

FERNANDA RAMLOV

**Efeitos dos fitorreguladores e da irradiância no
crescimento e na morfogênese de morfos
pigmentares de *Gracilaria domingensis*
(Kützing) Sonder *ex* Dickie (Gracilariales,
Rhodophyta)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2007

FERNANDA RAMLOV

**Efeitos dos fitorreguladores e da irradiância no
crescimento e na morfogênese de morfos
pigmentares de *Gracilaria domingensis*
(Kützinger) Sonder *ex* Dickie (Gracilariales,
Rhodophyta)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica
da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título de
MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL
E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração
Plantas Avasculares e Fungos em Análises
Ambientais.

ORIENTADORA: Dra. NAIR SUMIE YOKOYA

Aos meus pais, Mara e Walmor com todo carinho.

Ao Anderson e ao Lucas com todo amor.

Tudo posso Naquele que me fortalece.

Filipensis 4,13

AGRADECIMENTOS

Ao término deste trabalho, gostaria de agradecer a colaboração de muitas pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram para a sua realização.

À Deus pelo Dom da Vida, pela força, proteção e pelas bênçãos concedidas em todos os momentos da minha vida.

À Dra. Nair Sumie Yokoya pelo carinho com que me recebeu, pela orientação, pelo incentivo, confiança, dedicação e especialmente pela amizade construída ao longo desses dois anos.

À Dra. Estela Maria Plastino por gentilmente ter cedido os gametófitos femininos dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis* utilizados no presente trabalho, pelo apoio e pelas valiosas sugestões.

À Profa. Msc. Valéria Cassano pela amizade e pelo auxílio nos cortes anatômicos.

Ao José Domingos pela dedicação e organização do Laboratório de Cultura de Algas “Marilza Cordeiro Marino”, da Seção de Ficologia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pelo auxílio financeiro sob forma de concessão de bolsa de mestrado através do programa de pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica de São Paulo.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo pela infra-estrutura oferecida e, em especial, a Seção de Ficologia pela disponibilização dos laboratórios, equipamentos e materiais fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários da pós-graduação do Instituto de Botânica, especialmente a Márcia Regina Ângelo (Marcinha) pelo carinho e bom atendimento.

Aos pesquisadores, funcionários, estagiários e alunos de pós-graduação da Seção de Ficologia pelo carinho com que me acolheram, pela agradável convivência, pelo apoio e pela amizade cultivada.

Aos amigos queridos do Laboratório de Cultura de Algas: Felipe Dassi, Fernanda Rios e Renata Surati pela amizade e ajuda em inúmeras ocasiões.

À Aline Paternostro Martins e Ana Carolina Saraiva Pena Coto pelo companheirismo, carinho e pela paciência que vocês tiveram comigo. Obrigada pela amizade tão sincera, pelas longas conversas, passeios e pela nova família que fiz (Simone, D. Cida, Ian e Manuela) quando estava morando em São Paulo.

Às queridas amigas Kátia, Samantha e Giseli que apesar da distância, se fizeram presentes durante este período me dando muito apoio e carinho. Adoro vocês!

Às amizades preciosas que fiz em São Paulo: Aline Cavalari, Andréa Araújo, Luciana da Silva Canêz, Luciane O. Crossetti, Patrícia Jungbluth e Priscila da Silva. Obrigada pela amizade, pela ajuda nos momentos difíceis, pelas “conversas terapêuticas” e por sempre me fazerem enxergar o lado BOM da vida!!

Aos amigos do Alojamento do Instituto de Botânica, que sempre tentam tornar a nossa estadia a mais agradável possível: Adriano Afonso Spielmann, Angélica Cristina Righetti da Rocha, Bárbara Medeiros Fonseca, Bárbara Melissa Oliveira Guido, Berta Lúcia Pereira Villagra, Denílson Fernandes Peralta, Diógina Barata, Eduardo Custódio Gasparino, Fernanda Ferrari, Fernanda Karstedt, Gisele Areia Nóbrega, Iane Paula Rego Cunha, Juçara Bordin, Kleber Renan de Souza Santos, Luciana da Silva Canêz, Luciana Jandelli Gimenes, Maria Isabel Tauil de Moura Guimarães, Milton Félix Nunes Martins, Priscila da Silva, Rafael Batista Louzada, Sandra Vieira Costa, Suzana M. A. Martins. Às amigas de quarto, Angélica Patrícia Pavezzi Barbero, Cristiane de Almeida Nascimento, Luciane O. Crossetti e Patrícia Jungbluth.

À família Moura, por todo apoio e carinho e em especial, a minha sogra D. Elisabeth Silva Moura por ter cuidado de mim, do meu pimpolhinho e da minha casa para que eu pudesse terminar este trabalho.

Ao meu maior tesouro, meus pais, Mara e Walmor e, meus queridos irmãos, Viviane, Walmorzinho e Renata pelo apoio e sustentação emocional sem os quais este trabalho não seria possível. Obrigada por estarem sempre presentes em minha vida, demonstrando acima de tudo, amor, carinho e compreensão nos momentos mais difíceis. Eu amo vocês.

Ao Anderson, por estar sempre ao meu lado, pelo carinho e a compreensão incondicionais, mesmo nos momentos mais críticos. Obrigada por ser esta pessoa maravilhosa. Eu te amo, infinitamente!

Ao Lucas, meu bem maior, simplesmente por ser meu!! Mamãe te ama muito.

ÍNDICE

RESUMO GERAL	VIII
ABSTRACT	X
INTRODUÇÃO GERAL	1
O GÊNERO <i>GRACILARIA</i> GREVILLE	1
A CULTURA DE TECIDOS EM MACROALGAS	3
FITORREGULADORES EM MACROALGAS	4
ESTRUTURA DOS CALOS EM RODOFÍCEAS	7
A LUZ.....	7
OBJETIVOS	10
OBJETIVO GERAL	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
METODOLOGIA GERAL DE CULTIVO	11
MATERIAL BIOLÓGICO.....	11
COLETA E ESTERILIZAÇÃO DA ÁGUA DO MAR	11
MEIO DE CULTURA	12
MANUTENÇÃO DAS CULTURAS UNIALGÁCEAS	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
CAPÍTULO 1. CRESCIMENTO E FORMAÇÃO DE CALOS EM MORFOS PIGMENTARES DE <i>GRACILARIA DOMINGENSIS</i> (KÜTZING) SONDER <i>EX</i> DICKIE (GRACILARIALES, RHODOPHYTA) CULTIVADOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁGAR	22
ABSTRACT	22
RESUMO	22
INTRODUÇÃO	24
MATERIAIS & MÉTODOS	25
CULTURAS UNIALGÁCEAS	25
TESTES PARA DETERMINAR UM PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE EXPLANTES AXÊNICOS	25
TESTE COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁGAR	26
ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	27
RESULTADOS	29
PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE EXPLANTES AXÊNICOS.....	29
EFEITOS DO ÁGAR NO CRESCIMENTO	30
EFEITOS DO ÁGAR NA FORMAÇÃO DE CALOS	32
EFEITOS DO ÁGAR NO CRESCIMENTO DOS CALOS	35
EFEITOS DO ÁGAR NO CRESCIMENTO DOS EXPLANTES – ANÁLISE DE VARIÂNCIA BIFATORIAL	36
EFEITOS DO ÁGAR NA FORMAÇÃO DE CALOS – ANÁLISE DE VARIÂNCIA BIFATORIAL.....	38
DISCUSSÃO	40
PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE EXPLANTES AXÊNICOS.....	40
EFEITOS DO ÁGAR NO CRESCIMENTO DO EXPLANTE E NA FORMAÇÃO E CRESCIMENTO DE CALOS.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

CAPÍTULO 2. INFLUÊNCIA DOS FITORREGULADORES E DA IRRADIÂNCIA NO CRESCIMENTO E NA MORFOGÊNESE EM MORFOS PIGMENTARES DE *GRACILARIA DOMINGENSIS* (KÜTZING) SONDER EX DICKIE (GRACILARIALES, RHODOPHYTA).. 47

ABSTRACT	47
RESUMO	47
INTRODUÇÃO.....	49
MATERIAIS & MÉTODOS.....	50
CULTURAS UNIALGÁCEAS	50
EFEITOS DOS FITORREGULADORES E DA IRRADIÂNCIA NO CRESCIMENTO DE EXPLANTES E NA FORMAÇÃO DE CALOS.....	50
EFEITOS DOS FITORREGULADORES E DA IRRADIÂNCIA NA REGENERAÇÃO DIRETA E INDIRETA	52
ESTUDOS ANATÔMICOS	52
ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	52
RESULTADOS.....	53
ANATOMIA DOS CALOS FORMADOS EM MORFOS PIGMENTARES DE <i>GRACILARIA DOMINGENSIS</i>	53
EFEITOS DOS FITORREGULADORES E DA IRRADIÂNCIA NO CRESCIMENTO DOS EXPLANTES	57
EFEITOS DOS FITORREGULADORES E DA IRRADIÂNCIA NA FORMAÇÃO E NO CRESCIMENTO DE CALOS.....	62
EFEITOS DOS FITORREGULADORES E DA IRRADIÂNCIA NO PROCESSO DE REGENERAÇÃO DIRETA	71
EFEITOS DOS FITORREGULADORES E DA IRRADIÂNCIA NO PROCESSO DE REGENERAÇÃO INDIRETA	75
EFEITOS DOS FITORREGULADORES E DA IRRADIÂNCIA NO CRESCIMENTO DOS EXPLANTES – ANÁLISE DE VARIÂNCIA BIFATORIAL.....	80
EFEITOS DOS FITORREGULADORES E DA IRRADIÂNCIA NA FORMAÇÃO DE CALOS – ANÁLISE DE VARIÂNCIA BIFATORIAL.....	81
EFEITOS DOS FITORREGULADORES E DA IRRADIÂNCIA NA FORMAÇÃO DE REGENERAÇÕES DIRETA E INDIRETA – ANÁLISE DE VARIÂNCIA BIFATORIAL	83
DISCUSSÃO	87
EFEITOS DOS FITORREGULADORES E DA IRRADIÂNCIA NO PROCESSO DE CRESCIMENTO	87
EFEITOS DOS FITORREGULADORES E DA IRRADIÂNCIA NOS PROCESSOS MORFOGENÉTICOS	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
DISCUSSÃO GERAL	96
CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

