - *Gracilaria caudata*; 2 - Crescimento; 3 - Fotossíntese; 4 - Conteúdo pigmentar; 5 - Diversidade intraespecífica.

I - Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências.

Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora

_____ _____

Prof(a). Dr(a). Prof(a). Dr(a).

_____

Prof(a). Dr(a). Orientador(a)

Aos meus pais, Inês e Roberto,

minha irmã, Milena, com muito

amor e carinho.

I must go down to the seas again, to the lonely sea and the sky,
And all I ask is a tall ship and a star to steer her by;
And the wheel's kick and the wind's song and the white sail's shaking,
And a grey mist on the sea's face, and a grey dawn breaking,

I must go down to the seas again, for the call of the running tide
Is a wild call and a clear call that may not be denied;
And all I ask is a windy day with the white clouds flying,
And the flung spray and the blown spume, and the sea-gulls crying.

I must go down to the seas again, to the vagrant gypsy life,
To the gull's way and the whale's way where the wind's like a whetted knife;
And all I ask is a merry yarn from a laughing fellow-rover,
And quiet sleep and a sweet dream when the long trick's over.

Sea Fever, John Masefield

Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Estela M. Plastino pelos ensinamentos, pela amizade, paciência e confiança nestes tempos que passamos juntos.

Ao Rosário Petti, pelas conversas, companheirismo, ajuda e suporte técnico durante os experimentos realizados no LAM. Aos técnicos William Silva Oliveira e André Nakasato pelo companheirismo, ajuda e suporte técnico.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado concedida (nº 300148/93-3, 159759/2012-9).

Aos LAMigos, Jana, Bia, Fábio, Alexandre, Cíntia, Lígia, Nuno, Ana, Bruno, Laís, Fernando, Mário, Fabiana, Vanessa, Talissa, Karoline, Talita, Mariana e Carol pela convivência, conversas, ajudas e companhia dentro e fora do laboratório.

Aos professores do LAM, Flávio, Fungyi, Mariana, Suzana e Valéria pela oportunidade de conhecê-los e pela agradável convivência.

Ao Dr. Roberto Munehisa Shimizu por ceder um tempo e ajudar com questões de estatísticas.

Índice

Capítulo 1. Introdução geral **9**

Referências 22

Capítulo 2. Physiological characterization of a greenish-brown mutant from natural population of *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta) **31**

Resumo 31

Abstract 31

Introduction 32

Materials and Methods 33

Results 35

Discussion 41

References 43

Capítulo 3. Efeitos da irradiância em gametófitos de *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta) procedentes de três populações da costa brasileira: crescimento; fotossíntese; conteúdo pigmentar e protéico **48**

Resumo 48

Abstract 49

Introdução 49

Materiais e Métodos 50

Resultados 52

Discussão 63

Referência 64

Capítulo 4. Efeitos da irradiância em gametófitos e tetrasporófitos de *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta) procedentes de três populações da costa brasileira: crescimento; fotossíntese; e conteúdo pigmentar **68**

Resumo 68

Abstract 69

Introdução 70

Materiais e Métodos 71

Resultados 73

Discussão 85

Referência 88

Capítulo 5. Conclusão geral **91**

Referência 93
Resumo **95**
Abstract **96**

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

1. Importância econômica de Rhodophyta

As macroalgas vêm sendo cultivadas há séculos, com registros de atividades de cultivo por volta de 1650 (Ohno e Largo 1998). Inicialmente, os cultivos foram desenvolvidos empiricamente e utilizados para a produção de alimento humano em países com histórico no consumo de macroalgas marinhas, como Japão, Coréia e China (Oohusa 1993).

Algumas macroalgas são importantes produtoras de hidrocolóides e o mercado de algas para essa produção continua a crescer, impulsionado pelos mercados emergentes da China, Leste Europeu, Brasil, entre outros (Bixler e Porse 2011). No Brasil, o cultivo das algas no ambiente marinho é proposto como uma alternativa à obtenção de matéria-prima para a produção de ficocolóides (Oliveira 1998). Entretanto, para a implantação de programas de maricultura de macroalgas, é fundamental o conhecimento da fisiologia do desenvolvimento da espécie selecionada.

As algas vermelhas constituem um filo de organismos que compartilham uma combinação de atributos como: células eucarióticas, ausência de flagelo, amido das florídeas, pigmentos ficobiliproteínas e tilacóides não agregados nos cloroplastos (Woelkerling 1990). Apresentam ainda grande importância econômica pela produção de ficocolóides. Esses colóides vêm sendo utilizados como meio de cultura, em microbiologia, e na indústria alimentícia, como componentes de geléias, gelatinas e bebidas. Têm sido empregados ainda, na preparação de géis para estudos de biologia molecular (Armisen 1995; Oliveira 1997; Falcão 2008).

O gênero *Gracilaria* Greville (Rhodophyta, Gracilariales) inclui cerca de 230 espécies amplamente distribuídas (Guiry e Guiry 2014). Várias de suas espécies apresentam potencial para maricultura (Dawes et al. 1999). É considerado a principal fonte de ágar, sendo utilizado como meio de cultura em bacteriologia e micologia (Cunha et al. 2009). Além disso, suas espécies vêm sendo testadas e empregadas na biorremediação de efluentes provenientes da maricultura (Jones et al. 2001; Msuya e Neori 2002; Yang et al. 2006; Marinho-Soriano et al. 2002, 2006; Zhou et al. 2006; Tyler e McGlathery 2006), na alimentação humana e no preparo de ração (Rothman et al. 2009).

A costa brasileira, banhada por águas tropicais e subtropicais, propicia locais adequados ao crescimento de algas e à riqueza de espécies, principalmente espécies com alto valor econômico (Oliveira e Miranda 1998). Tentativas de cultivos de *Gracilaria* no Brasil são escassas. Alguns dos motivos pelo

insucesso desses cultivos são: i) a falta de tradição dessa atividade econômica; ii) a falta de tradição no consumo de algas na alimentação humana; e iii) as escassas informações sobre a fisiologia das espécies a serem selecionadas para cultivo (Oliveira 1981, 1998). Mesmo apresentando um histórico comercial sem grandes sucessos, o extrativismo de algas gracilarióides para a obtenção de ágar vem crescendo desde a década de 60 (Câmara-Neto 1987; Hayashi et al. 2014).

1.2. Irradiância

A radiação fotossinteticamente ativa (PAR), que corresponde à faixa de 400-700 nm (McCree, 1981) apresenta um máximo de 500 W m^{-2} nas regiões tropicais, correspondendo aproximadamente a uma taxa de fluxo de fótons de 2500 μmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (Lüning 1990). O nível de irradiância no mar é reduzido com o aumento da profundidade. No fundo do mar, mais de 90% é permanentemente escuro e não possibilita o crescimento de algas. A energia solar apresenta alteração na sua qualidade e quantidade de luz a medida que penetra no oceano. Essa energia possibilita que as algas se diferenciem, utilizando toda a faixa de luz visível. A irradiância pode influenciar no crescimento, fotossíntese e concentração pigmentar das algas (Gantt 1990; Lüning 1990). As algas se distinguem a partir dos seus pigmentos acessórios, sendo esses, importantes para captação de luz em diferentes comprimentos de onda, como em algas vermelhas, que apresentam clorofila *a*, carotenóides e ficobiliproteínas (Gantt 1990; Lüning 1990; Lobban e Harrison 1994).

Ficólogos são confrontados com muitas questões fundamentais para o entendimento da importância da luz quanto à distribuição e ocorrência sazonal das algas. Essas questões são: i) quanto a distribuição do espectro de luz influencia no processo de fotossíntese e crescimento?; ii) quais irradiâncias são limitantes, saturantes ou inibitórias nesses processos?; e iii) quais faixas espectrais e níveis de irradiâncias são usados pelas algas como sinais ambientais de fotomorfogênese, fotoperiodismo e outros fenômenos induzidos pela luz? (Lüning 1990). Estudos de laboratório podem contribuir para a melhor compreensão desses aspectos.

Algas vermelhas podem sobreviver numa ampla variação de irradiância, embora sejam consideradas algas de "sombra". Testes de crescimento realizados em condições controladas mostraram que espécies do gênero *Gracilaria* apresentam preferências para crescimento em altas irradiâncias: i, *G. birdiae* e *G. caudata* apresentam maiores taxas de crescimento em 200 μmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, quando comparadas a algas cultivadas em 100 μmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (Ursi 2005; Faria 2010); ii, *G. chorda* apresenta maiores taxas de crescimento em 60-120 μmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, quando comparada a algas cultivadas entre 20-40 μmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (Kakita et al. 2006); e iii, *G. vermiculophylla* apresenta maiores taxas de crescimento em 100 μmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, quando comparada a algas cultivadas entre 20-60 μmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (Yokoya et

al. 1999). A habilidade em utilizar altos níveis de irradiância em ambientes naturais pode ser uma das razões da alta eficiência fotossintetizante observada em espécies de *Gracilaria* (Lapointe e Ryther 1978; Lapointe 1981).

1.3. Diversidade intraespecífica

A diversidade intraespecífica compreende o conjunto de expressões fenotípicas resultantes de processos de aclimatação e/ou adaptação. Essas expressões fenotípicas ocorrerem em uma mesma espécie, podendo ser morfológicas, fisiológicas e genéticas, e contribuem para o sucesso dos indivíduos e/ou populações, quando submetidos a variações ambientais. A aclimatação corresponde às diferentes expressões de ajustamento ao ambiente que um organismo pode sofrer dentro do limite de seu genótipo. Já, a adaptação corresponde à expressão de ajustamento ao ambiente decorrente de alteração no genótipo (Plastino 2004).

Variações genotípicas intraespecíficas podem ocorrer em uma mesma população ou entre populações distintas. Essas variações são denominadas de polimorfismo, quando em um mesmo habitat ocorrem, simultaneamente, duas ou mais formas descontínuas de determinada espécie, em tais frequências que a mais rara delas não pode ser meramente mantida por mutação recorrente ou imigração (Ford 1964). Assim, o polimorfismo é decorrente de processos adaptativos em uma mesma população, e as variantes são denominadas de morfos ou morfotipos (Plastino e Guimarães 2001). No entanto, quando as variações genotípicas estão relacionadas a adaptações dos organismos a ambientes distintos, resultando em populações de uma mesma espécie geneticamente diferentes, utiliza-se o termo ecótipo (Innes 1984; Plastino e Guimarães 2001).

Dentre os estudos que enfocam aspectos da diversidade intraespecífica, podemos destacar aqueles que tratam de espécies de algas vermelhas que apresentam variação pigmentar. Variantes pigmentares de *Gracilaria* na natureza têm sido reportados na literatura para populações de *G. birdiae* (Ursi et al. 2001; Plastino et al. 2004; Costa et al. 2011), *G. chilensis* (González et al. 1995), *G. conferta* (Levy et al. 1990), *G. domingensis* (Plastino et al. 1999) e *G. tikvahiae* (van der Meer et al. 1977). Os estudos sobre variantes pigmentares têm contribuído para a compreensão e caracterização da composição pigmentar (van der Meer e Bird 1977; van der Meer 1979; Kursar et al. 1983a e b; Ramus e van der Meer 1983; Guimarães 2000; Plastino et al. 2004; Costa e Plastino 2011), do crescimento (van der Meer 1979; Guimãraes 2000; Ursi 2000; Ursi e Plastino 2001; Ferreira et al. 2006), da fotossíntese (Guimarães 2000; Ursi 2005; Donato 2005; Ayres-Ostrock e Plastino 2014*a*), da diferenciação de calos (Ramlov et al. 2013) e da frequência em populações naturais (Guimarães et al. 2003); alguns deles visam selecionar as melhores linhagens com potencial para a maricultura (Carneiro 2011; Ursi et al. 2013). Essas investigações, além de contribuírem

para o conhecimento amplo das algas gracilarióides, vêm contribuindo na seleção de modelos para experimentos relacionados a processos fisiológicos e expressão gênica plastidial, e devem permitir a seleção de espécies e/ou linhagens de agarófitas mais produtivas, que possam propiciar um melhor aproveitamento econômico desse recurso (Plastino 2004).

Em algas vermelhas existem algumas espécies para as quais foram descritos ecótipos. Esses ecótipos apresentam distintas taxas de crescimento e eficiência fotossintetizante. Karsten (1994) observou que *Bostrychia radicans* procedente de populações ao longo da costa dos EUA apresentou diferentes taxas de crescimento, quando submetida a diferentes concentrações de salinidade. Ecótipos relacionados à salinidade foram também relatados para outras espécies como *Delesseria sanguinea* e *Membranoptera alata*, quando comparadas populações provenientes do Atlântico norte e do Mar Báltico (Rietema 1991). Ecótipos relacionados à temperatura foram descritos para populações do Mar Mediterrâneo e Mar Índico (Eggert et al. 2003). Em *Gracilaria*, ecótipos foram observados para *G. birdiae* e *G. caudata*, quando submetidas a diferentes condições de PAR e ultravioleta-B: *G. birdiae*, procedentes das populações dos Estados do Ceará e Espírito Santo (Ursi et al. 2003, 2013; Ayres-Ostrock e Plastino 2014*a* e *b*); e *G. caudata* procedentes das populações dos Estados Ceará e São Paulo (Araújo et al. 2014).

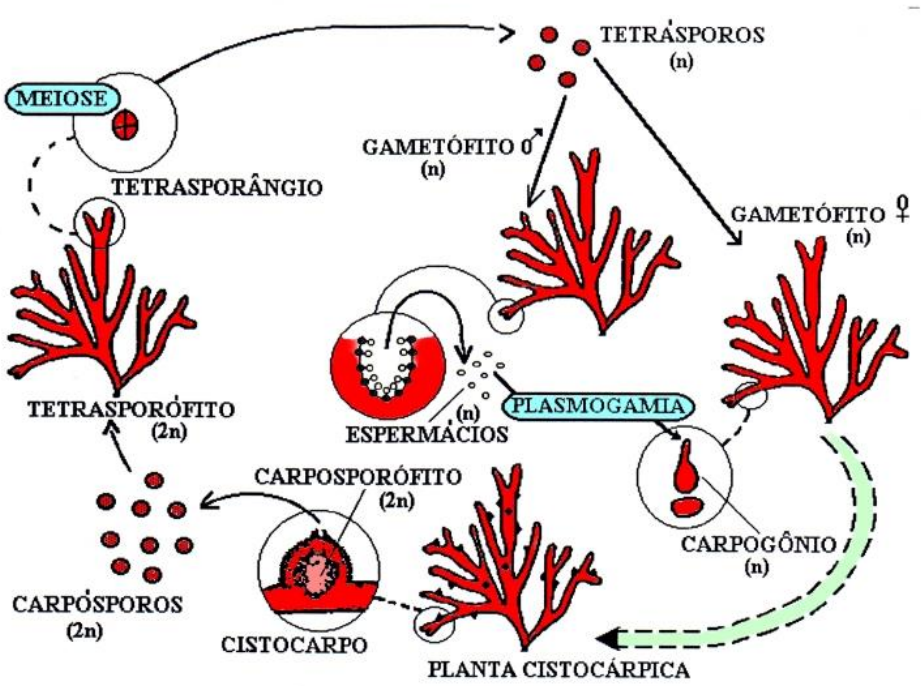

Figura 2. Histórico de vida de *Gracilaria* spp. (Oliveira e Plastino 1994).

O gênero *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) apresenta um histórico de vida trifásico, compreendendo a fase carposporofítica, gametofítica e tetrasporofítica, sendo as duas últimas isomórficas e independentes (Fig. 2). Embora *Gracilaria* apresente fases isomórficas, é possível que existam diferenças fisiológicas entre elas, como já reportado para algumas espécies do gênero (Guimarães 2000; Ursi et al. 2001; Costa 2005; Ferreira 2008; Barufi et al. 2015).

A literatura reporta vantagens e desvantagens dos haplóides e diplóides: i) organismos diplóides possuem duas cópias de cada gene, o que poderia acelerar o ritmo de adaptação a novos ambientes. Esses indivíduos possuem duas vezes mais probabilidade de ter uma nova mutação benéfica do que os haplóides, consequentemente, diplóides evoluiriam mais rápido; ii) diplóides mantêm maior variação genética porque as mutações persistem, e isto pode melhorar a capacidade de diplóides responderem às mudanças ambientais. Porém, indivíduos diplóides estariam em desvantagem em relação aos haplóides devido ao maior gasto energético para replicação de seu DNA, e as células haplóides poderiam ter uma vantagem nutricional em relação a células diplóides, especialmente em fases unicelulares (Lewis 1985; Hughes e Otto 1999). A relação superfície/volume em células haplóides é comumente maior do que em células diplóides, que apresentam uma relação superfície/volume menor (Hughes e Otto 1999). Essa variação na área e no volume entre as fases poderia propiciar melhores taxas de crescimento e/ou sobrevivência aos gametófitos jovens em determinados ambientes, especialmente em locais escassos de nutrientes. Quanto maior a área de superfície da célula, maior a eficiência e capacidade de transportar nutrientes através da membrana celular (Lewis 1985; Mable e Otto 1998; Hughes e Otto 1999). Destombe et al. (1993) observaram que indivíduos haplóides de *Gracilaria verrucosa* apresentam maiores taxas de crescimento que indivíduos diplóides quando cultivados em água do mar escassa em nutrientes; o inverso foi observado quando esses indivíduos foram cultivados em água do mar rica em nutrientes. Com isso, indivíduos haplóides, quando comparados a diplóides, poderiam apresentar um desempenho melhor em locais escassos de nutrientes, absorvendo maiores concentrações de nutrientes e sobrevivendo (Lewis 1985). Contudo, além da importância da área superficial, a fertilidade pode influenciar negativamente no desempenho e no desenvolvimento de gametófitos ou tetrasporófitos. Guillemin et al. (2014) observaram que gametófitos e tetrasporófitos inférteis de *G. chilensis* apresentaram maiores taxas de crescimento e eficiência fotossintetizante quando comparados a essas mesmas fases na forma reprodutiva. Algas no estado reprodutivo reduzem ou cessam o seu crescimento para que os recursos energéticos voltados a esse processo sejam compartilhados para o desenvolvimento das estruturas reprodutivas (Santelices et al. 1995).

1.4. *Gracilaria caudata*

Gracilaria caudata J. Agardh possui uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o Caribe até o litoral sul do Brasil, Município de Laguna, estado de Santa Catarina, 28°S (Plastino e Oliveira 1997). A espécie apresenta um talo cilíndrico, de coloração vermelho-vinácea, com até 34 cm de comprimento e 1,7mm de diâmetro (Fig. 3). Do apressório, diferencia-se um ou mais ramos, que podem atingir até a quinta ondem (Plastino e Oliveira 1997). Essa espécie é explotada como uma importante agarófita no nordeste do Brasil (Oliveira e Alveal 1990), sendo coletada em grandes quantidades para extração de ágar alimentício destinado ao mercado nacional (Oliveira e Miranda 1998). Existem poucas informações sobre o cultivo de *G. caudata*. Alguns estudos indicam que a espécie possui potencial para maricultura (Assad-Ludewings 1984; Oliveira e Miranda 1998; Marinho-Soriano et. al. 2002). Além disso, possui um ágar economicamente viável, visto que seu rendimento e teores de 3,6-anidrogalactose e sulfato são semelhantes aos observados para espécies explotadas comercialmente nas Filipinas (Yoshimura 2006). A espécie ainda demonstrou eficiência para remoção de compostos nitrogenados e fosfatos, obtendo um crescimento modesto em tanque de efluentes provenientes de cultivos de camarão (Marinho-Soriano et al. 2009).

Fig.3 Aspecto geral de *Gracilaria caudata* na natureza (Foto: E. M. Plastino).

Devido ao potencial econômico de *Gracilaria caudata*, alguns aspectos relacionados à sua biologia foram estudados em condições controladas de laboratório. O histórico de vida é do tipo "*Polysiphonia*" (como *Gracilaria* aff. *verrucosa*; Oliveira e Plastino 1984). Outros experimentos permitiram avaliar a atividade da nitrato-redutase (Chow et al. 2007) e mostraram que a espécie apresenta valores ótimos de crescimento em temperaturas de 26-30ºC (Yokoya et al. 1992*b*) e salinidade de 35 ups (Yokoya et al. 1992*a*). Estudos mais recentes têm focado em aspectos da diversidade intraespecífica, como o que verificou que tetrasporófitos apresentam maiores taxas de crescimento que gametófitos, e indivíduos de populações

distintas respondem diferentemente quando submetidos à radiação ultravioleta B (Araújo et al. 2014). Além disso, essa diversidade vem sendo confirmada pela avaliação de parâmetros da fotossíntese em populações naturais e pelo uso de marcadores genéticos (Ayres-Ostrock 2015).

2. Objetivo e hipóteses

O objetivo deste trabalho foi verificar e compreender os aspectos da diversidade intraespecífica de *Gracilaria caudata*, abrangendo o conhecimento sobre os eventuais efeitos da irradiância (70 e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}) em linhagens tetrasporofíticas e gametofíticas femininas procedentes de três populações distintas, duas delas do Nordeste e outra do Sudeste brasileiro. Foi também avaliada uma variante de cor. Foram analisados os seguintes parâmetros: i) crescimento; ii) fotossíntese; iii) conteúdo pigmentar; e iv) conteúdo protéico.

Essa abordagem permitiu testar as seguintes hipóteses:

- Tetrasporófitos em altas irradiâncias (150 µmol fótons m^{-2} s^{-1}) apresentam melhor desempenho somático, quando comparados a tetrasporófitos cultivados em baixas irradiâncias (70 µmol fótons m^{-2} s^{-1}) (Cap. 2 e 4). O mesmo se espera para gametófitos (Cap. 3 e 4);

- Gametófitos procedentes das diferentes populações apresentam respostas adaptativas distintas (Cap. 3 e 4). O mesmo se espera para tetrasporófitos (Cap. 4);

- Tetrasporófitos apresentam melhor desempenho somático quando comparados a gametófitos femininos de uma mesma população (Cap. 4);

- A fertilidade afeta de forma negativa as taxas de crescimento de tetrasporófitos, porém não afeta o desempenho fotossintetizante de tetrasporófitos (Cap. 2);

- Tetrasporófitos de coloração vermelha (selvagem) apresentam melhor desempenho somático em comparação aos de coloração marrom-esverdeada (mutante), independentemente da irradiância testada. Esses últimos apresentam menor conteúdo de ficoeritrina e maior de ficocianina e aloficocianina, quando comparados aos de coloração vermelha (Cap. 2);

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais biológicos

Culturas unialgáceas foram obtidas a partir de esporos derivados de linhagens de *Gracilaria caudata* provenientes de diferentes locais da costa brasileira. O material encontra-se depositado no Banco de Germoplasma de Gracilariaceae do Laboratório de Algas Marinhas "Édison José de Paula" do Instituto

de Biosciências da Universidade de São Paulo (LAM – IBUSP) (Costa et al. 2012) e no Herbário do IB-USP (SPF). A seguir, é detalhada a procedência das diferentes linhagens utilizadas neste trabalho.

a) Linhagens de coloração vermelha (selvagem) - Praia Pedra Rachada (3°44'44,90" S 38°29'47,62" O), Paracuru, Estado do Ceará:

i) Gametófitos femininos derivados da germinação de tetrásporos liberados por tetrasporófitos de coloração vermelha coletados em 08/02/2012 (SPF 57842);

ii) Tetrasporófitos derivados da germinação de carpósporos liberados por plantas cistocárpicas de coloração vermelha coletadas em 08/02/2012 (SPF 57843);

b) Linhagens de coloração marrom-esverdeada - Praia Pedra Rachada, Paracuru, Estado do Ceará:

i) Tetrasporófitos derivados da germinação de carpósporos liberados por plantas cistocárpicas de coloração marrom-esverdeada coletadas em 08/02/2012 (SPF 57848);

c) Linhagens de coloração vermelha - Praia do Emissário (12°44' 28,0" S 38°09'01,0" O), Arembepe, Estado da Bahia:

i) Gametófitos femininos derivados da germinação de tetrásporos liberados por tetrasporófitos coletados em 14/10/2012 (SPF 57846);

ii) Tetrasporófitos derivados da germinação de carpósporos liberados por plantas cistocárpicas coletadas em 14/10/2012 (SPF 57847).

d) Linhagens de coloração vermelha - Praia Dura (23°30'2,58" S 45°10'31,58" O), Ubatuba, Estado de São Paulo:

i) Gametófitos femininos derivados da germinação de tetrásporos liberados por tetrasporófitos mantidos no Banco de Germoplasma (SPF 57845) – tetrásporos liberados em 7/12/2012;

ii) Tetrasporófitos derivados da germinação de carpósporos liberados por plantas cistocárpicas derivadas de cruzamentos realizados em laboratório, a partir de gametófitos mantidos no Banco de Germoplasma (SPF 57844) – carpósporos liberados em 18/12/2012.

3.2 Condições gerais de cultivo

3.2.1 Meio de cultura

O meio de cultura foi preparado com água do mar coletada no Município de São Sebastião, SP (salinidade 32ups), submetida à dupla filtragem em filtro de pressão (Cuno), com porosidade de 5 e 1 μm e esterilizada por Radiação Ionizante (Lâmpada UV – C, sistema QUIMIS Q884-21 – 3,8L/min) (Petti e

Plastino 2012). Após o processo de esterilização, a água do mar foi enriquecida com uma solução de von Stosch 50% (Edward 1970) modificada (Ursi e Plastino 2001). O meio foi trocado semanalmente.

3.2.2 Temperatura, irradiância, fotoperíodo e aeração

Dentro das câmaras de cultivo, as algas foram mantidas a temperaturas controladas de 25±1ºC e iluminadas por lâmpadas fluorescentes "Luz do Dia" (Osram 40W). Foi adotada a irradiância de 70±5 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, mensurada com um sensor esférico Li-COR modelo L1-193, conectado a um medidor de quanta Li-COR modelo L1-185. O fotoperíodo utilizado foi de 14 horas de luz e 10 de escuro (14L:10E). A aeração foi utilizada em intervalos alternados a cada 30 minutos. O ar foi fornecido por um compressor radial (IBRAM).

3.3 Avaliações do crescimento

O crescimento foi avaliado por medidas semanais de massa fresca, mensuradas em balança analítica Mettler AE200 durante 14 ou 28 dias. Os dados de massa fresca foram utilizados para o cálculo das taxas de crescimento segundo a fórmula de Lignell e Pedersén (1989):

$$TC=[(Mf/Mi)^{1/t}-1]*100\%$$

(TC= Taxa de crescimento, Mf= Massa final, Mi= Massa inicial e t= tempo)

3.4 Fotossíntese

Dois métodos foram empregados para avaliação dos diferentes parâmetros da fotossíntese: a fluorescência *in vivo* da clorofila *a* e a técnica que afere o oxigênio dissolvido (demanda biológica de oxigênio (DBO).

3.4.1 Fluorescências *in vivo* da clorofila *a*

Para quantificação *in vivo* da clorofila *a*, foi utilizado fluorômetro subaquático Walz Diving-PAM® ("Pulse Amplitude Modulation"). A fluorescência foi obtida a partir de quatro ápices de um mesmo indivíduo, organizados sobre a extremidade da fibra ótica (Diving-F) por meio de um "pregador magnético" ("magnetic sample holder"), sem que houvesse sobreposição.

Foram empregados 8-12 pulsos de distintos níveis de irradiância, mensurados por meio do medidor de quanta Li-COR modelo L1-185 (8, 25, 50, 90, 132, 184, 276, 378, 572, 844, 1250 e 2086 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}) e selecionada a opção "light curve" do equipamento para a obtenção de "curvas rápidas de luz" (Suggett et al. 2011). O tempo de exposição dos ápices a cada pulso de irradiância foi de 0,8s intercalados por 15 segundos. Esses dados foram utilizados para a construção de curvas Taxa de Transporte

de Elétrons (ETR) X Irradiância (I) (Suggett et al. 2011). Para o cálculo do ETR foi usada a seguinte fórmula (Suggett et al. 2011):

$$ETR = \Delta F/Fm' * E_{PAR} * A * \sigma_{PSII}/\sigma_{PSU}$$

- $\Delta F/Fm'$: rendimento quântico efetivo ou eficiência fotoquímica do PSII (adimensional), obtido diretamente do fluorômetro, após um pulso inicial de saturação, quando as amostras encontravam-se sob uma luz azul de baixíssima intensidade (aproximadamente 3 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1});
- E_{PAR}: irradiância do pulso (µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}) referente ao ΔF/Fm' mensurado;
- $\sigma_{PSII}/\sigma_{PSU}$: fração da luz incidente absorvida diretamente pelo PSII, equivalente a 0,15 para algas vermelhas (Grzymski et al. 1997);
- A: absortância (adimensional), fração da luz incidente absorvida por pigmentos fotossintetizantes (Suggett et al. 2011), calculada pela seguinte fórmula:

$$A = 1 - (E_\lambda^0/E_\lambda) - R$$

onde E_λ^0/E_λ representa a transmitância (T) e R a reflectância. R foi desconsiderado por possuir valores próximos a zero e insignificantes em relação aos demais parâmetros, reduzindo A = 1–T, segundo recomendado por Suggett et al. (2011). A obtenção da transmitância se deu a partir da disposição de quatro ápices sobre o medidor de quanta Li-COR modelo L1-185 mensurando os valores de irradiação antes (E_λ) e após (E_λ^0) a disposição dos ápices. Foram realizadas medidas em diferentes etapas dos experimentos (0, 14 e 28 dias de cultivo). As medições da fluorescência *in vivo* da clorofila *a* foram realizadas no mesmo período do dia, num intervalo de 3 a 4 horas, após o início da fase de luz, período em que as taxas de fotossíntese são maiores (Ramus 1981; Henley 1993).

Os parâmetros da curva: eficiência fotossintetizante (αETR), fotossíntese máxima (ETR_{max}) e saturação luminosa (I_k) foram calculados e analisados de acordo com as equações:

P=Pmax*tanh(α*I/Pmax) (Jassby e Platt 1976);

P=PS*[1-exp(-α*I/PS)]*[exp(-β*I/PS)] e Pmax=PS*[α/(α+β)]*[β/(α+β)]^β/α (Platt et al. 1981); e

P=Pmax*[1-exp(-α*I/Pmax)] (Webb et al. 1974).

(P= fotossíntese; Pmáx= fotossíntese máxima; tanh= tangente hiperbólica; PS= saturação da fotossíntese; α= eficiência fotossintetizante; β= fotoinibição, I= irradiância)

3.4.2 Demanda biológica de oxigênio (DBO)

Foi utilizada a técnica de oxigênio dissolvido, "frascos claros e escuros", para avaliar as taxas de fotossíntese e respiração (escuro) e determinar a curva Fotossíntese x Irradiância (FxI). As taxas foram

determinadas por mudanças na concentração de oxigênio (Littler e Arnold, 1985; Thomas 1988). A determinação da curva FxI foi realizada com sete níveis de irradiância: 10, 50, 100, 200, 400, 800 e 1.600 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1} (em luz branca- lâmpadas fluorescentes "Luz do dia" Osram 40 W). A respiração foi avaliada no escuro.

A água do mar filtrada foi armazenada no escuro por aproximadamente quatro dias e os níveis de oxigênio dissolvido foram mantidos em 4,0 mg O_2.L^{-1}. Ramos de 100mg de um mesmo indivíduo de linhagens distintas foram colocados em frascos de vidro do tipo DBO (Demanda Biológica de Oxigênio) de volume aproximado de 170 ml, contendo água do mar filtrada não esterilizada. Foram adicionados 2ml de $NaHCO_3$ (2mM) para prevenir a limitação de CO_2.

