Fabiana Marchi dos Santos

Diversidade intraespecífica em *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): estudos genéticos e fisiológicos na interpretação da cor do talo.

Intraspecific diversity in *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): genetic and physiological studies in the interpretation of the thallus color.

São Paulo
2017

Fabiana Marchi dos Santos

Diversidade intraespecífica em *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): estudos genéticos e fisiológicos na interpretação da cor do talo.

Intraspecific diversity in *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): genetic and physiological studies in the interpretation of the thallus color.

Versão revisada

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

Orientador(a): Profª Dra. Estela Maria Plastino

São Paulo
2017

Ficha Catalográfica

Santos, Fabiana Marchi
Diversidade intraespecífica em *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): estudos genéticos e fisiológicos na interpretação da cor do talo. 76 páginas

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

1. Diversidade intraespecífica 2. Gracilaria caudata 3. Herança de cor 4. Codominância 5. Marrom-esverdeada 6. Variantes de cor 7. Variantes reprodutivas 8. Percentual de fixação 9. Pigmentos 10. Taxas de crescimento 11. Fotossíntese 12. Fertilidade 13. Recrutamento I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a). Fanly Fungyi Chow Ho

Prof(a). Dr(a). Daniela Milstein

Prof(a). Dr.(a). Estela Maria Plastino

Orientador(a)

À minha mãe Valdete Marchi,
e aos meus avós Sebastiana (Nega) e Hilário
com amor e carinho.

Agradecimentos

À Deus por me proporcionar essa experiência de vida;

À professora Estela Maria Plastino, pela orientação, pela compreensão, parceria e paciência contribuindo tanto para a minha formação profissional, quanto pessoal.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido.

Ao Instituto de Biociencias (IBUSP), onde foi realizado este trabalho, pelo espaço e infraestrutura.

Aos técnicos do Laboratório de Algas Marinhas – Édison José de Paula (LAM) do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências (IBUSP) que me acompanharam durante o desenvolvimento deste trabalho André Nakasato, Rosário Petti e Willian Oliveira pelo aprendizado e suporte técnico.

Aos professores do LAM Flávio, Fungyi, Mariana, Suzana e Valéria, pelo aprendizado e convivência.

Aos funcionários da pós-graduação do IBUSP pelo carinho e bom atendimento.

À minha mãe Valdete Marchi pelo amor incondicional pelo apoio nos momentos difíceis e por seu exemplo de dedicação ao trabalho.

Ao Michel Wunderlich pelo companheirismo, amor, apoio e ânimo para seguir em frente nos momentos difíceis.

À todos companheiros do LAM, em especial ao André Faria, Bruno Lenha Verde, Carolina Azevedo, Cintia Iha, Fabio Nauer, Mariana Mungioli e Talita pelo companherismo e por me auxiliarem desde o ínicio do mestrado.

À todos os professores que me acompanharam e acompanham ao longo da minha jornada acadêmica, em especial ao professor Walter Barrella pela indicação a professora Estela por me mostrar que devemos ter foco ao perseguir nossos sonhos.

Índice

1. Resumo.....1
2. Abstract.....3
3. Introdução.....5
3.1 Diversidade intraespecífica.....5
3.2 Variantes pigmentares em Rhodophyta.....5
3.2.1. Análises genéticas.....7
3.2.2. Análises fisiológicas.....8
3.3 G*racilaria* Greville.....9
3.4 Determinação sexual em *Gracilaria*.....12
3.5 Importância econômica de *Gracilaria*.....13
3.6 *Gracilaria caudata*.....14
4. Hipótese.....16
5. Objetivo geral.....16
6. Objetivos específicos.....16
7. Material e métodos.....17
7.1 Material biológico.....17
7.2 Condições gerais de cultivo.....17
7.2.1 Meio de cultura.....17
7.2.2 Temperatura, irradiância, fotoperíodo e aeração.....17
7.3 Desenho experimental.....18
7.4 Herança de cor.....19
7.5 Fluorescência *in vivo* da clorofila *a*.....21
7.6 Crescimento.....23
7.7 Número de ápices diferenciados.....23
7.8 Percentual de fertilidade.....24
7.9 Conteúdo pigmentar.....24
7.10 Número de cistocarpos diferenciados.....25
7.11 Percentual de fixação.....26
7.12 Análises estatísticas.....26
8. Resultados.....27
8.1 Herança de cor.....27
8.2 Taxas de crescimento.....36

8.3 Fertilidade.....37
8.4 Fotossíntese.....38
8.5 Pigmentos.....46
8.6 Número de ápices diferenciados.....47
8.6.1 Gametofitos *vm* e *me* e tetrasporófitos *vmvm*, *meme*, *vmme* e *mevm* – 14 dias..47
8.6.2 Gametófitos femininos *vm* e *me* - 21 dias.....48
8.7 Percentual de Fixação.....50
9. Discussão.....52
9.1 Herança de cor.....52
9.2 Histórico de vida.....53
9.3 Anomalias reprodutivas.....55
9.4 Aspectos fisiológicos.....58
10. Considerações finais.....63
11. Referências.....63

1. RESUMO

Gracilaria. caudata J. Agardh é uma das espécies mais comuns no Oceano Atlântico tropical e subtropical. No nordeste do Brasil a espécie é explotada como uma importante agarófita, onde recentemente foram encontradas variantes de coloração marrom-esverdeada crescendo lado a lado a indivíduos de coloração vermelha (mais comuns) em uma população natural. Este estudo teve por objetivo averiguar a estabilidade e o padrão de herança de cor marrom-esverdeada de indivíduos de *G. caudata* procedentes de uma população natural, bem como avaliar o desempenho somático e reprodutivo das diferentes fases do histórico de vida, levando-se em consideração indivíduos de coloração marrom-esverdeada e vermelha. A partir de cruzamentos teste foi possível verificar que a coloração marrom-esverdeada é estável e herdável, sendo o padrão de herança dessa coloração do tipo nuclear codominante, em que tetrasporófitos homozigotos são vermelhos (*vmvm*) ou marrom-esverdeados (*meme*) e os heterozigotos apresentam o fenótipo marrom (*vmme* e *mevm*) com segregação das colorações parentais em 1:1. O histórico de vida de *G. caudata* foi completado *in vitro* em aproximadamente cinco meses. Variantes pigmentares, independentemente da fase do histórico, atingiram precocemente a maturidade reprodutiva quando comparadas a espécimes do tipo selvagem. Essa característica pode favorecer a manutenção da variante marrom-esverdeada na natureza. No entanto, apesar da diferenciação tardia de cistocarpos, gametófitos femininos, provenientes de tetrasporófitos *vmvm*, apresentaram um melhor desempenho reprodutivo em relação a gametófitos femininos provenientes de tetrasporófitos com variação pigmentar (*meme*, *vmme* e *mevm*); essa característica poderia contribuir para a predominância de espécimes selvagens na natureza. Entretanto, tetrasporófitos com variação pigmentar não só atingiram precocemente a maturidade reprodutiva como se tornaram mais férteis em relação ao tipo selvagem. Apenas na descendência de tetrasporófitos selvagens (*vmvm*) foi observada a proporção sexual esperada de 1:1, entre gametófitos femininos e masculinos. Na progênie de tetrasporófitos com variação pigmentar foram observadas alterações na proporção sexual, devido à presença de gametófitos bissexuais. Essa condição de bissexualidade, provavelmente, é decorrente da presença de um alelo recessivo denominado *bi*, o qual possibilitaria a expressão de funções femininas em gametófitos masculinos. No presente estudo, pudemos evidenciar que a bissexualidade em *G. caudata* é herdável, e que gametófitos femininos que portam a mutação *bi* foram capazes de transmitir a mutação aos descendentes, porém o alelo não é fenotipicamente detectável. Como não foram observados gametófitos bissexuais na descendência de tetrasporófitos *vmvm* (provenientes do cruzamento ♀*vm* x ♂*vm*) sugere-se que a mutação *bi* estaria presente apenas em tetrasporófitos marrom-esverdeados oriundos da natureza. No entanto, permanece a possibilidade de ocorrência de espécimes bissexuais de coloração vermelha em populações naturais,

já que tais indivíduos foram observados na progênie de tetrasporófitos *vmme* e *mevm*, indicando assim, que não há ligação entre a bissexualidade e a coloração do talo. Gametófitos femininos vermelhos apresentam melhor desempenho somático quando comparados a gametófitos femininos marrom-esverdeados. Esse aspecto foi evidenciado por meio de taxas de crescimento, número de ápices diferenciados e percentual de fixação ao frasco de cultura. Essas características devem contribuir para a predominância de espécimes do tipo selvagem na natureza. Gametófitos marrom-esverdeados, em contrapartida, apresentaram melhor desempenho fotossintetizante, o que poderia representar uma vantagem, considerando-se o ambiente heterogêneo de ocorrência da espécie, e desse modo, contribuir para a manutenção dessa variante em população natural. Entretanto, não foram observadas diferenças com relação às taxas crescimento entre tetrasporófitos dos quatro genótipos (*vmvm*, *meme*, *vmme* e *mevm*), apesar das diferenças quanto à fertilidade, concentração pigmentar, número de ápices diferenciados e desempenho fotossintetizante. Tais tetrasporófitos apresentaram taxas de crescimento semelhantes às observadas para gametófitos femininos marrom-esverdeados, apesar do melhor desempenho fotossintetizante desses últimos. Os dados obtidos nesse trabalho sugerem que a variante marrom-esverdeada apresente vantagens adaptativas para *G. caudata*.

2. ABSTRACT

Gracilaria caudata J. Agardh is one of the most common species in the tropical and subtropical Atlantic Ocean. In the northeast of Brazil the species is exploited as an important agar producer, where greenish-brown color variants have recently been found growing side by side with individuals of red color (more common) in a natural population. The aim of this study was to investigate the stability and pattern of green-brown inheritance of *G. caudata* individuals from a natural population, as well as to evaluate the somatic and reproductive performance of the different stages of life history, considering individuals of greenish-brown and red colors. From test crosses it was possible to verify that the greenish-brown color is stable and inheritable. Codominant nuclear inheritance was found in the greenish-brown strains. Homozygous tetrasporophytes are red (*rdrd*) or greenish-brown (*gbgb*) while heterozygous tetrasporophytes present the brown phenotype (*rdgb* and *gbrd*), with a parental color segregation in 1:1. The life-history of *G. caudata* was completed *in vitro* in approximately five months. Color variants, regardless of the history phase, reached early reproductive maturity when compared to wild type specimens. This feature may favor the maintenance of the greenish-brown variant in nature. However, in spite of the late differentiation of cystocarps, female gametophytes derived from *rdrd* tetrasporophytes had a better reproductive performance in relation to female gametophytes from tetrasporophytes with color variation (*gbgb*, *rdgb* and *gbrd*); this feature could contribute to the predominance of wild specimens in nature. However, tetrasporophytes with color variation not only reached reproductive maturity early but also became more fertile in relation to the wild type. The expected sexual ratio of 1:1 between female and male gametophytes was only observed in the offspring of wild tetrasporophytes (*rdrd*). There were changes in the sexual proportion in the progeny of tetrasporophytes with color variation due to the presence of bisexual gametophytes. This condition of bisexuality is probably due to the presence of a recessive allele called *bi*, which would allow the expression of female functions in male gametophytes. In the present study, we could show that bisexuality in *G. caudata* is inheritable, and that female gametophytes, which carry the *bi* mutation, were able to transmit the mutation to the offspring, but the allele is not phenotypically detectable. As no bisexual gametophytes were found in the offspring of *rdrd* tetrasporophytes (from the cross ♀*rd* x ♂*rd*), it is suggested that the *bi* mutation would only be present in brown-green tetrasporophytes from the natural population. However, it remains the possibility of occurrence of bisexual specimens of red color in natural populations, since such individuals were observed in the progeny of tetrasporophytes *rdgb* and *gbrd*, thus indicating that there is no link between bisexuality and the thallus color. Red female gametophytes show better somatic performance when compared to the greenish-brown female gametophytes. This aspect was

evidenced by means of growth rates, number of differentiated apices, and percentage of attachment to the culture flask. These characteristics should contribute to the predominance of wild type specimens in natural populations. Otherwise, the greenish-brown gametophytes showed better photosynthetic performance, which could represent an advantage considering the heterogeneous environment of the species occurrence, thus contributing to the maintenance of this variant in the natural population. However, no differences were observed among tetrasporophytes of the four genotypes (*rdrd*, *gbgb*, *rdgb* and *gbrd*), regarding the growth rates, despite of the differences in fertility, pigment concentration, number of differentiated apices, and photosynthetic performance. These tetrasporophytes presented similar growth rates to those observed for greenish-brown female gametophytes, despite of the better photosynthetic performance of the latter. The data obtained in this work suggest that the greenish-brown variant presents adaptive advantages for *G. caudata.*

3. INTRODUÇÃO

3.1 Diversidade intraespecífica

A plasticidade fenotípica presente em muitas espécies de algas vermelhas (Rhodophyta) é descrita como uma consequência da diversidade intraespecífica, a qual compreende o conjunto de expressões fenotípicas possíveis, que podem ser manifestadas em uma mesma espécie, por meio de processos de aclimatação e/ou adaptação (Plastino, 2004). A aclimatação corresponde a diferentes expressões de ajustamento ao ambiente, que um organismo pode sofrer dentro dos limites do seu genótipo, enquanto que a adaptação corresponde a diferentes expressões decorrentes de alterações genotípicas (Gantt 1990).

A variação genética de um caráter surge por mutação, em uma frequência que pode ser variável de espécie para espécie, ou de linhagem para linhagem (Gant, 1990). De qualquer forma, a frequência, a transmissão e a persistência dessas variações em uma população dependem das condições ambientais, as quais o organismo está inserido (Futuyma, 1998; Plastino, 2004), já que o ambiente exerce forte papel sobre as reais implicações de uma mutação (seleção natural), determinando se seus efeitos serão benéficos, neutros ou deletérios ao organismo (Futuyma, 1998).

O termo polimorfismo refere-se a uma condição na qual ocorrem, no mesmo habitat ou população, dois ou mais fenótipos descontínuos de uma determinada espécie, em tal frequência que, o mais raro deles não possa ser mantido por mutação recorrente ou imigração (Ford, 1964). Dessa forma, o polimorfismo se estabelece numa população por meio de processos adaptativos, sendo caracterizadas como morfos ou morfotipos as variantes que ocorrem no ambiente com frequência superior a 1% (Futuyma, 1998). No entanto, quando a diferenciação genética é decorrente de seleção a diferentes ambientes, resulta em populações geneticamente distintas de uma mesma espécie. Nesse caso, utiliza-se o termo ecótipo (Innes, 1984).

3.2 Variantes pigmentares em Rhodophyta

Algas vermelhas (Rhodophyta) compartilham uma série de atributos, como células eucarióticas, ausência de flagelos, amido das florídeas armazenado no citoplasma, ficobiliproteínas (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina) como pigmentos acessórios à fotossíntese e tilacoides livres no cloroplasto (Woelkerling 1990). Sua coloração típica é resultante da presença de ficobiliproteínas, principalmente ficoeritrina, a qual mascara a clorofila *a* e os carotenoides (Bold & Wynne 1985).

Todavia, já foram observados na natureza indivíduos de uma mesma espécie que possuíam alterações na coloração do talo em relação ao tipo mais comum (selvagem). Essas variações fenotípicas, na maioria das vezes, decorrem da capacidade de fotoaclimatação do aparato fotossintetizante, ou seja, de uma alteração (ajuste) na composição pigmentar das algas frente à heterogeneidade luminosa do ambiente. Somente em poucos casos o fenótipo alterado é resultante de uma variação genotípica (mutações) (Plastino, 2004).

Variantes pigmentares no gênero *Gracilaria* foram reportadas no final da década de 70 com o isolamento e caracterização de linhagens mutantes de *G. tikvahiae* Lachlan, que surgiram espontaneamente em laboratório (como *Gracilaria* sp., van der Meer & Bird 1977). Posteriormente, outras variantes de cor foram encontradas para o gênero, algumas provenientes de populações naturais, *G. conferta* (Schousboe ex Montagne) Montagne, *G. verrucosa* (Hudson) Papenfuss (Levy & Friedlander 1990), *G. chilensis* C.J. Bird, McLachlan & E.C. Oliveira (González et al. 1995; Santelices et al. 1996), *G. birdiae* Plastino & E.C. Oliveira (Costa & Plastino, 2001; Plastino et al. 2004), *G. dominguensis* (Plastino et al. 1999), *G. cornea* J. Agardh (Ferreira et al. 2006), *G. caudata* J. Agardh (Faria & Plastino, 2016), *G. debilis* (Forsskål) Børgesen e *G. edulis* (Gmelin) Silva (Veeragurunathan et al. 2016). Outras variantes surgiram espontaneamente em laboratório, como em *G. birdiae* (Costa & Plastino, 2001).

Variantes pigmentares espontâneas foram também descritas para outros gêneros de Rhodophyta, como *Ahnfeltia plicata* (Hudson) Fries (Maggs & Pueschel 1989; Mansilla et al. 2013), *Chondrus crispus* Stackhouse (van der Meer, 1981a), *E. denticulatum* (N.L. Burman) Collins & Hervey (Gerung & Ohno, 1997), *Gigartina teedei* (Mertens ex Roth) J.V. Lamouroux (como *G. teedii* (Roth) Lamourox [Guiry, 1984]), *G. skottsbergii* Setchell & N. L.Gardner (Barahona et al. 2012), *Halosaccion ramentaceum* (L.) J. Agardh (van der Meer, 1981b), *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Yokoya et al. 2003), *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C. Silva (como *Eucheuma alvarezii* Doty [Doty et al. 1987]), *K. striatus* (F.Schmitz) Doty ex P.C. Silva (Gerung & Ohno, 1997), *Mazzaella laminarioides* (Bory) Fredericq (Navarro, 2015), *Pyropia yezoensis* Ueda (como *Porphyra yezoensis* Aruga & Miura, 1984), *P. tenera* var. *tamatsuensis* A. Miura (como *Porphyra tenera* var. *tamatsuensis* Niwa et al. 2008). Entretanto, a maior parte do conhecimento gerado a respeito de variantes pigmentares é proveniente de estudos com espécies de *Gracilaria*, principalmente *G. tikvahiae*. Outro fato importante a ser destacado é que, muitos desses estudos foram realizados com variantes induzidas por agentes químicos mutagênicos, os quais alteram a qualidade e/ou quantidade dos pigmentos fotossintetizantes, já que variantes pigmentares espontâneas são raras, e frequentemente dão origem a uma única planta ou porções da planta com fenótipo alterado, geralmente de coloração verde ou esverdeada (van der Meer, 1990).

De forma geral, a caracterização dos mutantes/variantes pigmentares tem contemplado diferentes aspectos, como genéticos, fisiológicos e ecológicos. Assim, além de contribuírem para o conhecimento da diversidade intraespecífica, tais estudos permitem que diferentes linhagens possam ser utilizadas como ferramentas em estudos ficológicos, fornecendo subsídios para a compreensão da biologia das macroalgas marinhas.

3.2.1. Análises genéticas

Estudos genéticos envolvendo mutantes pigmentares têm dado grande ênfase à genética Mendeliana, a qual possibilita a determinação da hereditariedade, estabilidade e características de transmissão do fenótipo alterado. A estabilidade do caráter cor e o modo como é transmitido podem ser conhecidos por meio do acompanhamento de sua herança em condições laboratoriais (Plastino & Guimarães 2001), já que a obtenção de tais informações em campo seria inviável, tendo em vista as oscilações das diferentes variáveis ambientais, bem como o alto risco de contaminação genética (van der Meer, 1990).

Estudos genéticos com variantes pigmentares de Rhodophyta têm se limitado a espécies com reprodução sexuada, as quais crescem e se reproduzem bem em condições laboratoriais (van der Meer, 1990). Nesse filo, a segregação genética ocorre na fase gametofítica (haploide) e, nesse estádio, as mutações recessivas não são mascaradas por alelos dominantes. No entanto, para saber se esporófitos (diploides) apresentam genes dominantes ou carregam uma mutação recessiva, é necessária a indução de fertilidade, a liberação de tetrásporos e a diferenciação de gametófitos, para que então possam ser realizados testes de cruzamentos, que permitam determinação do seu genótipo (van der Meer 1990).

Na maioria dos estudos com variantes pigmentares, a herança de cor do fenótipo alterado revelou-se autossômica nuclear recessiva (van der Meer & Bird, 1977; van der Meer 1979; 1981a; Guiry, 1984; Zhang & van der Meer, 1988). No entanto, alguns genes dominantes (van der Meer, 1979), codominantes (van der Meer, 1979; Plastino et al. 1999) e citoplasmáticos (van der Meer, 1978; Zhang & van der Meer, 1988) foram também citados.

Na costa brasileira, a maioria das variantes pigmentares espontâneas foram reportadas para *Gracilaria*, sendo ao todo quatro espécies (*G. bidiae*, *G. domingensis*, *G. cornea* e *G. caudata*) e sete variantes (Costa & Plastino, 2001; Plastino et al. 2004; Plastino et al. 1999; Ferreira et al. 2006; Faria & Plastino, 2016). Todavia, a caracterização do padrão da herança de cor foi realizada apenas para as variantes de *G. birdiae*, as quais possuem herança nuclear recessiva para os fenótipos verde claro

(Plastino et al. 2004) e marrom-esverdeado (Costa & Plastino, 2011) e herança citoplasmática para o fenótipo verde (Costa & Plastino, 2011), bem como para as variantes de *G. domingensis*, que apresenta herança nuclear codominante para o fenótipo verde, que quando em heterozigose com o tipo selvagem (vermelho) expressa o fenótipo marrom (Plastino et al. 1999). Em outros gêneros, foram descritas apenas uma variante por espécie como *Gigartina teedei*, a qual apresenta herança nuclear recessiva para o fenótipo verde (Guiry, 1984) e *Hypnea musciformis* (Yokoya et al. 2003), que ainda não teve seu padrão de herança de cor esclarecido.

Uma vez caracterizado o padrão de herança de cor, as linhagens mutantes podem ser utilizadas como marcadores genéticos em cruzamentos, (van der Meer, 1987). Sendo assim, podem auxiliar na detecção de fertilização, distinção entre processos sexuais ou assexuais (van der Meer et al. 1984), e entre processos de autofertilização e fertilização cruzada em espécies monoicas (van der Meer, 1987). Além disso, podem evidenciar aspectos inesperados e/ou desconhecidos sobre o histórico de vida de algas, como por exemplo, a identificação de germinação de tetrásporos *in situ* (Plastino et al. 1999), de falhas durante a citocinese de tetrasporângios (van der Meer, 1977), e de maturação sexual em gametófitos femininos microscópicos (van der Meer & Todd, 1977).

3.2.2. Análises fisiológicas

Análises comparativas de características fisiológicas entre variantes pigmentares e tipos selvagens contribuem para o conhecimento da diversidade funcional da espécie. Além disso, fornecem subsídios para a compreensão de como se dá a manutenção do polimorfismo pigmentar na natureza, bem como contribuem para a seleção de linhagens mais adequadas à maricultura (Patwary & van der Meer, 1982).

A maioria das variantes espontâneas apresentam um menor desempenho quanto ao crescimento em relação ao tipo selvagem, seja em campo ou em condições laboratoriais (Guimarães, 2000; Plastino et al. 2004; Mansilla et al. 2014; Faria & Plastino, 2016; Veeragurunathan et al. 2016). Entretanto, desempenho similar (Muñoz et al. 2004; Ferreira et al. 2006; Yokoya et al. 2007; Ursi et al. 2003; 2013; Navarro, 2015), ou superior foram também reportados (Gerung & Ohno, 1997).

A coloração esverdeada apresentada pela maioria dessas variantes vem sendo descrita como uma consequência da deficiência nas concentrações de ficoeritrina em relação ao tipo selvagem, e em contrapartida, um aumento nas concentrações de aloficianina, ficocianina e/ou clorofila *a* é observado (van der Meer, 1979; Guimarães et al. 2003; Yokoya et al. 2007; Niwa et al. 2008; Costa & Plastino, 2011, Martins et al. 2011; Faria & Plastino, 2016; Veeragurunathan et al. 2016). O conhecimento da

composição pigmentar é de grande importância nos estudos com variantes, pois permite caracterizar quantitativa e qualitativamente compostos que denotam as diferentes colorações, que podem ter consequência na capacidade competitiva de ocupar determinado nicho (Plastino & Guimarães, 2001). Ficobiliproteínas e carotenoides funcionam como pigmentos acessórios à fotossíntese, por ampliarem o espectro de absorção da energia luminosa e, posteriormente, transferir essa energia, por ressonância, a um par de moléculas de clorofila *a* presentes nos centros de reação dos fotossistemas I (P_{700}) ou II (P_{680}) (Gantt, 1990). Além da importância no processo de fotossíntese, os pigmentos podem ser utilizados pela alga como reserva de nitrogênio (García-Sánchez et al. 1993) e ainda possuir função fotoprotetora (Sinha et al. 1995; Figueroa et al. 2008).

A avaliação da capacidade fotossintetizante vem sendo realizada em muitos estudos envolvendo variantes pigmentares (Yokoya et al. 2007; Martins et al. 2011; Ayres-Ostrock & Plastino, 2014; Faria & Plastino, 2016). Num panorama geral, dentre os diferentes métodos de avaliação, a fluorimetria *in vivo* da clorofila *a* vem recebendo grande destaque, tendo em vista que se trata de uma metodologia rápida, e não invasiva, que fornece informações sobre o funcionamento do aparato fotossintetizante em tempo real (Kromkamp & Forster, 2003). Além disso, permite a identificação de morfos e ecótipos, a partir da análise e comparação dos diferentes parâmetros fornecidos, os quais evidenciam diferenças intraespecíficas frente a diversas pressões ambientais (Enriquez & Borowitzka, 2010).

3.3 G*racilaria* Greville

O gênero *Gracilaria* é um dos mais diversos da família Gracilariaceae (Oliveira & Plastino, 1994), incluindo cerca de 185 espécies taxonomicamente aceitas e amplamente distribuídas pelo mundo (Guiry & Guiry 2016). *Gracilaria* possui um histórico de vida trifásico do tipo-"*Polysiphonia"*, caracterizado pela alternância de fases diploides (tetrasporofítica e carposporofítica) e haploide (gametofítica) (Oliveira & Plastino, 1994). Gametófitos são dioicos e isomórficos ao tetrasporófito, sendo ambos de vida livre, enquanto que, o carposporófito desenvolve-se sobre o gametófito feminino (figura 1).