RESUMO GERAL

O papel dos reguladores de crescimento vegetal no desenvolvimento das macroalgas marinhas é pouco conhecido em comparação ao amplo conhecimento sobre os processos fisiológicos controlados por esses compostos em plantas vasculares. Os efeitos do ágar, dos fitorreguladores e da irradiância no crescimento e na morfogênese foram avaliados em culturas axênicas dos morfos verde (VD) e vermelho (VM) de *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder *ex* Dickie. Os efeitos de diferentes concentrações de ágar (zero a 1%) foram avaliados em meio ASP 12-NTA, sob irradiância de 50 - 80 $\mu\text{mol de fótons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Os efeitos dos fitorreguladores foram testados em segmentos apicais (SA) e intercalares (SI) dos dois tipos de morfos e foram cultivados em meio sólido ASP 12-NTA contendo 0,5% de ágar. Foram testadas duas auxinas [ácido indolil-3-acético (AIA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)] e duas citocininas [cinetina (K) e benzilaminopurina (BA)] em concentrações de 0,5 a 50,0 μM , sob dois níveis de irradiância (50,0 e 150,0 $\mu\text{mol de fótons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Os processos de regeneração direta (a partir de células do explante) e indireta (a partir de células do calo) foram induzidos com a transferência das culturas do meio sólido ASP 12-NTA para o meio líquido ASP 12-NTA, durante 4 semanas, e em seguida, para o meio líquido von Stosch (25%) por 3 semanas. Todos os experimentos foram realizados em temperatura de $22\pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 14 h, pH 8 e salinidade 30 ups. Os tratamentos foram testados com 3 repetições com 9 explantes em cada. Os resultados foram submetidos a análise de variância de um ou de dois fatores e ao teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

Explantes axênicos foram obtidos através do pré-tratamento por 48 h em solução de água do mar esterilizada contendo 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de nistatina e 1 $\text{ml}\cdot\text{L}^{-1}$ da solução antibiótica e antimicótica, seguida de uma lavagem com solução esterilizada de hipoclorito de sódio a 0,5% e 200 $\mu\text{l}\cdot\text{L}^{-1}$ de detergente por 20 segundos e três lavagens sucessivas em água do mar autoclavada. A presença de ágar no meio de cultura inibiu o crescimento de SA dos morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis*. Os tratamentos com ágar induziram a formação de três tipos de calos, denominados conforme a região do explante que originou o calo: calo apical, calo basal e calo intermediário, sendo que a presença de ágar foi essencial para a formação de calos apicais e intermediários em ambos os morfos. Ainda, a adição de ágar não influenciou o crescimento dos calos formados nos morfos estudados.

Em relação aos fitorreguladores, o crescimento de ambos os morfos foi inibido pelo 2,4-D, enquanto que o AIA promoveu o crescimento de SI dos morfos VD e VM quando cultivados sob a irradiância de $150 \mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As citocininas apresentaram efeito estimul\u00e1torio sobre o crescimento de ambos os morfos. A forma\u00e7\u00e3o de calos e o processo de regenera\u00e7\u00e3o indireta foram nulos, de maneira geral. Foi observado que os efeitos estimul\u00e1torios dos fitorreguladores ocorreram, em sua maioria, sob altos n\u00edveis de irradi\u00e2ncia, que foram necess\u00e1rios para promover a forma\u00e7\u00e3o de regenera\u00e7\u00f5es diretas e indiretas. Al\u00e9m disso, o morfo VM apresentou um desempenho superior em rela\u00e7\u00e3o ao morfo VD, o que indica que esse morfo pode ser mais adequado para a micropropaga\u00e7\u00e3o, tendo em vista o cultivo comercial de *Gracilaria domingensis*.

ABSTRACT

The role played by plant growth regulators on seaweed development is poorly known in comparison to the wide knowledge on physiological processes controlled by these compounds in vascular plants. Effects of agar, plant growth regulators and photon flux density on growth and morphogenesis were evaluated in axenic cultures of green (GR) and red (RE) morphs of *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder *ex* Dickie. Effects of agar concentrations (from zero to 1%) were tested in ASP 12-NTA medium, irradiance 50 - 80 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Effects of plant growth regulators were tested in apical (AS) and intercalary segments (IS) from both morphs cultured in ASP 12-NTA solid medium gelled with 0.5% agar. Two auxins [indole-3-acetic acid (IAA) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)] and two cytokinins [kinetin (K) and 6-benzylaminopurine (BA)] in concentrations ranging from 0.5 to 500 μM were tested under two light photon flux densities (50 and 150 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Processes of direct regeneration (from explant cells) and indirect regeneration (from callus cells) were induced by transferring the cultures from ASP 12-NTA solid medium to ASP 12-NTA liquid medium cultured for 4 weeks, and von Stosch medium (25%) for 3 weeks. Experiments were conducted under temperature of $22\pm 2^\circ\text{C}$, photoperiod of 14 h, pH 8, and salinity of 30 psu. Treatments were tested with 3 replicates with 9 explants in each. Data were submitted to analysis of variance of one or two factors, followed by Student-Newman-Keuls' test.

Axenic explants were obtained by treatment with sterilized seawater with 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ nystatin and 1 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ antibiotic and antimycotic solution for 48 h, followed by washing with a solution of sterile seawater with 0.5% of sodium hypochlorite and 200 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ of detergent for 20 seconds, and washings with autoclaved seawater

Growth of AS from both color morphs was inhibited by agar. Treatments with agar induced the formation of three types of callus, denominated in accordance with the region which gave rise to the callus: apical, basal, and intermediate calluses. The presence of agar was essential to the formation of intermediate and apical calluses. Callus growth was not influenced by agar concentration in both color morphs. In relation to the effects of phytohormones, growth of both morphs was inhibited by 2,4-D, while IAA promoted the growth of IS from GR and RE morphs cultured under 150 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Cytokinins stimulated the growth of both color morphs.

Plant growth regulators and irradiance did not have significant effects on callus formation and indirect regeneration. Stimulatory effects of plant growth regulators were observed in high irradiance levels, which promoted the formation of direct and indirect regenerations. Moreover, RE morph showed a higher performance than the GR morph, indicating that the RE morph could be more suitable for micropropagation, considering the commercial cultivation of *Gracilaria domingensis*.

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Gracilaria* Greville

Atualmente, as espécies do gênero *Gracilaria* Greville são responsáveis por cerca de 60% da produção mundial de ágar (Tseng 2001). Isto se deve principalmente às altas taxas de crescimento e fácil propagação vegetativa das espécies deste gênero, que favorecem o seu cultivo (Kain & Destombe 1995). Além disso, a descoberta de tratamentos alcalinos que possibilitam o melhoramento da qualidade de seu gel também torna atrativa a sua utilização (Critchley 1993, Murano 1995). Algumas espécies do gênero são utilizadas como biofiltros para tratamento de água e como fonte de alimento, principalmente em países asiáticos (De Casabianca *et al.* 1997).

No Brasil, segundo Nunes (2005) o gênero *Gracilaria* é representado por 21 espécies distribuídas desde o Estado do Ceará até o Rio Grande do Sul.

Um aspecto interessante nos estudos realizados com as espécies de *Gracilaria* é a ocorrência natural de variantes pigmentares. A ocorrência de variantes pigmentares na natureza foi referida para as seguintes espécies: *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira (Costa & Plastino 2001, Ursi & Plastino 2001), *Gracilaria chilensis* C.J. Bird, McLachlan & E.C. Oliveira (González *et al.* 1995), *Gracilaria conferta* (Schousboe *ex* Montagne) Montagne (Levy & Friedlander 1990), *Gracilaria domingensis* (Kützing) Sonder *ex* Dickie (Plastino *et al.* 1999) e *Gracilaria tikvahie* McLachlan (van der Meer & Bird 1977).

A herança de cor foi caracterizada para a maioria das variantes pigmentares de *Gracilaria*, podendo ser nuclear recessiva (van der Meer & Bird 1977, Zhang & van der Meer 1987, Plastino *et al.* 2004), nuclear codominante (van der Meer 1990, Plastino *et al.* 1999) ou citoplasmática (van der Meer 1978, 1979b).

A caracterização de variantes pigmentares de *Gracilaria* tem contemplado aspectos como: composição pigmentar (van der Meer & Bird 1977, van der Meer 1979a, Costa 2000, Guimarães 2000, Plastino *et al.* 2004), taxa de crescimento (van der Meer 1979a, Guimarães 2000, Ursi 2000, Ursi & Plastino 2001, Plastino *et al.* 2004), fotossíntese (Guimarães 2000); caracterização de polissacarídeos (Guimarães 2000), frequência em populações naturais (Guimarães *et al.* 2003), características morfo-anatômicas (Costa 2000), ultra-estrutura do cloroplasto (Guimarães & Plastino 1999, Plastino & Costa 2001) e sequenciamento dos genes das ficobiliproteínas (Sui *et al.* 2002).

Das espécies que ocorrem no Brasil, *Gracilaria domingensis* é amplamente distribuída no litoral brasileiro, ocorrendo desde o Estado do Maranhão até o litoral de Santa Catarina (Nunes 2005). Esta espécie é produtora de ágar, mas sua importância deve-se a sua utilização na dieta humana (comida *in natura*), sendo exportada principalmente para o Japão (Guimarães *et al.* 1999, Plastino *et al.* 1999). A espécie é caracterizada por apresentar fenótipos de cor vermelho (selvagem), verde e marrom. A herança de cor é determinada por um par de alelos, do tipo mendeliana de origem nuclear codominante, sendo o alelo que confere a cor verde codominante ao que confere a cor vermelha. Quando em heterozigose, eles expressam a cor marrom, observada apenas na fase tetrasporofítica (Plastino *et al.* 1999). Com relação à frequência nas populações naturais, as variantes pigmentares de *Gracilaria domingensis* podem ser denominadas morfos, já que os mesmos ocorrem em frequência igual ou superior a 1% (Guimarães *et al.* 2003).

O estudo realizado por Guimarães (2000) com morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* revelou que os morfos verde e vermelho apresentaram taxas de crescimento semelhantes e crescentes entre 20 e 150 $\mu\text{mol f\u00f3tons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, enquanto que o morfo verde apresentou maior taxa de crescimento em relação ao vermelho em 220 $\mu\text{mol f\u00f3tons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Em relação ao conteúdo pigmentar, o morfo vermelho apresentou maior conteúdo de clorofila *a* e ficoeritrina do que o morfo verde. A taxa fotossintética do morfo verde é maior quando comparada ao morfo vermelho nas irradiâncias de 10 a 2800 $\mu\text{mol f\u00f3tons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Não foi observada diferença entre a taxa fotossintética de ambos os morfos nas temperaturas de 16 a 34°C. A caracterização estrutural e o rendimento dos polissacarídeos 3/4-*O*-metil galactose, 3,6-anidrogactose, 6-*O*-metil galactose, 2-*O*-metil galactose, galactose e glucose dos morfos foi semelhante. O estudo de ultra-estrutura realizado por Guimarães & Plastino (1999) mostrou que o plasto de ambos os morfos são semelhantes estruturalmente, apesar de o morfo verde apresentar menores concentrações de ficoeritrina e um número maior de grãos de amido (Guimarães & Plastino 1999).

Com a maior demanda por ágar, o extrativismo de algas gracilarióides vem aumentando a cada ano, e uma avaliação realizada em 2000 revelou que 600 toneladas de *Gracilaria* spp. foram colhidas na região nordeste do litoral brasileiro para a extração de ágar (Oliveira *et al.* 2000). Assim, para evitar a redução drástica das populações de *Gracilaria* spp., o desenvolvimento de planos de manejo se faz necessário, visando desta forma, a preservação dessas populações (Oliveira & Miranda 1998). Uma alternativa seria o cultivo no mar, que permitiria a obtenção de matéria-prima sem a exploração direta dos bancos naturais (Accioly 2004). Com o principal objetivo de fornecer subsídios básicos para o cultivo, torna-

se importante o estudo com espécies nativas e a avaliação da diversidade intraespecífica para a seleção de linhagens com características de interesse.