Os frascos foram acondicionados em câmara incubadora, acoplada a um banho com fluxo contínuo de água (Ética 521-2-D) a fim de manter constante a temperatura (25 ±1°C). Os fracos escuros com ou sem algas foram completamente cobertos por papel alumínio. Os controles na luz e no escuro consistiram de frascos contendo apenas água do mar filtrada. A água do mar contida no interior dos frascos foi homogeneizada, em intervalos regulares, com auxílio de um agitador magnético, durante todo o experimento. Foram utilizados segmentos apicais de mesma biomassa por frasco; utilizaram-se cinco frascos claros e cinco frascos escuros, para a realização e medição da fotossíntese e respiração; nestes cinco frascos, foram utilizados ápices de cinco indivíduos distintos, que foram mantidos em diferentes irradiâncias, de acordo com o desenho experimental delineado.

As concentrações de oxigênio foram mensuradas no início e após 1hora de incubação, que equivale ao tempo de duração do experimento, com o auxílio de um oxímetro (YSI modelo 58), acoplado a um eletrodo provido de agitador automático (YSI 5905). A avaliação de produção de oxigênio foi feita a partir das leituras iniciais e finais, utilizando-se as fórmulas sugeridas por Littler e Arnold (1985), e expressas como MG O_2g^{-1} massa fresca.min^{-1}.

$$FB= (FC/T)/MF$$

$$Re= (Fe/T)/MF$$

$$FL= FB-Re$$

FC- nível de O_2 no frasco claro= O_2 final * V(litros) - O_2 inicial * V (litros)

FE- nível de O_2 no frasco escuro= O_2 final*V (litros) - O_2 inicial*V (litros)

(FB= fotossíntese bruta, FL= fotossíntese líquida, Re= respiração no escuro, T- tempo de incubação e MF- massa fresca)

As incubações foram realizadas no mesmo período do dia, num intervalo de 3 a 4 horas, após o início da fase de luz, período em que as taxas de fotossíntese são maiores (Ramus 1981; Henley 1993).

A construção das curvas de fotossíntese x irradiância (FxI) foi realizada a partir dos valores de oxigênio dissolvido (n=5) utilizando-se a equação 3 de Henley (1993):

$$F= F_{máx}(1-\exp(-\alpha*F_{máx}/PAR))+Re$$

(F= fotossíntese líquida, $F_{máx}$= fotossíntese máxima, PAR= irradiância, α= eficiência fotossintetizante e Re= respiração no escuro).

Diferentes parâmetros da curva, como Fmáx, α, I_k (parâmetro de saturação luminosa, calculado a partir de $F_{máx}/\alpha$) e I_c (irradiância de compensação, calculado a partir de Re/α), foram calculados e analisados de acordo com as três equações apresentadas na metodologia de fluorescência.

3.5 Composição pigmentar e protéica

Ramos apicais foram utilizados para extração e quantificação de ficobiliproteínas, clorofila *a*, carotenóides totais e proteínas solúveis totais.

3.5.1 Ficobiliproteínas e clorofila *a* (acetona 90%)

Amostras de 100 mg (massa fresca) foram selecionadas e lavadas em água destilada, sendo removido o excesso de água com papel absorvente. Em seguida, essas amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C, até o momento da extração pigmentar.

A metodologia de extração foi baseada em Kursar et al. (1983*a*), com modificações (Plastino e Guimarães 2001). As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, sendo em seguida acrescentado 1mL de tampão fosfato 50mM, pH 5,5. A solução obtida foi centrifugada por 20 minutos a 44.000 xg e 4°C. O sobrenadante (ficobiliproteínas) foi transferido para tubos de ensaio, sendo mantidos no escuro até a leitura em espectrofotômetro. O sedimentado foi ressuspendido em 3mL de acetona 90% e centrifugado a 12.000 xg e 4°C por 15 minutos. O sobrenadante (clorofila *a*) foi transferido para tubos de ensaio, sendo mantidos no escuro e em temperatura de 4°C até a leitura em espectrofotômetro. Os espectros de absorção foram obtidos registrando-se as absorbâncias no intervalo de 400-700 nm com varredura durante um segundo. A calibragem do espectrofotômetro (Hewlett Packard 8452A) foi realizada com os solventes empregados para cada pigmento. A determinação da quantidade de ficobiliproteínas foi baseada em Kursar et al. (1983*a*), enquanto que a quantificação de clorofila *a*, em Jeffrey e Humphrey (1975):

$$\text{Ficoeritrina} = 155{,}8*A_{498{,}5} - 40{,}0*A_{614} - 10{,}5*A_{651}$$

$$\text{Ficocianina} = 151{,}1*A_{614} - 99{,}1*A_{651}$$

$$\text{Aloficocianina} = 181{,}3*A_{651} - 22{,}3*A_{614}$$

$$\text{Clorofila } a = 11{,}85*A_{664} - 1{,}54*A_{647} - 0{,}08*A_{630}$$

3.5.2 Clorofila *a* e carotenóides totais (DMF)

A extração dos pigmentos lipossolúveis foi também realizada a partir de: i) amostras com aproximadamente 20mg de massa fresca, ou ii) "pellet", após extração de ficobiliproteínas (item 3.4.1). Foi adicionado 1 mL de DMF (99,8%) a cada amostra. Essas foram mantidas a 4°C e no escuro por 24h. O sobrenadante contendo a clorofila *a* e os carotenóides totais foram transferidos para tubos de ensaio que permaneceram vedados e no escuro, em temperatura de 4°C, até a leitura no espectrofotômetro (Wellburn 1994).

Empregou-se a equação descrita por Inskeep e Bloom (1985) na determinação da concentração de clorofila *a*:

$$\text{CL } (mg/g^{-1}\ PF) = [(12{,}70*A_{664} - 2{,}79*A_{647} - 0{,}08.A_{630})*V(ml)]/PF(g)$$

PF (peso fresco de alga).

Utilizou-se a equação apresentada por Wellburn (1994) para o cálculo da concentração dos carotenóides totais:

$$\text{Carotenóides } (mg/g^{-1}\ PF) = [((1000*A_{480} - 1{,}12*Cl\,a)/245)*V(L))]/PF(g)$$

CL (concentração de clorofila *a*).

3.5.3 Proteínas solúveis totais

Amostras de 50 mg (massa fresca) foram selecionadas e lavadas em água destilada, sendo removido o excesso de água com papel absorvente. Em seguida, essas amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C, até o momento da extração das proteínas solúveis totais.

A metodologia de extração foi baseada em Bradford (1976). As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, sendo em seguida acrescentados 1mL de tampão fosfato 50mM, pH 8. A solução obtida foi centrifugada por 20 minutos a 44.000 xg e 4°C. O sobrenadante (proteínas) foi transferido para tubos de ensaio. Foram utilizados 60 µL do sobrenadante (proteínas). A esse volume, foram acrescidos 900 µL do reagente Bradford, composto por azul brilhante de Comassie-250G (CB) para fixação das proteínas, e

40 µL de água milique, em temperatura ambiente. O princípio de mensuração da concentração protéica está relacionado à alteração do pico de absorbância do CB presente no reagente de Bradford. Quando não ligado a proteínas, seu pico de absorbância ocorre a 465 nm, e quando se liga a proteínas, o pico máximo de absorbância se transfere para 595 nm. Após 10 min de reação, foi feita a leitura espectrofotométrica da absorbância a 595 $nm.mL^{-1}$. A quantificação das proteínas solúveis foi feita por comparação a uma curva padrão, preparada a partir de diferentes diluições de amostras de albumina sérica bovina (BSA) com concentrações conhecidas: 16, 8, 4, 2 e 0 (branco) µg. Uma reta linear, com a respectiva equação foi gerada, de modo que os valores de A_{595} obtidos desde os tratamentos pudessem ser correlacionados a uma determinada concentração protéica.

3.6 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de homocedasticidade utilizando-se o modelo de Cochran (nível de significância $\alpha>0.05$) e ao teste de normalidade utilizando-se o modelo de Kolmogorov-Smirnov e Lilliefors. Após avaliação e confirmação de homogeneidade e normalidade das amostras, os resultados obtidos foram submetidos a análises de medidas repetidas (ANOVA) (TCs, número de ramos diferenciados e fotossíntese) ou a análises de variância multifatorial (MANOVA) de dois ou três fatores (pigmentos e proteínas solúveis totais). Os valores que não apresentaram normalidade foram submetidos a teste não paramétrico de comparação múltipla independente, utilizando-se o modelo de Kruskal-Wallis.

4. Referências

Araújo FO, Ursi S, Plastino EM. (2014) Intraespecific variation in *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): growth, pigment content, and photosynthesis. J Appl Phycol 26:849-858.

Armisen R (1995) World-wide use and importance of *Gracilaria*. J Appl Phycol 7:231-243.

Assad-Ludewigs IY (1984) Estudos sobre a biologia de uma espécie de *Gracilaria* (Rhodophyta, Gigartinales) do litoral norte do estado de São Paulo, Brasil. Tese de doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo. 190p.

Ayres-Ostrock LM, Plastino EM (2014*a*) Effects of short-term exposure to ultraviolet-B radiation on photosynthesis and pigment content of red (wild types), greenish-brown, and green strains of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). J Appl Phycol 26:867-879.

Ayres-Ostrock LM, Plastino EM (2014*b*) Effects of UVB radiation on growth rates, pigment contents, and ultrastructure of red (wild types), greenish-brown, and green strains of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). Eur J Phycol 49:197-212.

Ayres-Ostrock LM (2014) Estudos populacionais em *Gracilaria birdiae e G. caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): aspectos fenológicos, fisiológicos e moleculares. Tese de doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo.

Ayres-Ostrock LM, Mauger S, Plastino EM, Oliveira MC, Valero M, Destombe C (2015) Development and characterization of microsatellite markers in two agarophyte species, *Gracilaria birdiae* and *Gracilaria caudata* (Gracilariaceae, Rhodophyta), using next-generation sequencing. J Appl Phycol DOI 10.1007/s10811-015-0592-7.

Barufi JB, Figueroa FL, Plastino EM (2015) Effects of light quality on reproduction, growth, and pigment content of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). Scientia Marina. 79:15-24.

Bixler HJ, Porse H (2011) A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. J Appl Phycol 23:321-335.

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254.

Câmara-Neto C (1987) Seaweed culture in Rio Grande do Norte, Brazil. Hydrobiologia. 151/152:363–367.

Carneiro MAA, Marinho-Soriano E, Plastino EM (2011) Phenology of an agarophyte *Gracilaria birdiae* Plastino and E.C. Oliveira (Gracilariales,Rhodophyta) in Northeastern Brazil. Rev Bras Farmacogn 21:317-322.

Chow F, Capociama FV, Faria R, Oliveira MC (2007) Characterization of nitrate reductase activity *in vitro* in *Gracilaria caudate* J. Agardh (Rhodophyta, Gracilariales). Rev Bras Bot 30:123-129.

Costa E, Plastino EM, Petti R, Oliveira EC, Oliveira MC (2012) The Gracilariaceae Germplasm Bank of the University of São Paulo, Brazil - a DNA barcoding approach. J Appl Phycol 24:1643-1653.

Costa VL (2005) Diversidade intraespecífica em gametófitos de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): efeitos fisiológicos da concentração de nitrato no meio de cultura. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo.

Costa VL, Plastino EM (2011) Color inheritance and pigment characterization of red (wild-type), greenish-brown, and green strains of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). J Appl Phycol 23:599-605.

Cunha PLR, Paula RCM, Feitosa JPA (2009) Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. Química Nova 32:649-660.

Dawes CJ, Orduña-Rojas J, Robledo D (1999) Response of the tropical red seaweed *Gracilaria cornea* to temperature, salinity and irradiance. J Appl Phycol 10:419-452.

Destombe C, Godin J, Nocher M, Richerd S, Valero M (1993) Differences in response between haploid and diploid isomorphic phases of *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta: Gigartinales) exposed to artificial environmental conditions. Hydrobiologia. 260-261:131-137.

Donato R (2005) Diversidade intraespecífica em linhagens tetrasporofíticas de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): crescimento, caracterização pigmentar, fotossíntese e assimilação de nitrato. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo. 98p.

Edward P (1970) Illustrated guide to the seaweeds and sea grasses in the vicinity of Porto Aransas, Texas. Contributions in Marine Science 15:1-228.

Eggert A, van Hasselt PR, Breeman AM (2003) Differences in thermal acclimation of chloroplast functioning in two ecotypes of *Valonia utricularis* (Chlorophyta). Eur J Phycol 38:123-131.

Falcão VR, Tonon A.P, Oliveira MC, Colepicolo P (2008) RNA isolation method for polyssacharide rich algae: agar producing *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). J Appl Phycol 20:9-12.

Faria AVF (2010) Diversidade intraespecífica em *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): Efeito da temperatura e irradiância. Monografia de iniciação científica. Universidade Metodista de São Paulo.

Ferreira LB (2008) Diversidade intraespecífica em *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta): estudos fisiológicos na interpretação do polimorfismo de cor. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo.

Ferreira LB, Barufi JB, Plastino EM (2006) Growth of red and green strains of the tropical agarophyte *Gracilaria cornea* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) in laboratory. Rev Bras Bot 29:187-192.

Ford EB (1964) Ecological genetics. Methuen, London; John Wiley, New York. 335p.

Gantt E (1990) Pigmentation and photoacclimation. In: Cole, K.M. & Sheath, K.G. (eds). Biology of the red algae. Cambridge University Press, Cambridge, pp.203-221.

González MA, Montoya R, Candia A (1995) Organellar DNA restriction analysis of four morphotypes of *Gracilaria* from Lenga, VIIIth Region, Chile Biol Res 28:177-184.

Grzymski J, Johnsen G, Sakshug E (1997) The significance of intracellular self-shading on the bio-optical properties of brown, red and green macroalgae. J Phycol 33:408-414.

Guillemin M.L, Valenzuela P, Gáitan-Espitia J.D, Destombe C (2014) Evidence of reproductive cost in the triphasic life history of the red alga *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). J Appl Phycol 26:569-575.

Guimarães M (2000) Aspectos fisiológicos de *Gracilaria domingensis* (Gracilairales, Rhodophyta): subsídios para a compreensão da manutenção do polimorfismo pigmentar. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo. 88p.

Guimarães M, Plastino EM, Destombe C (2003) Green mutant frequency in natural population of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. Eur J Phycol. 38:165-169.

Guiry MD, Guiry GM (2014) AlgaeBase. Worldwide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: http://www.algaebase.org (último acesso em 11 abril 2015).

Hayashi L, Bulboa C, Kradolfer P, Soriano G, Robledo D (2014) Cultivation of red seaweeds: a Latin American perspective. J Appl Phycol 26:719-727.

Henley WJ (1993) Measurement and interpretation of photosynthetic light- response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes. J Phycol 29:729-739.

Hughes JS, Otto SP (1999) Ecology and the Evolution of Biphasic Life Cycles. Am Nat 154:306-320.

Innes DJ (1984) Genetic differentiation among populations of marine algae. Helgolander Meeresunters 38:401-417.

Inskeep WP, Bloom PR (1985) Extinction coefficients of chlorophyll *a* and *b* in *N,N* Dimethylformamide and 80% Acetone. Plant Physiol. 77:483-458.

Jassby AD, Platt T (1976) Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. 540-547.

Jeffrey SW, Humphrey GF (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae natural phytoplankton. Biochem Physiol Pflazen 167:191-194.

Jones AB, Dennison WC, Preston NP (2001) Integrated treatment of shrimp effluent by sedimentation, oyster filtration and macroalgal absorption: a laboratory scale study. Aquaculture 193:155-178.

Karsten U, West JA, Zuccarello G, Kirst GO (1994) Physiological ecotypes in the marine alga *Bostrychia radicans* (Ceramiales, Rhodophyta) from the east coast of the U.S.A. J Phycol 30:174-182.

Kakita H, Kamishima H (2006) Effects of environmental factors and metal ions on growth of the red alga *Gracilaria chorda* Holmes (Gracilariales, Rhodophyta). J Appl Phycol 18:469-474.

Kursar TA, van der Meer JP, Alberte RS (1983*a*) Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*. I. Biochemical analysis of pigment mutations. Plant Physiol. 73:353-360.

Kursar TA, van der Meer JP, Alberte RS (1983*b*) Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*. II. Phycobilisome characteristics of pigment mutant. Plant Physiol 73:361-367.

Lapointe BE (1981) The effects of light and nitrogen on growth, pigment content, and biochemical composition of *Gracilaria foliifera* V. Angustissima (Gigartinales, Rhodophyta). J Phycol 17:90-95.

Lapointe BE, Ryther JH (1978) Some aspects of the growth and yield of *Gracilaria tikvahiae* in culture. Aquaculture 15:185-193.

Lewis WM (1985) Nutrient scarcity as an evolutionary cause of haploid. Am Nat 125:692-701.

Levy I, Friedlander M (1990) Strain selection in *Gracilaria* spp. 1. Growth, pigment, and carbohydrates of strains of *G. conferta* and *G. verrucosa* (Rhodophyta, Gigartinales). Bot Mar 33:339-345.

Lignell A, Pedersén M (1989) Agar composition as a function of morphology and growth rate. Studies on some morphological strains of *Gracilaria secundata* and *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta). Bot Mar 32:219-227.

Littler MM, Arnold KE (1985) Electrodes and chemicals. In: Littler, M.M., Littler, D.S. (EDS.). Ecological field methods: macroalgae – Handbook of phycological methods. Cambridge University Press, UK. 350-375.

Lobban CS, Harrison P (1994) Seaweed ecology and physiology. Cambridge University Press, Cambridge, 123-159.

Lüning K (1990) Seaweeds: their environment, biogeography and ecophysiology. Wiley Interscience. New York.

Mable BK, Otto SP (1998) The Evolution of life cycles with haploid and diploid phases. Bioessays 20:453-462.

Marinho-Soriano E, Morales V, Moreira WSC (2002) Cultivation of *Gracilaria* (Rhodophyta) in shrimp pond effuents in Brazil. Aquaculture Research 33:1081-1086.

Marinho-Soriano E, Moreira WSC, Carneiro MAA (2006) Some aspects of the growth of *Gracilaria birdie* (Gracilariele, Rhodophyta) in an estuary in northeast Brazil. Aquaculture International 14:327-336.

Marinho-Soriano E, Panucci RA, Carneiro MAA, Pereira DC (2009) Evaluation of *Gracilaria caudata* J. Agardh for bioremediation of nutrients from shrimp farming wastewater. Bioresource Technology 100:6192-6198.

McCree KJ (1981) Photosynthetically active radiation. In: Encyclopedia of plant physiology, n.s., Vol. 12A. Ed. By O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond, and H. Ziegler. Springer-Verlag, Berlin, 41-55.

Msuya FE, Neori A (2002) *Ulva reticulate* and *Gracilaria crassa*: Macroalgae that can biofilter effluent from tidal fishponds in Tanzania. W. Indian Ocean. J Mar Sci 1:117-126.

Oliveira EC (1981) A exploração de algas marinhas no Brasil: situação atual e perspectivas futuras. Phycol Lat-Amer 1:5-17.

Oliveira EC (1997) Macroalgas marinhas de valor comercial: técnicas de cultivo. Panorama da Aqüicultura. 7:42-45.

Oliveira EC (1998) The seaweed resources of Brazil. In: Seaweed resources of the world (T. Critchley & M. Ohno, eds.). JICA, Yokosuka, 366-371.

Oliveira EC, Alveal KV (1990) The mariculture of *Gracilaria* (Rhodophyta) for the production of agar. In: Introduction to applied phycology (I. Akatsuka, ed.). Academic Publishing, The Hague, Netherlands, 553-564.

Oliveira EC, Miranda GEC. (1998). Aspectos sociais e econômicos da explotação de algas marinhas no Brasil. (Paula, E. J.; Cordeiro-Marinho, M.; Santos, D. P.; Plastino, E. M.; Fujii, M. T. & Yokoya, N.S. eds) Anais do IV Congresso Latino-americano, II Reunião Ibero-americana, VII Reunião Brasileira de Ficologia. Caxambu, MG. Sociedade Ficológica da America Latina e Caribe & Sociedade Brasileira de Ficologia: 149-156.

Oliveira EC, Plastino EM (1984) The life history of some species of (Rhodophyta) from Brazil. Jap J Phycol 32:203-208.

Oliveira EC, Plastino EM (1994) Gracilariaceae. In: Biology of economic algae (I. Akatsuka, ed.). SBP Academic Publishing, The Hague, Netherlands, 185-226.

Ohno M, Largo D (1998) The seaweed resources of Japan. *In:* Critchley, A. T., Ohno, M. (eds). Seaweed resouces of the word. Japan International Cooperations Agency. Yokosuka, Japan. 1-14.

Oohusa T (1993) The cultivation of *Porphyra* "Nori". *In*: Ohno, M, Critchley, A. T. (eds). Seaweed cultivation and marine ranching. Second ed. Japan International Cooperation Agency. Yokosuka, Japan. 57-73.

Petti R, Plastino EM (2012) Estudo comparativo de dois processos de esterilização de água do mar para preparação de meios de cultura de algas em laboratório. (ed. by E. Oliveira, G. Miranda, E. Paula, M. Cordeiro-Marino & D. Santos). XIV Congresso Brasileiro de Ficologia.

Plastino EM (2004) Diversidade intraespecifica em algas gracilarióides. Tese de Livre-Docência. Universidade de São Paulo. São Paulo. 52.

Plastino EM, Guimarães M (2001) Diversidad intraespecífica. (K.V. Alveal & T.J. Antezana eds.). Sustentabilidad de la Biodiversidad. Concepción, Universidad de Concepción 19-27.

Plastino EM, Guimarães M, Matioli SR, Oliveira EC (1999) Codominant inheritance of polymorphic colours variants of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). Gen Mol Biol 22:105-108.

Plastino E.M, Oliveira EC (1997) *Gracilaria caudata* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta)-restoring an old name for a common western Atlantic alga. *Phycologia* 36:225-232.

Plastino EM, Ursi S, Fujii MT (2004) Color inheritance, pigment characterization, and growth of a rare light green strain of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). Phycol Res 52:45-52.

Platt T, Gallegos C, Harrison W (1981) Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. J Mar Res 38:687-701.

Ramlov F, Plastino EM, Yokoya NS (2013) Growth, callus formation and plant regeneration in color of morphs of (Gracilariales, Rhodophyta) cultured under different irradiance and plant growth regulators. Phycologia. 52:508-516.

Ramus J (1981) The capture and transduction of light energy. In LOBBAN, CS. and WYNNE, MJ. (eds.), The biology of seaweeds. Blackwell Sci. Oxford. 458-492.

Ramus J, van de Meer JP (1983) A physiological test of the theory of complementary chromatic adaptation. I. Color mutants of a red seaweed. J Phycol 19:86-91.

Rietema H (1991) Evidence for ecotypic divergence between *Phycodrys rubens* populations from the Baltic Sea and North Sea. Bot Mar 34:375-381.

Rothman MD, Anderson RJ, Boothroyd CJT, Kemp FA, Bolton JJ (2009) The gracilarioids in South Africa: long-term monitoring of a declining resource. J Appl Phycol 21:47-53.

Santelices B, Varela D (1995) Regenerative capacity of *Gracilaria* fragments: effects of size, reproductive state and position along the axis. J Appl Phycol 7:501:506.

Suggett DJ, Prásil O, Borowitzka MA (2011) Chlorophyll *a* Fluorescence in Aquatic Sciences. Springer.

Thomas WLH (1988) Photosyntesis and respiration of aquatic macro-flora using the light and dark bottle oxygen method and dissolved oxygean analyzer. In: Lobban, C.S.; Chapaman, D.J. & Kremer, B.P. (eds.). Experimental phycology: a laboratory manual. Cambridge University Press, UK. 64-77.

Tyler AC, Mcglathery KJ (2006) Uptake and release of nitrogen by the macroalgae *Gracilaria vermiculophylla* (Rodophyta). J Phycol 42:515-525.

Ursi S (2000) Crescimento in vitro de *Gracilaria* sp. (Gracilariales, Rhodophyta): análise da diversidade intraespecífica. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Ursi S (2005) Diversidade intraespecífica de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): crescimento, fotossíntese, pigmentos, polissacarídeos e genes da ficoeritrina de linhagens selvagens e variantes. Tese de Doutorado. Univ. S. Paulo. São Paulo. 121.

Ursi S, Plastino EM (2001) Crescimento *in vitro* de linhagens de coloração vermelha e verde clara de *Gracilaria sp.* (Gracilariales, Rhodophyta) em dois meios de cultura: análise de diferentes estádios reprodutivos. Rev Bras Bot 24:587-594.

Ursi S, Costa VL, Hayashi L, Pereira RTL, Paula EJ, Plastino EM (2013) Intraspecific variation in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): growth, and agar yield and quality of color strains under aquaculture. Bot Mar 56:241–248.

Ursi S, Pedersén M, Plastino EM, Snoeijs P (2003). Intraspecific variation of photosynthesis, respiration and photoprotective carotenoids in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales: Rhodophyta). Mar Biol 142:997-1007.

van der Meer JP (1979) Genetics of *Gracilaria* sp. (Rhodophyceae, Gigartinales). V. Isolation and characterization of mutant strains. Phycologia 18:47-54.

van der Meer JP, Bird CJ (1977) Genetics of *Gracilaria* sp. (Rhodophyceae, Gigartinales). I. Mendelian inheritance of two spontaneous green variants. Phycologia 16:159-161.

Webb WL, Newton M, Starr D (1974) Carbon dioxide exchange of *Alnus rubra*. Oecologia 17:281-291.

Wellburn AR (1994) The spectral determination of Chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. J Plant Physiol 144:307-313.

Woelkerling WJ (1990) An introduction, (Cole, K. M., Sheath, R. G., Eds), Biology of the red algae. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, 1-6.

Yang YF, Fei XG, Song JM, Hu HY, Wang GC, Chung IK (2006) Growth of *Gracilaria lemaneiformis* under different cultivation conditions and its effects on nutrient removal in Chinese coastal waters. Aquaculture 254:248-255.

Yokoya NS, Oliveira EC (1992*a*) Effects of salinity on the growth rate, morphology and water content of some Brazilian red algae of economic importance. Cienc Mar 18:49–64.

Yokoya NS, Oliveira EC (1992*b*) Temperature response of economically important red algae and their potential for mariculture in Brazilian waters. J Appl Phycol 4:339–345.

Yokoya NS, Kakita H, Obika H, Kitamura T (1999) Effects of environmental factors and plant growth regulators on growth of the red alga *Gracilaria vermiculophylla* from Shikoku Island, Japan. Hydrobiologia 398/399: 339-347.

Yoshimura CY (2006) Avaliação do potencial de cultivo e produção de ágar de *Gracilaria domingensis* e de *Gracilaria caudata* (Rhodophyta, Gracilariales) na Enseada de Armação do Itapocoroy (Penha, Santa Catarina). Tese de doutorado. Instituto de Biociências, Universidade se São Paulo.

Zhou Y, Yang YF, Hu H, Liu Y, Mao Y, Zhou H, Xu X, Zhang F (2006) Bioremediation potential of macroalga *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) integrated into fed fish culture in coastal water of north China. Aquaculture 252:264-276.

CAPÍTULO 2

Physiological characterization of a greenish-brown mutant from a natural population of *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta)*

André V. F. de Faria, Estela M. Plastino

Department of Botany, Biosciences Institute, São Paulo University, Rua do Matão 277, 05508-090 São Paulo, Brazil. E-mail: emplasti@usp.br ; phone: 55.11.3091-7630; fax: 55.11.3091-7547

*Submitted to the Journal of Applied Phycology (May, 2015)

Resumo

Ao longo da costa brasileira, *Gracilaria caudata* é explotada para produção de ágar. Recentemente, entre indivíduos de coloração vermelha (RD), uma variante marrom esverdeada (GB) foi coletada numa população natural. O objetivo deste trabalho foi comparar o crescimento, a fotossíntese e o conteúdo pigmentar de tetrasporófitos GB e RD cultivados em duas irradiâncias, 70 e 150 μmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (70 e 150), durante o período de 28 dias. A variante GB é deficiente em ficoeritrina, mas produz grandes concentrações de aloficocianina e ficocianina, quando cultivada em 150. Nessa irradiância, não foi observada diferença na concentração de ficoeritrina entre as linhagens, sugerindo que RD pode utilizar esse pigmento como fonte de nitrogênio. Nos primeiros 14 dias de cultivo, as taxas de crescimento de RD, independentemente da irradiância, foram maiores quando comparadas às observadas para GB, embora não tenham sido observadas diferenças quanto à fotossíntese. Nesse período, GB e RD apresentaram maiores valores de GR, taxa de transporte de elétrons e rendimento quântico efetivo em 150 do que 70. Após esse período, embora não tenham sido observadas diferenças nas propriedades fotossintetizantes, houve uma queda nas taxas de crescimento de RD e GB, nas duas irradiâncias, que ocorreu simultaneamente à diferenciação de tetrasporângios. GB embora fértil, foi capaz de manter seu crescimento e até de superar as taxas de crescimento de RD na última semana de crescimento (150). Essa característica pode ser vantajosa para a espécie, favorecendo a ocorrência de GB nas populações naturais, já que *G. caudata* é normalmente encontrada no estado fértil ao longo da costa brasileira, e a maioria dos indivíduos são tetrasporófitos.

Abstract

On the Brazilian coast, *Gracilaria caudata* is exploited for agar production. Recently, among the common red wild type (RD), a greenish-brown variant (GB) was collected from a natural population. The aim of this work was to compare the growth (GR), photosynthesis, and pigment content of GB and RD tetrasporophytes cultivated under two irradiances, 70 and 150 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} (70 and 150), during a

period of 28 days. The GB variant is deficient in phycoerythrin, but it produced higher levels of allophycocyanin and phycocyanin at 150. At this irradiance, no difference of phycoerythrin content was observed between strains, suggesting that RD could be using this pigment as a nitrogen source. RD growth rates, irrespective of irradiance, were higher when compared to GB up to 14 days, although no differences were observed in photosynthesis. During the 14-day period, both color strains showed higher GR, maximum electron transport rate, and effective quantum yield at 150 when compared to 70. After that, although no differences were observed in the photosynthetic properties, a decrease in GR was seen at both irradiances when RD and GB simultaneously differentiated tetrasporangia. The GB, although fertile, was better able to maintain its growth and even exceed the growth rates of RD in the last week (150). This characteristic could be advantageous to the species, favoring GB in natural populations, since *G. caudata* is normally found in the fertile state along the Brazilian coast, and most individuals are tetrasporophytes.

Keywords: Color variant, *Gracilaria*, *In vivo* chlorophyll fluorescence, Pigment, Photosynthetically active radiation, Rhodophyta.

Introduction

Among the red algae, *Gracilaria* is an economically important genus widely distributed around the world (Oliveira and Plastino 1994). Nowadays, *Gracilaria* is the principal seaweed for the commercial production of agar, and some species have been successfully cultivated in Chile and Indonesia (Bixler and Porse 2011). In comparison to terrestrial crops and some other aquaculture industries, seaweed cultivation, although of considerable scale, is still in its infancy and, thus, vulnerable (Robinson et al. 2013).

In Brazil, *Gracilaria* spp. are harvested from natural beds on the northeast coast (Carneiro et al. 2011). No commercial cultivation exists, with the exception of some artisanal mariculture. These activities, including the use of seedlings from natural beds, can reduce availability, a problem that must be solved to avoid overexploitation (Hayashi et al. 2014). In this regard, laboratory studies on physiological and reproductive aspects can contribute to a better understanding of intraspecific diversity and thus gain control over the life history, a first step toward initiating a genetic improvement program (Robinson et al. 2013).