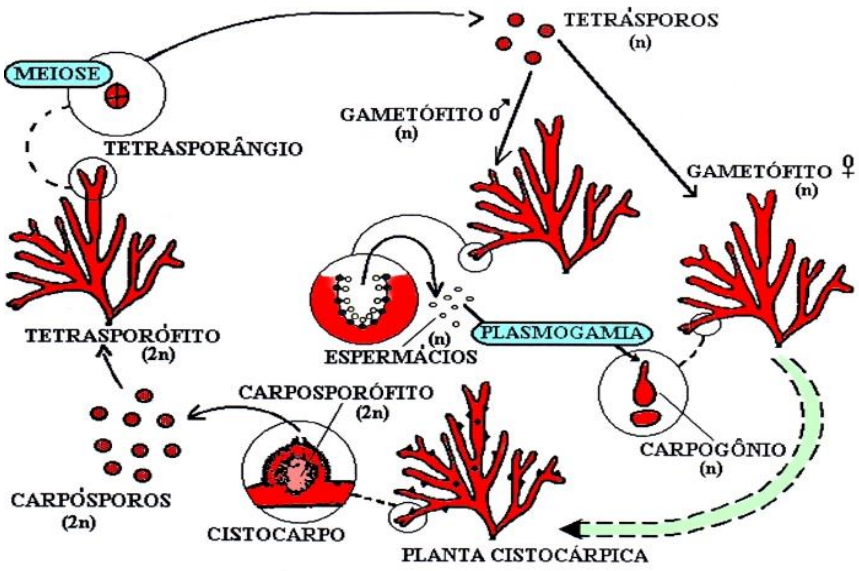


Figura 1. Histórico de vida de *Gracila* sp. (modificado de Oliveira & Plastino, 1994).

Escassas são as tentativas de trazer à luz o real significado evolutivo de um histórico de vida diplobionte (Valero et al.1992; Richerd et al. 1993; Hughes & Otto, 1999). Para alguns autores, esse tipo de histórico pode ser considerado como uma adaptação frente a um ambiente sazonalmente variável (Stebbins & Hill, 1980), no qual ocorreu a seleção para dois níveis de ploidia. Diploides: i, possuiriam maiores chances de novas mutações, aumentando assim a variabilidade genética, a qual pode conferir maiores chances de adaptação frente a mudanças ambientais (Crow & Kimura, 1965); ii, poderiam mascarar mutações deletérias recessivas, os quais garantiriam o bom funcionamento do indivíduo (Crow & Kimura 1965); e/ou iii, poderiam apresentar maior capacidade de síntese de proteínas e metabólitos (Adams & Hansche 1974). Nos haploides, mutações deletérias tenderiam a ser eliminadas mais rapidamente, enquanto que mutações benéficas seriam incorporadas na população (Hughes & Otto, 1999). Além das vantagens conferidas para cada nível de ploidia, um histórico de vida com alternância de gerações poderia conferir uma vantagem a mais em relação aos outros tipos de históricos, como redução do custo do sexo, já que esse custo ocorreria somente na geração haploide, mais precisamente no momento da fertilização, em que são necessários dois indivíduos para produzir uma descendência (Richerd et al.1993). A variabilidade genética ocorreria principalmente nos tetrasporófitos (diploide), em que ocorre o processo meiótico para produção de tetrásporos. Assim, possuir um histórico com alternância de gerações seria vantajoso em relação a outros tipos de histórico, em que o custo do sexo fosse alto (Richerd et al.1993).

Estudos realizados em populações naturais têm evidenciado uma maior frequência da fase diploide em relação à haploide para algumas espécies de *Gracilaria*, como por exemplo, *G. mammillaris* (Montagne) M.Howe e *G. cervicornis* (Turner) J.Agardh (Plastino, 1985), *G. cornea* (Orduña-Rojas et al. 2002), *G. chilensis* (Guillemin et al. 2008), *G. vermiculophylla* (Ohmi)

Papenfuss (Terada et al. 2010), *G. gracilis* (Stackhouse) M.Steentoft, L.M.Irvine & W.F.Farnham (Martín et al. 2011), *G. birdiae* e *G. caudata* (Ayres-Ostrock et al. 2015). O mesmo foi observado para outros gêneros e espécies de algas vermelhas, como *Gelidium canariense* (Grunow) Seoane Camba ex Haroun, Gil-Rodríguez, Díaz de Castro & Prud'homme van Reine, G. *arbusculum* Bory ex Børgesen *(as G. arbuscula)*, *G. pusillum* (Stackhouse) Le Jolis e *Pterocladiella capillacea* (S.G.Gmelin) Santelices & Hommersand (Prathep et al. 2009; Polifrone et al. 2012). Essa predominância da fase diploide na natureza vem sendo atribuída a questões intrinsecamente genéticas, as quais confeririam uma melhor aptidão desses indivíduos em relação aos haploides. Segundo alguns autores, a ploidia, entre outros aspectos, poderia afetar a capacidade somática dos organismos, permitindo assim um melhor crescimento vegetativo da fase diploide em relação à fase haploide, e provavelmente uma maior capacidade de reprodução vegetativa por meio da fragmentação do talo e recrutamento dos ápices destacados (Guillemin et al. 2008; Martín et al. 2011).

A fase haploide seria beneficiada pelo menor tempo necessário para a replicação do DNA e divisão celular, implicando assim, em um menor tempo de germinação de esporos, o que favoreceria sua manutenção no ambiente (Cavalier-Smith, 1978; Adams and Hansche, 1974). A manutenção da fase haploide vem sendo também relacionada a questões ecofisiológicas, nas quais o tamanho celular de fases iniciais do desenvolvimento traria grandes implicações, como por exemplo, tetrásporos (esporos n) são menores e possuem uma maior relação área de superfície por volume celular em relação a carpósporos (esporos 2n), o que lhes confere uma melhor eficiência nutricional, bem como uma vantagem frente a um ambiente com escassez de nutrientes (Lewis, 1985). Além disso, são células mais leves, o que implicaria em um maior tempo para sedimentação, proporcionando uma melhor capacidade de dispersão (Cavalier-Smith, 1978). De fato, quando realizados estudos comparativos entre essas duas fases em laboratório, o que se obtém, na maioria dos casos, é um melhor desempenho da fase tetrasporofítica (diploide) em relação à gametofítica (haploide), quando são avaliados parâmetros fisiológicos, como taxas de crescimento, respiração, fotossíntese e composição pigmentar, a despeito da condição isomórfica (Guillemin et al. 2013; Faria et al. 2016). No entanto, cabe ressaltar que, dependendo das condições abióticas utilizadas, pode ocorrer uma inversão desses resultados, ora com melhor desempenho de tetrasporófitos, ora gametófitos (Destombe et al. 1993). Esses resultados reforçam a importância do ambiente como agente selecionador, o qual indicaria a direção de seleção para a expansão de uma fase ou de outra.

3.4 Determinação sexual em *Gracilaria*

A proporção entre gametófitos femininos e masculinos produzidos a partir da germinação de tetrásporos em *Gracialaria* tem sido reportada como 1:1 (Ogata et al. 1972, van der Meer 1986, Guimarães et al. 1999; Costa & Plastino, 2001). Todavia, variações desse padrão, bem como a ocorrência de plantas reprodutivamente mistas já foram observadas para algumas espécies, como por exemplo, *G. tikvahiae* (como *Gracilaria* sp., van der Meer & Tood 1977; van der Meer, 1986) e *G. domingensis* (Gimarães et al. 1999).

Diferentes tipos de variantes reprodutivas vêm sendo encontradas ao longo dos anos, para diversas espécies de Rhodophyta, como *Gigartina pistilatta* (S.G.Gmelin) Stackhouse (Isaac & Simons, 1954), *Euthora cristata* (C.Agardh) J.Agardh (Dixon, 1961), *Membranoptera alata* (Hudson) Stackhouse e *Polysiphonia urceolata* (Lightfoot ex Dillwyn) Greville (Edelstein & MacLachlan, 1966), *Cystoclonium purpureum* (Hudson) Batters e *Chondria baileyana* (Montagne) Harvey (Edelstein et al. 1974). Sugere-se que diferentes mecanismos seriam responsáveis por esse fenômeno (van der Meer & Todd, 1977). Todavia, na maioria dos casos, foram realizadas apenas observações descritivas dessas variantes, as quais não fornecem dados suficientes para sua explicação (van der Meer & Todd 1977).

A razão para o surgimento de fases mistas, em alguns casos, foi explicada como uma consequência da germinação de tetrásporos *in situ*, resultando em ramos gametofíticos presos ao tetrasporófito (Bird et al. 1977; Oliveira & Plastino, 1984; Plastino, 1985; Destombe et al. 1989). No entanto, nem sempre a explicação para esse fenômeno pareceu tão óbvia, e um estudo mais detalhado desses casos proporcionou uma melhor apreciação do controle genético na diferenciação reprodutiva (van der Meer, 1986).

O desenvolvimento de gametófitos femininos e masculinos em igual número é consequência de um rigoroso controle genético de determinação sexual, o qual é primariamente regido por um par de fatores com segregação mendeliana (van der Meer & Tood 1977). A partir de observações feitas em uma variante reprodutiva de *Gracilaria tikvahiae*, a qual possuía porções de "tecido" gametofítico funcional em um talo tetrasporofítico maduro, os autores propuseram que esses fatores seriam alelos (mt^m para masculinos e mt^f para femininos), ao invés de cromossomos sexuais. E assim, a condição heterozigótica para o alelo *mt*, e não o estado diploide, determinaria o desenvolvimento tetrasporofítico, tendo em vista a evidencia citológica de que as porções gametofíticas observadas eram em si diploides. Dessa forma, para essa variante, o fenômeno foi explicado como uma consequência de recombinações mitóticas, em que células do talo tornaram-se homozigotas para um

ou outro *mt* alelo, expressando características gametofíticas ao invés de tetrasporofíticas, apesar de sua condição diploide (van der Meer & Tood 1977).

Novos mecanismos foram propostos para a explicação dos diferentes tipos de variantes reprodutivas encontradas. Em alguns casos, falhas na citocinese durante o processo de divisão meiótica foram apontadas como a causa do fenômeno, dando origem a um único indivíduo com ramos e/ou porções masculinos e femininos (van der Meer, 1977). Para outras variantes, no entanto, verificou-se a presença de uma mutação recessiva denominada *bi*, a qual seria distinta do locus sexo-determinante *mt* e possibilitaria o desenvolvimento de cistocarpos e espermatângios em um único ramo gametofítico (van der Meer et al. 1984). Dessa forma, ressalta-se a necessidade de novos estudos que contribuam para compreensão do fenômeno, permitindo o esclarecimento se de fato esses fatores sexuais seriam uma simples alternativa de um único gene regulatório ou se existiria um mecanismo de controle envolvendo um complexo de locus (van der Meer, 1990).

3.5 Importância econômica de *Gracilaria*

O gênero *Gracilaria* tem sido alvo de muitos estudos, pois inclui espécies que constituem a principal fonte de ágar (Oliveira et al. 2000), representando 80% da produção mundial (Bixeler et al. 2011). Esse ficocoloide, extraído da parede celular, possui propriedades estabilizantes, gelificantes e emulsificantes, as quais despertam grande interesse nas indústrias alimentícias e biotecnológicas para a produção de embutidos, entre outros alimentos, componentes de géis de eletroforese e meios de cultura em bacteriologia e micologia (Cunha et al. 2009).

A qualidade e quantidade de ágar produzidos por algas gracilarioides têm variado inter e intraespecificamente. Esse fato pode estar relacionado a diferentes aspectos, como por exemplo, diferentes condições abióticas as quais as algas foram cultivadas, a diferentes metodologias de extração do ficocoloide, ou a uma diversidade intraespecífica (Macchiavello et al. 1999; Skriptsova & Nabivailo, 2009; Ursi et al. 2013). Nesse contexto, o estudo de variantes pigmentares se mostra de grande valia e tem evidenciado similaridades quanto à qualidade e rendimento de ágar em relação ao tipo selvagem, quando cultivadas sob as mesmas condições (Ursi et al. 2013; Veeragurunathan et al. 2016), salientando, dessa forma, seu potencial econômico para a maricultura.

Gracilaria é, atualmente, o único de gênero de agarófita comercialmente cultivado, sendo seus principais produtores o Chile e a Indonésia (Bixeler et.al 2011). Cabe ressaltar, que o fornecimento de mudas para a indústria de ágar provem principalmente de bancos naturais, o que tem causado a depleção desses em diferentes regiões do mundo (Mc Hugh 2003). No Brasil, a explotação de bancos

naturais de *Gracilaria* para a extração de ágar teve início na década de 60 (Câmara-Neto 1987), e apesar de tentativas já realizadas, ainda não existem cultivos comerciais no país. A explotação desse recurso vem ocorrendo principalmente na região nordeste, de forma extrativista ou por meio de cultivo artesanal, onde exerce um papel importante na economia de comunidades costeiras (Carneiro et al. 2011; Costa et al. 2011). As principais espécies explotadas são *G. birdiae*, *G. caudata*, *G. cornea* e *G. domingensis* (Miranda et al. 2012), entretanto, a ausência de fiscalização e de procedimentos adequados de manejo que permitam a recuperação completa dos bancos tem proporcionado um declínio populacional (Carneiro et al. 2011). Nesse sentido, o cultivo comercial, e em especial o cultivo comercial a partir de esporos, bem como a utilização de variantes pigmentares, mostram-se como alternativas viáveis para satisfazer as demandas e para a conservação de populações naturais (Alveal et al. 1997; Hayashi, 2007; Ursi et al. 2013), já que, além de possibilitarem o aumento da biomassa disponível, contribuem para a variabilidade genética das espécies selecionas (Alveal et al. 1997).

3.6 *Gracilaria caudata*

Dentre as espécies que ocorrem no litoral brasileiro destaca-se *Gracilaria caudata*. No Brasil foi identificada pela primeira vez por Joly et al. (1963) como *Gracilariopsis sjoestedtii* (Kylin) Dawson, e ao longo dos anos foi referida por diversos autores como *G. andersonii* (Grunow in Piccone) Dawson (Ugadim 1975), *Gracilaria sjoestedtii* (Oliveira 1977), *G. verrucosa* (Hudson) Papenfuss (Steentoft et at. 1995) e *Gracilaria* sp. (Plastino, 1991). Por meio de estudos morfoanatômicos e testes de cruzamentos, Plastino & Oliveira (1997) esclareceram que essas algas se tratavam de uma espécie já descrita por J. Agardh em 1852, como *G. caudata*, e que grande parte do equívoco em sua nomenclatura foi resultante da plasticidade fenotípica e de sua ampla distribuição geográfica.

Gracilaria caudata pode ser encontrada no litoral de diferentes países como Venezuela, Barbados, Porto Rico e Cuba. Ao longo da costa brasileira, é encontrada desde o estado do Maranhão (Bellorin, 2002; Florêncio et al. 2012) até o estado de Santa Catarina (Plastino & Oliveira 1997). Ocorre em costões rochosos, principalmente de baias protegidas e águas turvas, estendendo-se desde o médio-litoral até a franja do infra-litoral. É geralmente gregária e, muitas vezes, está parcialmente enterrada na areia (Plastino & Oliveira 1997). A espécie possui um histórico de vida do tipo "*Polysiphonia*" (como *Gracilaria* sp., Oliveira & Plastino, 1984) e apresenta um talo cilíndrico, ereto, de coloração vermelho vináceo a amarelado, o qual pode atingir até 34 cm de comprimento e 1,7 mm

de diâmetro. Além disso, seu talo pode apresentar de um a vários eixos principais decorrentes de um apressório discoidal, sendo suas ramificações primeiramente subdicotômicas, tornando-se posteriormente unilaterais e de até quinta ordem (Plastino & Oliveira 1997).

Populações naturais de *Gracilaria caudata* vêm sendo explotadas no nordeste brasileiro desde a década de 70, para a produção de ágar alimentício destinado ao mercado nacional (Oliveira & Miranda, 1998). Devido à ausência de manejo adequado, algumas populações têm sofrido com a forte explotação (Miranda, 2008). Cabe ressaltar que, antes que se utilize uma espécie em potencial, é necessário o conhecimento de sua fisiologia, diversidade genética e mecanismos que a mantém (Norse, 1993). Nesse sentido, alguns aspectos relacionados à biologia de *G. caudata* vêm sendo estudados em condições laboratoriais, indicando que a espécie apresenta valores ótimos de crescimento em temperaturas de 26-30ºC, tolera salinidades de 10-60 ups (como *Gracilaria* sp., Yokoya & Oliveira, 1992a, b), possui ágar economicamente viável (Yoshimura, 2006), bem como polissacarídeos com excelente capacidade de quelação de íons ferrosos, o quais são os mais eficazes pró-oxidantes dos sistemas alimentares (Costa et al. 2010). Ainda em laboratório, foi realizada a análise e caracterização de seus ácidos graxos e ésteres metílicos (Tomaz, 2012), além da avaliação de atividade da nitrato redutase (Chow et al. 2007).

Estudos realizados com indivíduos de *G. caudata* cultivados em fazendas de camarões indicaram que a espécie é potencialmente útil como biofiltro em cultivos integrados, e que poderia contribuir para a melhora da qualidade das águas de regiões costeiras, pois apresenta bom desempenho na absorção de compostos nitrogenados e fósforo (Marinho Soriano et al. 2009). Além disso, a partir de estudos realizados em tanques de cultivos de peixes, observou-se um aumento da taxa de sobrevivência de pós-larvas, após a adição de ágar proveniente de *G. caudata* misturado à ração, indicando assim, um potencial imunoestimulante desse polissacarídeo (Araújo et al. 2008).

Alguns aspectos relacionados à diversidade intraespecífica de *G. caudata* vêm sendo estudados, indicando por meio de marcadores genéticos ou de técnicas de avaliação fisiológica que a espécie apresenta ecótipos ao longo da costa brasileira, relacionados à irradiância (Ayres-Ostrock et al. 2015; Faria & Plastino, 2016). Diferenças fisiológicas entre as fases vêm sendo também descritas, como por exemplo, a observação de maiores taxas de crescimento e conteúdo pigmentar por parte da fase tetrasporofítica em relação à fase gametofítica, bem como existência de diferenças entre as fases, quanto à capacidade fotossintetizante frente à radiação PAR ou UV-B (Araújo et al. 2013; Faria & Plastino, 2016).

Recentemente, variantes pigmentares de coloração marrom-esverdeada foram encontradas crescendo lado a lado a indivíduos de coloração vermelha (mais comuns) em uma população natural de *Gracilaria caudata* do nordeste do Brasil (Faria & Plastino, 2016). Tendo em vista i, a carência

de informações a respeito das implicações do fenótipo alterado para a espécie, ii, a ausência de conhecimento acerca de sua herdabilidade, e iii, a grande importância de variantes pigmentares em estudos genéticos, desenvolvemos este trabalho.

4. HIPÓTESE

Este trabalho tem por hipótese que a coloração vermelha do talo de *Gracilaria caudata* seja dominante em relação à coloração marrom-esverdeada, e que plantas marrom-esverdeadas apresentem menor capacidade somática e reprodutiva, bem como menor conteúdo pigmentar. Além disso, supõe-se que tetrasporófitos apresentem melhor desempenho somático em relação a gametófitos, independentemente da coloração.

5. OBJETIVO GERAL

Compreender os aspectos da diversidade intraespecífica de *Gracilaria caudata*, procedente de uma população natural, levando-se em consideração a coloração do talo. Esses estudos devem contribuir para a interpretação de possíveis vantagens adaptativas na manutenção da variante de cor marrom-esverdeada na natureza.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Interpretar a herança de cor marrom-esverdeada em *Gracilaria caudata* por meio de testes de cruzamentos e acompanhamento de sua descendência. Esse objetivo permitirá averiguar a estabilidade e o padrão de herança da cor marrom-esverdeada;
- Avaliar a capacidade somática de gametófitos e tetrasporófitos de coloração vermelha e marrom-esverdeada por meio dos seguintes parâmetros: i, taxas de crescimento; ii, desempenho fotossintetizante; iii, conteúdo pigmentar; iv, número de ápices diferenciados; e v, percentual de fixação ao frasco de cultura (apenas para gametófitos).
- Averiguar o desempenho reprodutivo de tetrasporófitos procedentes dos diferentes cruzamentos entre plantas vermelhas e marrom-esverdeadas, por meio da avaliação do percentual de fertilidade do talo, e verificar o desempenho reprodutivo de gametófitos femininos derivados desses tetrasporófitos, por meio da avaliação do número de cistocarpos diferenciados.

7. MATERIAL E MÉTODOS

7.1 Material biológico

Indivíduos tetrasporofíticos de *Gracilaria caudata* de coloração vermelha (tipo selvagem) e marrom-esverdeada (variante) foram coletados na praia da Pedra Rachada (3°44'44,90" S 38°29'47,62" O), município de Paracuru, estado do Ceará por E.M. Plastino em 08/02/2012. A partir desses indivíduos, que cresciam lado a lado em um banco de arenito da região entre marés, foram estabelecidos cultivos unialgáceos (Plastino & Oliveira 1990). Posteriormente, esses cultivos foram mantidos no "Banco de germoplasma de algas gracilarióides" do Laboratório de Algas Marinhas Édson José de Paula (LAM), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (Costa et al. 2012).

7.2 Condições gerais de cultivo

7.2.1 Meio de cultura

O meio de cultura foi preparado com solução de nutrientes von Stosch modificada (Ursi & Plastino, 2001) e diluída à concentração de 25% (VS 25%) em água do mar, com renovações semanais. A água do mar utilizada no preparo do meio de cultura foi proveniente do Centro de Biologia Marinha da USP, Município de São Sebastião, Estado de São Paulo, tendo salinidade média de 32 UPS. Essa água foi submetida à dupla filtragem em filtro de pressão (Cuno), com porosidade de 5 e 1 µm, e esterilizada por Radiação Ionizante (Lâmpada UV - C, sistema QUIMIS Q884-21 – 3,8L/min) (Petti & Plastino, 2012).

7.2.2 Temperatura, irradiância, fotoperíodo e aeração

As algas foram mantidas no LAM em câmaras de cultivo com temperatura controlada de 25±1ºC e iluminadas com lâmpadas fluorescentes "Luz do Dia" (PHILIPS 40 W). Foi adotada a irradiância de 70±5 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, mensurada com sensor esférico Li-COR modelo L1-193, conectado ao medidor de quanta Li-COR modelo L1-185. O fotoperíodo utilizado foi de 14 horas. A aeração foi empregada em períodos alternados de 30 minutos. O ar foi fornecido por um compressor radial

IBRAM CR03 de diafragma e isento de óleo, sendo inicialmente borbulhado em um frasco contendo água destilada que serve como filtro e umidificador.

7.3 Desenho experimental (Figura 2)

Gametófitos femininos (♀) e masculinos (♂) foram obtidos a partir da germinação de tetrásporos liberados por tetrasporófitos de campo de coloração vermelha (*vm*) e coloração marrom-esverdeada (*me*). Posteriormente, quatro tipos de cruzamentos teste foram realizados em triplicatas envolvendo esses gametófitos (♀*vm* x ♂*vm*, ♀*me* x ♂*me*, ♀*vm* x ♂*me*, ♀*me* x ♂*vm*). Nove plântulas, provenientes de cada cruzamento, foram cultivadas até que essas estivessem com 77 dias de idade, a fim de se observar distinções quanto ao padrão de coloração do talo, tempo de maturação de tetrasporângios e número de ápices diferenciados. A partir desses tetrasporófitos férteis, representativos de cada genótipo (*vmvm*, *meme*, *vmme* e *mevm*), foram coletados tetrásporos, e posteriormente selecionadas 25 plântulas provenientes da germinação desses. O desenvolvimento dessas plântulas foi acompanhado até que essas estivessem com cerca de 106 dias de idade, a fim de se observar distinções quanto ao padrão de coloração e verificar a proporção sexual entre os gametófitos resultantes. As biomassas desses gametófitos, bem como o número de cistocarpos diferenciados, foram analisados quando esses atingiram 76 e 84 dias de idade. Avaliações semanais de taxas de crescimento e fluorescência *in vivo* da clorofila *a* foram realizadas por um período de 14 dias para gametófitos ♀ *vm* e *me* (procedentes de tetrasporófitos de campo) e tetrasporófitos (procedentes dos diferentes cruzamentos). Ao final do período experimental (14 dias), o número de ápices diferenciados foi analisado, bem como o percentual de fertilidade do talo e conteúdo pigmentar para tetrasporófitos. Gametófitos ♀ *vm* e *me* (procedentes de tetrasporófitos *vmvm* e *meme*, respectivamente) foram analisados quanto ao percentual de fixação ao frasco de cultura, após um período de cultivo de 14 dias. Além disso, esses mesmos gametófitos femininos foram analisados quanto ao número de ápices diferenciados durante um período de 21 dias.

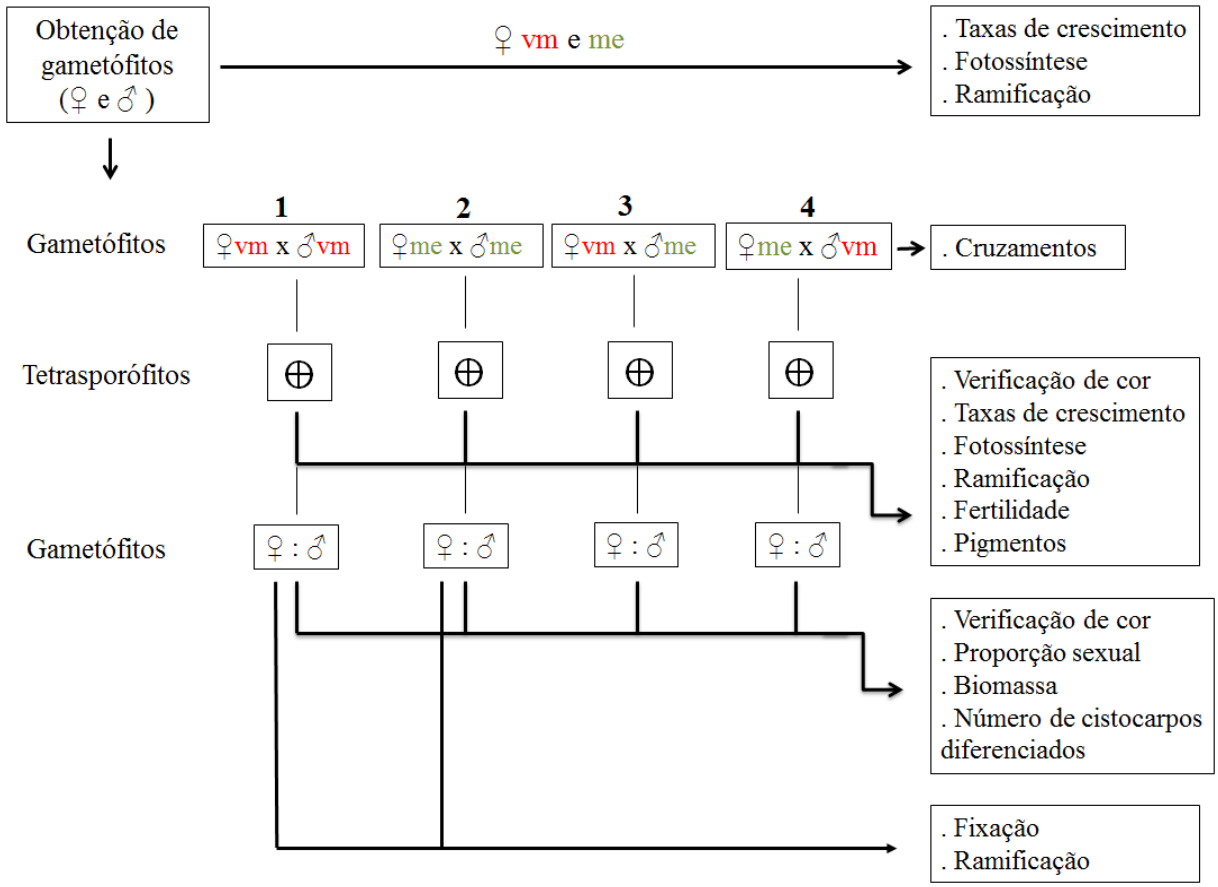


Figura 2. Etapas experimentais realizadas a partir de gametófitos derivados de tetrásporos obtidos de tetrasporófitos de coloração vermelha (*vm*) e coloração marrom-esverdeada (*me*) de *G. caudata* coletados na praia da Pedra Rachada, município de Paracuru, estado do Ceará.

