Luciana Bastos Ferreira

Diversidade intraespecífica em *Gracilaria*
domingensis (Gracilariales, Rhodophyta): estudos
fisiológicos na interpretação do polimorfismo
de cor

São Paulo

2008

Luciana Bastos Ferreira

Diversidade intraespecífica em *Gracilaria*
domingensis (Gracilariales, Rhodophyta): estudos
fisiológicos na interpretação do polimorfismo
de cor

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Botânica.

Orientadora: Profa. Dra. Estela Maria
Plastino

São Paulo

2008

Ferreira, Luciana Bastos

Diversidade intraespecífica em *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta): estudos fisiológicos na interpretação do polimorfismo de cor. 200 páginas.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica

1. Diversidade intraespecífica. 2. Morfos pigmentares. 3. *Gracilaria domingensis*.
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).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

Dedico esta Tese à minha avó Alice, que apesar de não ter tido a oportunidade de estudar, sempre me incentivou me dizendo que “quem estuda, vence!”.

Esta vitória também é sua.

“Aos deuses peço só que me concedam o nada lhes pedir, e tendo escrito não soube mais que dizer, há ocasiões assim, acreditamos na importância do que dissemos ou escrevemos até um certo ponto, apenas porque não foi possível calar os sons ou apagar os traços, mas entra-nos no corpo a tentação da mudez, a fascinação da imobilidade, estar como estão os deuses, calados e quietos, assistindo apenas.”

José Saramago, *O ano da morte de Ricardo Reis*.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, à minha querida professora e orientadora Dra. Estela Plastino, por ter me recebido no LAM quando eu ainda nem tinha cursado Criptógamas... Pela amizade, compreensão e conhecimentos compartilhados... Aprendi muito com você!

À CAPES, pela concessão da bolsa, sem a qual este trabalho não teria sido possível. Ao IB e à USP pelo apoio logístico para a execução deste trabalho.

Ao Fabiano, por sempre estar ao meu lado e entender as minhas ausências, tanto geográficas como presenciais, principalmente nos últimos três meses... Aos meus pais, Sérgio e Fátima, que sempre apoiaram incondicionalmente todos os meus projetos, e também pela revisão final deste manuscrito. À Cris, presente desde sempre, e agora com o Francisco. À minha avó Alice, que sempre incentivou os estudos da família. Ao meu tio Fernando, que sempre esteve tão presente e torcendo tanto por mim. Vocês são o meu alicerce! Também a todos os outros membros da minha família (numerosa!) que tanto me apoiaram ao longo desses anos.

Ao Rosário, tão imprescindível para o bom andamento do trabalho no LAM! Pela amizade, risadas e momentos descontraídos. O LAM não vive sem você!!!

Aos meus colaboradores, que tanto contribuíram para enriquecer este trabalho: Dra. Fungyi Chow, Dra. Karina H.M. Cardozo, Dr. Pio Colepicolo e Dr. Ricardo Chaloub.

A todos os LAMIGOS que eu conheci (e olha que foram muitos, me perdoem os que não estão aqui listados...), companheiros ou não de Bandeirão, que colaboraram para que o ambiente de trabalho no LAM fosse tão único, agradável e acolhedor: Alexis, Amandita, Amélia, Aninha, Bia, Cíntia(s), Cristian, Cristalina, Dani K., Dani M., Diógina, Fabíola, Fungyi, Guilherme, Josenildo, Lagosta, Leila, Letícia, Lígia, Lísia, Marcella, Maria Helena, Melina, Monica, Natália, Nelso, Rose, Suzana, Valéria, Vivi e tantos outros que por lá passaram... Me diverti muito com vocês!!! Aos queridos professores do LAM: Edison, Eurico, Estela, Fungyi e Mariana: vocês me ensinaram muito!!

Agradecimentos especiais... Aos que fizeram uma leitura crítica desta Tese: Amandita, Bia e José. À Su pela ajuda com os Abstracts. A todos os que me ajudaram com discussões, filosóficas ou não, regadas ou não com um cafezinho na copa ou um chazinho na sala da pós, sobre estatística: Flávio, Fungyi, Guilherme, José, Lagosta, Leila, Natália e Suzana.

Agradecimentos especiais também à Melina e à Suzana, que me ensinaram tanto quando eu entrei no LAM! Vocês são um exemplo para mim! À Anita e ao Rodrigo, que me acolherem tão bem na Cidade Maravilhosa. Parte do meu trabalho não teria sido possível sem vocês!! À Júlia, que me ajudou a superar os momentos de crise e contribuiu para a minha sanidade mental nos períodos mais conturbados...

Aos meus queridos amigos que estarão sempre no meu coração, não importa a distância, e com quem eu compartilhei tantos momentos agradáveis e outros nem tanto: Aline, Elisângela, Fabi, Sinistro, e tantos outros que passaram pela minha vida e que hoje eu não tenho mais contato.

Nós estamos todos interligados. Seria impossível, portanto, agradecer a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Mesmo assim eu me sinto grata por tudo! Porque no fim, valeu muito à pena!

ÍNDICE

CAPÍTULO 1- Introdução Geral.....	9
CAPÍTULO 2- Investimento reprodutivo em morfos pigmentares de <i>Gracilaria domingensis</i> (Gracilariales, Rhodophyta).....	23
CAPÍTULO 3- Efeitos da disponibilidade de nitrato em morfos pigmentares de <i>Gracilaria domingensis</i> (Gracilariales, Rhodophyta): sobrevivência de esporos, crescimento de plântulas, quantidade de proteínas solúveis totais e atividade da enzima nitrato redutase	58
CAPÍTULO 4- Atividade fotossintetizante de morfos pigmentares gametofíticos e tetrasporofíticos de <i>Gracilaria domingensis</i> (Gracilariales, Rhodophyta).....	106
CAPÍTULO 5- Efeitos da radiação UV-B na sobrevivência de esporos, crescimento de plântulas e síntese de MAAs em morfos pigmentares de <i>Gracilaria domingensis</i> (Gracilariales, Rhodophyta).....	136
CAPÍTULO 6- Considerações Finais.....	167
RESUMO	177
ABSTRACT	178
APÊNDICE I- Seleção da concentração da solução de von Stosch para o cultivo <i>in vitro</i> de <i>Gracilaria domingensis</i> (Gracilariales, Rhodophyta).....	179
APÊNDICE II- Padronização da metodologia utilizada para estimar o número de cistocarpos e de esporos liberados por <i>Gracilaria domingensis</i> (Gracilariales, Rhodophyta).....	185

Capítulo 1 - Introdução geral

1. Introdução

O gênero *Gracilaria* tem sido alvo de muitos estudos no Brasil e no mundo, devido à sua grande importância econômica. Existem mais de cem espécies, de ampla distribuição geográfica (Oliveira & Plastino 1994). No Brasil, ocorrem cerca de 18 espécies, distribuídas do Maranhão ao Rio Grande do Sul (Oliveira 1977). O gênero é utilizado em diversos países, principalmente para a produção de ágar (Critchley 1993), sendo responsável por mais de 50% da produção total desse ficocolóide (McHugh 2003). Há, também, outros usos comerciais para essas algas, como fonte de alimento, na produção de medicamentos (Kim 1970; McHugh 2003; Zemke-White & Ohno 1999; Smit 2004) e como biofiltro em cultivos integrados (McHugh 2003; Soriano 2007). Cultivos comerciais vêm se tornando cada vez mais importantes, uma vez que os estoques naturais vêm diminuindo consideravelmente ao longo dos anos devido à super exploração (Critchley 1993; McHugh 2003). Apesar disso, no Brasil existem apenas cultivos-piloto (Oliveira 1997; Soriano & Moreira 2002).

Variantes pigmentares já foram relatadas na literatura para várias espécies de Rhodophyta, como *Hypnea musciformis* (Yokoya *et al.* 2007), *Palmaria palmata* (Pueschel & van der Meer 1983), *Porphyra tenera* (Niwa *et al.* 2008) e *Porphyridium* sp. (Sivan & Arad 1993). A maior parte dos trabalhos com variantes de cor, no entanto, foi realizado com *Gracilaria* (e.g. van der Meer & Bird 1977; van der Meer 1978, 1979; Zhang & van der Meer 1987; Plastino *et al.* 1999; Costa & Plastino 2001; Guimarães *et al.* 2003; Ferreira *et al.* 2006; Guimarães *et al.* 2007). Algumas das variantes desse gênero foram produzidas artificialmente em laboratório com o uso de agentes mutagênicos (van der Meer 1979; van der Meer & Zhang 1988; Sivan &

Arad 1993), enquanto que outras surgiram espontaneamente (van der Meer & Bird 1977; van der Meer 1979; Pueschel & van der Meer 1983; Steele *et al.* 1986; Paula *et al.* 1999; Plastino *et al.* 1999; Costa & Plastino 2001; Ferreira *et al.* 2006; Niwa *et al.* 2008). Sabe-se muito pouco sobre a frequência com que variantes pigmentares são encontradas na natureza. Caso essa frequência seja igual ou superior a 1%, a variante pode ser considerada como um morfo (Futuyma 1998).

Dentre as espécies mais comuns de *Gracilaria* que ocorrem na região entremarés no litoral nordeste do Brasil, destaca-se *G. domingensis* (Kützinger) Sonder *ex* Dickie, uma das poucas do gênero a atingir o sul do país (Oliveira 1977). Essa espécie tem sido coletada esporadicamente pela empresa Agar Gel e exportada para o Japão, atingindo grande valor no mercado alimentício deste país (Plastino *et al.* 1999). *G. domingensis* é reconhecida como uma espécie com grande variação na coloração (Oliveira *et al.* 1983). Indivíduos de coloração verde, vermelha e marrom podem ser encontrados crescendo lado a lado em uma mesma população (figura 1).

O morfo verde é encontrado em menor frequência, porém pode compor até 20% da população (Guimarães *et al.* 2003). Verificou-se que as colorações verde, vermelha e marrom são determinadas por um par de alelos com herança mendeliana de origem nuclear codominante, sendo o alelo que confere a cor verde codominante ao que confere a cor vermelha. Em heterozigose, a cor marrom é expressa (Plastino *et al.* 1999). Possivelmente, essa diversidade intraespecífica quanto a cor seja vantajosa para a espécie, uma vez que esses morfos apresentam composição pigmentar distinta, que lhes confere características próprias quanto ao aproveitamento da luz incidente (Guimarães 2000).

Figura 1- Frondes marrons, vermelhas e verdes de *Gracilaria domingensis* coletadas na praia de Pacheco, Caucaia, CE (Guimarães 2000).

Além de possuírem composição pigmentar distinta (Guimarães *et al.* 2003), morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* apresentaram desempenho diferenciado quanto ao crescimento em diferentes irradiâncias (Guimarães 2000). Gametófitos femininos verdes apresentaram maiores taxas de crescimento, bem como maiores taxas fotossintetizantes que os de coloração vermelha quando submetidos às mesmas condições de irradiância. Esses estudos, no entanto, limitaram-se à fase gametofítica, não incluindo, portanto, o morfo marrom, nem as demais fases tetrasporofíticas, ou mesmo fases juvenis.

Apesar dos vários estudos fisiológicos realizados em laboratório, as razões que levam à manutenção e à estabilidade das frequências de morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* na natureza ainda são desconhecidas. No entanto, a avaliação global dos resultados obtidos com esses estudos permitiu a proposição de um modelo para explicar a manutenção do polimorfismo pigmentar (Guimarães 2000). Esse modelo baseou-se em dois pressupostos: i, o morfo verde apresenta desenvolvimento somático maior que o do morfo vermelho; e ii, o morfo verde

apresenta desenvolvimento reprodutivo menor que o do morfo vermelho. O primeiro pressuposto foi parcialmente confirmado após a análise das taxas de crescimento de gametófitos verdes e vermelhos adultos, bem como por análise das taxas fotossintetizantes (Guimarães 2000). O segundo pressuposto, porém, ainda não havia sido testado.

O desenvolvimento reprodutivo de uma alga pode ser avaliado por diferentes parâmetros, dos quais podemos citar a produção de gametas viáveis, o sucesso na fertilização, o número e a viabilidade de esporos produzidos, o diâmetro desses esporos, o diâmetro e a quantidade de cistocarpos diferenciados, entre outros (Santelices 1990). Todos esses parâmetros estão, de alguma forma, relacionados à produção de propágulos, que originarão novos indivíduos, garantindo, dessa forma, que a reprodução seja bem sucedida. A formação de propágulos é um dos processos fundamentais na história de vida de uma alga marinha bentônica, por permitir a colonização de um novo substrato (Fletcher & Callow 1992). Propágulos de algas usualmente incluem esporos, gametas, zigotos ou até mesmo fragmentos do talo contendo porções férteis (Hoffman 1987). O termo propágulo, no entanto, é geralmente utilizado para referir-se a esporos (Fletcher & Callow 1992). Nesse sentido, propágulos de *Gracilaria domingensis* incluem esporos de dois tipos: i, carpósporos, diplóides; e ii, tetrásporos, haplóides. Esses esporos são produzidos, respectivamente, pelo carposporófito (fase parasita do gametófito feminino, que se forma como resultado da multiplicação do produto da fecundação) e pelo tetrasporófito (figura 2).

Figura 2- Histórico de vida de *Gracilaria domingensis*. Modificado de Oliveira & Plastino 1994.

Mesmo que as fases tetrasporofítica e gametofítica de uma alga sejam isomórficas, é provável que existam diferenças fisiológicas entre elas, como já foi observado para algumas espécies de *Gracilaria*, tais como *G. birdiae* (Ursi & Plastino 2001, Barufi 2004); *G. coronopifolia* (Hoyle 1978), *G. tikvahiae* (Patwary & van der Meer 1983), *G. sjostedtii* (Zhang & van der Meer 1987) e *G. chilensis* (Santelices & Varela 1995). Até o presente, não havia estudos que comparassem as fases

gametofítica e tetrasporofítica em *G. domingensis*. Além disso, mesmo que os gametófitos e tetrasporófitos adultos ocupem nichos semelhantes, o mesmo pode não ocorrer com as fases juvenis. Em gametas, esporos, zigotos ou jovens com poucas células, diferenças no tamanho e na forma das células podem ocasionar grandes consequências para a reprodução, competição e dispersão (Lewis 1985; Destombe *et al.* 1992). Não havia também, até o presente, estudos que contemplassem esporos e fases juvenis de *G. domingensis*.

2. Objetivos

Tendo em vista o exposto, este trabalho teve como objetivo geral avaliar o desempenho somático e reprodutivo das diferentes fases do histórico de vida dos morfos verde, vermelho e marrons de *Gracilaria domingensis* em laboratório. Essa abordagem permitiu testar os seguintes pressupostos apresentados por Guimarães (2000): i, o morfo vermelho tem uma maior capacidade reprodutiva com relação ao morfo verde; e ii, o morfo verde tem uma maior capacidade somática com relação ao morfo vermelho. Além disso, possibilitou também avaliar o papel dos morfos marrons na manutenção do polimorfismo pigmentar da espécie.

Visando atingir o objetivo geral, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- 1) avaliar a capacidade reprodutiva dos diferentes morfos pigmentares (verde, vermelho e marrons) por meio dos seguintes parâmetros: i, número de cistocarpos diferenciados; ii, número de carpósporos e tetrásporos liberados; iii, diâmetro desses esporos; e iv, sobrevivência de carpósporos e tetrásporos. Esse último avaliado em diferentes condições de irradiância, nutrientes, e radiação ultravioleta.

2) avaliar a capacidade somática dos diferentes morfos pigmentares (verde, vermelho e marrons) em diferentes fases do seu desenvolvimento por meio da análise dos seguintes parâmetros: i, taxas de crescimento em diferentes condições nutricionais; ii, taxas de crescimento em diferentes condições de radiação ultravioleta; iii, atividade da enzima nitrato redutase em diferentes condições nutricionais; iv, taxas de fotossíntese; e v, síntese de “aminoácidos semelhantes a micosporinas” (MAAs) em diferentes condições de radiação UV-B.

3. Metodologia geral de cultivo

As condições gerais de cultivo utilizadas em todos os experimentos dessa Tese estão descritas a seguir. Modificações dessas condições serão explicitadas ao longo dos capítulos.

3.1. Coleta e preparação da água do mar

A água do mar utilizada nos experimentos foi coletada em São Sebastião, SP. Ela foi duplamente filtrada em filtro de pressão (Cuno) com porosidade de 5 e 1 μm e aquecida em banho-maria durante 60 minutos, contados a partir do momento da fervura. A salinidade foi de 32 ups. A água do mar, renovada semanalmente, foi enriquecida com solução de von Stosch (Edwards 1970) modificada por Plastino (1985), na concentração de 25%,. Essa concentração foi estabelecida em um teste preliminar de crescimento da espécie (Apêndice 1).

3.2. Temperatura, fotoperíodo e irradiância

As algas foram mantidas em câmaras de cultivo a temperaturas controladas, variando de 23 a 25 $^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 14h. A irradiância utilizada foi de 90 μmol fótons. m^{-2} . s^{-1} , provinda de lâmpadas fluorescentes “Luz do Dia” (Osram

40W) e mensurada com sensor esférico Li-COR, modelo LI-193, conectado a um medidor de quanta Li-COR, modelo LI 185.

3.3. Aeração

A aeração foi empregada em períodos alternados de 30 minutos. O ar foi fornecido por um compressor radial Ibram CR-03 de diafragma e isento de óleo, sendo inicialmente borbulhado em um frasco contendo água destilada, que serviu como filtro e umidificador.

3.4. Material biológico

O material biológico utilizado nos experimentos foi selecionado a partir de cultivos unialgais de gametófitos masculinos (M) e femininos (F), vermelhos (Vm) e verdes (Vd) e tetrasporófitos vermelhos (VmVm), verdes (VdVd) e marrons (VmVd e VdVm) de *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie provenientes do estado do Ceará e mantidos no Laboratório de Algas Marinhas Edison José de Paula (LAM), IBUSP.

3.4.1. Obtenção de carpósporos e de plântulas tetrasporofíticas de diferentes linhagens

Ápices de gametófitos femininos verdes e femininos vermelhos provenientes de seis indivíduos diferentes (três vermelhos e três verdes) de aproximadamente 60 mg cada foram cultivados durante três semanas em Erlenmeyers contendo 400ml de água do mar enriquecida. Seis ápices de cada indivíduo foram cultivados em cada frasco. O mesmo procedimento foi efetuado para ápices de 170 mg de gametófitos masculinos verdes e vermelhos provenientes de indivíduos diferentes (três vermelhos e três verdes). Os três ápices masculinos verdes foram cultivados em

frascos separados dos três ápices de gametófitos masculinos vermelhos. Após esse período, praticamente o talo inteiro dessas plantas estava repleto de espermatângios. Três ramos de gametófitos femininos verdes e três vermelhos foram transferidos para um frasco Erlenmeyer contendo 400 ml de água do mar enriquecida, juntamente com um ramo masculino verde (frascos 1, 2 e 3) ou vermelho (frascos 4, 5 e 6) (figura 3).

Figura 3- Esquema representando cruzamentos entre gametófitos femininos e masculino, verdes e vermelhos de *Gracilaria domingensis*. 1, 2 e 3: repetições dos cruzamentos Fvm x Mvd e Fvd x Mvd. 4, 5 e 6: repetições dos cruzamentos Fvm x Mvm e Fvd x Mvm.

Quatro tipos de cruzamentos foram, portanto, realizados, cada um em três repetições: i, Fvm x Mvm (frascos 4, 5 e 6); ii, Fvm x Mvd (frascos 1, 2 e 3); iii, Fvd x Mvd (frascos 1, 2 e 3); e iv, Fvd x Mvm (frascos 4, 5 e 6). Os ramos masculinos permaneceram em contato com os femininos na presença de aeração por 30 minutos (tempo estabelecido em experimento prévio, Apêndice 2). Após esse período, os ramos masculinos foram removidos dos frascos. Após a diferenciação de cistocarpos, as plantas foram transferidas para placas de Petri, visando à liberação de carpósporos. Cada tipo de cruzamento originou plantas cistocárpicas que produziram diferentes linhagens de carpósporos: i, c-VmVm (cruzamento Fvm x Mvm); ii, c-VmVd (cruzamento Fvm x Mvd); iii, c-VdVd (cruzamento Fvd x Mvd) e

iv, c-VdVm (cruzamento Fvd x Mvm). Carpósporos das diferentes linhagens foram transferidos, por meio de pipetas Pasteur, para cristalizadores contendo 200 ml de água do mar enriquecida, sem aeração. Ao germinarem, esses carpósporos originaram, respectivamente, plântulas tetrásporofíticas das linhagens: vermelha (VmVm), marrom VmVd, verde (VdVd) e marrom VdVm. Convencionou-se, na nomenclatura de tetrásporófitos, grafar o símbolo da planta feminina que lhe deu origem antes do símbolo da planta masculina.

3.4.2. Obtenção de tetrásporos e plântulas gametofíticas

Cinco ramos de plântulas tetrásporofíticas de um mês de idade das diferentes linhagens (vermelha, marrom VmVd, verde e marrom VdVm) foram transferidos para frascos Erlenmeyer contendo 400 ml de água do mar enriquecida. Após aproximadamente três semanas de cultivo, os tetrásporófitos estavam todos férteis. Eles foram, então, transferidos para placas de Petri, visando à liberação de tetrásporos. Tetrásporófitos vermelhos liberaram tetrásporos t-VmVm (todos da linhagem vermelha); tetrásporófitos marrons VmVd liberaram tetrásporos t-VmVd (linhagens vermelha ou verde); tetrásporófitos verdes liberaram tetrásporos t-VdVd (todos da linhagem verde); e tetrásporófitos marrons VdVm liberaram tetrásporos t-Vdvm (linhagens vermelha ou verde). Plântulas gametofíticas verdes foram obtidas a partir da germinação de t-VdVd, e plântulas gametofíticas vermelhas, a partir da germinação de t-VmVm, em cristalizadores contendo 200 ml de água do mar enriquecida, sem aeração.

4. Referências

- BARUFI, J.B. 2004. Efeitos da luz na reprodução, no crescimento e no conteúdo pigmentar de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 112 p.
- CRITCHLEY, A.T. *Gracilaria* (Rhodophyta, Gracilariales): an economically important agarophyte.. In: Ohno M. & Critchley A.T. (eds) *Seaweed Cultivation and Marine Ranching* (1st Edition). Japan International Cooperation Agency, Yokosuka, Japan. pp. 89-112.
- COSTA, V.L. & PLASTINO, E.M. 2001. Histórico de vida de espécimens selvagens e variantes cromáticas de *Gracilaria* sp. (Gracilariales, Rhodophyta). *Revista Brasileira de Botânica* 24: 491-500.
- EDWARDS, P. 1970. Illustrated guide of seaweeds and sea grasses in vicinity of Porto Arkansas, Texas. *Contrib. Mar. Sci.* 15: 1-228.
- HOFFMAN, A.J. 1987. The arrival of seaweed propagules at the shore: a review. *Botanica Marina* 30: 151-165.
- FLETCHER, R.L. & CALLOW, M.E. 1992. The settlement, attachment and establishment of marine algal spores. *British Phycological Journal* 27: 303-329.
- FERREIRA, L.B.; BARUFI, J.B. & PLASTINO, E.M. 2006. Growth of red and Green strains of *Gracilaria cornea* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) in laboratory. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 187-192.
- FUTUYMA, D.J. 1998. *Evolutionary Biology*, 3ª. edição. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- GUIMARÃES, M. 2000. Aspectos fisiológicos de *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta): subsídios para a compreensão da manutenção do polimorfismo pigmentar. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, SP.
- GUIMARÃES, M.; PLASTINO, E.M. & DESTOMBE, C. 2003. Green mutant frequency in natural populations of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. *European Journal of Phycology* 38: 165-169.
- GUIMARÃES, M.; PLASTINO, E.M. & OLIVEIRA, E.C. 1999. Life history, reproduction and growth of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. *Botanica Marina* 42: 481-486.

- GUIMARÃES, M.; VIANA, A.G.; DUARTE, M.E.R.; ASCÊNCIO, S.D.; PLASTINO, E.M. & NOSEDA, M. 2007. Low-molecular-mass carbohydrates and soluble polysaccharides of Green da red morphs of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *Botanica Marina* 50: 314-317.
- HOYLE, M.D. 1978. Reproductive phenology and growth rates in two species of *Gracilaria* from Hawaii. *Journal of Experimental Marine Ecology* 33: 273-283.
- KIM, D.H. 1970. Economically important seaweeds, in Chile- I- *Gracilaria*. *Botanica Marina* 13: 140-162.
- MCHUGH, D.J. 2003. A guide to the seaweed industry. In FAO Fisheries Technical Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 105 p.
- NIWA, K.; FURUITA, H.; YAMAMOTO, T. & KOBIYAMA, A. 2008. Identification and characterization of a green-type mutant of *Phorphyra tenera* Kjellman var. *tamatsuensis* Miura (Bangiales, Rhodophyta). *Aquaculture* 274: 126-131.
- OLIVEIRA, E.C. 1997. Macroalgas marinhas de valor comercial: técnicas de cultivo. *Panorama da Aqüicultura* 7: 42-45.
- OLIVEIRA, E.C.; BIRD, C.J. & MCLACHLAN, J. 1983. The genus *Gracilaria* (Rhodophyta, Gigartinales) in the western Atlantic. *Gracilaria domingensis*, *G. cervicornis*, and *G. ferox*. *Canadian Journal of Botany* 61: 2999-3008.
- OLIVEIRA, E.C. & PLASTINO, E.M. 1994. Gracilariaceae. In *Biology of Economic Algae*. Akatsuka, ed. pp. 185-226.
- PATWARY, M.U. & VAN DER MEER, J.P. 1983. Improvement of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae) by genetic modification of thallus morphology. *Aquaculture* 33: 207-214.
- PLASTINO, E.M. 1985. As espécies de *Gracilaria* (Rhodophyta, Gigartinales) da Praia Dura, Ubatuba, SP. – aspectos biológicos e fenologia. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- PLASTINO, E.M.; GUIMARÃES, M.; MATIOLI, S. & OLIVEIRA, E.C. 1999. Codominant inheritance of polymorphic color variants of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *Genetics and Molecular Biology* 22: 105-108.
- PUESCHEL, C.M. & VAN DER MEER, J.P. 1983. Ultrastructural characterization of a pigment

- mutant of the red alga *Palmaria palmate*. *Canadian Journal of Botany* 62: 1101-1107.
- SANTELICES, B. 1990. Patterns of reproduction, dispersal and recruitment in seaweeds. *Oceanography and Marine Biology Annual Review* 28: 177-276.
- SANTELICES, B. & VARELA, D. 1995. Regenerative capacity of *Gracilaria* fragments: effects of size, reproductive state and position along the axis. *Journal of Applied Phycology* 7: 501-506.
- SIVAN, A. & ARAD, S.M. 1993. Induction and characterization of pigment mutants in the red microalga *Porphyridium* sp. (Rhodophyceae). *Phycologia* 32: 68-72.
- SMIT, A.J. 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. *Journal of Applied Phycology* 16: 245-262.
- SORIANO, E.M. , MORALES, C. & MOREIRA, W.S.C. 2002. Cultivation of *Gracilaria* in shrimp pond effluents in Brazil. *Aquaculture Research* 33: 1081-1086.
- SORIANO, E.M. 2007. Seaweed biofilters: an environmentally friendly solution. *World Aquaculture* 38: 31-33.
- VAN DER MEER, J.P. 1978. Genetics of *Gracilaria* sp. (Rhodophyceae, Gigartinales) III. Non-Mendelian gene transmission. *Phycologia* 17: 314-318.
- VAN DER MEER, J.P. 1979. Genetics of *Gracilaria* sp. (Rhodophyceae, Gigartinales). V. Isolation and characterization of mutant strains. *Phycologia* 18: 47-54.
- VAN DER MEER, J.P. & BIRD, N.L. 1977. Genetics of *Gracilaria* sp. (Rhodophyceae, Gigartinales). I. Mendelian inheritance of two spontaneous green variants. *Phycologia* 16: 159-161.
- YOKOYA, N.; NECCHI JR, O.; MARTINS, A.P.; GONZALEZ, S.F. & PLASTINO, E.M. 2007. Growth responses and photosynthetic characteristics of wild and phycoeritrin-deficient strains of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 19: 197-205.
- ZEMKE-WHITE, W.L. & OHNO, M. 1999. World seaweed utilization: an end-of-century summary. *Journal of Applied Phycology* 11: 369-376.
- ZHANG, X. & VAN DER MEER, J.P. 1987. A genetic study on *Gracilaria sjoestedtii*. *Canadian Journal of Botany* 66: 2022- 2026.

**Capítulo 2- Investimento reprodutivo em morfos
pigmentares de *Gracilaria domingensis* (Gracilariales,
Rhodophyta)**

1. Abstract

The reproductive performance of green, red and brown pigment morphs of *Gracilaria domingensis* were analyzed in laboratory by: i) number of differentiated cystocarp; ii) growth rates (GR) of fertile plants; iii) number of tetraspores and carpospores released; and iv) diameter of spores. The high reproductive effort of this species was demonstrated by the 82% GR reduction of fertile plants (cystocarps and tetrasporophytes ones), as well as by the long period of spore release (minimum of eleven weeks). Significant differences were not observed among the number of differentiated cystocarps originated from the analyzed crosses (female (F) red (rd) x male (M) rd; Frd x M green (gr); Fgr x Mrd; e Fgr x Mrd). This results showed that the fecundation success and the subsequent processes that originated cystocarpic differentiation were not affected by the color of the parental gametophytes. The diameters of spores from different strains were also similar. However, the higher reproductive performance of the rd morph when compared to the gr one was observed by the longer period of spore release observed to carpospores originated from crosses between rd males and females (minimum of sixteen weeks) when compared to the shorter period of carpospores release from crosses between gr males and females (eleven weeks). The carpospore strains originated from the cross Frd x Mgr were produced in higher quantities than the other carpospores strains. This result suggests the occurrence of a higher number of brown plants (rdgr) in nature and the maintenance of green allele. The results showed that the analysis of reproductive performance of a polyporphic specie is not simple. The evaluation of multiple factors with synergic actuation is necessary to a accurate analysis.

2. Resumo

A capacidade reprodutiva de morfos pigmentares de coloração verde, vermelha e marrom de *Gracilaria domingensis* foi avaliada em laboratório considerando-se: i) a quantidade de cistocarpos diferenciados; ii) as taxas de crescimento (TC) de plantas férteis; iii) a quantidade de carpósporos e tetrásporos liberados; e iv) o diâmetro desses esporos. O grande esforço reprodutivo da espécie foi demonstrado pela redução de até 82% nas TC de plantas férteis (cistocárpicas e tetrasporofíticas) e pelo extenso período de liberação de esporos (um período mínimo de 11 semanas). Não foram observadas diferenças significativas no número de cistocarpos diferenciados entre os cruzamentos avaliados (feminina (F) vermelha (vm) x masculina (M) vm; Fvm x M verde (vd); Fvd x Mvd; e Fvd x Mvm). Isso indica que o sucesso na fecundação e os processos subsequentes que levam à diferenciação dos cistocarpos não são afetados pela cor dos gametófitos parentais. Não houve também diferença quanto ao diâmetro de carpósporos e tetrásporos entre as linhagens. Entretanto, a maior capacidade reprodutiva do morfo vermelho com relação ao verde ficou evidente pelo maior período de liberação de carpósporos provenientes dos cruzamentos envolvendo apenas gametófitos vermelhos (um período mínimo de 16 semanas) quando comparada ao menor período de liberação de carpósporos derivados dos cruzamentos entre gametófitos verdes (11 semanas). Comparando-se as diferentes linhagens de carpósporos oriundas dos quatro cruzamentos distintos, verificou-se que os originados de Fvm x Mvd foram

produzidos em maior quantidade, o que possibilitaria a ocorrência de um maior número de indivíduos marrons VmVd na natureza e favoreceria a manutenção do alelo verde. Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que a avaliação da capacidade reprodutiva de uma espécie polimórfica não é simples, e necessita da análise de múltiplos fatores que atuam em sinergismo.

3. Introdução

Uma das etapas fundamentais do histórico de vida de uma alga marinha bentônica é a colonização de um novo substrato, alcançada, na maioria das vezes, pela produção de propágulos (Fletcher & Callow 1992), em sua maior parte, esporos, zigotos ou gametas (Clayton 1992). O processo de disseminação de propágulos inclui diferentes etapas: maturação, liberação, dispersão, contato inicial com o substrato, fixação e germinação. Embora nem sempre a produção e a liberação de propágulos estejam diretamente relacionadas a fatores ambientais (Pacheco-Ruiz *et al.* 1989), a maior parte dos trabalhos da literatura apontam que a luz, a salinidade, o dessecação e a temperatura são fatores importantes para esse processo (Lüning 1981; Friedlander & Dawes 1984; Santelices 1990; Brawley & Johnson 1992; Gonzalez & Meneses 1996; Orduña-Rojas & Robledo 1999; Garza-Sánchez *et al.* 2000; Ichiki *et al.* 2000; Bellgrove & Aoki 2006). Além desses, outros fatores podem também influenciar na liberação de esporos, como hormônios (Guzmán-Urióstegui *et al.* 2002; Sacramento *et al.* 2004), presença de bactérias (Weinberger *et al.* 2007), e até mesmo a ação de herbívoros (Buschmann & Santelices 1987).

A reprodução geralmente impõe um custo ao organismo, que pode ser refletido na diminuição do crescimento ou até mesmo na morte do indivíduo (de Wreede & Klinger 1988; Guimarães *et al.* 1999). A capacidade reprodutiva de uma alga pode ser avaliada sob diversos aspectos, entre os quais a produção de gametas e esporos (Mshigeni 1976; Lefebvre *et al.* 1987; Pacheco-Ruiz *et al.* 1989; Rueness & Fredriksen 1998; Orduña-Rojas & Robledo 1999). A estratégia reprodutiva de algumas algas envolve a produção de gametas e/ou esporos em épocas específicas

do ano, em um padrão sazonal definido (Kain 1982; Rao & Kaliupermal 1987; Gonzalez & Meneses 1996; Garza-Sánchez *et al.* 2000), enquanto outras espécies podem ser encontradas férteis em qualquer época do ano, como *Gigartina canaliculata* (Pacheco-Ruiz *et al.* 1989), *Gracilaria domingensis* (Joventino & Bezerra 1980) e *Hypnea* sp. (Mshigeni 1976).

O tamanho dos esporos é considerado como um fator determinante nas suas taxas de sedimentação (Norton 1991). Esporos pequenos tendem a afundar mais depressa do que esporos grandes. Isso pode ter uma grande influência para a dispersão, já que esporos que afundam mais rápido tendem a permanecer mais próximos à planta parental, enquanto que esporos que demoram mais para afundar podem alcançar distâncias maiores (Clayton 1992). Trabalhos mais recentes, contudo, apontam que em ambientes costeiros, geralmente é a taxa de mistura vertical de água devido à turbulência, mais do que as velocidades de sedimentação, que controla o tempo em que propágulos de algas vão demorar para alcançar um substrato (Gaylord *et al.* 2002). Esporos de Rhodophyta podem variar bastante com relação ao tamanho, tendo sido encontrados esporos tão pequenos quanto 2 μm e tão grandes quanto 105 μm , além de muitos outros diâmetros intermediários entre esses valores (Boney 1975; Mshigeni & Lorri 1977; Okuda & Neushul 1981; Plastino 1985; Clayton 1992; Ichiki *et al.* 2000; Bouzon *et al.* 2006). Carpósporos de *Gracilaria* são liberados em grande número, associados por uma massa de mucilagem, e geralmente são pequenos, medindo em torno de 20 μm (Boney 1978; Ngan & Price 1979; Okuda & Neushul 1981; Plastino 1985; Orduña-Rojas & Robledo 1999).

Variantes pigmentares em Rhodophyta vêm sendo relatadas na literatura há muito tempo, porém pouco se sabe a respeito da capacidade reprodutiva dessas

variantes, e os relatos na literatura sobre variabilidade intraespecífica na reprodução são raros (Rueness & Fredriksen 1998). Sabe-se muito pouco também a respeito da frequência com que elas são encontradas na natureza. Caso essa frequência seja igual ou superior a 1%, a variante pode ser considerada como um morfo (Futuyma 1998). *Gracilaria domingensis* apresenta morfos pigmentares naturais (Guimarães *et al.* 2003). Plantas verdes, vermelhas e marrons podem ser encontradas crescendo lado a lado em uma mesma população, em porcentagens de até 20% (Guimarães *et al.* 2003).

Um dos mecanismos propostos para explicar a manutenção de um polimorfismo na natureza é o de que o heterozigoto pode ter maior desempenho quando comparado a cada um dos homozigotos (Begon *et al.* 1996), idéia esta conhecida como vigor híbrido, ou heterose. As duas linhagens de tetrasporófitos marrons de *G. domingensis* são heterozigotas para o gene que confere a cor das plantas, e, portanto, são ótimos objetos de estudo para avaliar a heterose em algas. Caso a heterose ocorresse nesses tetrasporófitos, ela poderia contribuir para a explicação da manutenção do alelo verde na natureza.

Tendo em vista o exposto, o presente trabalho teve como objetivos avaliar a capacidade reprodutiva dos morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* quanto aos seguintes aspectos: número de cistocarpos diferenciados, número de carpósporos e tetrásporos liberados e diâmetro desses esporos. Visando um melhor esclarecimento sobre os custos energéticos para a produção de esporos nos diferentes morfos, avaliou-se também as taxas de crescimento de plantas férteis (cistocárpicas e tetrasporofíticas) ao longo do tempo. Nossas hipóteses eram as seguintes: i, o morfo vermelho possui uma maior capacidade reprodutiva que a do morfo verde; e ii, o

morfo marrom possui uma capacidade reprodutiva maior que a dos demais morfos, ou seja, há heterose.

4. Material e Métodos

4.1. Material biológico

Quatro tipos de cruzamentos entre gametófitos femininos e masculinos, verdes e vermelhos, de *Gracilaria domingensis* mantidos no LAM foram realizados conforme explicado no Cap. 1: i, Fvm x Mvm; ii, Fvm x Mvd; iii, Fvd x Mvd; e iv, Fvd x Mvm. As plantas femininas e masculinas utilizadas nesses experimentos foram padronizadas pela massa fresca (60 mg e 170 mg, respectivamente, para cada ápice). Esses cruzamentos, realizados em três repetições cada, deram origem aos seguintes carpósporos, respectivamente: c-VmVm, c-VmVd, c-VdVd e c-VdVm. Esses carpósporos, ao germinarem, originaram tetrásporófitos vermelhos (VmVm), marrons (VmVd ou VdVm) e verdes (VdVd) que, ao ficarem férteis, produziram tetrásporos que foram aqui denominados de t-VmVm, t-VmVd, t-VdVm e t-VdVd, respectivamente. Os tetrásporos t-VmVd e t-VdVm pertenciam a duas linhagens, já que, ao germinarem, originaram gametófitos verdes e vermelhos. Porém, como pretendia-se avaliar o esforço reprodutivo das plantas parentais, as duas linhagens de tetrásporófitos marrons foram consideradas separadamente nas análises.