On the Brazilian coast, *Gracilaria caudata* J. Agardh has a wide distribution, and it is one of the main species exploited for agar production (Oliveira and Miranda, 1998; Oliveira et al. 2000). Common on bedrock, it occurs mostly in protected bays and turbid waters, extending from the mesolittoral to the infralittoral fringe (Plastino and Oliveira 1997). The species has a typical *Polysiphonia*-type life history (as *Gracilaria* sp., Oliveira and Plastino 1984), and under laboratory conditions, it tolerates a wide range of salinity (10–60 ups) and temperature (18–30°C) (as *Gracilaria* sp., Yokoya and Oliveira 1992a, b; as

Hydropuntia caudata, Miranda et al. 2012). Along the Brazilian coast, ecotypic differentiation relative to physiological aspects has been suggested by laboratory studies on populations of *G. caudata* (Araújo et al. 2014).

Recently, among the common red wild type, a greenish-brown variant of *Gracilaria caudata* was collected from a natural population in sandstone reef pools on the northeastern coast of Brazil. A few color strains have previously been reported in natural populations of *Gracilaria*: *G. birdiae* Plastino and E. C. Oliveira (Plastino et al. 2004; Costa and Plastino 2011), *G. chilensis* C.J. Bird, McLachlan and E.C. Oliveira (Santelices et al. 1996), *G. cornea* J. Agardh (Ferreira et al. 2006), *G. domingensis* (Kützing) Sonder ex Dickie (Plastino et al. 1999), and *G. tikvahiae* McLachlan (Ramus and van der Meer 1983). Among these color strains, some were collected from the Brazilian coast, where a green strain of *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux was also reported (Yokoya et al. 2003). Physiological studies on any new color strains may have important ramifications for future strategies of cultivation. Therefore, in the present work, the greenish-brown variant and the red wild type of *G. caudata* were isolated under laboratory conditions for further investigation. In particular, this work aimed to compare growth, pigment content, and photosynthesis of the color variant and the wild-type tetrasporophytes of *G. caudata* when cultivated under two different irradiances. It is expected that this study will provide information on species that will benefit the maintenance of color diversity in a population. Moreover, it will contribute to preliminary analysis on the performance of the greenish-brown mutant for future mariculture in Brazil.

Materials and Methods

Biological material

Gracilaria caudata was collected at Paracuru Beach (3.4°S 39.07°W), Ceará State, Brazil, in September 2012. Wild type (red, RD) and greenish-brown (GB) individuals grow side-by-side in sandstone reef pools, and they are usually exposed during low tides. Unialgal non-axenic cultures were established from carpospores released by RD and GB cystocarpic plants, following Plastino and Oliveira (1990). Tetrasporophytes derived from carpospores were kept in the Gracilariaceae Germplasm Bank of the University of São Paulo (Costa et al. 2012). Voucher specimens were deposited in the herbarium of the Institute of Bioscience at the University of São Paulo (RD, SPF-57843; GB, SPF 57848).

General culture conditions

Apical segments of RD and GB tetrasporophytes were maintained in von Stosch-enriched seawater with modification (Ursi and Plastino 2001) and diluted to 50% with sterile seawater (32 psu). The algae were kept in a temperature-controlled room at 25±1°C with a photoperiod of 14h. Photosynthetically active

radiation (PAR) was 70 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} provided by Osram 40 W Daylight fluorescent tubes and was measured by a quantameter (Li-COR model L1-185). Cultures were aerated for 30 min h^{-1}, and the medium was renewed weekly.

Experimental irradiance conditions

Two treatments were performed: 70 and 150 μmol photons.m^{-2}.s^{-1}; otherwise, general culture conditions were implemented. Experiments were conducted for a period of 28 days. Six replicates per treatment were made for each color strain (RD and GB). Each replicate was represented by one distinct individual.

Growth rates

One week before the beginning of the experiment (pretreatment), 48 apical fragments (6 individuals) of each color strain (RD and GB), each about 10 mm in length, were cultivated in six Erlenmeyer flasks containing 400 mL of enriched seawater (four apical segments, about 16.5 mg of algae flasks^{-1}). After that, six replicates of each color strain were cultivated under experimental conditions for growth rate determination (70 and 150 μmol photons.m^{-2}.s^{-1}). Growth was assessed weekly by measuring mass. Growth rates were estimated by means of the following equation: GR= $[(M_f/M_i)^{1/t}-1]$x100%, where M_f is the final mass, M_i is the initial mass, and t is the time (Lignell and Pedersén 1989).

In vivo chlorophyll fluorescence

Fluorescence measurements were performed at intervals of 14 and 28 days for both color strains (n=3). The measurements were always made from 11:00 to 14:00 (after 3–4 h of exposure to light in the culture chamber) to avoid possible effects of circadian rhythms. The *in vivo* chlorophyll fluorescence was measured using an underwater Walz Diving-PAM fluorometer. Apical segments of *G. caudata* were arranged on a magnetic sample holder to avoid overlap. Eight levels of irradiance were used to construct Photosynthesis × Irradiance curves (PI): 5, 15, 32, 61, 94, 128, 193, and 265 μmol photons m^{-2} s^{-1}. Apical segments were exposed 20s for each irradiance, interspersed with saturation pulse of 0.8 s, approximately 6,100 μmol photons m^{-2} s^{-1}. The effective quantum yield ($\Delta F/F$m′) was provided by the Diving-PAM after an initial saturation pulse, when the samples were at a very low intensity pulse of blue light (approximately 0 μmol photons m^{-2} s^{-1}). The following parameters were calculated (Webb et al. 1974) and analyzed (Schreiber 2004): photosynthetic efficiency (αETR), maximum electron transport rate (ETR_{max}), light saturation (I_k), and effective quantum yield ($\Delta F/F$m′).

Pigment analyses

Phycobiliproteins, chlorophyll *a*, and carotenoids were quantified in RD and GB strains exposed to 70 and 150 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} after 28 days. Phycobiliprotein extractions were carried out at 4 °C, according to Kursar et al. (1983) with modifications (Plastino and Guimarães 2001). Briefly, 100 mg of apical segments from each repetition (n=3) were ground in liquid nitrogen and 2 mL of phosphate buffer 50 mM, pH 5.5. Crude extracts were centrifuged at 44,000 × g for 20 min. The supernatant containing phycobiliproteins, including phycoerythrin (PE), phycocyanin (PC), and allophycocyanin (APC), was removed and kept in sealed vials at 4 °C until reading by spectrophotometer (HP 8452A). The extraction of chlorophyll *a* and carotenoids was carried out from samples of 20mg fresh weight for each repetition (n = 3). Briefly, 2 mL of *N*, *N*-dimethylformamide (DMF 99.8%) were added to each sample. The samples were kept at 4 °C in the dark for 12 h. The supernatant containing chlorophyll *a* and carotenoids was transferred to sealed vials and kept in the dark at 4 °C until reading by spectrophotometer (Wellburn 1994). The equation described by Inskeep and Bloom (1985) was used to determine the concentration of chlorophyll *a* and the equation described by Wellburn (1994) to determine the concentration of total carotenoids.

Statistical analysis

The normality and homogeneity assumptions of variances were tested using Kolmogorov-Smirnov and Cochran test, respectively. When necessary, logarithmic transformation was employed [x = log(x+1)] and retested (Zar 1996). Data, such as growth rate and photosynthetic parameters (I_k, $\Delta F/F_m'$, αETR, and ETR_{max}), were subjected to repeat-measures analyses of variance (RMANOVA) to determine the effects of the treatments; the pigment concentrations were analyzed by factorial ANOVA. In all cases, the a posteriori Newman-Keuls test was used to establish statistical differences. Statistical analyses were done using the Statistica 11 program, considering $p<0.05$.

Results

After two weeks under experimental conditions, branches of red and greenish-brown strains of *Gracilaria caudata* differentiated tetrasporangia on the thallus. These reproductive structures were observed in a higher quantity mainly under 150 μmol photons.m^{-2}.s^{-1}, regardless of the color strain.

Growth rates

Growth rates showed variation through time when comparing RD and GB strains. Detailed analysis of growth rate for all data collection dates (four occasions from days 7 to 28) showed daily variation (Fig. 1). Wild type and GB strains showed a decline in growth rates over time (Figs 1-2).

The growth rates of wild type, regardless of irradiance treatment, were higher when compared to GB up to 14 days (Fig. 1, F=82.10, p<0.02; Fig. 2, F=88.36, p<0.00), but both color strains (RD and GB) showed higher growth rates at 150 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} when compared to treatment at 70 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} (Fig. 1, F=329.75, p<0.00; Fig. 2, F=88.36, p<0.00).

By the second week of cultivation, a decrease in growth rates was observed at both irradiances (Fig. 1-2), just when both color strains were differentiating tetrasporangia. In the last two weeks of the experiment, GB strain exposed to 150 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} showed the highest growth rates, when compared to GB strain cultivated under 70 and RD strain cultivated under 70 and 150 (F=16.15, p <0.00) (Fig. 2).

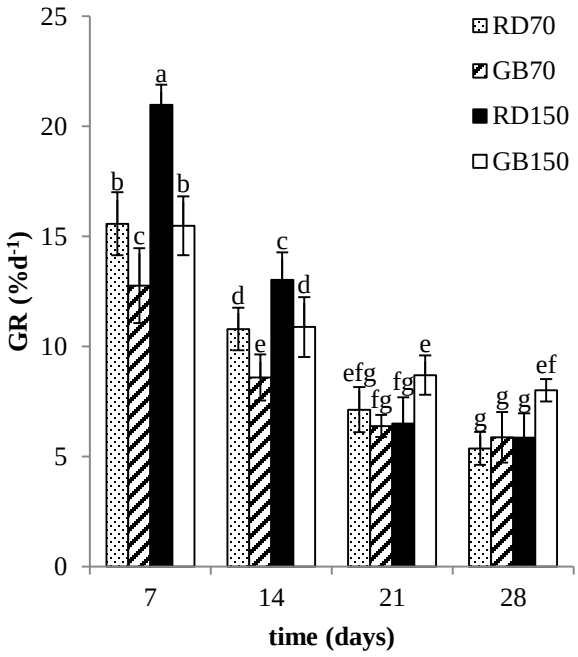

Figure 1. Growth rates of red (RD) and greenish-brown (GB) strains of *Gracilaria caudata* calculated from the average of fresh mass (mg) obtained every week for 28 days. Samples cultivated at different irradiances (70 and 150 μmol photons.m^{-2}.s^{-1}). Bars indicate standard deviation (n=6). Different letters indicate significant differences according to RMANOVA and Newman-Keuls test (P<0.05).

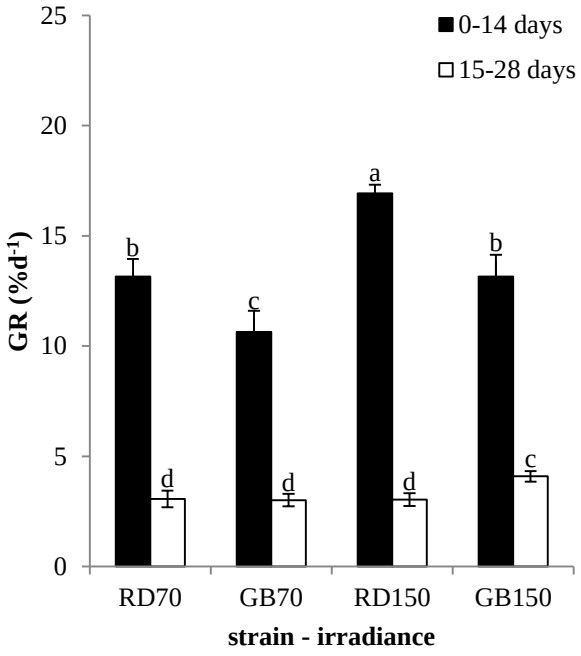

Figure 2. Relative growth rates of red (RD) and greenish-brown (GB) strains of *Gracilaria caudata* cultivated at different irradiances (70 and 150 μmol photons.m^{-2}.s^{-1}), showing all data collected over the first (A) and the last 14 days (B). Bars indicate standard deviation (n=6). Different letters indicate significant differences according to one-way ANOVA and Newman-Keuls test (P<0.05).

In vivo chlorophyll fluorescence

Both color strains of *G. caudata* showed a similar pattern of photosynthetic rates when subjected to increasing irradiance, and the same mathematical model to fit the PI curves could be used (Fig. 3). On comparing each strain (RD or GB) at 14 and 28 days, regardless of irradiance, similar values for all analyzed parameters were found for RD (I_k, F=1.07, p>0.11; αETR, F=1.15, p>0.20; ETR_{max}, F=0.23, p>0.38; ΔF/Fm', F=1.46, p>0.06) and GB strains (I_k, F=0.10, p>0.36; αETR, F=0.48, p>0.49; ETR_{max}, F=0.10, p>0.67; ΔF/Fm', F=0.79, p>0.64).

In a detailed analyses, considering each period of cultivation (14 or 28 days), we found some differences only at 14 days. First, higher values of ETR_{max} and ΔF/Fm' were found for RD and GB strains exposed to 150, when compared to both color strains exposed to 70 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} (ETR_{max}, F=44.34, p<0.02; ΔF/Fm', F=43.10, p<0.03). Second, higher I_k values were found only for RD strain exposed to 150 compared to exposure at 70 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} (F=11.44, p<0.03), but no differences were observed in GB strain (F=11.44, p>0.10). Finally, no differences were observed for αETR for either strain (F=11.30, p>0.08). When RD and GB strains were cultivated under the same irradiance, no differences were observed

between them for all analyzed parameters (I_k, F=0.01, p>0.10; αETR, F=0.01, p>0.09; ETR_{max}, F=0.08, p>0.09; and ΔF/Fm', F=0.30, p>0.06) (Table 1).

Table 1: Parameters of photosynthesis *vs*. irradiance curves of red (RD) and greenish-brown (GB) strains of *Gracilaria caudata* cultivated in different conditions (70 and 150 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}) for 28 days.

Time (days)	Parameters	Strains – PAR (µmol photons.m^{-2}.s^{-1})			
		RD-70	GB-70	RD-150	GB-150
14	I_k	36.62±2.39	41.79±7.20	52.50±3.87	47.83±7.31
	αETR	0.03±0.00	0.03±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00
	$ETR_{máx}$	1.20±0.01	1.43±0.35	2.18±0.06	1.89±0.10
	Δ*F*/*F*m`	0.50±0.02	0.53±0.00	0.59±0.01	0.57±0.01
28	I_k	34.07±6.48	33.27±10.52	46.61±14.75	52.71±6.35
	αETR	0.03±0.00	0.04±0.01	0.04±0.00	0.03±0.00
	$ETR_{máx}$	1.28±0.18	1.38±0.06	1.92±0.57	1.89±0.09
	ΔF/Fm`	0.56±0.00	0.53±0.07	0.57±0.03	0.52±0.06

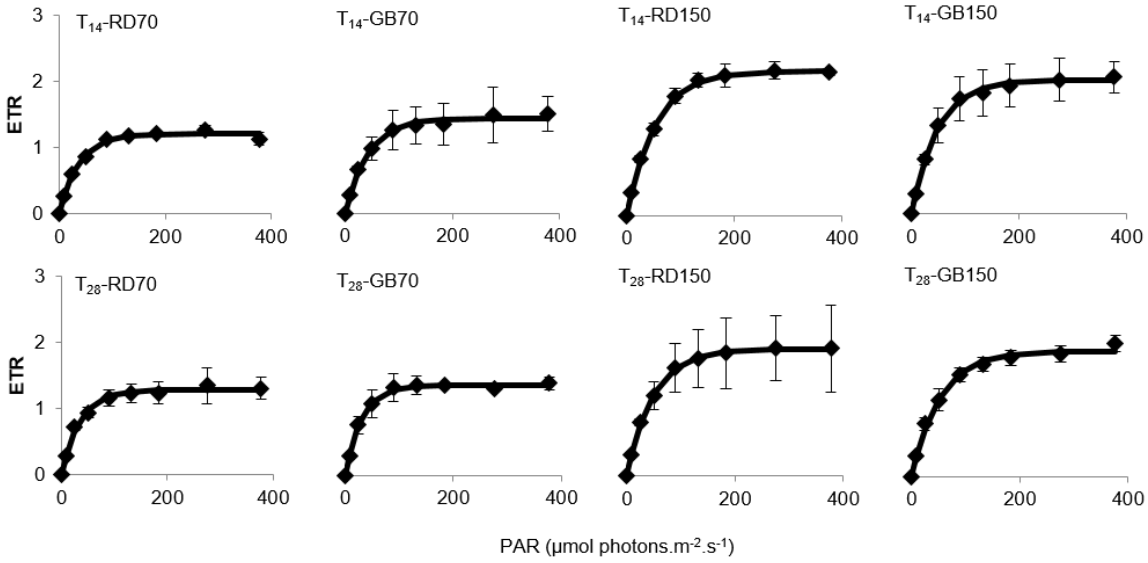

Figure 3. Electron transport rate (ETR) at different irradiances (µmol photons.m^{-2}.s^{-1}) of wild type (RD) and greenish-brown (GB) strains of *Gracilaria caudata* exposed to 70 (70) and 150 (150) µmol photons.m^{-2}.s^{-1}. Two measurements were performed: (T_{14}) 14 days and (T_{28}) 28 days. Data presented as means and standard deviations (n=3).

Pigment contents

All pigments were observed in both RD and GB strains, but no qualitative differences were evident (Fig. 4)

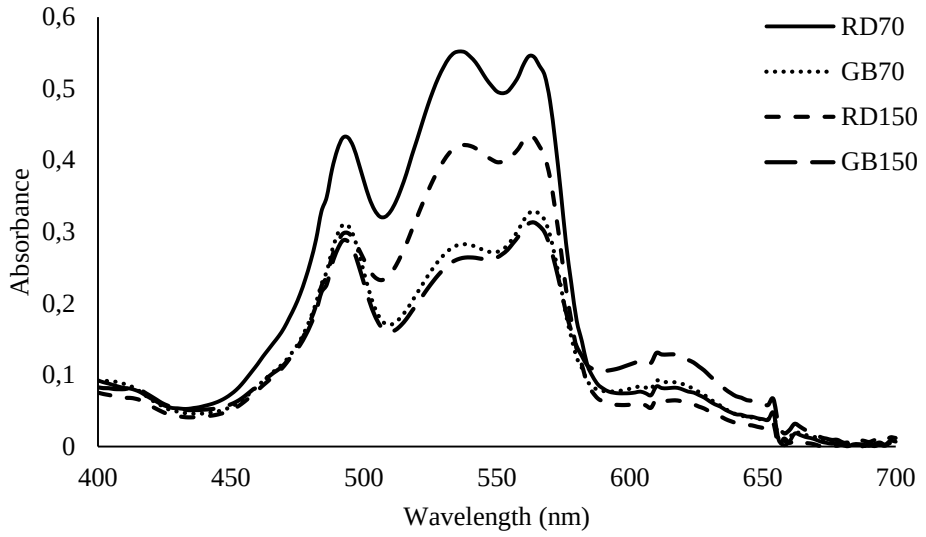

Figure 4. Absorption spectra of aqueous extracts of red (RD) and greenish-brown (GB) strains of *Gracilaria caudata*. Each line represents the strain average (n=3).

The RD strain cultivated under 70 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} had higher concentrations of phycoerythrin (PE) than GB strain exposed to 70 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} and RD and GB strains exposed to 150 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} (F=16.99, p<0.00). At 150, RD and GB strains showed concentrations of PE similar to those of GB strain exposed to 70 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} (Fig. 5).

The GB strain cultivated under 150 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} had higher concentrations of phycocyanin (PC) than the RD strain exposed to 150 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} and RD and GB strains exposed to 70 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} (F=22.61, p<0.00). Otherwise, no differences were observed in concentrations of PC between GB strain cultivated under 70 and RD strain exposed to 70 or 150 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} (F=22.61, p>0.08; Fig. 5).

GB cultivated under 150 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} had higher concentrations of allophycocyanin (APC) than RD strains exposed to 150 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} (F=5.29, p<0.04); intermediate and similar values were found in both color strains when exposed to 70 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} (Fig. 5).

No differences in concentrations of chlorophyll *a* (F=2.34, p>0.29) or total carotenoids (F=4.30, p>0.14) were found between RD and GB strains when cultivated under 70 and 150 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} (Fig. 5).

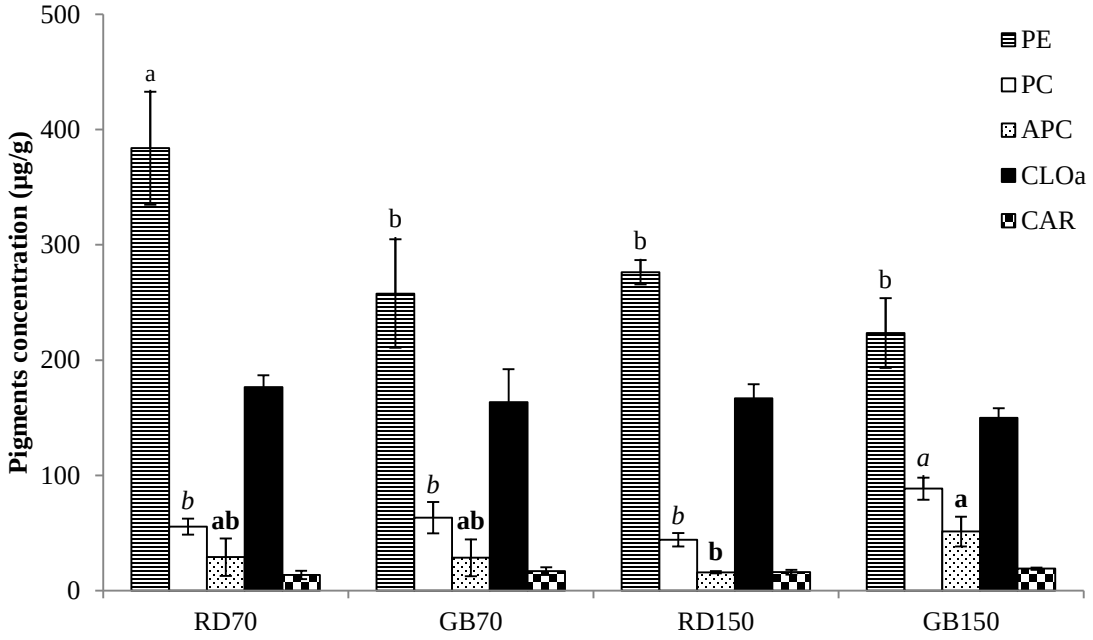

Figure 5. Phycobiliprotein, chlorophyll *a*, and total carotenoid concentrations of red (RD) and greenish-brown (GB) strains of *Gracilaria caudata* cultivated for 28 days under 70 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} (70) and 150 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} (150) conditions. Phycoerythrin (PE), phycocyanin (PC), allophycocyanin (APC), chlorophyll *a* (Chl-*a*), and total carotenoids (CAR). Data presented as means and standard deviations (n=3). Different letters indicate significant differences according to ANOVA and Newman-Keuls test (P<0.05).

PE/PC ratio was higher in RD strains when compared to GB strain, regardless of irradiance (F=130.31, p<0.00). GB strain showed higher PE/PC ratio under 70 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} when compared to GB strain cultivated under 150 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} (F=130.31, p<0.00), while RD strain showed a similar ratio under both irradiances (F=130.31, p>0.19) (Table 2). GB strain had higher PC/Chl-*a* (F=13.69, p<0.04), APC/Chl-*a* (F=7.16, p<0.04), and CAR/Chl-*a* (F=15.31, p<0.03) ratios than RD strain under 150 photons.m^{-2}.s^{-1} (Table 2).

Table 2: Pigment ratios of red (RD) and greenish-brown (GB) strains of *Gracilaria caudata* cultivated for 28 days under 70 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} (70) and 150 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} (150). (PE/PC, phycoerytrin/phycocyanin; PE/APC, phycoerytrin/allophycocyanin; PC/APC, phycocyanin/allophycocyanin; PE/CLO-*a*, phycoerytrin/chlorophyll-*a*; PC/CLO-*a*, phycocyanin/chlorophyll-*a*; APC/CLO-*a*, allophycocyanin/chlorophyll-*a*; CLO-*a*/CAR, chlorophyll-*a*/carotenoids; CAR/CLO-*a*, carotenoids/chlorophyll-*a*). Different letters indicate significant differences according to ANOVA and Newman-Keuls test (P<0.05).

Pigments	RD/70	GB/70	RD/150	GB/150
PE/PC	6.93±0.15^{a}	4.10±0.19^{b}	6.34±0.97^{a}	2.52±0.09^{c}
PE/APC	15.65±6.42$^{\mathbf{a}}$	10.45±3.75$^{\mathbf{ab}}$	17.45±1.07$^{\mathbf{a}}$	4.45±0.56$^{\mathbf{b}}$
PC/APC	2.27±0.96	2.56±0.93	2.80±0.51	1.77±0.29
PE/Chl-*a*	2.19±0.39	1.64±0.54	1.66±0.07	1.50±0.29
PC/Chl-*a*	0.32±0.06^{b}	0.40±0.15^{b}	0.27±0.05^{b}	0.59±0.10^{a}
APC/Chl-*a*	0.17±0.09$^{\underline{ab}}$	0.18±0.09$^{\underline{ab}}$	0.10±0.01$^{\underline{b}}$	0.35±0.11$^{\underline{a}}$
Chl-*a*/CAR	14.03±5.21$^{\boldsymbol{a}}$	9.68±0.35$^{\boldsymbol{b}}$	10.56±0.71$^{\boldsymbol{ab}}$	7.89±0.37$^{\boldsymbol{c}}$
CAR/Chl-*a*	0.07±0.02$^{\underline{\mathbf{b}}}$	0.10±0.00$^{\underline{\mathbf{ab}}}$	0.09±0.00$^{\underline{\mathbf{b}}}$	0.12±0.00$^{\underline{\mathbf{a}}}$

Discussion

The GB strain of *Gracilaria caudata* is deficient in PE and produces higher levels of APC and PC under higher irradiance (150 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}), probably to compensate for the lower PE concentration. This pigment balance is in agreement with previous descriptions for other color variants of red algae (van der Meer and Bird 1977; Yokoya et al. 2003; Costa and Plastino 2011) and could be related to the plasticity of the photosynthetic units. In *G. tikvahiae*, these units are quite plastic, and this plasticity is expressed as changes in light-capturing pigment densities (Ramus et al. 1983). This photosynthetic plasticity may be related to a chromatic acclimation at high and low light intensities, as observed in *G. caudata*.

Comparing the growth performance of strains during the first 14 days, it was found that RD presented higher growth rates than GB, regardless of the irradiance. These results are in agreement with most previous studies on *Gracilaria*, which have shown lower fitness in the color-mutants than their wild-type counterparts (van der Meer 1990; Plastino et al. 2004); however, similar growth rates were already observed in *Gracilaria* (Ramus and van der Meer 1983; Ursi et al. 2003; Ursi et al. 2013), as well as in

other Rhodophyta (Yokoya et al. 2007). Otherwise, considering only photosynthetic properties, no differences could be detected between RD and GB strains. The lack of alterations in these properties can indicate insensitivity to differences between strains, or, alternatively, GB strain, although PE deficiency accompanied by low growth rate performance is no different in wild plants when considering photosynthetic light reactions. Similar results were observed among color variants and wild types of *G. birdiae*, in which *in vivo* chlorophyll fluorescence were measurements unable to distinguish these strains (Ayres-Ostrock et al. 2014). However, differences among these same strains could be observed when photosynthetic analysis was performed using oxygen evolution (Ursi et al. 2003).

In the middle of experimental period (14 days), an increase of ETR_{max} and $\Delta F/F'm$ took place in both RD and GB strains of *G. caudata* cultivated under high irradiance when compared to strains cultivated under low irradiance. Indeed, under natural conditions, at least during the low tide, both color strains can be exposed to the conditions of increased light, since the Brazilian northeast coast is subject to higher irradiances (Moura and Shukla 1981). Otherwise, both strains become photosynthetically light-saturated at 36 – 52 μmol photons.m^{-2}.s^{-1}, suggesting that they are "shade" algae, as previously observed for other red algae (Lüning 1990).

Fertility is suggested as a critical factor explaining the decline in growth rates of *Gracilaria caudata* observed along the experimental period, although the analyses comparing strains from the second (infertile strains) and fourth weeks (fertile strains) did not result in any differences in photosynthetic properties. In the last two experimental weeks, fertile strains showed a poorer rate of growth, around 28% for RD and GB, under lower irradiance, when compared to results observed for the first 14 days. Under higher irradiance, RD showed around 18% and GB showed 31% of growth compared for the first 14 days. In the context of resource tradeoff in reproduction, it is generally assumed that a reduction or cessation of growth is likely at the onset of reproduction since resources must be partitioned (De Wreede and Klinger 1988). Our results corroborate this reproductive cost since no differences were observed in photosynthetic properties of infertile and fertile strains. Indeed, the negative correlation between reproductive state and growth was previously reported for other *Gracilaria* spp. In *G. sjoestedtii* Kylin, fertile tetrasporophytes grew less than unfertilized female gametophytes (Zhang and van der Meer 1988). This negative effect of reproduction on growth was also observed for *G. chilensis* Bird, McLachlan & Oliveira (Santelices and Varela 1995; Guillermin et al. 2014). The extra energy costs for producing spores, as previously shown in some species (Kain and Destombe 1995; Santelices and Varela 1995), could be explained by the fact that fertile tetrasporophytes eventually become senescent and almost stop growing (Zhang and van der Meer 1988).

No difference of PE content or photosynthetic properties was seen between RD and GB strains of *Gracilaria caudata* when cultivated under higher irradiance. In this condition, the red strain could be using PE as a nitrogen source to maintain basic metabolic activities. This mechanism was previously described for other red algae (García-Sanchez et al. 1993; Talarico et al. 2000). Otherwise, because it has also been suggested for other red algae (Sinha et al. 1995), the RD strain could be using PE as a photoprotective mechanism against increased irradiance. In the PE- deficient GB strain, another protective mechanism may be present. In red algae, carotenoids can also constitute an important photoprotective compound (Carnicas et al. 1999; Figueroa et al. 2008; Esteban et al. 2009), and this could also be the case for GB, since a higher Car/Chl-*a* rate was found when compared to RD.

Interestingly, in the last weeks of the experiment, the growth of RD and GB strains of *G. caudata* performed differently under 150 μmol photons.m^{-2}.s^{-1}. Specifically, GB presented similar (third week) or higher (fourth week) growth rates compared to RD strain, just the opposite of growth rates compared during the first weeks before tetrasporangium differentiation. Therefore, the GB strain, although fertile, was better able to maintain its growth and even exceed the growth rates of wild-type RD in the last week. In fact, a photoacclimation mechanism promoted by high APC and PC content found in GB under higher irradiance would result in optimizing absorbed light energy to mask the effects of low PE content. This mechanism could explain the higher growth rates observed in GB during the last week of experimentation, and it highlights intraspecific variation in *G. caudata*. These differences in responses, depending on the conditions, suggest that the occurrence of the GB variant in the natural population could benefit the species by occupying different niches on the substrate.