7.4 Herança de cor

A metodologia utilizada nos estudos relacionados à herança de cor de *Gracilaria caudata* foi baseada em Plastino et al. (1999) e Costa & Plastino (2011).

Tetrásporos liberados por um espécime tetrasporofítico de coloração vermelha (*vm*) e por um espécime de coloração marrom-esverdeado (*me*), ambos provenientes de campo, foram cultivados em frascos Erlenmeyer distintos (500ml), sob as condições gerais de cultivo, até a diferenciação de estruturas reprodutivas (espermatângios e cistocarpos). Nessa ocasião, foram selecionados ápices de 1 cm de comprimento, representativos de cada sexo, e esses foram cultivados separadamente sob as condições gerais de cultivo por um período de dois meses, a fim de assegurar a ausência de carpogônios fertilizados em gametófitos ♀, e obter gametófitos ♂ repletos de espermatângios.

Cruzamentos entre plantas femininas e masculinas de mesma cor (♀*vm* x ♂*vm*, ♀*me* x ♂*me*) e entre cores diferentes (♀*vm* x ♂*me* e ♀me x ♂*vm*) foram então realizados, a fim de se determinar o padrão de herança da coloração marrom-esverdeada. Nesses cruzamentos, um ápice de gametófito ♂

repleto de espermatângios, com aproximadamente 4 cm de comprimento, e três ápices de 2 cm de comprimento de um mesmo gametófito ♀ foram cultivados por um período de 48 horas em um mesmo frasco Erlenmeyer contendo 450ml de meio de cultura com aeração (n=3). Após esse período, os ápices ♂ foram então removidos, e os ♀ foram cultivados até a diferenciação de cistocarpos. Durante todo o período experimental, ápices ♀ *vm* e *me* provenientes dos mesmos indivíduos utilizados nos cruzamentos foram cultivados na ausência de ápices ♂, a fim de verificar a existência de hermafroditismo e partenogênese (Figura 3).

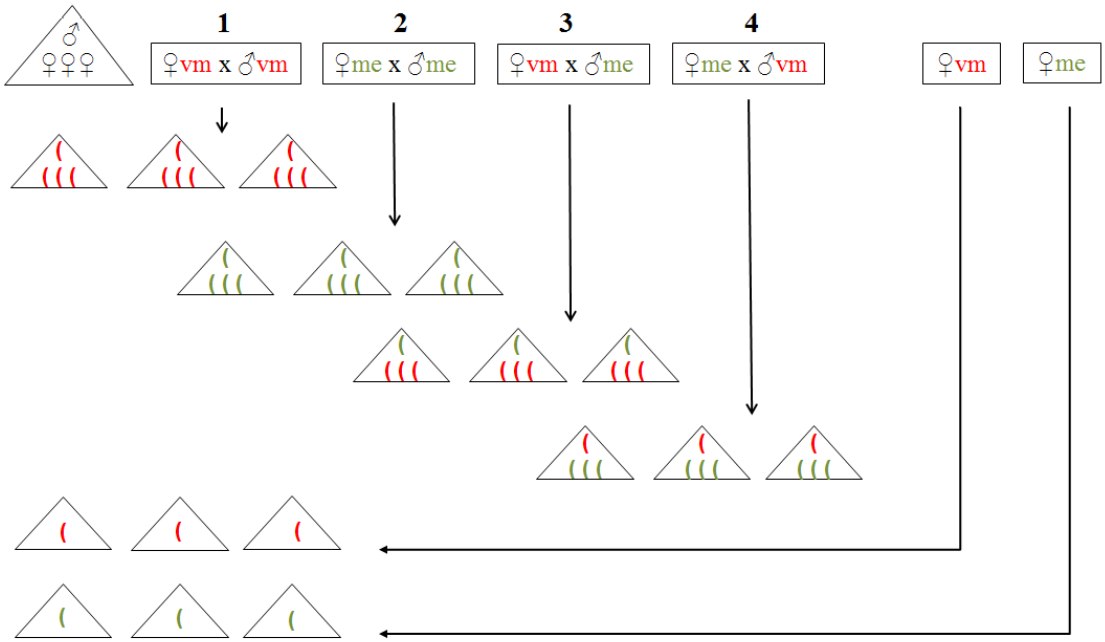


Figura 3. Cruzamentos realizados entre gametófitos femininos (♀) e masculinos (♂) de *G. caudata* de diferentes colorações, vermelha (*vm*) e marrom-esverdeada (*me*). Triângulos representam frascos distintos, sendo que cada frasco continha um ápice de gametófito masculino e três ápices de um mesmo gametófito feminino (n=3). Ápices de gametófitos ♀ das diferentes colorações e provenientes dos mesmos indivíduos utilizados nos cruzamentos foram cultivados na ausência de ápices ♂ durante todo o período experimental.

O acompanhamento da descendência foi realizado por meio do cultivo de 09 plântulas com 30 dias de idade e aproximadamente 4mm de comprimento, resultantes da germinação de carpósporos liberados pelo gametófito ♀ fertilizado de cada cruzamento (♀*vm* x ♂*vm*, ♀*me* x ♂*me*, ♀*vm* x ♂*me*, ♀*me* x ♂*vm*). Essas plântulas foram acondicionadas em um único frasco Erlenmeyer contendo 850ml de meio de cultura, sendo posteriormente mantidas sob as condições gerais de cultivo até a idade de 77 dias, a fim de se observar distinções quanto ao padrão de coloração, tempo de maturação sexual e número de ramificações diferenciadas.

Para a observação de possíveis diferenças de cor entre tetrasporófitos *vmme* e *mevm* foram selecionadas ao acaso quatro plantas tetrasporofíticas de dois centímentros de comprimento representativas de cada genótipo (*vmvm*, *meme*, *vmme* e *mevm*). Posteriormente, essas plantas agrupadas por genótipo foram cultivadas por um período de 21 dias em fracos Erlenmeyer contendo 850 ml meio de cultura, sob uma irradiância de 150 µmol de fótons m^{-2}. s^{-1}, mantendo-se as demais condições de cultivo.

Tetrásporos liberados durante um período de 24 horas, por um único tetrasporófito representativo de cada genótipo (*vmvm*, *meme*, *vmme* e *mevm*) e aclimatado a irradiância de 70 µmol de fótons m^{-2}. s^{-1}, foram coletados e mantidos sob as condições gerais de cultivo. Após um mês, foram selecionadas 25 plântulas de comprimento variado (2-4mm), provenientes da germinação desses tetrásporos. Essas foram então distribuídas em cinco frascos Erlenmeyer contendo 500ml de meio de cultura (cinco plântulas por frasco representando uma repetição) e mantidas sob as condições gerais de cultivo até que estivessem com cerca de 106 dias de idade. A proporção sexual entre os gametófitos resultantes foi avaliada quando todas as plantas, provenientes de um mesmo tetrasporófito, atingiram a maturidade reprodutiva (final do período experimental). A proporção de cor entre os gametófitos foi realizada quando as plantas atingiram 60 dias de idade. As observações sobre o desenvolvimento morfológico e reprodutivo foram realizadas semanalmente, sendo registradas por meio de fotografias.

Ao final do período experimental, gametófitos bissexuais, identificados pela presença de estruturas reprodutivas masculinas e cistocarpos em um mesmo talo, quando presentes, foram individualizados e "nomeados". A fim de verificar a viabilidade dos carpósporos, ramos portando cistocarpos foram selecionados e mantidos sob as condições gerais de cultivo até a liberação de carpósporos. Posteriormente, carpósporos provenientes de um mesmo cistocarpo foram coletados e mantidos em frascos Erlenmeyer contendo 125 ml de meio de cultura, sem aeração e sob as demais condições de cultivo. Após isso, 20 plântulas de aproximadamente um centrímetro de comprimento, provenientes da germinação desses carpósporos, foram selecionadas e cultivadas conjuntamente, em frascos Erlenmeyer contendo 500 ml de meio de cultura, até a diferenciação de estruturas reprodutivas.

7.5 Fluorescência *in vivo* da clorofila *a*

A avaliação da fluorescência *in vivo* da clorofila *a* foi realizada para gametófitos ♀ *vm* e *me* (procedentes de tetrásporos oriundos de tetrasporófitos de campo) e para tetrasporófitos dos diferentes genótipos (*vmvm*, *meme*, *vmme* e *mevm*), sendo cada repetição constituída por quatro ápices de um

mesmo indivíduo com aproximadamente 1cm de comprimento, sendo a biomassa fresca desses quatro ápices juntos de aproximadamente 14mg (n=3). A medições ocorreram após 7 e 14 dias do início do experimento, dentro do período das 11:00h e 16:00h (quatro horas após o início do período de luz). As medições foram realizadas por meio do fluorímetro subaquático Diving-PAM "Pulse Amplitude Modulation" (Walz, Effeltrich, Alemanha).

Utilizando-se a função Light Curve do equipamento, as repetições foram inicialmente submetidas a um pulso de saturação de 0.8 s e 6.100 µmol photons m^{-2} s^{-1}, permitindo assim o cálculo do rendimento quântico ($\Delta F/F$m′) para a irradiância na qual as amostras foram aclimatadas (70 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}). Posteriormente a esse pulso, houve a exposição das amostras a 11 níveis crescentes de irradiância (6, 19, 41, 75, 113, 156, 233, 323, 497, 738 e 1.113 µmol fótons. m^{-2}.s^{-1}), de modo que, a exposição a cada nível tivesse uma duração de 20 s e fosse intercalada por um pulso de saturação. Dessa forma, foi possível construir curvas de taxas de transporte de elétrons relativo (rETR) x irradiância (E_{PAR}), calcular a fluorescência mínima sob luz actinica (F_0') para cada irradiância e obter os valores de fluorescência máxima sob luz actinica (Fm'), após cada pulso de saturação.

Para o cálculo do rendimento quântico, a seguinte fórmula foi usada: $\Delta F/F$m′ = (Fm′- F_0′)/ Fm′ (Genty et al. 1989). Enquanto que para o cálculo do rETR, a seguinte fórmula foi aplicada: rETR=$\Delta F/F$m′*E_{PAR}*A* $\sigma_{PSII}/\sigma_{PSU}$ (Suggett et al. 2011).

- ⇨ F_0'= fluorescência mínima sob luz actinica;
- ⇨ Fm'= fluorescência máxima sob luz actinica;
- ⇨ $\Delta F/F$m′ = rendimento quântico sob luz actinica;
- ⇨ rETR = taxa de transporte de elétrons relativa do PSII para o PSI (sob luz actinica);
- ⇨ $rETR_{max}$ = taxa máxima de transporte de elétrons relativa
- ⇨ E_{PAR} = irradiância PAR incidente, expressa em µmol photons m^{-2} s^{-1};
- ⇨ A = absortância, fração de luz incidente absorvida pelos pigmentos fotossintetizantes;
- ⇨ $\sigma_{PSII}/\sigma_{PSU}$= fração da luz incidente absorvida diretamente pelo PSII, equivalente a 0,15 para Rhodophyta (Grzymski et al. 1997).

A absortância foi calculada a partir da fórmula: A = 1 - (E_λ^0/E_λ) - R, em que E_λ^0/E_λ é a transmitância (T) e R é a refletância. Todavia, a refletância foi desconsiderada neste trabalho por possuir valores próximos a zero e insignificantes em relação aos demais parâmetros, reduzindo A = 1–T, segundo recomendado por Suggett et al. (2011). A obtenção dos valores de transmitância foi realizada após a análise da curva de luz de cada amostra, por meio da disposição de quatro ápices sobre o medidor de quanta Li-COR modelo L1-185, mensurando-se os valores de irradiância antes (Eλ) e após (Eλ0) a disposição dos ápices.

As curvas de rETR x E_{PAR} foram ajustadas de acordo com os modelos de Platt et al. (1980): P=PS*[1-exp (-α*I/PS)]*[exp(-β*I/PS)] e Pmax=PS*[α/(α+β)]*[β/(α+β)]^β/α com o auxílio do programa KaleidaGraph 4.0 (R ≥ 0,95), permitindo assim, a obtenção de diferentes parâmetros da fotossíntese, como por exemplo:

- ⇨ $rETR_{max}$ = máxima taxa de transporte de elétrons relativa;
- ⇨ α = eficiência fotossintetizante;
- ⇨ E_k = irradiância de saturação, calculada $rETR_{max}$ /α;
- ⇨ β = fotoinibição.

7.6 Crescimento

As taxas de crescimento foram obtidas para os mesmos indivíduos citados no item 6.5, após a avaliação da fluorescência da clorofila *a*. Foram realizadas medidas de massa fresca mensuradas em balança analítica. O cálculo das taxas de crescimento foi realizado de acordo com a fórmula proposta por Lignell e Pedersén (1989):

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

(TC = Taxa de crescimento, M*F* = Massa final, Mi = Massa inicial e t = tempo em dias)

7.7 Número de ápices diferenciados

O número de ápices diferenciados (NAD) foi avaliado em três momentos neste trabalho:

1) para 09 tetrasporófitos de 71 dias de idade, representativos de cada genótipo (*vmvm*, *meme*, *vmme* e *mevm*). Esses encontravam-se individualizados por genótipo e mantidos separadamente em frascos Erlenmeyer contendo 850ml de meio de cultura (total de quatro frascos). Assim, o cálculo de NAD se deu pela soma de todos os ápices presentes no mesmo frasco de cultura, dividido pelo número total de indivíduos: NAD = Σ/ Σ_N.

2) para gametófitos ♀ *vm* e *me* (procedentes de tetrasporófitos de campo) e para tetrasporófitos dos diferentes genótipos (*vmvm*, *meme*, *vmme* e *mevm*), em paralelo com o experimento de fotossíntese e crescimento. Os valores de NAD foram obtidos subtraindo o número total de ápices observados no início do experimento (T_0) do número total de ápices observado no final do período

experimental (14 dias, T_{14}) para cada repetição (n=3), sendo posteriormente realizada a média dos valores resultantes.

3) para gametófitos ♀ *vm* e *me* de mesma idade (180 dias), procedentes de tetrasporófitos de *vmvm* e *meme* (obtidos em laboratório), respectivamente. Cada repetição era inicialmente constituída por quatro ápices de 1cm de comprimento, não ramificados e provenientes de um mesmo gametófito ♀, selecionados no estereomicroscópio. Esses foram então cultivados em um frasco Erlenmeyer contendo 950ml de meio de cultura, sob as condições gerais de cultivo e analisados semanalmente quanto ao NAD durante um período de 21 dias.

7.8 Percentual de fertilidade

O percentual de fertilidade (F%) foi avaliado ao término do experimento de crescimento e fotossíntese (14 dias) para os diferentes tetrasporófitos (*vmvm*, *meme*, *vmme* e *mevm*), sendo cada repetição constituída por quatro ápices de um mesmo indivíduo (n=3). O cálculo de fertilidade foi realizado de acordo com a equação proposta por Barufi et al. (2015): F% = (F/T) * 100.

O comprimento total (T) e de porções férteis (F) do talo foram mensurados em milímetros, por meio de microscópio estereoscópico (Leica WILD M3C), partindo da porção basal dos ramos. Considerando cada frasco como uma repetição (n=4), os valores de T e F foram obtidos a partir da soma dos comprimentos dos quatro ápices contidos em cada frasco, totalizando um valor de T, F e fertilidade (F%) por frasco.

7.9 Conteúdo pigmentar

O conteúdo pigmentar foi estimado para tetrasporófitos dos diferentes genótipos (*vmvm*, *meme*, *vmme* e *mevm*) mantidos sob as condições gerais de cultivo por um período 14 dias (n=3). Cada repetição era constituída inicialmente por quatro ápices de 0,5 cm, provenientes de um mesmo indivíduo. Para a extração dos pigmentos foram utilizadas amostras de 50 mg de massa fresca. Essas foram selecionadas e lavadas em água destilada, removendo-se o excesso de água com papel absorvente. Em seguida, foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a – 80°C, até o momento das extrações pigmentares.

A extração das ficobiliproteínas foi realizada a 4ºC segundo Kursar et al. (1983) com modificações (Plastino & Guimarães, 2001). As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido,

até a formação de um pó fino, sendo em seguida acrescentados 2 mL de tampão fosfato 50mM, pH 5,5. A solução obtida foi centrifugada por 20 minutos a 44.000 xg e o sobrenadante contendo ficobiliproteínas (ficoeritrina, FE; ficocianina, FC; e aloficocianina, AFC) foi retirado e mantido no escuro até a leitura em espectrofotômetro. O precipitado foi ressuspenso em 2 mL de acetona 90%, e centrifugado a 12.000 xg e 4°C por 15 minutos. O sobrenadante contendo clorofila *a* (Cl*a*) foi retirado e mantido no escuro até a leitura em espectrofotômetro.

Os pigmentos foram quantificados em espectrofotômetro UV – visível (Hewlett Packard 8452ª), registrando as absorbâncias no intervalo de 400 a 700 nm, com varredura de 1 segundo. O branco foi realizado com tampão fosfato para as ficobiliproteínas e acetona 90% para Cl*a*. A concentração de ficobiliproteínas foi determinada segundo Kursar et al. (1983) a partir das absorbâncias a 495,5, 614 e 651 nm, enquanto que a quantificação de Cl*a* foi realizada conforme Richie (2008) a partir das absorbâncias 630, 647 e 664 nm.

$$\text{Ficoeritrina} = 155{,}8 * A498{,}5 - 40{,}0 * A614 - 10{,}5 * A651$$

$$\text{Ficocianina} = 151{,}1 * A614 - 99{,}1 * A651$$

$$\text{Aloficocianina} = 181{,}3 * A651 - 22{,}3 * A614$$

$$\text{Clorofila } a = 11{,}85 * A664 - 1{,}54 * A647 - 0{,}08 * A630$$

7.10 Número de cistocarpos diferenciados

O número de cistocarpos diferenciados foi avaliado para gametófitos femininos de mesma idade, provenientes da germinação de tetrásporos liberados por tetrasporófitos (*vmvm*, *meme*, *vmme* e *mevm*). Tais gametófitos foram obtidos e cultivados conforme descrito no item 6.4. As avaliações foram realizadas por meio da contagem, sob estereomicroscópio, do número de cistocarpos e/ou manchas cistocárpicas presentes no talo dos gametófitos femininos, quando esses possuíam 76 e 84 dias de idade. O cálculo da média de cistocarpos diferenciados por gametófito feminino foi feito somando-se o número total de cistocarpos presentes em todos os ramos gametofíticos femininos dividido pelo número de gametófitos femininos presentes no frasco.

Paralelamente a essa avaliação, foi anotada a biomassa de todos os gametófitos presentes no mesmo frasco de cultura, a fim de obter uma melhor compreensão a respeito do investimento reprodutivo de cada linhagem, bem como a existência de diferentes estratégias reprodutivas.

7.11 Percentual de fixação

O percentual de fixação (Ƒix%) ao substrato foi avaliado para gametófitos ♀ *vm* e *me* não fertilizados e de mesma idade, procedentes de tetrasporófitos *vmvm* e *meme* (obtidos em laboratório), respectivamente. Quatro ápices de 1cm de comprimento, não ramificados e provenientes de um mesmo gametófito ♀ foram selecionados em estereomicroscópio. Em seguida, esses ápices foram cultivados em um frasco Erlenmeyer de 1L contendo 950ml de meio de cultura e mantidos sob a irradiância de 25 ±5 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, sem aeração e sem troca de meio por um período de 14 dias. Cada repetição era constituída por quatro ápices de um mesmo indivíduo (n=4).

Os valores de (Ƒix%) foram obtidos aplicando-se a seguinte equação para cada repetição Ƒix% = f/T*100, sendo *F* = total de ápices fixos ao frasco de cultura, e T = total de ápices presentes no frasco de cultura. Posteriormente, foi calculada a média desses valores a fim de se obter um único valor de Ƒix% por amostra.

7.12 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de homocedasticidade utilizando-se o modelo de Cochran (nível de significância $\alpha > 0.05$) e ao teste de normalidade utilizando-se o modelo de KolmogorovSmirnov e Lilliefors. Após avaliação e confirmação de homocedasticidade e normalidade das amostras, os resultados obtidos foram submetidos a análises de medidas repetidas (ANOVA) (TCs, fotossíntese e NAD período 21 dias) ou a análises de variância unifatoriais (one-way ANOVA) (NAD em tetrasporófitos de 71 dias de idade, biomassa de 25 gametófitos, número de cistocarpos diferenciados e pigmentos). Quando diferenças significativas foram observadas, o teste a posteriori de Newman-Keuls foi aplicado. Dados em percentual tais como Fertilidade e Fixação foram submetidos a uma transformação arcoseno, por meio da fórmula (ARCOSENO (RAIZ (valor)). Posteriormente, os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância unifatoriail (one-way ANOVA). A proporção sexual e de cor entre gametófitos derivados de terasporófitos, provenientes dos cruzamentos, foi realizada com o teste Qui-quadrado (X^2). As análises estatísticas, de forma geral, foram realizadas utilizando o programa Statistica versão 10, sendo o intervalo de confiança (IC) de 95% (p <0,05).

8. RESULTADOS

8.1 Herança de cor

A partir de tetrasporófitos de coloração vermelha ou marrom-esverdeada de *Gracilaria caudata*, oriundos do ambiente natural, foram obtidos tetrásporos de coloração vermelha, que ao germinarem, originaram plântulas com disco basal e eixo ereto de coloração vermelha. As diferenças de cor foram perceptíveis quando as plântulas atingiram cerca de 2 cm de comprimento de comprimento e tinham aproximadamente 60 dias. A partir da germinação de tetrásporos, liberados por tetrasporófitos de coloração vermelha, foram observados apenas gametófitos de coloração vermelha. Em contrapartida, a partir da germinação de tetrásporos, liberados por tetrasporófitos marrom-esverdeados, foram observados apenas gametófitos de coloração marrom-esverdeada (Figura 4).

Figura 4. *Gracilaria caudata* - aspecto geral de ramos apicais não fertilizados de gametófitos femininos de coloração vermelha (a esquerda) e de coloração marrom-esverdeada (a direita), cultivados por aproximadamente 17 dias, sob irradiância de 70 µmol de fótons m^{-2}. s^{-1}, em frascos Erlenmeyer contendo 950 ml de meio de cultura.

Testes de cruzamentos foram realizados entre ♀*vm* x ♂*vm*, ♀*me* x ♂*me*, ♀*vm* x ♂*me*, ♀*me* x ♂*vm*. Após seis dias de contato entre gametófitos femininos e masculinos foi observada, sob estereomicroscópio, a diferenciação de cistocarpos em todos os ramos femininos, independentemente do tipo de cruzamento e da coloração do talo. Gametófitos femininos *vm* e *me* cultivados na ausência de gametófitos masculinos não formaram cistocarpos, o que evidenciou a ausência de partenogênese

e hermafroditismo. Independentemente do cruzamento de origem, plantas cistocárpicas começaram a liberação de carpósporos após 18 dias do início do experimento.

Carpósporos resultantes dos diferentes cruzamentos apresentaram coloração avermelhada, bem como os discos basais e eixos eretos das plântulas nos estádios iniciais de desenvolvimento (5 mm de comprimento). A partir do cultivo de nove plântulas resultantes de cada cruzamento, verificou-se que, diferenças quanto à coloração começaram a surgir nos indivíduos com cerca de 1cm de comprimento e aproximadamente 45 dias de idade. Quando atingiram cerca de 2 cm de comprimento e aproximadamente 60 dias de idade plantas *vmvm* e *meme* já apresentavam a coloração vermelha ou marrom-esverdeada, enquanto que, plantas *vmme* e *mevm* possuíam uma coloração marrom intensa. Diferenças de cor foram notoriamente visíveis apenas quando essas plantas atingiram cerca de 4-5 cm de comprimento e já apresentavam estruturas reprodutivas (tetrasporângios). Tetrasporófitos derivados dos cruzamentos ♀*vm* x ♂*vm* apresentaram fenótipo vermelho (*vmvm*). Tetrasporófitos derivados dos cruzamentos ♀*me* x ♂*me* apresentaram fenótipo marrom-esverdeado (*meme*). Entretanto, tetrasporófitos originados tanto dos cruzamentos ♀*vm* x ♂*me*, quanto dos cruzamentos ♀*me* x ♂*vm* apresentaram fenótipo marrom (*vmme* e *mevm*, respectivamente), (Figura 5).

Figura 5. *Gracilaria caudata* - aspecto geral de ramos apicais de tetrasporófitos de coloração vermelha (*vmvm*), marrom-esverdeada (*meme*), e marons *vmme* e *mevm*, respectivamente, cultivados por aproximadamente 15 dias, sob irradiância de 70 µmol de fótons m^{-2}. s^{-1}, em frascos Erlenmeyer contendo 850 ml de meio de cultura.

Diferenças quanto ao tempo necessário para a diferenciação de tetrasporângios em plantas derivadas dos cruzamentos foram observadas. Tetrasporófitos *mevm* com 65 dias de idade e cerca de 2,1 cm de comprimento foram os primeiros a diferenciar tais estruturas, seguidos por tetrasporófitos *vmme* e *meme* com 71 dias de idade e cerca de 2,9 cm de comprimento. Tetrasporófitos *vmvm* foram os últimos a diferenciar tetrasporângios, com cerca de 77 dias de idade e cerca de 3,1 mm de

comprimento.

Plântulas tetrasporofíticas *vmvm* desde muito pequenas (1,5 cm de comprimento) aparentavam ser mais ramificadas do que as plântulas dos demais genótipos. Sendo assim, optou-se por quantificar essas ramificações nas plântulas procedentes dos diferentes cruzamentos. A partir dessas medições foi possível verificar que tetrasporófitos *vmvm* apresentavam maior número de ramificações diferenciadas em relação aos demais tetrasporófitos (F=45.11, p <0.00), os quais possuíam número de ramificações semelhantes entre si (F = 45.11, p > 0.57) (Figura 6 e Tabela 1).