As plantas cistocárpicas e tetrásporofíticas férteis foram cultivadas em frascos Erlenmeyer contendo 400 ml de água do mar enriquecida, trocada semanalmente. Todas as medidas foram feitas uma semana após a troca do meio. A relação massa fresca/volume ao longo dos experimentos foi no máximo de 0,57 g.L⁻¹.

4.2. Número de cistocarpos diferenciados

A contagem do número de cistocarpos diferenciados foi feita em microscópio estereoscópico três semanas após a fertilização, quando já era possível visualizar os ostíolos. Como todos os ramos apresentaram aproximadamente a mesma biomassa inicial (60 mg), foi possível comparar o número total de cistocarpos derivados dos diferentes cruzamentos (Fvm x Mvm; Fvm x Mvd; Fvd x Mvd; Fvd x Mvm).

4.3. Taxas de crescimento de plantas cistocárpicas e tetrasporofíticas férteis

Assim que as plantas cistocárpicas procedentes dos quatro cruzamentos (Fvm x Mvm; Fvm x Mvd; Fvd x Mvd; e Fvd x Mvm) e as plantas tetrasporofíticas das quatro linhagens (vermelha, verde e marrons VmVd e VdVm) iniciaram a liberação de esporos, seu crescimento foi avaliado por medidas semanais de massa fresca, mensuradas em balança analítica durante quatro semanas para plantas cistocárpicas, e 20 semanas para plantas tetrasporofíticas. A partir desses dados foram calculadas as taxas de crescimento (TC), segundo a fórmula de Lignell e Pedersén (1989): $TC = [(M_f/M_i)^{1/t} - 1] \times 100\%$, na qual TC= taxa de crescimento; M_f = Massa final; M_i = massa inicial; t = tempo (em dias).

4.4. Número de carpósporos e tetrásporos liberados

Assim que os ramos cistocárpicas procedentes dos quatro cruzamentos (Fvm x Mvm; Fvm x Mvd; Fvd x Mvd; e Fvd x Mvm) e as plantas tetrasporofíticas das quatro linhagens (vermelha, verde e marrons VmVd e VdVm) iniciaram a liberação de carpósporos e tetrásporos, respectivamente, foram transferidos para frascos do tipo Frascolex (Linha Alimentícia, modelo RED Automático) contendo 5 ml de água do mar. Um agitador orbital Ética Modelo 109-8 com velocidade de 50% foi

utilizado para evitar a sedimentação dos esporos. Após 2 h, os ramos foram retirados e pesados. Cinco pequenas alíquotas do líquido dos frascos foram amostradas para cada repetição, e transferidas para um hematocítômetro com escala Fuchs-Rosenthal (0,0064 ml), onde o número de esporos foi avaliado em microscópio óptico Wild Leitz modelo Laborlux. Esse procedimento foi realizado uma vez por semana, até o término da liberação de carpósporos e durante 20 semanas para tetrásporos. A quantificação dos esporos foi realizada sempre entre 4-7 horas após o início do fotoperíodo.

Foi calculada uma média para o número de esporos obtidos nas cinco sub-repetições amostradas em cada repetição. Essas médias foram consideradas como os valores de cada repetição (total de três repetições).

O número de esporos liberados foi estimado segundo diferentes índices:

1) Número de esporos liberados por hora

Número de esporos. $h^{-1} = ((e \cdot 5 \text{ ml}) / 0,0064 \text{ ml}) \cdot 2 \text{ h}^{-1}$, onde e = média do número de esporos das 5 sub-repetições de uma mesma repetição; 5 ml = quantidade de água do mar nos frascos onde os ramos permaneceram liberando os esporos; 0,0064 ml = volume do hematocítômetro; e 2 h = tempo em que os ramos permaneceram nos frascos liberando os esporos.

2) Número de esporos liberados por hora por massa fresca

O valor referente ao número de esporos liberados por hora foi dividido pelo valor da massa fresca dos ramos, considerando-se cada repetição.

3) Número de carpósporos liberados por hora por cistocarpo

O valor referente ao número de carpósporos liberados no período de uma hora foi dividido pelo número total de cistocarpos presentes nos três ramos de cada repetição.

O número de carpósporos e tetrásporos foi comparado considerando-se a massa fresca das plantas, durante as quatro primeiras semanas de liberação.

4.5. Diâmetro de carpósporos e tetrásporos

O diâmetro de carpósporos (QUAIS) e tetrásporos (QUAIS) foi avaliado considerando-se as dez sub-repetições de cada repetição (total de três repetições). Utilizou-se um microscópio óptico Wild Leitz modelo Laborlux com uma ocular métrica acoplada, em um aumento de 400 vezes. Médias para as dez sub-repetições foram calculadas, e essas médias foram consideradas como o diâmetro dos esporos de cada repetição.

O diâmetro de carpósporos e tetrásporos foi avaliado semanalmente durante um período de 11 semanas.

4.6. Análises estatísticas

O número total de cistocarpos resultantes dos diferentes cruzamentos (item 4.2) foi submetido a uma análise de variância unifatorial (fator: linhagem). Os valores das taxas de crescimento de plantas férteis (4.3), o número e o diâmetro de esporos (4.4 e 4.5) foram submetidos a análises de variância com medidas repetidas para verificar possíveis diferenças entre as linhagens e ao longo do tempo. Diferenças significativas foram consideradas com valores de $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Número de cistocarpos diferenciados

Uma semana após a realização dos cruzamentos já foi possível visualizar o início da diferenciação de cistocarpos a olho nú. Quatro semanas depois do início dos experimentos, os ramos começaram a liberar carpósporos.

Não houve diferenças significativas no número de cistocarpos diferenciados entre os diferentes cruzamentos analisados ($p = 0,61$) (figura 1).

Figura 1- Número de cistocarpos diferenciados nos gametófitos femininos utilizados nos diferentes cruzamentos de *G. domingensis*. As barras representam o número total de cistocarpos presentes nos três ramos de cada repetição.

5.2. Taxas de crescimento de plantas férteis

5.2.1. Plantas cistocárpicas

As taxas de crescimento (TC) das plantas cistocárpicas provenientes dos diferentes cruzamentos mensuradas a partir da quarta semana após a fecundação, que coincidiu com o início da liberação de carpósporos, foram semelhantes entre si considerando-se uma mesma semana ($p = 0,745$). TC na quarta semana foram menores que as obtidas na primeira semana de experimento, para todas as linhagens

($p = 0,004$). As TC obtidas nas semanas intermediárias (segunda e terceira) foram semelhantes entre si ($p > 0,374$) (figura 2).

Figura 2- Taxas de crescimento (TC) de plantas cistocárpicas provenientes dos diferentes cruzamentos de *G. domingensis* mensuradas a partir do início da liberação de carpósporos por um período de quatro semanas. Barras de erro, intervalo de confiança (95%). $n = 3$.

Observando-se a figura 2, parece que há uma tendência de maiores TC para plantas cistocárpicas vermelhas (Fvm x Mvm) na quarta semana. Porém, quando análises estatísticas unifatoriais foram feitas utilizando-se dados somente desta semana, não foram também observadas diferenças estatísticas entre os cruzamentos ($p = 0,324$).

5.2.2. Plantas tetrasporófitas

Tetrasporófitos das diferentes linhagens diferenciaram estruturas reprodutivas com sete semanas de idade. As TC dessas plantas foram calculadas a partir do início da liberação dos tetrásporos (figura 3). Houve interação entre as TC

das diferentes linhagens de plantas tetrasporófitas férteis ao longo do tempo ($p=0,016$). Por esse motivo, a análise *a posteriori* foi realizada levando-se em consideração os dois fatores (linhagem e tempo) juntos. Serão apresentadas, aqui, as tendências gerais apontadas por essa análise.

Todas as plantas apresentaram quedas nas taxas de crescimento ao longo do tempo. O momento em que essa queda ocorreu variou de acordo com a linhagem. De maneira geral, tetrasporófitos vermelhos e marrons VmVd apresentaram quedas nas TC a partir da terceira semana ($p = 0,000$) e da segunda semana ($p= 0,000$), respectivamente, após o início da liberação de tetrásporos. Essas taxas mantiveram-se constantes ($p> 0,060$), com exceção da 16ª semana, quando as TC foram menores com relação à maior parte das outras semanas ($p< 0,04$). As TC de tetrasporófitos verdes e marrons VdVm caíram a partir da terceira semana ($p= 0,000$) e mantiveram-se aproximadamente constantes até a 18ª semana ($p> 0,272$).

Considerando-se uma mesma semana, diferenças entre as linhagens só foram observadas na segunda semana após o início da liberação de tetrásporos. Da terceira à 18ª semana, bem como na primeira semana, as TC de todas as linhagens foram semelhantes entre si ($p> 0,120$). Na segunda semana, tetrasporófitos vermelhos apresentaram TC maiores que as obtidas para as duas linhagens de tetrasporófitos marrons ($p< 0,018$), que foram semelhantes entre si ($p= 0,462$). As TC de tetrasporófitos verdes, nesta semana, foram maiores que a de tetrasporófitos marrons VdVm ($p= 0,038$), e semelhantes às obtidas para tetrasporófitos vermelhos ($p= 0,239$).

Figura 3- Taxas de crescimento (TC) de plantas tetrasporofíticas férteis das diferentes linhagens de *G. domingensis* obtidas a partir do início da liberação de tetrásporos, por um período de 20 semanas. Barras de erro, intervalo de confiança (95%). $n = 3$.

5.3. Número de esporos liberados

5.3.1. Carpósporos

As três repetições da linhagem c-VmVm liberaram carpósporos durante 16 semanas. Após esse período, houve liberação em apenas uma das repetições, por mais seis semanas.

As três repetições da linhagem c-VmVd liberaram carpósporos até a 15ª semana. Da 16ª à 18ª semanas apenas duas repetições ainda liberavam carpósporos. A partir da 19ª semana de experimento cessou a liberação para essa linhagem.

As três repetições de c-VdVd liberaram carpósporos até a 11ª semana. Da 12ª à 15ª semanas apenas duas repetições liberaram carpósporos, e a partir da 16ª semana nenhuma repetição desse cruzamento liberou carpósporos.

As três repetições de c-VdVm liberaram carpósporos até a 12^a semana. Da 13^a à 16^a semanas duas repetições permaneciam liberando. Da 17^a à 22^a semanas uma repetição ainda permaneceu liberando, mas após a 23^a semana cessou a liberação por esse cruzamento.

5.3.1.1. Número de carpósporos liberados por hora

A análise de variância com medidas repetidas não detectou diferenças no número de carpósporos liberados por hora entre os diferentes cruzamentos ($p = 0,054$) considerando-se uma mesma semana. Entretanto, como o valor de p foi muito próximo do limite estabelecido para as diferenças significativas ($p < 0,05$), optou-se por fazer uma segunda análise, levando-se em conta somente a primeira semana, que, pela observação da figura 4, foi a que aparentemente mostrou diferenças entre as linhagens. A análise de variância unifatorial utilizando-se dados referentes somente a essa semana mostrou que c-VmVd foram liberados em maior quantidade quando comparados a carpósporos derivados dos demais cruzamentos ($p < 0,026$); c-VdVd foram liberados em maior quantidade quando comparados a c-VdVm ($p = 0,030$), porém em quantidade semelhante a c-VmVm ($p = 0,060$), e estes últimos, em quantidade semelhante a c-VdVm ($p = 0,344$).

A análise de variância com medidas repetidas mostrou algumas diferenças pontuais no número de carpósporos liberados ao longo do tempo ($p = 0,000$). Carpósporos c-VmVm foram liberados em maior quantidade na 4^a semana em relação à primeira e à 10^a semanas. Carpósporos c-VmVd foram liberados em maior quantidade na primeira semana em relação às semanas: 5, 6, 7, 10 e 11 (figura 4).

Figura 4- Número de carpósporos liberados por hora pelas plantas cistocárpicas de *G. domingensis* provenientes dos diferentes cruzamentos ao longo de 11 semanas. Barras de erro, intervalo de confiança (0,95). $n = 3$ (10 sub-repetições para cada amostra).

5.3.1.2. Número de carpósporos por hora por massa fresca

A análise de variância com medidas repetidas (tempo) não detectou diferenças significativas na liberação de carpósporos por hora por massa fresca entre os diferentes cruzamentos ($p = 0,128$), nem ao longo do tempo ($p = 0,252$) (figura 5). No entanto, ao observar a figura 3, nota-se que na primeira semana parece haver diferenças no número de carpósporos liberados entre eles. Quando uma análise de variância unifatorial foi executada utilizando-se somente os dados dessa semana, verificou-se que carpósporos derivados dos cruzamentos Fvm x Mvd e Fvd x Mvd foram liberados em maiores quantidades que os dos demais cruzamentos ($p < 0,002$).

Figura 5- Número de carpósporos liberados por hora por mg de massa fresca de plantas cistocárpicas de *G. domingensis* provenientes dos diferentes cruzamentos ao longo de 4 semanas. Barras de erro, intervalo de confiança (0,95). $n= 3$ (10 sub-repetições para cada amostra).

5.3.1.3. Número de carpósporos liberados por cistocarpo por hora

A análise de variância com medidas repetidas (tempo) não detectou diferenças significativas entre o número de carpósporos liberados pelos diferentes cruzamentos ($p = 0,706$). Houve apenas uma diferença pontual ao longo do tempo ($p = 0,029$): carpósporos c-VmVm foram liberados em maior quantidade na quarta semana em relação à décima semana (figura 6).

Figura 6- Número de carpósporos liberados por hora por cistocarpo, durante 11 semanas, em plantas cistocárpicas de *G. domingensis* provenientes dos diferentes cruzamentos. Barras de erro, intervalo de confiança (0,95).

5.3.2. Tetrásporos

As linhagens tetrasporofíticas liberaram tetrásporos durante todo o período experimental (20 semanas). Essas plantas foram cultivadas por cerca de 10 meses após o término do experimento, e continuaram liberando esporos.

5.3.2.1. Número de tetrásporos liberados por hora

A análise de variância com medidas repetidas não detectou diferenças significativas entre o número de tetrásporos liberados pelas diferentes linhagens ($p = 0,849$) considerando-se uma mesma semana, mas houve algumas diferenças ao longo do tempo ($p = 0,000$) (figura 7). Na quarta semana, tetrásporos de todas as linhagens foram liberados em maior quantidade em relação a todas as demais semanas. Na 12ª semana a liberação foi maior que em todas as outras, com exceção

da quarta, sexta e sétima semanas. Na sexta semana a liberação foi maior que na 8ª, 10ª e 11ª semanas (figura 7).

Figura 7- Número de tetrásporos das diferentes linhagens de *G. domingensis* liberados por hora durante 20 semanas. Barras de erro, intervalo de confiança (0,95).

5.3.2.2. Número de tetrásporos liberados por hora por massa fresca

Não houve diferenças significativas no número de tetrásporos liberados entre as linhagens ($p = 0,514$), mas sim ao longo do tempo ($p = 0,000$). De maneira geral, todas as linhagens liberaram tetrásporos em maior quantidade até a sétima semana. Da oitava semana em diante, a liberação de tetrásporos foi semelhante e constante. Na 12ª semana, no entanto, a liberação foi semelhante à das seguintes semanas: 2ª, 3ª e 5ª -20ª. A maior liberação ocorreu na quarta semana, seguida da primeira semana (figura 8).

Figura 8- Número de tetrásporos liberados por hora por massa fresca nas diferentes linhagens tetrasporofíticas de *G. domingensis*, durante 20 semanas. Barras de erro, intervalo de confiança (0,95).

5.3.3. Carpósporos x Tetrásporos

A comparação entre o número de carpósporos e tetrásporos liberados por massa fresca, feita considerando-se apenas as quatro primeiras semanas após o início da liberação dos esporos, não mostrou diferenças estatísticas entre eles ($p = 0,228$) (figura 9).

Figura 9- Comparação entre o número de carpósporos e tetrásporos de *G. domingensis* liberados por hora por massa fresca ao longo de quatro semanas. Barras de erro, intervalo de confiança (0,95). Para carpósporos, a legenda corresponde efetivamente às linhagens apresentadas; entretanto, para tetrásporos, a legenda corresponde à linhagem que os originou.

5.4. Diâmetro de esporos

5.4.1. Carpósporos

Não houve diferenças significativas do diâmetro de carpósporos provenientes dos diferentes cruzamentos ($p = 0,40$), nem ao longo do tempo ($p = 0,07$) (Figura 10).

Figura 10- Diâmetro de carpósporos provenientes dos diferentes cruzamentos entre gametófitos femininos e masculinos das diferentes linhagens de *G. domingensis* ao longo de 11 semanas. Barras de erro, intervalo de confiança (0,95).

5.4.2 Tetrásporos

Não houve diferenças no diâmetro de tetrásporos entre as linhagens considerando-se uma mesma semana ($p = 0,22$). Ao longo do tempo, no entanto, algumas diferenças irregulares puderam ser observadas ($p = 0,00$). De maneira geral, a 16ª semana apresentou tetrásporos maiores que os observados nas demais semanas.

Tetrásporos t-VmVm apresentaram diâmetro maior na 16ª semana com relação à primeira.

Tetrásporos t-VmVd apresentaram também diâmetro maior na 16ª semana com relação às seguintes semanas: 2ª, 4ª, 5ª, 7ª, 8ª, 9ª, 11ª, 12ª, 17ª, 18ª, 19ª e 20ª. Outras diferenças foram também observadas no diâmetro de tetrásporos dessa

linhagem ao longo do tempo: na 5ª semana o diâmetro foi menor que na 13ª e 15ª; na 7ª semana o diâmetro foi menor que na 15ª; na 9ª semana o diâmetro foi menor que 13ª, 14ª e 15ª; na 12ª semana o diâmetro foi menor que na 15ª; na 15ª o diâmetro foi maior que na 17ª, 18ª, 19ª e 20ª, o mesmo ocorrendo para a 16ª semana.

A linhagem verde apresentou na 16ª semana tetrásporos maiores que os observados nas seguintes semanas: 4ª, 6ª, 7ª, 8ª, 10ª, 17ª, 18ª e 20ª. Tetrásporos t-VdVm na 16ª semana apresentaram-se maiores que os das seguintes semanas: 17ª, 18ª, 19ª e 20ª (figura 11).

Figura 11- Diâmetro de tetrásporos provenientes das diferentes linhagens de *G. domingensis* ao longo de 20 semanas. Barras de erro, intervalo de confiança (0,95).

4.4.3. Carpósporos x Tetrásporos

Carpósporos e tetrásporos apresentaram diâmetros estatisticamente semelhantes ($p=0,803$) nas 11 primeiras semanas de liberação (figura 12).

Figura 12- Comparação entre o diâmetro de carpósporos e tetrásporos das diferentes linhagens de *G. domingensis*. Médias relativas às 11 primeiras semanas. Barras de erro: intervalos de confiança (0,95). Para carpósporos, a legenda corresponde efetivamente às linhagens apresentadas; entretanto, para tetrásporos, a legenda corresponde à linhagem que os originou.

6. Discussão

Optou-se por avaliar o número de esporos liberados de *Gracilaria domingensis* sempre no mesmo período do dia (entre 4 e 7 horas após o início do fotoperíodo), para evitar possíveis influências de ritmos circadianos de liberação dos mesmos, uma vez que esses efeitos já foram descritos para algumas espécies (Oza & Krishnamurthy 1967; Ngan & Price 1983; Lefebvre *et al.* 1987; Rao & Kaliaperumal 1987; Pacheco-Ruiz *et al.* 1989; Bellgrove & Aoki 2006).

Tanto carpósporos quanto tetrásporos foram liberados por um período de tempo bastante longo (vários meses), bem maior que o comumente relatado na literatura para outras algas, como cerca de 10 dias para carpósporos e tetrásporos de *Gigartina canaliculata* (Pacheco-Ruiz *et al.* 1989), 14 dias para carpósporos de

Calithamnion cordatum (O' Kelly & Baca 1984), e um mês para carpósporos de *Gracilaria verrucosa* (Oza & Krishnamurthy 1967; Lefebvre *et al.* 1987). Esses dados são compatíveis ao que ocorre na natureza, já que plantas de *G. domingensis* são comumente encontradas férteis ao longo de todo ano, e a frequência de ramos inférteis é bastante baixa (Joventino & Bezerra 1980; Guimarães *et al.* 2003). A espécie apresenta, portanto, um grande esforço reprodutivo, que se traduz também nas baixas taxas de crescimento de plantas cistocárpicas e tetrasporofíticas férteis. Houve uma redução de até 82% nas TC entre o período de início de liberação de tetrásporos e a 11ª semana de análise, valor maior que os 55% de queda nas TC de plantas cistocárpicas da espécie comparadas a gametófitos femininos não férteis (Guimarães *et al.* 1999).

No presente trabalho, poucas diferenças foram encontradas entre as TC de plantas férteis das diferentes linhagens, e somente para tetrasporófitos. A maior homogeneidade verificada nas TC de plantas cistocárpicas pode ser devida ao fato de gametófitos, por serem haplóides, possuírem uma diversidade genética menor. Mesmo para tetrasporófitos, porém, diferenças entre as linhagens só puderam ser observadas na segunda semana após o início da liberação dos tetrásporos. Nessa semana, tetrasporófitos vermelhos apresentaram TC maiores que as obtidas para as duas linhagens de tetrasporófitos marrons, apesar de o número de tetrásporos liberados ter sido a mesma entre essas linhagens, sugerindo que os tetrasporófitos vermelhos produzem tetrásporos a um custo menor que o das demais linhagens. Esse fato refuta a hipótese de que o heterozigoto tenha um maior vigor, pelo menos com relação ao investimento reprodutivo das plantas adultas. Da mesma maneira, nessa mesma semana (2ª), tetrasporófitos verdes obtiveram maiores TC que as de

tetrasporófitos marrons VdVm. As duas linhagens de tetrasporófitos marrons apresentaram TC semelhantes, bem como números de tetrásporos liberados em quantidades semelhantes, sugerindo que o investimento reprodutivo, pelo menos considerando-se esses fatores, não depende da cor da planta feminina que deu origem a esses tetrasporófitos. Entretanto, em algumas condições, o crescimento das duas linhagens marrons pode ser diferente, conforme apresentado no Capítulo 3. Além disso, deve-se ressaltar que essas vantagens observadas para os morfos vermelho e verde com relação a pelo menos uma linhagem de tetrasporófito marrom desapareceram a partir da terceira semana após o início da liberação de tetrásporos, indicando que elas não conseguem manter a produção de esporos sem um alto custo somático associado, a longo prazo.

O tempo necessário para que os espermácios fecundem os carpogônios de algas vermelhas varia muito de acordo com a espécie, tendo sido encontrados valores entre 20 minutos e 10 horas (O'Kelly & Baça 1984; Plastino 1985; Destombe *et al.* 1990). No presente trabalho, gametófitos masculinos férteis ficaram em contato com os femininos durante 30 min, e esse foi um período de tempo suficiente para que ocorresse a fecundação e o conseqüente desenvolvimento de cistocarpos. As taxas de fecundação avaliadas considerando-se os diferentes cruzamentos foram semelhantes, indicando que não existem deficiências na produção de espermácios e carpogônios e nem na subsequente fertilização do gameta feminino nas diferentes linhagens. Um trabalho anterior (L.B. Ferreira & E.M. Plastino, dados não publicados) mostrou que cistocarpos provenientes desses mesmos quatro cruzamentos possuem dimensões semelhantes, não havendo, portanto, nenhum indício de que haja diferenças nos processos de desenvolvimento

dos cistocarpos nos diferentes morfos de *G. domingensis*. Entretanto, como na natureza existem mais gametófitos vermelhos do que verdes, tanto femininos como masculinos (Guimarães *et al.* 2003), em números absolutos, o número de cistocarpos formados da linhagem vermelha deve ser maior, o que predisporia a uma maior abundância de tetrasporófitos vermelhos com relação aos demais, caso a sobrevivência entre as linhagens de carpósporos fossem semelhantes. Dados obtidos na natureza mostram maior quantidade de tetrasporófitos vermelhos com relação aos demais (Guimarães *et al.* 2003).

Além do sucesso na fecundação e na produção de cistocarpos, um outro fator que poderia afetar a capacidade reprodutiva de *Gracilaria domingensis* é o número de esporos liberados. Os diferentes índices calculados para estimar o número de esporos liberados por *G. domingensis* neste trabalho produziram resultados muito semelhantes. Plantas cistocárpicas derivadas do cruzamento Fvm x Mvd e Fvd x Mvd liberaram mais esporos que as demais, ao menos na primeira semana de liberação. Uma maior quantidade desses esporos na água do mar favoreceria a manutenção do alelo verde na natureza, e também a de um dos morfos marrons. Todas as outras linhagens gametofíticas e tetrasporofíticas, no entanto, liberaram quantidades semelhantes de esporos considerando-se uma mesma semana, o que indica que as diferenças entre as linhagens são sutis e pontuais. Considerando-se o período em que as três repetições permaneceram liberando esporos, no entanto, plantas cistocárpicas vermelhas liberaram carpósporos por um período maior de tempo (15-16 semanas) do que as plantas cistocárpicas verdes (11-12 semanas), independentemente da cor do gametófito masculino com quem os cruzamentos foram realizados. O período de liberação de plantas vermelhas foi sutilmente maior

quando elas foram fertilizadas por gametófitos vermelhos (Fvm x Mvm; 16 semanas) do que quando fertilizadas por gametófitos verdes (Fvm x Mvd; 15 semanas). Da mesma maneira, plantas cistocárpicas verdes liberaram carpósporos por mais tempo quando foram fertilizadas por gametófitos masculinos vermelhos (Fvd x Mvm; 12 semanas), quando comparadas às plantas verdes que foram fertilizadas por gametófitos masculinos verdes (Fvd x Mvd, 11 semanas).

Considerando-se o tempo em que pelo menos uma repetição permaneceu liberando esporos, tem-se que plantas cistocárpicas vermelhas fertilizadas por masculinas vermelhas (Fvm x Mvm) e plantas cistocárpicas verdes derivadas do cruzamento com masculinas vermelhas (Fvd x Mvm) foram as que liberaram carpósporos por mais tempo: 22 semanas. As plantas cistocárpicas vermelhas derivadas do cruzamento com masculinas verdes (Fvm x Mvd) liberaram carpósporos durante 18 semanas, e as plantas cistocárpicas verdes derivadas do cruzamento com masculinas verdes (Fvd x Mvd), durante 15 semanas. Esse maior vigor das plantas vermelhas pode estar relacionado a uma maior quantidade de substâncias de reserva. Um trabalho anterior com a espécie mostrou que a produção de amido das florídeas é maior em gametófitos femininos vermelhos quando comparados aos verdes (Guimarães *et al.* 2007). É possível que o alelo que confere a cor vermelha às plantas esteja relacionado não somente à produção de ficoeritrina, mas a diversos outros processos fisiológicos das plantas. Os resultados obtidos corroboram a hipótese de que o morfo vermelho tenha uma maior capacidade reprodutiva que a do morfo verde, e poderiam ser de grande importância no recrutamento de tetrasporófitos (presentes em maior número na natureza) uma vez que possibilitaria uma maior quantidade total de carpósporos da linhagem vermelha colonizando um

determinado substrato. Deve-se considerar, porém, que o recrutamento não depende somente do número de esporos disponíveis, mas de muitos outros fatores, como a viabilidade dos mesmos e a sobrevivência de fases juvenis, aspectos estes abordados no Capítulo 3 desta Tese.

Um dos mecanismos propostos para explicar a manutenção de um polimorfismo na natureza é o vigor do heterozigoto quando comparado a cada um dos homozigotos (Begon *et al.* 1996). Considerando-se a produção de tetrásporos como um dos fatores relacionados a um possível vigor do morfo marrom, verificou-se que tetrasporófitos marrons não liberaram tetrásporos em maior quantidade, tampouco por um período maior que tetrasporófitos verdes e vermelhos, evidenciando, novamente, que não há heterose. No entanto, carpósporos derivados do cruzamento Fvm x Mvd, e, portanto, que originam tetrasporófitos marrons VmVd, foram liberados em maior quantidade na primeira semana de liberação, o que favoreceria o estabelecimento da linhagem marrom VmVd e, portanto, a manutenção do alelo verde na natureza.

Alguns estudos mostram que o número de esporos liberados por plantas cistocárpicas ou tetrasporofíticas tende a ser maior no início do período de liberação, e a diminuir ao longo do tempo (Pacheco-Ruiz *et al.* 1989). Com exceção de algumas diferenças pontuais, carpósporos de *G. domingensis* foram liberados em quantidades semelhantes ao longo das semanas. O término da sua liberação não foi gradual, e sim abrupto.

Quando o número de tetrásporos liberados foi expresso por meio da massa fresca dos tetrasporófitos, observou-se que eles foram liberados em maior quantidade até a sétima semana. Após esse período, apesar de não ter cessado, a

liberação diminuiu. Não podemos, contudo, afirmar que a produção bruta de esporos tenha diminuído, já que, quando esse parâmetro foi expresso sem levar em conta a massa fresca das plantas tetrasporófitas, o número de tetrásporos liberados foi praticamente o mesmo ao longo das semanas. Conforme os tetrasporófitos crescem, novas áreas férteis se formam no talo, em um processo que pode se estender por longos períodos. Como o crescimento não cessou, o número de tetrásporos liberados expresso pela biomassa das plantas diminuiu. O processo de diferenciação contínua de tetrasporângios deve também acontecer na natureza, já que plantas inférteis da espécie são raramente encontradas (Guimarães *et al.* 2003).

Não são muitos os trabalhos na literatura que comparam o número de carpósporos e tetrásporos liberados pela mesma espécie. No presente trabalho, carpósporos e tetrásporos foram liberados em quantidades semelhantes, quando expressos em termos de massa fresca das plantas. O mesmo foi observado para *Gigartina canaliculata* (Pacheco-Ruiz *et al.* 1989). Em outros, porém, carpósporos são liberados em maior quantidade do que tetrásporos, como em *Chondracanthus chamissoi* (Gonzalez & Meneses 1996). Como existem mais tetrasporófitos do que gametófitos de *Gracilaria domingensis* na natureza (Pinheiro-Joventino & Bezerra 1980; Guimarães *et al.* 2003), seria esperado que carpósporos fossem liberados em maior quantidade com relação a tetrásporos, especialmente se considerarmos que as taxas de sobrevivência dos primeiros são bem menores (Capítulo 3). Esses dados indicam que o recrutamento depende da interação entre muitos fatores, e não pode ser analisado considerando-se apenas parte deles.

O diâmetro médio dos esporos de *G. domingensis* mensurados neste trabalho (22,35 μM) está dentro da faixa relatada para outras espécies de *Gracilaria* na

literatura (Boney 1978; Ngan & Price 1979; Okuda & Neushul 1981; Plastino 1985; Orduña-Rojas & Robledo 1999). O diâmetro dos carpósporos das diferentes linhagens permaneceu constante ao longo do tempo. O mesmo não ocorreu para tetrásporos, que tiveram um aumento significativo no diâmetro na 16ª semana de liberação. Esse aumento, no entanto, foi pontual.

Como carpósporos têm o dobro da ploidia de tetrásporos, espera-se que os primeiros sejam maiores que os segundos, considerando-se uma mesma espécie. A maior parte dos trabalhos que comparam o diâmetro de carpósporos e tetrásporos de uma mesma espécie apontam para o tamanho maior dos primeiros (Mshigeni 1976; Mshigeni & Lorri 1977; Ngan & Price 1979; Okuda & Neushul 1981; Plastino 1985). No entanto, carpósporos e tetrásporos de *Gracilaria domingensis* apresentaram dimensões estatisticamente semelhantes. Carpósporos e tetrásporos com tamanhos semelhantes já foram observados em outras espécies de Rhodophyta (Ngan & Price 1979).

Poucas diferenças foram encontradas na capacidade reprodutiva entre as linhagens. Nossa hipótese de que o morfo vermelho possuiria uma maior capacidade reprodutiva com relação ao morfo verde foi parcialmente confirmada pelo maior período de liberação de carpósporos provenientes de plantas da linhagem vermelha. A hipótese de que haveria heterose nos tetrasporófitos marrons, no entanto, foi refutada, pois a sua capacidade reprodutiva, quando analisada com relação às taxas de crescimento de plantas férteis e ao diâmetro de tetrásporos produzidos, não foi maior se comparada à capacidade reprodutiva dos morfos verde e vermelho. Entretanto, se considerarmos as fases carposporofíticas, podemos afirmar que há heterose, já que carpósporos c-VmVd, ou seja, resultantes de

carposporófitos provenientes do cruzamento Fvm x Mvd foram liberados em maior quantidade, se comparados a c-VmVm e c-VdVm. Os resultados obtidos no presente capítulo mostram que a avaliação da capacidade reprodutiva de uma espécie não é simples, e necessita da análise de múltiplos fatores que atuam em sinergismo.

7. Referências

- BEGON, M.; HARPER, J.L. & TOWNSEND, C.R. 1996. *Ecology. Individuals, populations and communities*. 3ª edição. Blackwell Science, Oxford.
- BELGROVE, A. & AOKI, M. 2006. Small-scale temporal variation in propagule supply of an intertidal red alga. *Phycologia* 45: 458-464.
- BOUZON, Z.L.; OURIQUES, L.C. & OLIVEIRA, E.C. 2006. Spore adhesion and cell wall formation in *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Gelidiales). *Journal of Applied Phycology* 18: 287-294.
- BRAWLEY, S. & JOHNSON, L.E. 1992. Gametogenesis, gametes and zygotes: an ecological perspective on sexual reproduction in algae. *British Phycological Journal* 27: 233-252.
- BUSCHMANN, A. & SANTELICES, B. 1987. Micrograzers and spore release in *Iridea laminarioides* Bory (Rhodophyta: Gigartinales). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 108: 171-179.
- CLAYTON, M.N. 1992. Propagules of marine macroalgae: structure and development. *British Phycological Journal* 27: 219-232.
- DE WREEDE, R.E. & KLINGER, T. 1988. Reproductive strategies in algae. In Plant reproductive ecology- patterns and strategies. J.L. Doust & L.L. Doust, eds. Oxford University Press, New York. p. 267-284.
- DESTOMBE, C.; GODIN, J. & REMY, J.M. 1990. Viability and dissemination of spermatia of *Gracilaria verrucosa* (Gracilariales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 204/205: 219-223.
- FLETCHER, R.L. & CALLOW, M.E. 1992. The settlement, attachment and establishment of marine algal spores. *British Phycological Journal* 27: 303-329.

- FRIEDLANDER, M. & DAWES, C.J. 1984. Studies on spore release and sporeling growth from carpospores of *Gracilaria foliifera* (Forksall) Borgesen var. *angustissima* (Harvey) Taylor. I. Growth responses. *Aquatic Botany* 19: 221-232.
- FUTUYMA, D.J. 1998. Evolutionary Biology, 3a. edição. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- GARZA-SÁNCHEZ, F.; ZERTRUCHE-GONZÁLEZ, J.A. & CHAPMAN, D.J. 2000. Effect of temperature and irradiance on the release, attachment and survival of spores of *Gracilaria pacifica* Abbott (Rhodophyta). *Botanica Marina* 43: 205-212.
- GAYLORD, B.; REED, D.C.; RAIMONDI, P.T.; WASHBURN, L. & MCLEAN, S.R. 2002. A physically based model of macroalgal spore dispersal in the wave and current-dominated nearshore. *Ecology* 83: 1239-1251.
- GONZALEZ, J. & MENESES, I. 1996. Differences in the early stages of development of gametophytes and tetrasporophytes of *Chondracanthus chamissoi* (C.Ag.) Kützting from Puerto Aldea, northern Chile. *Aquaculture* 143: 91-107.
- GUIMARÃES, M. 1995. Morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta): frequência populacional, análise pigmentar e aspectos ultraestruturais. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 96 pp.
- GUIMARÃES, M.; PLASTINO, E.M. & DESTOMBE, C. 2003. Green mutant frequency in natural populations of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. *Eur. J. Phycol.* 38: 165-169.
- GUIMARÃES, M.; VIANA, A.G.; DUARTE, M.E.R.; ASCÊNCIO, S.D.; PLASTINO, E.M. & NOSEDA, M. 2007. Low-molecular-mass carbohydrates and soluble polysaccharides of Green da red morphs of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *Botanica Marina* 50: 314-317.
- GUZMÁN-URIÓSTEGUI, A.G.; GARCÍA-JIMÉNEZ, P.; MARIÁN, F.; ROBLEDO, D. & ROBAINA, R. 2002. Polyamines influence maturation in reproductive structures of *Gracilaria córnea* (Gracilariales, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 38: 1169-1175.
- ICHIKI, S.; MIZUTA, H.; YASUI, H. & YAMAMOTO, H. 2000. Occurrence of polynucleate spores of the crustose coralline alga *Lithophyllum yessoense* (Corallinales, Rhodophyceae): growth and survival. *Phycologia* 39: 408-415.

- JOVENTINO, F.P. & BEZERRA, C.L.F. 1980. Estudo de fenologia e regeneração de *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta- Gracilariaceae) no estado do Ceará. *Arq. Ciênc. Mar.* 20: 33-41.
- KAIN, J.M. 1982. The reproductive phenology of nine species of Rhodophyta in the subtidal region of the Isle of Man. *British Phycological Journal* 17: 321-331.
- LEFEBVRE, C.A.; DESTOMBE, C. & GODIN, J. 1987. Le fonctionnement du carposporophyte de *Gracilaria verrucosa* et ses répercussions sur la stratégie de reproduction. *Cryptogamie Algologie* 8: 113-126.
- LÜNING, K. 1981. Egg release in gametophytes of *Laminaria saccharina*: induction by darkness and inhibition by blue light and U.V. *British Phycological Journal* 16: 379-393.
- MSHIGENI, K.E. 1976. Studies on the reproduction of selected species of *Hypnea* (Rhodophyta, Gigartinales) from Hawaii. *Botanica Marina* 19: 341-346.
- NGAN, Y. & PRICE, I.R. 1979. Systematic significance of spore size in the Florideophyceae (Rhodophyta). *British Phycological Journal* 14:285-303.
- NGAN, Y. & PRICE, I.R. 1983. Periodicity of spore discharge in tropical Florideophyceae (Rhodophyta). *British Phycological Journal* 18: 83-95.
- O'KELLY, C. & BACA, B.J. 1984. The time course of carpogonial branch and carposporophyte development in *Callithamnion cordatum* (Rhodophyta, Ceramiales). *Phycologia* 23: 407-417.
- OKUDA, T. & NEUSHUL, M. 1981. Sedimentation studies of red algal spores. *Journal of Phycology* 17: 113-118.
- ORDUÑA-ROJAS, J. & ROBLEDO, D. 1999. Effects of irradiance and temperature on the release and growth of carpospores from *Gracilaria cornea* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta). *Botanica Marina* 42: 315-319.
- OZA, R.M. & KRISHNAMURTHY, V. 1967. Studies on carposporic rithm of *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. *Botanica Marina* 11: 118-121.
- PACHECO-RUIZ, I.; GARCÍA-ESQUIVEL, Z. & ANGUIAR-ROSAS, L.E. 1989. Spore discharge in the carragenophyte *Gigartina canaliculata* Harvey (Rhodophyta, Gigartinales). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 126: 293-299.