A cultura de tecidos em macroalgas

Atualmente, a técnica de cultura *in vitro* tem sido aplicada visando à propagação clonal de plantas (Mercier 2004). A propagação clonal *in vitro*, também conhecida como micropropagação, tem como principal vantagem a produção, a partir de um indivíduo, de uma grande quantidade de plantas num espaço relativamente curto de tempo (Chawla 2002). Esta técnica amplamente utilizada para vegetais terrestres de interesse econômico, também pode ser aplicada às macroalgas marinhas, visando à seleção e propagação de linhagens com características desejadas e que possuam maior potencial econômico (Yokoya & Handro 1996, Huang & Fujita 1997a, Yokoya 2000).

Embora a técnica de cultura *in vitro* seja aplicada em plantas vasculares há muitos anos, os primeiros estudos com macroalgas foram publicados apenas no final da década de 70. O marco inicial foi o trabalho realizado por Chen & Taylor (1978) com *Chondrus crispus* Stackhouse (Rhodophyta). Estes autores cultivaram explantes da região medular do talo em condições axênicas, induzindo a diferenciação celular e a regeneração de plântulas. A partir deste trabalho, vários estudos foram realizados com os objetivos de se estabelecer protocolos para obtenção de explantes axênicos e de se conhecer fatores controladores da indução de calos e da regeneração de plântulas, principalmente em espécies de interesse econômico (Yokoya 1996). Porém, existem alguns fatores que podem influenciar a resposta do explante e até mesmo, dificultar o estabelecimento da cultura *in vitro*. Um dos principais problemas enfrentados é a obtenção de explantes axênicos, pois os protocolos de desinfestação acabam danificando e até inviabilizando os explantes (Evans & Trewavas 1991, Aguirre-Lipperheide *et al.* 1995). No entanto, a utilização de explantes axênicos é de extrema importância, já que a superfície do talo das macroalgas é coberta por microorganismos (Sieburth & Tootle 1981), que podem sintetizar fitorreguladores, influenciando a resposta do explante (Evans & Trewavas 1991, Bradley 1991).

Outro parâmetro importante para o estudo dos fitorreguladores é a composição do meio de cultura utilizado. Os meios de cultura que utilizam água do mar não são indicados para avaliar os efeitos dos fitorreguladores, pois a mesma pode conter substâncias promotoras do crescimento (Bradley 1991). Para o estudo dos fitorreguladores, é recomendável utilizar meios de composição química definida, conhecidos como meios sintéticos.

Fitorreguladores em macroalgas

Fitorreguladores (ou fitormônios, reguladores de crescimento vegetal ou hormônios vegetais) são substâncias de origem vegetal ou sintética que estimulam a divisão, o crescimento e a diferenciação celular, bem como outros processos celulares (Borém & Vieira 2005). Atualmente, a literatura relata o isolamento e a identificação de seis classes de fitorreguladores em macroalgas: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno e poliaminas (tabela 1).

Vários estudos têm evidenciado o efeito da aplicação exógena de fitorreguladores nas macroalgas marinhas, principalmente as auxinas e citocininas, e por serem as classes de hormônios selecionadas para o presente estudo, serão abordadas com mais detalhes.

Um dos primeiros trabalhos relacionados à aplicação exógena de fitorreguladores foi realizado por Davidson em 1950, que não observou efeito significativo das auxinas ácido indolil-3-acético (AIA), ácido indolilbutírico (IBA) e ácido naftalenoacético (ANA) sobre o crescimento de *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis e *Fucus evanescens* C. Agardh. Jacobs (1951) observou que a aplicação de AIA pode estimular a formação de rizóides em *Bryopsis plumosa* (Hudson) C. Agardh. O AIA promoveu o alongamento dos rizóides de *Acetabularia mediterranea* J.V. Lamouroux (Thimann & Beth 1959). O AIA também estimulou o alongamento de rizomas e a proliferação de frondes em *Caulerpa sertularioides* (S.G. Gmelin) M.A. Howe (Mishra & Kefford 1969) e em *Caulerpa prolifera* (Forsskål) J.V. Lamouroux (Dawes 1971). A presença de AIA estimulou o crescimento de *Codium fragile* subsp. *tomentosoides* (van Goor) P.C. Silva (Hanisak 1979), induziu o crescimento de rizóides e a regeneração de plântulas em culturas axênicas de *Fucus spiralis* L. (Fries 1984) e estimulou o crescimento de esporófitos jovens de *Laminaria japonica* J.E. Areschouq (Kai *et al.* 2006). A aplicação de vários tipos de auxinas [ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ANA, ácido 2,4 – diclorofenoxibutírico (2,4-DB), 2,4,5-T (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético) e outros] inibiram o crescimento de *Alaria esculenta* (L.) Greville (Buggeln 1976).

Tabela 1: Ocorrência de fitorreguladores nas macroalgas marinhas. ÁCIDO ABCSÍCICO (ABA= ácido abscísico), AUXINA (AIA= ácido indolil-3-acético), CITOCININAS (BA= benzilaminopurina, iP= isopenteniladenina, iPA= isopenteniladenosina, Z= zeatina), GIBERELINAS (GA₁, GA₂, GA₃, GA₄, GA₆, GA₇), POLIAMINAS (putrescina, espermidina, espermina).

Espécie	Substância	Referência
Rhodophyta		
<i>Gracilaria cornea</i> J. Agardh	putrescina, espermidina e espermina	Guzmán-Urióstegui <i>et al.</i> (2002)
<i>Hypnea musciformis</i> (Wulfen) J.V. Lamouroux	subst. semelhante à citocinina GA ₂ , GA ₃ , GA ₆ e GA ₇	Jennings (1969); Jennings & McComb (1967)
<i>Porphyra perforata</i> J. Agardh	AIA, iPA e Z	Zhang <i>et al.</i> (1991); Zhang <i>et al.</i> (1992)
Phaeophyta		
<i>Ascophyllum nodosum</i> (L.) Le Jolis	AIA, ABA	Mowat (1964); Sanderson <i>et al.</i> (1987); Kingman & Moore (1982)
<i>Ecklonia maxima</i> (Osbeck) Papenfuss	AIA, Z e derivados, iP e derivados e BA e derivados	Crouch <i>et al.</i> (1992); Stirk <i>et al.</i> (2004)
<i>Ecklonia radiata</i> (C. Agardh) J. Agardh	subst. semelhante à citocinina, GA ₃ , GA ₄ e GA ₇	Jennings & McComb (1967); Jennings (1968)
<i>Fucus serratus</i> L.	Z e derivados e iPA	Stirk & van Staden (1997)
<i>Fucus vesiculosus</i> L.	AIA, GA ₃ e GA ₁	Du Buy & Olson (1937); Radley (1961); Buggeln & Craigie (1971)
<i>Laminaria digitata</i> (Hudson) J.V. Lamouroux	subst. semelhante à citocinina	Hussain & Boney (1969)
<i>Laminaria japonica</i> J.E. Areschouq	derivados de Z e iPA	Duan <i>et al.</i> (1995)
<i>Laminaria</i> spp.	AIA	Mowat (1964)
<i>Macrocystis pyrifera</i> (L.) C. Agardh	AIA, Z e derivados, iP e iPA	de Nys <i>et al.</i> (1990); Stirk <i>et al.</i> (2004)
<i>Sargassum muticum</i> (Yendo) Fensholt	iPA e Z	Zhang <i>et al.</i> (1991)
<i>Undaria pinnatifida</i> (Harvey) Suringar	AIA	Abe <i>et al.</i> (1972)
Chlorophyta		
<i>Acetabularia mediterranea</i> J.V. Lamouroux	etileno	Van den Driessche <i>et al.</i> (1988)
<i>Caulerpa paspaloides</i> (Bory de Saint-Vincent) Greville	AIA	Jacobs <i>et al.</i> (1985); Jacobs (1993)
<i>Codium latum</i> Suringar	etileno	Watanabe & Kondo (1976)
<i>Ulva lactuca</i> L.	ABA	Tietz <i>et al.</i> (1989)
<i>Ulva intestinalis</i> L.	etileno	Pletnner <i>et al.</i> (2005)
<i>Valonia macrophysa</i> Kützing	subst. semelhante à auxina	van der Weij (1933)

A aplicação exógena de citocininas influenciou o crescimento e a morfogênese de diferentes espécies de macroalgas marinhas. A cinetina (K) promoveu o crescimento de *Ectocarpus fasciculatus* Harvey (Pedersén 1968) e de *Ecklonia* sp. e *Hypnea* sp. (Jennings 1969). Esta citocinina tem o papel na regulação dos processos morfogenéticos e de regeneração em *Fucus vesiculosus* L. (Borowczak *et al.* 1977), e promoveu o aumento nos níveis de proteínas e clorofila *a* em *Hypnea musciformis* (Jennings *et al.* 1972). O tratamento com K aumentou o número de ramos laterais de *Sphacelaria furcigera* Kützinger quando esta apresentava ausência de célula apical (Dworetzky *et al.* 1980). A zeatina (Z) e isopenteniladenina (iP) estimularam o crescimento e o aumento do diâmetro do talo de *Macrocystis pyrifera* (de Nys *et al.* 1991).

A aplicação de auxinas e/ou citocininas não apresentou efeito significativo na indução e crescimento de calos em várias espécies de rodofíceas (Polne-Fuller & Gibor 1987), como *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty (Reddy *et al.* 2003), *Gracilaria chilensis* (Collantes *et al.* 2004) e *Gelidiella acerosa* (Forsskål) Feldmann & Hamel (Kumar *et al.* 2004), assim como em algumas espécies de feofíceas (Fries 1980, Saga *et al.* 1982, Polne-Fuller e Gibor 1987). Por outro lado, estes fitorreguladores exerceram um efeito estimulatório na formação e crescimento de calos em *Furcellaria fastigiata* (Turner) J.V. Lamouroux, *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss, *Phyllophora nervosa* (A.P. de Candolle) Greville (Gusev *et al.* 1987), *Ecklonia radiata* (C. Agardh) J. Agardh (Lawlor *et al.* 1988), *Agardhiella subulata* (C. Agardh) Kraft & M.J. Wynne (Bradley & Cheney 1990), *Porphyra umbilicalis* (L.) Kützinger (Liu & Kloareg 1991) e *Kappaphycus alvarezii* (Muñoz *et al.* 2006). Em *Meristotheca papulosa* J. Agardh a combinação de AIA e benzilaminopurina (BA) não teve efeito significativo na taxa de indução de calos, mas estimulou o crescimento desta estrutura (Huang & Fujita 1997a). Huang & Fujita (1997b) demonstraram que AIA e BA foram eficientes para a indução de calos e regeneração de plântulas em um estudo realizado com 14 espécies de rodofíceas. O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) estimulou a taxa de indução de calos em *Grateloupia doryphora* (Montagne) M.A. Howe, enquanto que BA e K foram inibitórios (Garcia-Jimenez *et al.* 1998). Para *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss as auxinas e citocininas promoveram a formação de calos (Yokoya *et al.* 1999). Tratamentos com Z e ácido fenilacético promoveram a regeneração de plântulas a partir de calos em *Octhodes secundiramea* (Montagne) Howe (Maliakal *et al.* 2001). As auxinas (AIA e 2,4-D) e a cinetina estimularam a formação de calos e regeneração de plântulas de *Gracilaria perplexa* Byrne et Zuccarello e *Gracilaria tenuistipitata* Chang et Xia (Yokoya *et al.* 2004).