In conclusion, although the GB strain of *G. caudata* had a lower performance than that of wild type when both were infertile, growth of the GB strain exceeded that of the RD strain under conditions of fertility and high irradiance. This characteristic could be advantageous to the species, favoring the GB strain in nature, since *G. caudata* is normally found in a fertile state along the Brazilian coast, and most individuals are tetrasporophytes. This feature could also be important to the selection of this GB strain for future mariculture in Brazil. Despite its deficiency in PE, the GB strain did present higher values of PC and APC, which apparently compensate for the lack of PE. Further studies could assess the performance of GB gametophytes in laboratory conditions and the frequencies of the GB variant in local populations. These studies could elucidate possible advantages to the species in maintaining this variant.

References

Araujo FO, Ursi S, Plastino EM (2014) Intraspecific variation in *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): growth, pigment content, and photosynthesis. J Appl Phycol 26:849-858.

Ayres-Ostrock LM, Plastino EM (2014) Effects of short-term exposure to ultraviolet-B radiation on photosynthesis and pigment content of red (wild types), greenish-brown, and green strains of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). J Appl Phycol 26:867-879.

Bixler HJ, Porse H (2011) A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. J App Phycol 23:321–335.

Carneiro MAA, Marinho-Soriano E, Plastino EM (2011) Phenology of an agarophyte *Gracilaria birdiae* Plastino and E.C. Oliveira (Gracilariales,Rhodophyta) in Northeastern Brazil. Rev Bras Farmacogn 21:317-322.

Carnicas E, Jiménez C, Niell FX (1999) Effects of changes of irradiance on the pigment composition of *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang et Xia J. Photochem Photobiol B: Biol 50:149-158.

Costa E, Plastino EM, Petti R, Oliveira EC, Oliveira MC (2012) The Gracilariaceae Germplasm Bank of the University of São Paulo, Brazil - a DNA barcoding approach. J Appl Phycol 24:1643–1653.

Costa VL, Plastino EM (2011) Color inheritance and pigment characterization of red (wild-type), green strains of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). J Appl Phycol 23:599-605.

De Wreede R, Klinger T (1988). Reproductive strategies in algae. In Lovett-Doust J, Lovett-Doust L (eds), Plant Reproductive Ecology: Patterns and Strategies. Oxford University Press, Oxford pp 267-284.

Esteban R, Martínez B, Fernádez-Marín B, Becerril JM, García-Plazaola JI (2009) Carotenoid composition in Rhodophyta: insights into xantophyll regulation in *Corallina elongata*. Eur J Phycol 44:221-230.

Ferreira LB, Barufi JB, Plastino EM (2006) Growth of red and green strains of the tropical agarophyte *Gracilaria cornea* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) in laboratory. Rev Bras Bot 29:187–192.

Figueroa FL, Bueno A, Korbee N, Santos R, Mata L, Schuenhoff A (2008) Accumulation of mycosporine-like amino acids in *Asparagopsis armata* grown in tanks with fishpond effluents of Gilthead Sea Bream, *Sparus aurata*. J World Aquac Soc 39:692-699.

García-Sánchez MJ, Fernández JA, Niell FX (1993) Biochemical and physiological responses of *Gracilaria tenuistipitata* under two different nitrogen treatments. Physiol Plantarum 88:631–637.

Guillemin ML, Valenzuela P, Gáitan-Espitia JD, Destombe C (2014) Evidence of reproductive cost in the triphasic life history of the red alga *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). J Appl Phycol 26:569-575.

Hayashi L, Bulboa C, Kradolfer P, Soriano G, Robledo D (2014) Cultivation of red seaweeds: a Latin

American perspective. J Appl Phycol 26:719-727.

Inskeep WP, Bloom PR (1985) Extinction coefficients of chlorophyll *a* and *b* in N, N-dimethylformamide and 80% acetone. Plant Physiol 77:483–485.

Kain JM, Destombe C (1995) A review of the life history, reproduction and phenology of *Gracilaria.* J Appl Phycol 7:269-281.

Kursar TA, van der Meer J, Alberte RS (1983) Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*: I. Biochemical analyses if pigment mutations. Plant Physiol 73:353–360.

Lignell A, Pedersén M (1989) Agar composition as a function of morphology and growth rate. Studies on some morphological strains of *Gracilaria secundata* and *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta). Bot Mar 32:219–227.

Lüning, K (1990) Seaweeds: their environment, biogeography and ecophysiology. Wiley Interscience. New York pp 296-307.

Miranda GEC, Yokoya NS, Fujii MT (2012) Effects of temperature, salinity and irradiance on carposporeling development of *Hidropuntia caudata* (Gracilariales, Rhodophyta). Rev Bras Farmacogn 22:818-824.

Moura AD, Shukla J (1981) On the dynamics of droughts in northeast Brazil: observation, theory and numerical experiments with a general circulation model. J Atmos Sci 38:2653–2675.

Oliveira EC, Alveal K, Anderson R (2000) Mariculture of the agar-producing Gracilarioid red algae. Rev Fish Sci 8:345-378.

Oliveira EC, Miranda GEC (1998) Aspectos sociais e econômicos da explotação de algas marinhas do Brasil. In: (Paula EJ, Cordeiro-Marino M, Santos DP, Plastino EM, Fujii MT, Yokoya NS eds.) Anais IV Congresso Latino Americano, II Reunião Libero-Americana e VII Reunião Brasileira de Ficologia. Sociedade Ficológica da América Latina e Caribe, Sociedade Brasileira de Ficologia, São Paulo. pp 149–156.

Oliveira EC, Plastino EM (1984) The life history of some species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Brasil. Jap J Phycol 32:1-6.

Oliveira EC, Plastino EM (1994) Gracilariaceae. In: Akatsuka I (ed) Biology of economic algae. SPB Academic, The Hague, pp 185-226.

Plastino EM, Guimarães M (2001) Diversidad intraespecifica. In: Alveal KV, Antezana TJ (eds)

Sustentabilidad de la Biodiversidad. Universidad de Concepción, Concepción, pp 19–27.

Plastino EM, Guimarães M, Matioli SR, Oliveira EC (1999) Codominant inheritance of polymorphic color variants of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). Genet Mol Biol 22:105–108.

Plastino EM, Oliveira EC (1990) Crossing experiments as an aid to the taxonomic recognition of the agarophytes *Gracilaria*. In: Oliveira EC, Kautsky N (eds) Cultivation of seaweeds in Latin America. Universidade de São Paulo, São Paulo, pp 127–133.

Plastino EM, Oliveira EC (1997) *Gracilaria caudat*a J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) – restoring and old name for a common western Atlantic alga. Phycologia 36:225–232.

Plastino EM, Ursi S, Fujii MT (2004) Color inheritance, pigment characterization, and growth of a rare light green strain of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). Phycol Res 52:45–52.

Ramus J, van der Meer JP (1983) A physiological test of the theory of complementary chromatic adaptation. I. Color mutants of a red seaweed. J Phycol 19:86–91.

Robinson N, Winberg P, Kirkendale L (2013) Genetic improvement of macroalgae: status to date and needs for the future. J Appl Phycol 25:703–716.

Santelices B, Correa JA, Meneses I, Aedo D, Varela D (1996) Sporeling coalescence and intraclonal variation in *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). J Phycol 32:313–22.

Santelices B, Varela D (1995) Regenerative capacity of *Gracilaria* fragments: Effects of size, reproductive state and position along the axis. J Appl Phycol 7:501-506.

Schreiber U (2004) Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. In: Papageorgiou GC, Govindjee (eds) Chlorophyll *a* fluorescence: a signature of photosynthesis. Springer, Dordrecht, pp 279–319.

Sinha RP, Lebert M, Kumar A, Kumar HD, Häder DP (1995) Spectroscopic and biochemical analyses of UV effects on phycobilisomes of *Anabaena* sp. and *Nostoc carmium*. Bot Acta 108:87-92.

Talarico L, Maranzana G (2000) Light and adaptive responses in red macroalgae: an overview. J Photoch Photobiol B 56:1-11.

Ursi S, Costa VL, Hayashi L, Pereira RTL, Paula EJ, Plastino EM (2013) Intraspecific variation in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): growth, and agar yield and quality of color strains under aquaculture. Bot Mar 56:241–248.

Ursi S, Pedersén M, Plastino EM, Snoeijs P (2003) Intraspecific variation of photosynthesis, respiration

and photoprotective carotenoids in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales: Rhodophyta). Mar Biol 142:997-1007.

Ursi S, Plastino EM (2001) Crescimento in vitro de linhagens de coloração vermelha e verde clara de *Gracilaria* sp. (Gracilariales, Rhodophyta) em dois meios de cultura: análise de diferentes estádios reprodutivos. Rev Bras Bot 24:587–594.

van der Meer JP (1990) Genetics. In: Cole K, Sheath R (eds) Biology of the red algae. Cambridge University Press, New York, pp 103–121.

van der Meer JP, Bird NL (1977) Genetics of *Gracilaria* sp. (Rhodophyceae, Gigartinales). I. Mendelian inheritance of two spontaneous green variants. Phycologia 16:159-161.

Webb WL, Newton M, Starr D (1974) Carbon dioxide exchange of *Alnus rubra*: A mathematical model. Oecologia 17:281-291.

Wellburn AR (1994) The spectral determination of Chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. J Plant Physiol 144:307–313.

Yokoya NS, Necchi OJr, Martins AP, Gonzalez SF, Plastino EM (2007) Growth responses and photosynthetic characteristics of wild and phycoerythrin-deficient strains of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). J Appl Phycol 19:197-205.

Yokoya NS, Oliveira EC (1992a) Effects of salinity on the growth rate, morphology and water content of some Brazilian red algae of economic importance. Cienc Mar 18:49–64.

Yokoya NS, Oliveira EC (1992b) Temperature response of economically important red algae and their potential for mariculture in Brazilian waters. J Appl Phycol 4:339–345.

Yokoya NS, Plastino EM, Artel R (2003) Physiological responses and pigment characterization of two colour strains of the carrageenophyte *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). In: Chapman ARO, Anderson RJ, Vreeland VJ, Davison R (eds) Proceedings of the 17th International Seaweed Symposium. Oxford University Press, New York, pp 425–4334.

Zar, JH (1996) Biostatistical analysis. Prentice Hall, Upper Saddle River.

Zhang XC, van der Meer JP (1988) A genetic study on *Gracilaria sjoestedtii*. Can J Bot 66:2022–2026.

CAPÍTULO 3

Efeitos da irradiância em gametófitos de *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta) procedentes de três populações da costa brasileira: crescimento; fotossíntese; e conteúdo pigmentar e protéico.

Resumo

Gracilaria caudata apresenta uma ampla distribuição geográfica, além de ser considerada uma das principais agarófitas coletadas no nordeste brasileiro. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da irradiância (70 e 150 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}) no número de ramificações, nas taxas de crescimento, nos parâmetros da fotossíntese e no conteúdo pigmentar de gametófitos de *G. caudata* procedentes de três localidades distintas da costa brasileira: estados do Ceará (CE), Bahia (BA) e São Paulo (SP). Nossa hipótese foi que indivíduos procedentes da região nordeste são mais adaptados a maiores irradiâncias que indivíduos da região sudeste. As condições gerais de cultivo foram: 23-25ºC; 14L:10E; 70±5 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}; 32 psu; água do mar enriquecida com solução von Stosch modificada; e aeração a cada 30 minutos. Durante os experimentos, duas condições de irradiâncias foram testadas: 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (70) e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (150). As taxas de crescimento (TCs) e os parâmetros da fotossíntese foram analisados semanalmente ao decorrer de 28 dias. O conteúdo pigmentar e o número de ramificações foram analisados ao final do experimento. Gametófitos, cultivados em 150 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}, apresentaram maior número de ramificações, TCs, fotossíntese máxima ($ETR_{máx}$) e saturação luminosa (I_k), quando comparados aos cultivados em 70 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}. Gametófitos CE-70 e SP-70 apresentaram TCs semelhantes, e essas foram maiores do que as observadas em BA-70. Entretanto, CE-150 apresentaram maiores TCs do que SP-150, e ambas superaram as TCs de BA-150. Gametófitos CE-70 e BA-70 apresentaram menores $ETR_{máx}$ e maiores $F_{máx}$, α e Re do que SP-70. Gametófitos CE-150 e BA-150 apresentaram maiores I_k (técnica de fluorescência) do que SP-150. Entretanto, CE-150 apresentaram maiores α do que BA-150, e ambos apresentaram valores superiores aos de SP-150. Gametófitos do CE-150 apresentaram maiores valores de $ETR_{máx}$ e *Re* e menores valores de I_k (técnica de DBO), quando comparados aos da BA-150 e SP-150, que apresentaram valores semelhantes entre eles. A análise global desses dados corrobora a hipótese de que linhagens da região nordeste são mais adaptadas a maiores irradiâncias que linhagens da região sudeste e sugere que a espécie apresenta ecótipos relacionados à irradiância. A população da BA apresenta características intermediárias em relação às populações do Ceará e São Paulo, pois, dependendo do parâmetro analisado, seus gametófitos se assemelham aos do CE ou aos de SP.

Abstract

Gracilaria caudata has a wide geographical distribution and is considered one of the most important agarophyte collected in northeastern Brazil. This study aimed to evaluate the effects of irradiance (70 e 150 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}) on number of branches, growth rates, photosynthesis parameters and pigment content of gametophytes of *G. caudata* from three distinct geographical areas of Brazilian coast: Ceará State (CE), Bahia State (BA) and São Paulo State (SP). Our hypothesis was that gametophytes from the northeast are more adapted to higher light intensities that individuals from the southeast coast. The general conditions of cultivation were: 23-25ºC; 14L: 10D; 70±5 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}; 32 ups; seawater enriched with von Stosch modified solution; and aeration every 30 minutes. Gametophytes were cultivated in two different conditions along experiment: 70 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} (70) and 150 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} (150). Growth rates (TCs) and photosynthetic parameters were assessed weekly for 28 days. The pigment content and the number of branches were analyzed at the end of 28 days. Gametophytes cultivated in 150 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} showed a higher number of branches, TCs, maximum photosynthesis ($ETR_{máx}$) and light saturation (Ik) when compared to gametophytes cultivated at 70 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}. Gametophytes CE-70 and SP-70 showed similar TCs and these were higher than those observed in BA-70. However, CE-150 showed higher TCs than SP-150 and both exceeded TCs of BA-150. Gametophytes CE-70 and BA-70 had lower $ETR_{máx}$ and higher $F_{máx}$, α and *Re* than SP-70. Gametophytes CE-150 and BA-150 had higher *Ik* (fluorescence technique) than SP-150. However, CE-150 showed higher α than BA-150 and both showed higher values than the SP-150. CE-150 $ETR_{máx}$ gametophytes showed higher values and smaller Re and Ik values (BOD technique) compared to the BA-150 and SP-150, which showed similar values between them. A global analysis of these data supports the hypothesis that the strains of *G. caudata* from northeast region are better adapted to higher light intensities that strains from southeastern region and suggests that the specie has ecotypes related to irradiance. The population of the BA presents intermediate characteristics in relation to populations of Ceará and São Paulo, because depending on the parameter analyzed, their gametophytes are similar to the CE or the SP.

Introdução

O gênero *Gracilaria* Greville é conhecido por ter uma ampla distribuição (Oliveira e Plastino 1994) e por ser a principal macroalga para extração de ágar, sendo o Chile e a Indonésia os principais países produtores no mundo (Bixler e Porse 2011; Hayashi et al. 2014). No Brasil, a explotação de algas começou na década de 60. Porém, por falta de regulamentação e sob explotação, foi necessário cessar as atividades para não comprometer os bancos naturais (Câmara-Neto 1987). A partir de então, cultivos artesanais nos

estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Paraíba foram iniciados visando reduzir o impacto das extrações (Câmara-Neto 1987; Hayashi et al. 2014).

G. caudata J. Agardh é considerada uma das mais importantes espécies para a produção de ágar na região nordeste do Brasil (Oliveira e Alveal 1990; Oliveira e Miranda 1998). Além disso, mostrou-se eficiente na biorremediação de nutrientes em cultivo de fazendas de camarão (Marinho-Soriano et al. 2009). O conhecimento sobre o cultivo dessa macroalga é ainda muito escasso, pois conhece-se pouco sobre sua fisiologia (Costa e Plastino 2011).

G. caudata apresenta uma ampla distribuição geográfica, estendendo-se desde as ilhas do Caribe até o litoral sul do Brasil, indicando que a espécie está exposta a diferentes temperaturas, irradiâncias e condições de nutrientes. Ocorre em costões rochosos, essencialmente em baias protegidas e águas turvas, estendendo-se do mesolitoral até a franja do infralitoral (Plastino e Oliveira 1997). A espécie apresenta histórico de vida do tipo "*Polysiphonia*" (Oliveira e Plastino 1984) e sob condições laboratoriais, tolera condições variáveis de salinidade (10-60 ups, como *Gracilaria* sp., Yokoya e Oliveira 1992*a*) e temperatura (18-30ºC; como *Gracilaria* sp., Yokoya e Oliveira 1992*b*). Estudos em condições controladas mostraram que tetrasporófitos apresentam maiores taxas de crescimento que gametófitos, e indivíduos de populações distintas respondem diferentemente quando submetidos à radiação ultravioleta B (Araújo et al. 2014).

Como resultado da plasticidade fenotípica promovida por processos de adaptação, espera-se que gametófitos de *G. caudata* procedentes de diferentes locais da costa brasileira apresentem variações fisiológicas sob condições controladas de laboratório quando submetidos a irradiâncias distintas, caracterizando-se como ecótipos. Visando testar essa hipótese, pretende-se analisar os seguintes aspectos: taxas de crescimento, atividade fotossintetizante, conteúdo pigmentar e protéico de gametófitos derivados de plantas de três populações distribuídas ao longo da costa brasileira.

Material e Métodos

Material biológico

Foram utilizados ápices de indivíduos gametofíticos femininos não fertilizados de *Gracilaria caudata* procedentes dos estados do Ceará, Bahia e São Paulo (Capítulo 1, item 3.1).

Desenho experimental

Após o período de pré-tratamento (duas semanas, nas condições gerais de cultivo e em irradiâncias de 70 e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}), cinco repetições simultâneas (cinco indivíduos) foram testadas para cada população e irradiância: estado do Ceará, 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (CE-70) e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (CE-150); estado da Bahia, 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (BA-70) e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (BA-150);

e estado de São Paulo, 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (SP-70) e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (SP-150). Cada repetição constou de quatro ápices de um mesmo indivíduo (24 mg), sendo que cada ápice apresentava aproximadamente 2 cm de comprimento. Esses ápices foram cultivados em Erlenmayer de 500ml, utilizando-se 400ml de água do mar enriquecida. As demais condições de cultivo constam no capítulo 1, item 3.2.

O período experimental foi de quatro semanas, com mensurações de massa fresca e substituição do meio de cultura realizadas semanalmente. No início e final do experimento, as algas foram fotografadas para análise morfológica quanto ao número de ramos diferenciados. As quantificações de ramos diferenciados foram realizadas somando-se todos os ápices de primeira e segunda ordens ao longo do talo. O potencial fotossintetizante foi avaliado em três ocasiões: 1º, 14º e 28º dias por meio da avaliação da fluorescência *in vivo* da clorofila *a*. No 28º dia, avaliou-se a produtividade efetiva da fotossíntese por meio do método da demanda biológica de oxigênio. No final do experimento, esses ramos foram cultivados por mais dois dias, após a reposição do meio de cultura. Em seguida, foram congelados em nitrogênio líquido. Posteriormente, esse material foi utilizado em análises do conteúdo de ficobiliproteínas, clorofila *a* e proteínas solúveis totais.

Avaliação do crescimento e do número de ápices diferenciados

Foi empregada a metodologia apresentada no capítulo 1, item 3.3. Os valores de taxas de crescimento (TCs), foram submetidos a análise de variância multifatorial (MANOVA) e medidas repetidas (ANOVA). O número de ápices diferenciados em indivíduos das diferentes populações foi estatisticamente comparado por análise de medidas repetidas (ANOVA). Ambas as análises levaram em conta as seguintes variáveis independentes: procedência dos indivíduos e irradiância.

Fotossíntese: fluorescência *in vivo* da clorofila *a* e demanda biológica de oxigênio (DBO)

Foram empregadas as metodologias apresentadas no Capítulo 1, item 3.4. Os valores obtidos a partir da fluorescência *in vivo* da clorofila *a* foram submetidos à análise de variância multifatorial (MANOVA) e medidas repetidas (ANOVA), enquanto que os valores obtidos a partir do DBO foram submetidos à análise de variância multifatorial (MANOVA). Ambas as análises levaram em conta as seguintes variáveis independentes: procedência dos indivíduos e irradiância.

Composição pigmentar e protéica

Foram empregadas as metodologias apresentadas no Capítulo 1, item 3.5. As concentrações pigmentares e de proteínas totais foram estatisticamente comparadas por análise de variância multifatorial

(MANOVA) de dois fatores, levando-se em conta as seguintes variáveis independentes: procedência dos indivíduos e irradiância.

Resultados

Morfologia

A coloração dos gametófitos de *Gracilaria caudata* ao longo do experimento variou de acordo com a procedência, independentemente da irradiância testada; somente gametófitos de SP apresentaram variação na coloração entre as duas irradiâncias. Após 28 dias de cultivo, independentemente da irradiância, gametófitos da BA apresentaram coloração vermelho-escura, quando comparados aos gametófitos do CE, que apresentaram coloração rosada. Gametófitos procedentes de SP, cultivados em 70 µmol de fótons.$m^{-2}.s^{-1}$ apresentaram coloração amarronzada, enquanto que os cultivados em 150 µmol de fótons.$m^{-2}.s^{-1}$ apresentaram-se pardacentos.

Tabela 1. Número total e média de ramos diferenciados em gametófitos de *G. caudata*, procedentes do estado do Ceará (CE), Bahia (BA) e São Paulo (SP), cultivados em 70 µmol de fótons.$m^{-2}.s^{-1}$ (70) e 150 µmol de fótons.$m^{-2}.s^{-1}$ (150). O número total foi calculado a partir da soma de ápices presentes em todos os frascos de uma mesma condição no 1º (T_1) e 28º dias (T_{28}). A média e desvio padrão foram calculados a partir das cinco repetições por condição. Letras distintas representam diferenças significativas dentre as procedências e irradiâncias ($p<0.05$).

Procedência-Irradiância	T_1 (total)	T_{28} (total)	T_1 (média)	T_{28} (média)
CE-70	29	104	$5,8\pm0,8^{f}$	$20,8\pm1,4^{e}$
BA-70	31	159	$6,2\pm0,8^{f}$	$31,8\pm3,2^{d}$
SP-70	35	153	$7,0\pm1,2^{f}$	$30,6\pm4,8^{d}$
CE-150	32	551	$6,4\pm1,8^{f}$	$110,2\pm16,6^{a}$
BA-150	43	263	$8,6\pm1,1^{f}$	$52,6\pm11,5^{c}$
SP-150	40	331	$8,0\pm1,0^{f}$	$66,2\pm5,5^{b}$

Gametófitos cultivados em 150 µmol de fótons.$m^{-2}.s^{-1}$ apresentaram um maior número de ramificações, quando comparados aos cultivados em 70 µmol de fótons.$m^{-2}.s^{-1}$, independentemente da procedência (Tabela 1; Figura 1) (F=849.91, p<0.02). Em 150 µmol de fótons.$m^{-2}.s^{-1}$, os gametófitos procedentes do CE apresentaram maior número de ramificações em comparação com os de SP e BA (F=60.54, p<0.00), e esses últimos foram os que menos ramificaram. Contudo, em 70 µmol de fótons.$m^{-2}.s^{-1}$, gametófitos da BA apresentaram números semelhantes de ramificações, quando comparados aos de

SP (F=60.54, p>0.76). Nessa irradiância, BA e SP mostraram-se mais ramificados que gametófitos do CE (F=60.54, p<0.01).

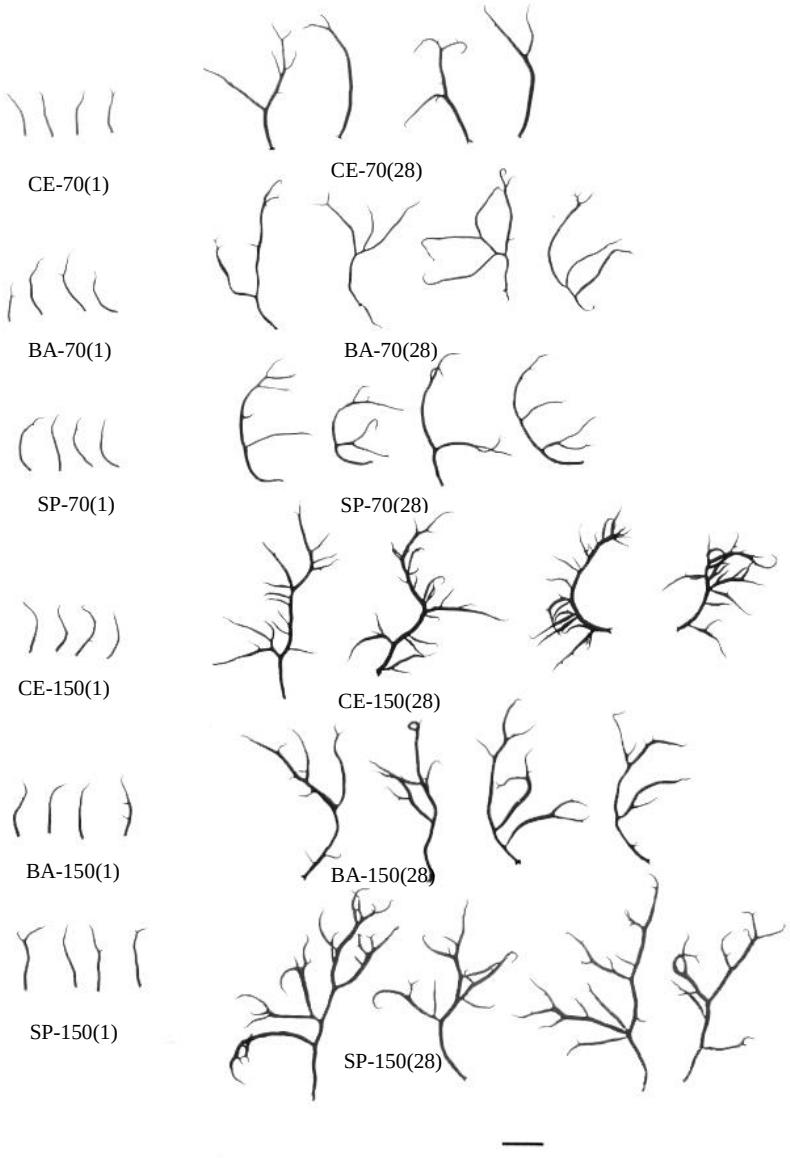

Figura 1. Ápices de gametófitos femininos de *Gracilaria caudata* originados a partir de algas procedentes do estado do Ceará (CE), Bahia (BA) e São Paulo (SP) cultivados em 70 µmol defótons $m^{-2}.s^{-1}$ (70) e 150 µmol de fótons $m^{-2}.s^{-1}$ (150) no 1º (1) e 28º dias (28) de cultivo. É apresentada uma repetição (com quatro ápices) por procedência e irradiância. Escala, 1cm.

Taxas de crescimento

Foi observada interação entre TCs (1-7, 8-14, 15-21 e 22-28 dias) e irradiâncias (70 e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}) para indivíduos de *G. caudata* do CE, BA e SP (F=3.35, p<0.00).

Gametófitos cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, independentemente da população de origem, apresentaram, de forma geral, maiores TCs durante os primeiros 14 dias de cultivo, quando comparados aos gametófitos cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (F=108.21, p<0.00). A única exceção ocorreu em gametófitos da BA, para aos quais, na segunda semana de cultivo, não se observou diferença entre gametófitos cultivados em 70 e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (F=8.31, p>0.21) (Figura 2). Durante os últimos 14 dias de cultivo em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, observou-se uma queda no crescimento dos indivíduos do CE e SP; em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, essa queda significativa foi apenas observada para indivíduos da BA.

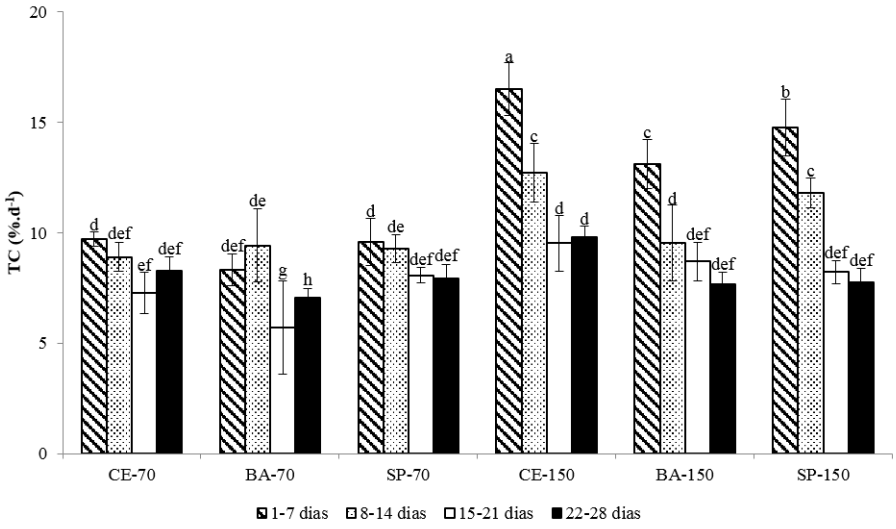

Figura 2. *Gracilaria caudata*: taxas de crescimento semanais de gametófitos derivados de plantas procedentes dos estados do Ceará (CE), Bahia (BA) e São Paulo (SP) e cultivados em 70 (70) e 150 (150) µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} ao longo de 28 dias. Dados apresentados como média e desvio padrão (n=5). Letras distintas representam diferenças significativas dentre as populações, irradiâncias e semanas (p<0.05).

A análise do crescimento foi realizada considerando-se também o período experimental total (28 dias). Foi observada interação entre TCs e irradiâncias (70 e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}) para gametófitos de *G. caudata* do CE, BA e SP (F=8.15, p<0.00) (Figura 3). Foram verificadas diferenças significativas entre as TCs de gametófitos procedentes das diferentes populações e mantidos em distintas irradiâncias. Gametófitos cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, independentemente da população de origem,

apresentam maiores TCs, quando comparados aos gametófitos cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (F=191.06, p<0.00). Em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, gametófitos do CE apresentaram maiores TCs, quando comparados aos gametófitos da BA e SP (F=27.27, p<0.00). Em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, foi observado que os gametófitos do CE e SP apresentaram TCs semelhantes entre si (F=27.27, p>0.59) e superiores aos gametófitos da BA (F=27.27, p<0.00). Os gametófitos da BA foram os que apresentaram menores TCs, independentemente da irradiância testada, 70 ou 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (Figura 3).

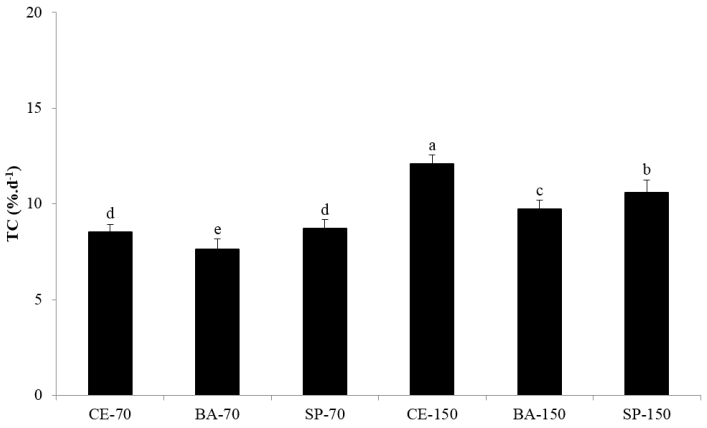

Figura 3. *Gracilaria caudata*: taxas de crescimento de gametófitos derivados de plantas procedentes dos estados do Ceará (CE), Bahia (BA) e São Paulo (SP) e cultivados em 70 (70) e 150 (150) µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} por um período de 28 dias. Dados apresentados como média e desvio padrão (n=5). Letras distintas representam diferenças significativas dentre as populações, irradiâncias e semanas (p<0.05).