- PLASTINO, E.M. 1985. As espécies de *Gracilaria* (Rhodophyta, Gigartinales) da Praia Dura, Ubatuba, SP. – aspectos biológicos e fenologia. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- RUENESS, J. & FREDRIKSEN, S. 1998. Intraspecific reproductive variation in *Gelidium pusillum* (Stackh.) Le Jol. (Gelidiales, Rhodophyta) from Europe. *Journal of Applied Phycology* 10: 253-260.
- SACRAMENTO, A.T.; GARCÍA-JIMÉNES, P.; ALCÁZAR, R.; TIBURCIO, A.F. & ROBAINA, R.R. 2004. Influence of polyamines on the sporulation of *Grateloupia* (Halymeniaceae, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 40: 887-894.
- SANTELICES, B. 1990. Patterns of reproduction, dispersal and recruitment in seaweeds. *Oceanography and Marine Biology Annual Review* 28: 177-276.
- RAO, M.U. & KALIAPERUMAL, N. 1987. Diurnal periodicity of spore-shedding in some red algae of Visakhapatnam coast. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 106: 193-199.
- WEINBERGER, F.; BELTRAN, J.; CORREA, J.; LION, U.; POHNERT, G.; KUMAR, N.; STEIMBERG, P. KLOAREG, B. & POTIN, P. 2007. Spore release in *Acrochaetium* sp. (Rhodophyta) is bacterially controlled. *Journal of Phycology* 43: 235-241.

**Capítulo 3- Efeitos da disponibilidade de nitrato em
morfo pigmentares de *Gracilaria domingensis*
(Gracilariales, Rhodophyta): sobrevivência de esporos,
crescimento de plântulas, proteínas solúveis totais e
atividade da enzima nitrato redutase**

Trabalho realizado em colaboração com a

Dra. Fungyi Chow, IB, USP

1. Abstract

This work evaluated the effects of nitrogen availability on pigment morphs of gametophytes (red and green) and tetrasporophytes (red, green and brown) of *Gracilaria domingensis* by: i, survival of spores; ii, growth rates of plantlets; and iii, total soluble protein contents and activity of the enzyme nitrate reductase (NR) of juvenile plants. Different concentration of nitrate (66 μM ; 127 μM ; 252 μM ; e 502 μM) were add to the seawater enriched with a original 25% von Stosch solution (VS) without nitrate. Green gametophytes showed the highest total soluble protein content when compared to red gametophytes at 66 μM , which represents an important adaptation to oligotrophic environments and could help to explain the maintenance of the green allele in nature. NR activity were higher in red gametophytes when compared to the green ones. In at least one of the nitrate concentration tested, all of the physiological parameters tested were different to one of the two brown strains when compared to each other. This result demonstrated the parental effect at the plants physiology. The hybrid vigor was not clearly observed. However, the similar or, in some cases, better performance of the brown strains when compared to the other ones contributes to the maintenance of green allele in nature.

2. Resumo

Este trabalho avaliou os efeitos da disponibilidade de nitrato em morfos pigmentares gametofíticos (verde e vermelho) e tetrasporofíticos (verde, vermelho e marrons) de *Gracilaria domingensis* considerando-se: i, a sobrevivência de esporos; ii, o crescimento de plântulas; e iii, o conteúdo de proteínas solúveis totais e a atividade da enzima nitrato redutase (NR) em plantas jovens. À água do mar acrescida da solução de enriquecimento de von Stosch (VS) diluída a 25% e sem nitrato foram adicionadas diferentes concentrações desse nutriente: 66 μM ; 127 μM ; 252 μM ; e 502 μM . Gametófitos verdes apresentaram um maior teor de proteínas solúveis totais quando comparados a gametófitos vermelhos em 66 μM , o que representa uma importante adaptação a ambientes oligotróficos e pode contribuir para a manutenção do alelo verde. Já a atividade da NR foi maior em gametófitos vermelhos quando comparada a gametófitos verdes. Em pelo menos uma das concentrações de nitrato testadas o desempenho de uma das linhagens marrons foi diferente quando comparadas uma com a outra para todos os parâmetros fisiológicos avaliados, demonstrando haver um efeito parental na fisiologia das plantas, mesmo que aparentemente não seja possível distinguir essas linhagens a olho nu. Não foi observado claramente um vigor híbrido, porém o desempenho semelhante, ou, em alguns casos, superior das linhagens marrons quando comparadas às plantas verdes e às vermelhas também contribuiria para a manutenção do alelo verde na natureza.

3. Introdução

Um dos processos fundamentais no histórico de vida de uma alga marinha bentônica é a colonização de um novo substrato, alcançada, na maioria das vezes, pela formação de propágulos (Fletcher & Callow 1992), que, no caso de *Gracilaria*, são representados, principalmente, pelos seus esporos. O processo de disseminação de propágulos inclui diferentes etapas: maturação, liberação, dispersão, contato inicial com o substrato, fixação e germinação. A sobrevivência das fases iniciais de vida de um organismo marinho logo após a fixação é fundamental para o estabelecimento de populações bentônicas (Vadas *et al.* 1992).

Vários fatores ambientais são considerados críticos à liberação e ao desenvolvimento de esporos de algas marinhas. Dentre eles, destaca-se a luz, por ter um papel importante na indução da reprodução (Brawley & Johnson 1992), na liberação e na germinação de esporos (Friedlander & Dawes 1984; Gonzalez & Meneses 1996; Orduña-Rojas & Robledo 1999; Garza-Sánchez *et al.* 2000). Poucos são os trabalhos, no entanto, que abordam as necessidades nutricionais de propágulos de macroalgas (Friedlander & Dawes 1984; Amsler & Neushul 1990; Amsler *et al.* 1999), sendo esse tema mais escasso ainda quando se trata de esporos de *Gracilaria*. Os processos de maturação de estruturas reprodutivas e produção de esporos podem ser estimulados tanto por um enriquecimento da água com nutrientes (Hsiao & Druehl 1973; Bird *et al.* 1977), como por falta deles (Oza 1977; Hoffman 1987; Brawley & Johnson 1992).

Muito tem sido discutido na literatura sobre qual seria o principal nutriente limitante no ambiente marinho. Apesar das controvérsias, vários estudos apontam para o nitrogênio (Ryther & Dunstan 1971; Bird *et al.* 1982; Tyrrell 1999), situação

acentuada principalmente em águas de regiões tropicais, em que a concentração desse nutriente costuma ser baixa (Lewis 1985). O nitrato é a principal forma de nitrogênio inorgânico solúvel existente no ambiente marinho (Chapman & Harrison 1988). Ao ser captado, ele pode ser estocado nos vacúolos ou reduzido a nitrito pela enzima citoplasmática nitrato redutase (NR). O nitrito é transportado ao cloroplasto, onde é reduzido a amônio pela enzima nitrito redutase. O amônio é então incorporado ao glutamato (esqueleto carbônico imediato) pela ação da enzima glutamina sintetase (Crawford 1995). A NR, sendo a primeira enzima dessa via metabólica regula a taxa de assimilação de nitrato (De la Rosa *et al.* 1989; Solomonson & Barber 1990). A expressão e a atividade dessa enzima são reguladas por diversos fatores, como a luz, concentração de compostos nitrogenados, metabólitos de carbono, ritmo circadiano, entre outros, e é considerada como fator limitante para o crescimento, desenvolvimento e produção de proteínas em organismos fotossintetizantes (Solomonson & Barber 1990; Lopes *et al.* 1997; Rossa 1999; Chow 2002; Chow *et al.* 2004; Granbom *et al.* 2004). Muitos fatores podem influenciar nas taxas de captação e assimilação do nitrato em algas, como seu histórico nutricional (Thomas *et al.* 1987; Smit 2002), porção do talo mensurada (Davison & Stewart 1984; Hurd *et al.* 1995; Granbom *et al.* 2004; Granbom *et al.* 2007), procedência das populações (Vennesland & Solomonson 1972), ritmo circadiano (Ramalho *et al.* 1995; Lopes *et al.* 1997; Granbom *et al.* 2004; Chow *et al.* 2007; Granbom *et al.* 2007), entre outros. Trabalhos que abordem comparações entre linhagens não são comuns na literatura (Vennesland & Solomonson 1972). Nesse contexto, estudos com diferentes morfos pigmentares de uma mesma espécie podem fornecer importantes resultados para o entendimento de adaptações

fisiológicas frente a fatores abióticos e bióticos. Nas algas, essas espécies representam um modelo biológico valioso a ser explorado em estudos fisiológicos, bioquímicos, de metabolismo e de expressão gênica (Ursi *et al.* 2003).

Os diferentes morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* já haviam sido estudados quanto a alguns aspectos referentes à sua capacidade somática, como fotossíntese, crescimento e produção de polissacarídeos de parede em gametófitos verdes e vermelhos adultos (Guimarães 2000). Não se conhecia, até o presente, o efeito de diferentes concentrações de nitrato na sobrevivência de esporos, crescimento de plântulas gametofíticas e tetrasporofíticas ou atividade da enzima NR nos diferentes morfos (verde, vermelho e marrom) da espécie.

Tendo em vista o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar, em gametófitos e tetrasporófitos de morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* de coloração verde, vermelha e marrom, os efeitos da disponibilidade de nitrato considerando-se: i, a sobrevivência de carpósporos e tetrásporos; ii, o crescimento de plântulas; e iii, o conteúdo de proteínas solúveis totais e a atividade da NR em gametófitos e tetrasporófitos jovens; e v, a atividade específica dessa enzima. A hipótese era a de que diferentes concentrações de nitrato na água do mar ocasionariam respostas diferenciadas dos genótipos com relação a esse nutriente, o que poderia justificar em parte a manutenção do polimorfismo pigmentar da espécie na natureza.

4. Material e Métodos

4.1. Teste preliminar: escolha da irradiância para o experimento de sobrevivência de esporos

Plantas cistocárpicas provenientes dos quatro cruzamentos (Fvm X Mvm,

Fvm X Mvd, Fvd X Mvd e Fvd X Mvm) e tetrasporofíticas férteis das quatro linhagens, vermelha (VmVm), verde (VdVd) e marrons (VmVd e VdVm) foram transferidas para placas de Petri, visando à liberação de carpósporos e tetrásporos, respectivamente. Um total de 1000 esporos recém liberados foi transferido para cristalizadores contendo 200 ml de água do mar enriquecida por meio de pipetas Pasteur, encostando-se a extremidade da pipeta à superfície interna inferior dos mesmos. Três repetições por linhagem foram mantidas para cada tratamento. Carpósporos (c-VmVm, c-VmVd, c-VdVd e c-VdVm) e tetrásporos (t-VmVm, t-VmVd, t-VdVd e t-VdVm) foram submetidos a três irradiâncias distintas: 5, 40 e 180 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. O número de plântulas sobreviventes foi contado após três semanas. Além dessas irradiâncias, foi também testada a sobrevivência de esporos no escuro. Nesse experimento, esporos recém-coletados foram imediatamente colocados em câmaras do tipo B.O.D., completamente vedadas e na ausência de luz. A sobrevivência, nesse experimento, foi avaliada no terceiro e sétimo dias após a coleta.

A sobrevivência de esporos foi considerada como a porcentagem de plântulas vivas em relação ao número inicial de esporos transferidos. Os dados foram submetidos à transformação do arco-seno (Zar 1999) para permitir análises de variância em porcentagens:

$$(\arcsen\sqrt{x/(n+1)} + \arcsen\sqrt{(x+1)/(n+1)})/2; \quad \text{onde: } x =$$

sobrevivência de esporos (%) e n= quantidade de esporos coletados. A porcentagem de plântulas vivas em relação ao número inicial de esporos transferidos (1000) foi considerada como a medida de sobrevivência.

4.2. Concentrações de nitrato empregadas nos experimentos

Foi preparada uma solução de enriquecimento de Von Stosch (VS) sem nitrato na concentração de 25% (VS-N 25%). A essa solução foram acrescentadas concentrações variáveis desse nutriente: i, zero; ii, 62,5 μM ; iii, 125 μM ; iv, 250 μM ; e v, 500 μM . Esses tratamentos foram utilizados nos experimentos de sobrevivência de esporos, crescimento de plântulas, e atividade da NR, descritos nos itens seguintes. A irradiância utilizada foi de 180 μmol fótons. m^{-2} . s^{-1} , estabelecida a partir do teste preliminar descrito no item 4.2.

A concentração final de nitrato no meio de cultura dependeu da concentração de nitrato presente na água do mar utilizada nos experimentos. O experimento de crescimento de plântulas foi feito com um lote de água mar, e o de sobrevivência de esporos e atividade da NR, com outro lote. Esses lotes de água do mar foram coletados em São Sebastião em abril e maio de 2006. Ambos foram submetidos a análises de concentração de alguns nutrientes no Laboratório de Nutrientes, Micronutrientes e Traços no mar (LABNUT), Instituto Oceanográfico, USP, sob supervisão da Dra. Elisabete Braga (tabela 1). Como a concentração de nitrato nos dois lotes utilizados foi muito semelhante, consideramos, para fins práticos, como sendo a mesma em todos os experimentos (considerou-se a média das três amostras analisadas: 2,2 μM). Dessa forma, as concentrações finais de nitrato na água do mar utilizada nos experimentos foram as seguintes: 2,2 μM ; 65 μM ; 127 μM ; 252 μM e 502 μM .

Tabela 1- Concentração de nutrientes (μM) presentes nos lotes de água do mar utilizados nos experimentos descritos neste capítulo. 1 A e 1 B: duas amostras diferentes referentes ao mesmo lote. Análises realizadas no Laboratório de Nutrientes, Micronutrientes e Traços no Mar, IO, USP. NTD, nitrogênio total dissolvido; PTD, fosfato total dissolvido.

Lote	Nitrato	Nitrito	Fosfato	NTD	PTD
1 A	2,73	0,09	0,27	5,8	0,07
1B	2,14	0,11	0,36	6,2	0,00
2	1,77	0,03	0,34	5,73	0,08

4.3. Sobrevivência de esporos e crescimento de plântulas em diferentes concentrações de nitrato

4.3.1. Material biológico

Os esporos e plântulas dos diferentes morfos pigmentares de *G. domingensis* utilizados nesse trabalho foram obtidos conforme explicado no Capítulo 1. Foram utilizadas quatro linhagens de carpósporos (c-VmVm, c-VmVd, c-VdVd e c-VdVm) e tetrásporos derivados de quatro tetrasporófitos distintos (t-VmVm, t-VmVd, t-VdVd e t-VdVm), bem como plântulas gametofíticas e tetrasporofíticas obtidas a partir da germinação desses esporos. As condições gerais de cultivo das plântulas foram as estabelecidas no Capítulo 1. Condições diferentes daquelas foram explicitadas ao longo do texto.

4.3.2. Sobrevivência de esporos

Utilizou-se a mesma metodologia descrita no item 4.1 para avaliar a sobrevivência de carpósporos (c-VmVm, c-VmVd, c-VdVd e c-VdVm) e tetrásporos (t-VmVm, t-VmVd, t-VdVd e t-VdVm) nas diferentes concentrações de nitrato descritas no item 4.2. Seis repetições por linhagem de carpósporo e três por linhagem de tetrásporo foram mantidas para cada tratamento.

4.3.3. Crescimento de plântulas

Carpósporos (c-VmVm, c-VmVd, c-VdVd e c-VdVm) e tetrásporos (t-VmVm, t-VmVd, t-VdVd e t-VdVm) foram coletados por meio de pipetas Pasteur e transferidos para lâminas comuns para microscopia, inseridas em recipientes de plástico descartáveis contendo 200 ml de água do mar enriquecida com as diferentes concentrações de nitrato descritas no item 4.3. Duas lâminas foram inseridas em cada recipiente. Seis repetições (frascos) para linhagens de plântulas tetrasporofíticas e três para linhagem de plântulas gametofíticas foram mantidas para cada tratamento. O número de esporos transferidos para cada lâmina não foi contado. O crescimento foi avaliado até o quinto dia após a coleta dos esporos, uma vez que observações preliminares (dados não apresentados) haviam mostrado que a partir dessa data inicia-se a diferenciação do ramo ereto, o que tornaria inadequada a avaliação do crescimento por meio do diâmetro dos discos de fixação. Portanto, a medida inicial foi obtida a partir dos valores de diâmetro de carpósporos e tetrásporos recém-liberados e a final, no quinto dia após a coleta dos esporos. Nessa data, as lâminas foram observadas ao microscópio óptico, onde o diâmetro do disco de fixação de 10 plântulas fixas (sub-repetições) observadas ao acaso foi avaliado. O valor do diâmetro desse disco de cada repetição foi considerado como uma média dessas 10 sub-repetições, perfazendo três médias para cada tratamento considerado (três repetições). Taxas de crescimento (TC) foram calculadas segundo Orduña-Rojas & Robledo (1999): $TC = \ln (D_2/D_1) \times t^{-1}$, onde D_2 = diâmetro final (no 5º dia); D_1 = diâmetro inicial (esporos recém-liberados); t = tempo em dias, sendo os valores das taxas expressos em $\% \cdot \text{dia}^{-1}$.

4.4. Proteínas solúveis totais e atividade da enzima NR

4.4.1. Cultivo e preparação do material biológico

Um total de 20 plântulas gametofíticas verdes e vermelhas e tetrasporofíticas verdes (VdVd), vermelhas (VmVm) e marrons (VmVd e VdVm) provenientes do experimento de sobrevivência de esporos (item 4.3.2) foram transferidas, após o término do mesmo (ou seja, quando as plântulas tinham três semanas de idade), para frascos Erlenmeyer contendo 400 ml de água do mar enriquecida com as mesmas concentrações de nitrato a que elas estavam sendo submetidas, excetuando-se o tratamento sem acréscimo de nitrato, já que nesta condição o crescimento de plântulas foi mínimo e não permitiu obtenção de massa fresca suficiente, apesar de terem desenvolvido ramos eretos. A água do mar enriquecida foi trocada semanalmente. Quando essas plântulas completaram sete semanas de idade, todas já estavam férteis. Ápices de 1,5 – 2,0 cm, não portando estruturas de reprodução, foram selecionados, cortados e pesados em balança analítica, até que fossem obtidas aproximadamente 70 mg de massa fresca por repetição (8-13 ápices por amostra). A maior parte dos ápices continha ramificações. Os ápices foram mantidos em novo meio de cultivo, com as respectivas concentrações de nitrato, por 24 h previamente ao congelamento em nitrogênio líquido e foram armazenadas em freezer a -80 °C até a realização dos ensaios enzimáticos da NR. As algas foram sempre congeladas entre 4-6 h após o início do fotoperíodo nas câmaras de cultivo.

4.4.2. Extração celular

As amostras foram trituradas em nitrogênio líquido em almofariz previamente gelado até a obtenção de um pó fino. O material foi suspenso em um tampão de extração (0,2 M tampão fosfato, pH 8,0; 5 mM EDTA; 1 mM DTT; e

BSA 0,3% p/v) na proporção de 1 g de massa fresca por 5 mL de tampão. Os restos celulares foram removidos por meio de centrifugação a 12.000 g por 15 min a 4°C. O sobrenadante (extrato bruto) foi recolhido e mantido no gelo e no escuro para o posterior ensaio da atividade da NR. A quantificação do teor de proteína solúvel total foi realizada com extrato bruto sem adição de BSA.

4.4.3. Ensaio *in vitro* da enzima NR

A atividade da enzima NR foi determinada pré-incubando 50 µl de extrato bruto no tampão de reação (0,2 M tampão fosfato, pH 8,0; 4 mM KNO₃; e 0,5 mM MgSO₄) a 25°C por 10 min. A mistura foi incubada por 5 min adicionais logo após a adição de 0,04 mM NADH para iniciar a reação. Um controle foi feito paralelamente sem a adição de NADH. A reação foi interrompida adicionando 1,4 mM ZnSO₄ e etanol 95% v/v. Substâncias precipitadas pela adição de ZnSO₄ e etanol foram removidas por centrifugação a 12.000 g por 10 min a 20°C. A concentração de nitrito, produto da redução do nitrato pela NR, foi determinada espectrofotometricamente pela absorção a 543 nm após adição de 9,6 mM sulfanilamida e 0,7 mM *n*-(1-naftil)etilendiamina diidrocloreto (NED). Os dados da quantidade de nitrito produzido (µmol) foram transformados em atividade da NR por massa fresca (U g⁻¹), assumindo-se que 1 unidade da NR (U) corresponde a 1 µmol de NO₂⁻ produzido por minuto (Chapman & Harrison, 1988), incubado a uma temperatura constante de 25 °C. Os resultados também foram expressos em atividade específica da NR (U mg⁻¹), para a qual a atividade da NR foi também padronizada pelo teor de proteínas solúveis totais. A padronização do ensaio enzimático para obtenção dos ótimos de pH, temperatura, volume de extrato bruto

e tempo de incubação já haviam sido realizados anteriormente com a espécie (Guimarães *et al.*, dados não publicados).

4.4.4. Proteínas solúveis totais

O teor de proteínas solúveis totais foi quantificado segundo o método descrito por Bradford (1976). Após a adição de solução para ensaio protéico da Bio-Rad (Bio-Rad, Califórnia) a uma alíquota de extrato bruto (sem adição de BSA), a concentração de proteínas solúveis totais foi determinada espectrofotometricamente pela absorção a 595 nm, usando BSA como proteína padrão para calibração. As leituras de proteína solúvel total (μg) foram padronizadas de acordo com a massa fresca das amostras e expressas em $\mu\text{g.mg}^{-1}$.

4.5. Análises estatísticas

Os valores de sobrevivência de esporos, taxas de crescimento e atividade da NR foram submetidos a análises de variância bifatoriais, com testes *a posteriori* de Newman-Keuls quando necessário. Diferenças significativas foram consideradas com $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Sobrevivência de esporos em diferentes irradiâncias

Não houve diferenças significativas quanto à sobrevivência de carpósporos entre as linhagens em nenhuma condição testada ($p = 0,278$). Algumas diferenças, porém, foram observadas entre as condições de irradiâncias testadas. A sobrevivência de todas as linhagens foi maior na irradiância de $180 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Sob 40 e $5 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, assim como na ausência de luz durante três dias, a sobrevivência foi semelhante ($p > 0,128$). Na ausência de luz durante sete

dias, a sobrevivência das diferentes linhagens de carpósporos foi menor do que em todas as demais condições testadas, e com valores próximos do zero ($p = 0,000$) (figura 1). Baseando-se nesses resultados, optou-se por utilizar a irradiância de 180 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ nos experimentos descritos no item 5.2.

Figura 1- Sobrevivência de carpósporos (dados transformados conforme item 4.1) resultantes dos cruzamentos entre morfos verdes (vd) e vermelhos (vm) de *Gracilaria domingensis* sob diferentes condições de irradiância. 0 (a), carpósporos mantidos na ausência de luz durante três dias. 0 (b), carpósporos mantidos no escuro durante sete dias. Barras de erro, intervalo de confiança (95%). $n=3$.

De maneira similar ao observado para carpósporos, a sobrevivência de tetrásporos não mostrou diferenças significativas entre as linhagens em nenhuma condição testada ($p= 0,202$). A sobrevivência de todas as linhagens de tetrásporos foi semelhante nas três irradiâncias ($p> 0,661$), cujos valores foram maiores do que na ausência de luz ($p< 0,002$). A sobrevivência de tetrásporos foi semelhante em três e sete dias no escuro ($p= 0,710$) (figura 2).

Figura 2- Sobrevivência de tetrásporos (dados transformados conforme item 4.1) resultantes de tetrásporófitos vermelhos VmVm, marrons VmVd, verdes VdVd e marrons VdVm de *Gracilaria domingensis* sob diferentes condições de irradiância. 0 (a), tetrásporos mantidos na ausência de luz por três dias. 0 (b), tetrásporos mantidos na ausência de luz por sete dias. Barras de erro, intervalo de confiança (95%). n=3.

A sobrevivência de tetrásporos foi maior que a de carpósporos em todas as condições testadas ($p = 0,000$).

5.2. Sobrevivência de esporos em diferentes concentrações de nitrato

Independentemente da concentração de nitrato testada, a linhagem de carpósporos c-VmVd apresentou valores de sobrevivência significativamente maiores que os de c-VdVm e c-VmVm ($p < 0,016$), porém semelhantes aos de c-VdVd ($p = 0,391$) (figura 3). A sobrevivência dessa última linhagem foi semelhante à de c-VmVm ($p = 0,053$), porém maior que a de c-VdVm ($p = 0,022$). As linhagens c-VmVm e c-VdVm apresentaram valores de sobrevivência semelhantes ($p = 0,464$).

Comparando-se as diferentes concentrações de nitrato, a sobrevivência de

carpósporos foi semelhante em 2,2 μM , 65 μM e 252 μM para todas as linhagens ($p > 0,070$), e menor nessas concentrações quando comparadas aos valores de sobrevivência obtidos em 127 μM e 502 μM ($p < 0,038$), que foram semelhantes entre si ($p = 0,701$) (figura 3).

Figura 3- Sobrevivência de carpósporos (dados transformados conforme item 4.1) resultantes dos cruzamentos entre morfos verdes (vd) e vermelhos (vm) de *Gracilaria domingensis* em diferentes concentrações de nitrato. Barras de erro, intervalo de confiança (95%). $n = 6$.

Considerando-se a mesma concentração de nitrato, não houve diferenças significativas na sobrevivência de tetrásporos entre as linhagens ($p = 0,139$) (figura 4). Todas as linhagens de tetrásporos apresentaram maiores valores de sobrevivência na presença da menor concentração de nitrato testada ($p < 0,002$). A sobrevivência de tetrásporos foi menor em 127 μM , com relação às demais concentrações testadas ($p < 0,019$), essas últimas semelhantes entre si ($p > 0,443$) (figura 4).

Figura 4- Sobrevivência de tetrásporos (dados transformados conforme item 4.1) resultantes de tetrasporófitos vermelhos VmVm, marrons VmVd, verdes VdVd e marrons VdVm de *Gracilaria domingensis* em diferentes concentrações de nitrato. Barras de erro, intervalo de confiança (95%). n= 3.

Plântulas gametofíticas e tetrasporofíticas provenientes do tratamento a 2,2 μM de nitrato foram mantidas nas mesmas condições por aproximadamente seis meses e, apesar do tamanho diminuto, pouca pigmentação e ausência de ramificações (dados não apresentados), permaneceram vivas durante esse período.

A sobrevivência de tetrásporos foi maior que a de carpósporos em todas as concentrações de nitrato testadas, independentemente da irradiância e da linhagem ($p=0,000$).

5.3. Crescimento de plântulas

A análise de variância não detectou diferenças nas TC entre plântulas gametofíticas verdes e vermelhas quando cultivadas em uma mesma concentração de nitrato ($p > 0,128$). Porém, observando-se o gráfico, nota-se uma tendência,

mesmo que não detectada estatisticamente, a maiores TC para a linhagem verde quando comparadas à vermelha em quase todas as concentrações de nitrato testadas, exceto 127 μM (figura 5). As taxas de crescimento de plântulas gametofíticas vermelhas em 2,2 μM foram semelhante às encontradas em 65 μM e 252 μM ($p>0,074$), porém menores que em 127 μM e 502 μM ($p<0,026$). Em 65 μM , 127 μM , 252 μM e 502 μM as TC foram semelhantes entre si ($p>0,239$). Já plântulas gametofíticas verdes apresentaram crescimento menor em 2,2 μM com relação às concentrações de 252 μM e 502 μM ($p<0,005$), e semelhante em todas as outras concentrações ($p>0,097$) (figura 5).

Figura 5- Taxas de crescimento (TC) calculadas a partir do diâmetro do disco de fixação de plântulas da linhagem verde (Vd) e vermelha (Vm) de *G. domingensis* submetidas a diferentes concentrações de nitrato. TC referentes a cinco dias. Barras de erro: intervalo de confiança (95%). $n=3$.

As taxas de crescimento de plântulas tetrasporofíticas das diferentes linhagens foram menores em 2,2 μM quando comparadas às demais concentrações de nitrato testadas ($p = 0,000$), as quais foram semelhantes entre si ($p > 0,114$).

Plântulas tetrasporofíticas marrons VmVd apresentaram taxas de crescimento menores que as de plântulas tetrasporofíticas vermelhas e marrons VdVm ($p < 0,007$), porém semelhantes às de plântulas tetrasporofíticas verdes ($p = 0,180$). As taxas de crescimento de plântulas verdes, vermelhas e marrons VdVm foram semelhantes entre si ($p > 0,076$) (figura 6).

Figura 6- Taxas de crescimento (TC) calculadas a partir do diâmetro do disco de fixação de plântulas tetrasporofíticas das diferentes linhagens de *G. domingensis* submetidos a diferentes concentrações de nitrato. TC referentes a cinco dias. Barras de erro: intervalo de confiança (95%). $n = 6$.

As taxas de crescimento de plântulas tetrasporofíticas foram maiores que as de plântulas gametofíticas em todas as concentrações testadas ($p = 0,000$).

5.4. Proteínas solúveis totais e atividade da enzima NR

5.4.1. Quantidade de proteínas solúveis totais

A quantidade de proteínas solúveis totais foi semelhante em gametófitos verdes e vermelhos nas concentrações de 127 μM , 252 μM e 502 μM ($p > 0,421$) (figura 7). Já na concentração de 65 μM , esse valor foi maior em gametófitos verdes com relação aos vermelhos ($p = 0,019$).

Comparando-se a quantidade de proteínas de gametófitos vermelhos nas diferentes concentrações de nitrato, a de 65 mM foi a que proporcionou menores valores ($p < 0,008$) (figura 7). Em 502 μM esse conteúdo foi maior que em 252 μM ($p = 0,047$), porém semelhante a 127 μM ($p = 0,931$). Em 127 μM e 252 μM , o conteúdo protéico foi semelhante ($p = 0,068$).

Gametófitos verdes apresentaram maiores valores de proteínas totais em 502 μM com relação às concentrações de 65 μM e 252 μM ($p < 0,004$), porém semelhantes aos obtidos na concentração de 252 μM ($p = 0,130$) (figura 7). Em 65 μM , 127 μM e 252 μM , os valores protéicos foram semelhantes ($p > 0,089$).

Figura 7- Quantidade de proteínas solúveis totais de gametófitos jovens vermelhos (Vm) e verdes (Vd) de *Gracilaria domingensis* submetidos a diferentes concentrações de nitrato durante sete semanas. Barras de erro: intervalo de confiança (95%). n=3.

Comparando-se o conteúdo protéico das diferentes linhagens tetrasporófitas dentro de uma mesma concentração de nitrato, observou-se que ele foi estatisticamente semelhante nas concentrações de 127 µM e 252 µM ($p > 0,317$) (figura 8). Na concentração de 65 µM, a linhagem marrom VdVm apresentou menor quantidade de proteínas totais com relação às demais linhagens ($p < 0,007$), semelhantes entre si ($p > 0,499$). Na concentração de 502 µM, a linhagem marrom VdVm obteve maiores valores de proteínas totais que a da linhagem verde ($p = 0,002$), enquanto que as demais linhagens tiveram valores protéicos semelhantes nessa concentração ($p > 0,191$).

Comparando-se uma mesma linhagem nos diferentes tratamentos, nota-se que tetrasporófitos vermelhos, verdes e marrons (VmVd) obtiveram maiores valores

protéicos em 252 μM ($p = 0,000$) com relação às demais concentrações testadas, que foram semelhantes entre si ($p > 0,077$). O conteúdo protéico da linhagem marrom VdVm foi maior em 252 μM ($p < 0,001$) e menor em 65 μM ($p = 0,000$), enquanto que em 127 μM e 502 μM , a quantidade de proteínas totais foi semelhante ($p = 0,323$) (figura 8).

Figura 8- Quantidade de proteínas totais de tetrasporófitos jovens vermelhos (VmVm), verdes (VdVd) e marrons (VmVd e VdVm) de *Gracilaria domingensis* submetidos a diferentes concentrações de nitrato durante sete semanas. Barras de erro: intervalo de confiança (95%). $n=3$.

A quantidade de proteínas solúveis totais de gametófitos e tetrasporófitos foi semelhante em 65 μM e 127 μM ($p > 0,221$). Em 252 μM , gametófitos apresentaram um maior teor protéico quando comparados a tetrasporófitos ($p = 0,000$), o inverso sendo observado quando as plantas jovens foram cultivadas em 502 μM ($p = 0,000$).

5.4.2. Atividade da enzima NR

A atividade da enzima NR foi maior em gametófitos vermelhos do que em gametófitos verdes, independentemente da concentração de nitrato testada ($p=0,029$) (figura 9). Nas duas linhagens, a atividade enzimática foi maior nas concentrações de 65 μM e 127 μM , semelhantes entre si ($p=0,078$), quando comparadas às concentrações de 252 μM e 502 μM ($p=0,000$). Esta última concentração promoveu maior atividade da enzima do que a anterior ($p=0,029$) (figura 9).

Figura 9- Atividade da enzima nitrato redutase (NR) de gametófitos vermelhos (Vm) e verdes (Vd) de *G. domingensis* submetidos a diferentes concentrações de nitrato durante sete semanas. Barras de erro: intervalo de confiança (95%). $n=3$.

A atividade da enzima NR foi semelhante para todas as linhagens tetrasporofíticas em 65 μM , 127 μM e 252 μM ($p>0,447$) (figura 10). Em 502 μM ,

algumas diferenças puderam ser evidenciadas entre as linhagens: tetrasporófitos vermelhos e marrons VmVd, semelhantes entre si ($p = 0,643$), apresentaram maior atividade da enzima que tetrasporófitos verdes e marrons VdVm ($p < 0,029$), semelhantes entre si ($p = 0,838$). Tetrasporófitos vermelhos e marrons (VmVd) apresentaram maior atividade da NR em $127 \mu\text{M}$ do que nas demais concentrações de nitrato ($p = 0,000$), essas últimas semelhantes entre si ($p > 0,392$). Tetrasporófitos verdes e marrons VdVm apresentaram maior atividade enzimática em $127 \mu\text{M}$ do que nas demais concentrações de nitrato ($p < 0,040$) e menor em $502 \mu\text{M}$ ($p < 0,029$). Na linhagem marrom VdVm a atividade da NR foi semelhante em $65 \mu\text{M}$ e $252 \mu\text{M}$ ($p > 0,616$) (figura 10).

Figura 10- Atividade da enzima nitrato redutase (NR) de tetrasporófitos vermelhos (VmVm), e verdes (VdVd) e marrons (VmVd e VdVm) de *G. domingensis* submetidos a diferentes concentrações de nitrato durante sete semanas. Barras de erro: intervalo de confiança (95%). $n = 3$.

Em ambas condições extremas testadas (65 μM e 502 μM) a atividade da NR de gametófitos foi semelhante à de tetrasporófitos ($p > 0,101$). Nas concentrações intermediárias testadas (127 μM e 252 μM), a atividade da NR foi maior em tetrasporófitos do que em gametófitos ($p < 0,004$).

5.4.3. Atividade específica da enzima NR

Gametófitos vermelhos apresentaram maior atividade específica da NR que gametófitos verdes ($p = 0,005$). Em 65 μM , a atividade específica da enzima foi maior do que em todas as outras concentrações testadas ($p = 0,000$). A concentração de 127 μM promoveu maior atividade enzimática do que as concentrações de 252 μM e 502 μM ($p < 0,003$), semelhantes entre si ($p = 0,406$) (figura 11).

Figura 11- Atividade específica da enzima nitrato redutase (NR) de gametófitos vermelhos (Vm) e verdes (Vd) de *G. domingensis* submetidos a diferentes concentrações de nitrato durante sete semanas. Barras de erro: intervalo de confiança (95%). $n=3$.

Considerando-se independentemente as concentrações de 127 μM , 252 μM e 502 μM , a atividade específica de todas as linhagens tetrasporofíticas foi semelhante ($p > 0,116$) (figura 12). Já na concentração de 65 μM , a atividade específica da NR de tetrasporófitos vermelhos, semelhante à de tetrasporófitos marrons VmVd ($p = 0,061$), foi menor que a de tetrasporófitos verdes e marrons VdVm ($p < 0,010$). Tetrasporófitos verdes apresentaram atividade específica da NR semelhante à das duas linhagens de tetrasporófitos marrons VmVd e VdVm nessa concentração ($p > 0,056$) ($p = 0,007$) (figura 12).

Tetrasporófitos vermelhos apresentaram valores semelhantes de atividade específica da NR em 252 μM e 502 μM ($p = 0,363$) (figura 12). Em 65 μM , a atividade foi semelhante a 502 μM ($p = 0,150$), porém maior que em 252 μM ($p = 0,023$) e menor que em 127 μM ($p = 0,009$). Nessa última concentração, a atividade foi maior que em 252 μM ($p = 0,000$). Tetrasporófitos marrons VmVd e tetrasporófitos verdes apresentaram atividade semelhante em 65 μM e 127 μM ($p > 0,190$), e nessas duas concentrações a atividade foi maior que em 252 μM e 502 μM ($p < 0,002$), essas últimas semelhantes entre si ($p > 0,612$). Tetrasporófitos marrons VdVm apresentaram atividade específica da NR maior em 65 μM com relação a todas as demais concentrações testadas ($p < 0,005$). Em 127 μM , a atividade foi maior que em 252 μM e 502 μM ($p = 0,000$), essas últimas semelhantes entre si (figura 12) ($p = 0,539$).

Figura 12- Atividade específica da enzima nitrato redutase (NR) de tetrasporófitos vermelhos (VmVm), e verdes (VdVd) e marrons (VmVd e VdVm) de *G. domingensis* submetidos a diferentes concentrações de nitrato durante sete semanas. Barras de erro: intervalo de confiança (95%). $n=3$.

Nas concentrações de 65 μM , 252 μM e 502 μM , a atividade específica da NR de gametófitos foi semelhante à de tetrasporófitos ($p > 0,231$). Já em 127 μM , a atividade específica dessa enzima para tetrasporófitos foi maior do que a observada para gametófitos ($p = 0,000$).