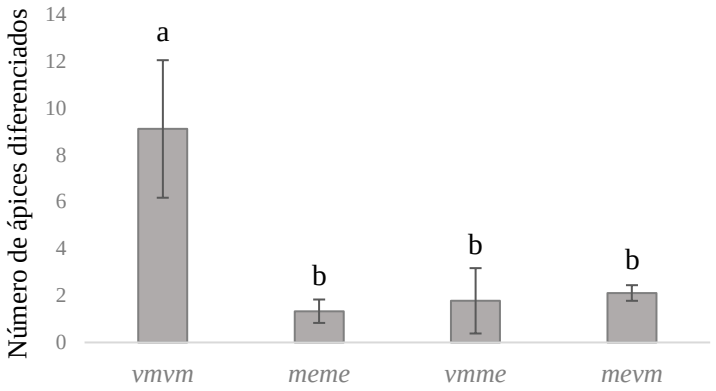


Figura 6. *Gracilaria caudata* - número de ápices presentes em tetrasporófitos com 71 dias de idade derivados dos diferentes cruzamentos (♀*vm* x ♂*vm*, ♀*me* x ♂*me*, ♀*vm* x ♂*me*, ♀*me* x ♂*vm*). Tetrasporófitos vermelhos (*vmvm*), marrom-esverdeado (*meme*) e marrons (*vmme* e *mevm*). Dados são apresentados como média e desvio padrão. Letras distintas representam diferenças significativas de acordo com a análise ANOVA Uni-fatorial e teste de Newman-Keuls (p < 0,05).

Tabela 1. *Gracilaria caudata* - número total e média de ápices diferenciados em tetrasporófitos vermelhos (*vmvm*), marrom-esverdeados (*meme*) e marrons (*vmme* e *mevm*) com 71 dias de idade. O número total foi calculado partir da soma de todos os ápices presentes no mesmo frasco de cultura. Letras distintas representam diferenças significativas de acordo com a análise ANOVA Uni-fatorial e teste de Newman-Keuls (p < 0,05).

Tetrasporófito	Total (T)	Média ± desvio padrão
vmvm	82	9,11 ± 2,93 a
meme	12	1,33 ± 0,50 b
vmme	16	1,77 ± 1,39 b
mevm	19	2,11 ± 0,33 b

A fim de verificar possíveis diferenças de cor entre tetrasporófitos *vmme* e *mevm*, que apresentaram coloração marrom, foram selecionados ápices tetrasporofíticos representativos de cada genótipo (*vmvm*, *meme*, *vmme* e *mevm*) e cultivados em irradiância superior à que vinham sendo cultivados (150 µmol de fótons m^{-2}. s^{-1}). Como resultado, foi possível verificar uma modificação na coloração do talo de tetrasporófitos *vmme* e *mevm*, após 21 dias de cultivo. Tetrasporófitos *vmme* apresentaram uma coloração marrom-avermelhada, enquanto que tetrasporófitos *mevm* apresentaram uma coloração marrom-esverdeada. Essas distintas colorações seguiram a coloração do gametófito feminino utilizado em cada cruzamento. Tetrasporófitos *vmvm* e *meme* apresentaram apenas diferenças quanto a tonalidade da cor, em relação ao cultivo em 70 µmol de fótons m^{-2}. s^{-1}, tetrasporófitos *vmvm* adquiriram uma coloração vermelha mais clara, e tetrasporófitos *meme* adquiriram um esverdeado mais intenso

Tetrásporos provenientes dos diferentes tetrasporófitos (*vmvm*, *meme*, *vmme* e *mevm*) foram cultivados nas condições gerais de cultivo. Assim como os carpósporos resultantes dos diferentes cruzamentos, esses tetrásporos possuíam coloração avermelhada, bem como os discos basais e eixos eretos das plântulas nos estádios iniciais de desenvolvimento (5 mm de comprimento). A observação do desenvolvimento dessas plântulas permitiu verificar que os gametófitos resultantes possuíam características de coloração, sexualidade e morfologia particulares, dependendo do tetrasporófito de origem.

Plântulas obtidas de tetrasporófito *vmvm* deram origem a gametófitos ♀ e ♂ de coloração vermelha em uma proporção de 1:1 (14♀:11♂), (Figura 8 e Tabela 2). A formação de cistocarpos foi observada quando os gametófitos ♀ apresentavam 62 dias. Nessa ocasião, gametófitos masculinos já haviam sido observados nos frascos. Tais cistocarpos foram inicialmente visualizados como manchas superficiais, que posteriormente adquiriram formato saliente ao talo e liberaram carpósporos. Gametófitos bissexuais (*bi*) não foram observados. Com 76 dias de idade foram contabilizados 156 cistocarpos, resultando uma média de 12 cistocarpos por gametófito feminino. Na semana seguinte, quando esses gametófitos possuíam 84 dias de idade, foi contabilizado um total de 617 cistocarpos, perfazendo uma média de 44 cistocarpos por gametófito feminino. A soma da biomassa das 25 plantas (14 plantas cistocárpicas e 11 gametófitos masculinos) foi de 3,9 gramas (g) e 6,6 g na primeira (76 dias) e segunda medição (86 dias), respectivamente.

Plântulas obtidas de tetrasporófitos *meme* deram origem a gametófitos ♀, identificados pela presença de cistocarpos, e gametófitos bissexuais, ambos de coloração marrom-esverdeada em uma proporção de 18♀:7♂*bi*, (Figura 8 e Tabela 2). A formação de cistocarpos em gametófitos ♀ foi observada quando esses atingiram 56 dias de idade. Os cistocarpos apresentavam massa de esporos avermelhada, e as e porções do talo adjacentes aos cistocarpos se apresentavam também

avermelhadas (Figura 7). Com 56 dias já era possível a identificação de sete gametófitos masculinos, os quais possuíam o talo repleto de espermatângios. Todavia, quando esses atingiram 79 dias de idade, observou-se o desenvolvimento de cistocarpos ao longo do talo masculino. Ao atingirem 99 dias de idade, todos os gametófitos masculinos haviam desenvolvido ao menos um cistocarpo. Dessa forma, tais gametófitos foram denominados como bissexuais (♂*bi*) por apresentarem características femininas além de masculinas. Foram contabilizados 240 cistocarpos diferenciados em 18 gametófitos femininos de 76 dias de idade, dando uma média de 13,3 cistocarpos por gametófito. Na semana seguinte, quando esses gametófitos possuíam 84 dias de idade, foi contabilizado um total de 334 cistocarpos diferenciados, perfazendo uma média de 19,6 cistocarpos por gametófito feminino. A soma da biomassa obtida para as 25 plantas (18 plantas cistocárpicas e 7 bissexuais) foi de 1,4 g aos 76 dias de idade, enquanto que, aos 84 dias essa somatória aumentou para 2,2 g. Ao final do período experimental, quando as plantas apresentavam 106 dias de idade, os gametófitos ♂ *bi* possuíam em média 2 cistocarpos por indivíduo, distribuídos ao longo do talo e em diferentes níveis de maturação, considerando-se os sete indivíduos. Tais cistocarpos inicialmente possuíam formato côncavo, e posteriormente, adquiriram um formato saliente ao talo e liberaram carpósporos avermelhados. Essa liberação foi observada apenas por cistocarpos que possuíam formato saliente e após 27 dias do início da formação do cistocarpo. A fim de verificar a viabilidade desses carpósporos, um único ramo cistocárpico foi selecionado e chamado de ♂*bi* 01. A partir desse cistocarpo, foram coletados carpósporos. Esses carpósporos originaram plântulas de coloração avermelhada (discos basais e eixos eretos com 5 mm de comprimento). Após 23 dias do início do cultivo de 20 plântulas de 1 cm de comprimento, sob as condições gerais de cultivo, foi possível observar que estruturas reprodutivas começavam a se desenvolver, dando origem a um talo repleto de tetrasporângios. Nesse momento, as plantas já possuíam coloração marrom-esverdeada (Tabela 3).

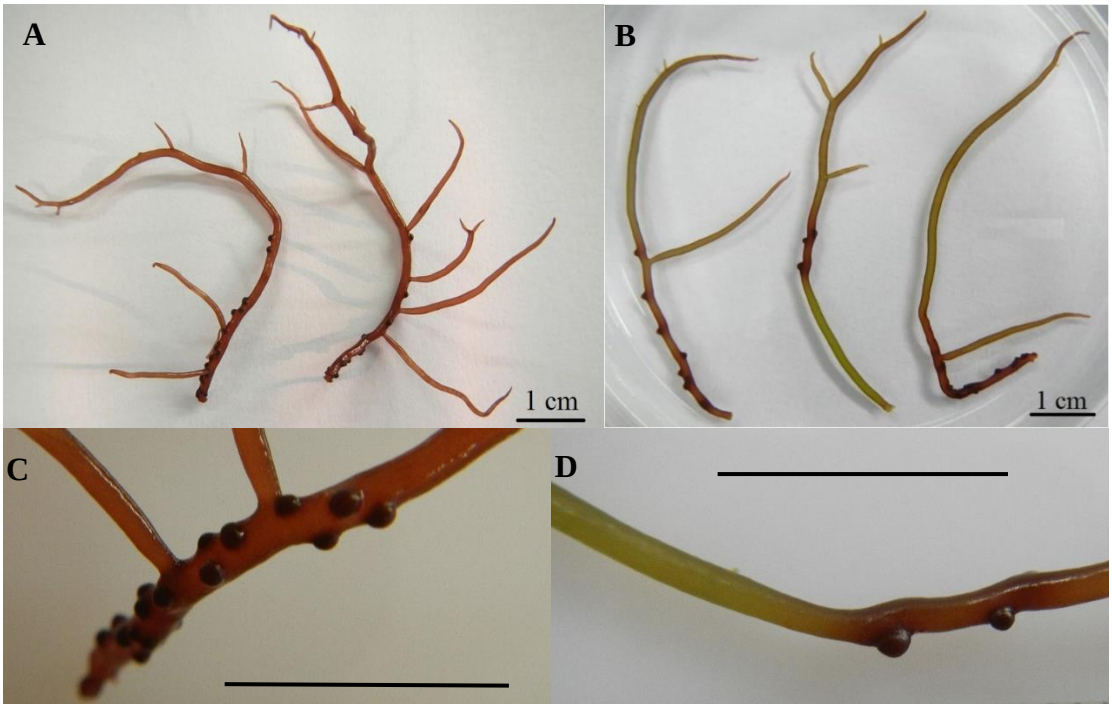


Figura 7. *Gracilaria caudata* – aspecto geral de ápices de plantas cistocárpicas de coloração vermelha (*vm*) **(A)**, e de coloração marrom-esverdeada (*me*) **(B)**. Notar a coloração vermelha em plantas cistocárpicas *me* nas porções do talo onde ocorrem cistocarpos **(D)**, escala de 1cm. Detalhe de cistocarpos em plantas cistocárpicas *vm* **(C)**, escala de 1cm.

Tendo em vista que a partir da descendência de um tetrasporófito *meme* foram obtidos apenas gametófitos ♀ e ♂*bi*, foram selecionados três ápices (2cm de comprimento) dos mesmos gametófitos masculinos, utilizados nos cruzamentos teste (provenientes de tetrasporófito marrom-esverdeado de campo). Esses foram cultivados em conjunto em frascos Erlenmeyer contendo 850ml de meio de cultura, sob as condições gerais de cultivo. Como resultado, foi observado que ao final do período experimental as três plantas masculinas haviam diferenciado ao menos um cistocarpo ao longo do talo, evidenciando que estes também se tratavam de gametófitos ♂*bi*.

Plântulas obtidas de tetrasporófitos de coloração marrom (*vmme* e *mevm*) desenvolveram-se em gametófitos ♀, gametófitos ♂ e gametófitos ♂ *bi*, de coloração vermelha ou marrom-esverdeada. Independentemente do tetrasporófito de origem, plantas cistocárpicas foram observadas com cerca de 49 dias de idade. Após o reconhecimento de plantas cistocárpicas (11♀ e 9♀ a partir de tetrasporófitos *vmme* e *mevm*, respectivamente), foi possível verificar que as demais plantas possuíam o talo repleto de espermatângios. Nesse momento, a proporção sexual entre gametófitos ♀ e ♂ foi de 1:1.Aos 76 dias de idade, gametófitos femininos provenientes de tetrasporófito *vmme* haviam diferenciado um total de 166 cistocarpos, resultando numa média de 15,0 cistocarpos por gametófito.

Na semana seguinte, quando esses gametófitos apresentavam 84 dias de idade, foram observados 230 cistocarpos, perfazendo uma média de 20,9 cistocarpos por gametófito feminino. Para gametófitos femininos provenientes de tetrasporófito *mevm* foram observados na primeira medição 154 cistocarpos, dando uma média de 17,1 cistocarpos por gametófito feminino. Na segunda medição, foram observados um total de 218 cistocarpos, perfazendo uma média de 24,2 cistocarpos por gametófito feminino. A biomassa total obtida para as 25 plantas derivadas de tetrasporófitos *vmme* (11 gametófitos femininos, 8 gametófitos masculinos e 6 gametófitos bissexuais) e *mevm* (9 gametófitos femininos, 11 gametófitos masculinos e 5 gametófitos bissexuais) na primeira medição foi de 1,5 g e 1,3 g, respectivamente. Na segunda medição, ou seja, quando essas plantas possuíam 84 dias de idade os valeres aumentaram para 3,1g e 3,7 g, respectivamente.

Não foram observadas diferenças quanto ao número de cistocarpos diferenciados entre os gametófitos femininos provenientes dos diferentes tetrasporófitos (*vmvm*, *meme*, *vmme* e *mevm*) na primeira semana de análisada ($F = 0.45$, $p > 0.47$). No entanto, para a semana seguinte, quando esses gametófitos apresentavam 84 dias de idade, diferenças foram observadas, evidenciando um maior número de cistocarpos diferenciados por parte dos gametófitos femininos provenientes de tetrasporófitos *vmvm* ($F = 4.8$, $p < 0.01$), enquanto que, gametófitos ♀ provenientes dos demais tetrasporófitos apresentavam número de cistocarpos semelhantes entre si ($p > 0.67$).

A partir de medidas de massa fresca das 25 plantas (♀ e ♂), provenientes dos diferentes tetrasporófitos (*vmvm*, *meme*, *vmme* e *mevm*), foi observado que, independentemente da semana em que a medição foi realizada, uma maior biomassa era encontrada para gametófitos provenientes de tetrasporófitos *vmvm* ($F = 12.83$, $p < 0.00$ e $F = 9.98$, $p < 0.00$), enquanto que, gametófitos procedentes dos demais tetraporófitos não apresentaram diferenças entre si ($p > 0.69$ e $p > 0.44$).

Assim como na descendência de tetrasporófitos *meme*, gametófitos ♂*bi* foram observados na descendência de tetrasporófitos *vmme* e *mevm*. Plantas masculinas com 71 dias de idade provenientes de tetrasporófito *vmme*, bem como plantas masculinas com 65 dias de idade, provenientes de tetrasporófito *mevm*, inicaram o desenvolvimento de cistocarpos ao longo do talo. Com 106 dias de idade, gametófitos ♂*bi* derivados de ambos tetrasporófitos (*vmme* e *mevm*) haviam diferenciado em média 2,8 e 2,6 cistocarpos por indivíduo, respectivamente. Ao final do período experimental (106 dias), foi possível também verificar que nem todos os gametófitos masculinos haviam diferenciado cistocarpos ao longo do talo. Sendo assim, esses gametófitos foram considerados como masculinos. Dessa forma, a proporção sexual, obtida para gametófitos provenientes de tetrasporófitos *vmme* foi de 11♀: 08♂: 06♂*bi*, enquanto que, a proporção sexual obtida para gametófitos provenientes de tetrasporófitos *mevm* foi de 09♀: 11♂: 05♂*bi* (Figura 8 e Tabela 2). A proporção de cor (vermelho ou marrom-esverdeado) entre os gametófitos foi de 1:1, tanto para gametófitos obtidos de

tetrasporófitos *vmme* (12*vm*:13*me*), quanto para gametófitos obtidos de tetrasporófitos *mevm* (15*vm*:10*me*), (Tabela 2).

Gametófitos ♂*bi* provenientes de tetrasporófitos *vmme* e *mevm* iniciaram a liberação de carpósporos após 21 e 19 dias do início da formação dos cistocarpos, respectivamente. A fim de verificar a viabilidade desses carpósporos, foram selecionados seis ramos cistocárpicos provenientes de ♂*bi* distintos, sendo três desses derivados da germinação de tetrásporos liberados por tetrasporófitos *vmme*, os quais foram denominados de ♂*bi* 02, ♂*bi* 03 e ♂*bi* 04, e três derivados da germinação de tetrásporos liberados por tetrasporófitos *mevm*, os quais por sua vez, foram denominados de ♂*bi* 05, ♂*bi* 06 e ♂*bi* 07. Para cada ramo foi analisada a descendência de um único cistocarpo, e os carpósporos, assim como os discos basais e eixos eretos de plântulas nos estádios iniciais de desenvolvimento (5 mm de comprimento) possuíam coloração avermelhada. Além disso, foi observado que as plântulas derivadas da germinação dos carpósporos liberados por um mesmo cistocarpo deram origem a plantas com i, espermatangios, ii, tetrasporângios, ou iii, tetrasporângios e espermatângios a partir de 15 dias do início do cultivo das plantas em frascos Erlenmeyer de 500 ml, sob aeração. Todavia, essas estruturas variaram em função do gametófito ♂*bi* progenitor, de forma que: plântulas obtidas de ♂*bi* 02, ♂*bi* 03, ♂*bi* 04 e ♂*bi* 07 deram origem a gametófitos ♂. No entanto, após 22 dias do início do cultivo, um indivíduo ♂ proveniente do gametófito ♂*bi* 07, diferenciou cistocarpos ao longo do talo; plântulas obtidas de ♂*bi* 05 e ♂*bi* 06 desenvolveram-se em tetrasporófitos. No entanto, após 22 dias de cultivo foi observada a presença de espermatângios e um cistocarpo em alguns talos tetrasporofíticos provenientes do gametófito ♂*bi* 06 (Tabela 3).

Diante do exposto, cabe ressaltar que a partir dos cruzamentos testes entre plantas ♀*vm* x ♂*vm*, ♀*me* x ♂*me*, ♀*vm* x ♂*me* e ♀*me* x ♂*vm* foi necessário um período de 157, 145, 138 e 132 dias, respectivamente, para que o histórico de vida foi completado *in vitro*.

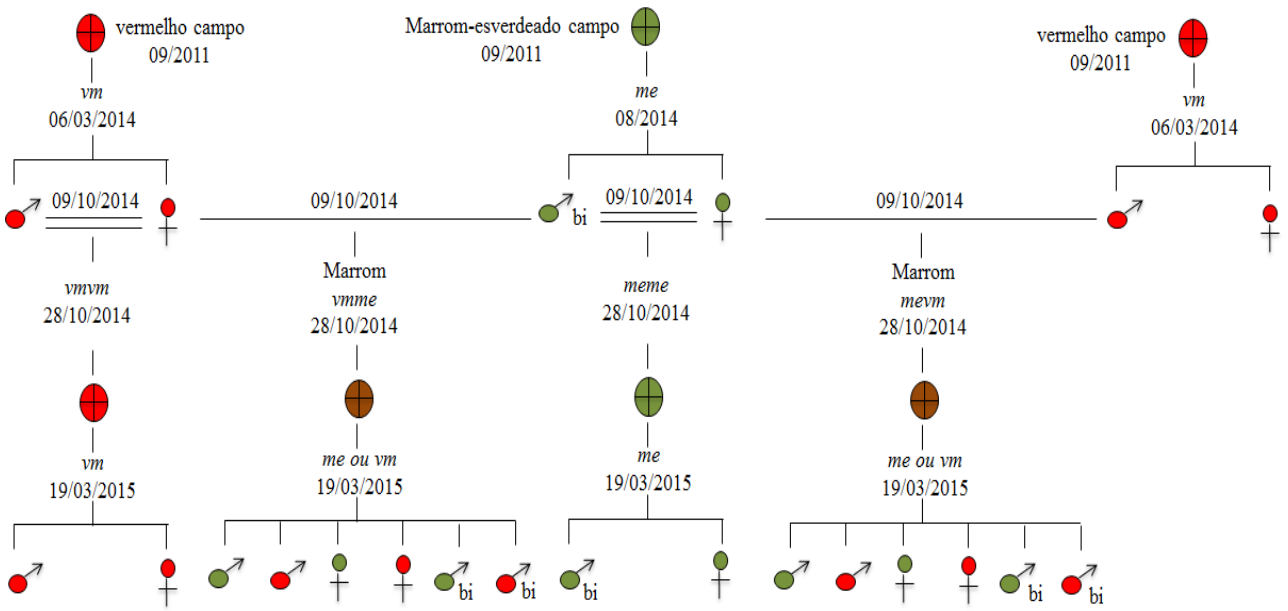


Figura 8. *Gracilaria caudata* - genealogia de linhagens gametofíticas e tetrasporofíticas. Abreviações: ⊕, tetrasporófito; ♀, gametófito feminino; ♂, gametófito masculino; ♂*bi*, gametófito bissexual; *vm*, vermelho; *me*, marrom-esverdeado; *vmvm*, vermelho; *meme*, marrom-esverdeado; *mevm* e *vmme*, marrom; —, cruzamento; =, cruzamento "consanguíneo".

Tabela 2. *Gracilaria caudata* - proporção sexual e de cor de gametófitos derivados de tetrasporófitos resultantes de testes de cruzamentos entre gametófitos vermelhos (*vm*) e marrom-esverdeados (*me*).

Cruzamentos	Tetrasporófitos	Gametófitos férteis	Gametófitos
♀ x ♂	Cor do talo	Sexo (♀: ♂: *bi*)	Cor do talo
vm x *vm*	Vermelho	14:11:0	25 vermelhos
me x *me*	Marrom-esverdeado	18: 0: 7	25 marrom-esverdeados
vm x *me*	Marrom	11: 8: 6	12 vermelhos, 13 marrom-esverdeados
me x *vm*	Marrom	9: 11: 5	15 vermelhos, 10 marrom-esverdeados

Tabela 3. *Gracilaria caudata* - descendência de gametófitos bissexuais (♂*bi*), os quais foram provenientes de tetrasporófitos marrom-esverdeados (*meme*) e marrons (*vmme* e *mevm*).

Tetrasporófito	Bissexual progenitor	Descendência	Comentários
meme	♂*bi* 01	Tetrasporófitos	Tetrasporângios
vmme	♂*bi* 02	Gametófitos masculinos	Espermatângios
vmme	♂*bi* 03	Gametófitos masculinos	Espermatângios
vmme	♂*bi* 04	Gametófitos masculinos	Espermatângios
mevm	♂*bi* 05	Tetrasporófitos	Tetrasporângios
mevm	♂*bi* 06	Tetrasporófitos	Tetrasporângios, espermatângios e um cistocarpo
mevm	♂*bi* 07	Gametófitos masculinos	Espermatângios e um cistocarpo

8.2 Taxas de crescimento

O crescimento de *G. caudata* variou em função do genótipo e do tempo ($F = 4.91$, $p < 0.01$). Gametófitos femininos de coloração vermelha apresentaram maiores TCs em relação às demais linhagens analisadas (♀*me*, *vmvm*, *meme*, *vmme* e *mevm*). Esses resultados foram observados na primeira ($p < 0.00$) e segunda semanas de cultivo ($p < 0.01$), bem como quando se considerou o tempo total de 15 dias de cultivo ($F = 12.88$, $p < 0.00$). Gametófitos ♀*me* e os diferentes tetrasporófitos apresentaram TCs semelhantes entre si na primeira semana de cultivo ($p > 0.20$). Na semana seguinte, ♀*me* e tetrasporófitos *vmvm*, *vmme* e *mevm* apresentaram TCs semelhantes entre si ($p > 0.61$) e superiores às obtidas por tetrasporófitos *meme* ($p < 0.03$). Quando a análise foi realizada considerando-se todo o período experimental (14 dias), observamos que todas as linhagens, com exceção de ♀*vm*, apresentam valores semelhantes si ($p > 0.18$). (Figura 9). Comparando-se as duas semanas de cultivo, foram observadas reduções nas TCs de todas as linhagens avaliadas ($p < 0.00$), com exceção de ♀*me*, cuja taxa manteve-se estável ($p = 0.18$). (Figura 9).

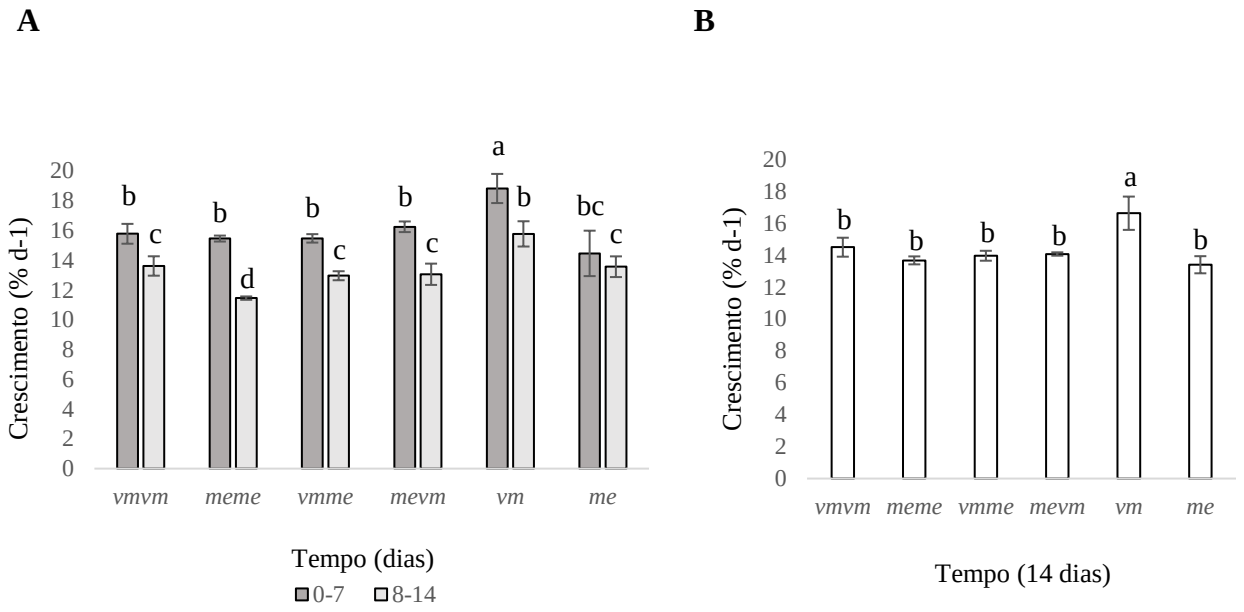


Figura 9. *Gracilaria caudata* - taxas de crescimento para linhagens tetrasporofíticas de coloração vermelha (*vmvm*), marrom-esverdeada (*meme*) e marrom (*vmme* e *mevm*), e linhagens gametofíticas femininas de coloração vermelha (*vm*) e marrom-esverdeada (*me*). (**A**) Taxas de crescimento semanais (duas semanas) (**B**) Taxas de crescimento após 14 dias de cultivo. Os dados são apresentados como média e desvio padrão (n=3). Letras distintas representam diferenças significativas de acordo com a análise de medidas repetidas (ANOVA) para a figura **A**, e ANOVA Uni-fatorial para a figura **B**, sendo ambos resultados submetidos ao teste a posteriori de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

8.3 Fertilidade

A diferenciação de tetrasporângios foi observada em todos os talos de de *Gracilaria caudata* utilizados no experimento, que teve duração de 14 dias. O maior percentual de fertilidade foi verificado em tetrasporófitos *vmme* ($F = 31.43$, $p < 0.00$), seguidos dos tetrasporófitos *meme* e *mevm*, os quais apresentaram valores semelhantes entre si ($p > 0.50$). Tetrasporófitos *vmvm*, por sua vez, apresentaram o menor percentual de fertilidade ($p < 0.00$) (Figura 10).