Fotossíntese: fluorescência *in vivo* da clorofila *a*

Analisando-se gametófitos de *Gracilaria caudata* das diferentes procedências, independentemente das irradiâncias, ao decorrer de 28 dias, observou-se que os valores de fotossíntese máxima (ETR_{max}) foram maiores em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, quando comparados com os de 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (CE-F=74.23, p<0.00; BA-F=98.89, p<0.01; SP-F=326.101, p<0.00) (Tabela 2). Os valores de saturação luminosa (I_k) variaram dependendo das localidades dos gametófitos e irradiâncias testadas. CE-150 apresentou maior valor de I_k, do que CE-70 (CE-F=85.73, p<0.00); BA-150 e SP-150 apresentaram maiores valores de I_k, do que BA-70 e SP-70 no 28º dia (BA-F=11.34, p<0.02; SP-F=60.77, p<0.01) (Tabela 2). Os valores de rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F$m'), quando analisados separadamente os gametófitos de cada uma das localidades, foram maiores em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, quando comparados com os de 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} no 28º dia (CE- F=4.75, p<0.00; BA- F=6.37, p<0.00; SP- F=0.32, p<0.03) (Tabela 2). Os

valores de eficiência fotossintetizante (αETR) para gametófitos do CE e BA foram semelhantes, independentemente da irradiância (CE- F=0.39, p>0.05; BA- F=2.12, p>0.06); contudo, SP-150 apresentou maiores valores de αETR do que SP-70 no 1º e 14º dia (SP- F=15.36, p<0.01) (Tabela 2).

Tabela 2. *Gracilaria caudata*: parâmetros das curvas de FxI de gametófitos procedentes dos estados do Ceará (CE), Bahia (BA) e São Paulo (SP) cultivados em 70 (70) µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} e 150 (150) µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} durante 28 dias. Medidas realizadas em três ocasiões: 1º dia (1); 14º dia (14); e 28º dia (28). Dados apresentados como médias e desvio padrão (n=5). I_k- saturação luminosa; αETR- eficiência fotossintetizante; ETR$_{max}$- fotossíntese máxima; ΔF/Fm′- rendimento quântico efetivo.

		Procedência-Irradiância					
Tempo (dias)	Parâmetros	CE-70	BA-70	SP-70	CE-150	BA-150	SP-150
1	I_k	39,7±4,9	45,4±29,1	39,5±3,3	80,9±8,8	83,6±19,7	77,7±10,2
	αETR	0,03±0,0	0,02±0,0	0,02±0,0	0,03±0,0	0,03±0,0	0,05±0,0
	ETR$_{máx}$	1,43±0,1	1,11±0,1	1,09±0,0	3,02±0,2	2,58±0,2	3,90±0,4
	ΔF/Fm′	0,55±0,0	0,50±0,0	0,50±0,0	0,59±0,0	0,51±0,0	0,55±0,0
14	I_k	29,9±8,1	90,9±22,0	45,3±10,8	78,4±13,5	81,5±11,5	71,9±11,3
	αETR	0,03±0,0	0,02±0,0	0,03±0,0	0,03±0,0	0,03±0,0	0,04±0,0
	ETR$_{máx}$	1,06±0,1	1,92±0,1	1,49±0,3	2,82±0,2	2,52±0,2	3,50±0,3
	ΔF/Fm′	0,56±0,0	0,50±0,0	0,48±0,0	0,55±0,0	0,48±0,0	0,55±0,0
28	I_k	53,3±5,6	68,5±12,9	57,2±15,3	107,4±24,5	107,5±9,8	82,3±9,5
	αETR	0,03±0,0	0,02±0,0	0,03±0,0	0,03±0,0	0,02±0,0	0,03±0,0
	ETR$_{máx}$	1,58±0,1	1,63±0,1	2,02±0,1	3,52±0,9	2,31±0,3	2,64±0,2
	ΔF/Fm′	0,54±0,0	0,49±0,0	0,57±0,0	0,43±0,0	0,41±0,0	0,49±0,0

Comparando-se gametófitos procedentes da mesma população, cultivados numa mesma irradiância, ao decorrer de 28 dias, observou-se que os valores de ETR$_{max}$ variaram quando analisados separadamente os gametófitos de cada uma das localidades, dependendo da irradiância testada: CE-70 e BA-150 apresentaram valores semelhantes de ETR$_{max}$, no 1º, 14º e 28º dias (CE-70- F=8.26, p>0.06; BA-150- F=6.62, p>0.17); BA-70, SP-70 e CE-150 apresentaram maiores valores de ETR$_{max}$ no 28º dia (BA-70 - F=6.62, p<0.00; SP-70- F=1.01, p<0.01; CE-150- F=8.26, p<0.03); e SP-150 apresentou menores valores de ETR$_{max}$ no 28º dia (CE-150 - F=8.26, p<0.03) (Tabela 2). Os valores de I_k para CE-70, BA-70, BA-150, SP-70 e SP-150 foram semelhantes no 1º, 14º e 28º dias (CE-70- F=12.51, p>0.09; BA-70- F=4.77, p>0.07; BA-150- F=4.77, p>0.14; SP-70- F=2.54, p>0.10; SP-150- F=4.77, p>0.41); contudo, CE-150 apresentou maiores valores de I_k no 28º dia (CE-150- F=12.51, p<0.00) (Tabela 2). Os valores de

$\Delta F/F$m′ variaram quando analisados separadamente os gametófitos de cada uma das localidades, dependendo da irradiância testada. CE-70 e BA-70 apresentaram valores semelhantes de $\Delta F/F$m′ no 1º, 14º e 28º dias (CE-70- F=63.38, p>0.30; BA-70- F=7.57, p>0.64); contudo, SP-70 apresentou maior valor de $\Delta F/F$m′ no 28º dia (SP-70- F=0.35, p<0.00). CE-150, BA-150 e SP-150 apresentaram maiores valores de $\Delta F/F$m′ no 1º e 14º dias (CE-150- F=63.38, p<0.00; BA-150- F=7.57, p<0.00; SP-150- F=0.35, p<0.01) (Tabela 2). Os valores de αETR para CE-70, CE-150, BA-70, BA-150 e SP-70 foram semelhantes no 1º, 14º e 28º dias (CE-70- F=6.19, p>0.05; CE-150- F=6.19, p>0.29; BA-70- F=5.22, p>0.09; BA-150- F=5.22, p>0.05; SP-70- F=4.15, p>0.11); contudo, SP-150 apresentou maiores valores de I_k no 1 º e 14º dias (SP-150- F=4.15, p<0.00) (Tabela 2).

Comparando-se gametófitos, das diferentes procedências, cultivados em 70 ou 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} no 28º dia amostral, observou-se diferenças quanto aos parâmetros analisados. Os valores de ETR_{max} foram maiores para SP-70, do que em CE-70 e BA-70, esses apresentaram valores semelhantes (F=5.92, p<0.00); contudo, gametófitos do CE-150 apresentaram maiores valores de ETR_{max}, do que os da BA-150 e SP-150, esses apresentaram valores semelhantes (F=15.80, p<0.00) (Tabela 2). Os valores de I_k para CE-70, BA-70 e SP-70 no 28º dia foram semelhantes (F=15.37, p>0.13); contudo, os valores de I_k para CE-150 e BA-150 foram maiores do que em SP-150 (F=2.80, p<0.02) (Tabela 2). Os valores de $\Delta F/F$m′ para CE-70, BA-70 e SP-70 no 28º dia foram semelhantes (F=5.59, p>0.24); contudo, esses valores foram maiores para SP-150, do que em CE-150 e BA-150, esses apresentaram valores semelhantes (F=18.07, p<0.00) (Tabela 2). Os valores de αETR para CE-70, BA-70 e SP-70 no 28º dia foram semelhantes (F=8.28, p>0.08); contudo, esses valores foram maiores para CE-150 e SP-150, do que em BA-150 (F=31.43, p<0.00) (Tabela 2).

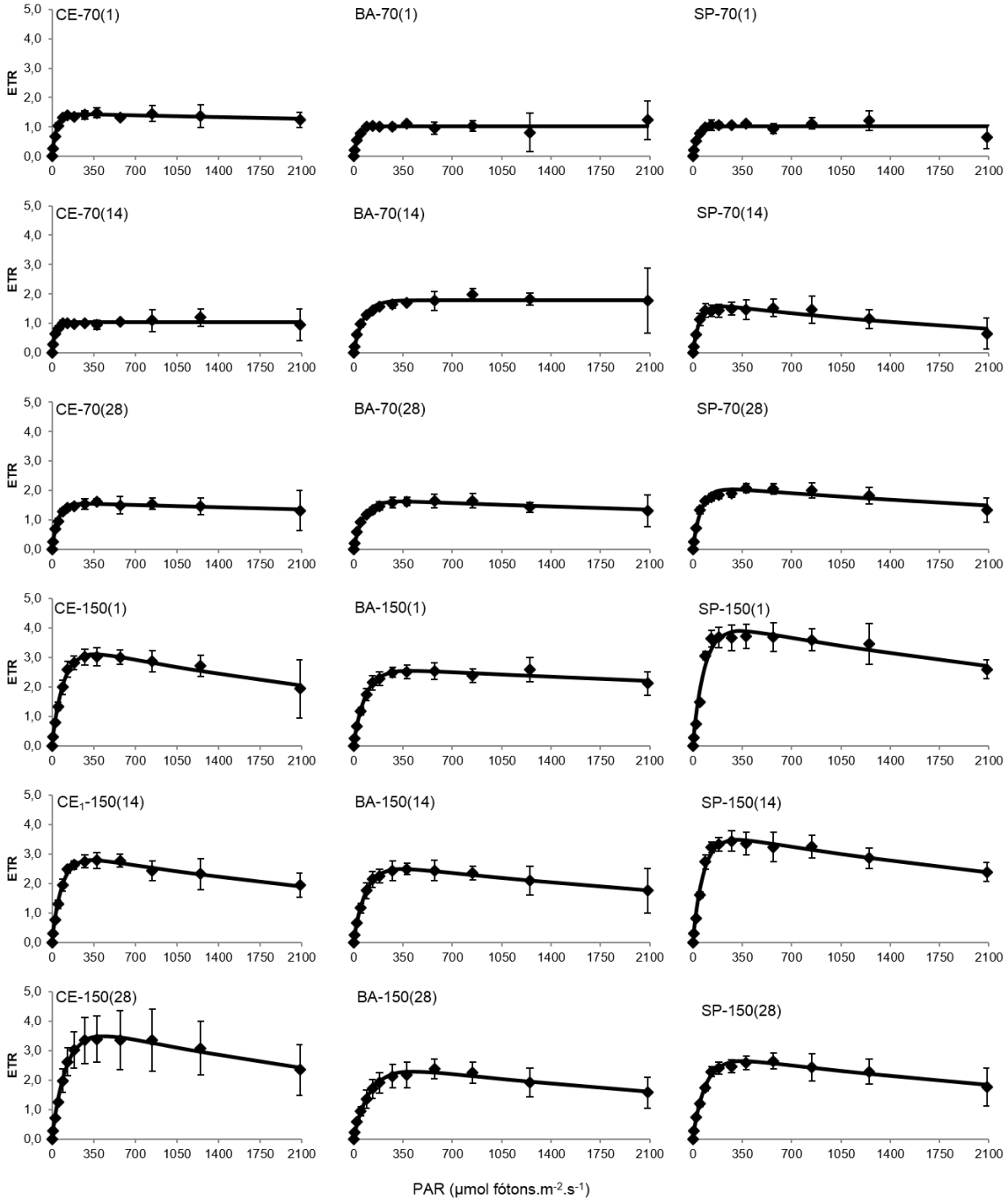

Figura 3. *Gracilaria caudata*: curvas de Fotossíntese-Irradiância obtidas pelo método da fluorescência *in vivo* da clorofila *a* de gametófitos femininos procedentes dos estados do Ceará (CE), Bahia (BA) e São Paulo (SP) cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (70) e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (150) durante 28 dias. Curvas realizadas em três ocasiões: 1º dia (1); 14º dia (14); e 28º dia (28). Dados apresentados como médias e desvio padrão (*n*=5).

Fotossíntese: demanda biológica de oxigênio

Os valores de fotossíntese máxima ($F_{máx}$) e saturação luminosa (I_k), quando analisados separadamente os gametófitos da BA e SP, foram maiores em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, do que em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} ($F_{máx}$- BA- F=20.85, p<0.00; SP- F=20.85, p<0.00) (I_k- BA- F=18.36, p<0.05; SP- F=18.36, p<0.01) (Tabela 3; Figura 4); somente os gametófitos do CE apresentaram valores similares, quando cultivados em 70 e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} ($F_{máx}$- CE- F=20.85, p>0.28; I_k- CE- F=18.36, p>0.30). Os valores de eficiência fotossintetizante (α) variaram, dependendo da irradiância testada: CE-150 apresentou maior α do que CE-70 (H=0.71, p<0.02); BA-70 apresentou maior α do que BA-150 (H=0.71, p>0.00); e SP-70 e SP-150 apresentaram valores semelhantes (H=0.71, p>0.40). Os valores de respiração (*Re*) variaram, dependendo da irradiância testada: SP-150 apresentou maior *Re* do que SP-70 (H=0.00, p<0.00); BA-70 apresentou maior *Re* do que BA-150 (H=0.00, p<0.00); e CE-70 e CE-150 apresentaram valores semelhantes (H=0.00, p>1.00). Os valores de ponto de compensação (I_c) variaram, dependendo da irradiância testada: CE-70 apresentou maior I_c do que CE-150 (H=0.83, p<0.01); BA-150 apresentou maior I_c do que BA-70 (H=0.83, p<0.00); e SP-70 e SP-150 apresentaram valores semelhantes (H=0.83, p>0.22) (Tabela 3).

Analisando-se gametófitos das diferentes procedências, cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, observou-se que os procedentes do CE e BA apresentaram maiores valores de $F_{máx}$, quando comparados aos de SP (F=12.76, p<0.00); gametófitos da BA apresentaram maiores valores de α, quando comparados aos do CE e SP (H=40.04, p<0.02); gametófitos do CE apresentaram maiores valores de *Re*, quando comparados aos da BA e SP (H=118.75, p<0.00); gametófitos de SP apresentaram maiores valores de I_k, quando comparados aos da BA (F=12.85, p<0.02), enquanto que gametófitos do CE apresentaram valorem intermediários, não apresentando diferenças significativas, quando comparados aos da BA e SP (F=12.85, p>0.09); os valores de I_c foram maiores para gametófitos do CE e SP, quando comparados aos da BA (H=10.87, p<0.00).

A análise de gametófitos cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} mostrou que os procedentes do CE apresentam maiores valores de α e *Re*, quando comparados aos da BA e SP (α- H=40.04, p<0.03; *Re*- H=118.75, p<0.00); gametófitos da BA apresentaram maiores valores de $F_{máx}$, quando comparados aos do CE e SP (F=12.76, p<0.02); gametófitos da BA e SP apresentam maiores valores de I_k, quando comparados aos do CE (F=12.85, p<0.00); os valores de I_c foram maiores para gametófitos de SP, quando comparados aos do CE (H=10.87, p<0.00), enquanto que gametófitos da BA apresentaram valores intermediários, não apresentando diferenças significativas, quando comparados aos da BA e SP (H=10.87, p>0.05).

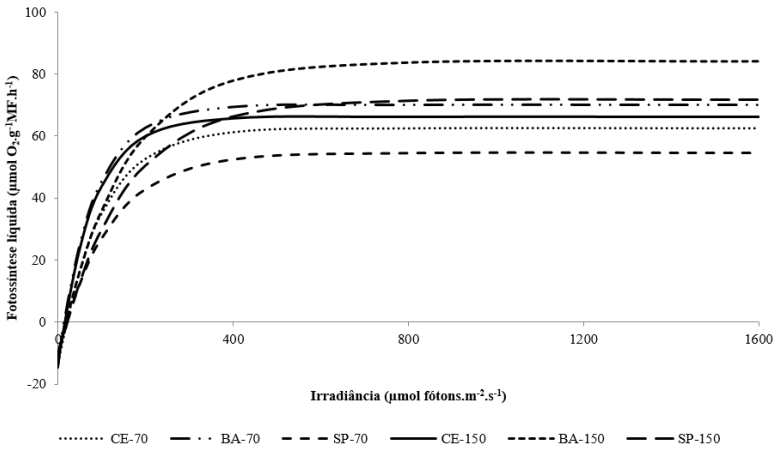

Figura 4. *Gracilaria caudata*: curvas de Fotossíntese x Irradiância calculadas a partir do modelo de hipérbole retangular (Henley, 1993; Equação 3) a partir das taxas de fotossíntese líquida obtidas para gametófitos dos estados do Ceará (CE), Bahia (BA) e São Paulo (SP) cultivados em irradiâncias de 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (70) e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (150) após 28 dias.

Tabela 3. *Gracilaria caudata*: parâmetros das curvas Fotossíntese x Irradiância calculados a partir das taxas de fotossíntese líquida de gametófitos dos estados do Ceará (CE), Bahia (BA) e São Paulo (SP) cultivados em irradiâncias de 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (70) e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (150) durante 28 dias. Dados apresentados como médias e desvio padrão (n=5). I_k, saturação luminosa; I_c, irradiância de compensação; e α, eficiência fotossintetizante; e $F_{máx}$, fotossíntese máxima; e *Re*, respiração no escuro; e F/Re, razão de $F_{máx}/Re$; e R, coeficiente de ajuste mais adequando. Diferenças significativas entre as diferentes procedências e irradiâncias testadas são indicadas com letras distintas (p<0.05).

	Procedência - Irradiância					
Parâmetros	CE-70	BA-70	SP-70	CE-150	BA-150	SP-150
R	0,94	0,97	0,97	0,97	0,93	0,98
$F_{máx}$	77,3±7,25^{b}	82,9±8,48^{b}	64,8±0,72^{c}	82,1±6,95^{b}	95,4±2,83^{a}	82,3±10,40^{b}
α	0,80±0,09$^{\mathbf{b}}$	1,00±0,04$^{\mathbf{a}}$	0,55±0,00$^{\mathbf{c}}$	0,98±0,15$^{\mathbf{a}}$	0,66±0,12$^{\mathbf{b}}$	0,56±0,05$^{\mathbf{c}}$
Re	14,6±0,05^{a}	12,6±0,05^{b}	10,3±0,04^{d}	14,6±0,05^{a}	11,3±0,04^{c}	11,3±0,04^{c}
I_k	97,5±13,18$^{\mathbf{bc}}$	82,7±10,16$^{\mathbf{c}}$	116,5±0,57$^{\mathbf{b}}$	85,8±20,08$^{\mathbf{c}}$	147,8±26,89$^{\mathbf{a}}$	146,1±21,49$^{\mathbf{a}}$
I_c	18,4±1,98$^{\underline{a}}$	12,5±0,50$^{\underline{c}}$	18,5±0,12$^{\underline{a}}$	15,1±2,43$^{\underline{bc}}$	17,5±2,78$^{\underline{ab}}$	20,2±2,05$^{\underline{a}}$
F/Re	5,28	6,54	6,27	5,53	8,39	7,32

Conteúdo pigmentar e proteínas solúveis totais

Foram observadas interações entre populações (CE, BA e SP) e irradiâncias (70 e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}) em relação ao conteúdo dos pigmentos ficoeritrina (FE), ficocianina (FC), clorofila *a* (CL) (FE- F= 34.6, p<0.00; FC- F= 19.2, p<0.00; CL- H= 9.8, p<0.00) e proteínas solúveis totais (F= 11.68, p<0.00). Não foi observada interação entre populações (CE, BA e SP) e irradiâncias (70 e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}) em relação ao conteúdo pigmentar aloficocianina (AFC) (F= 2.72, p>0.08).

CE-70 apresentou maior conteúdo de FC do que CE-150 (F= 28.32, p<0.00), contudo, os conteúdos de FE, AFC e CL foram semelhantes nas duas irradiâncias (FE- F= 59.03, p>0.40; AFC- F= 4.83, p>0.57; CL- F= 24.85, p>0.57). Considerando-se gametófitos da BA, observou-se que os conteúdos de ficobiliproteínas e de CL foram semelhantes nas duas irradiâncias testadas (BA- FE- F= 59.03, p>0.22; FC- F= 28.32, p>0.07; AFC- F= 4.83, p>0.92; CL- H= 24.85, p>0.43). SP-70 apresentou maiores concentrações de ficobiliproteínas e CL do que SP-150 (SP- FE- F= 59.03, p<0.00; FC- F= 28.32, p<0.00; AFC- F= 4.83, p<0.02; CL- H= 24.85, p<0.00).

Gametófitos da BA apresentaram maiores concentrações de ficobiliproteínas, quando comparados aos do CE e SP, independentemente da irradiância em que foram cultivados (FE- F= 59.03, p<0.00; FC- F= 28.32, p<0.02; AFC- F= 4.83, p<0.01). As menores concentrações de ficobiliproteínas e CL foram observadas em SP-150 (FE- F= 59.03, p<0.00; FC- F= 28.32, p<0.00; AFC- F= 4.83, p<0.04; CL- H= 24.85, p<0.00) (Figura 5).

SP-70 apresentou maior concentração de CL, quando comparado aos da BA-70 e SP-150 (CL- H= 24.85, p<0.03). O menor valor de CL foi observado para SP-150 (CL- H= 24.85, p<0.00) (Figura 5).

Não foram observadas diferenças no conteúdo de proteínas solúveis totais entre gametófitos cultivados nas diferentes irradiâncias e procedentes das diferentes populações (F= 7.24, p>0.56), com exceção dos indivíduos da BA cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, que apresentaram maiores valores quando comparados aos demais (F= 7.24, p<0.00) (Fig. 6).

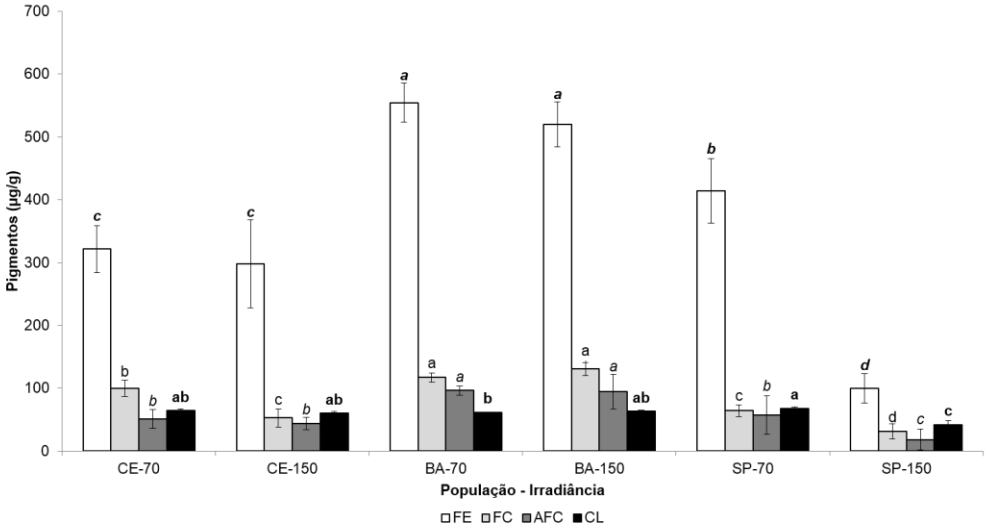

Figura. 5. Concentrações de ficoeritrina (FE), ficocianina (FC), aloficocianina (AFC) e clorofila *a* (CL) em gametófitos de *G. caudata* procedentes dos estados do Ceará (CE), Bahia (BA) e São Paulo (SP) e cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (70) e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (150) por um período de 30 dias. Dados apresentados como média e desvio padrão (n=5). Letras distintas representam diferenças significativas (p<0.05).

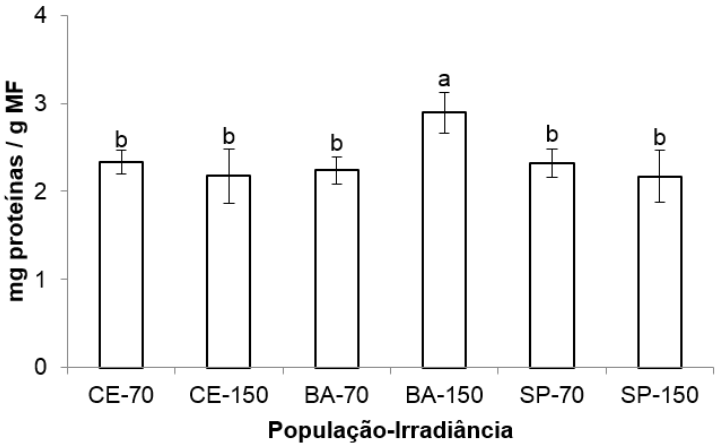

Figura 6. *Gracilaria caudata*: concentrações de proteínas solúveis totais de gametófitos dos estados do Ceará (CE), Bahia (BA) e São Paulo (SP) cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (70) e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (150) por um período de 30 dias. Dados apresentados como média e desvio padrão (n=5). Letras distintas representam diferenças significativas (p<0.05).

Discussão

Gametófitos de *Gracilaria caudata* apresentaram maiores taxas de crescimento e maior número de ramificações, quando cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, comparados aos cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}. Um ótimo desempenho em alta irradiância pode ser devido ao fato de que *G. caudata* ocorra no médio-litoral, ficando exposta a altas irradiâncias durante as marés baixas, como já sugerido para outras espécies (Beach e Smith 1996). Esses resultados estão de acordo com a maioria dos estudos realizados em espécies de *Gracilaria*, em que altas irradiâncias induziram maiores taxas de crescimento e maior número de ramificações (Yokoya et al. 1999; Skriptsova et al. 2002; Ursi 2005; Kakita et al. 2006; Faria 2010; Miranda et al. 2012; Barufi et al. 2015). Entretanto, o mesmo não é observado para outras espécies de algas vermelhas, como *Bostrychia radicans*, uma alga de manguezal considerada de "sombra", que apresentou maiores taxas de crescimento em baixas irradiâncias (Karsten et al. 1994).

Ao analisarmos as taxas de crescimento ao decorrer do tempo, foi observado que gametófitos de *G. caudata* cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, apresentaram queda no crescimento após a segunda semana de cultivo. Esses dados corroboram outros estudos em que espécies de *Gracilaria* mostram maiores valores de taxas de crescimento ao início dos cultivos, apresentando queda ao decorrer do tempo (Haglund e Pedersén 1992; Macchiavello et al. 1998; Ayres-Ostrock et al. 2014*b*).

A irradiância influenciou tanto as TCs e o número de ramificações, quanto a fotossíntese de *G. caudata*. Gametófitos apresentaram maiores valores $ETR_{máx}$ e I_k, quando cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, comparados aos de 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}. Gametófitos da BA-150 e SP-150 apresentaram maiores valores de $F_{máx}$ do que BA-70 e SP-70; porém, CE-150 e CE-70 apresentaram valores semelhantes de $F_{máx}$. A eficiência das algas em utilizar altos valores de irradiância torna-se evidente quando essas apresentam maiores valores de $F_{máx}$ e I_k (Henley 1993), como observado em *G. caudata* que apresentou valores altos de $F_{máx}$ e I_k, quando cultivada em irradiância de 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}.

Embora tenham sido observadas diferenças quanto às TCs de *G. caudata* cultivadas em 70 e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, nem sempre essas corresponderam a diferentes conteúdos pigmentares. Diferenças quanto ao conteúdo pigmentar entre gametófitos cultivados nas duas irradiâncias somente foram observadas em gametófitos SP, em que SP-70 apresentaram maiores conteúdos de FE, FC, AFC e CL do que SP-150; e entre os do CE, em que CE-70 apresentaram maior conteúdo de FC do que CE-150. As respostas observadas para gametófitos de SP corroboram estudos realizados em outras espécies de *Gracilaria*, em que indivíduos submetidos a baixas irradiâncias apresentam maiores concentrações pigmentares (Lapointe 1981; Ramus e van der Meer 1983; Carnicas et al. 1999). Esses pigmentos, por serem fontes de nitrogênio, em condições nutricionais limitadas, podem ser utilizados como recursos para o crescimento (Lapointe

1981; Talarico 1996). Essa situação pode ter ocorrido para gametófitos de São Paulo, quando cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}. O mesmo não foi observado para gametófitos do CE-150 e BA-150, que apresentaram concentrações pigmentares semelhantes, quando comparados com CE-70 e BA-70, respectivamente. Essas respostas podem indicar que gametófitos do CE e BA estejam mais adaptados para lidarem com altas irradiâncias que os de SP.

Gametófitos de *G. caudata* procedentes do CE, BA e SP apresentaram respostas distintas, quanto ao número de ramificações, TCs, parâmetros da fotossíntese e conteúdo pigmentar. Gametófitos do CE-150 apresentaram maiores valores de $ETR_{máx}$ e *Re*, e menores valores de I_k, quando comparados aos da BA-150 e SP-150. Esses dois últimos apresentaram valores semelhantes de $ETR_{máx}$ e *Re*. Esses dados corroboram estudos genéticos realizados nas três populações abordadas no presente trabalho (Ayres-Ostrock 2014). A autora, ao analisar a estrutura genética de populações de *G. caudata* da costa brasileira observou que existe uma correlação positiva entre a distância geográfica e a distancia genética entre as populações. Verificou ainda que a população da BA apresentou uma maior similaridade genética com a população de SP, quando comparada com a do CE. Entretanto, no presente estudo, foi também observado que gametófitos do CE-150 e BA-150 apresentaram valores semelhantes de I_k (técnica de fluorescência), sendo esses maiores do que os valores observados para SP-150.

Gametófitos do CE-70 e BA-70 apresentaram maiores valores de $F_{máx}$, α e *Re* do que SP-70, o que é esperado para algas procedentes de regiões mais próximas do equador, que estariam mais adaptadas a altas irradiâncias do que as que ocorrem em altas latitudes (Araújo et al. 2014; Ayres-Ostrock et al. 2014*a*).

A análise global desses dados sugere que *G. caudata* apresenta ecótipos relacionados à irradiância, e que a população da BA apresenta características intermediárias em relação às populações do Ceará e São Paulo, pois, dependendo do parâmetro analisado e da irradiância testada, seus gametófitos se assemelham aos do CE ou aos de SP.

Referências

Araújo FO, Ursi S, Plastino EM (2014) Intraespecific variation in *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): growth, pigment content, and photosynthesis. J Appl Phycol 26:849-858.

Ayres-Ostrock LM, Plastino E.M (2014*a*) Effects of short-term exposure to ultraviolet-B radiation on photosynthesis and pigment content of red (wild types), greenish-brown, and green strains of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). J Appl Phycol 26:867-879.

Ayres-Ostrock LM, Plastino EM (2014*b*) Effects of UVB radiation on growth rates, pigment contents, and ultrastructure of red (wild types), greenish-brown, and green strains of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). Eur J Phycol 49:197-212.

Ayres-Ostrock LM (2014) Estudos populacionais em *Gracilaria birdiae e G. caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): aspectos fenológicos, fisiológicos e moleculares. Tese de doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo.