6. Discussão

6.1. Sobrevivência de esporos em diferentes irradiâncias

Os testes de sobrevivência de esporos realizados em diferentes irradiâncias foram fundamentais para estabelecer a irradiância a ser utilizada no experimento de sobrevivência em diferentes concentrações de nitrato. A escolha de 180 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ baseou-se na maior sobrevivência de carpósporos provenientes dos

quatro cruzamentos realizados nessa condição. Já a sobrevivência de tetrásporos não foi influenciada pela irradiância. No entanto, a escolha dessa irradiância foi mantida também para tetrásporos a fim de facilitar comparações e a logística experimental. Além disso, como o crescimento das algas aumenta conforme se aumenta a irradiância (dados não apresentados), supôs-se que a atividade metabólica, incluindo a atividade da NR, positivamente regulada pela luz (Solomonson & Barber 1990), aumentaria nas irradiâncias maiores.

As maiores taxas de sobrevivência de carpósporos na irradiância de $180 \mu\text{mol f\acute{o}tons. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ não eram esperadas, uma vez que um trabalho anterior com a espécie (Ferreira & Plastino, dados não publicados) havia mostrado maiores índices de sobrevivência desses esporos nas irradiâncias mais baixas. A aparente discrepância encontrada entre o atual trabalho e o anterior pode ser explicada pelas diferentes condições às quais os esporos foram submetidos: enquanto no presente trabalho a solução enriquecedora de água do mar utilizada foi a de von Stosch (VS), diluída a 25%, no anterior utilizou-se a solução de Provasoli (PES, McLachlan 1973) diluída a 50%. As duas soluções têm composições nutricionais bastante diferentes, o que por si só poderia ocasionar respostas metabólicas diferenciadas. Enquanto a solução de VS contém menor quantidade de nitrato, $0,5 \text{ mM}$, a de PES contém $0,66 \text{ mM}$ desse nutriente. Além disso, a fonte de fosfato na solução de VS é inorgânica (Na_2HPO_4 $30 \mu\text{M}$), enquanto que na solução de PES, a fonte é orgânica (glicerofosfato de sódio, $25 \mu\text{M}$), entre outras diferenças. O tipo de fonte de irradiância também diferiu: lâmpadas brancas no atual, e levemente alaranjadas no anterior. Esses dados mostram que deve haver um sinergismo entre a concentração de nutrientes e a luminosidade (quantidade e qualidade de luz) para a regulação da sobrevivência dos

esporos. Muitos estudos relatam que esporos e fases juvenis de *Gracilaria* estejam adaptados a baixas irradiâncias, de até 50 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Bird *et al.* 1977; Friedlander & Dawes 1984; Orduña-Rojas & Robledo 1999; Garza-Sánchez *et al.* 2000; Ye *et al.* 2006). No entanto, não se pode generalizar, uma vez que também há relatos de espécies cujos esporos não tenham a sobrevivência afetada pela irradiância, como *Gelidium robustum* (Pacheco-Ruiz *et al.* 2001), ou até mesmo de algas cujo recrutamento seja maior em irradiâncias mais altas (90 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), como *Enteromorpha* (Sousa *et al.* 2007).

A sobrevivência de esporos no escuro depende da quantidade de substâncias de reserva presentes nas células (Clayton 1992). Uma vez que nessa situação não é possível a ocorrência de fotossíntese, as células precisam quebrar os polissacarídeos de reserva para obter a energia armazenada neles. Considerando-se o mesmo tipo de esporo (carpósporo ou tetrásporo), as respostas das diferentes linhagens à ausência de luz foram semelhantes, sugerindo que todas elas tenham a mesma quantidade de substâncias de reserva em suas células. Entretanto, diferentes respostas foram observadas entre carpósporos e tetrásporos. Carpósporos foram mais sensíveis a essa condição do que tetrásporos, visto que a sobrevivência dos primeiros diminuiu ao longo do tempo em que eles permaneceram na ausência de luz, o que não foi observado para tetrásporos. Tetrásporos ainda apresentaram maiores taxas de sobrevivência do que carpósporos nessas condições. Esporos haplóides e diplóides com taxas de sobrevivência diferenciadas já foram observados em outras espécies de *Gracilaria*, com maiores valores sendo observados para os primeiros (Destombe *et al.* 1992; Gonzalez & Meneses 1996). Estudos que contemplam essa abordagem são úteis no caso de espécies com estádios haplóide e diplóide isomórficos, como *G.*

domingensis, cujos estádios, aparentemente, podem ocupar nichos semelhantes. Lewis (1985) propôs uma hipótese, conhecida como a “Hipótese da Escassez de Nutrientes”, segundo a qual células haplóides, por serem menores e terem uma maior relação superfície/volume, poderiam captar nutrientes de maneira mais eficiente do que células diplóides. Além disso, por possuírem uma quantidade menor de DNA, gastariam menos energia e, portanto, poderiam economizar na captação de nutrientes, adquirindo, dessa forma, vantagens competitivas com relação a células diplóides. Os dados de sobrevivência de esporos de *G. domingensis* corroboram essa hipótese, já que tetrásporos apresentaram uma maior tolerância ao escuro quando comparados a carpósporos, o que indica que eles conseguem aproveitar melhor os escassos nutrientes disponíveis. Mesmo pensando que na natureza os esporos nunca ficarão expostos ao escuro por muito tempo, caso eles sejam liberados à noite e se fixem a um substrato nesse período de escuro, tetrásporos poderiam obter vantagens, já que, no momento em que os primeiros raios de luz chegassem até eles, eles já teriam nitrogênio inorgânico para incorporar aos esqueletos carbônicos produzidos na fotossíntese. Porém, tetrásporos de *G. domingensis* têm diâmetro semelhante ao de carpósporos (Capítulo 2), o que indica que, se tetrásporos realmente captam nutrientes de maneira mais eficiente, isso não se deve ao tamanho das suas células, mas sim ao seu maior desempenho metabólico.

6.2. Sobrevivência de esporos em diferentes concentrações de nitrato

A utilização de um mesmo lote de água do mar para cada experimento em que foram testadas diferentes concentrações de nitrato foi importante, uma vez que não se sabia, *a priori*, o quanto a concentração de nutrientes poderia variar de um lote para outro. As análises realizadas no Laboratório de Nutrientes, Micronutrientes

e Traços no Mar, IO, USP, confirmaram que a quantidade de nutrientes na água do mar da região coletada (São Sebastião, SP) não variou muito ao longo do tempo, conforme o sugerido por Oliveira *et al.* (1997) e Costa (2005). Entretanto, deve-se ressaltar que não foram feitas análises sazonais e que, portanto, não podem ser feitas generalizações para a região.

Em nenhuma condição testada o morfo vermelho obteve maiores taxas de sobrevivência de esporos quando comparado ao morfo verde. Além disso, a sobrevivência de carpósporos da linhagem marrom VmVd foi maior que a de carpósporos das linhagens marrom VdVm e vermelha. O maior desempenho do morfo marrom, mesmo que apenas em uma linhagem, assim como o desempenho semelhante encontrado para as linhagens verde e vermelha, poderiam ajudar a manter o alelo verde na natureza.

Houve uma tendência a uma maior sobrevivência de carpósporos nas maiores concentrações de nitrato testadas, independentemente da linhagem. Um aumento na concentração de nutrientes na água do mar também favoreceu o assentamento e a germinação de esporos de outras algas (Amsler & Neushul 1990; Sousa *et al.* 2007). A tendência oposta foi observada para tetrásporos de *Gracilaria domingensis*, evidenciando que as diferentes fases do histórico de vida, apesar de isomórficas, possuem necessidades nutricionais e respostas metabólicas distintas. Esses dados sugerem também a maior tolerância de tetrásporos a baixas concentrações de nutrientes, quando comparados a carpósporos, como foi sugerido para o experimento de sobrevivência de esporos na ausência de luz, evidenciando, mais uma vez, que tetrásporos tenham mecanismos mais eficientes de captação de nutrientes do que carpósporos.

As taxas máximas de sobrevivência obtidas neste trabalho para carpósporos (22,4%) de *Gracilaria domingensis* foram próximas aos valores obtidos para *G. pacifica*: 29% (Garza-Sánchez *et al.* 2000). Carpósporos das diferentes linhagens de *G. domingensis* apresentaram menores taxas de sobrevivência com relação a tetrásporos em todas as condições testadas, tanto de irradiância quanto de nutrientes. O mesmo foi observado para *G. pacifica* (Garza-Sánchez *et al.* 2000) e *Chondracanthus chamissoi* (Gonzalez & Meneses 1996). Outros trabalhos, porém, mostram a tendência oposta: carpósporos de *Gelidium pristoides* apresentaram maiores valores de sobrevivência quando comparados a tetrásporos (Carter 1985). Existem, ainda, trabalhos que mostram taxas de sobrevivência ainda mais baixas (em torno de 10%) para carpósporos em laboratório, como verificado para *Centroceras clavulatum* (Scardino *et al.* 2008). Muitos estudos sugerem que carpósporos de algas vermelhas, por serem diplóides, apresentariam uma maior capacidade de sobrevivência com relação a tetrásporos. Além disso, por serem maiores e, portanto, com maior volume e massa, teriam taxas de sedimentação maiores, o que conferiria vantagens ecológicas a esses esporos, já que eles alcançariam primeiro o substrato (Mshigeni 1976; Okuda & Neushul 1981). A camada de mucilagem que envolve os carpósporos exerce grande influência na sua taxa de sobrevivência, uma vez que ela tem extrema importância na fixação e interação do esporo com o substrato em ambientes naturais (Fletcher & Callow 1992; Bouzon *et al.* 2006). No mar, a mucilagem que envolve os esporos pode ser facilmente dissolvida (Moss 1974). Em laboratório, no entanto, o excesso de mucilagem poderia prejudicar a fixação dos mesmos por poder representar um substrato para bactérias se reproduzirem (Plastino 1985), o que poderia inibir a germinação dos esporos (Egan *et al.* 2001). Portanto, as menores taxas de

sobrevivência de carpósporos com relação a tetrásporos podem ser um artefato experimental de laboratório. Na natureza, as populações de *G. domingensis* são formadas predominantemente por tetrasporófitos (Guimarães *et al.* 2003). Caso carpósporos de *G. domingensis* tenham de fato taxas de sobrevivência menores que a de tetrásporos, outros fatores devem regular a frequência dessas duas fases do histórico de vida que não apenas a sobrevivência de esporos.

Os experimentos de sobrevivência de tetrásporos foram realizados com as quatro linhagens de tetrasporófitos: vermelha, marrom VmVd, verde e marrom VdVm. As duas linhagens de tetrasporófitos marrons deveriam produzir, em tese, tetrásporos com capacidade de sobrevivência semelhante, já que ambos produzem tetrásporos que, ao germinarem, vão originar igualmente gametófitos verdes e vermelhos. Porém, esses experimentos foram realizados com o intuito de se verificar se poderia haver um maior investimento reprodutivo de uma das linhagens de tetrasporófito marrom. Dessa forma, apesar de tetrásporos t-VmVd serem, em termos genéticos com relação aos alelos verde e vermelho, supostamente semelhantes a tetrásporos t-VdVm, seria possível que o investimento parental do tetrasporófito marrom VmVd fosse diferente daquele apresentado pelo tetrasporófito marrom VdVm, e nesse caso, taxas de sobrevivência diferentes seriam esperadas para os esporos dessas duas linhagens. Como não houve diferenças na sobrevivência de nenhuma linhagem de tetrásporo em nenhuma das condições testadas, assumiu-se que o investimento reprodutivo das diferentes linhagens tetrasporofíticas, ao menos quando medido pela sobrevivência dos tetrásporos, fosse semelhante. Como também não houve diferenças na quantidade de tetrásporos produzidos entre as linhagens (Capítulo 2), é muito provável que a

capacidade reprodutiva das diferentes linhagens tetrasporofíticas seja de fato semelhante.

6.3. Crescimento de plântulas

Carpósporos e tetrásporos cultivados durante seis meses em laboratório sem adição de nitrato à água do mar (dados não mostrados) diferenciaram ramo ereto, originando plântulas gametofíticas e tetrasporofíticas que, independentemente da linhagem, apresentaram sintomas típicos da escassez desse nutriente, como crescimento reduzido e despigmentação, sintomas amplamente descritos na literatura (Bird *et al.* 1982; O' Connor & West 1991; Tyrrel 1999; Conitz *et al.* 2001). Entretanto, nessa condição, foram verificadas taxas de crescimento positivas (dados não mostrados), o que deve ter sido resultado do aproveitamento das pequenas quantidades de nitrato presentes na água do mar (cerca de 2 μM).

Taxas de crescimento de plântulas tetrasporofíticas de *G. domingensis* foram maiores que as de plântulas gametofíticas, sob qualquer condição de nutrientes, resultados que coincidem com o observado para *Chondracanthus chamissoi* (Gonzalez & Meneses 1996). Essas respostas eram esperadas, uma vez que organismos diplóides tendem a ser mais vigorosos que os haplóides.

O morfo verde apresentou taxas de crescimento semelhantes às do morfo vermelho em todas as concentrações de nitrato testadas, tanto para gametófitos como para tetrasporófitos. Um trabalho anterior com a espécie (Guimarães 2000) mostrou maiores taxas de crescimento para gametófitos verdes adultos quando comparados a gametófitos vermelhos adultos, mas apenas na irradiância mais alta testada (220 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). No presente trabalho, mesmo com a maior irradiância testada (180 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), considerada alta se comparada às

irradiâncias normalmente utilizadas em laboratório, não foi possível verificar diferenças entre as linhagens. É reconhecido para algumas espécies de algas que as fases juvenis podem ser mais tolerantes do que algas mais velhas a variações ambientais (Friedlander & Dawes 1984; Rodrigo & Robaina 1997), o que poderia mascarar diferenças que ficam evidentes em fases posteriores do desenvolvimento. As taxas de crescimento de plântulas tetrasporofíticas marrons VdVm foram maiores que as de plântulas tetrasporofíticas marrons VmVd. Os mesmos resultados foram observados quando as taxas de crescimento foram mensuradas por meio de medidas de massa fresca de plantas mais velhas, com aproximadamente um mês de idade (D. M. Kikuchi, L.B. Ferreira & E.M. Plastino, dados não publicados). Esses resultados mostram que, pelo menos para tetrasporófitos, as diferenças entre as linhagens ficam evidentes desde o início do desenvolvimento, apesar de a sobrevivência de c-VmVd ser semelhante à de c-VdVm. Taxas de crescimento semelhantes para os morfos verde e vermelho, e superiores para uma das linhagens do morfo marrom, assim como observado para valores de sobrevivência de esporos, parecem contribuir para a manutenção do alelo verde na natureza.

6.4. Quantidade de proteínas solúveis totais e atividade da enzima NR

Gametófitos e tetrasporófitos jovens de todas as linhagens apresentaram uma tendência a menores conteúdos de proteínas solúveis quando cultivados em 65 μM de nitrato. Concentrações superiores não provocaram um aumento proporcional na quantidade de proteínas solúveis de gametófitos, indicando que pode ter havido saturação na capacidade de assimilação de nitrato a partir de 127 μM , como já sugerido pelos dados de crescimento, possivelmente devido a limitações na quantidade de esqueletos carbônicos disponíveis para sua incorporação. Sob

limitação desse nutriente (65 μM), gametófitos verdes apresentaram um maior conteúdo protéico do que gametófitos vermelhos. Deve-se ressaltar que, por características intrínsecas dos morfos, o morfo verde possui menos ficoeritrina do que o morfo vermelho (Guimarães *et al.* 2003). Considerando-se que a proporção de ficobiliproteínas com relação a proteínas solúveis totais em algas vermelhas alcança valores em torno de 20% (Korbee *et al.* 2005), a maior quantidade de proteínas solúveis totais em gametófitos verdes de *Gracilaria domingensis* quando comparados a gametófitos vermelhos são surpreendentes. Não se pode descartar, contudo, a hipótese de que gametófitos verdes tenham uma maior capacidade de acúmulo de outras substâncias de reserva nitrogenadas que não a ficoeritrina, o que poderia indicar uma maior capacidade de assimilação de nitrato para essa linhagem, favorecendo-a em ambientes tropicais, oligotróficos.

Tetrasporófitos verdes, vermelhos e marrons VmVd apresentaram conteúdos protéicos semelhantes entre si considerando-se a mesma condição. Já o tetrasporófito marrom VdVm mostrou um desempenho diferenciado nas condições extremas testadas (66 e 502 μM de nitrato): a quantidade de proteínas foi menor que a das demais linhagens em 65 μM , e maior que a da linhagem verde em 502 μM . A linhagem marrom VdVm parece ter uma menor capacidade de produzir proteínas que as demais quando há menos nitrato disponível. Todas as linhagens tetrasporofíticas apresentaram um maior conteúdo protéico em 252 μM . Somente nessa concentração, observou-se também diferenças entre tetrasporófitos e gametófitos, os primeiros apresentando um maior conteúdo protéico do que o de gametófitos.

A atividade da enzima NR pode ser padronizada pela quantidade de proteínas solúveis totais, caracterizando, nesse caso, o que é chamado de atividade específica da enzima. Os morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* apresentaram valores distintos de proteínas solúveis totais, demonstrando que este não é um bom parâmetro para comparar a atividade da NR entre as linhagens. Dessa forma, propõe-se, neste trabalho, que a atividade da NR dos morfos pigmentares da espécie sejam expressos considerando-se a massa fresca das algas, para que comparações entre as linhagens possam ser realizadas de maneira mais adequada. Padronizações pela massa fresca são muitas vezes criticadas porque pode haver grande variação no acúmulo de água nos tecidos de indivíduos diferentes, que podem ter a mesma massa fresca, mas não necessariamente a mesma massa seca. Esse não parece ser o caso das linhagens de *G. domingensis*, já que a massa fresca seca das plantas foi avaliada em outra ocasião (Capítulo 4), e não foram evidenciadas diferenças entre as linhagens.

Houve uma tendência a maiores valores para a atividade da NR dos diferentes morfos pigmentares de *G. domingensis* nas concentrações de nitrato mais baixas testadas. Há um amplo relato na literatura indicando o oposto: a atividade dessa enzima tende a ser diretamente proporcional à concentração de nitrato na água do mar ou no meio de cultura (Hipkin *et al.* 1983; Davison *et al.* 1984; Thomas & Harrison 1985; Hurd *et al.* 1995; Lartigue & Sherman 2006; Young *et al.* 2007). No entanto, ecótipos de águas oligotróficas de *Laminaria longicruris* apresentam maior afinidade pela captação de nitrato do que plantas de águas ricas em nutrientes da mesma espécie (Espinoza & Chapman 1983), sugerindo que espécies de regiões

tropicais, como *G. domingensis*, possam apresentar mecanismos diferentes de regulação da captação e/ou assimilação de nitrato.

Houve uma tendência a um aumento na quantidade de proteínas solúveis de tetrasporófitos jovens de *G. domingensis* com o aumento da concentração de nitrato na água do mar até 252 μM . Em 502 μM , o teor protéico caiu (figura 8). Caso estivesse ocorrendo uma simples saturação na captação de nitrato, seria esperado que a quantidade de proteínas totais permanecesse a mesma. Como essa quantidade caiu, podemos propor algumas hipóteses: i, os tetrasporófitos degradaram proteínas quando cultivados nessa concentração, por algum motivo desconhecido; ii, ocorreram alterações nas rotas metabólicas que direcionaram o acúmulo de nitrato para outras substâncias nitrogenadas que não as proteínas; iii, ocorreu um mecanismo de regulação da NR via retroalimentação negativa por substrato, uma vez que a NR é inibida pelo excesso de nitrato no meio, e que o acúmulo dos intermediários da via de assimilação de nitrato (nitrito e amônio) são tóxicos para as células. A capacidade de uma alga assimilar determinada quantidade de nitrato diretamente proporcional à quantidade disponível na água depende não apenas do fornecimento de substrato, mas também de que as demais rotas metabólicas estejam acopladas para um funcionamento sincronizado das vias relacionadas à assimilação de nitrogênio. Isto é, se a quantidade de nitrogênio inorgânico na água aumenta, a alga deve ser capaz de assimilar esse nutriente numa taxa que corresponda às taxas de produção de esqueletos de carbono, para que os compostos nitrogenados sejam incorporados e não se acumulem intermediários tóxicos da via de assimilação de nitrato (Crawford & Arnst 1993). Um aumento nas taxas de produção de esqueletos carbônicos poderia provir de: i, um aumento das taxas fotossintetizantes; ou ii,

clivagem de macromoléculas de carbono alocadas para outras funções. Uma vez que o experimento foi realizado em uma irradiância alta ($180 \mu\text{mol f\acute{o}tons. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), é provável que a luz não tenha sido limitante para acompanhar um incremento na atividade da NR concomitante à assimilação do nitrato externo disponível. Sendo assim, consideramos que a explicação mais plausível para os resultados obtidos para *G. domingensis* seja a regulação negativa da atividade enzimática pelo substrato, evitando assim a toxicidade celular, resposta fisiológica provavelmente devida ao fato de ser esta uma alga de águas oligotróficas e, portanto, sensível a altas concentrações de nutrientes.

Gametófitos verdes e vermelhos de *Gracilaria domingensis* apresentaram atividade da NR e atividade específica dessa enzima semelhantes entre si e nos diferentes tratamentos, exceto nas concentrações mais baixas ($65 \mu\text{M}$ e $127 \mu\text{M}$), nas quais esses valores foram maiores que nos demais para as duas linhagens, e maiores para gametófitos vermelhos com relação aos verdes. A maior atividade da NR de *G. domingensis* nessas condições de menor concentração de nitrato pode sugerir uma adaptação dessa espécie e de todas as linhagens à sobrevivência nas regiões entremarés de ambientes oligotróficos, já que quando a maré sobe, as algas que conseguem assimilar mais rapidamente os nutrientes teriam vantagens sobre outras cujas taxas de assimilação fossem mais lentas. Nesse sentido, seria interessante testar futuramente a atividade dessa enzima em algas cultivadas em água do mar sem adição de nitrato. No presente trabalho isso não foi possível, já que as plântulas cultivadas nessas condições não obtiveram crescimento suficiente para obtenção de massa fresca para os experimentos.

A atividade da enzima NR foi semelhante entre as quatro linhagens tetrasporofíticas, exceto na concentração de 502 μM , na qual tetrasporófitos verdes e marrons VdVm apresentaram menores valores que os demais, o que sugere uma maior sensibilidade dessas linhagens a altas concentrações de nitrato. Com relação à atividade específica da enzima NR, resultados opostos foram encontrados. Esses resultados devem-se à relação estabelecida entre a atividade específica da NR e o teor de proteínas solúveis totais, uma vez que o cálculo da atividade específica é em função da concentração de proteínas. Em *G. domingensis*, a atividade específica em plantas tetrasporofíticas foi semelhante entre as linhagens em todas as concentrações, exceto em 66 μM , na qual as linhagens VdVd e VdVm obtiveram os maiores valores. Todas as linhagens de *G. domingensis* parecem estar adaptadas a baixas concentrações de nitrato. Diferenças na atividade da enzima NR entre tetrasporófitos verdes e vermelhos só foram verificadas quando as algas foram cultivadas em altas concentrações de nitrato (502 μM), sendo que os tetrasporófitos vermelhos obtiveram maiores valores que os verdes. É possível que haja, nessa condição, limitação por esqueletos de carbono, e nesse caso, as plantas verdes estariam sofrendo mais com essa limitação do que as plantas vermelhas, o que indica que a fotossíntese de tetrasporófitos vermelhos pode ser mais eficiente que a de tetrasporófitos verdes em condições de altas concentrações de nutrientes. Neste sentido, seria interessante avaliar a influência do acréscimo de bicarbonato na água do mar ou de irradiâncias superiores na atividade da enzima NR.

A atividade da NR e a atividade específica dessa enzima foram semelhantes para gametófitos e tetrasporófitos apenas nas duas condições extremas testadas: 65 μM e 502 μM . Se considerarmos que 65 μM seja uma condição nutricional pobre

para a espécie nas condições estudadas, a resposta seria a mesma para todas as linhagens: captar rapidamente todo o nitrato disponível. Já em 502 mM, que supostamente é uma condição de estresse inibitório, a resposta metabólica de todas as linhagens à captação de nitrato seria inibida. Caso as linhagens gametofíticas e tetrasporofíticas não respondessem da mesma maneira a essas condições de estresse, isso poderia indicar que alguma(s) dela(s) teria(m) deficiências metabólicas. Por exemplo, se uma determinada linhagem não fosse capaz de diminuir as taxas de captação e assimilação de nitrato em condições nas quais esse nutriente está em excesso, isso poderia ocasionar graves danos às plantas, devido ao acúmulo de substâncias tóxicas, a menos que a tolerância à quantidade de nitrato fosse diferente entre elas. Portanto, os resultados obtidos sugerem que as fases gametofítica e tetrasporofítica *Gracilaria domingensis* apresentam desempenho semelhante quanto ao metabolismo do nitrogênio.

6.5. Conclusões

O maior teor de proteínas solúveis totais observado em gametófitos verdes quando comparados a gametófitos vermelhos pode ser vantajoso para essas algas, uma vez que isso pode representar uma maior capacidade de captação e assimilação de nutrientes, importante para algas que vivem em regiões oligotróficas, como é o caso de *G. domingensis*. Alguns experimentos, no entanto, não mostraram vantagens claras para uma planta portadora desse alelo, como foi o caso dos experimentos de sobrevivência de esporos e crescimento de plântulas em diferentes concentrações de nitrato. Nesses dois experimentos, foram evidenciadas tendências semelhantes para os morfos. Entretanto, mesmo que o morfo verde não possua um desempenho maior que o do morfo vermelho, o simples fato de ele ser semelhante já favorece a

manutenção do alelo verde na natureza. Em outros experimentos, no entanto, plantas vermelhas apresentaram desempenho maior quando comparadas a plantas verdes, como foi o caso da atividade da NR e atividade específica dessa enzima, maior em gametófitos vermelhos quando comparados a gametófitos verdes. Porém, diferenças podem surgir em etapas posteriores do metabolismo, não avaliadas no presente trabalho. Não é fácil responder qual ou quais desses fatores têm maior peso para a manutenção do alelo verde, até mesmo porque muitos outros fatores devem atuar em conjunto para regular a frequência dos morfos de *G. domingensis*.

Foi interessante observar que para todos os parâmetros fisiológicos avaliados neste capítulo (sobrevivência de carpósporos, crescimento de plântulas, quantidade de proteínas solúveis totais, atividade e atividade específica da NR), em pelo menos uma das concentrações de nitrato testadas o desempenho das duas linhagens marrons foi diferente quando comparadas uma com a outra, demonstrando haver um efeito parental na fisiologia dessas plantas, mesmo que, aparentemente, não seja possível distinguir as duas linhagens a olho nu. Mesmo que não tenha sido observado claramente um vigor híbrido nos tetrasporófitos marrons, o desempenho semelhante ou, em alguns casos, superior dessas linhagens quando comparadas às plantas verdes e vermelhas também contribuiria para a manutenção do alelo verde na natureza.

7. Referências

- AMSLER, C.D. & NEUSHUL, M. 1990. Nutrient stimulation of spore settlement. I, the kelps *Pterygophora californica* and *Macrocystis pyrifera*. *Marine Biology* 107: 297-304.
- AMSLER, C.D.; SHELTON, K.L.; BRITTON, C.J.; SPENCER, N.Y. & GREER, S.P. 1999. Nutrients do not influence swimming behavior or settlement rates of *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae) spores. *Journal of Phycology* 35: 239-244.

- BIRD, C.J.; EDELSTEIN, T. & MCLACHLAN, J. 1977. Studies on *Gracilaria*. Experimental observations on growth and reproduction in Pomquet Harbour, Nova Scotia. *Le Naturalist Canadien* 104: 245- 255.
- BIRD, K.T.; HABIG, C. & DEBUSK, T. 1982. Nitrogen allocation and storage patterns in *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 18: 344-348.
- BOUZON, Z.L.; OURIQUES, L.C. & OLIVEIRA, E.C. 2006. Spore adhesion and cell wall fotation in *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Gelidiales). *Journal of Applied Phycology* 18: 287-294.
- BRADFORD, M.M.A. 1976. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analitical Biochemistry* 72: 248-254.
- BRAWLEY, S. & JOHNSON, L.E. 1992. Gametogenesis, gametes and zygotes: an ecological perspective on sexual reproduction in algae. *British Phycological Journal* 27: 233-252.
- CARTER, A.R. 1985. Reproductive morphology and phenology, and culture studies of *Gelidium pristoides* (Rhodophyta) from Port Alfred in South Africa. *Botanica Marina* 28: 303-311.
- CHAPMAN, D.J. & HARRISON, P.J. 1988. *Nitrogen metabolism and measurement of nitrate reductase activity*. In *Experimental Phycology. A laboratory manual* (C.S. Lobban, D.J. Chapman & B. Kremer, eds.). Cambridge University Press, Cambridge, p. 196-202.
- CHOW, F. 2002. Atividade *in vitro* e regulação da enzima nitrato redutase na alga vermelha *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- CHOW, F.; CAPOCIAMA, F.V.; FARIA, R. & OLIVEIRA, M.C. 2007. Characterization of nitrate reductase activity *in vitro* in *Gracilaria caudata* J. Agardh (Rhodophyta, Gracilariales). *Revista Brasileira de Botânica* 30: 123-129.
- CHOW, F.; OLIVEIRA, M.C. & PEDERSÉN, M. 2004. *In vitro* assay and light regulation of nitrate reductase in red alga *Gracilaria chilensis*. *Journal of Plant Physiology* 161: 769-776.
- CLAYTON, M.N. 1992. Propagules of marine macroalgae: structure and development. *British Phycological Journal* 27: 219-232.

- CONITZ, J.M.; FAGEN, R.; LINDSTROM, S.C. PLUMLEY, F.G. & STEKOLL, M.S. 2001. Growth and pigmentation of juvenile *Porphyra torta* (Rhodophyta) gametophytes in response to nitrate, salinity and inorganic carbon. *Journal of Applied Phycology* 13: 423-431.
- COSTA, V.L. 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, SP.
- CRAWFORD, N.M. 1995. Nitrate: nutrient and sign for plant growth. *Plant Cell* 7: 859-868.
- CRAWFORD, N.M. & ARNST, H.N. 1993. The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. *Annual Review of Genetics* 27: 115-132.
- DAVISON, I.R.; ANDREWS, M. & STEWART, W.D.P. 1984. Regulation of growth in *Laminaria digitata*: use of *in vivo* nitrate reductase activities as an indicator of nitrogen limitation in field populations of *Laminaria* spp. *Marine Biology* 84: 207-217.
- DAVISON, I.R. & STEWART, W.D.P. 1984. Studies on nitrate reductase activity in *Laminaria digitata* (Huds.) Lamour. II. The role of nitrate availability in the regulation of enzyme activity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 79: 65-78.
- DE LA ROSA, M.A.; RONCEL, M. & NAVARRO, J.A. 1989. Flavin-mediated photoregulation of nitrate reductase: a key point of control in inorganic nitrogen photosynthetic metabolism. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 22: 355-364.
- DESTOMBE, C.; GODIN, J.; LEFEBREVE, C.; DEHORTER, O. & VERNET, P. 1992. Differences in dispersal abilities of haploid and diploid spores of *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta: Gigartinales). *Botanica Marina* 35: 93-98.
- EGAN, S.; JAMES, S.; HOLMSTRÖM, C. & KJELLEBERG, S. 2001. Inhibition of algal spore germination by the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicate*. *FEMS Microbiology Ecology* 35: 67-73.
- ESPINOZA, J. & CHAPMAN, A.R.O. 1983. Ecotypic differentiation of *Laminaria longicuris*. *Marine Biology* 74: 213-218.
- FERREIRA, L.B.; BARUFI, J.B. & PLASTINO, E.M. 2006. Growth of red and green strains of *Gracilaria cornea* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) in laboratory. *Revista Brasileira de Botânica*

- 29: 187-192.
- FLETCHER, R.L. & CALLOW, M.E. 1992. The settlement, attachment and establishment of marine algal spores. *British Phycological Journal* 27: 303-329.
- FRIEDLANDER, M. & DAWES, C.J. 1984. Studies on spore release and sporeling growth from carpospores of *Gracilaria foliifera* (Forksall) Borgesen var. *angustissima* (Harvey) Taylor. I. Growth responses. *Aquatic Botany* 19: 221-232.
- GARZA-SÁNCHEZ, F.; ZERTRUCHE-GONZÁLEZ, J.A. & CHAPMAN, D.J. 2000. Effect of temperature and irradiance on the release, attachment and survival of spores of *Gracilaria pacifica* Abbott (Rhodophyta). *Botanica Marina* 43: 205-212.
- GONZALEZ, J. & MENESES, I. 1996. Differences in the early stages of development of gametophytes and tetrasporophytes of *Chondracanthus chamissoi* (C.Ag.) Kützinger from Puerto Aldea, northern Chile. *Aquaculture* 143: 91-107.
- GUIMARÃES, M. 2000. Aspectos fisiológicos de *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta): subsídios para a compreensão da manutenção do polimorfismo pigmentar. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- GUIMARÃES, M.; PLASTINO, E.M. & DESTOMBE, C. 2003. Green mutant frequency in natural populations of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. *European Journal of Phycology* 38: 165-169.
- GRANBOM, M.; CHOW, F.; LOPES, P.F.; OLIVEIRA, M.C.; COLEPICCOLO, P.; PAULA, E.J. & PEDERSÉN, M. 2004. Characterization of nitrate reductase in the marine macroalga *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta). *Aquatic Botany* 78: 295-305.
- GRANBOM, M.; LOPES, P.F.; PEDERSÉN, M. & COLEPICCOLO, P. 2007. Nitrate reductase in the marine macroalga *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta): oscillation due to the protein level. *Botanica Marina* 50: 106-112.
- HOFFMAN, A.J. 1987. The arrival of seaweed propagules at the shore: a review. *Botanica Marina* 30: 151-165.
- HARRISON, P.J. & HURD, C.L. 2001. Nutrient physiology, of seaweeds: application of concepts to aquaculture. *Cahiers du Biologie Marine* 42: 71-82.

- HIPKIN, C.R.; THOMAS, R.J. & SYRETT, P.J. 1983. Effects of nitrogen deficiency on nitrate reductase, nitrate assimilation and photosynthesis in unicellular marine algae. *Marine Biology* 77: 101-105.
- HSIAO, S.I.C. & DRUEHL, L.D. 1973. Environment control of gametogenesis in *Laminaria saccharina*. II. Correlation of nitrate and phosphate concentrations with gametogenesis and selected metabolites. *Canadian Journal of Botany* 51: 829-839.
- HURD, C.L.; BERGES, J.A.; OSBORNE, J. & HARRISON, P.J. 1995. An *in vitro* nitrate reductase assay for marine macroalgae: optimization and characterization of the enzyme for *Fucus gardneri* (Phaeophyta). *Journal of Phycology* 31: 835-843.
- LAPOINTE, B.E. 1981. The effects of light and nitrogen on growth, pigment content, and biochemical composition of *Gracilaria foliifera* v. *angustissima* (Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 17: 90-95.
- LAPOINTE, B.E. & DUKE, C.S. 1984. Biochemical strategies for growth of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta) in relation to light intensity and nitrogen availability. *Journal of Phycology* 20: 488-495.
- LARTIGUE, J. & SHERMAN, T.D. 2006. A field study of nitrogen storage and nitrate reductase activity in the estuarine macroalgae *Enteromorpha lincolniata* (Chlorophyceae) and *Gelidium pusillum* (Rhodophyceae). *Estuaries and Coasts* 29: 699-708.
- LEWIS, W.M. 1985. Nutrient scarcity as an evolutionary cause of haploidy. *American Naturalist* 125: 692-701.
- LOPES, P.F.; OLIVEIRA, M.C. & COLEPICCOLO, P. 1997. Diurnal fluctuation of nitrate reductase activity in the marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 33: 225-231.
- MCLACHLAN, J. 1973. *Growth media marine*. In Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements (Stein, J.R. ed.). Cambridge University Press, Cambridge, p. 25-51
- MSHIGENI, K.E. 1976. Studies on the reproduction of selected species of *Hypnea* (Rhodophyta, Gigartinales) from Hawaii. *Botanica Marina* 19: 341-346.

- MOSS, B. 1974. Attachment and germination of the zygotes of *Pelvetia canaliculata* (L.) Dcne.et. Thur. (Phaeophyceae, Fucales). *Phycologia* 13: 317-322.
- NAVARRO-ANGULO, L. & ROBLEDO, D. 1999. Effects of nitrogen source, N:P ratio and N-pulse concentration and frequency on the growth of *Gracilaria cornea* (Gracilariales, Rhodophyta) in culture. *Hydrobiologia* 398/399: 315-320.
- O'CONNOR, K.A. & WEST, J.A. 1991. The effect of light and nutrient conditions on hair cell formation in *Spyridia filamentosa* (Wulfen) Harvey (Rhodophyta). *Botanica Marina* 34: 359-364.
- OKUDA, T. & NEUSHUL, M. 1981. Sedimentation studies of red algal spores. *Journal of Phycology* 17: 113-118.
- OLIVEIRA, E.C.; CORBISIER, T.N.; ESTON, V.R. & AMBROSIO, O. 1997. Phenology of a seagrass (*Halodule wrightii*) bed on the southeast coast of Brazil. *Aquatic Botany* 56: 25-33.
- ORDUÑA-ROJAS, J. & ROBLEDO, D. 1999. Effects of irradiance and temperature on the release and growth of carpospores from *Gracilaria cornea* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta). *Botanica Marina* 42: 315-319.
- OZA, R.M. 1977. Culture studies on induction of tetraspores and their subsequent development in the red alga *Falkenbergia rufolanosa* (Harvey) Schmitz. *Botanica Marina* 20: 29-32.
- PACHECO-RUIZ, I.; ZERTRUCHE-GONZÁLEZ, J.A.; BUSTUS-BARRERA, M. & ARROYO-ORTEGA, E. 2001. Recruitment *in situ* and fertility of nuclear phases of *Gelidium robustum* (Rhodophyta). *Ciencias Marinas* 27: 35-46.
- PAULA, E.J.P.; ERBERT, C. & PEREIRA, R.T.L. 2001. Growth rate of the carragenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) *in vitro*. *Phycological Research* 49: 155-161.
- PLASTINO, E.M. 1985. As espécies de *Gracilaria* (Rhodophyta, Gigartinales) da Praia Dura, Ubatuba, SP. – aspectos biológicos e fenologia. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- RAMALHO, C.B.; HASTINGS, J.W. & COLEPICCOLO, P. 1995. Circadian oscillation of nitrate reductase activity in *Gonyaulax polyedra* is due to changes in cellular protein levels. *Plant Physiology* 107: 225-231.
- RODRIGO, M. & ROBAINA, R.R. 1997. Stress tolerance of photosynthesis in sporelings of the

- red alga *Grateloupia doryphora* compared to that of Stage III thalli. *Marine Biology* 128: 689-694.
- ROSSA, M. 1999. A luz como fator de regulação da atividade enzimática da nitrato redutase (NR) e superóxido desmutase (SOD) em *Gracilariopsis tenuifrons* (Rhodophyta). Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- RYTHER, J.H. & DUNSTAN, W.M. 1971. Nitrogen, phosphorus, and eutrofication in the coastal marine environment. *Science* 171: 1008-1013.
- SCARDINO, A.J.; GUENTHER, J. & NYS, R. DE. 2008. Attachment point theory revisited: the fouling response to a microtextured matrix. *Biofouling* 24: 45-53.
- SMIT, A.J. 2002. Nitrogen uptake by *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta): adaptations to a temporally variable nitrogen environment. *Botanica Marina* 45: 196-209.
- SOLOMONSON, L.P. & BARBER, M.J. 1990. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41: 225-253.
- SOUSA, A.I.; MARTINS, I.; LILLEBO, A.I.; FLINDT, M.R. & PARDAL, M.A. 2007. Influence of salinity, nutrients and light on the germination and growth of *Enteromorpha* sp. spores. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 341: 142-150.
- THOMAS, T.E. & HARRISON, P.J. 1985. A comparison of *in vitro* nitrate reductase assays in three intertidal seaweeds. *Botanica Marina* 31: 101-107.
- THOMAS, T.E.; HARRISON, P.J. & TURPIN, D.H. 1987. Adaptations of *Gracilaria pacifica* (Rhodophyta) to nitrogen procurement at different intertidal locations. *Marine Biology* 93: 569-580.
- TYRRELL, T. 1999. The relative influence of nitrogen and phosphorus on oceanic primary production. *Nature* 400: 525-531.
- URSI, S. & PLASTINO, E.M. 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. *Revista Brasileira de Botânica* 24: 587-594.
- VADAS, R.L.; JONHSON, S. & NORTON, T.A. 1992. Recruitment and mortality of early post-settlement stages of benthic algae. *British Phycological Journal* 27: 331-351.