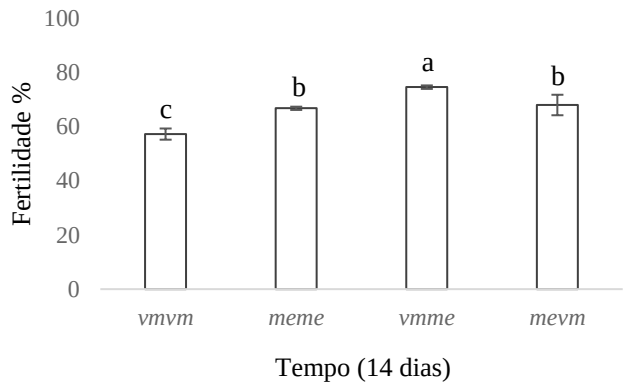


Figura 10. *Gracilaria caudata* - percentual de fertilidade (%) após 14 dias de cultivo, em linhagens tetrasporofíticas de coloração vermelha (*vmvm*), marrom-esverdeada (*meme*) e marrom (*vmme* e *mevm*), considerando-se a área fértil (presença de tetrasporângios) em relação ao comprimento total do talo. Os dados são apresentados como média e desvio padrão (n=3). Letras distintas representam diferenças significativas de acordo com ANOVA Uni-fatorial e teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$) realizados posteriormente a transformação de arcoseno.

8.4 Fotossíntese

Houve interação entre os fatores genótipo e tempo para $rETR_{max}$ ($F = 12.26$, $p < 0.00$). Na primeira semana de cultivo, tetrasporófitos *vmme* e *mevm* apresentaram valores semelhantes de $rETR_{max}$ ($p = 0.07$). Tetrasporófitos *vmme* apresentaram valores superiores a tetrasporófitos *vmvm*, *meme* e gametófitos *vm* e *me* ($p < 0.00$), os quais apresentaram valores semelhantes entre si ($p > 0.24$), enquanto que, tetrasporófitos *mevm* apresentaram valores superiores a gametófitos *vm* ($p < 0.00$) e semelhantes a tetrasporófitos *vmvm*, *meme*, e gametófitos *me* ($p > 0.06$). Na segunda semana de cultivo, ♀*me* apresentaram maiores valores de $rETR_{max}$ em relação às demais linhagens analisadas ($p < 0.04$), as quais apresentaram valores semelhantes entre si ($p > 0.16$). Diferenças entre as semanas foram observadas apenas para ♀*vm* e ♀*me*, os quais tiveram um incremento nos valores de $rETR_{max}$ na segunda semana ($p = 0.03$; $p = 0.00$), e para tetrasporófitos *vmme*, que de forma contrária, apresentaram uma redução nos valores de $rETR_{max}$ na segunda semana ($p = 0.03$), (Figura 11 e Tabela 4).

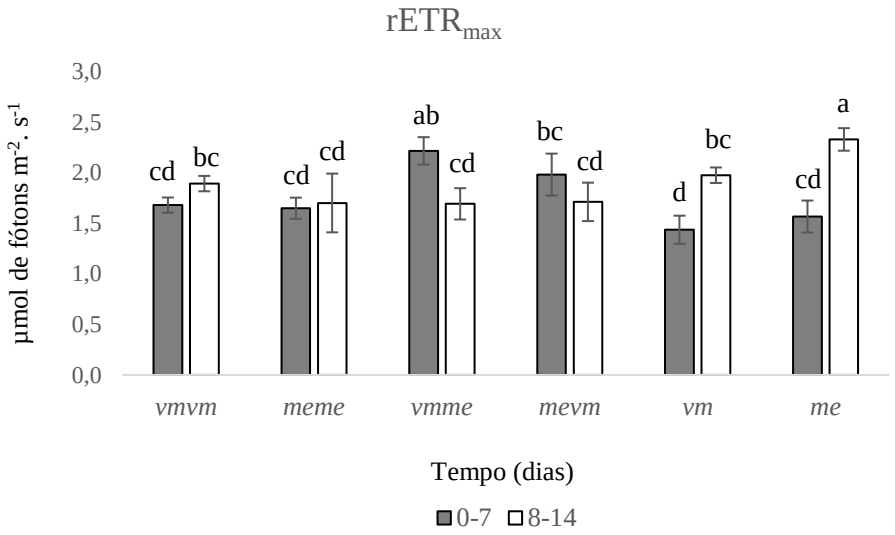


Figura 11. *Gracilaria caudata* - taxas máximas de transporte de elétrons ($rETR_{max}$) obtidas semanalmente durante um período de 14 dias a partir das curvas (rETR) x (E_{PAR}). Tetrasporófitos de coloração vermelha (*vmvm*), marrom-esverdeada (*meme*) e marrom (*vmme* e *mevm*) e gametófitos femininos de coloração vermelha (*vm*) e marrom-esverdeada (*me*). Os dados são apresentados como média e desvio padrão (n=3). Letras distintas representam diferenças significativas de acordo com a análise de medidas repetidas (ANOVA) e teste a posteriori de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Interação entre o genótipo e o tempo foi observada frente à eficiência fotossintetizante (α) ($F = 17.98$, $p < 0.00$). Para a primeira semana, não foram observadas diferenças entre as linhagens ($p > 0.22$), no entanto, na semana seguinte, ♀*me* apresentaram os maiores valores de α, quando comparados aos demais ($p < 0.00$). Tetrasporófitos *vmvm* e *vmme* apresentaram valores semelhantes entre si ($p = 0.79$), e superiores aos obtidos por tetrasporófitos *meme*, *mevm* e gametófitos *vm* ($p < 0.00$), os quais também apresentaram valores semelhantes entre si ($p > 0.79$). Diferenças entre as semanas foram observadas apenas para tetrasporófitos *vmvm* e ♀*me*, ambos apresentando um incremento nos valores de α para a segunda semana de cultivo ($p < 0.00$), (Figura 12 e Tabela 4).

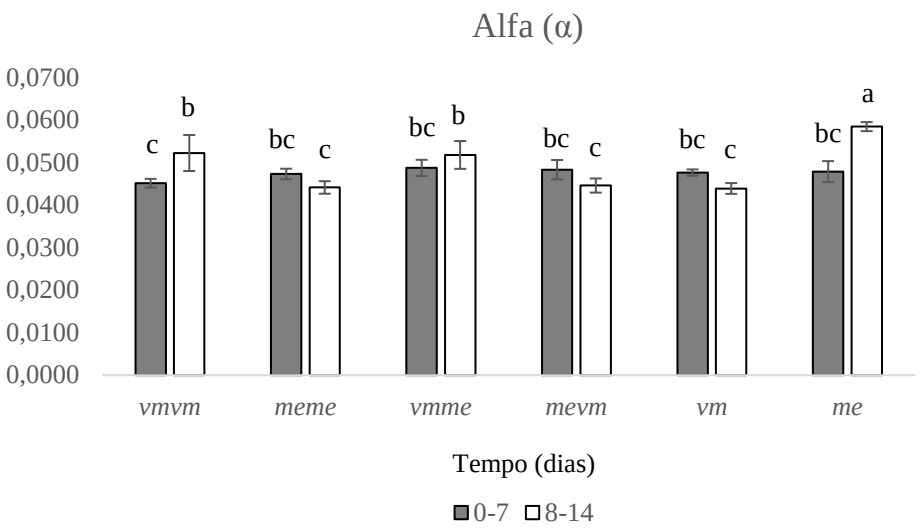


Figura 12. *Gracilaria caudata* – valores de eficiência fotossintetizante (α**)** obtidos semanalmente durante um período de 14 dias a partir das curvas (rETR) x (E_{PAR}). Tetrasporófitos de coloração vermelha (*vmvm*), marrom-esverdeada (*meme*) e marrom (*vmme* e *mevm*) e gametófitos femininos de coloração vermelha (*vm*) e marrom-esverdeada (*me*). Os dados são apresentados como média e desvio padrão (n=3). Letras distintas representam diferenças significativas de acordo com a análise de medidas repetidas (ANOVA) e teste a posteriori de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Quanto à saturação luminosa (E_K), foi observada interação entre o genótipo e o tempo (F = 7.84, $p < 0.00$). Para a primeira semana de cultivo, foi observado que tetrasporófitos *vmme* e *mevm* ($p = 0.26$) apresentaram os maiores valores de E_K, em relação aos gametófitos ♀*vm* e ♀*me* ($p < 0.02$). Tetrasporófitos *vmvm* apresentaram valores semelhantes a ambos os grupos ($p > 0.09$) e a tetrasporófitos *meme* ($p = 0.80$), os quais por sua vez, apresentaram valores semelhantes a tetrasporófitos *vmme* e gametófitos *vm* e *me* ($p > 0.30$). Na segunda semana de cultivo, tetrasporófitos *vmme* apresentaram valores de EK inferiores aos tetrasporófitos *vmvm* e gametófitos *vm* ($p < 0.00$), enquanto que, tetrasporófitos *meme*, *mevm* e gametófitos *me* apresentaram valores intermediarios entre os dois grupos anteriores ($p > 0.05$). Diferenças entre as semanas foram observadas apenas para ♀*vm*, os quais apresentaram um incremento nos valores de E_K na segunda semana de cultivo ($p < 0.02$), e para *vmme*, que apresentaram um decrescimo nesses valores (Figura 13 e Tabela 4).

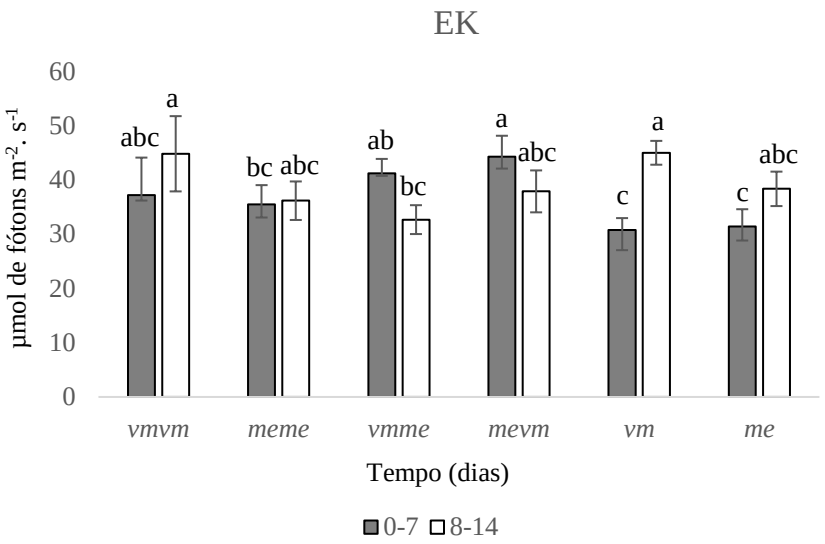


Figura 13. *Gracilaria caudata* - índices de saturação luminosa (E_k) obtidos semanalmente durante um período de 14 dias, a partir das curvas (rETR) x (E_{PAR}). Tetrasporófitos de coloração vermelha (*vmvm*), marrom-esverdeada (*meme*) e marrom (*vmme* e *mevm*) e gametófitos femininos de coloração vermelha (*vm*) e marrom-esverdeada (*me*). Os dados são apresentados como média e desvio padrão (n=3). Letras distintas representam diferenças significativas de acordo com a análise de medidas repetidas (ANOVA) e teste a posteriori de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Com relação ao rendimento quântico efetivo (ΔF/Fm'), foi observada a interação entre os fatores genótipo e tempo ($F = 10.8$, $p < 0.00$). Para a primeira semana de cultivo, tetrasporófitos *vmme* apresentaram os maiores valores de ΔF/Fm' ($p < 0.00$), seguidos por tetrasporófitos *meme*, *mevm* e gametófitos ♀*vm* e *me*, os quais apresentaram valores semelhantes entre si ($p > 0.59$) e superiores aos observados para tetrasporófitos *vmvm* ($p < 0.00$). Na segunda semana, ♀*me* apresentaram os maiores valores de ΔF/Fm' ($p < 0.01$). Tetrasporófitos *vmvm*, *meme*, *mevm* e gametófitos *vm* apresentaram valores semelhantes entre si ($p > 0.05$), enquanto que, tetrasporófitos *vmme* apresentaram valores semelhantes a tetrasporófitos *meme* e gametófitos *vm* ($p > 0.06$) e superiores a tetrasporófitos *vmvm* e *mevm* ($p < 0.00$). Diferenças entre as semanas foram observadas apenas para tetrasporófitos *vmvm* e ♀*me*, ambos apresentando um incremento nos valores de ΔF/Fm' para a segunda semana de cultivo ($p < 0.00$), (Figura 14 e Tabela 4).

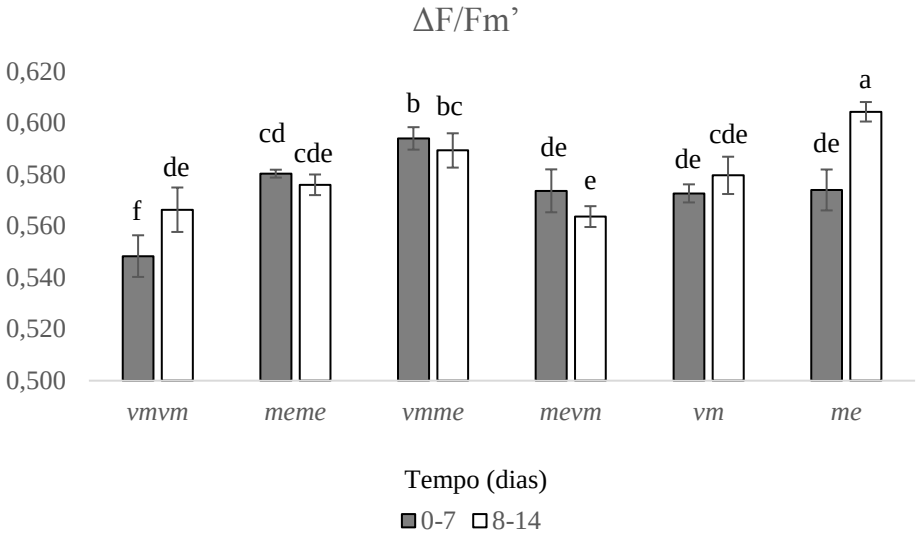
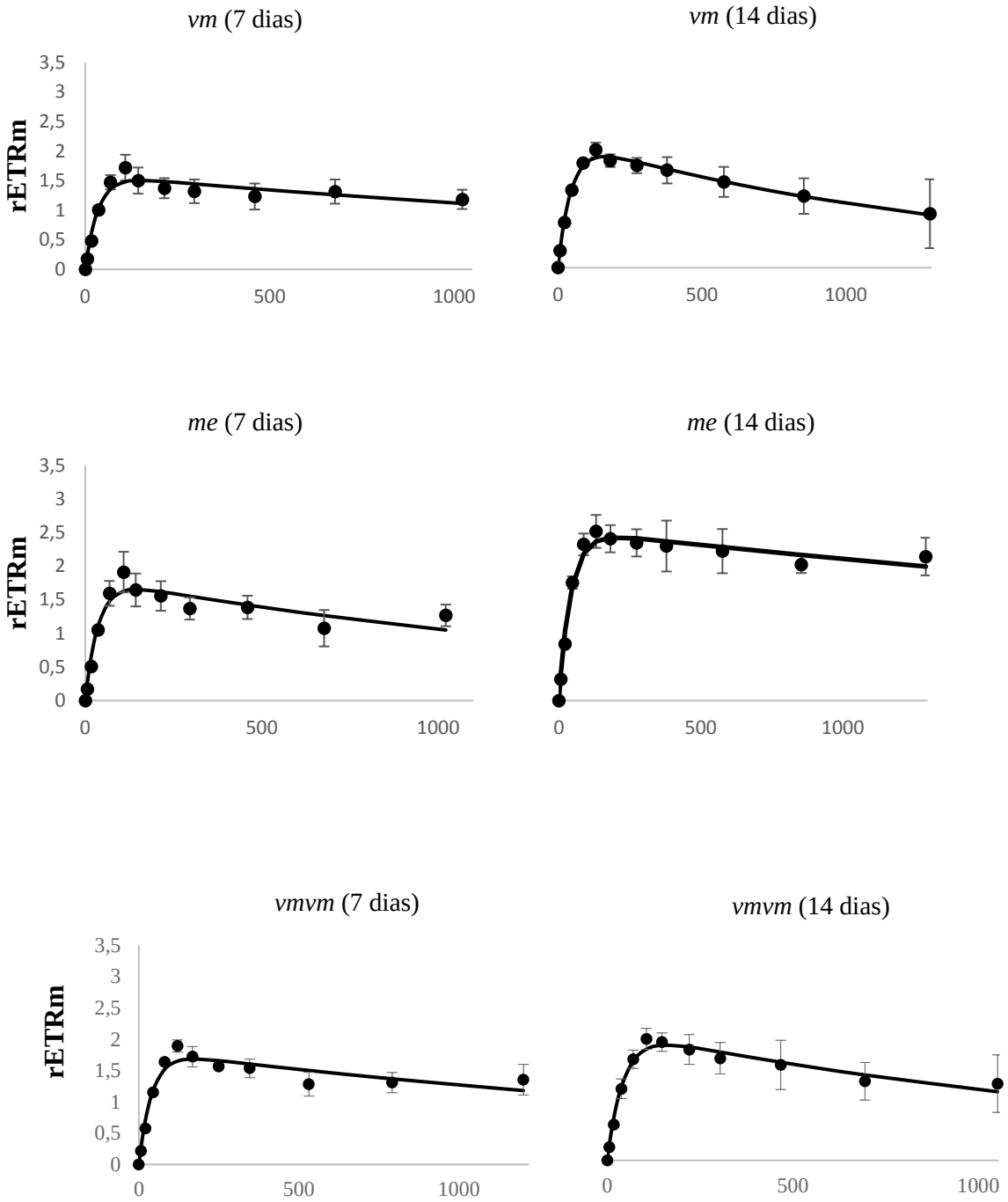


Figura 14. *Gracilaria caudata* - rendimento quântico efetivo (ΔF/Fm') obtido semanalmente durante um período de 14 dias, a partir das curvas (rETR) x (E_{PAR}). Tetrasporófitos de coloração vermelha (*vmvm*), marrom-esverdeada (*meme*) e marrom (*vmme* e *mevm*) e gametófitos femininos de coloração vermelha (*vm*) e marrom-esverdeada (*me*). Os dados são apresentados como média e desvio padrão (n=3). Letras distintas representam diferenças significativas de acordo com a análise de medidas repetidas (ANOVA) e teste a posteriori de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Tabela 4. *Gracilaria caudata* - parâmetros das curvas (rETR) x (E_{PAR}) a partir de medidas de fluorescência *in vivo* da clorofila *a* de tetrasporófitos de coloração vermelha (*vmvm)*, marrom-esverdeada (*meme)* e marrom (*vmme* e *mevm*), e gametófitos femininos de coloração vermelha (*vm*) e marrom-esverdeada (*me*), cultivadas sob condições controladas, durante um período de 14 dias. Os valores são apresentados como médias ± desvio padrão (n=3), expressos em µmol de fótons $m^{-2} . s^{-1}$ e referentes à fotossíntese máxima ($rETR_{max}$), eficiência fotossintetizante (α), saturação luminosa (E_K) e rendimento quântico efetivo (ΔF/Fm'). Letras distintas representam diferenças significativas entre um mesmo parâmetro de acordo com a análise de medidas repetidas (ANOVA) e teste a posteriori de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Tempo (dias)	Parâmetros	Linhagens					
		Tetrasporófitos				Gametófitos	
		vmvm	*Meme*	*Vmme*	*mevm*	*vm*	*me*
7	$rETR_{max}$	1,678 ± 0,075 cd	1,647 ± 0,104 cd	2,214 ± 0,135 ab	1,979 ± 0,207 bc	1,434 ± 0,139 d	1,565 ± 0,158 cd
	α	0,045 ± 0,001 c	0,047 ± 0,001 bc	0,048 ± 0,001 bc	0,048 ± 0,002 bc	0,047 ± 0,000 bc	0,047 ± 0,002 bc
	E_k	37,17 ± 0,979 abc	35,49 ± 2,417 bc	41,21 ± 0,467 ab	44,27 ± 2,187 a	30,76 ± 3,712 c	31,42 ± 2,597 c
	ΔF/Fm'	0,548 ± 0,008 f	0,580 ± 0,001 cd	0,594 ± 0,004 b	0,573 ± 0,008 de	0,572 ± 0,003 de	0,574 ± 0,007 de
14	$rETR_{max}$	1,891 ± 0,075 bc	1,699 ± 0,290 cd	1,690 ± 0,154 cd	1,710 ± 0,189 cd	1,973 ± 0,076 bc	2,327 ± 0,111 a
	α	0,052 ± 0,004 b	0,044 ± 0,001 c	0,051 ± 0,003 b	0,044 ± 0,001 c	0,043 ± 0,001 c	0,058 ± 0,001 a
	E_k	44,81 ± 6,935 a	36,16 ± 3,551 bc	32,68 ± 2,660 bc	37,88 ± 3,865 abc	44,99 ± 2,196 a	38,35 ± 3,174 abc
	ΔF/Fm'	0,566 ± 0,008 de	0,576 ± 0,004 cde	0,589 ± 0,006 bc	0,563 ± 0,004 e	0,579 ± 0,007 cde	0,604 ± 0,003 cde

Curvas Fotossíntese x Irradiância (rETR x E_{PAR}**)**



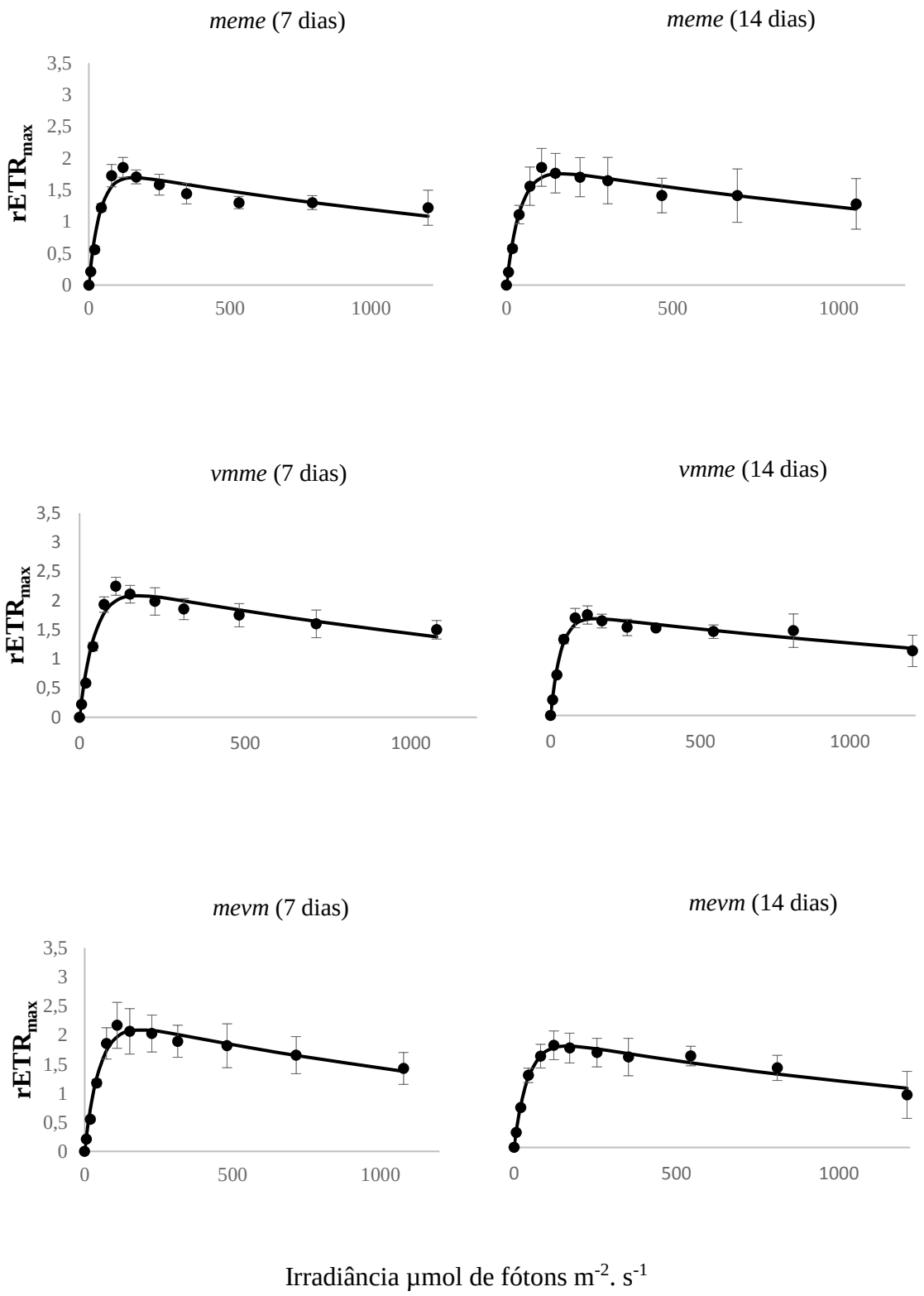


Figura 15. *Gracilaria caudata* - curvas rETR x E_{PAR} a partir de medidas de fluorescencia *in vivo* da clorofila *a* de linhagens gametofiticas femininas vermelha (*vm*) e marrom-esverdeada (*me*) e linhagens tetrasporofíticas vermelha (*vmvm*), marrom-esverdeada (*meme*) e marrons (*vmme* e *mevm*) cultivadas em 70 µmol de fótons m^{-2}. s^{-1} durante um período de 14 dias. As medições foram realizadas no sétimo e décimo quarto dias. Dados apresentados como médias e desvio padrão (n=3).

8.5 Pigmentos

Todos os pigmentos foram observados nas diferentes linhagens tetrasporofíticas analisadas (*vmvm*, *meme*, *vmme* e *mevm*). Diferenças com relação a concentração pigmentar foram observadas apenas para tetrasporófitos *meme*, os quais apresentam menores concentrações de ficoeritrina em relação aos tetrasporófitos *vmvm*, *vmme* e *mevm* ($F = 6.06$, $p < 0.03$), (Figura 16). Foram observadas diferenças apenas quanto a razão FE/Clor.*a*, em que tetrasporófitos *meme* apresentam os menores valores, quando comparados aos demais ($F = 9{,}36$, $p < 0.00$).