Barufi JB, Figueroa FL, Plastino EM (2015) Effects of light quality on reproduction, growth, and pigment content of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). Scientia Marina 79:15-24.

Beach KS, Smith CM (1996) Ecophysiology of tropical rhodophytes. 1. Microscale acclimation in pigmentation. J Phycol 32:701–10.

Bixler HJ, Porse H (2011) A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. J Appl Phycol 23:321-335.

Câmara-Neto C (1987) Seaweed culture in Rio Grande do Norte, Brazil. Hydrobiologia 151/152:363–367.

Carnicas E, Jiménez C, Niell FX (1999) Effects of changes of irradiance on the pigment composition of *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang et Xia J. Photochem Photobiol B: Biol 50:149-158.

Costa VL, Plastino EM (2011) Color inheritance and pigment characterization of red (wild-type), greenish-brown, and green strains of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). J Appl Phycol 23:599-605.

Faria AVF (2010) Diversidade intraespecífica em *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): Efeito da temperatura e irradiância. Monografia de iniciação científica. Universidade Metodista de São Paulo.

Haglund K, Pedersén M (1992) Growth of the red alga *Gracilaria tenuistipitata* at high pH. Influence of some environmental factors and correlation to an increased carbonic-anhydrase activity. Bot mar 35:579–587.

Hayashi L, Bulboa C, Kradolfer P, Soriano G, Robledo D (2014) Cultivation of red seaweeds: a Latin American perspective. J Appl Phycol 26:719-727.

Henley WJ (1993) Measurement and interpretation of photosynthetic light- response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes. J Phycol 29:729-739.

Kakita H, Kamishima H (2006) Effects of environmental factors and metal ions on growth of the red alga *Gracilaria chorda* Holmes (Gracilariales, Rhodophyta). J Appl Phycol 18:469-474.

Karsten U, West JA, Zuccarello G, Kirst GO (1994) Physiological ecotypes in the marine alga *Bostrychia radicans* (Ceramiales, Rhodophyta) from the east coast of the U.S.A. J Phycol 30:174-182.

Lapointe BE (1981) The effects of light and nitrogen on growth, pigment content, and biochemical composition of *Gracilaria foliifera* V. Angustissima (Gigartinales, Rhodophyta). J Phycol 17:90-95.

Macchiavello J, De Paula E, Oliveira EC (1998) Growth rate responses of five commercial strains of *Gracilaria* (Rhodophyta, Gracilariales) to temperature and light. Journal of the World Aquaculture Society 29:259-266.

Marinho-Soriano E, Panucci RA, Carneiro MAA, Pereira DC (2009) Evaluation of *Gracilaria caudata* J. Agardh for bioremediation of nutrients from shrimp farming wastewater. Bioresource Technology 100:6192-6198.

Miranda GEC, Yokoya NS, Fujii MT (2012) Effects of temperature, salinity and irradiance on carposporeling development of *Hidropuntia caudata* (Gracilariales, Rhodophyta). Rev Bras Farmacogn 22:818-824.

Oliveira EC, Alveal KV (1990) The mariculture of *Gracilaria* (Rhodophyta) for the production of agar. In: Introduction to applied phycology (I. Akatsuka, ed.). Academic Publishing, The Hague, Netherlands, 553-564pp.

Oliveira EC, Miranda GEC (1998) Aspectos sociais e econômicos da explotação de algas marinhas no Brasil. (Paula, E. J.; Cordeiro-Marinho, M.; Santos, D. P.; Plastino, E. M.; Fujii, M. T. & Yokoya, N.S. eds) Anais do IV Congresso Latino-americano, II Reunião Ibero-americana, VII Reunião Brasileira de Ficologia. Caxambu, MG. Sociedade Ficológica da America Latina e Caribe & Sociedade Brasileira de Ficologia: 149-156pp.

Oliveira EC, Plastino EM (1984) The life history of some species of (Rhodophyta) from Brazil. Jap J Phycol 32:203-208.

Oliveira EC, Plastino EM (1994) Gracilariaceae. In: Biology of economic algae (I. Akatsuka, ed.). SBP Academic Publishing, The Hague, Netherlands, 185-226pp.

Plastino EM, Oliveira EC (1997) *Gracilaria caudata* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) - restoring an old name for a common western Atlantic alga. Phycologia 36:225-232.

Ramus J, van de Meer JP (1983) A physiological test of the theory of complementary chromatic adaptation. I. Color mutants of a red seaweed. J Phycol 19:86-91.

Skriptova AV, Yakovleva IM (2002) The influence of variations in irradiance upon morphology in an unattached form of *Gracilaria gracilis* (Stackhoude) Steentoft during field cultivation, South Primorye, Russia. Aquat Ecol 36:511–518.

Talarico L (1996) Phycobiliproteins and phycobilisomes in red algae: adaptive responses to light. Sci Mar 60:205–222

Ursi S (2005) Diversidade intraespecífica de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): crescimento, fotossíntese, pigmentos, polissacarídeos e genes da ficoeritrina de linhagens selvagens e variantes. Tese de Doutorado. Univ. S. Paulo. São Paulo. 121p.

Yokoya NS, Kakita H, Obika H, Kitamura T (1999) Effects of environmental factors and plant growth regulators on growth of the red alga *Gracilaria vermiculophylla* from Shikoku Island, Japan. Hydrobiologia 398/399:339-347.

Yokoya NS, Oliveira EC (1992*a*) Effects of salinity on the growth rate, morphology and water content of some Brazilian red algae of economic importance. Cienc Mar 18:49–64.

Yokoya NS, Oliveira EC (1992*b*) Temperature response of economically important red algae and their potential for mariculture in Brazilian waters. J Appl Phycol 4:339–345.

CAPÍTULO 4

Efeitos da irradiância em gametófitos e tetrasporófitos de *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta) procedentes de três populações da costa brasileira: crescimento; fotossíntese; e conteúdo pigmentar.

Resumo

Gracilaria apresenta um histórico de vida trifásico do tipo "*Polysiphonia*" em que a fase gametofítica é semelhante à tetrasporofítica. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da irradiância (70 e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}) nas taxas de crescimento (TCs), nos parâmetros da fotossíntese e no conteúdo pigmentar em tetrasporófitos e gametófitos de *G. caudata* procedentes de três localidades distintas da costa brasileira: estados do Ceará (CE), Bahia (BA) e São Paulo (SP). Nossas hipóteses foram: i) tetrasporófitos apresentam melhor desempenho somático, quando comparados a gametófitos de uma mesma população; e ii) indivíduos procedentes da região nordeste são mais adaptados a altas irradiâncias que indivíduos da região sudeste. As condições gerais de cultivo foram: 23-25ºC; 14L:10E; 70±5 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}; 32 psu; água do mar enriquecida com solução von Stosch modificada; e aeração a cada 30 minutos. Durante os experimentos, duas condições de irradiâncias foram testadas: 70 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1} (70) e 150 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1} (150). As taxas de crescimento (TCs) e os parâmetros da fotossíntese foram analisados semanalmente ao decorrer de 14 dias. O conteúdo pigmentar foi analisado ao final do experimento. Tetrasporófitos e gametófitos, cultivados em 150 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1} apresentaram maiores TCs e fotossíntese máxima ($ETR_{máx}$, $F_{máx}$), quando comparados aos cultivados em 70 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}. Comparando-se tetrasporófitos e gametófitos da mesma procedência foram observadas diferenças quanto aos parâmetros, dependendo da irradiância. Tetrasporófitos e gametófitos cultivados em 70 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1} apresentaram TCs semelhantes. Tetrasporófitos BA-150 apresentaram maiores TCs do que gametófitos BA-150; entretanto, tetrasporófitos CE-150 e SP-150 apresentaram TCs semelhantes aos gametófitos CE-150 e SP-150, respectivamente. Tetrasporófitos apresentaram maiores valores de fotossíntese máxima ($ETR_{máx}$) do que gametófitos, independentemente da procedência ou irradiância. Tetrasporófitos cultivados em 70 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1} apresentaram maiores valores de saturação luminosa (I_k) do que gametófitos nessa mesma irradiância, independentemente da procedência. Tetrasporófitos BA-150 e SP-150 apresentaram maiores αETR do que gametófitos BA-150 e SP-150, porém, tetrasporófitos e gametófitos CE-150 apresentaram valores semelhantes de αETR. Tetrasporófitos CE-150 e SP-150 apresentaram maiores fotossíntese máxima ($F_{máx}$) e ponto de compensação (*Ic*) do que gametófitos CE-150 e SP-150; tetrasporófitos e gametófitos BA-150 apresentaram valores semelhantes de $F_{máx}$ e *Ic*. Gametófitos de SP apresentaram maiores conteúdos de FE e FC do que tetrasporófitos, independentemente da irradiância. Os

dados obtidos neste trabalho corroboram a hipótese de que tetrasporófitos apresentam um desempenho fisiológico melhor do que gametófitos por serem organismos diploides (2n), proporcionando maiores TCs, $ETR_{máx}$, $F_{máx}$, I_k, αETR e I_c e conteúdos de FE e FC. A análise global desses dados corrobora a hipótese de que indivíduos da região nordeste são mais adaptados a maiores irradiâncias que indivíduos da região sudeste e sugere que a espécie apresenta ecótipos relacionados à irradiância.

Abstract

Gracilaria has a "*Polysiphonia*" type life history with isomorphic gametophytic and tetrasporophytic generations. This study aimed to evaluate the effects of irradiance (70 e 150 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}) on number of branches, growth rates, photosynthesis parameters and pigment content of gametophytes and tetrasporophytes of *G. caudata* from three distinct geographical areas of Brazilian coast: Ceará State (CE), Bahia State (BA) and São Paulo State (SP). Our hypotheses were: i) tetrasporophytes have better somatic performance when compared to gametophytes from the same population; and ii) individuals from the northeast are more adapted to high irradiance that individuals from the southeast. The general conditions of cultivation were: 23-25ºC; 14L: 10D; 70±5 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}; 32 ups; seawater enriched with von Stosch modified solution; and aeration every 30 minutes. Gametophytes and tetrasporophytes were cultivated in two different conditions along experiment: 70 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} (70) and 150 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} (150). Growth rates (TCs) and photosynthetic parameters were assessed weekly for 14 days. The pigment content and the number of branches were analyzed at the end of 14 days. Tetrasporophytes and gametophytes cultivated in 150 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} had higher TCs and maximum photosynthesis (ETRmax, Fmax) when compared to cultivated at 70 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}. Comparing gametophytes and tetrasporophytes from the same origins differences were observed for the parameters depending on the irradiance. Tetrasporophytes and gametophytes cultivated in 70 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} showed similar TCs. Tetrasporophytes BA-150 showed higher TCs than gametophytes BA-150; however, tetrasporophytes CE-150 and SP-150 showed TCs similar to gametophytes CE-150 and SP-150, respectively. Tetrasporophytes had higher maximum photosynthetic rates ($ETR_{máx}$) than gametophytes, regardless of origin or irradiance. Tetrasporophytes cultivated at 70 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} had higher light saturation values (*Ik*) than gametophytes in the same irradiance, regardless of origin. Tetrasporophytes BA-150 and SP-150 had higher αETR than gametophytes BA-150 and SP-150, however, tetrasporophytes and gametophytes CE-150 showed similar values αETR. Tetrasporophytes CE-150 and SP-150 showed higher maximum photosynthesis ($F_{máx}$) and compensation point (*Ic*) than gametophytes CE-150 and SP-150; tetrasporophytes and gametophytes BA-150 showed similar values of $F_{máx}$ and *Ic*. Gametophytes SP had higher FE content and FC than tetrasporophytes, regardless of irradiance. The data obtained in this study

corroborate the hypothesis that tetrasporophytes have a better physiological performance than gametophytes for being diploid organisms (2n), providing higher TCs, $ETR_{máx}$, $F_{máx}$, *Ik*, αETR and *Ic* and FE and FC content. A global analysis of these data supports the hypothesis that individuals in the northeast are more adapted to higher light intensities that individuals from the southeast and suggests that the specie has ecotypes related to irradiance.

Introdução

Gracilaria Greville representa um dos grandes gêneros de macroalgas com mais de 230 espécies distribuídas no mundo todo (Guiry e Guiry 2014). Na costa brasileira, são referidas 17 espécies (Lyra et al. 2015), sendo uma delas *G. caudata* J. Agardh, que ocorre desde o Caribe até o litoral sul do Brasil (Plastino e Oliveira, 1997).

A luz é considerada um dos fatores abióticos mais importantes que influência na distribuição, crescimento e fotossíntese das macroalgas (Lüning 1990; Lobban e Harrison 1994). Quando as algas são submetidas a um excesso de energia solar, pode ocorrer oxidação em seus aparatos fotossintetizantes, fazendo com que apresentem fotoinibição (Falkowski e Raven 1997). Para que continuem apresentando ótima eficiência fotossintetizante, as algas precisam ter mecanismos para dissipar a energia proveniente da excitação e lidar com as possíveis situações de estresses que ocorrem ao longo do dia, otimizando a eficiência fotossintetizante e as atividades metabólicas (Henley e Ramus 1989; Gantt 1990). Os efeitos da luz têm sido observados para várias espécies de *Gracilaria*, como: *G. arcuata, G. incurvata, G. textorii, G. lichenoides, G. foliifera* e *G. corticata* (Raikar et al. 2001); *G. domingensis* (Ramlov et al. 2012); *G. tenuistipitata* e *G. edulis* (Yu et al. 2013); *G. vermiculophylla* (Yokoya et al. 1999; Nejrup et al. 2013); e *G. chilensis* (Guillemin et al. 2013).

O gênero *Gracilaria* apresenta um histórico de vida trifásico do tipo "*Polysiphonia*" (Kain e Destombe, 1995). Foram reportados estudos demonstrando que as duas fases isomórficas, tetrasporofítica (2n) e gametofítica (n), apresentam desempenho fisiológico distinto quando comparadas e submetidas às mesmas condições experimentais, como em *G. vermiculophylla* (Yokoya et al. 1999), *G. chilensis* (Guillemin et al. 2013), *G. caudata* (Araújo et al. 2014) e *G. birdiae* (Barufi et al. 2015).

A fertilidade afeta diretamente o desempenho fisiológico das algas. Em *G. chilensis*, plantas cistocárpicas e tetrasporofíticas apresentam uma redução nas taxas de crescimento, quando se tornam férteis, pois necessitam compartilhar parte da sua energia para produzir estruturas reprodutivas e seus derivados, carpósporos, tetrasporângios, espermatângios ou carpogônios (Santelices e Varela 1995). Como consequência da fertilidade, além de queda nas taxas de crescimento (Guimarães et al. 1999), foi observada

também queda no desempenho fotossintetizante ou conteúdo pigmentar de *G. chilensis* (Santelices e Varela 1995; Guillemin et al. 2013; Guillemin et al. 2014). Portanto, quando se pretende analisar efetivamente o desempenho fisiológico de gametófitos e tetrasporófitos, é importante que esses estádios não estejam férteis.

A diversidade intraespecífica é notada por meio da plasticidade fenotípica, que pode resultar de dois processos: aclimatação e adaptação (Gantt 1990). Quando uma espécie apresenta ampla distribuição geográfica e suas populações demonstram respostas distintas, quando submetidas às mesmas variáveis ambientais, pode-se interpretá-las como ecótipos (Innes 1984). Ecótipos já foram sugeridos para duas espécies do gênero *Gracilaria* que ocorrem na costa brasileira: *G. birdiae* (Ursi et al. 2003) e *G. caudata* (Araújo et al. 2014).

Como resultado da plasticidade fenotípica promovida por processos de adaptação, espera-se que gametófitos e tetrasporófitos de *G. caudata* procedentes de diferentes locais da costa brasileira apresentem variações fisiológicas sob condições controladas de laboratório quando submetidos a irradiâncias distintas, caracterizando-se como ecótipos. Espera-se também que tetrasporófitos apresentem um desempenho superior que gametófitos. Visando testar essa hipótese, pretende-se analisar os seguintes aspectos: taxas de crescimento, atividade fotossintetizante e conteúdo pigmentar de tetrasporófitos e gametófitos de *G. caudata* derivados de plantas de três populações distribuídas ao longo da costa brasileira.

Material e Métodos

Material biológico

Foram utilizados ápices de indivíduos gametofíticos femininos não fertilizados e tetrasporofíticos inférteis de *Gracilaria caudata* procedentes dos estados do Ceará, Bahia e São Paulo. (Capítulo 1, item 3.1).

Desenho experimental

Após a fase de pré-tratamento (duas semanas, nas condições gerais de cultivo e em irradiâncias de 70 e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}), cinco repetições simultâneas (cinco indivíduos) foram testadas para cada fase reprodutiva, procedência dos indivíduos e irradiância: i, estado do Ceará - tetrasporófito, 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (TCE-70); gametófito feminino, 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (GCE-70); tetrasporófito, 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (TCE-150); e gametófito feminino, 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (GCE-150); ii, estado da Bahia: tetrasporófito, 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (TBA-70); gametófito feminino, 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (GBA-70); tetrasporófito, 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (TBA-150); gametófito feminino, 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (GBA-150); e iii, estado de São Paulo: tetrasporófito, 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (TSP-70);

gametófito feminino, 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (GSP-70); tetrasporófito, 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (TSP-150); gametófito feminino, 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (GSP-150). Cada repetição constou de quatro ápices de um mesmo indivíduo (15 mg), sendo que cada um apresentava aproximadamente 1,5 cm de comprimento. Esses ápices foram cultivados em Erlenmayer de 500ml, utilizando-se 400ml de água do mar enriquecida. As demais condições de cultivo constam no capítulo 1, item 3.2.

O período experimental foi de duas semanas, com mensurações de massa fresca e substituição do meio de cultura realizadas semanalmente. No início e final do experimento, as algas foram fotografadas para análise morfológica quanto ao número de ramos diferenciados. As quantificações de ramos diferenciados foram realizadas somando-se todos os ápices de primeira e segunda ordens ao longo do talo. O potencial fotossintetizante foi avaliado em duas ocasiões: 1º e 14º dias, por meio da avaliação da fluorescência *in vivo* da clorofila *a*. No 14º dia, avaliou-se a produtividade efetiva da fotossíntese por meio da demanda biológica de oxigênio. No final do experimento, esses ramos foram cultivados por mais dois dias, após a reposição do meio de cultura. Em seguida, foram congelados em nitrogênio líquido. Posteriormente, esse material foi utilizado em análises do conteúdo de ficobiliproteínas e clorofila *a*.

Avaliação do crescimento e do número de ápices diferenciados

Foi empregada a metodologia apresentada no capítulo 1, item 3.3. Os valores obtidos para as taxas de crescimento (TCs) foram submetidos à análise de variância multifatorial (MANOVA). O número de ápices diferenciados em tetrasporófitos e gametófitos das diferentes populações foram estatisticamente comparados por análise de medidas repetidas (ANOVA). Ambas análises levaram em conta as seguintes variáveis independentes: fase reprodutiva, procedência dos indivíduos e irradiância.

Fotossíntese: fluorescência *in vivo* da clorofila *a* e demanda biológica de oxigênio (DBO)

Foram empregadas as metodologias apresentadas no Capítulo 1, item 3.4. Os valores obtidos a partir da fluorescência *in vivo* da clorofila *a* foram submetidos à análise de variância multifatorial (MANOVA) e medidas repetidas (ANOVA), enquanto que para os valores obtidos a partir do DBO, foi utilizada a análise de variância multifatorial (MANOVA). Ambas análises levaram em conta as seguintes variáveis independentes: fase reprodutiva, procedência dos indivíduos e irradiância.

Composição pigmentar

Foram empregadas as metodologias apresentadas no Capítulo 1, item 3.5. As concentrações pigmentares foram estatisticamente comparadas por análise de variância multifatorial (MANOVA) de três fatores, levando-se em conta as seguintes variáveis independentes: fase reprodutiva, procedência dos indivíduos e irradiâncias.

Resultados

Morfologia

A coloração dos gametófitos e tetrasporófitos de *Gracilaria caudata* ao longo do experimento variou de acordo com a procedência e independentemente da irradiância testada; somente gametófitos e tetrasporófitos de SP apresentaram variação na coloração nas duas irradiâncias. Após 14 dias de cultivo, independentemente da irradiância, gametófitos do CE e BA apresentaram coloração vermelho-escuro, quando comparados aos tetrasporófitos do CE e BA, que apresentaram coloração rosada. Gametófitos e tetrasporófitos cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} apresentaram coloração amarronzada, enquanto que os cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} apresentaram-se pardacentas.

Na análise quanto ao número de ramos diferenciados foi observada interação entre tetrasporófitos e gametófitos procedentes de diferentes populações (CE, BA e SP) e irradiâncias (70 e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}) (F=122.98, p<0.00).

Tetrasporófitos e gametófitos procedentes do mesmo local, cultivados em 150 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}, apresentaram um maior número de ramificações, quando comparados aos cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (F=121.37, p<0.00) (Tabela 1; Figura 1). Somente TBA-70 e TBA-150 apresentaram número similar de ramificações (F=121.37, p>0.98).

Gametófitos da BA e SP cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} apresentaram um maior número de ramificações, quando comparados a tetrasporófitos (BA- F=121.37, p<0.00; SP- F=121.37, p<0.00) e somente para a população do CE, tetrasporófitos ramificaram mais que gametófitos (F=121.37, p<0.00) (Tabela 1; Figura 1). Em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, independentemente da irradiância testada, gametófitos do CE, BA e SP apresentaram um maior número de ramificações, quando comparados a tetrasporófitos (CE- F=121.37, p<0.00; BA- F=121.37, p<0.00; SP- F=121.37, p<0.00).

GCE-150 apresentaram maior número de ramificações, quando comparados aos demais gametófitos e tetrasporófitos (F=121.37, p<0.00), enquanto que TBA-70 apresentaram o menor número de ramificações (F=121.37, p<0.00) (Tabela 1; Figura 1).

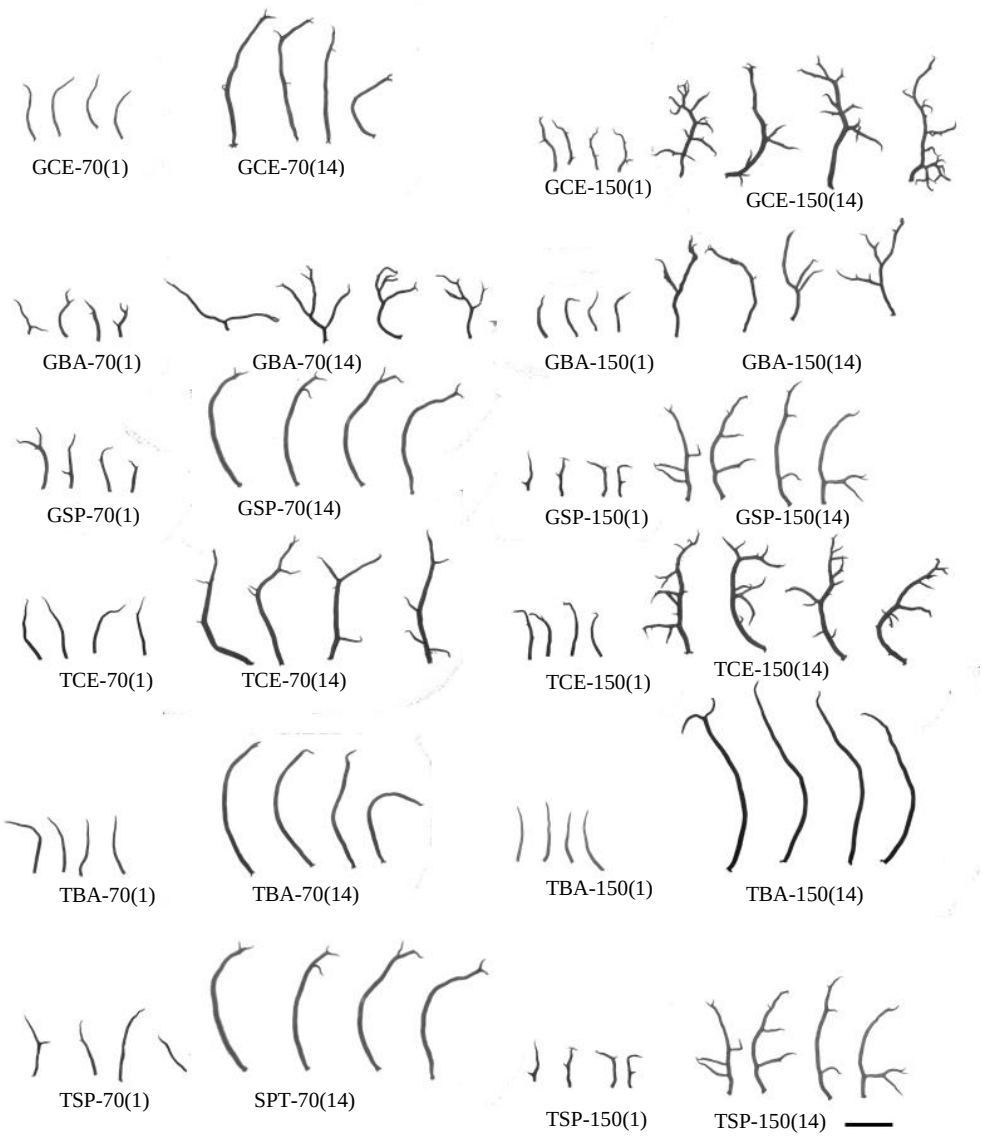

Figura 1. Ápices de gametófitos femininos (G) e tetrasporófitos (T) de *Gracilaria caudata* originados a partir de algas procedentes do estado do Ceará (CE), Bahia (BA) e São Paulo (SP) cultivados em 70 (70) e 150 µmol de fótons $m^{-2}.s^{-1}$ (150) no 1º (1) e 14º dias (14) de cultivo. É apresentada uma repetição (com quatro ápices) por procedência e irradiância. Escala, 1cm.

Tabela 1. Número total e média de ápices diferenciados em tetrasporófitos e gametófitos femininos de *G. caudata*, procedentes do estado do Ceará, Bahia e São Paulo, cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (70) e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (150). O número total foi calculado partir da soma de ápices presentes em todos os frascos de uma mesma condição no 1º (T_1) e 14º dias (T_{14}). A média e desvio padrão foram calculados a partir das cinco repetições por condição. Letras distintas representam diferenças significativas dentre as procedências e irradiâncias ($p<0.05$).

Fase-Procedência-Irradiância	T_1 (total)	T_{14} (total)	T_1 (média)	T_{14} (média)
Gametófito-Ceará-70	22	67	4,4±0,5^{i}	13,4±1,1^{fg}
Gametófito-Ceará-150	46	286	9,2±5,0^{ghi}	57,2±4,1^{a}
Gametófito-Bahia-70	27	78	5,4±2,0^{hi}	15,6±4,1^{f}
Gametófito-Bahia-150	26	112	5,2±0,8^{hi}	22,4±2,3^{d}
Gametófito-São Paulo-70	46	121	9,2±1,6^{hi}	24,2±3,3^{d}
Gametófito-São Paulo-150	34	151	6,8±1,3^{hi}	30,2±2,3^{c}
Tetrasporófito-Ceará-70	25	96	5,0±0,7^{i}	19,2±1,9^{e}
Tetrasporófito-Ceará-150	41	263	8,2±0,8^{hi}	52,6±5,5^{b}
Tetrasporófito-Bahia-70	21	24	4,2±0,4^{i}	4,8±0,8^{i}
Tetrasporófito-Bahia-150	25	29	5,0±1,2^{hi}	5,8±0,8^{hi}
Tetrasporófito-São Paulo-70	22	50	4,4±0,5^{i}	10,0±1,5^{h}
Tetrasporófito-São Paulo-150	46	120	9,2±1,3^{hi}	24,0±1,5^{d}

Taxas de crescimento

Não foi observada interação entre as populações (CE, BA e SP), fases (tetrasporofíticas e gametofíticas femininas) e irradiâncias (70 e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}) para os indivíduos de *G. caudata* (F=1.22, p>0.30).

Gametófitos e tetrasporófitos cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, independentemente da procedência, apresentaram maiores TCs, quando comparados aos gametófitos e tetrasporófitos cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (F=476.87, p<0.00). Em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, gametófitos e tetrasporófitos do CE apresentaram maiores TCs, quando comparados aos da BA, e aos GSP-150 (F=24.80, p<0.00); entretanto, esses valores foram semelhantes aos observados em TSP-150 (F=24.80, p>0.06). GBA-150 apresentaram as menores TCs, quando comparados aos demais cultivados nessa mesma irradiância (F=24.80, p<0.00). TBA-150 apresentaram TCs semelhantes aos TSP-150 e GSP-150 (F=24.80, p>0.06).

Não foi observada diferença significativa, quanto as TCs entre gametófitos e tetrasporófitos cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (F=24.80, p>0.26). Comparando-se tetrasporófitos e gametófitos de uma mesma população, verificou-se que apenas TBA-150 apresentaram maiores TCs que GBA-150 (F=0.09, p<0.00). Nas demais condições, tetrasporófitos e gametófitos tiveram TCs semelhantes (F=0.09, p>0.12). (Figura 2).

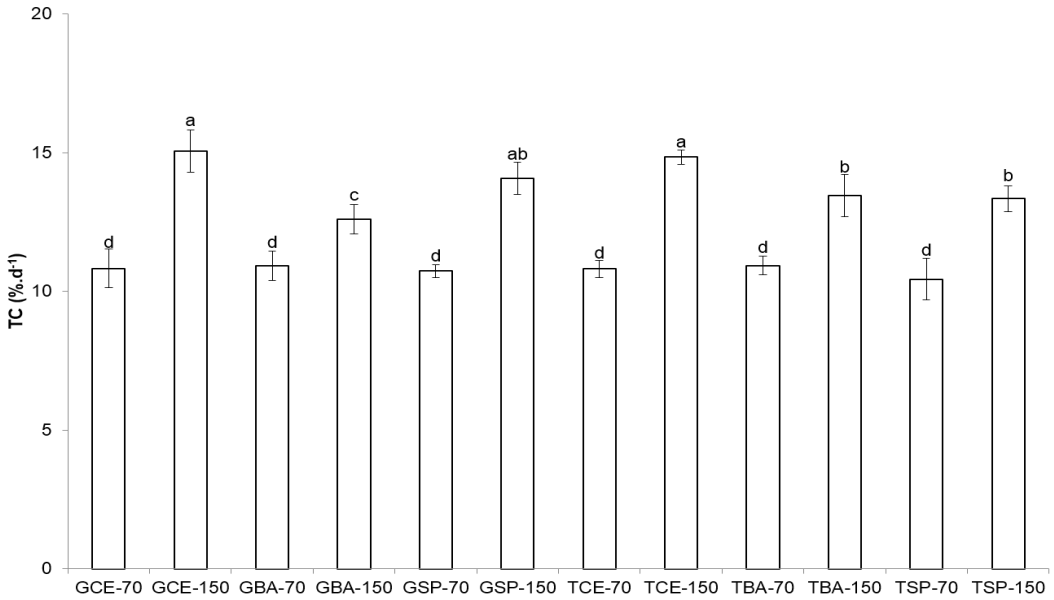

Figura 2. *Gracilaria caudata*: taxas de crescimento de tetrasporófitos (T) e gametófitos (G) derivados de plantas procedentes dos estados do Ceará (CE), Bahia (BA) e São Paulo (SP) cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (70) e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (150) por um período de 14 dias. Dados apresentados como média e desvio padrão (n=5). Letras distintas representam diferenças significativas dentre as populações e irradiâncias (p<0.05).