- VENNESLAND, B. & SOLOMONSON, L.P. 1972. The nitrate reductase of *Chlorella*. Species or strain differences. *Plant Physiology* 49: 1029-1031.
- YE,N.; WANG, H. & WANG, G. 2006. Formation and early development of tetraspores of *Gracilaria lemaneiformis* (Gracilaria, Gracilariaceae) under laboratory conditions. *Aquaculture* 254: 219-226.
- YOUNG, E.B.; DRING, M.J.; SAVIDGE, G.; BIRKETT, D.A. & BERGES, J.A. 2007. Seasonal variations in nitrate reductase activity and internal N pools in intertidal brown algae are correlated with ambient nitrate concentrations. *Plant, Cell and Environment* 30: 764-774.
- ZAR, J.H. 1999. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey.

**Capítulo 4- Atividade fotossintetizante em plantas
juvenis de morfos pigmentares de *Gracilaria*
domingensis (Gracilariales, Rhodophyta)**

Trabalho realizado em colaboração com o Dr.

Ricardo M. Chaloub, UFRJ

1. Abstract

This work compared photosynthetic rates, PR (measured as oxygen evolution) of juvenile gametophytes and tetrasporophytes of pigment morphs of *Gracilaria domingensis* in laboratory. Chlorophyll-*a* and total carotenoids were also analyzed. PR were normalized to fresh biomass, dry biomass, and chlorophyll-*a* concentration. Pigment concentration (chlorophyll-*a* and total carotenoids) were not different among reproductive phases and pigment morphs. The P-I curves showed similar form, regardless of the normalization parameter, which indicated that all of them were appropriate to photosynthetic activity analysis of the species. The high I_k values (from 700 to 1400 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and the absence of photoinhibition in all testes strains suggests adaptation of *G. domingensis* juvenile plants to high irradiances. The light saturation parameter (I_k), as well as the dark respiration rates (R_e), were similar among strains, which indicates that the basal metabolisms of them are similar, at least when they are juvenile plants. Although not statistically different, the following tendencies were observed: i, higher P_{max} to the green morphs when compared to the red one, regardless of the reproductive phase or normalization parameter; and ii, P_{max} and α of the two brown tetrasporophytes were numerically higher than green and red morphs, which indicates the possibility of hybrid vigor. These characteristics contributed to the maintenance of the green allele in nature. Red tetrasporophytes showed higher I_k and lower I_c and α when compared to the other tetrasporophytic strains, which suggests mixed characteristics of sun and shadow plants. The present work was the first to study juvenile plants of pigment morphs of *Gracilaria domingensis*.

2. Resumo

Este trabalho avaliou taxas fotossintetizantes, TF (expressas em termos de quantidade líquida de O_2 produzido), das fases juvenis gametofíticas e tetrasporofíticas dos diferentes morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* em laboratório. Foram também avaliadas as quantidades de clorofila *a* e carotenóides totais das linhagens. TF foram normalizadas por: i, biomassa fresca; ii, biomassa seca; e iii, quantidade de clorofila *a*. A quantidade de pigmentos (clorofilas e carotenóides) não variou entre as linhagens gametofítica e tetrasporofítica dos diferentes morfos. A forma das curvas P x I foi semelhante, independentemente do parâmetro de normalização escolhido, indicando que todos eles foram adequados para avaliar a atividade fotossintetizante da espécie. Os altos valores de I_k (entre 700 e 1400 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e a ausência de fotoinibição em todas as linhagens testadas sugerem adaptação das plantas jovens de *G. domingensis* a altas irradiancias. O parâmetro de saturação luminosa (I_c), bem como as taxas de respiração no escuro (R_e) foram semelhantes entre as linhagens, indicando que todas elas possuam os mesmos valores de metabolismo basal, ao menos quando jovens. Foram observadas as seguintes tendências nos resultados (embora não estatísticas): i, maiores valores de P_{max} para o morfo verde com relação ao morfo vermelho, tanto para gametófitos como para tetrasporófitos, e independentemente do tipo de padronização dos

dados; e ii, $P_{\max}$ e α das duas linhagens de tetrasporófito marrom foram numericamente maiores que os das linhagens verde e vermelha, indicando a existência de um possível vigor híbrido. Essas características contribuiriam para a manutenção do alelo verde na natureza. Tetrasporófitos vermelhos apresentaram maior I_k e menor I_c e α quando comparados às demais linhagens tetrasporofíticas, sugerindo características mistas entre plantas de sol e de sombra. Este foi o primeiro trabalho a estudar a fotossíntese em plantas jovens de *Gracilaria domingensis* considerando-se os morfos verde, vermelho e marrons.

3. Introdução

A luz é um dos fatores ambientais que mais afetam as plantas. Isso é especialmente válido para algas de regiões entremarés, que estão sujeitas a grandes variações de irradiância ao longo do dia. Existem, na literatura, muitos estudos sobre a influência da irradiância na fotossíntese de algas vermelhas, como em *Chondrus crispus* (Mathieson & Norall 1975), *Endocladia muricata* (Britting & Chapman 1993), *Eucheuma denticulaum* (Dawes 1992), *Gelidium sesquipedale* (Silva *et al.* 1998), *Gracilaria birdiae* (Ursi *et al.* 2003; Donato 2005), *G. cornea* (Orduña-Rojas *et al.* 2002), *G. foliifera* (Friedlader & Dawes 1984), *G. domingensis* (Guimarães 2000), *G. tikvahiae* (Lapointe *et al.* 1984), *G. salicornia* (Phooprong *et al.* 2007), *Grateloupia doryphora* (Rodrigo & Robaina 1997), *Hypnea musciformis* (Yokoya *et al.* 2007), *Kappaphycus alaezii* (Dawes 1992), *Mazzaella laminarioides* (Varela *et al.* 2006), *Porphyra yezoensis* (Yan *et al.* 2000), entre outros. Alguns desses estudos comparam o desempenho fotossintetizante de variantes pigmentares da mesma espécie (Dawes 1992; Guimarães 2000; Yan *et al.* 2000; Ursi *et al.* 2003; Donato 2005; Yokoya *et al.* 2007), mas poucos abordam possíveis diferenças de fases do histórico de vida (Mathieson & Norall 1975; Britting & Chapman 1993; Rodrigo & Robaina 1997; Varela *et al.* 2006). Salienta-se, ainda, que todos esses trabalhos tiveram como objeto de estudo indivíduos adultos, mas poucos fornecem informações sobre o estágio reprodutivo das plantas utilizadas (Mathieson & Norall 1975; Guimarães 2000; Ursi *et al.* 2003; Donato 2005). Sabe-se que esta é uma informação muito importante do ponto de vista fisiológico, visto que o desempenho de plantas portando estruturas de reprodução pode ser distinto daquele observados para plantas inférteis (Guimarães *et al.* 1999).

A fotossíntese em algas costuma ser normalizada por dois parâmetros: i,

massa seca ou fresca (macroalgas) ou número de indivíduos (microalgas); ou ii, quantidade de clorofila (ambas). Esses dois tipos de normalização podem indicar aclimações distintas (Magalhães *et al.* 2004). Se ocorre um aumento no tamanho da antena, por exemplo, a fotossíntese máxima não é alterada se a fotossíntese é expressa pela quantidade de células (ou peso), mas diminui caso se use como parâmetro a quantidade de clorofila. Usualmente, se não ocorre variação no número de fotossistemas ativos, as diferenças encontradas são atribuídas à variação no tamanho da antena quando a normalização é feita por indivíduo.

Variantes pigmentares em Rhodophyta vêm sendo relatadas na literatura há muito tempo. Algumas dessas variantes são produzidas artificialmente em laboratório com o uso de agentes mutagênicos (van der Meer 1979; van der Meer & Zhang 1988; Sivan & Arad 1993), enquanto que outras são espontâneas (van der Meer & Bird 1977; van der Meer 1979; Pueschel & van der Meer 1983; Steele *et al.* 1986; Paula *et al.* 1999; Plastino *et al.* 1999; Ursi & Plastino 2001; Ferreira *et al.* 2006; Niwa *et al.* 2008). Sabe-se muito pouco sobre a frequência com que variantes pigmentares são encontradas na natureza. Caso esta frequência seja igual ou superior a 1%, a variante pode ser considerada como um morfo (Futuyma 1998). *Gracilaria domingensis* apresenta morfos pigmentares em suas populações (Guimarães *et al.* 2003). Plantas verdes, vermelhas e marrons podem ser encontradas crescendo lado a lado em uma mesma população. Apesar de alguns aspectos fisiológicos dessa espécie já terem sido estudados em laboratório, como a influência da irradiância e da temperatura na fotossíntese e no crescimento (Guimarães 2000), até o presente não havia estudos sobre o morfo marrom de *G. domingensis*, nem sobre as diferentes fases (gametófito e tetrasporófito) do histórico de vida.

Tendo em vista o exposto, este trabalho teve como objetivo verificar possíveis diferenças na atividade fotossintetizante das fases juvenis gametofíticas e tetrasporofíticas inférteis dos morfos pigmentares de *G. domingensis*. Nossa hipótese era a de que havia diferenças significativas nos parâmetros fotossintetizantes entre os morfos, o que contribuiria para explicar a manutenção do polimorfismo pigmentar na natureza.

4. Material e Métodos

4.1. Material biológico

Plântulas gametofíticas verdes e vermelhas e tetrasporofíticas verdes, vermelhas e marrons de *G. domingensis* foram obtidas a partir de esporos e cultivadas conforme descrito no capítulo 1, porém sob $40 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, durante dois meses. Após esse período, elas foram transportadas para o Laboratório de Estudos Aplicados em Fotossíntese (LEAF) do Instituto de Química da UFRJ, onde foram utilizadas nos experimentos de produção de oxigênio, realizados em três repetições, cada uma consistindo de ápices de 1 cm de comprimento, não ramificados e não-férteis.

4.2. Condições de cultivo empregadas no LEAF

4.2.1. Coleta e preparação da água do mar

A água do mar, coletada na área de proteção ambiental de Grumari, Rio de Janeiro, RJ, foi filtrada em papel de filtro de celulose de $2,0 \mu\text{m}$ de poro, com o auxílio de uma bomba de vácuo, e posteriormente autoclavada a 121°C por 30 minutos. A salinidade foi de 32 ups.

4.2.2. Condições de cultivo

As algas foram cultivadas em frascos Erlenmeyer contendo 100 ml de água

do mar enriquecida, sem aeração, em temperaturas variando de 23 a 25 °C e fotoperíodo de 14 horas. A densidade do fluxo de fótons da radiação fotossinteticamente ativa (400 a 700 nm) foi de 10 $\mu\text{mol fótons. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, provinda de lâmpadas fluorescentes Philips + LT 20W/75RS Extra Luz do Dia e Daylight F15T8-D, estimada por meio de um sensor quântico co-seno corrigido (modelo LI-190SB), acoplado a um integrador radiométrico (modelo LI-185B, Li-Cor Inc., USA). Essa irradiância corresponde à de 30 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ medida na água com o sensor esférico. 24 h antes de realizar as medições dos parâmetros de fotossíntese, a irradiância foi aumentada para 50 $\mu\text{mol fótons. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (correspondente a 150 $\mu\text{mol fótons. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ na água) e as algas foram mantidas em aeração constante.

4.3. Testes preliminares

Dois testes preliminares foram realizados com o objetivo de verificar: i, a quantidade de ápices para a qual o valor da fotossíntese fosse máximo; e ii, se a data de troca da solução de água do mar enriquecida influenciava os resultados. No primeiro teste, foram utilizados 4, 8, 12, 14 ou 16 ápices de gametófitos verdes e vermelhos em uma irradiância de 1700 $\mu\text{mol fótons. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, estimada na superfície externa do compartimento de amostras do eletrodo. Foi escolhida uma irradiância alta para que a fotossíntese não fosse limitada por luz. No segundo, a fotossíntese de 12 ápices de gametófitos verdes foi avaliada em duas condições: i, 24h após a troca da solução de água do mar enriquecida; ii, 48h após essa troca. Esses testes preliminares não foram feitos com repetições.

4.4. Produção de oxigênio

A troca líquida de O_2 foi estimada por polarografia em eletrodo de oxigênio tipo Clark (Rank and Brothers, U.K.) mantido a 25 °C com o auxílio de um banho de circulação termostatizado (Haake, Germany) e acoplado a um registrador linear. A quantidade de oxigênio dissolvido na água foi previamente calibrada pela adição de ditionito de sódio ($Na_2S_2O_4$). Um total de 12 ápices (correspondentes a uma repetição) foi colocado em uma cubeta contendo uma solução de 4ml de água do mar e bicarbonato de sódio, em concentração final de 5mM (pH = 8,4), para que a atividade fotossintetizante não fosse limitada pela disponibilidade de CO_2 . Essa solução foi constantemente misturada por um agitador magnético em velocidade constante. A agitação da solução tem por objetivo garantir um fluxo constante e máximo de oxigênio do compartimento de amostra para o eletrodo, através da membrana semi-permeável. A luz, provida de uma lâmpada Osram HL - Xenophot, 100W, foi conduzida até a superfície do compartimento das amostras por meio de um feixe de fibras óticas.

Após avaliar a respiração no escuro, as amostras foram iluminadas com 15 diferentes irradiâncias crescentes (medidas no ar), variando entre 15-2000 μmol fótons. m^{-2} . s^{-1} . Essas diferentes intensidades luminosas, medidas na superfície do compartimento de amostras, foram obtidas mediante a utilização de filtros de densidade neutra entre a luz incidente e o alvo. A velocidade de produção de oxigênio foi determinada quando cada curva se tornou constante, após 3 a 5 minutos. Os dados experimentais foram ajustados pela equação modelo, a função tangente hiperbólica, proposta por Jassby & Platt (1976) e descrita a seguir:

P = taxa fotossintetizante

P_m = taxa fotossintetizante máxima

$\tanh$ = tangente hiperbólica

$$P = P_m \cdot \tanh \cdot (\alpha E / P_m) + R_e$$

α = inclinação inicial da curva

E = irradiância

R_e = taxa de respiração no escuro

O parâmetro de saturação luminosa (I_k) foi calculado como $P_{\max}/\alpha$, e a irradiância de compensação (I_c) como R_e/α . Os gráficos e os valores de $P_{\max}$ e R_e foram produzidos com o auxílio do programa Sigma Plot 10.0. Os valores da eficiência fotossintetizante relativa (α) foram obtidos pela regressão linear de cinco a seis valores positivos da curva $P \times I$ inicial, com o auxílio do programa Excel. Todos os valores de r^2 foram maiores que 0,95.

As medidas foram realizadas sempre entre as 10 e as 15h (isto é, 3-8 h após o início do fotoperíodo nas câmaras de cultivo) para evitar possíveis efeitos de ritmos circadianos. O equipamento foi calibrado todos os dias, antes de iniciarem as medidas.

4.5. Determinação de clorofila a e carotenóides totais e peso seco

Após as medidas de troca de líquida de O_2 , os ápices foram colocados em placas de metal cobertas com papel de filtro (Figura 1), previamente secos e pesados, sendo o peso fresco aferido em balança analítica. Em seguida, os ápices foram transferidos para frascos âmbar contendo 4 mL de dimetil-sulfoxido (DMSO), tampados e mantidos por 40 minutos em banho a 60°C protegidos da luz (Hiscox & Israelstam 1979). O tempo de exposição ao DMSO foi estimado através

da confecção prévia de uma curva de extração de pigmentos em função do tempo. As absorbâncias de cada amostra foram estimadas em 480 e 665 nm em espectrofotômetro Hitachi UV-Vis (modelo U-1100). A cada valor de absorbância utilizado nas equações já descritas foi diminuída a turbidez registrada em 750 nm. Após a leitura das absorbâncias, os ápices foram novamente transferidos para as placas de metal, onde permaneceram secando sob uma lâmpada que emitia calor (Fisher Infra-Radiator). As placas de metal foram resfriadas em uma placa de Petri contendo sílica gel, sendo a massa seca determinada após a obtenção de massa constante (40 min).

Figura 1- Recipientes de metal cobertos com papel filtro, utilizados para averiguação da massa seca. Algas secando sob lâmpada que emitia calor.

A clorofila *a* e os carotenóides totais foram quantificados de acordo com as equações propostas para clorofilas e carotenóides (Wellburn, 1994), abaixo descritas:

$$\text{Clorofila } a \text{ (Chl } a) = 13,8 \times A_{665}$$

$$\text{Carotenóides totais} = (1000 \times A_{480} - 2,14 \times \text{Chl } a) / 220$$

As trocas líquidas de oxigênio foram normalizadas por três parâmetros: massa fresca, massa seca e quantidade de clorofila *a*.

4.6. Análises estatísticas

Os parâmetros da atividade fotossintetizante ($P_{\max}$, R_e , α , I_k e I_c) e os dados referentes à quantidade de pigmentos foram submetidos a análises estatísticas de variância unifatoriais (fator: linhagem) com o auxílio do programa Statistica 6.0. Diferenças significativas foram consideradas com valores de $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Testes preliminares

Testes da quantidade de ápices a serem utilizados nos experimentos de produção de oxigênio são importantes para detectar um possível efeito de sombreamento que um ápice possa produzir sobre outro. Nesse caso, as taxas fotossintetizantes diminuiriam com o aumento da quantidade de ápices. A quantidade máxima de ápices testada no presente trabalho (16) não foi suficiente para produzir um efeito de sombreamento (tabela 1). Dessa forma, não faria diferença utilizar 4, 8 ou 12 ápices. Optou-se pela quantidade de 12 ápices nos experimentos seguintes por ser mais conveniente trabalhar com valores mais altos de taxas fotossintetizantes.

Tabela 1- Taxas fotossintetizantes ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg peso fresco}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) de gametófitos jovens verdes e vermelhos de *G. domingensis* utilizados no teste preliminar para verificação da quantidade ideal de ápices para os experimentos de fotossíntese.

Quantidade de ápices	Gametófitos verdes	Gametófitos vermelhos
4	5,876	8,731
8	5,943	8,731
12	8,956	10,990
14	8,705	13,007
16	9,636	11,814

Foram verificadas diferenças na fotossíntese dos ápices quando a troca de água do mar enriquecida foi realizada um ou dois dias antes do experimento, sendo esta maior no primeiro caso (figura 2). Por este motivo, a água do mar enriquecida foi trocada 24h antes do início dos experimentos posteriores.

Figura 2- Curvas Fotossíntese x Irradiância obtidas a partir do modelo da tangente hiperbólica (Jassby & Platt 1976) para gametófitos jovens verdes de *Gracilaria domingensis* 24 e 48 h antes da troca de água do mar enriquecida. Experimento realizado sem repetições. Cada curva corresponde às medidas de 12 ápices. MF, massa fresca.

5.2. Quantidade de clorofila *a* e carotenóides totais

Não houve diferenças estatísticas significativas na quantidade de clorofila entre as diferentes linhagens de gametófitos e tetrasporófitos, tanto quando essa quantidade foi expressa em termos de massa fresca (figura 3) quanto massa seca ($p > 0,232$) (figura 4). O mesmo ocorreu para os carotenóides totais ($p > 0,337$) (figuras 3 e 4).

Figura 3- Valores médios da concentração de clorofila *a* (chl *a*) e carotenóides totais (car) em gametófitos jovens verdes (Gam vd) e vermelhos (Gam vm) e tetrasporófitos jovens verdes (Tet vd), vermelhos (Tet vm) e marrons (Tet vmvd e Tet vdvm) de *Gracilaria domingensis*. MF, massa fresca. Barras de erro: desvio-padrão. n= 3.

Figura 4- Valores médios da concentração de clorofila *a* (chl *a*) e carotenóides totais (car) em gametófitos jovens verdes (Gam vd) e vermelhos (Gam vm) e tetrasporófitos jovens verdes (Tet vd), vermelhos (Tet vm) e marrons (Tet vmvd e Tet vdvm) de *Gracilaria domingensis*. BS, massa seca. Barras de erro: desvio-padrão. n= 3.

5.3. Produção de O₂

5.3.1. Normalização por massa fresca

Os valores dos parâmetros fotossintetizantes de gametófitos e tetrasporófitos jovens de *Gracilaria domingensis* encontram-se na tabela 1. As curvas P x I de gametófitos jovens verdes e vermelhos são mostradas na figura 5. Todos os parâmetros de fotossíntese ($P_{\max}$, α , R_e , I_c e I_k) foram semelhantes entre si ($p > 0,26$). Já os tetrasporófitos apresentaram diferenças em alguns deles. A eficiência fotossintetizante (α) de tetrasporófitos vermelhos foi menor que a das demais linhagens tetrasporofíticas ($p < 0,048$), as quais foram semelhantes entre si ($p > 0,20$). A fotossíntese máxima ($P_{\max}$) de tetrasporófitos jovens vermelhos foi menor que a de tetrasporófitos da linhagem marrom (VdVm) ($p = 0,04$), porém semelhante ao das demais linhagens tetrasporofíticas ($p > 0,26$). As outras linhagens tetrasporofíticas (verde, marrom VmVd e marrom VdVm) tiveram valores de $P_{\max}$ semelhantes ($p > 0,06$). O parâmetro de saturação luminosa (I_k) de tetrasporófitos jovens vermelhos foi maior que o das demais linhagens tetrasporofíticas ($p < 0,04$), que foram semelhantes entre si ($p > 0,52$). A irradiância de compensação (I_c) e a respiração do escuro (RD) das linhagens tetrasporofíticas jovens foram semelhantes entre si ($p > 0,17$). As curvas P x I de tetrasporófitos jovens de *G. domingensis* são mostradas na figura 6. Comparando-se gametófitos e tetrasporófitos, todos os parâmetros foram semelhantes ($p > 0,37$), com uma exceção. I_k dos gametófitos foi menor que o de tetrasporófitos vermelhos ($p < 0,04$), mas semelhante ao dos demais tetrasporófitos ($p > 0,65$).

Tabela 2. Médias (n=3) dos parâmetros da curva Fotossíntese x Irradiância das três repetições de cada linhagem gametofítica e tetrasporofítica dos diferentes morfos pigmentares jovens de *Gracilaria domingensis*. Normalização dos dados por massa fresca. R_e e F_{max} , $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg massa fresca}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; I_k , irradiância de saturação ($\mu\text{mol fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$); I_c , irradiância de compensação ($\mu\text{mol fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

Linhagem	R_e	F_{max}	α	I_k	I_c
Gam vm	$-1,925 \pm 1,089$	$22,180 \pm 1,079$	$0,027 \pm 0,010$	$920,479 \pm 415,210$	$69,113 \pm 16,570$
Gam vd	$-1,725 \pm 1,327$	$26,961 \pm 3,925$	$0,028 \pm 0,005$	$946,580 \pm 32,430$	$57,423 \pm 44,250$
Tet vm	$-1,563 \pm 0,306$	$22,327 \pm 5,217$	$0,016 \pm 0,004$	$1386,133 \pm 223,635$	$101,657 \pm 36,526$
Tet vd	$-1,363 \pm 0,825$	$23,803 \pm 1,378$	$0,033 \pm 0,001$	$725,947 \pm 41,147$	$41,572 \pm 25,280$
Tet mr	$-1,434 \pm 0,276$	$28,717 \pm 7,004$	$0,033 \pm 0,008$	$875,808 \pm 117,891$	$46,342 \pm 20,045$
(VmVd)					
Tet mr	$-1,939 \pm 1,903$	$33,193 \pm 1,511$	$0,040 \pm 0,006$	$834,186 \pm 81,673$	$45,229 \pm 38,816$
(VdVm)

Figura 5- Curvas Fotossíntese x Irradiância obtidas a partir do modelo da tangente hiperbólica (Jassby & Platt 1976) para os gametófitos jovens verdes (Gam vd) e vermelhos (Gam vm) das três repetições de *Gracilaria domingensis*. Barras de erro: desvio-padrão. MF, massa fresca. n= 3.

Figura 6- Curvas Fotossíntese x Irradiância obtidas a partir do modelo da tangente hiperbólica (Jassby & Platt 1976) para os tetrasporófitos jovens marrons (Tet mr (vmvd) e Tet mr (vdvm)), verdes (Tet vd) e vermelhos (Tet vm) das três repetições de *Gracilaria domingensis*. Barras de erro, desvio-padrão. MF, massa fresca. n= 3.

5.3.2. Normalização por peso seco

Os valores dos parâmetros fotossintetizantes de gametófitos e tetrasporófitos jovens de *Gracilaria domingensis* encontram-se na tabela 2. As curvas P x I de gametófitos jovens verdes e vermelhos são mostradas na figura 7. Todos os seus parâmetros de fotossíntese (P_{max} , α , R_e , I_c e I_k) foram semelhantes entre si ($p > 0,10$). Já nos tetrasporófitos houve diferenças em alguns deles. A eficiência fotossintetizante relativa (α) de tetrasporófitos vermelhos foi menor que a da linhagem marrom VmVd ($p = 0,048$), porém semelhante à das demais linhagens tetrasporofíticas ($p > 0,06$), semelhantes entre si ($p > 0,18$). I_k de tetrasporófitos vermelhos foi maior que o da linhagem marrom VmVd ($p = 0,020$), porém semelhante à das demais linhagens tetrasporofíticas ($p > 0,06$), que foram semelhantes entre si ($p > 0,20$). Os demais parâmetros (I_c , R_e e P_{max}) apresentaram

valores semelhantes entre as linhagens tetrasporofíticas ($p > 0,10$). As curvas $P \times I$ dos tetrasporófitos jovens são mostradas na figura 8. Comparando-se gametófitos e tetrasporófitos jovens, todos os parâmetros foram semelhantes ($p > 0,10$), com exceção de I_k . Gametófitos vermelhos apresentaram menores valores para esse parâmetro quando comparados a tetrasporófitos vermelhos e verdes ($p < 0,04$), mas semelhante ao de ambos tetrasporófitos marrons ($p > 0,11$). Gametófitos verdes apresentaram menores valores de I_k quando comparados a tetrasporófitos vermelhos ($p = 0,02$), mas semelhantes às demais linhagens tetrasporofíticas ($p > 0,18$).

Tabela 3. Médias ($n=3$) dos parâmetros da curva Fotossíntese x Irradiância das três repetições de cada linhagem gametofítica e tetrasporofítica dos diferentes morfos pigmentares de *G. domingensis*. Normalização dos dados por massa seca. R_e e F_{max} : $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg massa seca}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; I_k : irradiância de saturação ($\mu\text{mol fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$); I_c : irradiância de compensação ($\mu\text{mol fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

Linhagem	R_e	F_{max}	α	I_k	I_c
Gam vm	$-20,140 \pm 10,822$	$234,280 \pm 14,877$	$0,331 \pm 0,039$	$715,795 \pm 110,931$	$59,245 \pm 25,171$
Gam vd	$-18,781 \pm 13,864$	$308,182 \pm 49,560$	$0,350 \pm 0,067$	$888,314 \pm 81,732$	$57,530 \pm 44,945$
Tet vm	$-19,778 \pm 1,305$	$295,993 \pm 144,351$	$0,209 \pm 0,105$	$1434,436 \pm 183,199$	$107,678 \pm 38,241$
Tet vd	$-19,179 \pm 11,878$	$318,804 \pm 31,237$	$0,272 \pm 0,058$	$1197,026 \pm 164,937$	$68,226 \pm 30,214$
Tet mr (vmvd)	$-19,715 \pm 5,510$	$398,376 \pm 62,567$	$0,233 \pm 0,044$	$938,843 \pm 70,911$	$46,556 \pm 11,656$
Tet mr (vdvm)	$-11,649 \pm 0,003$	$412,382 \pm 81,336$	$0,401 \pm 0,118$	$1067,521 \pm 308,792$	$30,538 \pm 7,755$

Figura 7- Curvas Fotossíntese x Irradiância obtidas a partir do modelo da tangente hiperbólica (Jassby & Platt 1976) para as três repetições de gametófitos jovens verdes (Gam vd) e vermelhos (Gam vm) de *Gracilaria domingensis*. Barras de erro: desvio-padrão. BS, biomassa seca. n= 3.

Figura 8- Curvas Fotossíntese x Irradiância obtidas a partir do modelo da tangente hiperbólica (Jassby & Platt 1976) para as três repetições de tetrasporófitos jovens marrons (Tet mr (vmvd) e Tet mr (vdvm)), verdes (Tet vd) e vermelhos (Tet vm) de *Gracilaria domingensis*. Barras de erro: desvio-padrão. MS, massa seca. n= 3.

5.3.3. Normalização pela quantidade de clorofila *a*

Os valores dos parâmetros fotossintetizantes de gametófitos e tetrasporófitos jovens de *Gracilaria domingensis* encontram-se na tabela 4. As curvas P x I de gametófitos jovens verdes e vermelhos são mostradas na figura 9, e a de tetrasporófitos jovens verdes, vermelhos e marrons, na figura 10. Os parâmetros $P_{\max}$, R_e , I_c e I_k apresentaram valores semelhantes entre todas as linhagens gametofíticas e tetrasporofíticas ($p > 0,11$). α de tetrasporófitos vermelhos foi menor que a de tetrasporófitos marrons (VdVm) ($p = 0,03$), porém semelhante à dos demais tetrasporófitos ($p > 0,06$), semelhantes entre si ($p > 0,64$). Gametófitos verdes e vermelhos apresentaram os valores semelhantes de α ($p = 0,95$).

Tabela 4. Médias (n=3) dos parâmetros da curva Fotossíntese x Irradiância das três repetições de cada linhagem gametofítica e tetrasporofítica dos diferentes morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis*. Normalização dos dados por quantidade de clorofila *a*. R_e e $F_{\max}$: $\mu\text{mol O}_2 \cdot \mu\text{g clorofila } a^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; I_k : irradiância de saturação ($\mu\text{mol fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$); I_c : irradiância de compensação ($\mu\text{mol fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

Linhagem	R_e	$F_{\max}$	α	I_k	I_c
Gam vm	-5,485± 4,874	88,930± 20,890	0,112± 0,016	825,314± 324,008	45,858± 36,220
Gam vd	-5,716± 4,445	90,638± 4,624	0,103± 0,007	888,553± 81,632	57,531± 44,936
Tet vm	-4,756± 0,761	67,602± 20,142	0,056± 0,030	1299,280± 317,273	101,537± 48,830
Tet vd	-5,284± 3,683	85,507± 14,074	0,105± 0,033	858,948± 227,388	47,980± 20,505
Tet mr (vmvd)	-4,807± 1,037	99,320± 26,184	0,107± 0,024	978,802± 422,330	47,085± 16,747
Tet mr (vdvm)	-7,366± 7,241	111,620±	0,125± 0,017	896,916± 39,302	55,876± 48,858
		14,122

Figura 9- Curvas Fotossíntese x Irradiância obtidas a partir do modelo da tangente hiperbólica (Jassby & Platt 1976) para as três repetições de gametófitos jovens verdes (Gam vd) e vermelhos (Gam vm) de *Gracilaria domingensis*. Barras de erro, desvio-padrão. n= 3.

Figura 10- Curvas Fotossíntese x Irradiância obtidas a partir do modelo da tangente hiperbólica (Jassby & Platt 1976) para as três repetições de tetrasporófitos jovens marrons (Tet mr (vmvd) e Tet mr (vdvm)), verdes (Tet vd) e vermelhos (Tet vm) de *Gracilaria domingensis*. Barras de erro: desvio-padrão. n= 3.

6. Discussão

Todas as metodologias utilizadas para a padronização da fotossíntese neste trabalho (massa fresca, massa seca e clorofila *a*) se mostraram adequadas, já que a forma das curvas $P \times I$ foi semelhante, independentemente do parâmetro escolhido. Porém, a normalização pela massa fresca foi a que refletiu as maiores diferenças entre as linhagens. Não era esperado que diferenças nos parâmetros fotossintetizantes fossem observadas para a padronização por massa fresca ou seca, já que todas as linhagens apresentaram massas (fresca e seca) semelhantes entre si. A normalização pela quantidade de clorofila foi a que detectou menores diferenças entre os morfos. É sabido que se o número de unidades fotossintetizantes aumenta, a curva $P \times I$ é semelhante se a padronização dos dados é feita por meio da quantidade de clorofila, mas diferenças entre os parâmetros aparecem se os dados forem normalizados por número de células ou massa: I_k , P_{max} e α também aumentam. Já se ocorre um aumento no tamanho das unidades fotossintetizantes, quando a fotossíntese é expressa por meio da quantidade de clorofila, P_{max} e α diminuem, mas I_k permanece constante; e quando a fotossíntese é expressa por meio de número de células (ou massa), P_{max} permanece constante, mas I_k e α diminuem (Prézelin 1981). Dessa forma, é possível que o tetrasporófito vermelho analisado neste trabalho tenha uma quantidade menor de unidades fotossintetizantes (menor α e maior P_{max} e I_k quando a fotossíntese foi normalizada por meio da massa), mas de maior tamanho (menor α , quando a fotossíntese foi normalizada por meio da quantidade de clorofila *a*). Poderíamos, em um primeiro momento, considerar o tetrasporófito vermelho como planta de sol, já que apresentou um alto

I_k é uma baixa α , quando comparado às demais linhagens tetrasporofíticas. Entretanto, os dados sugerem que essa linhagem pode ter apenas uma tolerância grande a irradiâncias altas (alto I_k), mas um baixo aproveitamento da energia incidente (baixo α e baixa P_{max}), demonstrando que a distinção entre plantas de sol e de sombra nem sempre é clara e requer interpretações cautelosas. Tetrasporófitos vermelhos jovens apresentam também menores taxas de crescimento quando comparados aos demais morfos (L.B. Ferreira & E.M. Plastino, dados não publicados).

As respostas obtidas para as diferentes metodologias de padronização da fotossíntese foram mais homogêneas em gametófitos do que em tetrasporófitos, possivelmente porque estes, por serem diplóides, possuem um conjunto genético maior que o de gametófitos, o que poderia ampliar a variedade de respostas a um determinado fator.

A semelhança na quantidade de clorofila *a* nas plantas jovens das diferentes linhagens pigmentares de *Gracilaria domingensis* corrobora dados anteriores obtidos com plantas adultas da espécie, que demonstraram que as diferenças de cor entre as linhagens devem-se principalmente à quantidade de ficoeritrina: maior nas plantas vermelhas, menor nas verdes, e intermediária nas marrons (Guimarães *et al.* 2003). Ramus & van der Meer (1983) encontraram também conteúdos de clorofila semelhantes entre plantas selvagens e mutantes pigmentares de *G. tikvahiae*. No entanto, quantidades diferentes de clorofila *a* já foram detectadas para variantes pigmentares do gênero (Plastino *et al.* 2004; Kursar *et al.* 1983). A quantidade de carotenóides totais foi também semelhante em todas as linhagens testadas. Esses resultados sugerem que, na natureza, os morfos verde, vermelho e marrom de *G.*

domingensis tenham a mesma capacidade de fotoproteção. É preciso levar em conta, no entanto, que em condições de estresse luminoso e hídrico, aos quais as algas estão sujeitas, por ocorrerem em regiões entremarés, diferenças na quantidade e no tipo de carotenóides presentes nas linhagens poderiam ser detectadas.

As Rhodophyta geralmente são reconhecidas como plantas de sombra, por possuírem, muitas vezes, baixa irradiância de compensação (I_c) e de saturação (I_k) e alta eficiência fotossintetizante (α), como já foi referido para muitas espécies (Mathieson & Dawes 1974; Murase *et al.* 1989; Dawes *et al.* 1998), inclusive para gametófitos adultos de *Gracilaria domingensis* (Guimarães 2000). Os altos valores de I_k (entre 700 e 1400 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e a ausência de fotoinibição em todas as linhagens testadas no presente trabalho, porém, sugerem que as plantas jovens de *G. domingensis* estão bem adaptadas a aproveitar altas irradiâncias. Outras espécies tropicais de Rhodophyta podem também exibir um grau elevado de tolerância a altas irradiâncias, sem a ocorrência de fotoinibição (Lapointe *et al.* 1984; Penniman & Mathieson 1985; Coutinho & Yoneshigue 1988; Dawes 1992; Orduña-Rojas *et al.* 2002; Ursi *et al.* 2003). Como a I_c e a I_k dependem da irradiância em que as algas estavam crescendo anteriormente (Gantt 1990), pode-se especular que, na natureza, *G. domingensis* possua tolerância ainda maior a altas irradiâncias.

Não são muitos os trabalhos na literatura que comparam a fotossíntese de variantes pigmentares da mesma espécie. Diferenças nos parâmetros fotossintetizantes entre linhagens de cor já foram relatadas anteriormente para gametófitos adultos de *Gracilaria birdiae* (Ursi *et al.* 2003) e *G. domingensis* (Guimarães 2000), sendo que para esta espécie, foi possível distinguir características de plantas de sol para gametófitos verdes e de plantas de sombra para gametófitos vermelhos.