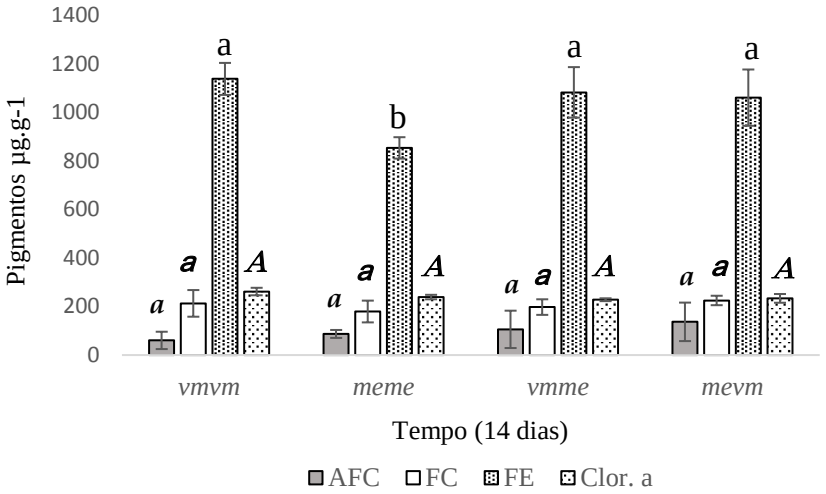


Figura 16. *Gracilaria caudata* - concentrações de aloficocianina (AFC), ficocianina (FC), ficoeritrina (FE) e clorofila a (Clor. *a*) obtidas de tetrasporófitos de coloração vermelha (*vmvm*), marrom-esverdeada (*meme*) e marrom (*vmme* e *mevm*) cultivados em 70 µmol de fótons m^{-2}. s^{-1} por um período de 14 dias. Dados apresentados como média e desvio padrão (n=3). Letras distintas representam diferenças significativas de acordo com ANOVA Uni-fatorial e teste de Newman-Keuls ($p < 0{,}05$).

Tabela 5. *Gracilaria caudata* - razões médias e respectivos desvios padrões entre ficobiliproteínas [ficoeritrina (FE), ficocianina (FC) e aloficocianina (AFC)], bem como entre cada uma delas e a clorofila *a* (Clor. *a*) encontradas em tetrasporófitos vermelhos (*vmvm*), marrom-esverdeados (*meme*) e marrons (*vmme* e *mevm*). Dados apresentados como média e desvio padrão (n=3). Letras distintas representam diferenças significativas entre um mesmo quociente de acordo com one-way ANOVA e teste de Newman-Keuls ($p < 0{,}05$).

Pigmentos	FE/FC	FE/AFC	FC/AFC	FE/Clor. *a*	FC/Clor. *a*	AFC/Clor. *a*
vmvm	5,59 ± 1,42 a	23,58 ± 12,29 a	4,02 ± 1,31 A	4,37 ± 0,50 A	0,82 ± 0,22 a	0,23 ± 0,14 a
meme	4,95 ± 1,17 a	10,01 ± 1,56 a	2,06 ± 0,35 A	3,58 ± 0,32 B	0,76 ± 0,21 a	0,36 ± 0,07 a
vmme	5,51 ± 0,37 a	13,21 ± 6,19 a	2,35 ± 1,02 A	4,75 ± 0,46 A	0,87 ± 0,14 a	0,46 ± 0,33 a
mevm	4,73 ± 0,49 a	9,59 ± 5,09 a	1,97 ± 0,90 A	4,53 ± 0,16 A	0,97 ± 0,10 a	0,60 ± 0,38 a

8.6 Número de ápices diferenciados

8.6.1 Gametofitos *vm* e *me* e tetrasporófitos *vmvm*, *meme*, *vmme* e *mevm* – 14 dias

Quando comparado o número de ápices diferenciados num período de 14 dias entre espécimes de coloração vermelha (♀*vm* e tetrasporófitos *vmvm*) e marrom-esverdeada (♀*me* e tetrasporófitos *meme*), pudemos observar que, independentemente da fase, espécimes de coloração vermelha mostram-se mais ramificados (F = 36.52, p < 0.00). Com relação a espécimes tetrasporofiticos de coloração marrom (*vmme* e *mevm*), verificou-se que *mevm* apresentaram número de ápices semelhantes a espécimes vermelhos (p > 0.06) e superiores aos observados para tetrasporófitos *vmme* (p < 0.00). Esses últimos, por sua vez, apresentaram-se com maior número de ápices em relação a tetraspófitos *meme* (p = 0.02) e a gametófitos *me* que apresentaram valores semelhantes entre si (Figura 17 e Tabela 6).

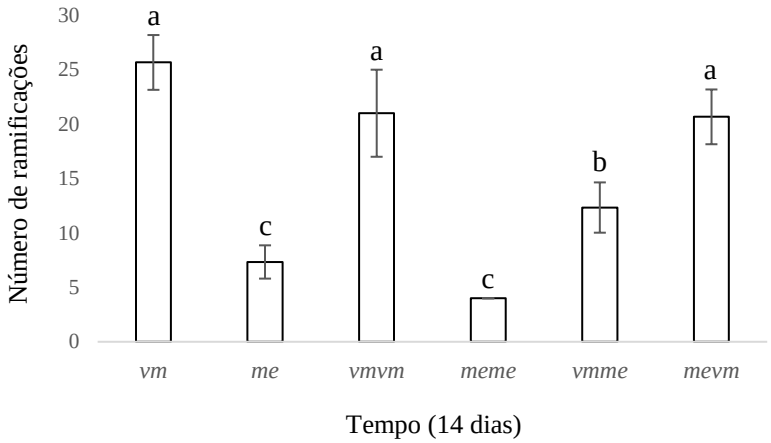


Figura 17. *Gracilaria caudata* - número de ápices diferenciados em gametófitos femininos de coloração vermelha (*vm*) e marrom-esverdeada (*me*) e em tetrasporófítos de coloração vermelha (*vmvm*), marrom-esverdeada (*meme*) e marrom (*vmme* e *mevm*). Dados apresentados como média e desvio padrão calculados a partir das três repetições por linhagem (n=3). Letras distintas representam diferenças significativas de acordo com ANOVA Uni-fatorial e teste de Newman-Keuls (p < 0,05).

Tabela 6. *Gracilaria caudata* - número total e média de ápices diferenciados em gametófitos femininos vermelhos (*vm*) e marrom-esverdeados (*me*) e em tetrasporófitos vermelhos (*vmvm*), marrom-esverdeados (*meme*) e marrons (*vmme* e *mevm*). O número total foi calculado a partir da soma de ápices presentes em todos os frascos de uma mesma linhagem (n= 3) no início do

experimento (T_0) e após 14 dias, quando do término do mesmo (T_{14}). A média e desvio padrão foram calculados a partir das três repetições por linhagem. Letras distintas representam diferenças significativas ($p<0.05$) de acordo com one-way ANOVA e teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Linhagens	T_0 (total)	T_{14} (total)	T_{14} - T_0	Média ± desvio padrão
vm	28	105	77	25,67 ± 2,51 a
me	18	32	14	04,67 ± 3,21 c
vmvm	25	88	63	21,00 ± 4,00 a
meme	14	26	12	04,00 ± 0,00 c
vmme	19	56	37	12,33 ± 2,30 b
mevm	16	69	53	17,67 ± 3,51 a

8.6.2 Gametófitos femininos *vm* e *me* - 21 dias

Houve interação entre o tempo e a coloração dos gametófitos em relação ao número de ápices diferenciados ($F = 17.99$, $p < 0.00$). Gametófitos femininos de coloração *vm* e *me*, quando cultivados por um período de 21 dias, apresentaram diferenças entre si, bem como ao decorrer das semanas. Para a primeira semana de cultivo (0-7 dias), não foram observadas diferenças entre as linhagens ($p = 0.68$). No entanto, para a segunda semana (8-14 dias), houve um aumento no número de ápices diferenciados em ♀*vm* ($p = 0.00$), enquanto que, os valores observados para ♀*me* mantiveram-se estáveis em relação à semana anterior ($p = 0.56$). Na terceira semana, ♀*vm* apresentaram um maior número de ápices em relação aos ♀*me* ($F = 36.98$, $p = 0.00$), bem como em relação aos valores da semana anterior ($F = 17.99$, $p = 0.00$). Apesar de ♀*me* terem apresentado um menor número de ápices em relação aos ♀*vm*, após 21 dias de cultivo, verificou-se também um aumento no número de ápices diferenciados em relação à semana anterior ($F = 17.99$, $p = 0.01$), (Figura 18 e Tabela 7). O aspecto geral dos ápices após 21 dias de cultivo é apresentado na Figura 19.

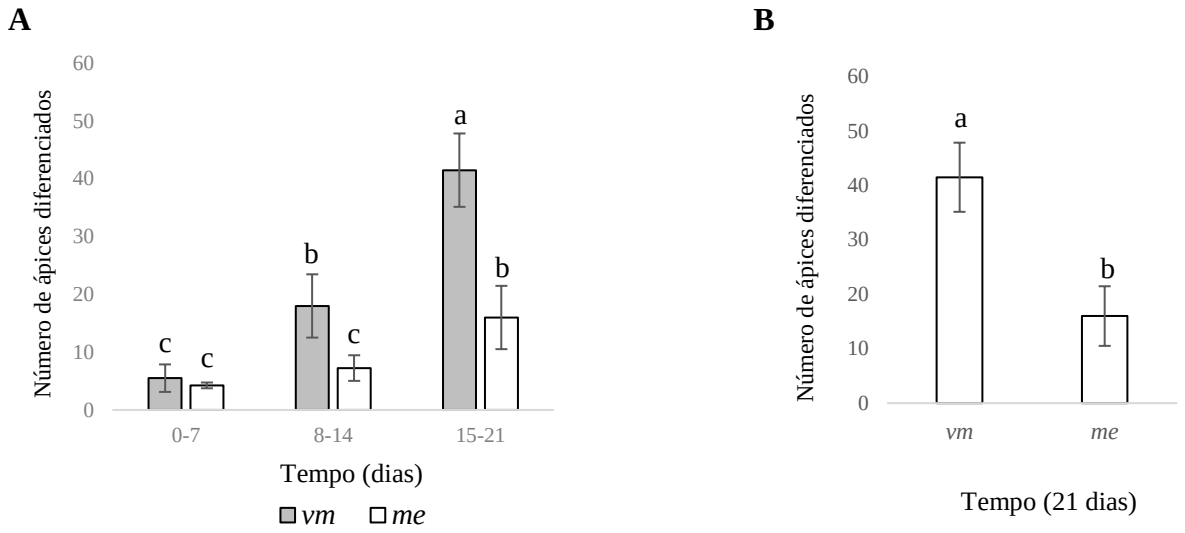


Figura 18. *Gracilaria caudata* - número de ápices diferenciados em gametófitos femininos de coloração vermelha (*vm)* e coloração marrom-esverdeada (*me)*. (**A**) Número de ápices diferenciados semanalmente (três semanas) (**B**) número de ápices diferenciados após 21 dias de cultivo. Dados apresentados como média e desvio padrão calculados a partir das quatro repetições por linhagem (n=4). Letras distintas representam diferenças significativas de acordo com a análise de medidas repetidas (ANOVA) para a figura **A**, e ANOVA Uni-fatorial para a figura **B**, sendo ambos resultados submetidos ao teste a posteriori de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Tabela 7. *Gracilaria caudata* - número total e média de ápices diferenciados em gametófitos femininos vermelhos (*vm*) e marrom-esverdeados (*me*). O número total foi calculado a partir da soma de ápices presentes em todos os frascos de uma mesma linhagem (n=4) no início do experimento (T_0) e após 7 (T_7), 14 (T_{14}) e 21dias (T_{21}). Dados apresentados como média e desvio padrão, calculados a partir das quatro repetições por linhagem. Letras distintas representam diferenças significativas de acordo com a análise de medidas repetidas (ANOVA) e teste a posteriori de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Linhagem	T_0 (Total)	T_7 (Total)	T_{14} (Total)	T_{21} (Total)	T_7 (média)	T_{14} (média)	T_{21} (média)
vm	16	22	72	166	5,5 ± 2,38 c	18,0 ± 5,47 b	41,5 ± 6,35 a
me	16	17	29	64	4,25 ± 0,5 c	7,25 ± 2,21 c	16,0 ± 5,47 b

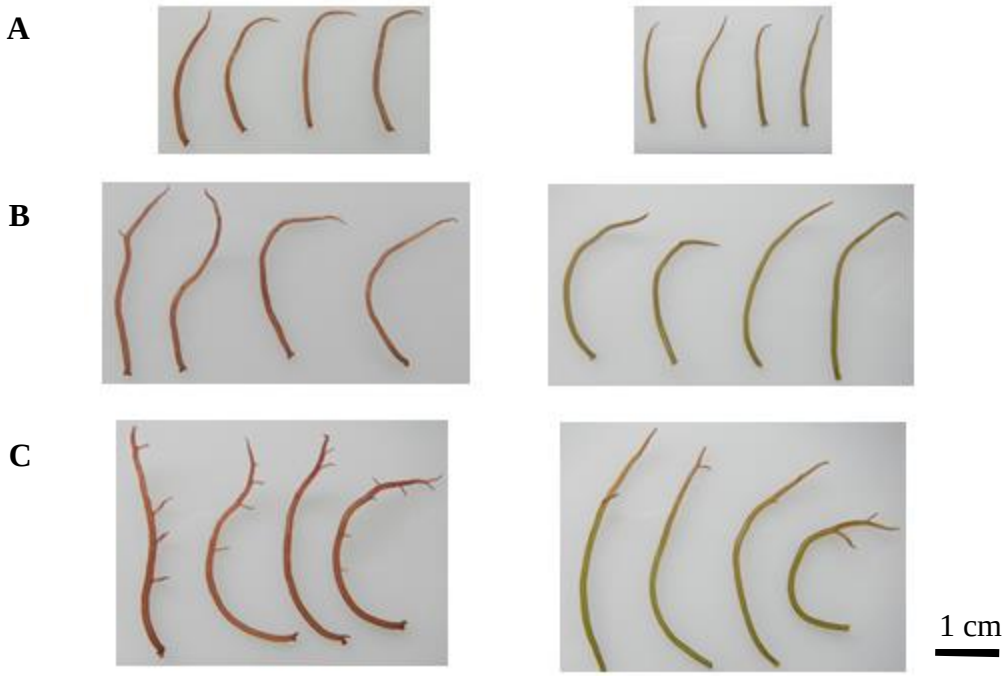


Figura 19. *Gracilaria caudata* - aspecto geral de ápices de gametófitos femininos de coloração vermelha (*vm*) e marrom-esverdeada (*me*), provenientes de tetrasporófitos *vmvm* e *meme*, respectivamente, cultivados sob as condições gerais de cultivo por um período de 21 dias. **A**) aspecto geral após 7 dias de cultivo; **B**) aspecto geral após 14 dias de cultivo; **C**) aspecto geral após 21 dias de cultivo.

8.7 Percentual de Fixação

Ápices de gametófitos femininos vermelhos (*vm*) apresentaram maior percentual de fixação nos frascos de cultivo, em relação a gametófitos femininos marrom-esverdeados (*me*), após um período experimental de 14 dias ($F = 8.00$, $p < 0.03$), (Figura 20 e Tabela 8).

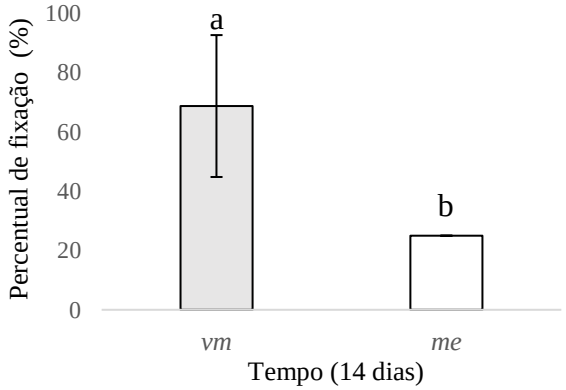


Figura 20. *Gracilaria caudata* - percentuais de fixação ao frasco de cultura obtidos por gametófitos femininos de coloração vermelha (*vm*) e marrom-esverdeada (*me*) após um período de 14 dias, sob

as condições gerais de cultivo. Dados apresentados como média e desvio padrão calculados a partir das quatro repetições por linhagem (n=4). Letras distintas representam diferenças significativas de acordo com ANOVA Uni-fatorial e teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$) realizados posteriormente a transformação de arcoseno.

Tabela 8. *Gracilaria caudata* - percentuais de fixação ao frasco de cultura de gametófitos femininos de coloração vermelha (*vm*) e marrom-esverdeada (*me*), após um período de 14 dias. Os dados são apresentados como média e desvio padrão, calculados a partir das quatro repetições por linhagem (n=4). Letras distintas representam diferenças significativas de acordo com ANOVA Uni-fatorial e teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$) realizados posteriormente a transformação de arcoseno.

Linhagem	Total de ápices	Total de ápices fixos	Fix % (média)
vm	16	11	68,75 ± 23,93 a
me	16	4	25,00 ± 0,00 b

9. DISCUSSÃO

9.1 Herança de cor

O presente trabalho evidenciou que a coloração marrom-esverdeada observada em espécimes de *Gracilaria caudata* é estável e herdável. A partir de cruzamentos recíprocos foi possível verificar que o padrão de herança dessa coloração é do tipo nuclear codominante em relação ao tipo selvagem: plantas homozigotas são vermelhas (*vmvm*) ou marrom-esverdeadas (*meme*) e plantas heterozigotas apresentam o fenótipo marrom (*vmme* e *mevm*) com segregação das colorações parentais em 1:1, na geração gametofítica. Esse padrão de herança tem sido verificado para outras espécies de *Gracilaria*, como *G. tikvahiae* (van der Meer, 1979) e *G. domingensis* (Plastino et al. 1999), embora a maioria das variantes pigmentares de Rhodophyta, descritas até o presente, tenham apresentado herança nuclear recessiva (van der Meer & Bird, 1977; van der Meer 1979; Guiry, 1984; Zhang & van der Meer, 1988; van der Meer, 1990; Plastino et al. 2004; Costa & Plastino, 2011).

A aclimatação de tetrasporófitos com diferentes genótipos (*vmvm*, *meme*, *vmme* e *mevm*) a uma irradiância superior à que vinham sendo cultivados possibilitou a identificação de um efeito parental materno na coloração de tetrasporófitos heterozigotos, ressaltando a coloração do gametófito feminino que lhes deu origem. Tal efeito materno foi observado para *G. domingensis*, que também apresentou herança nuclear codominante para a cor do talo (Plastino et al. 1999).

Carpósporos e tetrásporos de *G. caudata* apresentaram coloração vermelha, independentemente de sua origem. As cores marrom-esverdeada ou marrom somente foram observadas em plantas mais velhas (2cm – marrom-esverdeada e 4-5 cm – marrom). Esse fenômeno vem sendo frequentemente observado em variantes pigmentares espontâneas de *Gracilaria*, como por exemplo, nas variantes verdes de *G. tikvahiae* (van der Meer and Bird, 1977), *G. domingensis* (Plastino et al. 1999), *G. cornea* (Ferreira et al. 2006) e *G. birdiae* (Costa & Plastino, 2011), e na variante marrom-esverdeada de *G. birdiae* (Costa & Plastino, 2011). Uma possível explicação para o fenômeno é a presença de células menores e com vacúolos pequenos em plântulas, quando comparadas às células maiores e vacúolos grandes, presentes em talos adultos, o que evidenciaria a menor concentração de ficoeritrina em relação aos demais pigmentos (Plastino et al. 1999). Ainda dentro desse contexto, cabe ressaltar que, apesar de ser pouco reportado, esporos e plântulas de variantes pigmentares espontâneas podem também ter sua coloração expressa desde as fases iniciais de desenvolvimento, como observado para a variante verde clara de *G. birdiae* (Plastino et al. 2004).

De forma geral, o tempo necessário para a distinção entre as colorações *vm* e *me* em *G. caudata* não variou em detrimento da fase do histórico de vida, no entanto, foi evidente que tetrasporófitos apresentavam uma tonalidade mais intensa em relação a gametófitos de idade equivalente. Esse fato pode estar relacionado a diferenças metabólicas entre as duas fases, principalmente com relação à composição pigmentar, já que tetrasporófitos poderiam ter maiores concentrações de ficobiliproteinas em relação aos gametófitos, assim como já foi observado em *G. domingensis* (Guimarães, 1995).

Embora *G. caudata* seja filogeneticamente próxima de *G. birdiae* (Costa et al. 2012; Lyra et al. 2015), o tempo necessário para a diferenciação da cor do talo entre o tipo selvagem e a variante marrom-esverdeada em *G. caudata* foi de aproximadamente 60 dias, quando as plantas apresentavam 2cm de comprimento, enquanto que para *G. birdiae* foi necessário um tempo maior de vida (100 dias), além de um tamanho maior, 3cm (Costa & Plastino, 2011). Acredita-se que tais divergências sejam em decorrência de características intrínsecas às espécies, ao tipo de mutação, ou ainda uma consequência da utilização de diferentes metodologias de cultivo.

A partir dos cruzamentos teste foi possível também observar que independentemente da coloração do gametófito feminino (*vm* ou *me*) de *G. caudata*, os cistocarpos formados possuíam pericarpos avermelhados, diferentemente do observado para outras variantes espontâneas do gênero. Em *G. birdiae*, por exemplo, foi observada a coloração esverdeada do pericarpo em todos os cistocarpos diferenciados, independentemente da linhagem de origem, vermelha, marrom ou verde (Ursi, 2000), enquanto que, para *G. domingensis*, essa coloração esverdeada foi observada apenas quando o gametófito feminino possuía coloração verde (Plastino et al. 1999).

9.2 Histórico de vida

O histórico de vida de *G. caudata* foi completado *in vitro* para as linhagens selvagem e variante marrom-esverdeada, confirmando-se como do tipo "*Polysophonia*" (como *Gracilaria*, sp., Oliveira & Plastino, 1984). Esse mesmo tipo foi reportado para outras espécies e variantes pigmentares do gênero (Oliveira & Plastino, 1984; Plastino, 1985; Kain & Destombe, 1995; Guimarães, 1995; Plastino et al. 1999; Costa & Plastino, 2001). Independentemente da linhagem, o histórico de vida de *G. caudata* foi completado em aproximadamente cinco meses, sendo um dos menores tempos já reportados para espécies de *Gracilaria*, o qual tem variando entre 5-16 meses, considerando-se espécimes do tipo selvagem (Ogata et al., 1972; Bird et al., 1977; McLachlan &

Edelstein, 1977; Bird et al. 1982; Oliveira & Plastino, 1984; Bird et al., 1986; Rueness et al., 1987; Plastino & Oliveira, 1988; Guimarães et al. 1999; Costa & Plastino, 2001).

Comparando-se as diferentes linhagens tetrasporofíticas de *G. caudata* obtidas em laboratório a partir dos cruzamentos teste, pudemos observar que tetrasporófitos selvagens (*vmvm*) foram os últimos a diferenciarem tetrasporângios e, em contrapartida, apresentavam-se mais ramificados que os demais tipos de tetrasporófitos (*meme*, *vmme* e *mevm*). Esse fato sugere diferenças metabólicas entre os tetrasporófitos em função do genótipo. Essas diferenças levariam tetrasporófitos com variação pigmentar a investirem inicialmente no alcance da maturidade reprodutiva, enquanto que tetrasporófitos selvagens investiriam no crescimento vegetativo. Diferenças quanto ao tempo necessário para o alcance da maturidade reprodutiva foram também observadas na descendência desses tetrasporófitos, de forma que, gametófitos femininos provenientes de tetrasporófitos *vmvm* foram os últimos a diferenciarem estruturas reprodutivas, quando comparados aos gametófitos femininos provenientes de tetrasporófitos com variação pigmentar (*meme*, *vmme* e *mevm*). Apesar do início tardio da diferenciação de cistocarpos em plantas femininas vermelhas de *G. caudata*, provenientes de tetrasporófitos *vmvm*, foi observado que essas diferenciaram o dobro de cistocarpos por indivíduo em relação às plantas cistocarpicas provenientes de tetrasporófitos com variação pigmentar *meme*, *vmme* e *mevm* (44, 19, 20 e 24 cistocarpos por planta, respectivamente). Além disso, se considerarmos o número total de cistocarpos, plantas cistocárpicas provenientes de tetrasporófitos *vmvm* diferenciaram 617 cistocarpos, enquanto que plantas cistocárpicas provenientes de tetrasporófitos *meme*, *vmme* e *mevm* diferenciaram 334, 230 e 218 cistocarpos, respectivamente. Sugere-se então que, gametófitos femininos, provenientes de tetrasporófitos *vmvm*, apresentem um melhor desempenho reprodutivo em relação a gametófitos femininos provenientes de tetrasporófitos com variação pigmentar. Esses resultados sugerem também que na natureza poderia haver uma maior quantidade de carpósporos de genótipo *vmvm* aptos ao recrutamento em relação aos carpósporos dos demais genótipos, contribuindo dessa forma, para predominância de espécimes de coloração vermelha na natureza. Para *G. birdiae*, o sucesso reprodutivo dos gametófitos femininos foi mensurado por meio da densidade de cistocarpos formados por centímetro do talo. Ao contrário do observado para *G. caudata*, plantas cistocárpicas vermelhas de *G. birdiae* apresentaram um menor sucesso reprodutivo quando comparadas a plantas cistocárpicas com variação pigmentar, no caso marrom-esverdeada e verde (Costa, 2000).

Plantas cistocárpicas vermelhas de *G. caudata*, provenientes de tetrasporófito homozigoto *vmvm*, apresentaram um menor tempo para a maturação dos cistocarpos (18 dias) em relação às plantas cistocárpicas de *G. birdiae* (42 dias, Costa, 2000) e *G. domingensis* (28 dias, Ferreira, 2008). Esse fato pode estar relacionado a diferenças fisiológicas entre as espécies ou a diferentes

metodologias de cultivo empregadas. Além disso, no presente trabalho, não foram observadas variações desse tempo em função da coloração do talo, como observado para variantes pigmentares cistocárpicas de *G. birdiae* (Costa, 2000).

Ao compararmos apenas o tempo necessário para que fosse completado o histórico de vida em laboratório das linhagens vermelha de *G. caudata* (proveniente de tetrasporófito vermelho de campo) e marrom-esverdeada (proveniente de tetrasporófito marrom-esverdeado de campo) de *G. caudata* observamos que, a linhagem marrom-esverdeada teve seu histórico completado em um tempo menor em relação ao tipo selvagem (145 dias e 157 dias, respectivamente), já que atingiram primeiro a maturidade reprodutiva tanto para a fase tetrasporofítica (*meme* 71 dias, e *vmvm* 77 dias) quanto gametofítica (♀*me* 56 dias e ♀*vm* 62 dias). No entanto, em *G. birdiae* o histórico de vida da linhagem selvagem foi completado em um tempo menor em relação aos de variantes de coloração marrom-esverdeada e verde (498, 523 e 861 dias, respectivamente), já que os tetrasporofítos dessa linhagem (genótipo *vmvm*) atingiram a maturidade reprodutiva num tempo mais curto do que tetrasporófitos com variação pigmentar (Costa & Plastino, 2001).