Fotossíntese: fluorescência *in vivo* da clorofila *a*

Analisando-se separadamente tetrasporófitos e gametófitos das diferentes procedências, independentemente das irradiâncias, no 1º dia amostral, observou-se que os valores de fotossíntese máxima (ETR_{max}) e saturação luminosa (I_k) foram maiores em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, quando comparados aos de 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (ETR_{max}- H=74.23, p<0.00; I_k- F=635.82, p<0.01). Os valores de eficiência fotossintetizante (αETR), foram maiores em GCE-150, TBA-150, GBA-150 e GSP-150, quando comparados aos de GCE-70, TBA-70, GBA-70 e GSP-70 (F=80.24, p<0.03); TCE-150 e TSP-150 respectivamente apresentaram valores de αETR semelhantes aos de TCE-70 e TSP-70 (CE- F=80.24, p>0.14; SP- F=80.24, p>0.22). Observou-se poucas diferenças para valores de rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F$m′): TBA-150>TBA-70; e GSP-150>GSP-70 (H=28.38, p<0.04) (Tabela 2).

Tabela 2. *Gracilaria caudata*: parâmetros das curvas de FxI de tetrasporófitos (T) e gametófitos (G) procedentes dos estados do Ceará (CE), Bahia (BA) e São Paulo (SP) cultivados em 70 (70) µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} e 150 (150) µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} durante 14 dias. Medidas realizadas em duas ocasiões: 1º dia (1) e 14º dia (14). Dados apresentados como médias e desvio padrão (n=5). I_k- saturação luminosa; αETR- eficiência fotossintetizante; ETR_{max}- fotossíntese máxima; ΔF/Fm′- rendimento quântico efetivo.

		Irradiância – Tempo (dias)			
Fase-Procedência	Parâmetros	70-1	70-14	150-1	150-14
GCE	I_k	44,96±8,78	36,86±6,51	69,90±11,88	76,74±8,98
	αETR	0,03±0,00	0,03±0,00	0,04±0,00	0,03±0,00
	$ETR_{máx}$	1,43±0,19	1,30±0,14	2,86±0,27	2,95±0,46
	ΔF/Fm′	0,56±0,00	0,52±0,02	0,57±0,03	0,57±0,01
GBA	I_k	56,43±13,44	69,28±15,49	74,63±6,79	73,84±5,10
	αETR	0,02±0,00	0,02±0,00	0,04±0,00	0,03±0,00
	$ETR_{máx}$	1,60±0,25	1,80±0,22	3,15±0,24	2,38±0,39
	ΔF/Fm′	0,52±0,02	0,52±0,01	0,54±0,01	0,51±0,03
GSP	I_k	41,35±5,78	51,03±7,51	58,91±9,32	58,56±11,43
	αETR	0,03±0,00	0,02±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00
	$ETR_{máx}$	1,30±0,13	1,49±0,21	2,66±0,58	2,29±0,37
	ΔF/Fm′	0,50±0,05	0,55±0,01	0,57±0,02	0,54±0,04
TCE	I_k	30,06±13,26	55,93±9,31	63,26±10,28	79,57±6,46
	αETR	0,04±0,00	0,03±0,00	0,05±0,00	0,04±0,00
	$ETR_{máx}$	1,60±0,23	2,08±0,18	3,28±0,36	3,43±0,27
	ΔF/Fm′	0,56±0,01	0,56±0,01	0,58±0,01	0,57±0,01
TBA	I_k	43,25±10,87	44,24±10,96	80,84±8,72	65,38±9,68
	αETR	0,04±0,00	0,04±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00
	$ETR_{máx}$	1,83±0,19	1,79±0,23	4,53±0,67	3,27±0,33
	ΔF/Fm′	0,56±0,06	0,57±0,01	0,61±0,01	0,60±0,00
TSP	I_k	40,32±8,30	50,17±11,89	72,03±12,06	67,43±7,89
	αETR	0,03±0,00	0,03±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00
	$ETR_{máx}$	1,52±0,19	1,90±0,22	3,21±0,41	3,18±0,47
	ΔF/Fm′	0,52±0,04	0,54±0,02	0,52±0,03	0,51±0,03

Analisando-se separadamente tetrasporófitos e gametófitos das diferentes procedências, independentemente das irradiâncias, no 14º dia amostral, observou-se que os valores de ETR_{max}, foram maiores em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, quando comparados aos de 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (F=460.80, p<0.00). Para os demais parâmetros, observou-se poucas diferenças: I_k (TCE-70<TCE-150; GCE-70<GCE-150) (F=460.80, p<0.00); αETR (TSP-70<TSP-150; GSP-70<GSP-150) (F=460.80, p<0.01); e ΔF/Fm′ (GCE-70<GCE-150) (F=74.23, p<0.04) (Tabela 2).

Comparando-se tetrasporófito ou gametófito, das diferentes procedências, cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, no 14º dia amostral, nota-se que os valores de ETR_{max} foram maiores em TCE-70 do que em TBA-70 (F=1.56, p<0.01); contudo, GBA-70 apresentaram maiores valores de ETR_{max} que GCE-70 e GSP-70 (F=16.46, p<0.00). Os valores de I_k foram maiores em TCE-70 do que em TBA-70 (F=0.08, p<0.03); contudo, GBA-70 apresentaram maiores valores de I_k do que GSP-70, e esses valores foram maiores que os observados em GCE-70 (F=20.49, p<0.00). Os valores de αETR foram semelhantes para os tetrasporófitos, independentemente da procedência (F=2.25, p>0.55), entretanto, GCE-70 apresentaram maiores valores de αETR do que GBA-70 e GSP-70 (F=6.70, p<0.01). Os valores de $\Delta F/F$m′ foram semelhantes, independentemente da fase e da procedência (tetrasporófito- F=5.32, p>0.46; gametófito- F=2.77, p>0.06).

Comparando-se tetrasporófito ou gametófito das diferentes procedências, cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, no 14º dia amostral, nota-se que os valores de ETR_{max} foram maiores em GCE-150 do que em GBA-150 e GSP-150 (F=5.41, p<0.01), contudo, esses valores foram semelhantes para tetrasporófitos independentemente da procedência (F=13.90, p>0.70). Os valores de I_k, foram maiores em TCE-150 do que em TBA-150 e TSP-150 (F=0.78, p<0.01), contudo, GCE-150 e GBA-150 apresentaram maiores do que GSP-150 (F=16.81, p<0.00). Os valores de αETR foram maiores para GCE-150 e GBA-150 do que em GSP-150 (F=5.00, p<0.02), entretanto, TBA-150 apresentaram maiores valores do que TCE-150 (F=5.68, p<0.04). Os valores de $\Delta F/F$m′ foram maiores em TCE-150 do que em TBA-150 (F=65.23, p<0.03), entretanto, GBA-150 apresentaram maiores valores do que GCE-150, e esses foram maiores que em GSP-150 (F=14.24, p<0.00).

Comparando-se tetrasporófitos e gametófitos das diferentes procedências, cultivados em 70 ou 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, no 14º dia amostral, observou-se que os valores de ETR_{max} foram maiores para tetrasporófitos, quando comparados aos gametófitos, independentemente da procedência ou irradiância (F=107.80, p<0.02). Somente TBA-70 e GBA-70 apresentaram valores semelhantes de ETR_{max} (F=107.80, p>0.90). Os valores de I_k foram maiores para tetrasporófitos, quando comparados aos gametófitos cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (F=0.11, p<0.00), entretanto, tetrasporófitos e gametófitos apresentaram valores semelhantes, quando cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, independentemente da procedência (F=0.11, p>0.10). Os valores de αETR foram maiores para TBA-70, TBA-150, TSP-70 e TSP-150, quando comparados respectivamente aos GBA-70, GBA-150, GSP-70 e GSP-150 (F=77.88, p<0.00), entretanto, TCE-70 e GCE-70, bem como TCE-150 e GCE-150 apresentaram valores semelhantes (F=77.88, p>0.33). Os valores de $\Delta F/F$m′ apresentaram poucas diferenças: TBA-70>GBA-70 (F=27.65, p<0.00); e TBA-150>GBA-150 (F=27.65, p<0.00).

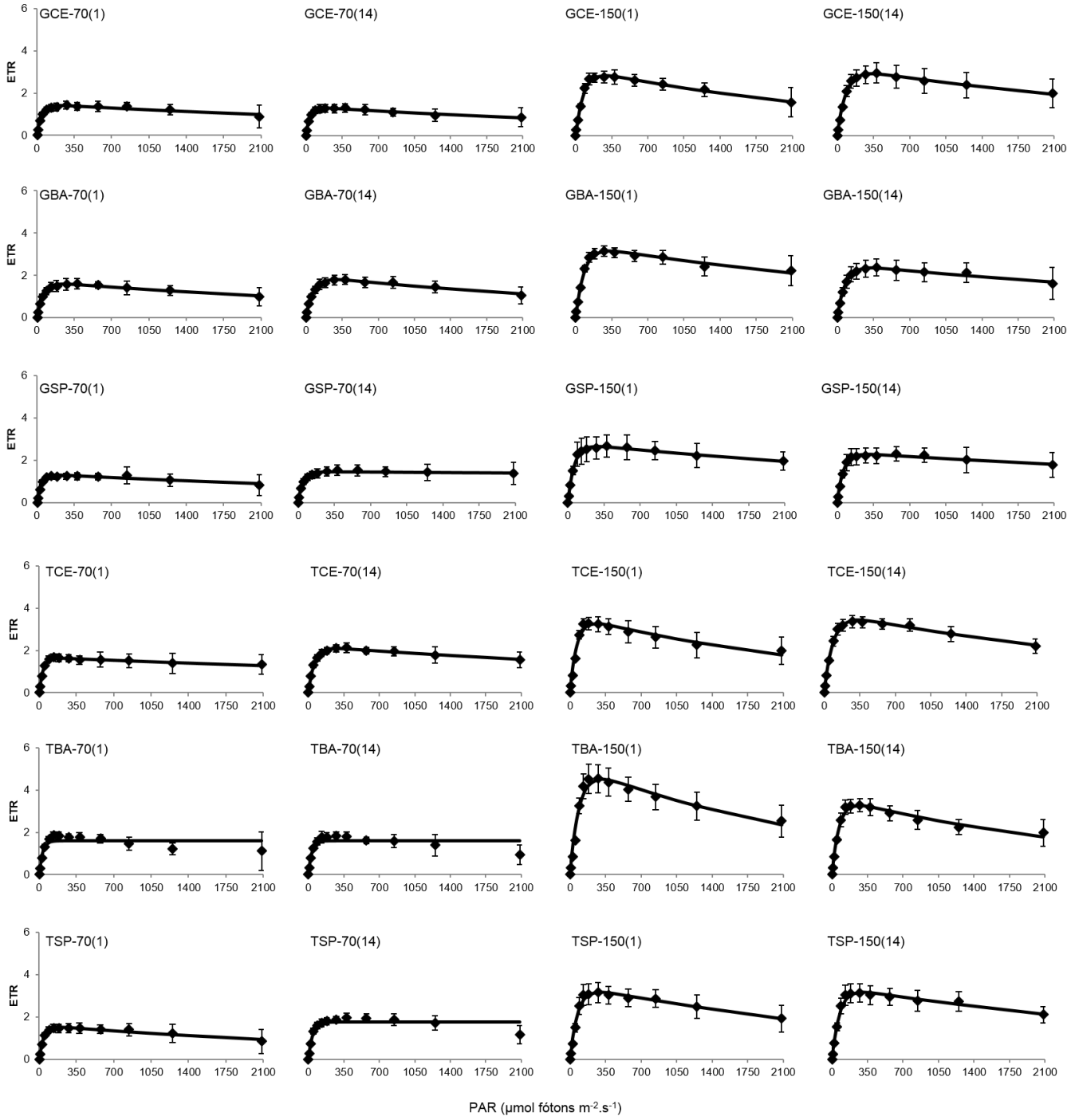

Figura 3. *Gracilaria caudata*: curva de Fotossíntese-Irradiância obtidas pelo método da fluorescência *in vivo* da clorofila *a* de gametófitos femininos (G) e tetrasporófitos (T) procedentes dos estados do Ceará (CE), Bahia (BA) e São Paulo (SP) cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (70) e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (150) durante 28 dias. Curvas realizadas em duas ocasiões: 1º dia (1) e 14º dias (14). Dados apresentados como médias e desvio padrão (*n*=5).

Fotossíntese: demanda biológica de oxigênio (DBO)

Os valores de fotossíntese máxima ($F_{máx}$), quando analisados separadamente tetrasporófitos e gametófitos de cada uma das localidades, foram maiores em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, do que em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (F=186.99, p<0.03) (Tabela 3; Figura 4). Os valores de eficiência fotossintetizante (α) foram maiores em TCE-70 e TSP-70, do que em TCE-150 e TSP-150 (F=27.79, p<0.00). Os valores de saturação luminosa (I_k) foram maiores em TCE-150, TBA-150, TSP-150 e GCE-150 do que em TCE-70, TBA-70, TSP-70 e GCE-70 (F=110.39, p<0.01). Os valores de irradiância de compensação (I_c) foram maiores em TCE-150 e TSP150 do que em TCE-70 e TSP70 (F=1.44, p<0.01), entretanto, GCE70 apresentaram maior I_c do que GCE-150 (F=1.44, p<0.00). Os valores de respiração (*Re*) foram maiores em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} do que em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (H=136.50, p<0.00). Somente TCE-150 e GSP-150 apresentaram valores semelhantes de *Re*, quando respectivamente comparados aos TCE-70 e GSP-70 (F=186.99, p>0.99) (Tabela 3).

Numa análise comparativa entre as fases tetrasporofítica e gametofítica, considerando-se indivíduos procedentes da mesma população, cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, foram observados poucas diferenças: $F_{máx}$ (TCE-70>GCE-70) (F=40.14, p<0.00); α (TSP-70>GSP-70) (F=0.03, p<0.00); e *Re* (TCE-70<GCE-70; TSP-70>GSP-70) (H=0.00, p<0.00). Entretanto, para tetrasporófitos e gametófitos cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, foi observado que esses valores apresentaram maior variação: $F_{máx}$ (TCE-150>GCE-150; TSP-150>GSP-150) (F=40.14, p<0.00); α (TSP-150<GSP-150) (F=0.03, p<0.00); e *Re* (TCE-150>GCE-150; TSP-150<GSP-150) (H=0.00, p<0.00); e I_k (TCE-150<GCE-150; TSP-150>GSP-150) (F=15.76, p<0.01); e I_c (TCE-150>GCE-150; TSP-150>GSP-150) (F=4.22, p<0.00). Somente TBA-150 e GBA-150 apresentaram valores similares de $F_{máx}$, α, *Re*, I_k e I_c ($F_{máx}$- F=40.14, p>0.40; α- F=0.03, p>0.51; *Re*- H=0.00, p>1.00; I_k- F=15.76, p>0.26; e I_c- F=4.22, p>0.58). TCE-150 e GCE-150 apresentaram também valores similares de α (F=0.03, p>0.14) (Tabela 3; Figura 4).

Analisando-se separadamente as fases das diferentes procedências cultivadas nas distintas irradiâncias, foi observado que TSP-70 apresentam maiores valores de *Re*, quando comparados aos TCE-70 e TBA-70 (H=13.42, p<0.00); não houve variação nos demais parâmetros. Dentre os gametófitos, observou-se que GCE-70 apresentaram maiores valores de *Re*, quando comparados aos GBA-70 e GSP-70 (H=13.42, p<0.00).

TCE-150 apresentam maiores valores de $F_{máx}$ e *Re*, quando comparados aos TBA-150 e TSP-150 ($F_{máx}$- F=14.95, p<0.00; *Re*- H=13.42, p<0.00); TCE-150 e TBA-150 apresentam maiores valores de α, quando comparados a TSP-150 (F=10.17, p<0.03); contudo, TSP-150 apresentam maiores valores de I_k e I_c, quando comparados a TCE-150 e TBA-150 (I_k- F=3.83, p<0.00; I_c- F=8.13, p<0.00). GCE-150 e GBA-

150 apresentam maiores valores de $F_{máx}$, quando comparados aos GSP-150 (F=14.95, p<0.02); entretanto, GSP-150 apresentam maiores valores de *Re*, quando comparados a GCE-150 e GBA-150 (H=13.42, p<0.00). GBA-150 apresentam maiores valores de I_k, quando comparados aos GSP-150 (F=3.83, p<0.00), e GCE-150 apresentam valores similares aos GBA-150 e GSP-150 de I_c (F=3.83, p>0.07).

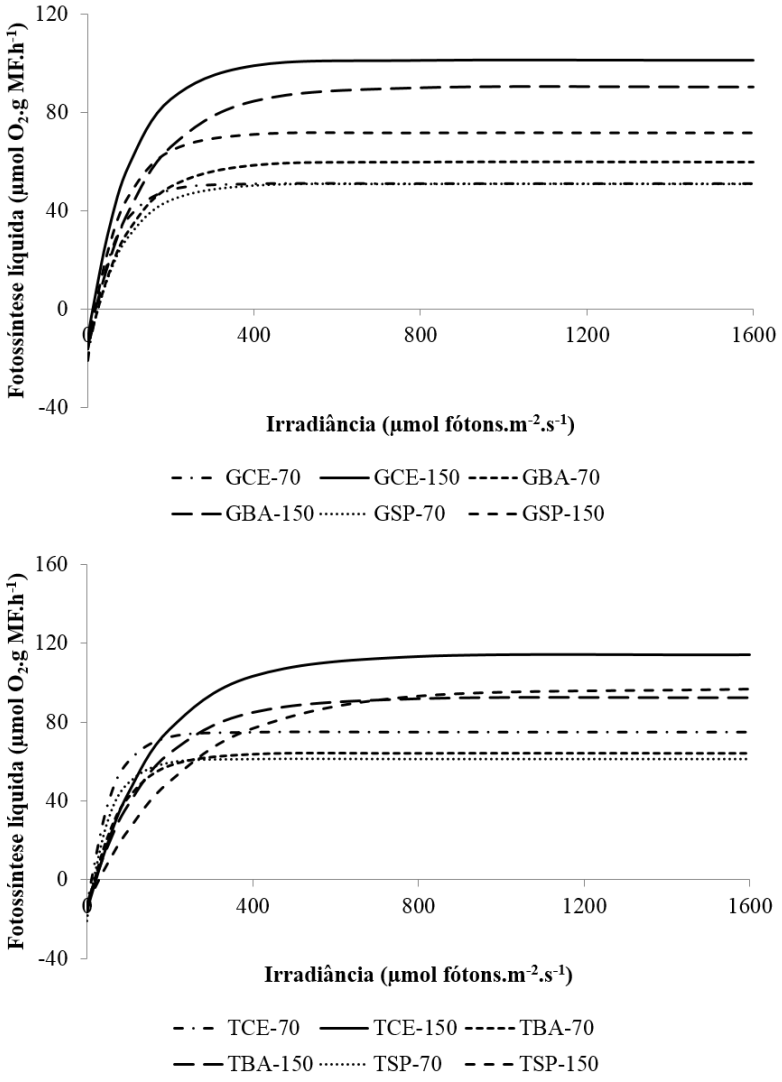

Figura 4. *Gracilaria caudata*: curvas de Fotossíntese x Irradiância calculadas a partir do modelo de hipérbole retangular (Henley, 1993; Equação 3) a partir das taxas de fotossíntese líquida obtidas para tetrasporófitos (T) e gametófitos (G) dos estados do Ceará (CE), Bahia (BA) e São Paulo (SP) cultivados em irradiâncias de 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (70) e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (150) durante 14 dias.

Tabela 3. *Gracilaria caudata*: parâmetros das curvas Fotossíntese x Irradiância calculados a partir das taxas de fotossíntese líquida de tetrasporófitos e gametófitos femininos dos estados do Ceará (CE), Bahia (BA) e São Paulo (SP) cultivados em irradiâncias de 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (70) e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (150) durante 14 dias. Dados apresentados como médias e desvio padrão (n=5). I_k, saturação luminosa; I_c, irradiância de compensação; e α, eficiência fotossintetizante; e $F_{máx}$, fotossíntese máxima; e *Re*, respiração no escuro; e F/Re, razão de $F_{máx}/Re$; e R, coeficiente de ajuste mais adequando. Diferenças significativas entre as diferentes procedências e irradiâncias testadas são indicadas com letras distintas (p<0.05).

Fase-Procedência-Irradiância	R	$F_{máx}$	α	Re	I_k	I_c	F/Re
Gametófito feminino-Ceará-70	0,83	68,37±5,99^{d}	1,08±0,34^{ab}	20,86±0,08^{a}	69,47±24,86^{e}	20,82±5,98^{b}	3,44
Gametófito feminino-Ceará-150	0,90	113,83±10,59^{b}	1,08±0,13^{ab}	12,62±0,05^{c}	106,47±19,56^{cd}	11,75±1,44^{c}	8,02
Gametófito feminino-Bahia-70	0,91	75,91±2,41^{cd}	0,79±0,10^{bc}	16,23±0,06^{b}	97,06±11,53^{cde}	20,78±2,77^{b}	4,42
Gametófito feminino-Bahia-150	0,97	103,25±10,51^{b}	0,75±0,06^{bc}	12,62±0,05^{c}	139,47±28,05^{bc}	16,93±1,60^{bc}	8,02
Gametófito feminino-São Paulo-70	0,92	67,21±4,01^{d}	0,80±0,21^{bc}	16,23±0,06^{b}	87,76±20,19^{de}	21,18±4,53^{b}	4,13
Gametófito feminino-São Paulo-150	0,97	88,01±8,51^{c}	1,10±0,10^{ab}	16,22±0,06^{b}	80,36±13,27^{de}	4,74±1,22^{bc}	8,02
Tetraporófito-Ceará-70	0,90	91,29±7,05^{c}	1,38±0,29^{a}	16,23±0,06^{b}	68,12±14,36^{e}	12,14±2,48^{c}	5,63
Tetraporófito-Ceará-150	0,97	132,61±15,25^{a}	0,78±0,05^{bc}	16,22±0,06^{b}	171,19±28,10^{b}	20,88±1,46^{b}	8,02
Tetraporófito-Bahia-70	0,86	81,37±7,04^{cd}	1,03±0,31^{abc}	16,23±0,06^{b}	86,93±33,19^{de}	17,28±6,20^{bc}	4,95
Tetraporófito-Bahia-150	0,97	107,94±9,00^{b}	0,66±0,10^{bc}	12,62±0,05^{c}	164,86±68,11^{b}	19,19±2,64^{b}	8,33
Tetrasporófito-São Paulo-70	0,90	82,12±8,00^{cd}	1,29±0,19^{a}	20,86±0,08^{a}	64,22±9,02^{e}	16,39±2,44^{bc}	3,93
Tetrasporófito-São Paulo-150	0,94	108,12±10,42^{b}	0,40±0,06^{d}	12,62±0,05^{c}	274,57±65,84^{a}	31,79±5,20^{a}	8,66

Conteúdo pigmentar

Foram observadas interações entre tetrasporófito e gametófito das diferentes populações (CE, BA e SP) e irradiâncias (70 e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}) em relação ao conteúdo dos pigmentos ficoeritrina (FE) e ficocianina (FC) (FE- F= 21.21, p<0.00; FC- F= 12.64, p<0.00). Não foi observada interação entre tetrasporófitos e gametófitos das diferentes populações (CE, BA e SP) e irradiâncias (70 e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}) em relação ao conteúdo de aloficocianina (AFC) e clorofila *a* (AFC- F= 2.82, p>0.06; F= 0.33, p>0.71).

A figura 5 apresenta os dados referentes ao conteúdo pigmentar encontrado nos indivíduos esyudados. GCE-70, TBA-70, GBA-70, TSP-70 e GSP-70 apresentaram maiores concentrações de FE e FC, quando respectivamente comparados aos GCE-150, TBA-150, GBA-150, TSP-150 e GSP-150 (FE- F= 247.59, p<0.00; FC- F= 18.50, p<0.00); entretanto, TCE-70 apresentaram valores semelhantes de FE, quando comparados a TCE-150 (F= 247.59, p>0.10), e esses últimos apresentaram maiores valores de FC, quando comparados a TCE-70 (F= 18.50, p<0.01). Os valores de AFC foram semelhantes para tetrasporófitos e gametófitos, independentemente da procedência e irradiância (F= 25.34, p>0.41).

Comparando-se tetrasporófito e gametófito da mesma procedência, cultivados em 70 ou 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, observou-se que GCE-70, GSP-70 e GSP-150 apresentaram maiores concentrações de FE e FC, quando comparados aos TCE-70, TSP-70 e TSP-150 (FE- F= 25.25, p<0.00; FC- F= 18.50, p<0.01); contudo, TCE-150, apresentou maiores concentrações de FE e FC, quando comparado com GCE-150 (FE- F= 25.25, p<0.01; FC- F= 18.50, p<0.02); tetrasporófito e gametófito da BA, apresentaram valores semelhantes para concentrações de FE e FC, independentemente da irradiância (FE- F= 25.25, p>0.15; FC- F= 18.50, p>0.61). Os valores para o conteúdo de AFC foram na grande maioria dos casos semelhantes, independentemente da fase, procedência e irradiância (F= 25.34, p>0.18).

Comparando-se tetrasporófito ou gametófito das diferentes procedências, cultivados em 70 ou 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, observou-se que TBA-70, GBA-70, TBA-150 e GBA-150 apresentaram maiores concentrações de FE, quando comparados aos TCE-70, TSP-70, GCE-70, GSP-70, TCE-150, TSP-150, GCE-150 e GSP-150 (F= 233.97, p<0.00). Para o conteúdo de FC, observou-se que TBA-70 e TBA-150 apresentaram maiores concentrações desse pigmento, quando comparados aos TSP-70, TCE-70, TSP-150 e TCE-150 (F= 25.34, p>0.18). GBA-70, GSP-70, GBA-150 e GSP-150 apresentaram maiores concentrações de FC, quando comparados aos GCE-70 e GCE-150 (F= 111.53, p<0.00).

Analisando-se separadamente as fases das diferentes procedências, cultivadas nas distintas irradiâncias, foi observado que TBA-70, GBA-70, TBA-150 e GBA-150 apresentaram maiores concentrações de FE, quando comparados aos TCE-70, TSP-70, GCE-70, GSP-70, TCE-150, TSP-150,

GCE-150 e GSP-150 (*F*= 233.97, p<0.18). Para o conteúdo de FC, observou-se que TBA-70 e TBA-150 apresentaram maiores concentrações desse pigmento, quando comparados aos TSP-70, TCE-70, TSP-150 e TCE-150 (*F*= 25.34, p>0.18); GBA-70, GSP-70, GBA-150 e GSP-150 apresentaram maiores concentrações de FC, quando comparados aos GCE-70 e GCE-150 (*F*= 25.34, p>0.18).

Os valores para o conteúdo de AFC foram semelhantes para tetrasporófitos e gametófitos cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} e tetrasporófitos cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, independentemente da irradiância (*F*= 18.60, p>0.13). GBA-150 apresentaram maiores valores de AFC, quando comparados a GCE-150 (*F*= 18.60, p<0.00), entretanto, GSP-150 apresentou valores semelhantes aos GBA-150 e GCE-150 (*F*= 18.60, p>0.12).

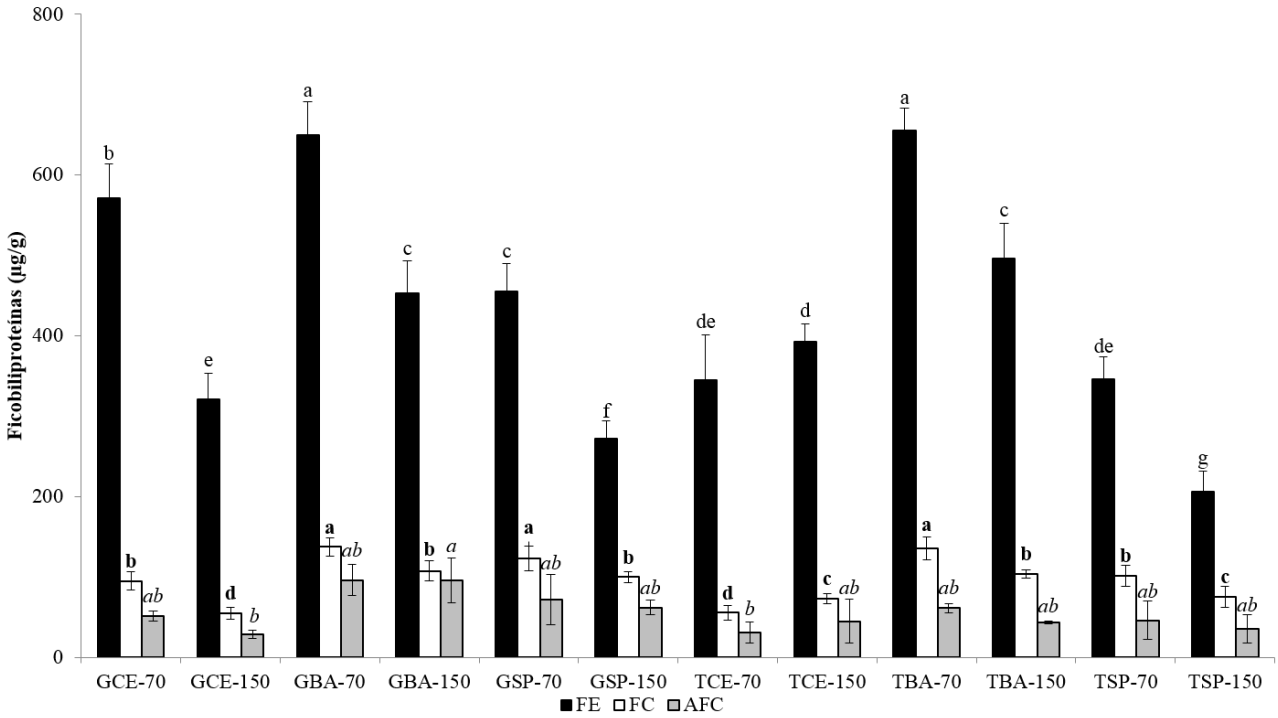

Figura 5. *Gracilaria caudata*: concentrações de ficoeritrina (FE), ficocianina (FC) e aloficocianina (AFC) em tetrasporófitos (T) e gametófitos (G) procedentes dos estados do Ceará (CE), Bahia (BA) e São Paulo (SP) e cultivados em 70 (70) µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} e 150 (150) µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} por um período de 16 dias. Dados apresentados como média e desvio padrão (n=5). Letras distintas representam diferenças significativas (*p*<0.05).

TCE-70, GCE-70, GCE-150 e TBA-70 apresentaram maiores concentrações de clorofila *a*, quando comparados ao TSP-150 (*F*= 6.88, p<0.02). TCE-150, GBA-70, TBA-150, GBA-150, TSP-70, GSP-70 e

GSP-150 apresentaram valores semelhantes aos TCE-70, GCE-70, GCE-150, TBA-70 e TSP-150 (F= 6.88, p>0.06). Os menores valores de clorofila *a* foram observados em TSP-150 (F= 6.88, p<0.01) (Figura 5).