Em *Grateloupia dichotoma* J. Agardh, as auxinas inibiram a formação de ramos laterais enquanto que as citocininas promoveram a formação destas estruturas. Com relação

ao processo de regeneração, auxinas e citocininas em altas concentrações estimularam a regeneração (Yokoya & Handro 1996). Em *Gracilariopsis tenuifrons* (Bird et Oliveira) Fredericq et Hommersand foram observados resultados diferentes dependendo do tipo de explante e do fitorregulador (Yokoya 2000). As auxinas e/ou citocininas estimularam a formação de explantes filamentosos e influenciou a taxa de regeneração em *Solieria filiformis* (Kützing) Gabrielson (Yokoya & Handro 2002). Bravin (2005) observou que baixas concentrações de auxinas e citocininas induziram as maiores taxas de formação de calos e o crescimento de regenerações em *Hypnea musciformis*.

Estrutura dos calos em rodofíceas

Em rodofíceas, os calos podem se originar a partir das células da superfície seccionada do explante, na região apical ou, raramente, ao longo da superfície do talo, principalmente quando o talo encontra-se exposto ao ar (Polne-Fuller & Gibor 1987, Yokoya 2000, Yokoya *et al.* 2004). Entretanto, os calos podem também se desenvolver em meio líquido (Bradley & Cheney 1990, Collantes *et al.* 2004). As células responsáveis pela origem do calo são as células corticais e células medulares (Aguirre-Lipperheide *et al.* 1995) e os calos apresentam uma ampla variação de formas (tabela 2).

A Luz

A luz é um importante fator que controla o crescimento e o desenvolvimento das macroalgas marinhas, que podem utilizar a luz para basicamente dois processos: como fonte de energia para a fotossíntese e como fonte de informação, para a fotomorfogênese (McDonald 2003). Como fonte de informação, a luz é absorvida por um pigmento fotoquimicamente ativo, conhecido como fotorreceptor (Dring 1988, McDonald 2003). A maioria das respostas fotomorfogenéticas está relacionada ao fitocromo, e já há indícios de sua presença nas rodofíceas (Rüdiger & López-Figueroa 1992).

Tabela 2: Tipos de calos e informações sobre a sua origem em diferentes espécies de rodofíceas. C= compacto, D= massa celular desorganizada, E= esférico, F= filamentosos, G= globoso, I= irregular, O= oval.

Ordem	Espécie	Organização do talo do explante	Regiões de origem do calo	Tipos de calo	Referência
Gelidiales	<i>Gelidiella acerosa</i> (Forsskål) Feldmann & Hamel (Okamura) R.E. Norris	uniaxial	basal e apical	F	Kumar <i>et al.</i> (2004)
Gigartinales	<i>Chondracanthus tenellus</i> (Harvey) Hommersand	uniaxial	basal	E	Huang & Fujita (1997b)
	<i>Eucheuma uncinatum</i> Setchell & Gardner	uniaxial	basal	F	Polne-Fuller & Gibor (1987)
	<i>Hypnea musciformis</i> (Wulfen) J.V. Lamouroux	uniaxial	apical lateral basal	F G ou F F	Bravin <i>et al.</i> (2006)
	<i>Kappaphycus alvarezii</i> (Doty) Doty	multiaxial	basal, apical e intermediário	F	Reddy <i>et al.</i> (2003)
	<i>Meristotheca papulosa</i> J. Agardh	multiaxial	basal	E ou D	Huang & Fujita (1997b)
	<i>Solieria filiformis</i> (Kützinger) Gabrielson	multiaxial	apical	E	Robledo & Garcia-Reina (1993)
Gracilariales	<i>Gracilaria chilensis</i> Bird, McLachlan & Oliveira	multiaxial	basal e apical	C	Collantes <i>et al.</i> (2004)
	<i>Gracilaria perplexa</i> Byrne et Zuccarello	multiaxial	apical basal intermediário	O F D	Yokoya <i>et al.</i> (2004)
	<i>Gracilaria tenuistipitata</i> Chang et Xia	multiaxial	apical basal intermediário	O F D	Yokoya <i>et al.</i> (2004)
	<i>Gracilaria textorii</i> Hariot	multiaxial	basal	D	Huang & Fujita (1997b)
	<i>Gracilaria vermiculophylla</i> (Ohmi) Papenfuss	multiaxial	basal	F	Yokoya <i>et al.</i> (1999)
	<i>Gracilaria verrucosa</i> (Hudson) Papenfuss	multiaxial	basal	D	Kaczyna & Megnet (1993)
	<i>Gracilariopsis tenuifrons</i> (Bird et Oliveira) Fredericq et Hommersand	multiaxial	apical	E ou I	Yokoya (2000)

Continuação

Tabela 2: Tipos de calos e informações sobre a sua origem em diferentes espécies de rodofíceas. C= compacto, D= massa celular desorganizada, E= esférico, F= filamentosos, G= globoso, I= irregular, O= oval.

Ordem	Espécie	Organização do talo do explante	Regiões de origem do calo	Tipos de calo	Referência
Halymeniales	<i>Grateloupia acuminata</i> Holmes	multiaxial	basal	F	Huang & Fujita (1997b)
	<i>Grateloupia filicina</i> C. Agardh	multiaxial	basal	E ou D	Huang & Fujita (1997b)
	<i>Grateloupia imbricata</i> Holmes	multiaxial	basal	E ou D	Huang & Fujita (1997b)
	<i>Grateloupia turuturu</i> Yamada	multiaxial	basal	E ou D	Huang & Fujita (1997b)
	<i>Prionitis crispata</i> Kawaguchi	multiaxial	basal	E ou D	Huang & Fujita (1997b)

O conhecimento sobre os efeitos da irradiância na formação de calos e na regeneração a partir dos calos (regeneração indireta) é muito restrito. Em *Eckloniopsis radiosa* (Kjellmann) Okamura, o crescimento do calo foi maior em baixa irradiância (10-40 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), e a diferenciação em plântulas adventícias foi observada em alta irradiância (20-80 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (Notoya *et al.* 1994, Notoya 1997). Kirihara *et al.* (1997) observaram que a formação de calos em *Sargassum confusum* C. Agardh foi induzida por níveis de irradiância de 80 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

O fotoperíodo também tem influência sobre o desenvolvimento de calos. Explantes da região meristemática do talo e do estipe de *Ecklonia cava* Kjellman foram expostos a três diferentes ciclos de luz:escuro (24:0, 10:14 e 0:24 h). A presença de luz é essencial para o desenvolvimento de calos na região meristemática, uma vez que os calos não se desenvolveram no ciclo de 0:24 h (Kawashima & Tokuda 1990).

Em relação aos efeitos dos fitorreguladores e da irradiância, os estudos realizados evidenciam que a luz influencia os níveis e o metabolismo dos fitorreguladores (Tian & Reed 2001), e altera a sensibilidade celular ao fitorregulador (Evans 1984). Em *Grateloupia dichotoma*, o processo de regeneração não ocorre em calos cultivados na ausência de luz, apesar da presença de fitorreguladores (Yokoya & Handro 1996). Em baixa irradiância, a linhagem verde clara de *Hypnea musciformis* apresentou formação de calos em todos os tratamentos com auxinas e citocininas, enquanto que a linhagem marrom produziu calos somente em tratamentos com altas concentrações destes fitorreguladores (Yokoya *et al.* 2003).

Dentro deste contexto, a luz e os fitorreguladores apresentam um papel importante no controle do crescimento e dos mecanismos morfogênicos das algas. Desta forma, este trabalho visa à ampliação do conhecimento dos processos morfogênicos e o seu controle pelos fitorreguladores e pela luz em morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis*, contribuindo para o entendimento da variabilidade intraespecífica desta espécie. Ainda, com o crescente extrativismo dos bancos naturais de macroalgas de interesse econômico, a cultura de tecidos de macroalgas marinhas poderá subsidiar, futuramente, um “banco de sementes” visando à conservação de espécies ameaçadas pelo excesso de coletas.

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos dos fitorreguladores e da irradiância no crescimento e na morfogênese dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta).

Objetivos Específicos

- Estabelecer um protocolo para obtenção de explantes axênicos de *Gracilaria domingensis*;
- Avaliar o efeito da concentração de ágar no crescimento e na morfogênese dos dois morfos;
- Avaliar os efeitos de diferentes concentrações de fitorreguladores: ácido indolil-3-acético (AIA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), cinetina (K) e benzilaminopurina (BA) sob dois diferentes níveis de irradiância (50,0 e 150,0 $\mu\text{mol de fótons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) no crescimento e na morfogênese de segmentos apicais e intercalares dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis*.

Metodologia geral de cultivo

Neste item, serão descritos os métodos gerais de cultivo das algas utilizadas nos experimentos descritos nos próximos capítulos. A metodologia específica utilizada para cada experimento será descrita dentro do item Materiais e Métodos de cada capítulo.

Material biológico

O material biológico utilizado nos experimentos foram gametófitos femininos dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis* provenientes do Banco de Germoplasma de Algas Gracilarióides do Laboratório de Algas Marinhas “Édison José de Paula” do Instituto de Biociências (LAM) da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, que foram gentilmente cedidos pela Prof.^a Dra. Estela Maria Plastino. Os indivíduos verdes receberam os números 124, 125 e 126 do banco de germoplasma e os indivíduos vermelhos receberam os números 127, 128 e 129. Estes indivíduos são derivados de espécimes coletados na Praia do Pacheco, município de Caucaia no Estado do Ceará, em 1993, e estão em cultivo no laboratório por várias gerações.

Esta espécie apresenta aproximadamente 35 cm de comprimento (figura 1), onde a porção basal é subcilíndrica e os ramos principais achatados ou em forma de fita; a ramificação é subdicotômica. Os ramos são bem desenvolvidos, apresentando de 1-3 camadas de células corticais, 1-2 camadas de células subcorticais, 4-6 camadas de células medulares e pequenas células por entre as células medulares (Oliveira *et al.* 1983). O histórico de vida desta espécie é do tipo “Polysiphonia”, apresentando duas fases diplóides (carposporófito e tetrasporófito) e uma fase haplóide (gametófito) (Plastino *et al.* 1999).

Coleta e esterilização da água do mar

A água do mar foi coletada na Praia do Lamberto, pelo sistema de captação da Base Norte do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, em Ubatuba (SP). A água do mar apresentou salinidade de 30-32 ups e pH 8,0.