Em *Gracilaria caudata* foi necessário um período menor para que fosse completado *in vitro* o histórico de vida a partir dos cruzamentos entre gametófitos de colorações distintas (♀*vm* x ♂*me*, 132 dias; ♀*me* x ♂*vm*, 138 dias) em comparação aos cruzamentos entre gametófitos de colorações semelhantes (♀*vm* x ♂*vm*, 157 dias; ♀*me* x ♂*me*, 145 dias), tendo em vista que tetrasporófitos *mevm* atingiram a maturidade reprodutiva antes em relação aos tetrasporófitos homozigotos *vmvm* e *meme* (65 e 77 dias de idade, respectivamente). Além disso, gametófitos femininos provenientes de tetrasporófitos *vmme* e *mevm* desenvolveram cistocarpos precocemente quando comparados às plantas femininas provenientes de tetrasporófitos *vmvm* e *meme* (49, 49, 56 e 62 dias de idade, respectivamente). Portanto, sugere-se a existência de heterose, quanto à maturidade reprodutiva, na progênie dos cruzamentos entre gametófitos *vm* e *me*, provenientes de tetrasporófitos de coloração vermelha e marrom-esverdeada de campo.

9.3 Anomalias reprodutivas

No presente trabalho, foram observadas divergências quanto à sexualidade da geração gametofítica em função do genótipo do tetrasporófito progenitor de *G. caudata*. Apenas na descendência de tetrasporófitos selvagens (*vmvm*) foi observada uma proporção sexual de 1:1, entre gametófitos femininos e masculinos, a qual é esperada para espécies de *Gracilaria* (Ogata et al. 1972, Plastino, 1985; van der Meer 1986; Costa & Plastino, 2001). No entanto, na progênie de

tetrasporófitos com variação pigmentar (*meme*, *vmme* e *mevm*) houve alterações na proporção sexual, devido à presença de variantes reprodutivas. Tais variantes, obtidas espontaneamente, foram caracterizadas pelo surgimento de cistocarpos em um talo inicialmente considerado como masculino por apresentar espermatângios. Em razão do modo como cistocarpos e espermatângios se dispunham no talo de *G. caudata*, sugere-se que tais variantes não seriam originadas a partir da coalescência de tetrásporos, e talvez nem a partir de falhas durante a citocinese de tetrasporângios. Essa condição de bissexualidade, tal como observada no presente trabalho, foi reportada para *G. tikvahiae* (van der Meer et al. 1984; van der Meer, 1986) e *G. domingensis* (Plastino et al. 1999). Sugere-se então que, assim como observado para *G. tikvahiae*, a bissexualidade seja decorrente da presença de um alelo recessivo denominado *bi*, o qual possibilitaria a expressão de funções femininas em gametófitos masculinos (van der Meer et al. 1984). De acordo com a notação genética descrita por van der Meer et al. (1984), gametófitos bissexuais teriam o genótipo mt^{m}/bi, enquanto que, gametófitos apenas masculinos teriam o genótipo mt^{m}/bi^{+}. O locus *mt* seria o responsável pelo controle primário de determinação sexual, enquanto que o locus *bi* permitiria a expressão de características femininas em gametófitos masculinos.

A partir de tetrasporófitos *vmme* (provenientes do cruzamento entre ♀*vm* x ♂*me*) foram obtidos tetrásporos que ao germinarem deram origem a gametófitos femininos, masculinos e bissexuais em uma proporção de 11:8:6. Esses resultados indicam que a bissexualidade em *G. caudata* é herdável, já que todos os gametófitos masculinos *me* utilizados inicialmente nos cruzamentos teste tornaram-se bissexuais. Além disso, tendo em vista que a bissexualidade é herdável e que na progênie de tetrasporófitos *vmvm* (provenientes do cruzamento entre ♀*vm* x ♂*vm*) não foram observados gametófitos bissexuais, podemos inferir que todos os gametófitos femininos e masculinos *vm* utilizados inicialmente nos cruzamentos teste não portavam a mutação *bi*, sendo seus genótipos descritos como mt^{f}/bi^{+} e mt^{m}/bi^{+}, respectivamente. Tetrasporófitos *vmme* seriam provenientes do cruzamento entre uma planta feminina *vm* x gametófito bissexual *me* (mt^{f}/bi^{+} x mt^{m}/bi) e, portanto, seriam heterozigotos para o locus *mt* e *bi*, sendo seu genótipo descrito como mt^{f}/mt^{m}, bi^{+}/bi. Após o processo meiótico nos tetrasporófitos, seriam esperadas quatro classes reprodutivas, feminina (mt^{f}/bi^{+}), feminina portando a mutação *bi* (mt^{f}/bi), masculina (mt^{m}/bi^{+}) e bissexual (mt^{m}/bi), em uma proporção de 1:1:1:1, considerando-se a segregação de dois genes independentes, como reportado para *G. tikvahie* (van der Meer et al. 1984; van der Meer 1986). Entretanto, o alelo *bi* não pode ser fenotipicamente detectado em gametófitos femininos, que naturalmente já expressam características femininas, resultando numa proporção de dois gametófitos femininos, um masculino e um bissexual.

Com relação à descendência de tetrasporófitos *mevm* (provenientes do cruzamento entre ♀*me* x ♂*vm*), foram observados gametófitos femininos, masculinos e bissexuais, assim como na progênie

de tetrasporófitos *vmme*, porém, em uma proporção de 9:11:5. Esses resultados sugerem que todos os gametófitos femininos *me*, utilizados inicialmente nos cruzamentos teste, portavam também a mutação *bi* que confere a bissexualidade, já que os gametófitos masculinos *vm* utilizados inicialmente nos cruzamentos teste não portavam a mutação, e que a bissexualidade é herdável, como visto a partir da descendência de tetrasporófitos *vmme*. Dessa forma, sugere-se que as plantas femininas *me*, utilizadas inicialmente nos cruzamentos teste, teriam o genótipo mt^f/bi, enquanto que tetrasporófitos *mevm* teriam o genótipo mt^f/mt^m, bi^+/bi, sendo heterozigotos para o locus *mt* e *bi*, assim como os tetrasporófitos *vmme*.

Na progênie de tetrasporófitos *meme* (provenientes do cruzamento entre ♀*me* x ♂*me*), foram observados apenas gametófitos femininos e bissexuais em uma proporção de 18:7. Esses resultados corroboram o raciocínio de que todas as plantas ♀*me* utilizadas inicialmente nos cruzamentos teste portavam a mutação *bi*. Considerando-se que não foram observados gametófitos exclusivamente masculinos na progênie de tetrasporófitos *meme*, sugere-se que tais tetrasporófitos sejam provenientes do cruzamento entre duas variantes reprodutivas (mt^f/bi x mt^m/bi) e, portanto, seriam heterozigotos para o locus *mt* e homozigotos para o locus *bi*, sendo seu genótipo descrito como mt^f/mt^m, *bi*/*bi*. Assim, a partir da meiose na geração tetrasporofítica, poderiam ser obtidas apenas duas classes reprodutivas, gametófitos femininos que portariam a mutação *bi* e gametófitos bissexuais, em uma proporção de 1:1, como observado a partir da descendência de tetrasporófitos homozigotos *bi* em *G. tikvahiae* (van der Meer 1986). Entretanto, nossos resultados diferem da proporção esperada, assim como já observado na descendência de tetrasporófitos homozigotos *bi* em *G. tikvahiae* (van der Meer 1986).

Semelhanças quanto as proporções sexuais entre gametófitos feminino, masculino e bissexual, obtidas para *Gracilaria caudata*, poderiam ser melhor corroboradas com as proporções obtidas por outras espécies (van der Meer & Bird, 1977; van der Meer & Tood, 1977; van der Meer et al. 1984; van der Meer, 1986) aumentando-se o número amostral. Além disso, um período maior de observação referente à diferenciação de estruturas reprodutivas poderia resultar em proporções distintas das apresentadas nesse trabalho, já que a bissexualidade é espressa tardiamente.

A fim de verificar os mecanismos responsáveis pela formação dos cistocarpos em gametófitos bissexuais van der Meer et al. (1984) realizaram cruzamentos em *G. tikvahiae* baseando-se na utilização de variantes de cor com herança nuclear dominante e sem histórico de bissexualidade (mt^m/bi^+) como gametófitos masculinos, e gametófitos bissexuais como "femininos" (mt^m/bi). Esses autores observaram que a descendência dos bissexuais apresentava a coloração dominante, indicando que os cistocarpos eram formados por meio de um processo sexuado. Assim, a partir da geminação de carpósporos foram obtidos apenas espécimes diploides com características masculinas (mt^m/mt^m,

bi^{+}/*bi*). De acordo com esse raciocínio, seria possível inferir que os cistocarpos formados em gametófitos bissexuais *G. caudata*, os quais deram origem apenas a espécimes masculinos, tenham também sido formados por meio de um processo sexual. Assim, tais espécimes seriam diploides e teriam o mesmo genótipo descrito acima. Considerando-se que na descendência do indivíduo ♂*bi* 07 foram observados apenas espécimes com características masculinas, e que um desses espécimes desenvolveu um único cistocarpo no talo, seria possível que tal cistocarpo fosse proveniente de uma mutação somática no locus *bi*. Apesar dessa proposição ser a mais plausível diante dos resultados obtidos, cabe ainda ressaltar que os cistocarpos formados em gametófitos bissexuais de *G. caudata*, os quais deram origem apenas a espécimes masculinos possam ter sido formados por meio de um processo de autofecundação ou fecundação cruzada com um segundo gametófito bissexual, resultando assim, em espécimes diploides bissexuais (mt^{m}/mt^{m}, *bi*/*bi*), os quais ainda não teriam atingido a maturidade reprodutiva. Tal mecanismo genético baseia-se na proposição de van der Meer et al. (1984), utilizada para explicar a progênie de gametófitos bissexuais de *G. tikvahiae*. Outra possível explicação seria que esses cistocarpos teriam sido formados por meio de um processo partenogênico, e o fato de que apenas um espécime tenha expressado a bissexualidade esteja relacionado a diferenças individuais quanto ao tempo de maturação reprodutiva. Por fim, ainda permanecem obscuros os prováveis mecanismos pelos quais foram gerados os cistocarpos em gametófitos bissexuais, que deram origem a tetrasporófitos.

9.4 Aspectos fisiológicos

Populações de *G. caudata* que ocorrem na costa brasileira são compostas predominantemente por tetrasporífitos (Ayres-Ostrock et al. 2015), assim como populações de outras espécies de *Gracilaria*, como por exemplo, *G. mammillaris* e *G. cervicornis* (Plastino, 1985), *G. cornea* (Orduña-Rojas et al. 2002), *G. chilensis* (Guillemin et al. 2008), *G. vermiculophylla* (Terada et al. 2010), *G. gracilis* (Martín et al. 2011) e *G. birdiae* (Ayres-Ostrock et al. 2015). O mesmo ocorre em outros gêneros de algas vermelhas, como *Gelidium* (Prathep et al. 2009) e *Pterocladiella* (Polifrone et al. 2012). Esses dados sugerem que a fase tetrasporofítica apresente vantagens em relação à gametofítica, como já amplamente discutido na literatura (Hughes & Otto, 1999). Entretanto, nossos dados evidenciaram que gametófitos vermelhos de *G. caudata* apresentaram maiores TCs em relação aos tetrasporófitos de mesma coloração (*vmvm*) em condições controladas de laboratório. Esses dados não corroboram resultados anteriores, em que tetrasporófitos de *G. caudata* apresentaram maiores taxas de crescimento que gametófitos (Araújo et al. 2014; Faria & Plastino 2016). Entretanto, é

importante destacar que variações na disponibilidade de nutrientes podem eventualmente favorecer uma ou outra fase do histórico de vida, como já referido para outras espécies (Destombe et al. 1993). Faria & Plastino (2016) utilizaram mais nutrientes (VS 50%) durante o cultivo de *G.caudata* que o presente trabalho (VS 25%). Esses dados sugerem que gametófitos de *G. caudata* apresentem vantagens em relação aos tetrasporófitos, sob condições nutricionais menos favoráveis, assim como observado para *G. gracilis* (como *G. verrucosa*, Destombe et al. 1993) e *G. chilensis* (Guillermin et al. 2013). Lewis (1985) propõe que haploides sob um ambiente de escassez nutricional poderiam ter vantagens em relação aos diploides. Resultados semelhantes aos nossos, em que gametófitos apresentaram maiores TCs em detrimento à fase tetrasporofitica foram reportados também para *G. birdiae* (Ursi & Plastino 2001) e *G. dura* (C.Agardh) J.Agardh (Gupta et al. 2011); entretanto, a maioria dos trabalhos tem evidenciado um melhor desempenho da fase tetrasporofitica (Barufi et al. 2015; Guillemin et al. 2013).

Gametófitos femininos e tetrasporófitos de *G. caudata* não apresentaram diferenças com relação ao número de ápices diferenciados, considerando-se espécimes de mesma coloração. Esses resultados estão de acordo com estudos previos realizados com espécimes vermelhos de *G. caudata* provenientes da mesma população estudada no presente trabalho (Faria & Plastino 2016). Todavia, diferenças quanto ao número de ápices entre as fases haploide e diploide foram reportadas para indivíduos oriundos dessa mesma população de *G. caudata*, quando sujeitos a uma irradiância superior à utilizada no presente trabalho (Faria et al. 2016). Esses dados sugerem que a espécie possa responder diferentemente dependendo das condições abióticas, o que denota seu potencial de aclimatação.

Observou-se que gametófitos e tetrasporófitos vermelhos de *G. caudata* apresentaram número de ápices semelhantes entre si, sendo o mesmo observado para gametófitos e tetrasporófitos marrom-aesverdeados. Entretanto, espécimes de coloração vermelha apresentaram um maior número de ápices diferenciados em relação a espécimes de coloração marrom-esverdeada, independentemente da fase do histórico de vida. Resultados semelhantes foram observados para *G. birdiae* em que variantes pigmentares apresentaram-se também menos ramificadas em relação ao tipo selvagem (Ursi, 2000). Como consequência do maior número de ápices observado em gametófitos vermelhos de *G. caudata*, maiores TCs foram também observadas em relação a gametófitos marrom-esverdeados. Esses resultados estão de acordo com maioria dos estudos em que são realizadas comparações entre o desempenho somático de variantes pigmentares e espécimes do tipo selvagem (Guimarães, 2000; Plastino et al. 2004; Mansilla et al. 2014; Faria & Plastino, 2016; Veeragurunathan et al. 2016). Muitos autores atribuem esses resultados às baixas concentrações de ficoeritrina, que geralmente são

encontradas em variantes pigmentares espontâneas (van der Meer, 1979; Guimarães et al. 2003; Niwa et al. 2008; Costa & Plastino, 2011, Martins et al. 2011; Veeragurunathan et al. 2016).

Tetrasporófitos marrom-esverdeados (*meme*) de *Gracilaria caudata* apresentaram menores concentrações de ficoeritrina em relação a espécimes tetrasporofíticas do tipo selvagem (*vmvm*), corroborando os resultados anteriores para a espécie (Faria & Plastino 2016). Apesar de diferenças quanto à composição pigmentar, tais tetrasporófitos apresentaram TCs semelhantes entre si, assim como observado para variantes de cor e tipos selvagens de outras espécies de *Gracilaria*, como *G. birdiae* (Ursi et al. 2003; 2013) e *G. cornea* (Ferreira et al. 2006), bem como de outras algas vermelhas: *Kappaphyccus alvarezii* (Muñoz et al. 2004); *Hypnea mussiformis* (Yokoya et al. 2007); e *Mazzaella laminarioides* (Navarro, 2015).

Embora tenhamos observado TCs semelhantes entre tetrasporófitos marrom-esverdeados (*meme*) e vermelhos (*vmvm*) de *Gracilaria caudata*, esses resultados diferem de resultados anteriores, em que um melhor desempenho foi verificado para tetrasporófitos vermelhos (Faria & Plastino, 2016). Considerando-se que os autores empregaram uma concentração de solução nutritiva superior (VS 50%) ao que empregamos no nosso trabalho (VS 25%), sugere-se que as TCs de espécimes marrom-esverdeados sejam inibidas em meio com excesso de nutrientes. Além disso, permanece a possibilidade de que espécimes do tipo selvagem tenham seu crescimento favorecido em relação aos tetrasporófitos marrom-esverdeados quando sujeitos a condições nutricionais menos ricas. Comparando-se apenas os tetrasporófitos dos diferentes genótipos de *G. caudata* (*vmvm*, *meme*, *vmme* e *mevm*), pudemos observar que os marrom-esverdeados (*meme*) apresentaram menores concentrações de ficoeritrina em relação aos *vmme* e *mevm*; entretanto, diferenças quanto à composição pigmentar entre tetrasporófitos do tipo selvagem (*vmvm*) e variantes marrons (*vmme* e *mevm*) não foram observadas. Esses resultados, provavelmente poderiam ser distintos, caso tivéssemos utilizado no inicio do cultivo ápices maiores que 0,5 cm de comprimento e biomassa superior a 50mg para as extrações, já que a diferenciação de coloração em *G. caudata* é nitidamente visível somente em talos mais maduros.

Independentemente da fase ou coloração do talo, espécimes de *G. caudata* apresentaram um declínio das TCs ao longo do tempo. Esse resultado está de acordo com o observado para espécimes tetrasporofíticos vermelhos e marrom-esverdeados de *G. caudata* (Faria & Plastino 2016), bem como corroboram os resultados obtidos para outras espécies de *Gracilaria*, nas quais são observadas maiores TCs nas fases iniciais de cultivo (Haglund e Pedersén 1992; Macchiavello et al. 1998; Ayres-Ostrock et al. 2014b). Uma única exceção observada no presente trabalho refere-se a ♀*me*, que mantiveram as TCs estáveis ao longo do tempo. Esse resultado parece estar relacionado a um incremento nos valores $rETR_{max}$, α, $\Delta F/Fm'$ ao longo do tempo, observados para essa variante.

Considerndo-se os parâmetros fotossintetizantes, foi observado que independentemente da coloração do talo, gametófitos femininos apresentam um incremento nos valores de $rETR_{max}$ ao longo do tempo, enquanto que, os tetrasporófitos dos diferentes genótipos mantiveram os valores estáveis. A única exceção foram os tetrasporófitos *vmme*, os quais apresentaram uma redução nos valores de $rETR_{max}$ na segunda semana de cultivo. Deve-se ressaltar que os tetrasporófitos dos diferentes genótipos apresentaram diversos percentuais de fertilidade do talo (*vmvm* 56%, *meme* 66%, *vmme* 72% e *mevm* 68%). Portanto, esses resultados possivelmente estão associados à fertilidade, já que tetrasporângios puderam ser observados em todos os tetrasporófitos desde a primeira semana de experimento. A redução da $rETR_{max}$ observada para tetrasporófitos *vmme* pode estar associada ao fato de tais tetrasporófitos apresentarem-se mais férteis em relação aos demais. Segundo Santelices & Varela (1995), as algas desviam parte ou toda a energia necessária ao desempenho somático para a reprodução, podendo causar reduções nas TCs, no desempenho fotossintetizante, bem como no conteúdo pigmentar. Resultados semelhantes foram observados para *G. chilensis* (Guillemin et al. 2014).

No presente trabalho, tetrasporófitos vermelhos e marrom-esverdeados de *Gracilaria caudata* apresentaram diferenças quanto à eficiência fotossintetizante (α), evidenciando maiores valores para tetrasporófitos vermelhos, diferentemente do observado anteriormente, quando se empregou uma condição nutricional superior à utilizada no presente estudo (Faria & Plastino 2016). Portanto, sugere-se que fatores ambientais possam também influenciar no desempenho fotossintetizante de *G. caudata*. Cabe ressaltar que diversos estudos em algas vermelhas têm mostrado semelhanças quanto aos diferentes parâmetros fotossintetizantes entre variantes pigmentares e espécimes do tipo selvagem (Ayres-Ostrock et al. 2014; Martins et al. 2011), entretanto, um melhor desempenho por parte do tipo selvagem foi também reportado (Yokoya et al. 2007). De forma geral, gametófitos femininos marrom-esverdeados de *G. caudata* apresentaram maiores valores de $rETR_{max}$, α e ΔF/Fm' em relação às demais linhagens analisadas, evidenciando um melhor desempenho fotossintetizante. Variantes pigmentares com melhor desempenho fotossintetizante foram reportadas para outras espécies de *Gracilaria* como, por exemplo, *G. birdiae* (Ursi et al. 2003).

Apesar das diferenças observadas quanto ao número de apices diferenciados, composição pigmentar, fertilide e desempenho fotossitetizante, gametófitos femininos marrom-esverdeados, e os tetrasporófitos dos diferentes genótipos apresentaram TCs semelhantes quando considerado todo o periodo experimental, sendo esses valores inferiores aos observados para os gametófitos feminos vermelhos. Sugere-se, que esses dados sejam resultantes da interação de diversos fatores, como por exemplo: i, estado fértil dos diferentes tetrasporófitos; ii, o bom desempenho fotossintetizante de

gametófitos femininos *me*; iii, o melhor desempenho somático de gametófitos femininos *vm*, quando comparados aos *me*; e principalmente iv, a diversidade intraespecífica.

Em *G. caudata*, tetrasporófitos com variação pigmentar apresentaram-se mais férteis em relação aos tetrasporófitos do tipo selvagem. Esses resultados evidenciam vantagens adaptativas em relação ao tipo selvagem, as quais, provavelmente, contribuem para a manutenção de tal variante na natureza. Além disso, deve-se ressaltar que essa vantagem quanto à fertilidade poderia trazer diversas implicações econômicas, uma vez que o estabelecimento de cultivos comerciais a partir de esporos, bem como a utilização de variantes pigmentares, têm se mostrado como alternativas viáveis para satisfazer as demandas por ágar e para a conservação de populações naturais (Alveal et al. 1997; Hayashi, 2007; Ursi et al. 2013). Além disso, a ocoarrência de variantes possibilita o aumento da biomassa disponível e contribue para a variabilidade genética das espécies selecionas (Alveal et al. 1997).

Indivíduos haploides e diploides de *Gracilaria caudata*, assim como as demais algas vermelhas, têm capacidade de se reproduzir vegetativamente por meio da fragmentação do talo e recrutamento. Segundo Guillemin et al. (2008) ramos destacados de *G. chilensis* teriam a capacidade de recrutar áreas de fundo macio pelo soterramento, mas seriam incapazes de formarem novos discos de fixação. No presente trabalho, foi observado que gametófitos femininos de *G. caudata*, independentemente da coloração do talo (vermelho ou marrom-esverdeado), possuem a capacidade de regeneração de discos de fixação a partir de ápices destacados do talo. Além disso, espécimes selvagens apresentaram maior capacidade de fixação ao frasco de cultura quando comparadas à variante de cor marrom-esverdeada. Esses resultados sugerem que espécimes selvagens possuiriam uma melhor capacidade de recrutamento em relação à variante pigmentar marrom-esverdeada em ambiente natural. Cabe ressaltar, que a maioria dos estudos que avalia o recrutamento ou colonização do substrato em algas o fazem a partir de esporos, sejam eles haploides ou diploides, por meio de diferentes técnicas, como por exemplo: i, taxas de sobrevivência em função da ploidia ou espécie (Roleda et al. 2004); ii, coleta de substrato em campo e avaliação das espécies recrutadas pela identificação dos esporos presentes (Robuchon et al. 2014); e iii, avaliação dos fatores que influenciam o recrutamento, por meio de inserção de substratos artificiais na natureza (Kennelly, 1983; Torres et al. 2008; Castelar et al. 2008), entre outros. Dessa forma, ressalta-se a importância do estudo do recrutamento em algas a partir de processos assexuados, como a reprodução vegetativa, já que além do exposto acima, algumas populações de algas gracilarioides podem apresentar uma prevalência da reprodução assexuada, como, por exemplo, *G. birdiae* (Ayres-Ostrock, 2014).

10. Considerações finais

No presente trabalho foram realizadas investigações sobre a diversidade intraespecífica de *Gracilaria caudata*. Avaliou-se pela primeira vez o padrão de herança da coloração marrom-esverdeada encontrada em espécimes provenientes de população natural. O padrão de herança foi do tipo nuclear codominante, rejeitando-se assim a hipótese inicial deste trabalho de que a coloração vermelha seria dominante em relação à coloração marrom-esverdeada. Essa coloração é decorrente de uma deficiência de ficoeritrina, confirmada pela análise de tetrasporófitos dos diferentes genótipos (*vmvm*, *meme*, *vmme* e *mevm*), e já reportada para a espécie em estudo anterior (Faria & Plastino, 2016).

Variantes reprodutivas (bissexuais) foram, pela primeira vez, reportadas para *G. caudata*. Tais variantes foram observadas em diferentes proporções com relação a gametófitos femininos e masculinos, e apenas na progênie de tetrasporófitos com variação pigmentar obtidos em laboratório (*meme*, *vmme* e *mevm*). Sugere-se a ocorrência do alelo *bi* que confere a bissexualidade e foi anteriormente referido para *G. tikvahiae* (van der Meer 1986). Esse alelo estaria presente em tetrasporófitos marrom-esverdeados oriundos de campo, e teria sido transmitido para as gerações subsequentes cultivadas em laboratório. Permanece a possibilidade de que em populações naturais esse alelo esteja também presente em espécimes de coloração vermelha, já que na progênie de tetrasporófitos *vmme* e *mevm* foram observados gametófitos ♂*bi* de coloração vermelha.

O presente trabalho verificou que gametófitos de *G. caudata* de coloração vermelha possuem um melhor desempenho somático quando comparados a gametófitos de coloração marrom-esverdeada. Esse aspecto foi evidenciado por meio de taxas de crescimento e número de ápices diferenciados. Pudemos verificar também que gametófitos de coloração vermelha apresentaram um maior percentual de fixação ao frasco de cultura quando comparados aos gametófitos de coloração marrom-esverdeada, sugerindo que no ambiente natural os primeiros tenham uma vantagem frente ao recrutamento de ápices destacados. Cabe ressaltar ainda, que o melhor desempenho reprodutivo observado para gametófitos de coloração vermelha (número de cistocarpos diferenciados) sugere que na natureza possa haver uma maior quantidade de carpósporos de genótipo *vmvm* aptos ao recrutamento em detrimento de carpósporos dos demais genótipos (*meme*, *vmme* e *mevm*), contribuindo, para a predominância de espécimes de coloração vermelha na natureza. Em contrapartida, espécimes gametofíticos de coloração marrom-esverdeada apresentaram melhor desempenho fotossintetizante e, apesar do menor desempenho reprodutivo, tais variantes alcançaram a maturidade sexual precocemente. Esses mecanismos, provavelmente, favorecem a manutenção da variante marrom-esverdeada no ambiente natural.

Observou-se que, de forma geral, tetrasporófitos com variação pigmentar não só atingiram precocemente a maturidade reprodutiva, como também tornaram-se mais férteis em relação ao tipo selvagem (*vmvm*). Essa vantagem observada para tais tetrasporófitos, provavelmente, também contribui para a manutenção da variante marrom-esverdeada na natureza. Além disso, poderia ser futuramente melhor estudada, trazendo assim contribuições à maricultura de *G. caudata* no país, uma vez que cultivos comerciais a partir de esporos, bem como a utilização de variantes pigmentares, têm se mostrado como alternativas viáveis para satisfazer as demandas por ágar e para a conservação de populações naturais, por possibilitarem o aumento da biomassa disponível e contribuírem para a variabilidade genética da espécie (Alveal et al. 1997; Hayashi, 2007; Ursi et al. 2013).