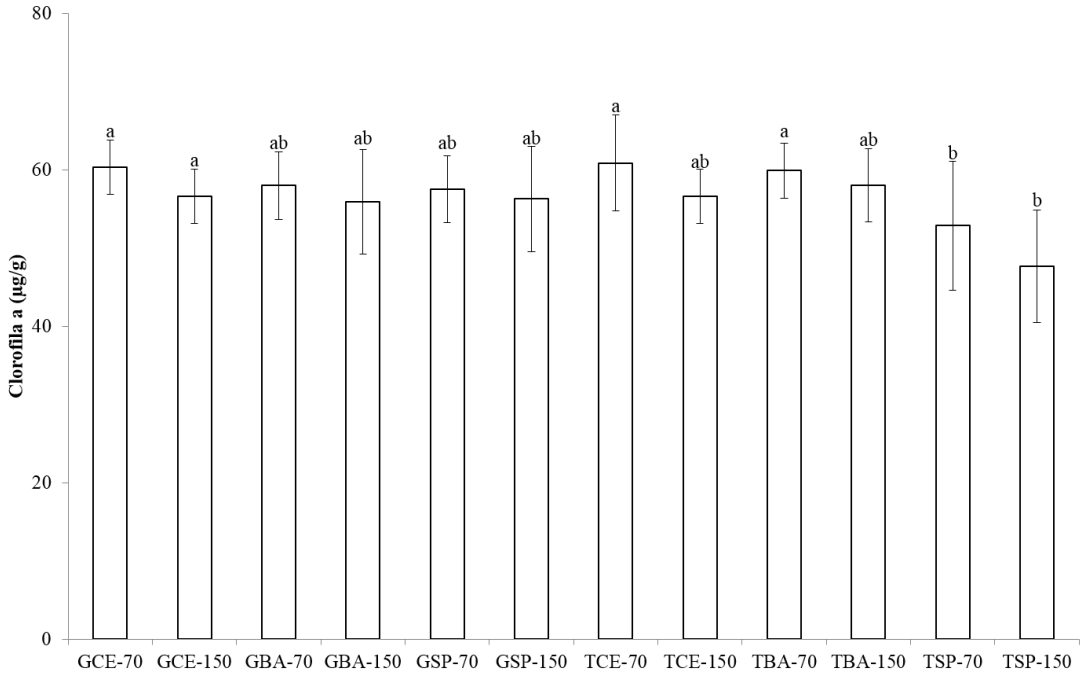

Figura 6. *Gracilaria caudata*: concentrações de clorofila *a* em tetrasporófitos (T) e gametófitos (G) procedentes dos estados do Ceará (CE), Bahia (BA) e São Paulo (SP) e cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (70) e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (150) por um período de 16 dias. Dados apresentados como média e desvio padrão (n=5). Letras distintas representam diferenças significativas (p<0.05).

Discussão

A irradiância influenciou tanto o número de ramificações e as TCs, quanto a fotossíntese e o conteúdo pigmentar de *G. caudata* procedente de diferentes locais, quando cultivada por um período de 14 dias. Tetrasporófitos e gametófitos apresentaram maior número de ramificações, maiores taxas crescimento e fotossíntese, e maiores conteúdos de FE e FC, quando cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, comparados aos cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}. O mesmo foi observado no capítulo 3 para gametófitos cultivados em alta irradiância ao longo de 28 dias. Esses dados sugerem que *G. caudata* apresenta adaptações a altas irradiâncias por ocorrer no médio-litoral, onde pode ficar exposta durante as marés baixas.

Ao analisarmos as taxas de crescimento de *G. caudata* procedente da BA, cultivada em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, observamos que tetrasporófitos apresentaram maior crescimento do que gametófitos. Respostas distintas entre tetrasporófitos e gametófitos podem representar uma vantagem fisiológica para a

espécie, pois possibilitaria uma maior amplitude de repostas de aclimatação a diferentes ambientes de ocorrência. Essas diferenças no desempenho fisiológico das fases isomórficas são consideradas vantajosas para a manutenção deste tipo de histórico de vida na natureza (Hughes e Otto 1999). Esses resultados estão de acordo com a maioria de estudos realizados em espécies de *Gracilaria*, em que tetrasporófitos apresentam maiores taxas de crescimento do que gametófitos (Barufi et al. 2015; Guillemin et al. 2013; Araújo et al 2014). Os dados do presente trabalho corroboram a hipótese de que tetrasporófitos, por serem organismos diplóides, possuem um desempenho fisiológico mais eficiente frente a variações ambientais, apresentando maiores taxas de sobrevivência e tolerância, quando comparados aos gametófitos. (Destombe et al. 1989; Hughes e Otto, 1999; Engel et al. 2004). Deve-se ressaltar ainda que tetrasporófitos de *G. caudata* são encontrados em maior proporção do que gametófitos em várias populações da costa brasileira (Ayres-Ostrock 2014). O fato de que tetrasporófitos e gametófitos procedentes do CE, BA e SP, cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, e os do CE e SP cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} terem apresentado taxas de crescimento semelhantes entre as fases da mesma população sugere que respostas fisiológicas dependem das condições ambientais a que estão submetidas as algas e também das características intrínsecas à população. Respostas distintas das obtidas para *G. caudata* foram observadas para outras espécies de *Gracilaria*, como *G. birdiae* (Ursi e Plastino 2001) e *G. dura* (Gupta et al. 2011), que apresentam maiores taxas de crescimento em gametófitos do que em tetrasporófitos.

Embora as respostas de *G. caudata* quanto às TCs tenham variado de acordo com a irradiância, os estádios e a procedência, os tetrasporófitos apresentaram maiores valores de fotossíntese máxima ($ETR_{máx}$), comparados a gametófitos, independentemente da procedência e da irradiância testada. Tetrasporófitos da BA e SP, quando cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, apresentaram maiores valores de eficiência fotossintetizantes (αETR), comparados aos gametófitos da mesma procedência. Tetrasporófitos do CE e SP, quando cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, apresentaram maiores valores de fotossíntese máxima ($F_{máx}$) e irradiância de compensação (I_c), comparados aos gametófitos da mesma procedência. Os maiores valores de $ETR_{máx}$, $F_{máx}$, I_k, αETR e I_c observados para tetrasporófitos sugerem que esses estão mais adaptados a altas irradiâncias do que gametófitos. Esses resultados corroboram estudo anterior, em que tetrasporófitos de *G. caudata* apresentaram maiores valores de $F_{máx}$ e I_k, quando comparados a gametófitos (Araújo et al. 2014).

Gametófitos de SP apresentaram maiores concentrações de FE e FC, quando comparados aos tetrasporófitos, independentemente da irradiância. Resultados semelhantes foram observados para gametófitos do CE, mas apenas quando cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}. Gametófitos do CE, cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, apresentaram menores concentrações de FE e FC que os tetrasporófitos. Gametófitos e tetrasporófitos da BA mostraram valores de concentrações pigmentares

semelhantes, independentemente da irradiância. A literatura relata também dados variáveis quanto ao conteúdo de pigmentos de gametófitos e tetrasporófitos, como em *G. caudata*, que apresentou maiores concentrações de FE e FC para tetrasporófitos, quando comparados aos gametófitos (Araújo et al. 2014), e *G. birdiae*, que apresentou valores similares nas concentrações de FE e FC para tetrasporófitos e gametófitos (Barufi et al. 2015). Deve-se salientar que vários fatores podem estar envolvidos nessas respostas, como disponibilidade de nutrientes, fotoperíodo, irradiância, entre outros.

Comparando-se os resultados obtidos para gametófitos de *G. caudata* cultivados ao decorrer de 14 dias (este capítulo) e 28 dias (capítulo 3), notam-se algumas diferenças que podem ser atribuídas ao período de aclimatação. Quando gametófitos foram cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} por 14 dias, não foi possível distinguir diferenças significativas quanto às taxas de crescimento entre as três populações, entretanto, quando o cultivo se estendeu por 28 dias, CE e SP mantiveram as taxas de crescimento semelhantes, porém, essas foram superiores às observadas para BA. Em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, durante o cultivo por 14 dias, CE e SP mantiveram as taxas de crescimento semelhantes, e essas foram superiores às observadas para BA, enquanto que durante o cultivo por 28 dias, além de observarmos menores taxas para gametófitos da BA, os do CE apresentaram taxas superiores aos de SP. Possivelmente, o cultivo por um período maior possibilitou uma maior expressão da capacidade fisiológica da espécie.

Gametófitos CE e BA cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} apresentaram maiores valores de I_k (técnica de fluorescência), αETR e $F_{máx}$, quando comparados com gametófitos SP-150. Tetrasporófitos CE e BA cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} apresentaram maiores valores de α, quando comparados com tetrasporófitos SP-150. Esses resultados indicam que algas procedentes de locais próximos do equador estão mais adaptadas a altas irradiâncias do que algas que estão em maiores latitudes (Araújo et al. 2014; Ayres-Ostrock et al. 2014), já que a maior incidência luminosa ocorre na região Nordeste (Moura e Shukla 1981). Os dados obtidos para *Gracilaria caudata* corroboram estudos sobre genética de populações da espécie para a costa brasileira, que ressaltam diferenças genéticas entre as três populações estudadas no presente trabalho (Ayres-Ostrock 2014 e Ayres-Ostrock et al. 2015).

Concluindo, na maior parte das condições testadas, verificaram-se respostas distintas entre indivíduos procedentes das três populações, quando considerados os diferentes parâmetros analisados. Esses resultados permitem concluir que *G. caudata* apresenta ecótipos ao longo da costa brasileira, e um dos fatores que sugere essa diferenciação é a irradiância, que se distribui de forma diversa nas diferentes latitudes. Esses dados corroboram ainda a hipótese de que indivíduos da região nordeste são mais adaptados a maiores irradiâncias que indivíduos da região sudeste. Além disso, embora *G. caudata* apresente tetrasporófitos e gametófitos isomórficos, quando analisados diferentes parâmetros fisiológicos, nota-se

que essas duas fases podem responder diferentemente. Essa ampla capacidade de respostas provavelmente favorece a manutenção da espécie na natureza, já que possibilita uma maior amplitude de repostas de aclimatação a diferentes ambientes.

Referências

Araujo FO, Ursi S, Plastino EM (2014) Intraspecific variation in *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): growth, pigment content, and photosynthesis. J Appl Phycol 26:849-858.

Ayres-Ostrock LM (2014) Estudos populacionais em *Gracilaria birdiae e G. caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): aspectos fenológicos, fisiológicos e moleculares. Tese de doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo.

Ayres-Ostrock LM, Plastino EM (2014) Effects of short-term exposure to ultraviolet-B radiation on photosynthesis and pigment content of red (wild types), greenish-brown, and green strains of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). J Appl Phycol 26:867-879.

Ayres-Ostrock LM, Mauger S, Plastino EM, Oliveira MC, Valero M, Destombe C (2015) Development and characterization of microsatellite markers in two agarophyte species, *Gracilaria birdiae* and *Gracilaria caudata* (Gracilariaceae, Rhodophyta), using next-generation sequencing. J Appl Phycol DOI 10.1007/s10811-015-0592-7.

Barufi JB, Figueroa FL, Plastino EM (2015) Effects of light quality on reproduction, growth, and pigment content of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). Scientia Marina 79:15-24.

Destombe C, Valero M, Vernet P, Couvet D (1989) What controls haploid-diploid ratio in the red alga, *Gracilaria verrucosa*? J Evol Biol 2:317-338.

Engel CR, Destombe C, Valero M (2004) Mating system and gene flow in the red seaweed *Gracilaria gracilis*: effect of haploid-diploid life history and interdial rocky shore landscape on fine-scale genetic structure. Heredity 92:289-298.

Falkowski PG, Raven JA (1997) Aquatic Photosynthesis. Blackwell, Oxford, pp. 193–198.

Gantt E (1990) Pigmentation and photoacclimation. In: Cole, K.M. & Sheath, K.G. (eds). Biology of the red algae. Cambridge University Press, Cambridge, pp.203-221.

Gupta V, Baghel R, Kumar M, Kumari P, Mantri VA, Reddy CRK, Jha B (2011) Growth and agarose characteristics of isomorphic gametophyte (male and female) and sporophyte of *Gracilaria dura* and their marker assisted selection. Aquaculture 318:389–396

Guillemin ML, Sepúlveda RD, Correa JA, Destombe C (2013) Differential ecological responses to environmental stress in the life history phases of the isomorphic red alga *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta). J Appl Phycol 25:215-224.

Guillemin ML, Valenzuela P, Gáitan-Espitia JD, Destombe C (2014) Evidence of reproductive cost in the triphasic life history of the red alga *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). J Appl Phycol 26:569-575.

Guimarães M, Plastino EM, Oliveira EC (1999) Life-history, reproduction, and growth of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. Bot Mar 42:481-486.

Guiry MD, Guiry GM (2014) AlgaeBase. Worldwide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: http://www.algaebase.org (último acesso em 11 abril 2015).

Henley WJ, Ramus J (1989) Optimization of pigment content and the limits of photoacclimation for *Ulva rotundata* (Chlorophyta). Mar Biol 103:267–274.

Hughes JS, Otto SP (1999) Ecology and the Evolution of Biphasic Life Cycles. Am Nat 154:306-320.

Innes DJ (1984) Genetic differentiation among populations of marine algae. Helgolander Meeresunters 38:401-417.

Kain JM, Destombe C (1995) A review of the life history, reproduction and phenology of *Gracilaria.* J Appl Phycol 7:269-281.

Lyra G M, Costa ES, Jesus PB, Matos JCG, Caires TA, Oliveira MC, Oliveira EC, Xi Z, Nunes JMC, Davis CC (2015) Phylogeny of Gracilariaceae (Rhodophyta): evidence from plastid and mitochondrial nucleotide sequences. J Phycol 51:356-366.

Moura AD, Shukla J (1981) On the dynamics of droughts in northeast Brazil: observation, theory and numerical experiments with a general circulation model. J Atmos Sci 38:2653–2675.

Nejrup LB, Staerhb PA, Solgaard M (2013) Temperature- and light-dependent growth and metabolism of the invasive red algae *Gracilaria vermiculophylla* – a comparison with two native macroalgae. Eur J Phycol 48:295-308.

Plastino E.M, Oliveira EC (1997) *Gracilaria caudata* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) - restoring an old name for a common western Atlantic alga. Phycologia 36:225-232.

Raikar SV, Iima M, Fujita Y (2001) Effect of temperature, salinity and light intensity on the growth of *Gracilaria* spp. (Gracilariales, Rhodophyta) from Japan, Malaysia and India. Indian J Mar Sci 30:98 – 104

Ramlov F, Souza JMC, Farias A, Maraschin M, Horta PH, Yokoya N S (2012) Effects of temperatura, irradiance, and nutrients on the development of carposporelings and tetrasporophytes in *Gracilaria domingensis* (Kütz.) Sonder ex Dickie (Rhodophyta, Gracilariales). Bot Mar 55: 253 – 259.

Santelices B, Varela D (1995) Regenerative capacity of *Gracilaria* fragments: Effects of size, reproductive state and position along the axis. J Appl Phycol 7:501-506.

Ursi S, Plastino EM (2001) Crescimento *in vitro* de linhagens de coloração vermelha e verde clara de *Gracilaria sp.* (Gracilariales, Rhodophyta) em dois meios de cultura: análise de diferentes estádios reprodutivos. *Revta Bras Bot* 24:587-594.

Ursi S, Pedersén M, Plastino EM, Snoeijs P (2003) Intraspecific variation of photosynthesis, respiration and photoprotective carotenoids in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales: Rhodophyta). Mar Biol 142:997-1007.

Yokoya NS, Kakita H, Obika H, Kitamura T (1999) Effects of environmental factors and plant growth regulators on growth of the red alga *Gracilaria vermiculophylla* from Shikoku Island, Japan. Hydrobiologia 398/399:339-347.

Yu CH, Lim PE, Phang SM (2013) Effects of irradiance and salinity on the growth of carpospore-derived tetrasporophytes of *Gracilaria edulis* and *Gracilaria tenuistipitata* var *liui* (Rhodophyta). J Appl Phycol 25:787-794.

CAPÍTULO 5

Considerações finais

O objeto de estudo do presente trabalho foi a alga vermelha *Gracilaria caudata*, uma espécie com ampla distribuição geográfica, que ocorre desde o sul do Caribe até a região sul do Brasil (estado de Santa Catarina). A espécie é considerada uma das principais agarófitas do nordeste brasileiro. Teve como objetivo investigar a diversidade intraespecífica e os eventuais efeitos das distintas irradiâncias (70 e 150 μmol fótons m^{-2} s^{-1}) na fisiologia da espécie. Os parâmetros analisados foram: número de ramificações, taxas de crescimento, fotossíntese (método de fluorescência e método de DBO) e conteúdo pigmentar e protéico. Essa abordagem incluiu a análise de diferentes indivíduos procedentes de três populações distintas, localizadas nos estados do Ceará, Bahia e São Paulo. Além disso, possibilitou uma análise intrapopulacional, considerando-se gametófitos e tetrasporófitos de cada uma dessas populações, bem como a caracterização de uma variante natural de coloração marrom-esverdeada, descoberta recentemente, procedente do estado do Ceará. Embora as respostas fisiológicas obtidas em laboratório possam ser distintas das observadas na natureza, o presente estudo, realizado em condições controladas de laboratório, pôde fornecer indícios dos efeitos fisiológicos da irradiância em *G. caudata*.

Tetrasporófitos de coloração vermelha e marrom-esvedeada e gametófitos de coloração vermelha, cultivados em altas irradiâncias (150 μmol fótons m^{-2} s^{-1}), apresentaram melhor desempenho somático, quando comparados a tetrasporófitos e gametófitos cultivados em baixas irradiâncias (70 μmol fótons m^{-2} s^{-1}). Um ótimo desempenho em alta irradiância seria esperado para a espécie, pois *G. caudata* ocorre no médio-litoral, ficando exposta a altas irradiâncias durante as marés baixas.

Comparou-se pela primeira vez em *Gracilaria caudata* tetrasporófitos de coloração vermelha (selvagem) e tetrasporófitos de uma variante natural de coloração marrom-esverdeada, levando-se em consideração os efeitos da irradiância. Foi possível testar a hipótese de que tetrasporófitos de coloração vermelha apresentam melhor desempenho somático em comparação aos de coloração marrom-esverdeada, independentemente da irradiância. A variante de coloração marrom-esverdeada caracteriza-se pela deficiência em ficoeritrina. A presença desses indivíduos na natureza possivelmente torna-se vantajosa para a espécie, se considerarmos os resultados observados neste trabalho, em que tetrasporófitos férteis de coloração marrom-esverdeada apresentaram maiores taxas de crescimento no período de 14-28 dias e maior conteúdo de ficocianina e aloficocianina, quando comparados aos de coloração vermelha, ambos cultivados em 150 μmol fótons m^{-2} s^{-1}. Na natureza, essa característica poderia ser vantajosa, pois tetrasporófitos

férteis de coloração marrom-esverdeada poderiam atingir maiores proporções que os de coloração vermelha e, consequentemente, produzir um maior número de tetrasporângios.

A fertilidade afetou de forma negativa as taxas de crescimento de tetrasporófitos de coloração vermelha e marrom-esverdeada, porém não afetou o desempenho fotossintetizante desses tetrasporófitos. Esses resultados corroboram a hipótese de que tetrasporófitos férteis necessitam de recursos energéticos extras para produção de estruturas reprodutivas. Como o desempenho fotossintetizante é mantido, parte dos recursos destinados ao crescimento é direcionada para a produção de tetrasporângios, promovendo a queda nas taxas de crescimento.

A comparação entre indivíduos das populações procedentes dos estados do Ceará, Bahia e São Paulo mostrou que esses apresentam respostas adaptativas distintas. Isso ficou evidente tanto nas análises de gametófitos por um período de quatro semanas, quanto nas análises de gametófitos e tetrasporófitos realizadas por duas semanas. Esses resultados sugerem que a espécie apresenta ecótipos relacionados à irradiância, e que a população da BA apresenta características intermediárias em relação às populações do Ceará e São Paulo, pois, dependendo do parâmetro analisado, seus gametófitos e tetrasporófitos se assemelham aos do CE ou aos de SP. Estudos anteriores demonstram que algas procedentes de locais próximos do equador estão mais adaptadas a altas irradiâncias do que algas que estão em maiores latitudes (Araújo et al. 2014; Ayres-Ostrock et al. 2014). Além disso, a análise da estrutura genética de populações de *G. caudata* da costa brasileira mostrou uma correlação positiva entre a distância geográfica e a distância genética entre as populações (Ayres-Ostrock 2014). A autora, ainda observou que a população da BA apresentou uma maior similaridade genética com a população de SP, quando comparadas com a do CE. Entretanto, no presente trabalho, os resultados obtidos para os parâmetros avaliados em gametófitos e tetrasporófitos procedentes da BA variaram, apresentando similaridades tanto com tetrasporófitos e gametófitos do CE, quanto com tetrasporófitos e gametófitos de SP, não sendo possível, portanto, pelas respostas fisiológicas observadas, confirmar a maior similaridade entre populações da BA e SP.

A comparação entre tetrasporófitos e gametófitos da mesma procedência, cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, mostrou que tetrasporófitos estão mais adaptados do que gametófitos a maiores irradiâncias (150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}), por terem apresentado maiores valores de $ETR_{máx}$, $F_{máx}$, I_k, αETR e I_c. Estudos anteriores demonstram que independentemente de serem isomórficos, tetrasporófitos e gametófitos podem apresentar respostas fisiológicas distintas, dependendo das condições abióticas, como já reportado para algumas espécies de *Gracilaria* (Guimarães 2000; Ursi et al. 2001; Costa 2005; Ferreira 2008; Barufi et al. 2015). Vantagens e desvantagens de organismos haplóides e diplóides vêm sendo

relatadas para espécies que apresentam alternâncias de geração. Uma dessas fases teria vantagem sobre a outra, dependendo do ambiente a que são expostas (Lewis 1985; Hughes e Otto 1999).

Concluindo, foi possível confirmar as hipóteses iniciais deste trabalho na maior parte das condições testadas. Esses resultados permitem concluir que *G. caudata* apresenta ecótipos ao longo da costa brasileira, e um dos fatores que sugere essa diferenciação é a irradiância, que se distribui de forma diversa nas diferentes latitudes. Além disso, embora a espécie apresente tetrasporófitos e gametófitos isomórficos, quando analisados diferentes parâmetros fisiológicos, nota-se que essas duas fases podem responder diferentemente. A ocorrência de uma variante de cor confere à espécie maiores possibilidades de respostas a fatores ambientais. A capacidade fisiológica de *G. caudata* verificada nos diferentes experimentos provavelmente favoreça a manutenção da espécie na natureza, bem como sua ocorrência na costa caribenha e brasileira, já que possibilita uma maior amplitude de repostas de aclimatação a diferentes ambientes.

Referências

Araujo FO, Ursi S, Plastino EM (2014) Intraspecific variation in *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): growth, pigment content, and photosynthesis. J Appl Phycol 26:849-858.

Ayres-Ostrock LM (2014) Estudos populacionais em *Gracilaria birdiae e G. caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): aspectos fenológicos, fisiológicos e moleculares. Tese de doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo.

Ayres-Ostrock LM, Plastino EM (2014) Effects of short-term exposure to ultraviolet-B radiation on photosynthesis and pigment content of red (wild types), greenish-brown, and green strains of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). J Appl Phycol 26:867-879.

Barufi JB, Figueroa FL, Plastino EM (2015) Effects of light quality on reproduction, growth, and pigment content of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). Scientia Marina. 79:15-24.

Costa VL (2005) Diversidade intraespecífica em gametófitos de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): efeitos fisiológicos da concentração de nitrato no meio de cultura. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo.

Ferreira LB (2008) Diversidade intraespecífica em *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta): estudos fisiológicos na interpretação do polimorfismo de cor. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo.

Guimarães M (2000) Aspectos fisiológicos de *Gracilaria domingensis* (Gracilairales, Rhodophyta): subsídios para a compreensão da manutenção do polimorfismo pigmentar. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo. 88p.

Hughes JS, Otto SP (1999) Ecology and the Evolution of Biphasic Life Cycles. Am Nat 154:306-320.

Lewis WM (1985) Nutrient scarcity as an evolutionary cause of haploid. Am Nat 125:692-701.

Ursi S, Plastino EM (2001) Crescimento *in vitro* de linhagens de coloração vermelha e verde clara de *Gracilaria sp.* (Gracilariales, Rhodophyta) em dois meios de cultura: análise de diferentes estádios reprodutivos. Rev Bras Bot 24:587-594.

Resumo

Gracilaria caudata J. Agardh apresenta uma ampla distribuição geográfica, além de ser uma das principais agarófitas coletadas no nordeste brasileiro. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da irradiância (70 e 150 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}) no número de ramificações, nas taxas de crescimento, nos parâmetros da fotossíntese e no conteúdo pigmentar de gametófitos e tetrasporófitos procedentes de três localidades distintas da costa brasileira: estados do Ceará (CE), Bahia (BA) e São Paulo (SP). Além disto, uma variante de coloração marrom-esverdeada foi caracterizada. Exemplares cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} apresentaram maiores taxas de crescimento, quando comparados aos cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, independentemente da coloração e procedência da espécie. A fertilidade afetou de forma negativa as taxas de crescimento de tetrasporófitos de coloração vermelha e marrom-esverdeada, porém não afetou o desempenho fotossintetizante desses tetrasporófitos. Em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, tetrasporófitos não-férteis de coloração vermelha apresentaram maiores taxas de crescimento, quando comparados aos não-férteis de coloração marrom-esverdeada, independentemente da irradiância; porém, esses últimos apresentaram maior conteúdo de ficocianina e aloficocianina. Quando gametófitos foram cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} por 14 dias, não foi possível distinguir diferenças significativas quanto às taxas de crescimento entre as três populações, entretanto, quando o cultivo se estendeu por 28 dias, CE e SP mantiveram as taxas de crescimento semelhantes, porém, essas foram superiores às observadas para BA. Em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, durante o cultivo por 14 dias, gametófitos do CE e SP mantiveram as taxas de crescimento semelhantes, e essas foram superiores às observadas para BA, enquanto que durante o cultivo por 28 dias, além de observarmos menores taxas para gametófitos da BA, os do CE apresentaram taxas superiores aos de SP. Tetrasporófitos do CE, BA e SP, cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} por 28 dias, apresentaram taxas de crescimento semelhantes, porém, quando cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, os do CE apresentaram maiores taxas, quando comparados aos da BA e SP, que apresentaram valores semelhantes. Quando gametófitos foram cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} por 28 dias, CE e BA apresentaram maiores valores de $F_{máx}$, α e *Re* do que SP, o que é esperado para algas procedentes de regiões mais próximas do equador, pois estariam mais adaptadas a altas irradiâncias do que as que ocorrem em altas latitudes; o mesmo foi observado para gametófitos e tetrasporófitos, cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} por 28 dias. Gametófitos do CE e BA apresentaram maiores valores de I_k (técnica de fluorescência), αETR e $F_{máx}$ do que SP, quando cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} por 14 dias. Nessa mesma irradiância e período, tetrasporófitos do CE e BA apresentaram maiores valores de α do que SP. Gametófitos de SP cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} apresentaram maiores conteúdos de FE, FC, AFC e CL do que os cultivados em 150 µmol.de fótons.m^{-2}.s^{-1}. Nos demais gametófitos (BA e CE) esses valores foram semelhantes nas duas irradiâncias. Essas respostas podem indicar que gametófitos do CE e

BA estejam mais adaptados para lidarem com altas irradiâncias do que os de SP. Gametófitos de SP apresentaram maiores concentrações de FE e FC, quando comparados aos tetrasporófitos de SP, independentemente da irradiância. Resultados semelhantes foram observados para os do CE, mas apenas quando cultivados em 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}. Gametófitos do CE, cultivados em 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, apresentaram menores concentrações de FE e FC que os tetrasporófitos. Gametófitos e tetrasporófitos da BA mostraram valores de concentrações pigmentares semelhantes, independentemente da irradiância. Em síntese, a análise geral dos resultados sugere a ocorrência de ecótipos de *G. caudata* ao longo da costa brasileira e ressalta a diversidade da espécie quanto às respostas fisiológicas, considerando-se também que essas foram distintas entre tetrasporófitos e gametófitos de uma mesma população. Além disso, a ocorrência de uma variante de cor na natureza com características distintas do tipo mais comum confere à espécie maior capacidade de adaptação frente a diferentes fatores abióticos. Tetrasporophytes from CE, BA and SP, grown in 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} for 28 days, showed similar growth rates, however, when grown in 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, CE showed higher rates when compared to the BA and SP, which were very similar.

Abstract

Gracilaria caudata J. Agardh a wide geographic distribution, as well as being a major agarophyte collected in northeastern Brazil. This study aimed to evaluate the effects of irradiance (70 and 150 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}) in number of branches, the growth rates, in photosynthesis parameters and pigment content of gametophytes and tetrasporophytes from three different locations of the Brazilian coast: Ceará State (CE), Bahia State (BA) and São Paulo State (SP). In addition, a variant of brown-green color was characterized. Specimens grown in 150 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} showed higher growth rates compared to those grown in 70 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}, regardless of color and origin of the species. The fertility negatively affects growth rates of tetrasporophytes red and greenish-brown color, but did not affect the photosynthetic performance of these tetrasporophytes. In 150 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}, non-fertile tetrasporophytes of red color had higher growth rates compared to non-fertile brown-green color, regardless of the irradiance; but the latter had higher content of phycocyanin and allophycocyanin. When gametophytes were grown in 70 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} for 14 days, it was not possible to distinguish significant differences in growth rates among the three populations, however, when the cultivation was extended for 28 days, CE and SP maintained similar growth rates, however, these were higher than those observed for BA. In 150 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} for the cultivation for 14 days, the CE and SP gametophytes remained similar growth rates and were superior to those observed for BA, whereas during the cultivation for 28 days, gametophytes of BA showed lower rates, the CE had higher rates than the SP. When gametophytes were grown in 70 µmol photons.m^{-}

$^{2}.s^{-1}$ for 28 days, CE and BA had higher F_{max}, α and *Re* values than SP, which is expected to algae coming from regions closer to the equator, because they would be more adapted to high irradiances than that occur at high latitudes; the same was observed for gametophytes and tetrasporophytes grown in 150 µmol photons.$m^{-2}.s^{-1}$ for 28 days. Gametophytes from CE and BA showed higher values of I_k (fluorescence technique), αETR and F_{max} than SP, when cultivated in 150 µmol photons.$m^{-2}.s^{-1}$ for 14 days. That same irradiance and period, the CE and BA tetrasporophytes had higher α values than SP. Gametophytes From SP grown in 70 µmol photons.$m^{-2}.s^{-1}$ had higher FE, FC, AFC and CL content than those grown in 150 µmol photons.$m^{-2}.s^{-1}$. In other gametophytes (BA and CE) these values were similar in both irradiance. These responses may indicate that gametophytes from CE and BA are further adapted to deal with high irradiances than SP. Gametophytes from SP showed higher concentrations of FE and FC when compared to tetrasporophytes from SP regardless of irradiance. Similar results were observed for the CE, only when grown at 70 µmol photons.$m^{-2}.s^{-1}$. Gametophytes from CE grown in 150 µmol photons.$m^{-2}.s^{-1}$, showed lower concentrations of FE and FC that tetrasporophytes. Gametophytes and tetrasporophytes BA showed similar pigment concentration values, regardless of irradiance. In summary, the overall analysis of the results suggests the occurrence of ecotypes for *G. caudata* along the Brazilian coast and emphasizes the diversity of species and the physiological responses, considering also that these were distinct from tetrasporophytes and gametophytes of the same population. Furthermore, the occurrence of a color variant in nature with different characteristics gives the most common type of species greater capacity against different abiotic adapt. Tetrasporophytes from CE, BA and SP, grown in 70 µmol photons.$m^{-2}.s^{-1}$ for 28 days, showed similar growth rates, however, when grown in 150 µmol photons.$m^{-2}.s^{-1}$, CE showed higher rates when compared to the BA and SP, which were very similar.