No laboratório, a água do mar foi filtrada em membrana Millipore AP 20 e aquecida em banho-maria durante 60 minutos, contados a partir do momento da fervura. Posteriormente, a água do mar foi deixada esfriar até atingir a temperatura ambiente e submetida ao banho-maria por mais 60 minutos. A água do mar submetida a tal processo será referida neste trabalho como água do mar esterilizada.



Figura 1: Aspecto geral do talo (gametófito feminino) de *Gracilaria domingensis*. Escala: 1 cm.

Meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi água do mar esterilizada enriquecida com a solução de von Stosch preparada segundo Edwards (1970) com modificações segundo Yokoya (1996) - redução de 50% nas concentrações de tiamina HCl, biotina e cianocobalamina (tabela 3). O enriquecimento foi feito em concentrações de 2 ml da solução de von Stosch (25%) por litro de água do mar esterilizada.

Manutenção das culturas unialgáceas

As culturas unialgáceas foram cultivadas com água do mar esterilizada enriquecida com a solução de von Stosch a 25% durante todo o período de cultivo. A troca do meio de cultura foi realizada semanalmente. Foram utilizados frascos com boca larga (6 x 8 cm – diâmetro x altura, volume de 100 ml). Estes frascos foram fechados com filme de PVC transparente. Toda a vidraria utilizada foi autoclavada a 121°C durante 30 minutos e os instrumentos utilizados no manuseio das algas foram esterilizados em etanol 70% e flambados.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, os morfos estudados foram cultivados na sala de cultura do Laboratório de Cultura de Algas “Marilza Cordeiro Marino” da Seção de Ficologia do Instituto de Botânica nas seguintes condições: temperatura média de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 14 h, irradiância de 50 a 80 $\mu\text{mol de fótons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes “luz do dia” (Philips 40 W), dispostas horizontalmente acima dos frascos de cultura. A irradiância foi mensurada com um sensor plano, modelo Li-COR 192, conectado a um medidor de quanta Li-COR, modelo LI-185.

Tabela 3: Composição química da solução de nutrientes de von Stosch preparada segundo Edwards (1970), com modificações segundo Yokoya (1996)

Componentes	Concentração para um litro de meio
NaNO ₃	0,50 mM
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	30 μM
FeSO ₄ .7H ₂ O	1 μM
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,1 μM
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	10 μM
Tiamina.HCl	0,59 μM *
Biotina	4,10 nM *
Cianocobalamina	1,0 nM *

* Concentração equivalente a 50% em relação à composição original proposta por Edwards (1970)

Referências bibliográficas

- Abe, H., Uchiyama, M. & Sato, R.** 1972. Isolation and identification of native auxins in marine algae. *Agricultural and Biological Chemistry* 26: 2259-2260.
- Accioly, M.C.** 2004. Desenvolvimento da maricultura artesanal de macroalgas no Baixo-Sul Baiano. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 120p.
- Aguirre-Lipperheide, M., Estrada-Rodríguez, F.J. & Evans, L.V.** 1995. Facts, problems and needs in seaweeds tissue culture: an appraisal. *Journal of Phycology* 31: 677-688.
- Borém, A. & Vieira, M.L.C.** 2005. Glossário de Biotecnologia. Editora Folha de Viçosa, Viçosa, 183 p.
- Borowczak, E., Kentzer, T. & Potulska-Klein, B.** 1977. Effect of gibberellin and kinetin on the regeneration ability of *Fucus vesiculosus*. *Biologia Plantarum* 19: 405-412.
- Bradley, P.M.** 1991. Plant hormones do have a role in controlling growth and development of algae. *Journal of Phycology* 27: 317-321.

- Bradley, P.M. & Cheney, D.P.** 1990. Some effects of plant regulators on tissue cultures of the marine red alga *Agardhiella subulata* (Gigartinales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 204/205: 353-360.
- Bravin, I.C.** 2005. Micropropagação e potencial biotecnológico de *Hypnea musciformis* (Gigartinales – Rhodophyta). Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 148 p.
- Bravin, I.C., Valentin, Y.Y. & Yokoya, N.S.** 2006. Formação de calos e regeneração de segmentos apicais de *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Gigartinales, Rhodophyta): obtenção de culturas axênicas e efeitos de diferentes concentrações de ágar. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 175-182.
- Buggeln, R.G.** 1976. Auxin, an endogenous regulator of growth in algae? *Journal of Phycology* 12: 355-358.
- Buggeln, R.G. & Craigie, J.S.** 1971. Evaluation of evidence for the presence of indole-3-acetic acid in marine alga. *Planta* 73: 173-178.
- Chawla, H.C.** 2002. *Introduction to Plant Biotechnology*. 2 ed. Science Publishers, Enfield, 528 p.
- Chen, L.C.M. & Taylor, A.R.A.** 1978. Medullary tissue culture of the red alga *Chondrus crispus*. *Canadian Journal of Botany* 56: 883-886.
- Collantes, G., Melo, C. & Candia, A.** 2004. Micropropagation by explants of *Gracilaria chilensis* Bird, McLachlan and Oliveira. *Journal of Applied Phycology* 16: 203-213.
- 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, 79 p.
- Costa, V.L. & Plastino, E.M.** 2001. Histórico de vida de espécimens selvagens e variantes cromáticas de *Gracilaria* sp. (Gracilariales, Rhodophyta). *Revista Brasileira de Botânica* 24: 491-500.
- Critchley, A.T.** 1993. *Gracilaria* (Rhodophyta, Gracilariales): an economically important agarophyte. In: M. Ohno & A.T. Critchley (eds.). *Seaweed cultivation and marine ranching*. JICA, Japão, pp. 89-112.
- Crouch, I.J., Smith, M.T., Van Staden, J., Lewis, M.J. & Hoad, G.V.** 1992. Identification of auxins in a commercial seaweed extract. *Journal of Plant Physiology* 139: 590-594.
- Davidson, F.F.** 1950. The effect of auxins on the growth of marine algae. *American Journal of Botany* 37: 502-510.
- Dawes, C.J.** 1971. Indole-3-acetic acid in the green algal coenocyte *Caulerpa prolifera* (Chlorophyceae, Siphonales). *Phycologia* 10 (4): 375-379.
- De Casabianca, M.L., Marinho-Soriano, E. & Laugier, T.** 1997. Growth of *Gracilaria bursa-pastoris* in a mediterranean Lagoon:Thau, France. *Botanica Marina* 40: 29-37.

- Dworetzky, B., Klein, R.M. & Cook, P.W.** 1980. Effect of growth substances on “apical dominance” in *Sphacelaria furcigera* (Phaeophyta). *Journal of Phycology* 16: 239-242.
- de Nys, R., Jameson, P.E. & Brown, M.T.** 1991. The influence of cytokinins on the growth of *Macrocystis pyrifera*. *Botanica Marina* 34: 465-467.
- de Nys, R., Jameson, P.E., Chin, N., Brown, M.T. & Sanderson, K.J.** 1990. The cytokinins as endogenous growth regulators in *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Ag. (Phaeophyceae). *Botanica Marina* 33: 467-475.
- Dring, M.J.** 1988. Photocontrol of development in algae. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39: 157-174.
- Duan, D., Liu, X., Pan, F., Liu, H., Chen, N. & Fei, X.** 1995. Extraction and identification of cytokinin from *Laminaria japonica* Aresch. *Botanica Marina* 38: 409-412.
- Du Buy, H.G. & Olson, R.A.** 1937. The presence of growth regulators during early development of *Fucus*. *American Journal of Botany* 24: 609-611.
- Edwards, P.** 1970. Illustrated guide to the seaweeds and seagrass in the vicinity of Porto Aransas, Texas. *Contribution of Marine Sciences Austin* 15: 1-228.
- Evans, M.L.** 1984. Functions of hormones at the cellular level of organization. *In*: T.K. Scott (ed.). *Encyclopedia of Plant Physiology*. v. 10. Springer-Verlag, Berlin, pp. 23-80.
- Evans, L.V. & Trewavas, A.J.** 1991. Is algal development controlled by plant growth substances? *Journal of Phycology* 27: 322-326.
- Fries, L.** 1984. Induction of plantlets in axenically cultivated rhizoids of *Fucus spiralis*. *Canadian Journal of Botany* 62: 1616-1620.
- Garcia-Jimenez, P., Rodrigo, M. & Robaina, R.R.** 1998. Influence of plant growth regulators, polyamines and glycerol on growth and morphogenesis of carposporelings of *Grateloupia* cultured *in vitro*. *Journal of Applied Phycology* 10: 95-100.
- González, M.A.; Montoya, R. & Candy, A.** 1995. Organellar DNA restriction analysis of four morphotypes of *Gracilaria* from Lengua, VIIIth Region, Chile. *Biological Research* 28: 177-184.
- Guimarães, M.** 2000. Aspectos fisiológicos de *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta): subsídios para a compreensão da manutenção do polimorfismo pigmentar. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 89 p.
- Guimarães, M. & Plastino, E.M.** 1999. Plastid organization of color variants of the red macroalga *Gracilaria domingensis* (Gracilariales). *Acta Microscopica* 8: 795-796.
- Guimarães, M., Plastino, E.M. & Oliveira, E.C.** 1999. Life history, reproduction and growth of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. *Botanica Marina* 42: 481-486.

- Guimarães, M., Plastino, E.M. & Destombe, C.** 2003. Green mutant frequency in natural populations of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. *European Journal of Phycology* 38: 165-169.
- Gusev, M.V., Tambiev, A.H., Kikova, N.N., Shelyastina, N.N. & Aslanyan, R.R.** 1987. Callus formation in seven species of ágarophyte marine algae. *Marine Biology* 95: 593-597.
- Guzmán-Urióstegui, A., García-Jiménez, P., Marián, F., Robledo, D. & Robaina, R.** 2002. Polyamines influence maturation in reproductive structures of *Gracilaria cornea* (Gracilariales, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 38: 1169-1175.
- Hanisak, M.D.** 1979. Effect of indole-3-acetic acid on growth of *Codium fragile* subsp. *tomentosoides* (Chlorophyceae) in culture. *Journal of Phycology* 15: 124-127.
- Huang, W. & Fujita, Y.** 1997a. Callus induction and thallus regeneration of the red alga *Meristotheca papulosa* (Rhodophyta, Gigartinales). *Botanica Marina* 40: 55-61.
- Huang, W. & Fujita, Y.** 1997b. Callus induction and thallus regeneration in some species of red algae. *Phycological Research* 45: 105-111.
- Hussain, A. & Boney, A.D.** 1969. Isolation of kinin-like substances in *Laminaria digitata*. *Nature* 223: 504-505.
- Jacobs, W.M.P.** 1951. Studies on cell-differentiation: the role of auxin in algae, with particular reference to rhizoid formation in *Bryopsis*. *The Biological Bulletin* 101: 300-306.
- Jacobs, W.M.P.** 1993. A search for some angiosperm hormones and their metabolites in *Caulerpa paspaloides* (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 29: 595-600.
- Jacobs, W.M.P., Falkenstein, K. & Hamilton, R.H.** 1985. Nature and amount of auxin in algae: IAA from extracts of *Caulerpa paspaloides* (Siphonales). *Plant Physiology* 78: 844-848.
- Jennings, R.C.** 1968. Gibberelins as endogenous growth regulators in green and brown algae. *Planta* 80: 34-42.
- Jennings, R.C.** 1969. Cytokinins as endogenous growth regulator in the alga *Ecklonia* (Phaeophyta) and *Hypnea* (Rhodophyta). *Australian Journal of Biological Sciences* 22: 621-627.
- Jennings, R.C., Broughton, W.J. & McComb, A.J.** 1972. Effect of kinetin on the phycoerythrin and chlorophyll content of a red alga. *Phytochemistry* 11: 1937-1943.
- Jennings, R.C. & McComb, A.J.** 1967. Gibberelins in the red alga *Hypnea musciformis* (Wulf.) Lamour. *Nature* 215: 872-873.
- Kaczyna, F. & Megnet, R.** 1993. The effects of glycerol and plant growth regulators on *Gracilaria verrucosa* (Gigartinales, Rhodophyceae). *Hydrobiologia* 268: 57-64.