No presente trabalho, apesar de a análise estatística não ter detectado diferenças em nenhum parâmetro fotossintetizante de gametófitos verdes e vermelhos jovens, $P_{\max}$ de gametófitos verdes parece ser maior que a de gametófitos vermelhos, independentemente do tipo de padronização dos dados. Taxas de crescimento de gametófitos jovens verdes e vermelhos da espécie, no entanto, são semelhantes (L.B. Ferreira & E.M. Plastino, dados não publicados).

Foi detectada uma diferença estatística na $P_{\max}$ do tetrasporófito marrom jovem (VdVm) com relação ao tetrasporófito vermelho jovem, apenas quando os dados foram normalizados pela massa fresca. Da mesma maneira, as duas linhagens de tetrasporófito marrom apresentaram maiores valores de α com relação ao tetrasporófito vermelho somente quando os dados foram padronizados pela massa fresca. No entanto, ao observar as curvas $P \times I$, é possível notar duas tendências, independentemente do tipo de normalização feito: $P_{\max}$ e α das duas linhagens de tetrasporófito marrom parecem maiores que a das linhagens verde e vermelha. Essa tendência indica um possível vigor híbrido para os tetrasporófitos marrons: além de possuírem uma alta eficiência fotossintetizante, o que os tornaria bem adaptados a aproveitar irradiâncias baixas, os altos valores de $P_{\max}$ refletiriam a aptidão dessas linhagens a aproveitar irradiâncias altas. Essas características tornariam o morfo marrom capaz de se aclimatar a vários níveis de irradiância distintos na natureza, o que contribuiria para a manutenção do alelo verde. É possível que com um n amostral maior essas diferenças fossem detectadas por um teste estatístico.

Plantas jovens de *G. domingensis* apresentaram I_c que variaram entre 40 e 107 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, superiores aos encontrados anteriormente para a espécie: 36 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Schubert *et al.* 2006) e 11 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Guimarães 2000).

As taxas de respiração foram também maiores (aproximadamente $1,650 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg massa fresca}^{-1}$) do que a de gametófitos adultos (aproximadamente $0,026 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg massa fresca}^{-1}$) (Guimarães 2000). Como esses dois parâmetros (I_c e R_c) relacionam-se ao gasto energético, podemos concluir que a taxa metabólica das plantas jovens de *G. domingensis* é bem maior que a de plantas adultas, o que é também refletido nas maiores taxas de crescimento de plantas jovens da espécie (E.M. Ferreira & E.M. Plastino, dados não publicados). Gametófitos adultos verdes de *G. domingensis* apresentaram maiores valores de I_c do que gametófitos adultos vermelhos (Guimarães 2000). No presente trabalho, contudo, os diferentes morfos pigmentares jovens da espécie apresentaram I_c semelhantes. O mesmo resultado foi obtido para linhagens cromáticas tetrasporófitas de *G. birdiae* (Donato 2005). R_c entre os diferentes morfos pigmentares de *G. domingensis* foi semelhante, tanto em plantas jovens (este trabalho) como em um anterior, com gametófitos verdes e vermelhos adultos (Guimarães 2000). Os valores de I_c e R_c encontrados no presente trabalho indicam que todas as linhagens de *G. domingensis* apresentem aproximadamente os mesmos valores de metabolismo basal, ao menos quando jovens.

Não foi possível verificar diferenças claras nos padrões da fotossíntese de gametófitos e tetrasporófitos jovens de *Gracilaria domingensis*. Apenas o tetrasporófito vermelho parece se destacar dos demais, apresentando maior I_k e menor I_c e α . Maiores taxas fotossintetizantes já foram observadas para tetrasporófitos quando comparados a gametófitos de algas vermelhas (Mathieson & Norall 1975; Britting & Chapman 1993; Varela *et al.* 2006). Mathieson & Norall (1975) encontraram maiores taxas fotossintetizantes para plantas tetrasporófitas de *Chondrus crispus* com relação

a plantas cistocárpicas. Os autores atribuíram essas diferenças à distribuição geográfica das duas fases: plantas cistocárpicas ocorrendo em maior abundância em regiões entremarés e infra-litoral superior, e as tetrasporofíticas no infra-litoral médio. Não são encontrados padrões de distribuição distintos para gametófitos e tetrasporófitos de *G. domingensis* (Guimarães *et al.* 2003). Deve-se considerar, ainda, que o presente trabalho comparou gametófitos e tetrasporófitos não férteis. Experimentos futuros poderiam utilizar plantas férteis para verificar se os padrões observados com os jovens não férteis seriam mantidos, já que é sabido que a reprodução pode afetar a capacidade somática da espécie (Guimarães *et al.* 1999).

Em conclusão, este foi o primeiro trabalho a estudar a fotossíntese de plantas jovens e do morfo marrom de *Gracilaria domingensis*. Houve uma tendência a maiores valores de P_{max} para o morfo verde com relação ao morfo vermelho, tanto para gametófitos como para tetrasporófitos, e independentemente do tipo de padronização dos dados (massa fresca, massa seca ou quantidade de clorofila *a*). Esses resultados corroboram a hipótese proposta por Guimarães (2000) de que o morfo vermelho tenha uma menor capacidade somática que a do morfo verde. Os dados sugerem, ainda, que o morfo marrom possa ter um importante papel na manutenção do alelo verde na natureza, como consequência do seu vigor híbrido.

7. Referências

- ARUGA, Y. & MIURA, A. 1984. *In vivo* absorption spectra and pigment contents of the two types of color mutants of *Phorphyra*. *Japanese Journal of Phycology* 32: 243- 250.
- BRITTING, S.A. & CHAPMAN, D. J. 1993. Physiological comparison of the isomorphic life history phases of the high intertidal alga *Endocladia muricata* (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 29: 739-745.
- COUTINHO, R. & YONESHIGUE, Y. 1988. Diurnal variation in photosynthesis vs. irradiance

- curves form “sun” and “shade” plants of *Pterocladia capillacea* (Gmelin) Bornet *et* Thuret (Gelidiaceae: Rhodophyta) from Cabo Frio, Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 118: 217-228.
- DAWES, C.J. 1992. Irradiance acclimation of the cultured Philippine seaweeds *Kappaphycus alvarezii* and *Eucheuma denticulatum*. *Botanica Marina* 35: 189-195.
- 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, SP.
- EDWARDS, P. 1970. Illustrated guide of seaweeds and sea grasses in vicinity of Porto Arkansas, Texas. *Contrib. Mar. Sci.* 15: 1-228.
- FERREIRA, L.B.; BARUFI, J.B. & PLASTINO, E.M. 2006. Growth of red and Green strains of *Gracilaria cornea* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) in laboratory. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 187-192.
- FRIEDLANDER, M. & DAWES, C.J. 1984. Studies on spore release and sporeling growth from carpospores of *Gracilaria foliifera* (Forsskal) Borgesen var. *angustissima* (Harvey) Taylor. II. Photosynthetic and respiratory responses. *Aquatic Botany* 19: 233-241.
- GANTT, E. 1990. Pigmentation and photoacclimation. In *Biology of the Red Algae*. (Cole, K. M. Sheath, R.G., editores). Cambridge University Press, Cambridge.
- GUIMARÃES, M. 2000. Aspectos fisiológicos de *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta): subsídios para a compreensão da manutenção do polimorfismo pigmentar. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, SP.
- GUIMARÃES, M.; PLASTINO, E.M. & DESTOMBE, C. 2003. Green mutant frequency in natural populations of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. *European Journal of Phycology* 38: 165-169.
- GUIMARÃES, M.; PLASTINO, E.M. & OLIVEIRA, E.C. 1999. Life history, reproduction and growth of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. *Botanica Marina* 42: 481-486.
- JASSBY, A.D. & PLATT, T. 1976. Mathematical formulation of the relationship between

- photosynthesis and light for phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 21: 540-547.
- KURSAR, T.A.; VAN DER MEER, J. & ALBERTE, R.S. 1983. Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*. I. Biochemical analysis of pigment mutations. *Plant Physiology* 73: 353-360.
- LAPOINTE, B.E.; TENORE, K.R. & DAWES, C.J. 1984. Interactions between light and temperature on the physiological ecology of *Gracilaria tikvahiae* (Gigartinales: Rhodophyta). *Marine Biology* 80: 161-170.
- LOBBAN, C.S.; HARRISON, P.J. & DUNCAN, M.J. 1985. Light and photosynthesis. In *The physiological ecology of seaweeds*. Cambridge University Press. 237 p.
- MATHIESON, A.C. & DAWES, C.J. 1974. Ecological studies of Floridian *Eucheuma* (Rhodophyta, Gigartinales). II. Photosynthesis and respiration. *Bulletin of Marine Science* 24: 274-285.
- MATHIESON, A.C. & NORALL, T.L. 1975. Photosynthetic studies of *Chondrus crispus*. *Marine Biology* 33: 207-213.
- MURASE, N.; MAEGAWA, M. & KIDA, W. 1989. Photosynthetic characteristics of several species of Rhodophyceae from different depths in the coastal area of Shima Peninsula, central Japan. *Japanese Journal of Phycology* 37: 213-220.
- NIWA, K.; FURUITA, H.; YAMAMOTO, T. & KOBAYAMA, A. 2008. Identification and characterization of a green-type mutant of *Porphyra tenera* Kjellman var. *tamatsuenensis* Miura (Bangiales, Rhodophyta). *Aquaculture* 274: 126-131.
- ORDUÑA-ROJAS, J.; ROBLEDO, D. & DAWES, C.J. 2002. Studies on the tropical agarophyte *Gracilaria cornea* J. Agardh (Rhodophyta, Gracilariales) from Yucatán, Mexico. I. Seasonal physiological and biochemical responses. *Botanica Marina* 45: 453-458.
- PAULA, E.J.; PEREIRA, R.T.L. & OHNO, M. 1999. Strain selection in *Kappaphycus alvarezii* (Solieriaceae, Rhodophyta) using tetraspore progeny. *Journal of Applied Phycology* 11: 111-121.
- PLASTINO, E.M. 1985. As espécies de *Gracilaria* (Rhodophyta, Gigartinales) de Praia Dura, Ubatuba, SP- Aspectos biológicos e fenologia. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, SP.
- PLASTINO, E.M.; GUIMARÃES, M.; MATIOLI, S. & OLIVEIRA, E.C. 1999. Codominant

- inheritance of polymorphic color variants of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *Genetics and Molecular Biology* 22: 105-108.
- PLASTINO, E.M.; URSI, S. & FUJII, M.T. 2004. Color inheritance, pigment characterization, and growth of a rare light green strain of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycological Research* 52: 45-52.
- PENNIMAN, C.A. & MATHIESON, A.C. 1985. Photosynthesis of *Gracilaria tikvahiae* (Gigartinales, Rhodophyta) from the Great Bay Estuary, New Hampshire. *Botanica marina* 28: 427-435.
- PHOOPRONG, S.; OGAWA, H. & HAYASHIZAKI, K. 2007. Photosynthetic and respiratory responses of *Gracilaria salicornia* (C. Ag.) Dawson (Gracilariales, Rhodophyta) from Thailand and Japan. *Journal of Applied Phycology* 19: 795-801.
- PUESCHEL, C.M. & VAN DER MEER, J.P. 1983. Ultrastructural characterization of a pigment mutant of the red alga *Palmaria palmate*. *Canadian Journal of Botany* 62: 1101-1107.
- RAMUS, J. & VAN DER MEER, J.P. 1983. A physiological test of the theory of complementary chromatic adaptation. I. Color mutants of a red seaweed. *Journal of Phycology* 19: 86-91.
- RODRIGO, M. & ROBAINA, R.R. 1997. Stress tolerance of photosynthesis in sporelings of the red alga *Grateloupia doryphora* compared to that of Stage III thalli. *Marine Biology* 128: 689-694.
- SCHUBERT, H.; ANDERSSON, M. & SNOEIJS, P. 2006. Relationship between photosynthesis and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in two red algae with different carotenoid compositions. *Marine Biology* 149: 1003-1013.
- SILVA, J.; SANTOS, R.; SERÓDIO, J. & MELO, R.A. 1998. Light response curves for *Gelidium sesquipedale* from different depths, determined by two methods: O₂ evolution and chlorophyll fluorescence. *Journal of Applied Phycology* 10: 295-301.
- SIVAN, A. & ARAD, S.M. 1993. Induction and characterization of pigment mutants in the red microalga *Porphyridium* sp. (Rhodophyceae). *Phycologia* 32: 68-72.
- STEELE, R.L.; THURSBY, G.B. & VAN DER MEER, J.P. 1986. Genetics of *Champia parvula* (Rhodymeniales, Rhodophyta): mendelian inheritance of spontaneous mutants. *Journal of Phycology* 22: 538-542.

- URSI, S. & PLASTINO, E.M. 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. *Revista Brasileira de Botânica* 24: 587-594.
- URSI, S.; PEDERSÉN, M.; PLASTINO, E.M. & SNOEIJS, P. 2003. Intraspecific variation of photosynthesis, respiration and photoprotective carotenoids in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales: Rhodophyta). *Marine Biology* 142: 997-1007.
- VAN DER MEER, J.P. 1979. Genetics of *Gracilaria* sp. (Rhodophyceae, Gigartinales). V. Isolation and characterization of mutant strains. *Phycologia* 18: 47-54.
- VAN DER MEER, J.P. & BIRD, N.L. 1977. Genetics of *Gracilaria* sp. (Rhodophyceae, Gigartinales). I. Mendelian inheritance of two spontaneous green variants. *Phycologia* 16: 159-161.
- VAN DER MEER, J.P. & ZHANG, X. 1988. Similar unstable mutations in three species of *Gracilaria* (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 24: 198-202.
- VARELA, D.; SANTELICES, B.; CORREA, J.A. & ARROYO, M.K. 2006. Spatial and temporal variation of photosynthesis in intertidal *Maizella laminarioides* (Bory de Ferry) Fredericq (Rhodophyta, Gigartinales). *Journal of Applied Phycology* 18: 827-838.
- WELLBURN, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144: 307-313.
- YAN, X.H.; FUJITA, Y. & ARUGA, Y. 2000. Induction and characterization of pigmentation mutants in *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 12: 69-81.
- YOKOYA, N.; NECCHI JR, O.; MARTINS, A.P.; GONZALEZ, S.F. & PLASTINO, E.M. 2007. Growth responses and photosynthetic characteristics of wild and phycoerythrin-deficient strains of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 19: 197-205.

**Capítulo 5- Efeitos da radiação UV-B na sobrevivência
de esporos, no crescimento de plântulas e na síntese de
MAAs em morfos pigmentares de *Gracilaria*
domingensis (Gracilariales, Rhodophyta)**

Trabalho realizado em colaboração com o
Dr. Pio Colepicolo e com a Dra. Karina H.M.

Cardozo,
IQ, USP

1. Abstract

This work evaluated the UV-B radiation effects at: i, survival and growth of gametophytic and tetrasporophytic plantlets of green, red and brown morphs of *Gracilaria domingensis*; and ii, synthesis of “mycosporine-like amino acids” (MAAs) of adult green and red female gametophytes of the species. The algae were submitted to two conditions: i, active photosynthetic irradiance, PAR (control) of 90 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; and ii, PAR + UV-B (0,12 W.m^{-2} in the experiments considering survival of spores and growth of plantlets, and 0,70 W.m^{-2} in the experiment considering MAAs synthesis). Neither survival of spores or growth of plantlets were negatively affected by UV-B, which demonstrated that the strains are well adapted to the high irradiances of the brazilian northeast region. The higher growth rates of green and red gamatophytic plantlets cultivated on UV-B when compared to the control could be explain by the UV-A radiation received from lamps utilized in the experiments. This radiation has important effects on recovery of damages caused by UV-B, which were already reported to some other plants. The MAAs porphyr-334, shinorina and palitin identified in green and red gametophytes of *G. domingensis* were already observed in algae from the field, which indicated that they are produced in a constitutive manner on this species. MAAs synthesis were induced by UV-B on green gametophytes, although not on the red ones. This result evidenced sun characteristics to the green plants. In conclusion, the effect of UV-B radiation were different among the genotypes, but not in the initial phases of development. Further studies are necessary to improve the understanding about UV-B radiation effect on the maintenance of polymorphism in this species.

2. Resumo

Este trabalho avaliou os efeitos da radiação UV-B considerando-se: i, a sobrevivência e o crescimento de plântulas gametofíticas e tetrasporofíticas dos morfos verde, vermelho e marrons de *Gracilaria domingensis*; e ii, a síntese de “aminoácidos tipo micosporinas” (MAAs) em gametófitos femininos verdes e vermelhos adultos da espécie. As algas foram submetidas a duas condições: i, radiação fotossinteticamente ativa, PAR (controle) de 90 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; e ii, PAR + UV-B (0,12 W.m^{-2} nos experimentos de sobrevivência de esporos e crescimento de plântulas, e 0,70 W.m^{-2} no que avaliou a síntese de MAAs). A UV-B não prejudicou a sobrevivência de esporos nem o crescimento de plântulas em nenhuma linhagem, indicando que a espécie está adaptada a irradiâncias altas, típica das regiões entremarés do nordeste do Brasil. As maiores taxas de crescimento de plântulas gametofíticas verdes e vermelhas na radiação UV-B quando comparadas ao controle poderiam ser explicadas porque as lâmpadas UV-B utilizadas também emitem radiação na faixa da UV-A, que parece ter um papel importante na recuperação dos danos causados pela UV-B em muitas espécies. As MAAs porphyr-334, chinorina e palitina identificadas em gametófitos verdes e vermelhos de *Gracilaria domingensis* no presente trabalho também foram encontradas em algas dessa espécie provenientes do campo, indicando que elas são produzidas de forma constitutiva nessa espécie. A síntese de MAAs foi induzida pela radiação UV-B em

gametófitos verdes, mas não em vermelhos, o que proporcionaria aos primeiros vantagens em ambiente com intensa luminosidade, conferindo-lhes características de plantas de sol. Em conclusão, a radiação UV-B ocasionou respostas distintas nos genótipos, mas não nas fases iniciais do desenvolvimento. Mais estudos são necessários para melhor compreender o papel da radiação UV-B na manutenção do polimorfismo da espécie na natureza.

3. Introdução

Cerca de 8-9% da radiação solar total que alcança o nosso planeta é radiação ultravioleta (UV) (Hollósý 2002). De acordo com o Comitê Internacional de Iluminação e Fotobiologia, a radiação UV pode ser dividida em três faixas: i, UV-A, conhecida também como luz negra, que compreende aos comprimentos de onda entre 315-400 nm; ii, UV-B, conhecida também como radiação eritemática, por causar vermelhidão na pele, que compreende comprimentos de onda entre 280-315 nm; e iii, UV-C, conhecida também como germicida, que inclui comprimentos de onda entre 100-280 nm. Comprimentos de onda abaixo de 290 nm, apesar de bastante energéticos, não são prejudiciais à vida na Terra, já que são absorvidos pelo ar e não alcançam a superfície do nosso planeta (Okuno *et al.* 1996). A camada de ozônio é a barreira mais importante para diminuir a incidência de radiação UV-B na Terra, a qual apresenta potencial para causar muitos danos à vida. São bastante conhecidos na literatura os efeitos prejudiciais dessa radiação para algas, na fotossíntese (Dring *et al.* 2001; Figueroa & Gómez 2001; Gómez *et al.* 2005; Davison *et al.* 2007), crescimento e metabolismo do nitrogênio (Hoffman *et al.* 2003; Roleda *et al.* 2004 *b*; Davison *et al.* 2007), estrutura de lipídeos e membranas, ácidos nucleicos e proteínas (Ries *et al.* 2000; Hollósý 2002; Bouchard *et al.* 2005; Roleda *et al.* 2006), entre outros.

Com a diminuição da camada de ozônio, cientistas de todo o mundo têm voltado a sua atenção para estudos que não só verifiquem os danos causados por essa radiação, mas também encontrem maneiras de amenizar os problemas. Dentre os compostos mais conhecidos com função fotoprotetora em organismos aquáticos estão os “aminoácidos tipo micosporinas” (“mycosporine-like amino acids”,

MAAs). Estes são moléculas hidrossolúveis de baixo peso molecular que absorvem radiação UV na faixa de 310-365 nm (Oren & Gunde-Cimerman 2007). As MAAs já foram isoladas de muitas algas diferentes, especialmente rodófitas, e sua função na fotoproteção está bem estabelecida (Karsten *et al.* 1998 *b*; Sinha *et al.* 1998; Cardozo 2007). Alguns estudos apontam, ainda, que as MAAs possam também ter um papel importante como antioxidante, na regulação da pressão osmótica, na resistência à dessecação, entre outros, apesar de essas funções alternativas não estarem ainda muito claras (para uma revisão, ver Oren & Gunde-Cimerman 2007).

A grande maioria dos trabalhos que tratam dos efeitos da radiação UV em algas marinhas utilizou indivíduos adultos, apesar de ser conhecido o fato de que esporos e fases juvenis são bem mais sensíveis a esse tipo de radiação (Cordi *et al.* 2001; Henry & Alstyne 2004; Wiencke *et al.* 2006). Dos trabalhos que abordam os efeitos da radiação UV nas fases juvenis de macroalgas, a maior parte refere-se a algas pardas de regiões temperadas ou polares (Huovinen *et al.* 2000; Swanson & Druchi 2000; Wiencke *et al.* 2000; Flores-Moya *et al.* 2002; Altamirano *et al.* 2003; Henri & Alstyne 2004; Roleda *et al.* 2005; Wiencke *et al.* 2006). O uso de rodófitas nessas pesquisas é menos comum (Bañares *et al.* 2002; Roleda *et al.* 2004 *b*; Andrés *et al.* 2006; Jiang *et al.* 2007; Zacher *et al.* 2007) e, do nosso conhecimento, não existem trabalhos publicados com *Gracilaria* que utilizem essa abordagem, apesar da grande importância econômica do gênero. Tampouco há trabalhos que comparem a tolerância à radiação UV-B entre variantes pigmentares, sendo esta uma recente linha de pesquisa em nosso laboratório.

Tendo em vista o exposto, o presente trabalho teve como objetivos avaliar os efeitos da radiação UV-B considerando-se: i, a sobrevivência e o crescimento de

plântulas gametofíticas e tetrasporofíticas de morfos verde, vermelho e marrons de *G. domingensis*; e ii, a síntese de MAAs em gametófitos femininos verdes e vermelhos adultos da espécie. A hipótese foi a de que a radiação UV-B ocasionaria respostas distintas nos genótipos, o que poderia justificar em parte a manutenção do polimorfismo pigmentar da espécie na natureza.

4. Material e Métodos

4.1. Material biológico

Os esporos e plântulas dos diferentes morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* utilizados neste trabalho foram obtidos conforme explicado no Capítulo 1. Foram utilizadas quatro linhagens de carpósporos (c-VmVm, c-VmVd, c-VdVd e c-VdVm) e tetrásporos derivados de quatro tetrasporófitos distintos: t-VmVm, t-VmVd, t-VdVd e t-VdVm. Além dos esporos, foram também utilizados gametófitos femininos vermelhos e verdes adultos de *G. domingensis* provenientes do estado do Ceará e mantidos no Laboratório de Algas Marinhas Édison José de Paula, IBUSP.

As condições gerais de cultivo das plântulas foram as estabelecidas no Capítulo 1. Condições diferentes daquelas foram explicitadas ao longo do texto.

4.2 Irradiância

Em todos os experimentos realizados, as algas foram submetidas à radiação fotossinteticamente ativa, PAR (controle), e a um tratamento com PAR + UV-B. A irradiância UV-B utilizada variou de acordo com o experimento.

A irradiância PAR utilizada em todos os experimentos foi de 90 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A radiação UV-B, fornecida por lâmpadas UV-B Broad Band Philips TL 20W/12RS (figura 1), foi mensurada por meio de um radiômetro Vilber-Lourmat VLX - 3W nº 2218-3W. As fontes de luz foram posicionadas acima das

prateleiras onde os frascos foram depositados. O espaço destinado a esses cultivos foi mantido isolado do ambiente por plásticos brancos, os quais impediram que a radiação emitida pela lâmpada UV-B se dissipasse para o ambiente.

Figura 1- Espectro de emissão da lâmpada UV-B Broad Band Philips TL 20W/12RS utilizadas nos experimentos. Fonte: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

Durante todos os experimentos, as algas permaneceram expostas à radiação em cristalizadores contendo 200 mL de água do mar enriquecida. Esses cristalizadores foram cobertos com um filtro de biacetato de celulose de 0,075 mm de espessura, com a finalidade de absorver todos os comprimentos de onda inferiores a 280 nm, correspondentes à radiação UV-C. Esses filtros foram substituídos a cada 45 horas de uso, para evitar a sua degradação (Adamse & Britz 1992).

4.3. Sobrevivência de esporos e crescimento de plântulas

Tomando como base a intensidade de radiação UV-B que atinge a região de Fortaleza, CE, 0,5 W.m⁻² (<http://www.soda-is.com/eng/index.html>), foi realizado um teste de sobrevivência de carpósporos de apenas uma linhagem (c-VmVm) nessa

irradiância, mais a irradiância PAR de 90 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A lâmpada UV-B foi ligada 5 horas após o início do fotoperíodo, e foi desligada três horas depois (3 horas de exposição diária). Como após sete dias os esporos estavam mortos, foi escolhida uma irradiância mais baixa, de 0,12 $\text{W}.\text{m}^{-2}$, para ser utilizada nos experimentos de sobrevivência (item 4.3.1) e crescimento de esporos (item 4.3.2).

4.3.1. Sobrevivência de esporos

Plantas cistocárpicas provenientes dos quatro cruzamentos (Fvm X Mvm, Fvm X Mvd, Fvd X Mvd e Fvd X Mvm) e tetrasporofíticas férteis das quatro linhagens, vermelha (VmVm), verde (VdVd) e marrons (VmVd e VdVm) foram transferidas para placas de Petri, visando à liberação de carpósporos e tetrásporos, respectivamente. Um total de 1000 esporos recém liberados foi transferido para cristalizadores por meio de pipetas Pasteur encostando-se a extremidade da pipeta à superfície interna inferior dos mesmos. O volume de água do mar enriquecida foi de 200 mL por frasco. Três repetições por linhagem foram mantidas para cada condição testada: controle (PAR) e tratamento (PAR + UV-B). O número de plântulas foi contado após três dias e após dez dias, considerados desde a data da coleta. A sobrevivência de esporos foi considerada como a porcentagem de plântulas com relação ao número inicial de esporos transferidos. Os dados foram submetidos à transformação do arco-seno (Zar 1999) para permitir análises de variância em porcentagens:

$$(\arcsen\sqrt{x/(n+1)} + \arcsen\sqrt{(x+1)/(n+1)})/2; \quad \text{onde: } x =$$

sobrevivência de esporos (%) e n= quantidade de esporos coletados. A porcentagem de plântulas vivas em relação ao número inicial de plântulas fixas (1000) foi considerada como a medida de sobrevivência.

4.3.2. Crescimento de plântulas

Carpósporos (c-VmVm, c-VmVd, c-VdVd e c-VdVm) e tetrásporos (t-VmVm, t-VmVd, t-VdVd e t-VdVm) foram coletados por meio de pipetas Pasteur e transferidos para lâminas comuns para microscopia, inseridas em recipientes de plástico descartáveis contendo 200 mL de água do mar enriquecida. Duas lâminas foram inseridas em cada recipiente. Três repetições (frascos) foram mantidas para cada condição testada: controle (PAR) e tratamento (PAR + UV-B). O número de esporos transferidos para cada lâmina não foi contado. O crescimento foi avaliado até o quinto dia após a coleta dos esporos, uma vez que observações preliminares (dados não apresentados) haviam mostrado que a partir dessa data inicia-se a diferenciação do ramo ereto, o que tornaria inadequada a avaliação do crescimento por meio do diâmetro dos discos de fixação (plântulas). Portanto, a medida inicial foi obtida a partir dos valores de diâmetro de carpósporos e tetrásporos recém-liberados e a final, no quinto dia após a coleta dos esporos. Nessa data, as lâminas foram observadas ao microscópio óptico, onde o diâmetro de 10 plântulas fixas, observadas ao acaso, foi avaliado para cada repetição. O valor do diâmetro das plântulas de cada repetição foi considerado como uma média dessas 10 sub-repetições, perfazendo três médias para cada tratamento considerado (três repetições). As taxas de crescimento foram calculadas segundo Orduña-Rojas & Robledo (1999): $TC = \ln (D_2/D_1) \times t^{-1}$; D_2 , diâmetro final (no 5º dia); D_1 , diâmetro inicial (esporos recém-liberados); t , tempo em dias; sendo os valores das taxas expressos em $\% \cdot \text{dia}^{-1}$.

4.4. Síntese de “aminoácidos do tipo micosporinas” (MAAs)

4.4.1. Exposição dos gametófitos à radiação UV-B

Ápices de gametófitos femininos verdes e vermelhos adultos de *G. domingensis* provenientes de indivíduos diferentes foram cultivados em Erlenmeyers (cada indivíduo em um Erlenmeyer distinto) contendo 400 mL de água do mar enriquecida, com aeração, durante três semanas em PAR. Após esse período, um conjunto de aproximadamente 8 ramos de 4 cm, com massa fresca de 100 mg para cada repetição, foi selecionado e transferido para cristalizadores contendo 200 mL de água do mar enriquecida. Esses cristalizadores foram expostos a duas condições: i, controle (somente PAR) e ii, tratamento, com PAR + 0,7 W.m⁻² UV-B. A lâmpada UV-B foi ligada três horas após o início do fotoperíodo, e foi desligada nove horas depois (seis horas de exposição total). As algas foram, então, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer a -80 °C. Os ramos congelados foram posteriormente liofilizados e armazenados novamente em freezer a -80 °C até a realização das extrações.

4.4.2. Extração de MAAs

As MAAs foram extraídas segundo o protocolo descrito em Cardozo (2007) com algumas modificações. As amostras liofilizadas foram trituradas em nitrogênio líquido e à massa seca (15 a 20 mg) foram adicionados metanol:água (1:4,v/v) para uma concentração final de 10 mg/mL. Após sonicação em banho ultrassom (15 min / 10 °C) e extração a 4 °C, os extrato foram centrifugados (10000 rpm/ 10 min / 4 °C) e os sobrenadantes evaporados em *Speed Vac*[®]. Os precipitados resultantes foram ressuspensos em 200 µL de ácido trifluoracético a 0,2% em água e 25 µL foram injetados no sistema de HPLC.

4.4.3. Análises de MAAs

As análises por HPLC foram conduzidas em um sistema *Shimadzu* composto por duas bombas LC-6AD, detector de arranjo de diodos SPD-M10A/VP equipado com cela analítica e preparativa e injetor automático SIL-10ADVP. Para a quantificação foram utilizadas duas colunas em série: Synergi Fusion-RP (Phenomenex®, 250 x 4,6 mm, 4 µm) e Synergi Polar-RP (Phenomenex®, 250 x 4,6 mm, 5 µm) com pré-coluna. As análises foram monitoradas entre 200 e 400 nm e o fluxo foi de 1,0 mL/min. O gradiente utilizado está descrito na tabela 1.

Tabela 1: Gradiente utilizado para as análises das MAAs. Fase móvel A: ácido trifluoracético 0,2% em água + hidróxido de amônio (pH 3,15) e fase móvel B : metanol. Modificado de Carreto *et al.* 2005.

Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0	100	0
10	100	0
25	50	50
26	0	100
30	0	100

As MAAs foram identificadas comparando os tempos de retenção e os espectros de absorção no UV com padrões previamente isolados de *Gracilaria tenuistipitata* e da matéria-prima comercialmente disponível Helioguard 365® (Cardozo 2007). As amostras foram quantificadas utilizando os coeficientes de extinção molar e as absorbâncias nos comprimentos de ondas máximos de cada MAA empregando a Lei de Beer-Lambert. Os resultados foram expressos em mg/g MS (miligrama por grama de massa seca de alga).

Posteriormente, as MAAs encontradas foram confirmadas por espectrometria de massas (Cardozo 2007) utilizando equipamento do tipo *Ion trap*, e seus perfis de fragmentação foram comparados com os da literatura (Whitehead & Hedges 2003; Cardozo *et al.* 2006, 2008; Cardozo 2007).

4.5. Análises estatísticas

Os dados transformados de sobrevivência de esporos foram submetidos a análises de variância trifatoriais (fatores: linhagem, tratamento e fase do histórico de vida) com medidas repetidas (fator de repetição: tempo). Os dados de crescimento de plântulas foram submetidos a análises de variância trifatoriais (fatores: linhagem, tratamento e fase do histórico de vida). Os dados de quantificação de MAAs produzidas foram submetidos a análises de variância trifatoriais (fatores: linhagem, tratamento e tipo de MAAs) ou bifatoriais, para os dados de MAAs totais (fatores: linhagem e tratamento). As análises foram realizadas com o auxílio do programa Statistica 6.0. Diferenças significativas foram consideradas com $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Sobrevivência de esporos

5.1.1. Carpósporos

Não houve diferenças na sobrevivência de carpósporos entre as linhagens em nenhuma condição testada ($p = 0,613$). A sobrevivência de carpósporos das diferentes linhagens no controle foi semelhante à sobrevivência na radiação UV-B ($p = 0,913$). A sobrevivência de carpósporos de todas as linhagens foi semelhante em três dias e em dez dias ($p = 0,401$) (figura 2).

Figura 2- Sobrevivência de carpósporos (dados transformados) de *Gracilaria domingensis* originados a partir dos diferentes cruzamentos, expostos à radiação UV-B e ao controle durante três ou dez dias. Barras de erro, intervalos de confiança (95%). n= 3.

5.1.2. Tetrásporos

Não houve diferenças na sobrevivência de tetrásporos entre as linhagens em nenhuma condição testada ($p= 0,613$). A sobrevivência dos tetrásporos das diferentes linhagens no controle foi semelhante à sobrevivência na radiação UV-B ($p= 0,913$). A sobrevivência de tetrásporos de todas as linhagens foi semelhante em três dias e em dez dias ($p= 0,401$) (figura 3).

Figura 3- Dados transformados de sobrevivência de tetrásporos de *Gracilaria domingensis* originados a partir das diferentes linhagens de tetrasporófitos, expostos à radiação UV-B ou não (controle) durante três ou dez dias. Barras de erro, intervalos de confiança (95%). n= 3.

5.1.3. Carpósporos x tetrásporos

A sobrevivência de tetrásporos foi maior que a de carpósporos ($p= 0,000$) em todas as condições testadas.

5.2. Crescimento de plântulas

5.2.1. Plântulas tetrasporofíticas

As taxas de crescimento de plântulas tetrasporofíticas marrons VmVd foram maiores que as de plântulas tetrasporofíticas marrons VdVm, tanto no tratamento como no controle ($p= 0,037$) (figura 4). As demais taxas foram semelhantes entre si ($p> 0,106$). Não houve diferenças significativas entre os tratamentos ($p=0,397$) (figura 4).

Figura 4- Taxas de crescimento (TC) de plântulas tetrasporofíticas dos diferentes morfos de *Gracilaria domingensis*, expostos à radiação UV-B ou não (controle). Barras de erro, intervalos de confiança (95%). n= 3.

5.2.2. Plântulas gametofíticas

As taxas de crescimento de plântulas gametofíticas verdes foram maiores que as de plântulas gametofíticas vermelhas, tanto no controle quanto durante a exposição à radiação UV-B ($p= 0,003$) (figura 5). As taxas de crescimento das plântulas das duas linhagens foram maiores quando estes foram expostos à radiação UV-B, quando comparados ao controle ($p= 0,003$) (figura 5).

Figura 5- Taxas de crescimento (TC) de plântulas de *Gracilaria domingensis* originados a partir de tetrasporófitos vermelhos (t-VmVm) e verdes (t-VdVd), expostos à radiação UV-B ou não (controle). Barras de erro, intervalos de confiança (95%). n= 3.

5.2.3. Plântulas tetrasporofíticas x gametofíticas

As taxas de crescimento de plântulas tetrasporofíticas e gametofíticas foram semelhantes ($p= 0,229$).

5.3. Síntese de MAAs

Não houve diferenças na composição qualitativa das MAAs quando comparou-se gametófitos verdes e vermelhos. Em ambas linhagens, foram encontradas as seguintes MAAs: chinorina, porphyra-334 e palitina. O perfil cromatográfico dos extratos, representado por uma amostra de um indivíduo verde, bem como os espectros de absorção na UV de cada MAA são mostrados na figura 6.

Figura 6. Perfil cromatográfico em 334 nm das MAAs presentes em um indivíduo gametofítico verde de *Gracilaria domingensis* e espectros no UV. Tempos de retenção (min): **pico 1**- chinorina: 6,0; **pico 2** – porphyra-334: 7,4 e **pico 3** – palitina: 7,8.

Os perfis de fragmentação obtidos no espectrômetro de massas para gametófitos verdes e vermelhos confirmaram a presença das seguintes MAAs: chinorina, porphyra-334 e palitina (tabela 2).

Tabela 2. MAAs identificadas por espectrometria de massas (*Ion trap*) em gametófitos verdes e vermelhos de *Gracilaria domingensis*. TR: tempo de retenção, $\lambda_{\max}$: comprimento de onda máximo, ϵ : coeficiente de extinção molar $[M+H]^+$: molécula protonada e principais fragmentos (*massa/carga*) .

MAA	TR (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	ϵ ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)	$[M+H]^+$	Principais fragmentos (<i>m/z</i>)
Chinorina	6,0	332	44700	333	318, 274, 230, 186
Porphyra-334	7,4	333	43300	347	332, 303, 288, 244, 227, 186
Palitina	8,0	320	36200	245	230, 209, 186

A quantidade total de MAAs produzidas por gametófitos vermelhos foi maior no controle do que no tratamento com UV-B ($p=0,008$). Já gametófitos verdes produziram maior quantidade de MAAs no tratamento com UV-B quando comparados ao controle ($p=0,020$) (figura 7). No tratamento com UV-B, a quantidade de MAAs totais foi semelhante nas duas linhagens testadas ($p=0,226$), enquanto que no controle, essa quantidade foi maior para gametófitos vermelhos ($p=0,000$) (figura 7).

Figura 7. Quantidade de MAAs totais produzidas por gametófitos verdes e vermelhos adultos de *G. domingensis* submetidos a um tratamento com UV-B e controle (sem UV-B). MS, massa seca das algas. Barras de erro, intervalo de confiança (95%). $n=3$.

As três MAAs encontradas em gametófitos verdes e vermelhos de *Gracilaria domingensis* foram produzidas em quantidades diferentes, dependendo da linhagem considerada e do tratamento (UV-B ou controle). Tanto para gametófitos verdes

como para vermelhos, a MAA produzida em maior quantidade foi porphyrina-334, seguida pela chinorina, e pela palitina, nessa ordem ($p = 0,000$) (figura 8).