Destaca-se ainda que espécimes de coloração vermelha de *G. caudata*, independentemente da fase, bem como tetrasporófitos *mevm*, produziram um maior número de ápices quando comparados aos demais. Sugere-se que essas plantas teriam maiores chances de fragmentação do talo, o que possibilitaria um maior recrutamento nas populações naturais, contribuindo para a predominância de espécimes de coloração vermelha na natureza.

Apesar das diferenças observadas quanto ao número de ápices diferenciados, composição pigmentar, fertilidade e desempenho fotossintetizante, gametófitos femininos marrom-esverdeados, e os tetrasporófitos dos diferentes genótipos apresentaram taxas de crescimento semelhantes quando considerado todo o período experimental (14 dias), sendo esses valores inferiores aos observados para os gametófitos femininos de coloração vermelha. Esses resultados, possivelmente, decorreram da interação de diferentes fatores, como fertilidade, desempenho somático e fotossintetizante, os quais foram expressos em maior ou menor grau em função do genótipo do indivíduo. Essas características diversas, verificadas tanto entre as fases quanto entre as variantes pigmentares e os espécimes do tipo selvagem, contribuem para a diversidade de *G. caudata* e favorecem a manutenção da espécie, principalmente quando considerado o ambiente heterogêneo do médio-litoral onde são encontradas. Deve-se ressaltar que as condições laboratoriais divergem do ambiente natural, e as diferenças observadas poderiam ser acentuadas ou minimizadas, já que na natureza outros fatores bióticos e abióticos estariam atuando de forma sinérgica.

11. REFERÊNCIAS

Adams, J.; Hansche P. E. 1974. Population studies in microorganisms. I. Evolution of diploidy in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* 76:327–338.

Alveal K.; Romo H.; Werlinger C.; Oliveira E.C. 1977. Mass cultivation of the agar-producing alga *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta) from spores. *Aquaculture* 148: 77-83.

Araújo F.O.; Ursi S.; Plastino E.M. 2013. Intraspecific variation in *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): growth, pigment content, and photosynthesis. *Journal of Applied Phycology* DOI 10.1007/s10811-013-0184-3.

Araújo S.G.; Farias W.R.L.; Rodrigues J.A.G.; Torres V.M.; Pontes G.C. 2008. Administração oral dos polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Gracilaria caudata* na sobrevivência de pós-larvas de tilápia. *Revista Ciência Agronômica* 39: 548-554.

Armisen R.; Galatas F. 1987. Production, properties and uses of agar. In McHugh DJ, (ed.) Production and utilization of products from commercial seaweeds. *FAO Fisheries Technical Paper* 288:1-57 pp.

Aruga Y.; Miura A. 1984. In vivo absorption spectra and pigment contents of the two types of color mutants of *Porphyra*. *Journal of Applied Phycology* 32: 243-250.

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

Ayres-Ostrock L.M.; Plastino E.M. 2014b. Effects of UVB radiation on growth rates, pigment contents, and ultrastructure of red (wild types), greenish-brown, and green strains of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). *European Journal Phycology* 49:197-212.

Ayres-Ostrock L.M.; Mauger S.; Plastino E.M.; Oliveira M.C.; Valero M.; Destombe C. 2015. Development and characterization of microsatellite markers in two agarophyte species, *Gracilaria birdiae* and *Gracilaria caudata* (Gracilariaceae, Rhodophyta), using next-generation sequencing. *Journal of Applied Phycology* DOI 10.1007/s10811-015-0592-7.

Barufi J.B.; Figueroa F.L.; Plastino E.M. 2015. Effects of light quality on reproduction, growth, and pigment content of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). *Scientia Marina* 79:15-24.

Bellorin A. M. 2002. Sistemática e filogenia molecular de algas gracilarioides (Gracilariaceae, Rhodophyta). Tese do doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

Bird C.J.; McLachlan J.; Oliveira E.C. 1986. *Gracilaria chilensis* sp. nov. (Rhodophyta, Gigartinales), from Pacific South America. *Canadian Journal of Botany* 64: 2928-2934.

Bird C. J.; van der Meer J.P.; McLachlan J. 1982. A comment on *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. (Rhodophyta: Gigartinales). *Jounal Marine Biology* 62: 453-459.

Bird N.L.; McLachlan J.; Grund D. 1977. Studies on *Gracilaria*. 5 in vitro life history of *Gracilaria* sp. from the Maritime Provinces. *Canadian Journal of Botany* 55: 1282-1290.

Bixler H.J.; Porse H. 2011. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *Journal of Applied Phycology* 23:321335.

Bold H.C.; Wynne M.J. 1985. Introduction in the algae: structure and reproduction, 2nd edn. Prentice – Hall inc. Englewood Cliffs. NJ, 1-33 pp.

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

Carneiro M.A.A.; Marinho-Soriano E.; Plastino E.M. 2011. Phenology of an agarophyte *Gracilaria birdiae* Plastino and E.C. Oliveira (Gracilariales, Rhodophyta) in Northeastern Brazil. Brazilian Journal of Pharmacognosy 21(2): 317-322.

Cavalier-Smith T. 1978. Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA c-value paradox. *Journal of Cell Science* 34:247–278.

Chow F.; Capociama F.V.; Faria R.; Oliveira M.C. 2007. Characterization of nitrate reductase activity *in vitro* in *Gracilaria caudate* J. Agardh (Rhodophyta, Gracilariales). *Revista Brasileira de Botânica* 30: 123-129.

Costa E.S.; Plastino E.M.; Petti R.; Oliveira E.C.; Oliveira M.C. 2012. The Gracilariaceae Germplasm Bank of the University of São Paulo, Brazil—a DNA barcoding approach. *Journal of Applied Phycology* 24: 1643-1653.

Costa L.S.; Fidelis G.P.; Cordeiro S.L.; Oliveira R.M.; Sabry D.A.; Câmara R.B.G.; Nobre L.T.D.B.; Costa M.S.S.P.; Almeida-Lima J.; Farias E.H.C.; Leite E.L.; Rocha H.A.O. 2010. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 64: 21-28.

Costa R.F.; Salles M.C.T.; Matias L.G.O. 2011. Cultivando algas marinhas e valores para o desenvolvimento de uma comunidade costeira no municipio de Icapuí/CEC. *Caderno de Agroecologia* 6:1–5.

Costa V.L. 2000. Caracterização genética, reprodutiva e pigmentar de uma linhagem selvagem e duas variantes cromáticas de *Gracilaria* sp. (Gracilariales, Rhodophyta). Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Costa V.L.; Plastino E.M. 2001. Histórico de vida de espécimens selvagens e variantes cromáticas de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). *Revista Brasileira de Botânica* 24: 491-500.

Costa V.L.; Plastino E.M. 2011. Color inheritance and pigment characterization of red (wild-type), greenish-brown, and green strains of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 23: 599-605.

Critchley A.T. 1993. *Gracilaria* (Rhodophyta, Gracilariales): an economically important agarophyte. In Ohno M & Critchley AT (eds.). Seaweed Cultivation and Marine Rancing,: JICA. Yokosuka 89-112 pp.

Crow J.F.; Kimura M. 1965. Evolution in sexual and asexual populations. *The American Naturalist* Vol. XCIX, No. 909.

Cunha P.L.R.; Paula R.C.M.; Feitosa J.P.A. 2009. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. Química Nova 32:649-660.

Destombe C.; Valero M.; Vernet P.; Couvet D. 1989. What controls the haploid-diploid ratio in the red alga, Gracilaria verrucosa? *Journal of Evolutionary Biology* 2: 317–338.

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

Dixon P.S. 1961. The occurrence of tetrasporangia and carposporophytes on the same thallus *in Euthora cristata* (L. ex Turn.). *Canadian Journal of Botany* 39: 541-543.

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

Edelstein, T.; MacLachlan J. 1966. Cystocarps and tetrasporangia in the same thallus in *Membranoptera alata* and *Polysiphonia urceolata*. *Br. Phycol. Bull* 3: 185-187

Edelstein, T.; Bird C.J.; McLachlan J. 1974. Tetrasporangia and gametangia in the same thallus in the red algae *Cystocloniun purpureum* (Huds.) Batt and *chondria baileyana* (Mont.) Harv. *British Phycological Journal* 9: 247-250

Enríquez S.; Borowitzka M.A. 2010. The Use of the Fluorescence Signal in Studies of Seagrasses and Macroalgae. In Suggett, D. J., Borowitzka, M. A. & Prásil, O. (eds) Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications. Springer. 187-208.

Falcão V.R.; Tonon A.P.; Oliveira C.M.; Colepicolo P. 2008. RNA isolation method for polyssacharide rich algae: agar producing *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 20: 9-12.

Faria A.V.F.; Plastino E.M. 2016. Physiological assessment of the mariculture potential of a *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta) variant. *Journal of Applied Psychology* DOI 10.1007/s10811-015-0761-8.

Faria A.V.F.; Barufi J.B.; Plastino E.M. 2016. Ecotypes of Gracilaria caudata (Gracilariales, Rhodophyta): physiological and morphological approaches considering life history phases. *Journal of Applied Phycology* DOI 10.1007/s10811-016-1018-x.

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

Ferreira 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 Botânica* 29: 187-192.

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

Florêncio I.M.; Florentino E.R.; Silva F.L.H.; Fernandes V.S.; Cavalcanti M.T. 2012. Estudo da extração de ágar da macroalga *Gracilaria caudata* J. Agardh para utilização em fins alimentícios. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável* 7: 71-78.

Ford E.B. 1964. Ecological genetics. Methuen, London; John Wiley, New York. 335p.

Futuyma D.J. 1988. Evolutionary biology. 3ª ed. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.

Gantt E. 1990. Pigmentation and photoacclimation. In: Cole KM, Sheath RG (eds) Biology of the red algae. Cambridge University Press. Cambridge, 203-219 pp.

García-Sánchez M.J.; Fernández J.A.; Niell F.X. 1993. Biochemical and physiological responses of *Gracilaria tenuistipitata* under two different nitrogen treatments. *Physiol. Plant*. 88: 631-637.

Genty B.; Briantais J.; Baker N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica at Biophysica Acta* 990:87–92

Gerung G.S.; Ohno M. 1997. Growth rates of *Eucheuma denticulatum* (Burman) Collins et Harvey and *Kappaphycus striatum* (Schmitz) Doty under diferent conditions in warm waters of Southern Japan. *Journal of Applied Phycology* 9: 413–415

González M.A.; Montoya R.; Candia A. 1995. Organellar DNA restriction analysis of four morphotypes of *Gracilaria* from Lenga, VIIIth Region, Chile. *Biological Research* 28:177-184.

Guillemin M.L.; Faugeron S.; Destombe C.; Viard F.; Correa J.A.; Valero M. 2008. Genetic variation in wild and cultivated populations of the haploid– diploid red alga gracilaria chilensis: how farming practices favor asexual reproduction and heterozygosity. *Evolution* doi:10.1111/j.1558-5646.2008.00373.x.

Guillemin M.L.; Sepúlveda R.D.; Correa J.A.; Destombe C. 2013. Differential ecological responses to environmental stress in the life history phases of the isomorphic red alga *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 25:215-224.

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

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.

Guimarães M. 2000. Aspectos fisiológicos de *Gracilaria dominguensis* (Gracilariales, Rhodophyta): subsídio para a compreensão da manutenção do polimorfismo pigmentar. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo.

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 Phycology* 38: 165-169.

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

Guiry M.D. 1984. Structure, Life History and Hybridization of Atlantic Gigartina teedii (Rhodophyta) in Culture. *British Phycological Journal* 19:37-55

Guiry M.D.; Guiry G.M. 2016. AlgaeBase. Worldwide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: http://www.algaebase.org (último acesso em 04.01.17).

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

Hayashi L. 2007. Contribuição à maricultura da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii (Rhodophyta, Solieriaceae)* para a produção de carragenana. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo.

Hughes, J.S. & Otto, S.P. 1999. Ecology and evolution of biphasic life cycles. *The American Naturalist 154*: 306-320.

Innes D.J. 1984. Genetic differentiation among populations of marine algae. *Helgolander Meeresunters* 38:401-417.

Joly A.B.; Cordeiro M.; Mendonza M.L.; Yam A.; Ugadim Y. 1963. Additions to the marine flora of Brazil. *III. Boletim da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Sao Paulo, Serie Botânica* 20: 7-21.

Kain (Jones) J.M.; Destombe C. 1995. A review of the life history, reproduction and phenology of *Gracilaria*. *Journal of Applied Phycology* 7: 269-281.

Kennelly S.J. 1983. An experimental approach to the study of factors affecting algal colonization in a sublittoral kelp forest. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 68: 257–276.

Kromkamp J.C.; Forster R.M. 2003. Review - The use of variable fluorescence measurements in aquatic ecosystems: differences between multiple and single turnover measuring protocols and suggested terminology. *European Journal Phycology* 38: 103–112.

Kursar T.A.; van der Meer J.P.; Alberte R.S. 1983a. Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*. I. Biochemical analysis of pigment mutations. *Plant Physiology* 73: 353-360.

Levy I.; Friedlander M. 1990. Strain selection in *Gracilaria* spp. I. Growth, pigment and carbohydrates characterization of strains of *G. conferta* and *G. verrucosa* (Rhodophyta, Gigartinales). *Botanica Marina* 33: 339–45.

Lewis W.M.Jr. 1985. Nutrient scarcity as an evolutionary cause of haploidy. *The American Naturalist* vol 125 nº 5.

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.

Lyra G.M.; Costa E.S.; Jesus P.B.; Matos J.C.G.; Caires T.A.; Oliveira M.C.; Oliveira E.C.; Xi Z.; Nunes J.M.; Davis C.C. 2015. Phylogeny of gracilariaceae (rhodophyta): evidence from plastid and mitochondrial nucleotide sequences. *Journal of Phycology* 51, 356–366.

Mansilla A.; Rodriguez J.P.; Souza J.M.C.; Rosenfeld S.; Ojeda J.; Yokoya N.S. 2014. Growth responses to temperature, salinity and nutrient variations, and biomass variation and phenology of Ahnfeltia plicata (Rhodophyta, Ahnfeltiales): a commercially interesting agarophyte from the Magellanic Region, Chile. *Journal of Applied Phycology* 26:1133–1139

Marinho Soriano E.; Panucci R.A.; Carneiro M.A.A.; Pereira D.C. 2009. Evaluation of *Gracilaria caudata* J. Agardh for bioremediation of nutrients from shrimp farming wastewater. *Bio resource Technology*. 100: 6192-6198.

Martín L.A.; Zaixso A.L.B.; Leonardi P. 2011. Biomass variation and reproductive phenology of Gracilaria gracilis in a Patagonian natural bed (Chubut, Argentina). *Journal of Applied Phycology* 23: 643–654.

Martins A.P.; Junior O.N.; Colepicolo P.; Yokoya N.S. 2011. Effects of nitrate and phosphate availabilities on growth, photosynthesis and pigment and protein contents in colour strains of *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21(2): 340-348.

Macchiavello Saito J. R.; Garófalo G.; Oliveira E.C. 1999. A comparative analysis of agarans from commercial species of Gracilaria (Gracilariales, Rhodophyta) grown in vitro. *Hydrobiologia* 398/399 : 397 – 400.

Mc Hugh D.J. 2003. A guide to the seaweed industry. In FAO Fisheries Techinal Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome 441.

McLachlan J.; Edelstein T. 1977. Life history and culture of *Gracilaria foliifera* (Rhodophyta) from south Devon. *Journal of Marine Biology* 57: 577-586.

Miranda G.E.C.; Yokoya N.S.; Fujii M.T. 2012. Effects of temperature, salinity and irradiance on carposporeling development of Hidropuntia caudata (Gracilariales, Rhodophyta). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22(4): 818-824.

Miranda G.E.C.; Fujii M.T.; Yokoya N.S. 2008. Efeito da irradiância sobre o crescimento e Desenvolvimento de plântulas de *gracilaria caudata* (rhodophyta, gracilariales). *Anais do XII Congresso Brasileiro de Ficologia*. 283 pp.

Muñoz J.; Freile-Pelegrín Y.; Robledo D. 2004. Mariculture of *Kappaphyccus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) color strains in tropical waters of Yucatán, México. *Aquiculture* 239: 161-177

Navarro P. 2015. Presencia de variante verde de *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta) en la Región de Magallanes, Chile. *Revista de Biologia Marina y Oceanografia* vol. 50,S1:193-198.

Niwa K.; Furuita H.; Yamamoto T.; Kobiyama A. 2008. Identification and characterization of a green type mutant of *Phorpyra tenera* Kjellman var. *tamatsuensis* Miura (Bangiales/ Rhodophyta). *Aquaculture* 274: 126-131.

Norse E.A. 1993. Global Marine Biological Diversity: a Strategy for Building Conservation into Decision Making. Washington, DC: Island Press.

Ogata E.; Matsui T.; Nakamura H. 1972. The life cycle of *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyceae, Gigartinales) in vitro. *Phycologia* 11: 75-80.

Oliveira E.C. 1977. *Algas marinhas bentônicas do Brasil.* São Paulo, 407p. Tese (Livre-Docência), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

Oliveira E.C.; Alveal K.; Anderson R. 2000. Mariculture of the agar – producing Gracilarioid red algae. *Reviews in Fisheries Science.* 8: 345-378.

Oliveira E.C.; Plastino E.M. 1984. The life-history of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Brazil. *Japanese Journal of Phycology* 32: 203-208.

Oliveira E.C.; Plastino E.M. 1994. Gracilariaceae. In: by 1. Akatsuka (Ed) Biology of Economic Algae. SPB Academic Publishing, The Hague. 185-226 pp.

Oliveira, E.C. & Miranda, G.E.C. 1998. Aspectos sociais e econômicos da explotação de algas marinhas no Brasil. (Paula, E.J.; Cordeiro-Marinho, M.; Santos, D.P.; Plastino, E. M.; Fujii, M. T. & Yokoya,

N.S. eds) *Anais do IV Congresso Latino-americano, II Reunião Ibero-americana, VII Reunião Brasileira de Ficologia. Caxambu, MG. Sociedade Ficológica da América Latina e Caribe & Sociedade Brasileira de Ficologia:* pp 149-156.

Orduña-Rojas J.; Robledo D. 2002. Studies on the tropical agarophyte *Gracilaria cornea* J. Agardh (Rhodophyta, Gracilariales) from Yucatan, Mexico. II. Biomass assessment and reproductive phenology. *Botanica Marina* 45: 459–464.

Patwary M.U.; van der Meer J.P. 1982. Genetics of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae). VIII. Phenotypic and genetic characterization of some selected morphological mutants. *Canadian Journal of Botany* 60: 2556-2564.

Petti R.; Plastino E.M. 2012. Estudo comparativo de dois processos de esterilização de água do mar para preparação de meios de cultura de algas em laboratório. Anais do XIV Congresso Brasileiro de Ficologia. Acessado em 13 de setembro de 2013. Disponível em http://www.sbfic.org.br/cbfic2012/ocs-2.3.4/index.php/xivcbfic/congresso/paper/view/340

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. 1991. Cultivo in vitro, Estudos Reprodutivos e Biosistematica de Algas Gracilarióides (Rhodophyta, Gracilariales) de talo cilindrico. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Plastino E.M. 2004. Diversidade intraespecífica em algas gracilarióides. Tese de Livre-Docência. Universidade de São Paulo. São Paulo.

Plastino E.M.; Oliveira E.C. 1988. Deviations in the life-history of *Gracilaria* sp. (Rhodophyta, Gigartinales), from Coquimbo, Chile, under different culture conditions. *Hydrobiologia* 164: 6774.

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

Plastino E.M.; Guimarães M.; Matioli S.R.; 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.; Costa V.L. 2001. Anomalous plastids in a light green strain of the red macroalga *Gracilaria* sp. (Gracilariales). *Acta Microscópica* 3 (Sup. C): 315-316.

Plastino E.M.; Guimarães M. 2001. Diversidade intraespecífica. *In*: Alveal, K. & Antezana, T. (Eds.). Sustentabilidad de la biodiversidad, un problema actual. Bases cientifico-tecnicas, teorizaciones y proyecciones. Universidad de Concepción. Concepción 19-27pp.

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.

Platt T.; Gallegos C.L.; Harrison W.G. 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *Journal of Marine Research.* 38(4): 687-701

Polifrone M.; Gil-Rodríguez M.C.; Alvárez S.D.; Stroobant M.; Viera-Rodríguez M.A.; 2012. Reproductive phenology of three species of Gelidiales (Rhodophyta) in two macroalgal communities from Tenerife (Atlantic Ocean, Canary Islands, Spain). *Anales del Jardín Botánico de Madrid.* 69: 247-252.

Prathep A.; Lewmanomont K.; Buapet P. 2009. Effects of wave exposure on population and reproductive phenology of an algal turf, *Gelidium pusillum* (Gelidales, Rhodophyta), Songkhla, Thailand. *Aquat. Bot.* 90: 179–183.

Pueschel C.M.; van der Meer J.P. 1983. Ultrastructural characterization of a pigment mutant of the red algae *Palmaria palmata*. *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

Richie R. J. 2008. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica* 46 (1): 115-126, 2008

Robuchon M.; Couceiro L.; Peters A.F.; Destombe C.; Vaalero M. 2014. Examining the bank of microscopic stages in kelps using culturing and barcoding. *European Journal Phycology* 49(1): 128–133.

Roleda M.Y.; van de Poll W.H.; Hanelt D.; Wiencke C. 2004. 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.

Rueness J.; Mathisen H.A.; Tananger T. 1987. Culture and field observations on Gracilaria verrucosa (Huds.) Papenf. (Rhodophyta) from Norway. *Botanica Marina* 30: 267-276.

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.

Santelices B.; Correa J.A.; Meneses I.; Aedo D.; Varela D. 1996. Sporeling coalescence and intraclonal variation in *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 32: 313-322

Sinha R.P.; Lebert M.; Kumar A.; Kumar H.D.; Häder D.P. 1995. Spectroscopic and biochemical analyses of UV effects on phycobilisomes of *Anabaena sp*. and *Nostoc carmium*. Bot Acta 108:87-92.

Skriptsova A.V.; Nabivailo Y.V. 2009. Comparison of tree gracilarioids: growth rate, agar contente and quality. *Journal of Applied Phycology* 21: 443-450.

Stebbins, G.L. & Hill, G.J. 1980. Did the multicellular plants invade the land? *Am. Nat. 115*: 342-353.

Steentoft M.; Irvlne L.M.; FarnhamW.F. 1995. Two terete species of *Gracilaria* and *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta) in Britain. *Phycologia* 34: 113-127.

Suggett D.J.; Prásil O.; Borowitzka M.A. 2011. Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences. Springer.

Terada R.; Tsuyoshi A.; Kawaguchi S. 2010. Reproductive phenology of three species of *Gracilaria*: *G. blodgettii* Harvey, *G. vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss and *G. salicornia* (C. Agardh) Dawson (Gracilariales, Rhodophyta) from Okinawa, Ryukyu Islands, Japan. *Coastal Marine Science* 34(1): 129–134.

Tomaz A.C.A. 2012. Substâncias encontradas em algas rodofíceas do litoral paraibano e do mar Jônico – Grécia. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba.

Ugadim Y. 1975. Algas marinhas bentônicas do litoral do Estado de São Paulo e Estado do Paraná. III - Divisão Rhodophyta (2): Cryptonemiales, Gigartinales e Rhodymeniales. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 3: 115-164.

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

Ursi S.; Plastino E.M. 2001. Crescimento *in vitro* de linhagens de coloração vermelha e marrom-esverdeada 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. Intraespecific variation of fhotosynthesis, respiration and photoprotective carotenoids in *Gracilaria birdeae* (Gracilariales: Rhodophyta). *Marine Biology* 142: 997-1007.

Ursi S.; Costa V.L.; Hayashi L.; Pereira R.T.L.; Paula E.J.; Plastino E.M. 2013. Intraspecific variation in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): growth, and agar yield and quality of color strains under aquaculture. *Botanica Marina* 56:241–248.

Valero M.; Richerd S.; Perrot V.; Destombe C. 1992. Evolution of alternation of haploid and diploid phases in life cycles. *Tree* vol 7 nº 1.

van der Meer J.P. 1977. Genetics of *Gracilaria* sp. (Rhodophyceae, Gigartinales). II. The life history and genetic implications of cytokinetic failure during tetraspore formation. *Phycologia* 16: 367-71.

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. 1981a. The inheritance of spontaneous pigment mutations in *Chondrus crispus* Stacklh. (Rhodophyceae). *Proceedings of Natural Society Institute of Science* 31:187-192.

van der Meer J.P. 1981b. Genetics of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae). VII. Further observations and construction of polyploids. *Canadian Journal of Botany* 59: 787-792.

van der Meer J.P. 1986. Genetics of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophy- ceae). XI. Further characterization of a bisexual mutant. *Journal of Phycology* 22: 151-158.

van der Meer J.P. 1987. Marine algal genetics and genomes. *Hydrobiologia* 151/152: 49-56.

van der Meer J.P. 1990. Genetics. In: Cole KM, Sheath RG (eds) Biology of the red algae. Cambridge University Press. Cambridge, 103-122 pp.

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: 159-61.

van der Meer J.P.; Tood E.R. 1977. Genetics of *Gracilaria* sp. (Rhodophyceae, Gigartinales). IV. Mitotic recombination and its relationship to mixed phases in the life history. *Canadian Journal of Botany* 55: 2810-2817.

van der Meer J.P.; Patwary M.U.; Bird C.J. 1984. Genetics of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae). X. Studies on a bisexual clone. *Journal of Phycology* 20: 42-46.

Veeragurunathan V.; Prasad K.; Singh N.; Malarvizhi J.; Mandal S.K.; Mantri V.A. 2016. Growth and biochemical characterization of green and red strains of the tropical agarophytes *Gracilaria debilis* and *Gracilaria edulis* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*. DOI 10.1007/s10811-016-0898-0

White A.J.; Critchley C. 1999. Rapid light curves: a new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. *Photosynthesis Research* 59: 63-72.

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

Yokoya N.S.; Oliveira E.C. 1992a. Effects of salinity on the growth rate, morphology and water content of some Brazilian red algae of economic importance. *Ciências Marinas* 18: 49-64.

Yokoya N.S. & Oliveira E.C. 1992b. Temperature response of economically important red algae and their potential for mariculture in Brazilian Waters. *Journal of Applied Phycology* 4: 339-345.

Yokoya N.S.; Plastino E.M.; Artel R. 2003. Physiological responses and pigment characterization of two colour strains of the carrageenophyte *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). In: Chapman ARO, Anderson RJ, Vreeland VJ, Davison IR (eds) Proc 17th Int Seaweed Symp, Oxford University Press, New York, pp 425–433

Yokoya N.S.; 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.

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

Zhang X.; van der Meer J.P. 1988. A genetic study on *Gracilaria sjoestedtii*. *Canadian Journal of Botany* 66:2022–2026.