- Kai, T., Nimura, K., Yasui, H. & Mizuta, H.** 2006. Regulation of sorus formation by auxin in Laminariales sporophyte. *Journal of Applied Phycology* 18: 95-101.
- Kain, J.M. & Destombe, C.** 1995. A review of the life history, reproduction and phenology of *Gracilaria*. *Journal of Applied Phycology* 7: 269-281.
- Kawashima, Y. & Tokuda, H.** 1990. Callus formation in *Ecklonia cava* Kjellman (Laminariales, Phaeophyta). *Hydrobiologia* 204/205: 375-380.
- Kingman, A.R. & Moore, J.** 1982. Isolation, purification and quantitation of several growth regulating substances in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyta). *Botanica Marina* 25: 149-153.
- Kirihara, S., Fujikawa, Y. & Notoya, M.** 1997. Axenic tissue culture of *Sargassum confusum* C. Agardh (Phaeophyta) as a source of seeds for artificial marine forests. *Journal of Marine Biotechnology* 5: 142-146.
- Kumar, G.R., Reddy, C.R.K., Ganesan, M., Thirupathi, S., Dipakkore, S., Eswaran, K., Subba Rao, P.V. & Jha, B.** 2004. Tissue culture and regeneration of thallus from callus of *Gelidiella acerosa* (Gelidiales, Rhodophyta). *Phycologia* 43 (5): 596-602.
- Lawlor, H.J., McComb, J.A. & Borowitzka, M.A.** 1988. The development of filamentous and callus-like growth in axenic tissue culture of *Ecklonia radiata*. In: T. Standler, M.C.V. Moillon, Y. Karamanos, H. Morvan & D. Christiaen (eds.). *Algal Biotechnology*. Elsevier Applied Science, London, pp. 139-150.
- Levy, I. & Friedlander, M.** 1990. Strain selection in *Gracilaria* spp. 1. Growth, pigment, and carbohydrates of strains of *G. conferta* and *G. verrucosa* (Rhodophyta, Gigartinales). *Botanica Marina* 33: 339-345.
- Liu, X.W. & Kloareg, B.** 1991. Tissue culture of *Porphyra umbilicalis* (Bangiales, Rhodophyta). I. The effects of plant hormones on callus induction from tissue explants. *CR Academic Paris Serie III* 321: 517-522.
- Maliakal, S., Cheney, C. & Rorrer, G.** 2001. Halogenated monoterpene production in regenerated plantlet cultures of *Ochtodes secundiramea* (Rhodophyta, Cryptonemiales). *Journal of Phycology* 37: 1010-1019.
- McDonald, M.S.** 2003. *Photobiology of Higher Plants*. John Wiley & Sons, Nova York, 368p.
- Mercier, H.** 2004. Estudos em Bromeliaceae: desenvolvimento e metabolismo do nitrogênio. Tese de Livre-Docência, Universidade de São Paulo, São Paulo, 48 p.
- Mishra, A.E. & Kefford, N.D.** 1969. Developmental studies on the coenocytic alga *Caulerpa sertularioides*. *Journal of Phycology* 5: 103-109.
- Mowat, J.A.** 1964. A survey of results on the occurrence of auxins and gibberellins in algae. *Botanica Marina* 8 (1): 149-155.

- Muñoz, J., Cahue-López, A.C., Patiño, R. & Robledo, D.** 2006. Use of plant growth regulators in micropropagation of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) in airlift bioreactors. *Journal of Applied Phycology* 18: 209-218.
- Murano, E.** 1995. Chemical structure and quality of ágars from *Gracilaria*. *Journal of Applied Phycology* 7: 245-254.
- Notoya, M.** 1997. Chloroplast changes and differentiation of callus cells in *Eckloniopsis radicata* (Kjellman) Okamura (Phaeophyta, Laminariales). *Journal of Applied Phycology* 9: 175-178.
- Notoya, M., Nagashima, M. & Aruga, Y.** 1994. Influence of light intensity and temperature on callus development in young sporophytes of three species of Laminariales (Phaeophyta). *Journal of Marine Biotechnology* 2: 2-15.
- Nunes, J.M.C.** 2005. Rodofíceas marinhas bentônicas do Estado da Bahia, Brasil. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 410p.
- Oliveira, E.C., Alveal, K., Anderson, R.** 2000. Mariculture of ágar-producing gracilarioid red algae. *Reviews in Fisheries Science* 8: 345-378.
- Oliveira, E.C., Bird, C.J. & McLachlan, J.** 1983. The genus *Gracilaria* (Rhodophyta, Gigartinales) in the Western Atlantic. *Gracilaria domingensis* Sond. ex Kütz., *G. cervicornis* (Turn.) J. Ag. and *G. ferox* J. Ag. *Canadian Journal of Botany* 61: 2999-3008.
- Oliveira, E.C. & Miranda, G.E.C.** 1998. Aspectos sociais e econômicos da exploração de algas marinhas no Brasil. In: E.J. Paula, M. Cordeiro-Marino, D.P. Santos, E.M. Plastino, M.T. Fujii, N.S. Yokoya (eds.). *Anais do Congresso Latino Americano de Ficologia, II Reunião Ibero-americana, VII Reunião Brasileira de Ficologia*. vol. 2. Sociedade Ficológica da América Latina e Caribe e Sociedade Brasileira de Ficologia, São Paulo, p. 149-156.
- Pedersén, M.** 1968. *Ectocarpus fasciculatus*: marine brown alga requiring kinetin. *Nature* 218: 776.
- Plastino, E.M. & Costa, V.L.** 2001. Anomalous plastids in a light green strain of the red macroalgae *Gracilaria* sp. *Acta Microscopica* 3: 315-316.
- 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.; Ursi, S. & Fujii, M.T.** 2004. Color inheritance, pigment characterization, and growth of a rare light green strain of *Gracilaria birdae* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycological Research* 52: 45-52.
- Plettner, I., Steinke, M. & Malim, G.** 2005. Ethene (ethylene) production in the marine macroalga *Ulva (Enteromorpha) intestinalis* L. (Chlorophyta, Ulvophyceae): effects of light-stress and co-production with dimethyl sulphide. *Plant, Cell and Environment* 28: 1136-1145.

- Polne-Fuller, M. & Gibor, A.** 1987. Calluses and callus-like growth in seaweeds: induction and culture. *Hydrobiologia* 151/152: 131-138.
- Radley, M.** 1961. Gibberellin-like substances in plants: leguminous root nodules. *Nature* 191: 684-685.
- Reddy, C.R.K., Kumar, G.R.K., Siddhanta, A.K. & Tewari, A.** 2003. *In vitro* somatic embryogenesis and regeneration of somatic embryos from pigmented callus of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty (Rhodophyta, Gigartinales). *Journal of Phycology* 39: 610-616.
- Robledo, D.R. & Garcia-Reina, G.** 1993. Apical callus formation in *Solieria filiformis* (Gigartinales, Rhodophyta) cultured in tanks. *Hydrobiologia* 260/261: 401-406.
- Rüdiger, W. & López-Figueroa, F.** 1992. Photoreceptors in algae. *Photochemistry and Photobiology* 55: 949-954.
- Saga, N., Motomura, T. & Sakai, Y.** 1982. Induction of callus from the marine brown alga *Dictyosiphon foeniculaceus*. *Plant and Cell Physiology* 23: 727-730.
- Sanderson, J.J., Jameson, P.E. & Zabkiewicz, J.A.** 1987. Auxin in a seaweed extract: identification and quantification of indole-3-acetic acid by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Plant Physiology* 129: 363-367.
- Sieburth, J.M.N. & Tootle, J.** 1981. Seasonality of microbial fouling an *Ascophyllum nodosum* (L.) Lejol, *Fucus vesiculosus* L., *Polysiphonia lanosa* (L.) Tandy and *Chondrus crispus* Stackh. *Journal of Phycology* 17: 57-64.
- Stirk, W.A., Arthur, G.D., Lourens, A.F.; Novák, O., Strnad, M. & Van Staden, J.** 2004. Changes in cytokinin and auxin concentrations in seaweed concentrates when stored at an elevated temperature. *Journal of Applied Phycology* 16: 31-39.
- Stirk, W.A. & van Staden, J.** 1997. Isolation and identification of cytokinins in a new commercial seaweed product made from *Fucus serratus* L. *Journal of Applied Phycology* 9: 327-330.
- Sui, Z., Zhang, X. & Cheng, X.** 2002. Comparison of phycobiliproteins from *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) and its pigment mutants in spectral and molecular respects. *Acta Botanica Sin-ica* 44: 557-561.
- Tian, Q. & Reed, J.W.** 2001. Molecular links between light and auxin signaling. *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 274-280, 2001.
- Thimann, K. & Beth, K.** 1959. Actions of auxins on *Acetabularia* and the effects of eunucleation. *Nature* 183: 946-948.
- Tietz, A., Ruttkowski, R., Kohler, R. & Kasprisk, W.** 1989. Further investigations on the occurrence and the effects of abscisic acid in algae. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 184: 259-266.
- Tseng, C.K.** 2001. Algal biotechnology industries and research activities in China. *Journal of Applied Phycology* 13: 375-380.