Considerando-se as MAAs chinorina e porphyrina-334, observa-se que em gametófitos vermelhos elas foram produzidas em maior quantidade no controle quando comparadas ao tratamento com UV-B ($p < 0,015$), enquanto que em gametófitos verdes, ocorreu o oposto: essas MAAs foram produzidas em maior quantidade no tratamento com UV-B ($p < 0,032$). A MAA palitina foi produzida em quantidades semelhantes no tratamento com UV-B e no controle em ambas linhagens ($p > 0,983$) (figura 8).

No controle, a quantidade das MAAs chinorina e porphyrina-334 foi maior em gametófitos vermelhos do que em verdes ($p = 0,000$), enquanto que a quantidade de palitina foi semelhante entre as linhagens ($p = 0,996$). No tratamento com UV-B, a quantidade de uma mesma MAA foi semelhante entre as linhagens ($p > 0,106$) (figura 8).

Figura 8. Quantidades das três MAAs produzidas por gametófitos verdes e vermelhos adultos de *G. domingensis* submetidos a um tratamento com UV-B e controle (sem UV-B). MS, massa seca das algas. Barras de erro, intervalo de confiança (95%). n= 3.

6. Discussão

Gracilaria domingensis é uma alga de regiões entremarés muito comum no litoral brasileiro. Sendo assim, ela está, naturalmente, exposta a altas irradiâncias PAR e UV, e seria esperado que ela tivesse capacidade de tolerar altos níveis de UV-B. Respostas diferenciadas dos genótipos de seus morfos pigmentares a essa radiação poderiam ajudar a explicar a manutenção do polimorfismo da espécie na natureza.

O teste preliminar de sobrevivência de esporos mostrou que a irradiância de 0,3 W.m⁻² de UV-B foi fatal para eles. No entanto, em 0,12 W.m⁻², os valores de sobrevivência de esporos (carpósporos e tetrásporos) foram semelhantes aos obtidos no controle. É possível que: i, em uma irradiância de UV-B intermediária

entre esses dois valores, a sobrevivência dos esporos fosse afetada, mas não em tão grande extensão quanto em $0,3 \text{ W.m}^{-2}$; ou ii, o tempo de exposição à radiação de $0,12 \text{ W.m}^{-2}$ tenha sido muito pequeno (10 dias) para produzir uma resposta que fosse refletida em quedas na taxa de sobrevivência. Trabalhos realizados com esporos e fases juvenis de algas de regiões polares e temperadas que verificaram a sensibilidade das fases jovens à radiação UV utilizaram irradiâncias maiores de UV-B ($0,35 - 1,0 \text{ W.m}^{-2}$) do que as que foram utilizadas neste trabalho, e/ou foram experimentos mais longos, de algumas semanas de duração (Bañares *et al.* 2002; Flores-Moya *et al.* 2002; Altamirano *et al.* 2003; Roleda *et al.* 2004 *a*; Mansilla *et al.* 2006; Zacher *et al.* 2007), ao invés de apenas alguns dias.

A sobrevivência de carpósporos e tetrásporos das diferentes linhagens manteve-se constante ao longo do tempo (3 ou 10 dias), indicando que os níveis de radiação UV-B utilizados não prejudicaram a fixação inicial dos esporos, nem promoveram seu desprendimento posterior.

Tetrásporos de todas as linhagens apresentaram maiores valores de sobrevivência do que carpósporos, tanto no controle como no tratamento com UV-B. Resultados semelhantes foram observados no Capítulo 3, demonstrando que não se trata de um efeito promovido pela radiação UV-B, e sim por características relacionadas à forma de liberação desses esporos.

As diferenças observadas nas taxas de crescimento de plântulas entre as linhagens foram as mesmas no tratamento e no controle. Desta forma, a radiação UV aplicada não promoveu respostas diferenciadas dos genótipos. Porém, surpreendentemente, as taxas de crescimento de plântulas gametofíticas verdes e vermelhas foram maiores no tratamento com UV-B quando comparadas ao

controle. Resultados semelhantes já foram observados para *Ulva pertusa* (Han *et al.* 2003). Porém, nesse caso, os autores justificaram aumento nas taxas de crescimento de plantas adultas como consequência da inibição da diferenciação de esporos no talo, causada pela radiação UV-B. *U. pertusa* é uma espécie com grande esforço reprodutivo, e o crescimento cessa ou diminui bastante quando o talo começa a produzir esporos. A mesma explicação não é válida para o presente trabalho, já que as taxas de crescimento foram medidas em fases muito iniciais (plântulas). Henry *et al.* (2003), no entanto, observaram que o crescimento de embriões de *Fucus gardnerii* é inibido pela UV-B, mas favorecido pela UV-A, sugerindo um papel importante dessa radiação na recuperação de danos causados pela UV-B, assim como já foi demonstrado em outros estudos (Jiang *et al.* 2007). A lâmpada UV-B utilizada nos experimentos do presente trabalho emite energia também na região da UV-A (figura 1). Essa emissão pode ter sido responsável por favorecer o crescimento de plântulas de *G. domingensis*, e pode inclusive ter neutralizado possíveis efeitos prejudiciais da UV-B na sobrevivência dos esporos.

Comparando-se os resultados obtidos nos experimentos de sobrevivência e crescimento de esporos do presente trabalho com os mostrados no Capítulo 3, verifica-se que os padrões de diferenças observadas entre as linhagens foram muito semelhantes. A sobrevivência entre as diferentes linhagens de carpósporos e tetrásporos foi semelhante em todas as condições testadas. A tendência a maiores taxas de crescimento de plântulas gametofíticas verdes, apontada no Capítulo 3, neste Capítulo apareceu como diferença estatisticamente significativa. Além disso, plântulas tetráspóricas marrons VmVd apresentaram maiores taxas de crescimento que o das plântulas tetráspóricas marrons VdVm nos dois capítulos,

favorecendo a hipótese de que as duas linhagens de tetrasporófitos marrons sejam fisiologicamente diferentes. Todos esses resultados indicam que, apesar da grande variabilidade entre as amostras, os padrões se repetem, o que torna a interpretação dos dados mais confiável. Uma maior tolerância das plantas verdes à radiação UV poderia favorecer a manutenção desse alelo na natureza.

A indução da síntese de MAAs pela radiação UV já foi relatada para muitos gêneros de micro e macroalgas, como *Anabaena* (Sinha *et al.* 1999), *Bangia* (Karsten & West 2000), *Chondrus* (Karsten *et al.* 1998 *a*), *Gyrodinium* (Klisch & Häder 2000), *Heterocapsa* (Wänberg *et al.* 1997), *Lemanea* (Crespo *et al.* 2005) *Porphyra* (Korbee *et al.* 2004), *Ulva* (Han & Han 2005), entre outros, e está relacionada a um aumento na capacidade de fotoproteção. Muitos estudos apontam que a quantidade de MAAs em algas provenientes de regiões entremarés é maior que a de algas que vivem no infralitoral (Karsten *et al.* 1998 *a*; Karsten *et al.* 1999; Figueroa *et al.* 2003). Gametófitos verdes de *Gracilaria domingensis* apresentaram aumento na quantidade total de MAAs quando expostos à radiação UV-B, indicando que essas algas estejam bem adaptadas a regiões com altos índices de irradiância. Já gametófitos vermelhos não apresentaram essa resposta. Pelo contrário, a quantidade de MAAs caiu quando essas algas foram cultivadas no tratamento com UV-B. Uma diminuição na quantidade da MAA porphyra-334 foi também observada para *Gyrodinium dorsum* e *Lemanea fluviatilis* quando expostas à radiação UV-B (Klisch & Häder 2000 e Crespo *et al.* 2005, respectivamente). Os autores sugeriram que poderia ter havido uma inibição da síntese dessa MAA, mas também seria possível que ela fosse seletivamente metabolizada nessas condições. Poderíamos sugerir o mesmo para gametófitos vermelhos de *Gracilaria domingensis* no presente trabalho. A síntese de

MAAs em outras algas, como *Chondrus crispus*, *Gracilaria cornea* e *Porphyra umbilicalis* também não foi induzida por radiação UV-B (Franklin *et al.* 1999; Sinha *et al.* 2000 e Gröniger *et al.* 1999, respectivamente). Contudo, é possível que essa linhagem fosse induzida a produzir mais MAAs caso o tempo de exposição à radiação UV fosse maior do que seis horas, como detectado em outras espécies (Wängberg *et al.* 1997; Klisch & Häder 2000; Peinado *et al.* 2004). De qualquer maneira, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que as diferentes linhagens de *G. domingensis* possuem mecanismos de regulação gênica e/ou de expressão de proteínas distintos, e uma resposta mais rápida à radiação UV-B em gametófitos verdes conferiria a eles vantagens em ambientes onde esse tipo de radiação pode variar ao longo do tempo, como é o caso de regiões entremarés, onde os morfos de *G. domingensis* são encontrados, e conferiria a eles características de plantas de sol, ao contrário de gametófitos vermelhos, que seriam melhor classificados como plantas de sombra. Plantas verdes jovens mensuradas no Capítulo 4 tenderam a apresentar maiores taxas fotossintetizantes quando comparadas a plantas vermelhas, assim como a as taxas fotossintetizantes de gametófitos verdes adultos da espécie foram maiores que as de vermelhos (Guimarães 2000), corroborando esta conclusão.

As MAAs porphyra-334, chinorina e palitina identificadas em gametófitos verdes e vermelhos de *Gracilaria domingensis* no presente trabalho também foram encontradas em algas dessa espécie provenientes do campo (Cardozo 2007). Nessas algas do campo, foram também encontradas quantidades mínimas de asterina, palitinol e paliteno e/ou usujierno (Cardozo 2007). Essas outras MAAs não foram detectadas nos extratos de *G. domingensis* no presente trabalho. Porém, como a quantidade delas nas plantas provenientes da natureza foi muito pequena, podemos

assumir que as três principais MAAs presentes na espécie são produzidas de forma constante. É interessante notar, também, que as quantidades relativas de MAAs nos extratos foram as mesmas para as algas de campo e de laboratório: porphyra-334 foi a que apareceu em maior quantidade, seguida de chinorina e palitina, respectivamente. Seria interessante testar se as quantidades relativas dessas MAAs seriam alteradas por variáveis como nutrientes e qualidade espectral de luz, como já foi observado para *Chondrus crispus* (Franklin *et al.* 2001) e espécies de *Porphyra* (Peinado *et al.* 2004; Korbee *et al.* 2005 *a*; Korbee *et al.* 2005 *b*), sendo inclusive sugerida a existência de fotorreceptores específicos ligados à síntese desses compostos (Franklin *et al.* 2001; Korbee *et al.* 2005 *b*).

Em conclusão, a radiação UV-B ocasionou respostas distintas dos genótipos, embora essas respostas não tenham sido perceptíveis ao se avaliar as taxas de crescimento das fases iniciais do desenvolvimento. Seria interessante testar se o investimento reprodutivo de plantas adultas seria o mesmo em diferentes irradiâncias de UV-B. A capacidade de indução da síntese de MAAs pela radiação UV-B em gametófitos verdes adultos poderia conferir não apenas vantagens somáticas, mas também reprodutivas, já que as plantas férteis estariam mais protegidas e, em tese, poderiam produzir uma quantidade maior de esporos, o que contribuiria para a manutenção do alelo verde na natureza. Porém, o efeito contrário poderia também ser observado: caso a síntese de MAAs requeira um alto investimento de energia pela planta, esse investimento poderia ser desviado da produção de esporos para a síntese dessas substâncias fotoprotetoras, e nesse caso, a capacidade reprodutiva das plantas verdes seria menor. Deve ser também levado em conta que, na natureza, a proporção entre as radiações PAR, UV-A e UV-B é

diferente da que foi utilizada no presente estudo, e poderia ocasionar respostas diferentes das observadas. Nesse sentido, experimentos realizados no campo contribuiriam muito para o entendimento das respostas fisiológicas da espécie à radiação UV-B. Este trabalho representa a primeira contribuição sobre os efeitos da radiação UV em morfos de *G. domingensis*. Estudos futuros poderão esclarecer melhor o papel dessa radiação na manutenção do polimorfismo pigmentar da espécie na natureza.

7. Referências

- ADAMSE, P. & BRITZ, S. 1992. Spectral quality of two fluorescent UV sources during long-term use. *Photochemistry and Photobiology* 56: 641-644.
- ALTAMIRANO, M.; FLORES-MOYA, A. & FIGUEROA, F.L. 2003 *a*. Effects of UV radiation and temperature on growth of germlings of three species of *Fucus* (Phaeophyceae). *Aquatic Botany* 75: 9-20.
- ALTAMIRANO, M.; FLORES-MOYA, A.; KUHLENKAMP, R. & FIGUEROA, F.L. 2003 *b*. Stage-dependent sensitivity to ultraviolet radiation in zygotes of the Brown alga *Fucus serratus*. *Zygote*: 101-106.
- BAÑARES, E.; ALTAMIRANO, M.; FIGUEROA, F.L. & FLORES-MOYA, A. 2002. Influence of UV radiation on growth of sporelings of three non-geniculate coralline red algae from Southern Iberian Península. *Phycological Research* 50: 23-30.
- BOUCHARD, J.N.; CAMPBELL, D.A. & ROY, S. 2005. Effects of UV-B radiation on the D1 protein repair cycle of natural phytoplankton communities from three latitudes (Canada, Brazil, and Argentina). *Journal of Phycology* 41: 273-286.
- CARDOZO, K.H.M.; CARVALHO, V.M.; PINTO, E. & COLEPICOLO, P. 2006. Fragmentation of mycosporine-like amino acids by hydrogen/deuterium exchange and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20: 253-258.

- CARDOZO, K. H. M., VESSECCHI, R., CARVALHO, V. M., PINTO, E., GATES, P. J., COLEPICOLO, P., GALEMBECK, S. E., LOPES, N. P. 2008. A theoretical and mass spectrometry study of the fragmentation of mycosporine-like amino acids. *International Journal of Mass Spectrometry* 273:11-19.
- CARRETO, J. I.; CARIGNAN, M. O. & MONTOYA, N. G. 2005. A high-resolution reverse-phase liquid chromatography method for the analysis of mycosporine-like amino acids (MAAs) in marine organisms. *Marine Biology* 146: 237-252.
- CORDI, B.; DONKIN, M.E.; PELOQUIN, L.; PRICE, D.N. & DEPLEDGE, M.H. 2001. The influence of UV-B radiation on the reproductive cells of the intertidal macroalga, *Enteromorpha intestinalis*. *Aquatic Toxicology* 56: 1-11.
- CRESPO, M.A.; SINHA, R.P.; ABAIGAR, J.M.; OLIVEIRA, E.N. & HÄDER, D.P. 2005. Ultraviolet radiation-induced changes in mycosporine-like amino acids and physiological variables in the red alga *Lemanea fluviatilis*. *Journal of Freshwater Ecology* 20: 677-687.
- DAVISON, I.R.; JORDAN, T.J.; FEGLET, J. & GROBE, C.W. 2007. Response of *Laminaria saccharina* (Phaeophyta) growth and photosynthesis to simultaneous ultraviolet radiation and nitrogen limitation. *Journal of Phycology* 43: 636-646.
- DRING, M.J.; WAGNER, A. & LÜNING, K. 2001. Contribution on the UV component of natural sunlight to photoinhibition of photosynthesis in six species of subtidal brown and red seaweeds. *Plant, Cell and Environment* 24: 1153-1164.
- FIGUEROA, F.L.; ESCASSI, L.; RODRIGUEZ, E.P.; KORBEE, N.; GILES, A.D. & JOHNSEN, G. 2003. Effects of short-term irradiation on photoinhibition and accumulation of mycosporine-like amino acids in sun and shade species of the red algal genus *Porphyra*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 69: 21-30.
- FIGUEROA, F.L. & GÓMEZ, I. 2001. Photosynthetic acclimation to solar UV radiation of marine red algae from the warm-temperate coast of southern Spain: a review. *Journal of Applied Phycology* 13: 235-248.
- FLORES-MOYA, A.; POSUDIN, Y.I.; FERNÁNDEZ, J.A.; FIGUEROA, F.L. & KAWAI, H. 2002. Photomovement of the swimmers of the Brown algae *Scytosiphon lomentaria* and *Petalonia*

- fascia*: effects of photon irradiance, spectral composition and UV dose. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 66: 134-140.
- FRANKLIN, L.A.; YAKOVLEVA, I.; KARSTEN, U. & LÜNING, K. 1999. Synthesis of mycosporine-like amino acids in *Chondrus crispus* (Florideophyceae) and the consequences for sensitivity to ultraviolet B radiation. *Journal of Phycology* 35: 682-693.
- GÓMEZ, I.; FIGUEROA, F.L.; HUOVINEN, P.; ULLOA, N. & MORALES, V. 2005. Photosynthesis of the red alga *Gracilaria chilensis* under natural solar radiation in an estuary in southern Chile. *Aquaculture* 244: 369-382.
- GRÖNIGER, A.; HALLIER, C. & HÄDER, D.P. 1999. Influence of UV radiation and visible light on *Porphyra umbilicalis*: photoinhibition and MAA concentration. *Journal of Applied Phycology* 11: 437-445.
- GUIMARÃES, M. 2000. Aspectos fisiológicos de *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta): subsídios para a compreensão da manutenção do polimorfismo pigmentar. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, SP.
- HAN, Y.S. & HAN, T. 2005. UV-B induction of protection in *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 41: 523-530.
- HENRY, B.E. & ALSTYNE, K.L.V. 2004. Effects of UV radiation on growth and phlorotannins in *Fucus gardneri* (Phaeophyceae) juveniles and embryos. *Journal of Phycology* 40: 527-533.
- HOFFMAN, J.R.; HANSEN, L.J. & KLINGER, T. 2003. Interactions between UV radiation and temperature limit inferences from single-factor experiments. *Journal of Phycology* 39: 268-272.
- HOLLÓSY, F. 2002. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron* 33: 179-197.
- HUOVINEN, P.S.; OIKARI, A.O.J.; SOIMASUO, M.R. & CHERR, G.N. 2000. Impact of UV radiation on the early development of the giant kelp (*Macrocystis pyrifera*) gametophytes. *Photochemistry and Photobiology* 72: 308-313.
- JIANG, H.; GAO, K. & HELBLING, E.W. 2007. Effects of solar UV radiation on germination of conchospores and morphogenesis of sporelings in *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta). *Marine Biology* 151: 1751-1759.

- KARSTEN, U.; BISCHOF, K.; HANELT, D.; TÜG, H. & WIENCKE, C. 1999. The effect of ultraviolet radiation on photosynthesis and ultraviolet-absorbing substances in the endemic Arctic macroalga *Devaleraea ramentacea* (Rhodophyta). *Physiologia Plantarum* 105: 58-66.
- KARSTEN, U.; FRANKLIN, L.A.; LÜNING, K. & WIENCKE, C. 1998 *a*. Natural ultraviolet radiation and photosynthetically active radiation induce formation of mycosporine-like amino acids in the marine macroalga *Chondrus crispus* (Rhodophyta). *Planta* 205: 257-262.
- KARSTEN, U.; SAWALL, T.; HANELT, D.; BISCHOF, K.; FIGUEROA, F.L.; FLORES-MOYA, A. & WIENCKE, C. 1998 *b*. An inventory of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in macroalgae from polar to warm-temperate regions. *Botanica Marina* 41: 443-453.
- KARSTEN, U. & WEST, J.A. 2000. Living in the intertidal zone- seasonal effects on heterosides and sun-screen compounds in the red alga *Bangia artropurpurea* (Bangiales). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 254: 221-234.
- KLISCH, M. & HÄDER, D.P. 2000. Mycosporine-like amino acids in the marine dinoflagellate *Gyrodinium dorsum*: induction by ultraviolet irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 55: 178-182.
- MANSILLA, A.; WERLINGER, C.; PALACIOS, M.; NAVARRO, N.P. & CUADRA, P. 2006. Effects of UVB radiation on the initial stages of growth of *Gigartina skottsbergia*, *Sarcothalia crispata* and *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 18: 451-459.
- OKUNO, E.; NAKAJIMA, T.; YOSHIMURA, E.M.; HIODO, F.; FAUSTO, A.M.F.; PAES, W.S.; UMISEDÓ, N.K. & OTSUBO, S. 1996. Radiação ultravioleta solar em S. Paulo, Chiba, Cafalate e Ilha de Páscoa. *Caderno de Engenharia Biomédica* 12: 143-153.
- OREN, A. & GUNDE-CIMERMAN, N. 2007. Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? *FEMS Microbiology Letters* 269: 1-10.
- PEINADO, N.K.; DÍAZ, R.T.A. & FIGUEROA, F.L. 2004. Ammonium and UV radiation stimulate the accumulation of mycosporine-like amino acids in *Porphyra columbina* (Rhodophyta) from Patagonia, Argentina. *Journal of Phycology* 40: 248-259.

- RIES, G.; HELLER, W.; PUCHTA, H.; SANDERMANN, H.; SEIDLITZ, H.K. & HOHN, B. 2000. Elevated UV-B radiation reduces genome stability in plants. *Nature* 406: 98-101.
- ROLEDA, M.Y.; HANELT, D.; KRÄBS, G. & WIENCKE, C. 2004 *a*. Morphology, growth, photosynthesis and pigments in *Laminaria ochroleuca* (Laminariales, Phaeophyta) under ultraviolet radiation. *Phycologia* 43: 603-613.
- ROLEDA, M.Y.; HANELT, D. & WIENCKE, C. 2006. Growth and DNA damage in young *Laminaria* sporophytes exposed to ultraviolet radiation: implication for depth zonation of kelps on Helgoland (North Sea). *Marine Biology* 148: 1201-1211.
- ROLEDA, M.Y.; WIENCKE, C.; HANELT, D.; VAN DE POLL, W.H. & GRUBER, A. 2005. Sensitivity of Laminariales zoospores from Helgoland (North Sea) to ultraviolet and photosynthetically active radiation: implications for depth distribution and seasonal reproduction. *Plant, Cell and Environment* 28: 466-479.
- ROLEDA, M.Y.; VAN DE POLL, W.H.; HANELT, D. & WIENCKE, C. 2004 *b*. PAR and UVBR effects on photosynthesis, viability, growth and DNA in different life stages of two coexisting Gigartinales: implications for recruitment and zonation pattern. *Marine Ecology Progress Series* 281: 37-50.
- SINHA, R.P.; KLISCH, M.; GRÖNIGER, A. & HÄDER, D.P. 1998. Ultraviolet-absorbing/screening substances in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 47: 83-94.
- SINHA, R.P.; KLISCH, M.; GRÖNIGER, A. & HÄDER, D.P. 1999. Induction of a mycosporine-like amino acid (MAA) in the rice-field cyanobacterium *Anabaena* sp. By UV irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 52: 59-64.
- SINHA, R.P.; KLISCH, M.; GRÖNIGER, A. & HÄDER, D.P. 2000. Mycosporine-like amino acids in the marine red alga *Gracilaria cornea*- effects of UV and heat. *Environmental and Experimental Botany* 43: 33-43.
- SWANSON, A.K. & DRUSCHI, L.D. 2000. Differential meiospore size and tolerance of ultraviolet light stress within and among kelp species along a depth gradient. *Marine Biology* 136: 657-664.

- WÄNBERG, S.A.; PERSSON, A. & KARLSON, B. 1997. Effects of UV-B radiation on synthesis of mycosporine-like amino acid and growth in *Heterocapsa triquetra* (Dynophyceae). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 37: 141-146.
- WIENCKE, C.; GÓMEZ, I.; PAKKER, H.; FLORES-MOYA, A.; ALTAMIRANO, M.; HANELT, D.; BISCHOF, K. & FIGUEROA, F.L. 2000. Impact of UV-radiation on viability, photosynthetic characteristics and DNA of Brown algal zoospores: implications for depth zonation. *Marine Ecology Progress Series* 197: 217-229.
- WIENCKE, C.; ROLEDA, M.Y.; GRUBER, A.; CLAYTON, M. & BISCHOF, K. 2006. Susceptibility of zoospores to UV radiation determines upper depth distribution limit of Arctic kelps: evidence through field experiments. *Journal of Ecology* 94: 455-463.
- WHITEHEAD, K. & HEDGES, J.I. 2003. Electrospray ionization tandem mass spectrometric and electron impact mass spectrometric characterization of mycosporine-like amino acids. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17: 2133-2138.
- ZACHER, K.; ROLEDA, M.Y.; HANELT, D. & WIENCKE, C. 2007. UV effects on photosynthesis and DNA in propagules of three Antarctic seaweeds (*Adenocystis utricularis*, *Monostroma hariotii* and *Porphyra endiviifolium*). *Planta* 225: 1505-1516.
- ZAR, J.H. 1999. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey.

Capítulo 6- Considerações Finais

Polimorfismo pode ser definido como “a existência de duas ou mais formas segregantes descontínuas, geneticamente determinadas em uma população, onde a frequência do tipo mais raro é mantida não somente por mutação” (Ford 1940). A maior parte das mutações são deletérias, algumas são neutras e muito poucas são adaptativas. As taxas de mutação podem variar de acordo com a região do DNA considerada e entre táxons, mas os marcadores geralmente utilizados em estudos de genética de populações mostram taxas bastante baixas, da ordem de 10^{-5} (Valero *et al.* 2001). Enquanto a existência de variantes de cor em uma população depende das taxas de mutação, a manutenção do polimorfismo depende do seu “fitness” (Guimarães *et al.* 2003). A existência de polimorfismos nas populações pode ser considerada como uma consequência de processos adaptativos, uma vez que permite que diferentes genomas possam se expressar, aumentando a plasticidade fenotípica (Plastino & Guimarães 2001).

O alelo que confere a cor verde em *Gracilaria domingensis* está muito bem estabelecido nas populações litorâneas do estado do Ceará, nas quais indivíduos portadores desse alelo podem perfazer até 20% (Guimarães *et al.* 2003). Essas evidências parecem indicar que a mutação que originou o alelo verde tenha se mantido com tanto sucesso, por ser benéfica à espécie, apesar de não poder ser excluída a hipótese de que essa mutação seja neutra (Guimarães *et al.* 2003). O tipo de herança de cor na espécie já foi estudado: o alelo que confere a cor verde é codominante ao alelo que confere a cor vermelha. Em heterozigose (e, portanto, somente nos tetrasporófitos), a cor marrom é expressa (Guimarães *et al.* 1999).

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar o desempenho somático e o reprodutivo das diferentes fases do histórico de vida dos morfos verde,

vermelho e marrons de *Gracilaria domingensis* em laboratório. O desempenho somático foi avaliado com relação aos seguintes aspectos: crescimento de plântulas em diferentes concentrações de nitrato e crescimento de plântulas sob efeito da radiação UV-B, conteúdo protéico, atividade da enzima nitrato redutase (NR), fotossíntese e síntese de “aminoácidos semelhantes a micosporinas” (MAAs). Sabe-se que, para a espécie, a fertilidade influencia muito na capacidade somática, pois *G. domingensis* apresenta um grande esforço reprodutivo, evidenciado por quedas nas taxas de crescimento de plantas férteis tanto tetrasporofíticas (dados apresentados no Capítulo 2) quanto cistocárpicas (Capítulo 2 e Guimarães *et al.* 1999). A influência da fertilidade no desempenho somático dificulta a avaliação desse parâmetro para tetrasporófitos, já que eles facilmente desenvolvem estruturas de reprodução quando cultivados em laboratório. Por esse motivo, os estudos fisiológicos com os morfos de *G. domingensis* em laboratório tiveram início utilizando-se a fase gametofítica feminina, com plantas verdes e vermelhas (Guimarães 2000). O presente trabalho foi o primeiro a comparar parâmetros fisiológicos dos morfos da espécie, nas fases gametofítica e tetrasporofítica. Como a capacidade somática dos tetrasporófitos e, por consequência, dos morfos marrons, só poderia ser corretamente avaliada em fases precoces do desenvolvimento, antes que as plantas desenvolvessem estruturas de reprodução, foi necessário desenvolver uma metodologia específica de trabalho (Apêndice II).

Os resultados obtidos no presente trabalho apontam vantagens no desempenho somático das plantas portadoras do alelo verde. Plantas verdes parecem estar bem adaptadas a ambientes com intensa luminosidade, por apresentarem tendência a maiores valores de fotossíntese máxima quando

comparadas às plantas vermelhas, e também por produzirem mais MAAs quando expostas à radiação UV-B se comparadas ao controle. O maior teor de proteínas solúveis totais observado em gametófitos verdes quando comparados a gametófitos vermelhos pode ser vantajoso para essas algas, uma vez que isso pode representar uma maior capacidade de reservas desse metabólito, importante para algas que vivem em regiões oligotróficas. Essa maior capacidade de estocar proteínas pode estar relacionada à menor quantidade de carboidratos de reserva (amido das florídeas e floridosídeo) presentes em gametófitos verdes quando comparados aos vermelhos (Guimarães *et al.* 2007), já que é reconhecido que, para rodófitas, limitações por nitrogênio levam à síntese desses polissacarídeos. Além disso, o fato da síntese de MAAs ter sido estimulada na linhagem verde quando sob radiação UV-B quando comparada à vermelha, que já mantinha valores maiores mesmo na ausência de UV-B, indica que a linhagem verde parece ter um metabolismo mais econômico e eficiente, só sintetizando essas substâncias caso haja necessidade. Esse metabolismo mais econômico poderia compensar também a menor quantidade de carboidratos de reservas presentes nessa linhagem, e poderia explicar por que a atividade da enzima NR foi menor em gametófitos verdes quando comparados aos vermelhos. Como a linhagem verde, por apresentar metabolismo aparentemente mais eficiente, produz uma quantidade maior de proteínas solúveis totais, a atividade da NR poderia ser reduzida.

Não foram observadas diferenças na quantidade de clorofila *a* e de carotenóides totais entre os diferentes morfos, nem entre as fases gametofíticas e tetrasporofíticas jovens de *Gracilaria domingensis*. Um trabalho anterior que avaliou o conteúdo pigmentar de gametófitos e tetrasporófitos adultos da espécie detectou

maiores quantidades de clorofila *a* em gametófitos verdes quando comparados aos vermelhos, mas essa diferença não foi observada entre os tetrasporófitos (Guimarães *et al.* 2003).

A capacidade reprodutiva dos morfos de *Gracilaria domingensis* foi avaliada com relação aos seguintes aspectos: número de cistocarpos diferenciados, taxas de crescimento de plantas férteis, número e diâmetro de esporos liberados e sobrevivência de esporos em diferentes concentrações de nitrato e radiação UV-B. As únicas diferenças observadas na capacidade reprodutiva entre as linhagens foram com relação ao período de liberação de carpósporos. O maior período de liberação de carpósporos originados a partir de cruzamentos envolvendo apenas gametófitos vermelhos (16 semanas) quando comparado ao período de liberação de carpósporos derivados de cruzamentos envolvendo plantas verdes (11 semanas) disponibilizaria uma maior quantidade de carpósporos da linhagem vermelha, o que proporcionaria a essa linhagem vantagens competitivas com relação às demais. Essa maior capacidade reprodutiva do morfo vermelho é corroborada por um estudo anterior. A coleta excessiva de *Gracilaria domingensis* na praia de Paracuru (CE) para fins comerciais em 1993 permitiu a observação de diferenças entre os morfos na capacidade de recolonizar espaços vagos: a frequência do morfo vermelho aumentou 75% depois disso (Guimarães 1995).

Lewis (1985) propôs uma hipótese segundo a qual células haplóides, por serem menores e terem uma maior relação superfície/volume, poderiam captar nutrientes de maneira mais eficiente do que células diplóides. Além disso, por possuírem uma quantidade menor de DNA, gastariam menos energia e, portanto, poderiam economizar na captação de nutrientes, adquirindo, dessa forma, vantagens

competitivas com relação a células diplóides. Essas possíveis vantagens das células haplóides (tetrásporos) com relação às diplóides (carpósporos) não foram observadas no presente trabalho, possivelmente porque, em *G. domingensis*, o diâmetro desses esporos é semelhante (Capítulo 2).

Um dos mecanismos descritos por Ford (1940) para explicar a manutenção de um polimorfismo descreve que o heterozigoto pode ter um desempenho maior quando comparado a cada um dos homozigotos. No presente trabalho, pelo menos uma das linhagens de tetrasporófitos marrons de *Gracilaria domingensis*, heterozigotas quanto ao alelo que confere a cor verde, apresentaram vantagens com relação a pelo menos um dos homozigotos. Essas vantagens na capacidade somática, foram refletidas por uma tendência a maiores valores dos parâmetros fotossintetizantes P_{max} e α , além de maiores taxas de crescimento, maior conteúdo de proteínas solúveis totais e maior atividade da enzima nitrato redutase. Quanto à capacidade reprodutiva, o maior desempenho dos heterozigotos foi evidenciado por uma maior sobrevivência de carpósporos c-VmVd (derivados de cruzamento Fvm x Mvd e que originaram tetrasporófitos marrons VmVd). A fase carposporofítica que deu origem a essa linhagem (VmVd) apresentou também heterose, já que carpósporos c-VmVd foram liberados em maior quantidade na primeira semana de liberação de esporos com relação às demais. Todas essas características favorecem a manutenção do alelo verde na natureza.

Foi muito interessante o fato de que as duas linhagens de tetrasporófitos marrons (VmVd e VdVm) apresentaram desempenho distinto quando comparadas entre si com relação a vários aspectos. Carpósporos c-VmVd apresentaram maiores taxas de sobrevivência em diferentes concentrações de nitrato, da mesma maneira

que as plântulas tetrasporofíticas marrons que eles originaram (VmVd) apresentaram maiores taxas de crescimento sob efeito da radiação UV-B. Porém, quando foram consideradas as taxas de crescimento de plântulas em diferentes concentrações de nitrato, a linhagem marrom VdVm foi a que obteve maiores valores. Não era esperado que as duas linhagens marrons apresentassem desempenho distinto, já que ambas possuem um alelo que confere a cor verde e outro que confere a cor vermelha. Porém, quando essas linhagens eram cultivadas em solução de água do mar enriquecida com o meio Provasoli (PES, Mclachlan 1973), era possível diferenciar uma coloração marrom esverdeada para a linhagem VdVm, e marrom avermelhada para a linhagem VmVd (Plastino *et al.* 1999). Estes dados, acrescidos aos dados obtidos no presente trabalho, evidenciaram a existência de duas linhagens não só genotipicamente, mas fenotipicamente distintas. No presente trabalho, porém, quando se utilizou água do mar enriquecida com VS, não foi mais possível a diferenciação fenotípica dessas duas linhagens. As duas linhagens de tetrasporófitos marrons, portanto, se expressam de forma diferente frente a condições abióticas distintas. É possível que o gene envolvido na herança de cor em *G. domingensis* esteja relacionado não somente à expressão da cor das plantas, mas a outros aspectos metabólicos. Sabe-se que o tipo de herança de cor é nuclear codominante (Plastino *et al.* 1999), mas não se sabe em que cromossomo esse gene está situado, e muito menos como é a sua expressão. É possível que o gene que confere a cor das plantas regule várias características distintas (pleiotropia), ou até mesmo que genes diferentes interfiram na expressão de uma mesma característica (epistasia). Seriam necessários estudos de genética e biologia molecular para esclarecer essa questão.

Neste trabalho, foi possível comparar, pela primeira vez, as fases gametofítica e tetrasporofítica dos morfos de *Gracilaria domingensis*. O número de carpósporos liberados foi semelhante ao de tetrásporos, porém, a sobrevivência destes últimos foi sempre maior. É possível que a mucilagem que envolve os carpósporos no momento da liberação tenha prejudicado a fixação dos mesmos e que, portanto, esses resultados sejam um artefato de laboratório. O desempenho de tetrasporófitos foi maior que o de gametófitos independentemente da linhagem, considerando-se os seguintes parâmetros: taxas de crescimento de plântulas em diferentes concentrações de nitrato; quantidade de proteínas solúveis totais na maior concentração de nitrato testada (502 μM) e atividade da enzima NR em 127 e 502 μM . Em apenas uma condição, o desempenho de gametófitos foi maior: síntese de proteínas solúveis totais em 252 μM . Em outras condições, porém, o desempenho das duas fases foi semelhante: taxas de crescimento sob efeito da radiação UV-B; quantidade de proteínas solúveis totais em 66 mM e 127 mM; e atividade da enzima NR em 65 e 502 μM . Esses resultados demonstraram que as diferentes fases do histórico de vida de *G. domingensis* têm necessidades metabólicas distintas, o que confere às plantas uma maior plasticidade fenotípica.

Mutações adaptativas promovem vantagens na capacidade somática e/ou reprodutiva dos indivíduos portadores do alelo mutante. A mutação que deu origem ao alelo verde em *G. domingensis* deve ter se mantido por ser benéfica, já que ele trouxe muitas vantagens somáticas às plantas verdes, além de proporcionar heterose. Contudo, por mais vantajoso que seja para a espécie possuir um alelo verde, as plantas vermelhas são encontradas sempre em maior número (Guimarães *et al.* 2003). Como a capacidade reprodutiva desse morfo se mostrou superior à dos

demais, a competição por espaço, comum na região entremarés, deve ser um fator muito importante para manter o alelo vermelho na natureza. As diferenças detectadas entre as linhagens no presente trabalho foram discretas. Caso as vantagens proporcionadas pelo alelo verde fossem muito superiores às apresentadas pelo alelo vermelho, ou vice-versa, seria esperado que, ao longo do tempo, uma das duas formas excluísse a outra. A coexistência dos morfos, porém, indica que cada um deles deve ocupar um nicho ligeiramente distinto do outro, o que confere à espécie vantagens frente a ambientes heterogêneos e/ou mudanças ambientais, possibilitando uma maior capacidade de adaptação.

Referências

- FORD, E.B. 1940. *Ecological Genetics*. Chapman & Hall, London.
- GUIMARÃES, M. 1995. Morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta): frequência populacional, análise pigmentar e aspectos ultraestruturais. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 96 pp.
- GUIMARÃES, M. 2000. Aspectos fisiológicos de *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta): subsídios para a compreensão da manutenção do polimorfismo pigmentar. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- GUIMARÃES, M.; PLASTINO, E.M. & DESTOMBE, C. 2003. Green mutant frequency in natural populations of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. *Eur. J. Phycol.* 38: 165-169.
- GUIMARÃES, M.; VIANA, A.G.; DUARTE, M.E.R.; ASCÊNCIO, S.D.; PLASTINO, E.M. & NOSEDA, M. 2007. Low-molecular-mass carbohydrates and soluble polysaccharides of Green da red morphs of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *Botanica Marina* 50: 314-317.
- MCLACHLAN, J. 1973. *Growth media marine*. In Stein, J.R. (ed.). Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, Cambridge, p. 25-51.