- Ursi, S.** 2000. Crescimento *in vitro* de *Gracilaria* sp. (Gracilariales, Rhodophyta): análise da diversidade intraespecífica. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 84 p.
- Ursi, S. & Plastino, E.M.** 2001. Crescimento *in vitro* de linhagens de coloração vermelha e verde de *Gracilaria* sp. (Gracilariales, Rhodophyta) em dois meios de cultura: análise de diferentes estágios reprodutivos. *Revista Brasileira de Botânica* 24: 587-594.
- Van den Driessche, T., Kevers, C., Collet, M. & Gaspar, T.** 1988. *Acetabularia mediterranea* and ethylene production in relation with development, circadian rhythms in emission and response to external application. *Journal of Plant Physiology* 133: 635-639.
- van der Meer, J.P.** 1978. Genetics of *Gracilaria* sp. (Rhodophyceae, Gigartinales). III. Non-mendelian gene transmission. *Phycologia* 17: 314-318.
- van der Meer, J.P.** 1979a. Genetics of *Gracilaria* sp. (Rhodophyceae, Gigartinales). V. Isolation and characterization of mutant strains. *Phycologia* 18: 47-54.
- van der Meer, J.P.** 1979b. Genetics of *Gracilaria* sp. (Rhodophyceae, Gigartinales). VI. Complementation and linkage analysis of pigmentation mutants. *Canadian Journal of Botany* 57: 64-68.
- van der Meer, J.P.** 1990. Genetics. In: K. Cole & R. Sheath (eds.). *Biology of the red algae*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 103-122.
- van der Meer, J.P. & Bird, N.L.** 1977. Genetics of *Gracilaria* sp. (Rhodophyceae, Gigartinales). I. Mendelian inheritance of two spontaneous green variants. *Phycologia* 16: 159-161.
- Van der Weij, H.G.** 1933. On the occurrence of growth substances in marine algae. *Koninklijke Akademie van Wetenschappen* 36: 759-760.
- Watanabe, T. & Kondo, N.** 1976. Ethylene evolution in marine algae and a proteinaceous inhibitor of ethylene biosynthesis from a red alga. *Plant and Cell Physiology* 71: 327-332.
- Yokoya, N.S.** 1996. Controle do desenvolvimento e da morfogênese por auxinas e citocininas em três espécies de rodofíceas: *Gracilariopsis tenuifrons*, *Grateloupia dichotoma* e *Solieria filiformis*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 202p.
- Yokoya, N.S.** 2000. Apical callus formation and plant regeneration controlled by plant growth regulators on axenic culture of the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycological Research* 48: 133-142.
- Yokoya, N.S. & Handro, W.** 1996. Effects of auxins and cytokinin on tissue culture of *Grateloupia dichotoma* (Gigartinales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 326/327: 393-400.
- Yokoya, N.S. & Handro, W.** 2002. Effects of plant growth regulators and culture medium on morphogenesis of *Solieria filiformis* (Rhodophyta) cultured *in vitro*. *Journal of Applied Phycology* 14: 97-102.

- Yokoya, N.S., Kakita, H., Obika, H. & Kitamura, T.** 1999. Effects of environmental factors and plant growth regulators on growth of the red alga *Gracilaria vermiculophylla* from Shikoku Island, Japan. *Hydrobiologia* 398: 339-347.
- 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:* A.R.O. Chapman, R.J. Anderson, V.J. Vreelnd & J.R. Dawison (eds.). Proceedings of the XVIIth International Seaweed Symposium, Oxford University Press, New York, pp. 425-433.
- Yokoya, N.S., West, J.A. & Luchi, A.E.** 2004. Effects of plants growth regulators on callus formation, growth and regeneration in axenic tissue cultures of *Gracilaria tenuispitata* and *Gracilaria perplexa* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycological Research* 52: 244-25.
- Zhang, W., Chapman, D.J., Phinney, B.O. & Spray, C.R.** 1991. Identification of cytokinins in *Sargassum muticum* (Phaeophyta) and *Porphyra perforata* (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 27: 87-91.
- Zhang, W., Yamane, H., Spray, C.R., Chapman, D.J. & Phinney, B.O.** 1992. Cytokinins from the tRNA of the red alga *Porphyra perforata* J. Ag. Plant and Cell Physiology 33 (2): 197-199.
- Zhang, X. & van der Meer, J.P.** 1987. A study on heterosis in diploid gametophytes of marine red alga *Gracilaria tikvahiae*. *Botanica Marina* 30: 309-314.

CAPÍTULO 1

Crescimento e formação de calos em morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta) cultivados em diferentes concentrações de ágar

Abstract

[Growth and callus formation in color morphs of *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta) cultivated under different agar concentrations]

The effects of agar concentrations on growth and callus formation were studied in axenic cultures of the green and red morphs of *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie. To obtain axenic explants, three washing periods were tested (20, 30 and 40 seconds) in apical and intercalary segments of the green and red morphs with a solution of sterile seawater with 0.5% of sodium hypochlorite and 200 $\mu\text{L.L}^{-1}$ of detergent. A high percentage (above 80%) of axenic explants was obtained with washing of 20 seconds for both color morphs. In order to evaluate the effects of agar, apical and intercalary segments were inoculated into ASP 12-NTA medium with agar concentrations ranging from zero to 1%. Experiments were conducted under temperature of $22\pm 2^\circ\text{C}$, photoperiod of 14 h, pH 8, and salinity of 30 psu. Treatments were tested with 3 replicates with 9 explants in each. Data were submitted to analysis of variance of one or two factors, followed by Student-Newman-Keuls' test. Addition of agar to the culture medium inhibited the growth of apical segments of the green morph. Treatments with agar induced the formation of three types of callus, denominated in accordance with the region which gave rise to the callus: apical, basal, and intermediate calluses. Wherever, the presence of agar is essential for the formation of intermediate and apical calluses. Independently of the callus type, callus growth (assessed by variations on callus area) was not influenced by treatments with agar concentration in both color morphs. In apical segments of the green morph, the highest rate of basal calluses occurred at 0.5% of agar and 0.7% of agar induced the highest rate of intermediate calluses. The results indicated that agar has a regulatory role on morphogenetical processes in color morphs of *Gracilaria domingensis*.

Resumo

Os efeitos da concentração de ágar no crescimento e na formação de calos foram avaliados em culturas axênicas de morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie. Para a obtenção de explantes axênicos, foram testados diferentes períodos de lavagem (20, 30 e 40 segundos) em segmentos apicais e intercalares dos dois tipos de morfos com uma solução de água do mar esterilizada com 0,5% de hipoclorito de sódio e 200 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de detergente. Altas porcentagens de explantes axênicos foram obtidas com a lavagem por 20 segundos com essa solução (acima de 80% para ambos os morfos). Para avaliar os efeitos da concentração de ágar, segmentos apicais e intercalares foram inoculados em meio ASP 12-NTA com concentrações de ágar de zero, 0,5%, 0,6%... a 1%. Todos os experimentos foram realizados em temperatura de $22\pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 14 h, pH

8 e salinidade 30 ups. Os tratamentos foram testados com 3 repetições com 9 explantes em cada. Os resultados foram submetidos a análise de variância de um ou de dois fatores e ao teste de comparação de Student-Newman-Keuls. A adição de ágar no meio inibiu o crescimento dos segmentos apicais de ambos os morfos. Os tratamentos com ágar induziram a formação de três tipos de calo, denominados conforme a região do explante que originou o calo: calo apical, calo basal e calo intermediário. No entanto, foi observado que a presença de ágar é essencial para a formação de calos intermediários e apicais. Independentemente do tipo de calo, não houve diferença entre os tratamentos com relação ao crescimento do calo (avaliado pela área) de ambos os morfos. A maior taxa de formação de calos ocorreu no meio com 0,5% de ágar para os calos basais e em meio com 0,7% de ágar para os calos intermediários em segmentos apicais do morfo verde. Estes resultados indicam que a presença de ágar no meio promove respostas morfogenéticas nos morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis*.

Introdução

As técnicas de cultura de tecidos vêm sendo amplamente utilizadas para as macroalgas, uma vez que estas técnicas permitem a seleção e propagação de linhagens com características desejadas e que tenham maior potencial econômico (Polne-Fuller & Gibor 1987a, Aguirre-Lipperheide *et al.* 1995). No entanto, um dos principais problemas enfrentados para o estabelecimento da cultura de tecidos é a obtenção de culturas axênicas, ou seja, livre de qualquer tipo de contaminação (Evans & Trewavas 1991, Aguirre-Lipperheide *et al.* 1995). Alguns trabalhos foram realizados com o objetivo de aperfeiçoar este procedimento. Fries (1963) testou diferentes combinações de antibióticos e observou que a combinação de penicilina e estreptomicina foi o melhor tratamento para a obtenção de explantes axênicos para *Goniotrichum elegans* Chauvin. A aplicação de ampicilina, carbenicilina, eritromicina, canamicina, neomicina e ticarcilina foi efetiva na obtenção de culturas axênicas de *Porphyra linearis* Greville (Chen & McCracken 1993). Yokoya (1996) observou que o método mais adequado para obtenção de explantes axênicos de *Gracilariopsis tenuifrons* (C.J. Bird & E.C. Oliveira) Fredericq & Hommersand, *Solieria filiformis* (Kützing) P.W. Gabrielson, *Grateloupia dichotoma* J. Agardh e *Grateloupia filiformis* (J.V. Lamouroux) C. Agardh é a combinação de uma solução de antibiótico/antimicótico seguida de uma lavagem em solução de hipoclorito de sódio e detergente. A combinação de uma lavagem em solução de detergente e iodo seguida de imersão em solução de antibiótico/antimicótico por 48 h foi o tratamento eficaz para obtenção de explantes axênicos de *Gelidiella acerosa* (Forsskål) Feldmann & G. Hamel (Kumar *et al.* 2004). Para *Laminaria angustata* Kjellman (Saga & Sakai 1983) e *Ecklonia radiata* (C. Agardh) J. Agardh (Lawlor *et al.* 1991), o método de desinfestação mais eficiente foi a utilização de etanol 70%.

Um outro aspecto importante na cultura de tecidos de macroalgas é a utilização do meio sólido para indução de calos, já que para algumas espécies a presença do gelificante é responsável pela ocorrência desta estrutura (Jin *et al.* 1997). A taxa de formação de calos é um parâmetro importante para a micropropagação de macroalgas, pois a regeneração de plântulas adventícias ocorre a partir de calos, e essas plântulas poderão ser utilizadas futuramente, como mudas para o cultivo comercial (Roberts *et al.* 1984, Jin *et al.* 1997). No entanto, foram realizados poucos trabalhos sobre o agente gelificante e a concentração ótima a ser utilizada durante a cultura (Robaina *et al.* 1990, Huang & Fujita 1997a, Jin *et al.* 1997). Robaina *et al.* (1990) testaram três diferentes concentrações de ágar e observaram que há uma correlação positiva entre a concentração de ágar e a formação de calos, e negativa entre a concentração de ágar e a formação de regenerações em *Grateloupia doryphora* (Montagne)

M.A. Howe. Esta correlação também foi observada em *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty (Reddy *et al.* 2003) e *Gelidiella acerosa* (Kumar *et al.* 2004). Yokoya (1996) testou cinco concentrações de ágar (0,3% a 0,7%) e observou que o crescimento de calos basais de *Grateloupia dichotoma* e *Solieria filiformis* é maior nas concentrações de 0,6% e 0,7% de ágar, respectivamente. Bravin *et al.* (2006) testaram diferentes concentrações de ágar (0,4%, 0,6%, 0,8% e 1,0%) e observaram que as concentrações de 0,8% e 1,0% de ágar induziram as maiores taxas de formação de calos em *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux. No entanto, a indução de calos em meio líquido também foi descrita para algumas espécies de macroalgas como: *Agardhiella subulata* C. Agardh (Bradley & Cheney 1990), *Pterocladia capillacea* (S.G. Gmelin) Santelices & Hommersand (Liu *et al.* 1990), *Solieria filiformis* (Robledo & García-Reina 1993) e *Gracilaria chilensis* Bird, McLachlan & Oliveira (Collantes *et al.* 2004).