- PLASTINO, E.M. & GUIMARÃES, M. 2001. Diversidad intraespecífica. *In* Sustentabilidad de La biodiversidad. K. Alveal & T. Antezana, Eds. Universidad de Concepción, Chile.
- PLASTINO, E.M.; GUIMARÃES, M.; MATIOLI, S. & OLIVEIRA, E.C. 1999. Codominant inheritance of polymorphic color variants of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *Genetics and Molecular Biology* 22: 105-108.
- VALERO, M.; ENGEL, C.; BILLOT, C.; KLOAREG, B. & DESTOMBE, C. 2001. Concepts and issues of population genetics in seaweeds. *Cahiers de Biologie Marine* 42: 53-62.

Resumo

O presente trabalho analisou as fases gametofítica e tetrasporofítica de morfos verde, vermelho e marrons de *Gracilaria domingensis* em laboratório. A capacidade reprodutiva foi testada considerando-se: i, número de cistocarpos diferenciados; ii, número de carpósporos e tetrásporos liberados; iii, diâmetro desses esporos; e iv, sobrevivência de carpósporos e tetrásporos, esse último em diferentes condições de irradiância, nutrientes, e radiação ultravioleta. A capacidade somática foi testada em diferentes fases do desenvolvimento por meio da análise dos seguintes parâmetros: i, taxas de crescimento em diferentes condições nutricionais; ii, taxas de crescimento em diferentes condições de radiação ultra-violeta; iii, atividade da enzima nitrato redutase em diferentes condições nutricionais; iv, taxas de fotossíntese; e v, síntese de “aminoácidos semelhantes a micosporinas” (MAAs) em diferentes condições de radiação UV-B. Uma das únicas diferenças observadas na capacidade reprodutiva entre as linhagens foi o maior período de liberação de carpósporos derivados dos cruzamentos envolvendo apenas gametófitos vermelhos. Essa característica disponibilizaria uma maior quantidade de propágulos dessa linhagem, trazendo vantagens competitivas em relação às demais no ambiente natural. Plantas verdes mostraram maiores valores de fotossíntese máxima, maior síntese de MAAs quando expostas à radiação UV-B, e maior teor de proteínas solúveis totais quando comparadas às plantas vermelhas. Essas respostas sugerem adaptações a ambientes oligotróficos e com intensa luminosidade. Foi observada heterose nas linhagens de tetrasporófitos marrons (VmVd ou VdVm) com relação a pelo menos um dos seguintes parâmetros: fotossíntese máxima e eficiência fotossintetizante; taxas de crescimento; conteúdo de proteínas solúveis totais; atividade da NR; e sobrevivência de carpósporos. Esse vigor híbrido, pelo menos quanto a alguns aspectos, favoreceria a manutenção do alelo verde na natureza. As linhagens de tetrasporófitos marrons apresentaram desempenho distinto quando comparadas entre si com relação a sobrevivência de esporos e taxas de crescimento, indicando que os dois genótipos se expressam de forma diferente frente a condições abióticas distintas. O número de carpósporos liberados foi semelhante ao de tetrásporos considerando-se a massa fresca das plantas férteis, porém, a sobrevivência desses últimos foi sempre maior. O desempenho somático e reprodutivo de tetrasporófitos foi maior que o de gametófitos na maior parte das condições testadas, independentemente da linhagem. Esses resultados demonstraram que as diferentes fases do histórico de vida de *G. domingensis* têm características metabólicas distintas, o que confere às plantas uma maior plasticidade fenotípica. As diferenças detectadas entre as linhagens no presente trabalho foram discretas. Caso as vantagens proporcionadas pelo alelo verde fossem muito superiores às apresentadas pelo alelo vermelho, ou vice-versa, seria esperado que, ao longo do tempo, uma das duas formas excluísse a outra. A coexistência dos morfos, porém, indica que cada um deles deve ocupar um nicho ligeiramente distinto do outro, o que confere à espécie vantagens frente a ambientes heterogêneos e/ou mudanças ambientais, possibilitando uma maior capacidade de adaptação.

Abstract

This work investigated gametophytic and tetrasporophytic phases of green, red and brown morphs of *Gracilaria domingensis* in laboratory. The reproductive performance was tested considering the following: i, number of cystocarps produced; ii, number of carpospores and tetraspores released; iii, diameter of these spores; and iv, survival of carpospores and tetraspores in different nutrient, irradiance and UV-B conditions. The somatic performance of different life phases was tested considering the following: i, growth rates on different nutritional conditions; ii, growth rates on different UV-B conditions; iii, nitrate reductase (NR) activity on different nutritional conditions; iv, photosynthetic rates; and v, “mycosporine-like amino acids” (MAAs) synthesis on different UV-B conditions. Carpospores originated by the cross of red males x red females were released by a longer period of time when compared to the other carpospores strains. This was almost the only difference found in the reproductive performance among different strains, and could make a greater number of the red strain propagules available for settling. This result could represent competitive advantages in the natural environment. Green plants showed greater values of maximum photosynthesis, a greater MAAs synthesis when exposed to UV-B radiation, and greater amounts of total soluble proteins when compared to the red plants. These responses suggest adaptations to high irradiances and oligotrophic environments. Heterosis was observed in one of the two brown tetrasporophyte strains considering, at least, one of the following parameters: maximum photosynthesis and photosynthetic efficiency; growth rates; total soluble proteins content; NR activity; and survival of carpospores. The heterosis related to these aspects could favor the maintenance of the green allele in nature. The two brown tetrasporophytic strains showed different performance considering the survival of spores and growth rates, which indicates that the two genotypes are expressed in different ways depending on the abiotic conditions. The number of spores released was the same for carpospores and tetraspores when expressed by the fresh biomass of the fertile plants. However, survival of tetraspores was always higher. The somatic and reproductive performance of tetrasporophytes were higher than the gametophytes ones for most of the conditions tested, regardless the strain. These results demonstrate that the different life phases of *G. domingensis* have specific metabolic characteristics, which contributes to a higher phenotypic plasticity of this species. The differences found among the strains were slight. If the green allele promoted very superior advantages when compared to the ones promoted by the red allele, or vice-versa, it would be expected that, within time, one of the two morphs would exclude the other. The coexistence of the morphs, however, indicates that each one of them must occupy a slightly different niche, which provides advantages to the species concerning heterogonous environments, and /or environmental changes, and enable it with a greater adaptative capacity.

**Apêndice I: Seleção da concentração da solução de
von Stosch para o cultivo *in vitro* de *Gracilaria*
domingensis (Gracilariales, Rhodophyta)**

O cultivo de algas marinhas em laboratório pode ser feito em água do mar artificial ou água do mar enriquecida com nutrientes (Andersen 2005). Existem algumas soluções nutritivas que podem ser acrescentadas à água do mar, as mais simples contendo apenas nitrogênio e fósforo, enquanto as mais complexas contêm além destes, vitaminas e metais-traço (McLachlan 1973). Duas soluções destacam-se por serem bastante utilizadas no cultivo de algas marinhas (Plastino 2003): von Stosch, VS (Edwards 1970); e Provasoli, PES (McLachlan 1973).

Gracilaria domingensis é uma espécie estudada há algum tempo em nosso laboratório (Guimarães & Plastino 1999; Guimarães *et al.* 1999; Plastino *et al.* 1999; Guimarães *et al.* 2003; Guimarães *et al.* 2007). Ela vinha sendo cultivada e mantida até então em solução de água do mar enriquecida com PES, diluído a 50% e sem adição de TRIS. Este, no entanto, é um meio de cultura muito rico e que pode propiciar contaminações por bactérias mais facilmente se comparado a outros meios, como VS. O trabalho com esporos torna essa dificuldade maior, já que contaminações nessa etapa do desenvolvimento das algas são mais difíceis de exterminar. A solução nutritiva de VS com modificações (Plastino 1985) tem se mostrado muito útil para enriquecer o cultivo de algas tropicais (Plastino 2003), e atualmente é a mais utilizada em nosso laboratório para o cultivo de diferentes espécies, como *G. birdiae* (Ursi & Plastino 2001), *G. caudata* (Chow *et al.* 2007), *G. cornea* (Ferreira *et al.* 2006), *G. tenuistipitata* (Lopes *et al.* 2002), *Gracilariopsis tenuifrons* (Plastino *et al.* 1996) e *Kappaphycus alvarezii*. (Paula *et al.* 2001). Não se conhecia, até então, a concentração de VS mais adequada ao cultivo de *Gracilaria domingensis*, apesar da constatação de que a espécie crescia bem em soluções de água do mar enriquecidas com este meio.

Três ramos de gametófitos femininos vermelhos de *G. domingensis* foram cultivados em frascos Erlenmeyer contendo 450ml de água do mar enriquecida com VS (Edwards 1970, modificado por Plastino 1985), em quatro concentrações diferentes: 12,5%, 25%, 50% e 75%. Foram feitas três repetições por tratamento. As algas foram mantidas em câmaras de cultivo a temperaturas controladas, variando de 23 a 25 °C, com fotoperíodo de 14h e aeração a cada 30 min. Empregou-se uma irradiância de 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$, provinda de lâmpadas fluorescentes “Luz do Dia” (Osram 40W), mensuradas com sensor esférico Li-COR, modelo LI-193, conectado a um medidor de quanta Li-COR, modelo LI 185. O crescimento foi avaliado semanalmente por meio de medidas de massa fresca das algas por um período de cinco semanas. A partir dessas medidas, foram calculadas taxas de crescimento (Lignell & Pedersén 1989), submetidas posteriormente a uma análise de variância unifatorial com o auxílio do programa Statistica 6.0. Diferenças significativas foram consideradas com $p < 0,05$.

Ramos cultivados em VS 75% apresentaram taxas de crescimento (TC) menores que os cultivados em VS 12,5% e 25% ($p < 0,008$), e semelhantes às observadas em VS 50% ($p = 0,060$). Ramos cultivados em VS 12,5%, 25% e 50% apresentaram taxas de crescimento semelhantes ($p > 0,072$) (Figura 1).

Figura 1- Crescimento de gametófitos femininos vermelhos de *Gracilaria domingensis* cultivados em $90 \mu\text{mol f\acute{otons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, submetidos a diferentes concentrações de von Stosch (%). $n= 3$.

Gracilaria domingensis apresentou melhores taxas de crescimento quando cultivada em baixas concentrações de VS. Outras espécies de Rhodophyta também parecem se beneficiar com a diluição das soluções enriquecedoras de água do mar, como *G. cornea* (Ferreira *et al.* 2006), *G. birdiae* (Ursi & Plastino 2001; Costa 2005) e *Kappaphycus alvarezii* (Paula *et al.* 2001). Isso provavelmente ocorre porque essas soluções foram originalmente desenvolvidas para algas de regiões temperadas, cuja água do mar é mais rica em nutrientes. As taxas de crescimento em VS 12,5%, 25% e 50% foram semelhantes. No entanto, a diluição de 50% promoveu crescimento semelhante ao da diluição de 75%, cujas taxas foram menores que em 12,5% e 25%. Como em 12,5% e 25% o crescimento foi semelhante, a diluição de VS escolhida para ser utilizada em cultivos futuros foi a de 25%, tendo em vista que muitos dos experimentos foram delineados para ocorrerem em períodos prolongados, maiores que os do teste, e que poderia haver uma possível limitação de nutrientes na concentração mais baixa ao longo do tempo.

Referências

- ANDERSEN, R.A. 2005. Algal culturing techniques. Elsevier, Academic Press, Amsterdam. 578 pp.
- CHOW, F.; CAPOCIAMA, F.V.; FARIA, R. & OLIVEIRA, M.C. 2007. Characterization of nitrate reductase activity *in vitro* in *Gracilaria caudata* J. Agardh (Rhodophyta, Gracilariales). *Revista Brasileira de Botânica* 30: 123-129.
- COSTA, V.L. 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, SP.
- EDWARDS, P. 1970. Illustrated guide of seaweeds and sea grasses in vicinity of Porto Arkansas, Texas. *Contrib. Mar. Sci.* 15: 1-228.
- FERREIRA, L.B.; BARUFI, J.B. & PLASTINO, E.M. 2006. Growth of red and Green strains of *Gracilaria cornea* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) in laboratory. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 187-192.
- GUIMARÃES, M.; PLASTINO, E.M. & OLIVEIRA, E.C. 1999. Life history, reproduction and growth of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. *Botanica Marina* 42: 481-486.
- GUIMARÃES, M. & PLASTINO, E.M. 1999. Plastid organization of color variants of the red macroalga *Gracilaria domingensis* (Gracilariaceae). *Acta Microscopica* 8 (Sup. C): 795-796.
- GUIMARÃES, M.; PLASTINO, E.M. & DESTOMBE, C. 2003. Green mutant frequency in natural populations of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. *European Journal of Phycology* 38: 165-169.
- GUIMARÃES, M.; VIANA, A.G.; DUARTE, M.E.R.; ASCÊNCIO, S.D.; PLASTINO, E.M. & NOSEDA, M. 2007. Low-molecular-mass carbohydrates and soluble polysaccharides of Green da red morphs of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *Botanica Marina* 50: 314-317.
- 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). *Botanica Marina* 32: 219-227.

- LOPES, P.F.; OLIVEIRA, M.C. & COLEPICOLO, P. 1997. Diurnal fluctuation of nitrate reductase activity in the marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 33: 225-231
- MCLACHLAN, J. 1973. *Growth media marine*. In Stein, J.R. (ed.). Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, Cambridge, p. 25-51.
- PAULA, E.J.P.; ERBERT, C. & PEREIRA, R.T.L. 2001. Growth rate of the carragenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) *in vitro*. *Phycological Research* 49: 155-161.
- PLASTINO, E.M. 2003. Cultivo em laboratório y selección de cepas em algas rojas (Rhodophyta). In: Mansilla, A., Wellinger, C. & Navarro, N. (Eds.). *Memórias de Curso Internacional de Pós-graduação y Especialización de macroalgas em ambientes subantárticos*. Ediciones Universidad de Magallanes, Punta Arenas, PP. 53-58.
- PLASTINO, E.M.; GUIMARÃES, M.; MATIOLI, S. & OLIVEIRA, E.C. 1999. Codominant inheritance of polymorphic color variants of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *Genetics and Molecular Biology* 22: 105-108.
- PLASTINO, E.M.; URSI, S. & HEIMBECKER, A.M.C. 1996. Efeito da temperatura e salinidade no crescimento de *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). In Anais do IV Congresso Latino-Americano de Ficologia, II Reunião Ibero-Americana de Ficologia e VII Reunião Brasileira de Ficologia: 2: 359-369.
- URSI, S. & PLASTINO, E.M. 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. *Revista Brasileira de Botânica* 24: 587-594.

**APÊNDICE II: Padronização da metodologia utilizada
para estimar o número de cistocarpos e de esporos
liberados por *Gracilaria domingensis* (Gracilariales,
Rhodophyta)**

1. Introdução

A maior parte dos trabalhos realizados com os morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* em nosso laboratório até o presente abordou aspectos do desenvolvimento somático dos indivíduos, como crescimento, fotossíntese e composição de polissacarídeos de parede (Guimarães 2000; Guimarães *et al.* 2007). Recentemente, iniciaram-se também estudos relacionados à capacidade reprodutiva dessa espécie.

Os experimentos descritos a seguir foram planejados para padronizar a metodologia de avaliação: i, do número de cistocarpos diferenciados; e ii, do número de esporos liberados. Foram utilizados ramos cistocárpicos provenientes dos quatro tipos de cruzamentos (Fvm x Mvm; Fvm x Mvd; Fvd x Mvd; e Fvd x Mvm), bem como os carpósporos que elas produziram; e tetrasporófitos marrons VdVm e seus tetrásporos, t-VdVm.

2. Avaliação do número de cistocarpos diferenciados

Gracilaria domingensis caracteriza-se por sempre produzir estruturas de reprodução quando cultivada nas condições gerais de laboratório: água do mar enriquecida com soluções nutritivas (VS ou PES), aeração a cada 30 minutos, fotoperíodo de 14 horas, irradiância de 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, 24-26 °C. Espermatângios são facilmente induzidos quando gametófitos masculinos são cultivados nessas condições, e um grande número de cistocarpos é diferenciado após o cultivo em conjunto de ramos masculinos e femininos. Tentativas anteriores de cruzamentos mostraram a diferenciação de numerosos cistocarpos, de forma a ser difícil a delimitação dos pericarpos adjacentes e, conseqüentemente, da avaliação do número de cistocarpos quando os ramos masculinos permaneceram em contato

com os femininos por mais de uma semana. Portanto, houve a necessidade de planejar testes preliminares com o objetivo de se estabelecer o tempo ideal de contato dos ramos masculinos com os femininos. Esse tempo não poderia ser muito longo, pois isso propiciaria o desenvolvimento posterior de um número muito grande de cistocarpos, nem muito curto, que não fosse suficiente para que a fecundação ocorresse. Diferentes períodos de tempo em que os ramos masculinos férteis permaneceram em contato com os femininos foram, então, testados: 30 min; 1h; 3h; 6h; 1 dia; e 2 dias.

Todos os ramos femininos procedentes dos quatro tipos de cruzamentos (Fvm x Mvm; Fvm x Mvd; Fvd x Mvd; e Fvd x Mvm) desenvolveram cistocarpos, independentemente do tempo de contato com os gametófitos masculinos férteis. Quando os ramos masculinos permaneceram em contato com os femininos por um ou dois dias, o número de cistocarpos diferenciados foi tão grande que não foi possível contá-los. No menor período de tempo testado (30 min) houve diferenciação de cistocarpos em menor número (observação empírica). Esse foi, então, o período de tempo escolhido para que os ramos femininos e masculinos permanecessem em contato nos experimentos descritos nesta Tese. O melhor período para a contagem de cistocarpos foi três semanas após a fertilização, quando já era possível visualizar os ostíolos. Todos os ramos iniciaram a liberação de carpósporos quatro semanas após a fertilização, independentemente da linhagem testada.

O grande número de cistocarpos diferenciados em todos os períodos de tempo testados demonstra a facilidade com que *Gracilaria domingensis* se reproduz em laboratório. Essa característica não parece depender de condições nutricionais, já

que mesmo quando cultivada em outras soluções enriquecedoras de água do mar, como PES, ela rapidamente desenvolve estruturas de reprodução (Guimarães *et al.* 1999). O mesmo parece ocorrer no campo. Estudos anteriores com a espécie mostraram que a frequência de plantas inférteis na natureza é estatisticamente nula (Guimarães *et al.* 2003).

3. Avaliação do número de carpósporos liberados

Ramos cistocárpicos férteis foram colocados separadamente em frascos de vidro do tipo Frascolex (Linha Alimentícia, modelo RED Automático) contendo volumes variáveis (testados nos experimentos descritos a seguir) de água do mar. Um agitador orbital Ética Modelo 109-8 foi utilizado para evitar a sedimentação dos esporos. Após um determinado período (que foi testado nos experimentos descritos a seguir), os ramos férteis foram retirados e pequenas alíquotas do líquido do frasco foram amostradas para que o número de esporos fosse avaliado em um hematocitômetro com a escala de Fuchs-Rosenthal. Este consiste de uma lâmina para microscópio graduada e ligeiramente côncava, com área de 16 mm² e 0,0032 mL de volume (figura 1). As avaliações foram feitas em microscópio óptico Wild Leitz modelo Laborlux.

Figura 1. Hematocitômetro. Setas indicam o ponto de aplicação da amostra. Extraído de Schoen (1988).

Como o número de esporos liberados foi avaliado por meio de alíquotas da água do mar do frasco onde as plantas permaneceram liberando esporos, e como o número de esporos nas alíquotas foi extrapolado para o volume total de água, o primeiro parâmetro que precisou ser padronizado foi o volume de água do mar utilizado nos frascos. Não poderia ser um volume muito pequeno, de forma que as plantas ficassem expostas à dessecação, nem muito grande, de forma que os esporos ficassem muito diluídos e não fosse possível fazer uma amostragem correta. Em um primeiro teste, foram utilizados ramos cistocárpicos procedentes do cruzamento Fvd x Mvd (sem repetições; um ramo por frasco). Foram testados os seguintes volumes de água do mar: 5ml, 10ml, 20 ml e 50 ml. A velocidade do agitador orbital foi de 40%. Após 1 hora, uma alíquota de cada frasco foi retirada e o número de carpósporos presentes foi avaliado no hematocitômetro (tabela 1).

Tabela 1. Número de carpósporos derivados de um ramo cistocárpico verde de *Gracilaria domingensis* (Fvd x Mvd) mensurado no hematocitômetro após uma hora, em diferentes volumes de água do mar. Velocidade do agitador: 40%.

Volume (ml)	Carpósporos/alíquota
50	0
20	1
10	1
5	1

Como o número de carpósporos presentes nas alíquotas foi muito pequeno, independentemente do volume de água do mar testado, supôs-se que o tempo em que os ramos permaneceram liberando esporos (uma hora) foi muito curto. Por este motivo, um segundo teste foi realizado, no qual ramos cistocárpicos vermelhos e verdes (um ramo em cada frasco) procedentes do cruzamento com um gametófito masculino vermelho permaneceram liberando carpósporos por duas horas, em dois volumes de água do mar diferentes: 3 ml e 5 ml (tabela 2).

Tabela 2. Número de carpósporos provenientes de um ramo cistocárpico verde ou vermelho de *Gracilaria domingensis* (procedentes do cruzamento com um gametófito verde), mensurado no hematocitômetro após duas horas, em diferentes volumes de água do mar. Velocidade do agitador: 40%.

Planta cistocárpica	Volume (ml)	Carpósporos/alíquota
Verde	3	2
Verde	3	3
Vermelho	5	1
Vermelho	5	1
Vermelho	5	0
Verde	5	2

Como o número de esporos presentes nas alíquotas ainda era pequeno, um terceiro teste foi realizado, variando-se o tempo em que as plantas permaneceram liberando esporos: 1h; 3h; 4h; 5h; e 6h. Esse tempo não poderia ser longo a ponto de permitir uma grande sedimentação dos esporos, nem tão curto que não fosse suficiente para mensurá-los. Um ramo cistocárpico vermelho e um verde (procedentes do cruzamento com um ramo masculino vermelho) foram utilizados nesse teste (um ramo por frasco). O volume de água do mar foi aumentado para 10 ml. A velocidade do agitador orbital foi de 40% (tabela 3).

Tabela 3. Número de carpósporos provenientes de um ramo cistocárpico verde ou vermelho (procedentes do cruzamento com um gametófito masculino vermelho) de *Gracilaria domingensis*, mensurado no hematocitômetro após períodos de tempo variáveis, em 10 ml de água do mar. Velocidade do agitador: 40%.

Planta cistocárpica	Tempo (h)	Carpósporos/amostra
Vermelho	1	0
Verde	3	2
Verde	4	4
Vermelho	5	3
Vermelho	6	1

O número de carpósporos observados em cada alíquota amostrada não aumentou proporcionalmente ao tempo em que os ramos permaneceram nos frascos. O problema da metodologia neste momento parecia estar relacionado à baixa concentração de esporos. Por esse motivo, ao invés de deixar apenas um ramo

cistocárpico por frasco, como vinha sendo feito até então, um quarto teste foi realizado, com o objetivo de tentar concentrar mais os esporos. Testes com três e seis ramos cistocárpicos foram realizados por um período de duas horas, em 5 ml de água do mar. Optou-se, também, por baixar a velocidade do agitador orbital para 30%. Nesse teste, utilizou-se ramos cistocárpicos derivados de todos os cruzamentos (Fvm x Mvm; Fvm x Mvd; Fvd x Mvd; e Fvd x Mvm). Como o número de esporos observados por amostra foi bem maior (tabela 4), todos os testes seguintes foram realizados com três ramos cistocárpicos por frasco, em um volume de 5 ml de água do mar. Como foi observada o mesma número de esporos no hematocitômetro quando foram utilizados três ou seis ramos cistocárpicos, por uma questão de praticidade optou-se por utilizar três ramos.

Tabela 4. Número de carpósporos derivados de ramos cistocárpicos verdes ou vermelhos de *Gracilaria domingensis* procedentes dos diferentes cruzamentos, mensurado no hematocitômetro após duas horas, em 5 ml de água do mar. Velocidade do agitador: 30%.

Planta cistocárpica	Planta masculina	Ramos/frasco	Carpósporos/amostra
Verde	vermelha	3	12
Vermelho	vermelha	3	19
Verde e vermelha	verde	6	19

4. Determinação do número de alíquotas por frasco

Os testes seguintes foram realizados com ramos cistocárpicos procedentes dos quatro tipos de cruzamentos (Fvm x Mvm; Fvm x Mvd; Fvd x Mvd; e Fvd x Mvm). Foram retirados diferentes números de alíquotas de cada frasco (1-20). Para cada nova alíquota retirada, uma média foi calculada, considerando-se o total de alíquotas anteriores (tabelas 5-9).

Tabela 5. Número de carpósporos derivados de ramos cistocárpicos verdes e vermelhos de *Gracilaria domingensis* procedentes dos diferentes cruzamentos, mensurado no hematocitômetro, para cinco alíquotas diferentes do mesmo frasco onde as plantas permaneceram liberando esporos por duas horas. As médias foram calculadas levando-se em conta o número de carpósporos presentes em todas as alíquotas anteriores. Velocidade do agitador: 30%.

Gametófito feminino	Alíquotas	Carpósporos/alíquota	Médias considerando-se alíquotas anteriores
Verde	1 ^a .	24	24
	2 ^a .	21	23
	3 ^a .	14	19,6
	4 ^a .	20	19,7
	5 ^a .	11	16
Verde	1 ^a .	44	44
	2 ^a .	21	32,5
	3 ^a .	16	27
	4 ^a .	35	29
	5 ^a .	28	28,8
Verde	1 ^a .	20	20
	2 ^a .	32	26
	3 ^a .	26	26
	4 ^a .	22	25
	5 ^a .	21	19,8
Vermelho	1 ^a .	26	26
	2 ^a .	25	25,5
	3 ^a .	41	36,6
	4 ^a .	25	29,2
	5 ^a .	25	30,4
Vermelho	1 ^a .	3	3
	2 ^a .	10	6,5
	3 ^a .	4	5,6
	4 ^a .	19	9
	5 ^a .	6	19,6

Tabela 6. Número de carpósporos provenientes de ramos cistocárpicos verdes de *Gracilaria domingensis* procedentes do cruzamento com um gametófito masculino vermelho, mensurado no hematocítômetro, para 10 alíquotas diferentes do mesmo frasco onde as plantas permaneceram liberando esporos durante 6 horas. As médias foram calculadas levando-se em conta o número de carpósporos presentes em todas as alíquotas anteriores. Velocidade do agitador: 50%.

Alíquotas	Carpósporos/alíquota	Médias considerando-se alíquotas anteriores
1 ^a .	10	10
2 ^a .	10	10
3 ^a .	12	10,6
4 ^a .	5	9,2
5 ^a .	3	8
6 ^a .	7	7,8
7 ^a .	8	7,8
8 ^a .	9	8
9 ^a .	8	8
10 ^a .	4	7,6

Tabela 7. Número de carpósporos provenientes de ramos cistocárpicos verdes de *Gracilaria domingensis* procedentes do cruzamento com um gametófito masculino vermelho, mensurado no hematocítômetro, para 18 alíquotas diferentes do mesmo frasco onde os ramos permaneceram liberando esporos por 9 horas. As médias foram calculadas levando-se em conta o número de carpósporos presentes em todas as alíquotas anteriores. Velocidade do agitador: 30%.

Alíquotas	Carpósporos/alíquota	Médias considerando-se alíquotas anteriores
1 ^a .	18	18
2 ^a .	24	21
3 ^a .	33	25
4 ^a .	29	26
5 ^a .	24	25,6
6 ^a .	18	24,3
7 ^a .	31	25,2
8 ^a .	33	26,2
9 ^a .	16	25,1
10 ^a .	39	26,5
11 ^a .	23	26,1
12 ^a .	30	26,5
13 ^a .	38	27,3
14 ^a .	25	27,2
15 ^a .	30	27,4
16 ^a .	19	26,9
17 ^a .	19	26,5
18 ^a .	22	25,6

Tabela 8. Número de carpósporos derivados de ramos cistocárpicos verdes de *Gracilaria domingensis* procedentes do cruzamento com um gametófito masculino vermelho, mensurado no hematocitômetro, para 20 alíquotas diferentes do mesmo frasco onde as plantas permaneceram liberando esporos por duas horas. As médias foram calculadas levando-se em conta o número de carpósporos presentes em todas as alíquotas anteriores. Velocidade do agitador: 60%.

Alíquotas	Carpósporos/alíquota	Médias considerando-se alíquotas anteriores
1 ^a .	9	9,0
2 ^a .	8	8,5
3 ^a .	7	8,0
4 ^a .	4	7,0
5 ^a .	2	6,0
6 ^a .	4	5,6
7 ^a .	5	5,5
8 ^a .	9	6,0
9 ^a .	6	6,0
10 ^a .	0	5,4
11 ^a .	4	5,2
12 ^a .	3	5,0
13 ^a .	3	4,9
14 ^a .	4	4,0
15 ^a .	6	4,6
16 ^a .	3	4,8
17 ^a .	6	4,9
18 ^a .	5	4,8
19 ^a .	7	4,5
20 ^a .	3	4,9

Tabela 9. Número de carpósporos provenientes de ramos cistocárpicos vermelhos de *Gracilaria domingensis* derivados do cruzamento com um gametófito masculino vermelho, mensurado no hematocítômetro, para 20 alíquotas diferentes do mesmo frasco onde as plantas permaneceram liberando esporos por quatro horas. As médias foram calculadas levando-se em conta o número de carpósporos presentes em todas as alíquotas anteriores. Velocidade do agitador: 60%.

Alíquotas	Carpósporos/alíquota	Médias considerando-se alíquotas anteriores
1 ^a .	6	6,0
2 ^a .	4	5,0
3 ^a .	0	3,3
4 ^a .	3	3,2
5 ^a .	0	2,6
6 ^a .	2	2,5
7 ^a .	2	2,4
8 ^a .	4	2,6
9 ^a .	2	2,5
10 ^a .	1	2,4
11 ^a .	2	2,3
12 ^a .	2	2,3
13 ^a .	1	2,2
14 ^a .	3	2,2
15 ^a .	2	2,2
16 ^a .	0	2,1
17 ^a .	2	2,1
18 ^a .	3	2,1
19 ^a .	3	2,2
20 ^a .	3	2,2

Embora seja recomendado que amostras preliminares para detectar o n amostral necessário em geral devem possuir um $n=30$, no mínimo (Rosso 1995), no atual trabalho não foi possível retirar 30 amostras de esporos a partir de um volume de 5 ml, onde os ramos permaneceram liberando esporos. Dessa forma, consideramos 20 um número razoável para uma amostragem preliminar. Os dados mostrados nas tabelas 7-9 foram utilizados para os cálculos do n amostral de alíquotas necessárias. As médias obtidas para cada n estão apresentadas na figura 2.

Figura 2- Médias do número de carpósporos de *Gracilaria domingensis* calculadas levando-se em conta o número de carpósporos presentes em todas as alíquotas anteriores. Vm-2h: dados apresentados na tabela 9; Vd-2h: dados apresentados na tabela 8; Vd-9h: dados apresentados na tabela 7.

Dois tipos de cálculos estatísticos foram realizados para verificar o número de alíquotas necessárias: i, $n = s/\Delta$, onde s = desvio-padrão da média da amostra preliminar e Δ = erro-padrão desta média (Pringle 1984); e ii, $n = t^2p (s/\Delta)^2$, onde t = valor da estatística t para $p = 1-(\alpha/2)$, s = desvio-padrão da média da amostra preliminar e Δ = erro-padrão desta média (Bakanov 1985).

Os valores obtidos quando se utilizou a fórmula de Pringle (1984) foram: Vd-2h: $n = 4,54$; Vm-2h: $n = 4,48$; Vd-9h: $n = 4,14$. Um número de alíquotas igual a 5 é compatível com o que mostra o gráfico da figura 2: a partir desse valor, mesmo que se aumente o número de alíquotas amostradas, as médias continuam praticamente as mesmas.

O emprego da fórmula de Bakanov (1985) resultou em: Vd-2h: $n = 59,80$; Vm-2h: $n = 61,60$; e Vd-9h: $n = 51,24$. Um $n > 50$, no entanto, é bastante alto e torna-se impraticável no presente trabalho por duas razões: i, após retirar 20

alíquotas, o volume de água dos frascos já havia sido bastante reduzido; e ii, o tempo necessário para manipular as repetições seria inviável. Dessa forma, estabeleceu-se que o número de alíquotas observadas por repetição seria de cinco.

A velocidade do agitador orbital foi escolhida como 50%. Velocidades menores que esta levaram a uma maior número de carpósporos fixos nos frascos após algumas horas de liberação (dados não apresentados).

5. Avaliação do número de tetrásporos liberados

Este teste foi realizado com cinco ramos de tetrasporófito marrom VdVm. Eles foram deixados por 2h em um frasco contendo 5 ml de água do mar, com velocidade de agitação de 50%. Foram retirados diferentes números de alíquotas de cada frasco (1-20). Para cada nova alíquota retirada, uma média foi calculada, considerando-se o total de alíquotas anteriores (tabela 10).

Aplicando as mesmas fórmulas utilizadas para carpósporos, obteve-se os seguintes valores: $n = 4,47$ com a fórmula de Pringle (1984); e $n = 59,72$ com a fórmula de Bakanov (1985). Esses resultados são muito semelhantes aos obtidos para carpósporos. Novamente, e pelos mesmos motivos apresentados anteriormente, estabeleceu-se que o número de alíquotas amostradas por repetição seria de cinco.

Tabela 10. Número de tetrásporos provenientes de ramos tetrasporofíticos marrons VdVm de *Gracilaria domingensis*, mensurado no hematocítômetro, para 20 alíquotas diferentes do mesmo frasco onde as plantas permaneceram liberando esporos por duas horas. As médias foram calculadas levando-se em conta o número de carpósporos presentes em todas as alíquotas anteriores. Velocidade do agitador: 60%.

Alíquotas	Tetrásporos/alíquota	Médias considerando-se alíquotas anteriores
1 ^a .	4	4,0
2 ^a .	4	4,0
3 ^a .	1	3,0
4 ^a .	7	4,0
5 ^a .	5	4,2
6 ^a .	5	4,3
7 ^a .	2	4,0
8 ^a .	3	3,8
9 ^a .	5	4,0
10 ^a .	3	3,9
11 ^a .	3	3,8
12 ^a .	4	3,8
13 ^a .	2	3,8
14 ^a .	7	3,9
15 ^a .	5	4,0
16 ^a .	6	4,1
17 ^a .	5	4,1
18 ^a .	9	4,4
19 ^a .	8	4,6
20 ^a .	0	4,4

6. Conclusões

Com base nos testes preliminares apresentados neste capítulo, chegou-se às seguintes conclusões: i, ramos masculinos e femininos devem permanecer em contato por 30 min durante os cruzamentos; ii, três ramos cistocárpicos ou três tetrasporofíticos das diferentes linhagens devem permanecer em volumes de 5 ml por 2 h; iii, esses frascos devem ser agitados a uma velocidade de 50% no agitador orbital; e iv, o número necessário de sub-repetições (alíquotas) amostradas no hematocítômetro por repetição deve ser igual a cinco.

7. Referências

BAKANOV, A.I. 1985. A nomogram for estimating the required number of samples of an aggregated distribution. *Hydrobiological Journal* 6: 85-88.

- EDWARDS, P. 1970. Illustrated guide to the seaweeds and sea grasses in the vicinity of Porto Aransas, Texas. *Contributions in Marine Science* 15: 1-228.
- FERREIRA, L.B., BARUFI, J.B. & PLASTINO, E.M. 2006. Growth of red and green strains of the tropical agarophyte *Gracilaria cornea* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) in laboratory. *Revista Brasileira de Botanica* 29: 187- 192.
- GUIMARÃES, M. & PLASTINO, E.M. 1999. Plastid organization of color variants of the red macroalga *Gracilaria domingensis* (Gracilariales). *Acta Microscopica* 8: 795-796.
- GUIMARÃES, M.; PLASTINO, E.M. & OLIVEIRA, E.C. 1999. Life history, reproduction and growth of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. *Botanica Marina* 42: 481-486.
- GUIMARÃES, M.; PLASTINO, E.M. & DESTOMBE, C. 2003. Green mutant frequency in natural populations of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. *European Journal of Phycology* 38: 165-169.
- GUIMARÃES, M.; VIANA, A.G.; DUARTE, M.E.R.; ASCÊNCIO, S.D.; PLASTINO, E.M. & NOSEDA, M. 2007. Low-molecular-mass carbohydrates and soluble polysaccharides of Green da red morphs of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *Botanica Marina* 50: 314-317.
- 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). *Botanica Marina* 32: 219-227.
- MCLACHLAN, J. 1973. *Growth-media marine*. In Stein, J.R. (ed.), Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 25-51.
- PAULA, E.J.; ERBERT, C.; & PEREIRA, R.T.L. 2001. Growth rate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) in vitro. *Phycological Research* 49: 155-161.

- PLASTINO, E.M. 1985. As espécies de *Gracilaria* (Rhodophyta, Gigartinales) da Praia Dura, Ubatuba, SP. – aspectos biológicos e fenologia. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- PLASTINO, E.M. 2003. Cultivo em laboratorio y selección de cepas em algas rojas (Rhodophyta). In Mansilla, A.; Welinger, C. & Navarro, N. (eds.). *Memorias de Curso Internacional de Postgrado y Especialización de macroalgas em ambientes subantárticos*. Ediciones Universidad de Magallanes, Punta Arenas. pp. 53-58.
- PLASTINO, E.M., GUIMARÃES, M., MATIOLI, S.R. & OLIVEIRA, E.C. 1999. Codominant inheritance of polymorphic colour variants of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *Genetics and Molecular Biology*. 22: 105-108.
- PRINGLE, J.D. 1984. Efficiency estimates for various quadrat sizes used in benthic sampling. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 41: 1485-1489.
- ROSSO, S. 1995. Dimensionamento amostral em estudos descritivos de comunidades de organismos bênticos sésseis e semi-sésseis. In *Oecologia Brasiliensis*, Volume I: estrutura, funcionamento e manejo de ecossistemas brasileiros. F.A. Esteves (ed.). Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Instituto de Biologia, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ. pp. 193-223.
- SCHOEN, S. 1988. Cell counting. In *Experimental Phycology: a Laboratory Manual*. Lobban, C.S.; Chapman, D.J & Kremer, B.P. p. 16-22.
- URSI, S. & PLASTINO, E.M. 2001. Crescimento *in vitro* de linhagens de coloração vermelha e verde clara de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) em dois meios de cultura: análise de diferentes estádios reprodutivos. *Revista Brasileira de Botânica*. 24: 587-594.