Com a finalidade de estabelecer as condições adequadas para desenvolver a micropropagação de *Gracilaria domingensis* (Kützting) Sonder *ex* Dickie, o presente trabalho teve como objetivos: 1) estabelecer um protocolo para obtenção de explantes axênicos; 2) avaliar os efeitos de diferentes concentrações de ágar no crescimento e na formação de calos em morfos verde e vermelho e 3) comparar a variabilidade intraespecífica nas respostas fisiológicas dos morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis*.

Materiais & Métodos

Culturas unialgáceas

Três indivíduos do morfo verde (VD – 124, 125, e 126) e três indivíduos do morfo vermelho (VM – 127, 128 e 129) de *Gracilaria domingensis* foram cultivados em frascos contendo 50 ml de meio de cultura von Stosch a 25%, sob temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, irradiância de 50 - 80 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 14 h. A troca do meio de cultura foi realizada semanalmente.

Testes para determinar um protocolo para obtenção de explantes axênicos

Para a obtenção de explantes axênicos, espécimes com aproximadamente 2 cm dos morfos verde e vermelho provenientes das culturas unialgáceas foram cultivados por 48 h em

meio von Stosch a 25% acrescido de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de nistatina (Sigma) e de uma solução antibiótica e antimicótica de Provasoli (Sigma), composta por $20.000 \text{ unidades.L}^{-1}$ de penicilina, 20 mg.L^{-1} de estreptomicina e $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ de anfotericina. Após este período, segmentos apicais e segmentos intercalares de 5 mm de comprimento foram isolados dos indivíduos de cada morfo e submetidos a uma lavagem com solução de água do mar esterilizada com hipoclorito de sódio a 0,5% (Synth) e $200 \mu\text{l.L}^{-1}$ de detergente orgânico (Amway). Esta solução foi filtrada em membrana com diâmetro dos poros de $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore). Os segmentos apicais e intercalares foram lavados com esta solução durante 20, 30 e 40 segundos e posteriormente, foram enxaguados três vezes em água do mar autoclavada. Cada tratamento constituiu-se de três repetições com nove explantes em cada repetição (3 explantes de cada indivíduo do morfo verde; o mesmo procedimento foi feito para o morfo vermelho). Os explantes foram cultivados em frascos contendo 40 ml de meio von Stosch a 25% com 0,7% de ágar (Merck) (figura 1). Após 4 semanas, foram analisadas as porcentagens de explantes axênicos, contaminados ou mortos.

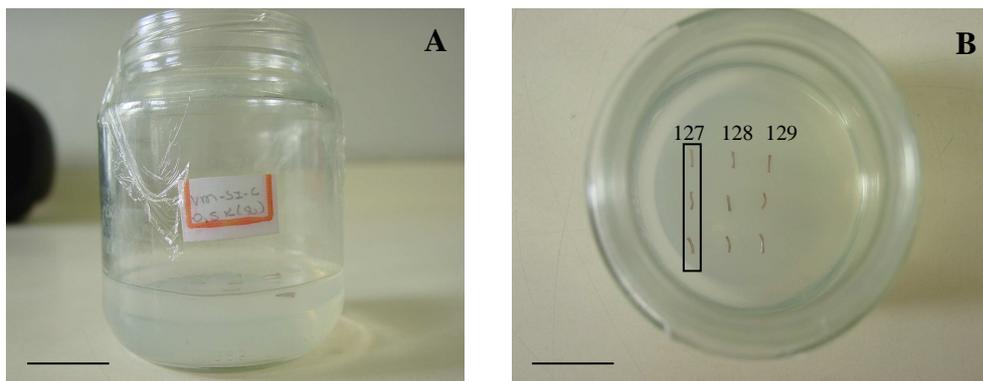


Figura 2: (A) Aspecto das culturas com meio von Stosch a 25% com 0,7% de ágar. (B) Disposição vertical dos três explantes isolados dos indivíduos 127, 128 e 129 do morfo vermelho de *Gracilaria domingensis* sobre o meio sólido Escalas: 1 cm.

Teste com diferentes concentrações de ágar

Explantes axênicos dos indivíduos dos morfos verde e vermelho foram obtidos com o tratamento por 48 h em meio von Stosch a 25% acrescido de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de nistatina (Sigma) e da solução antibiótica e antimicótica de Provasoli (Sigma), e posterior lavagem por 20s em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (Synth) e $200 \mu\text{l.L}^{-1}$ de detergente orgânico (Amway) seguida de três lavagens em água do mar autoclavada. Este tratamento foi selecionado por apresentar uma alta porcentagem (acima de 80%) de explantes axênicos.

Para avaliar os efeitos de diferentes concentrações de ágar, segmentos apicais e segmentos intercalares axênicos de 5 mm provenientes dos indivíduos de ambos os morfos foram inoculados em 40 ml de meio sintético ASP 12-NTA (Iwasaki 1961) (Tabelas 1, 2 e 3) contendo ágar nas concentrações de zero, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9% e 1%. O meio de cultura foi autoclavado a 121°C durante 15 minutos.

Os experimentos foram realizados nas mesmas condições descritas para as culturas unialgáceas. Cada tratamento constituiu-se de 3 repetições com 9 explantes em cada repetição (3 explantes de cada indivíduo). Após 8 semanas, foram analisadas a massa da matéria fresca (para o cálculo da taxa de crescimento), comprimento do explante, área do calo (comprimento x largura) e a porcentagem de formação de calos (n° total de calos/ n° total de explantes x 100%). Os explantes foram fotografados com o auxílio de uma câmera fotográfica digital (Sony DSC-S75) e analisados no software Axiovision v. 3.1 (Carl Zeiss).

A taxa de crescimento (TC) foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$TC = (\ln \text{ massa final} - \ln \text{ massa inicial}) / (\text{Tempo final} - \text{tempo inicial})$$

Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de um ou dois fatores e ao teste de comparação “a posteriori” de Student-Newman-Keuls. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SigmaStat (versão 1.0).

Tabela 1: Composição química do meio de cultura sintético ASP 12-NTA, segundo Iwasaki (1961), modificado por Yokoya (1996).

Componentes	Concentração para um litro de meio
NaCl	28,0 g
KCl	0,7 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	7,0 g
MgCl ₂ . 6H ₂ O	4,0 g
CaCl ₂	0,4 g
NaNO ₃	0,1 g
K ₃ PO ₄	10,0 mg
Na ₂ -glicerofosfato	10,0 mg
Ácido nitriloacético (NTA)	0,1 g
TRIS**	1,0 g
Tiamina.HCl*	100 µg
Biotina	1,0 µg
Cianocobalamina	1,0 µg
Metais-Traço PII	10 ml
Metais-Traço SII	10 ml

*- foi adicionado tiamina.HCl, segundo McLachlan (1973) e retirado o Na₂SiO₃.9H₂O

** - pH ajustado para 7,8 a 8,0

Tabela 2: Solução de metais-traço PII

Elemento	Concentração do elemento (µM)	Sais utilizados	Concentração do sal em 100 ml
B	18,5	H ₃ BO ₃	114,0 mg
Fe	1,8	FeCl ₃ . 6H ₂ O	4,9 mg
Mn	7,3	MnSO ₄ . H ₂ O	16,4 mg
Zn	0,8	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	2,2 mg
Co	0,17	CoSO ₄ . 7H ₂ O	0,48 mg
EDTA	26,9	NA ₂ EDTA	100 mg

Tabela 3: Solução de metais-traço SII

Elemento	Concentração do elemento (μM)	Sais utilizados	Concentração do sal em 100 ml
Br	125	NaBr	128 mg
Sr	23	SrCl ₂	36 mg
Rb	2,3	RbCl	2,9 mg
Li	28,8	LiCl	11,7 mg
I	0,08	Ki	0,132 mg
Mo	5,2	NaMoO ₄ . 2H ₂ O	12,5 mg

Resultados

Protocolo para obtenção de explantes axênicos

Os diferentes períodos de lavagem (20, 30 e 40 segundos) com a solução de água do mar esterilizada com hipoclorito de sódio (0,5%) e detergente não apresentaram diferenças significativas. Considerando que, uma alta porcentagem de explantes axênicos (acima de 80% - Tabela 4) foi obtida para ambos os morfos e para os dois tipos de segmentos no tratamento de 20s, este tratamento foi selecionado para ser utilizado nos experimentos subsequentes, uma vez que, para o morfo verde, a lavagem por 30s causou morte e contaminação dos explantes (4% contaminados e 3% mortos para os segmentos apicais e 26% contaminados para os segmentos intercalares). Em um experimento preliminar, o tratamento de 40s causou a morte dos explantes do morfo verde (dados não apresentados).

Tabela 4: Porcentagem de explantes axênicos de *Gracilaria domingensis* após diferentes períodos de lavagem com solução composta por água do mar esterilizada contendo hipoclorito de sódio (0,5%) e detergente orgânico (200 $\mu\text{l.L}^{-1}$). Os explantes correspondem a segmentos apicais (SA) e intercalares (SI) com 5 mm de comprimento, que foram cultivados em meio von Stosch a 25% com 0,7% de ágar durante quatro semanas. Valores correspondem a média \pm DP (n=3, com nove explantes em cada repetição).

PERÍODOS DE LAVAGEM (s)	MORFOS			
	VERMELHO		VERDE	
	SA	SI	SA	SI
20	89,0 \pm 11,1 ns	100,0 \pm 0,0 ns	89,0 \pm 19,2 ns	93,0 \pm 12,8 ns
30	96,0 \pm 6,4 ns	96,0 \pm 6,4 ns	93,0 \pm 6,4 ns	74,0 \pm 23,1 ns
40	100,0 \pm 0,0 ns	89,0 \pm 11,1 ns	-	-

(ns) – não significativo pelo teste de Student-Newman-Keuls, a 5% de significância.

Efeitos do ágar no crescimento

TC DOS EXPLANTES DO MORFO VERDE: As taxas de crescimento (TC) dos segmentos apicais do morfo verde foram maiores no tratamento sem adição de ágar. Os tratamentos com 0,5% a 0,9% de ágar não apresentaram diferenças significativas nas TC, e a menor TC foi observada no tratamento com 1% de ágar (figura 2A). Para os segmentos intercalares do morfo verde, as maiores TC foram observadas nos tratamentos com 0,5% a 0,9% de ágar e as menores TC foram observadas nos tratamentos controle e 1% de ágar (figura 2B).

TC DOS EXPLANTES DO MORFO VERMELHO: Para o morfo vermelho, a maior TC de segmentos apicais foi observada no tratamento controle e altas concentrações de ágar (0,9% e 1,0%) inibiram o crescimento (figura 2C). As TC dos segmentos intercalares do morfo vermelho não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos testados (figura 2D).

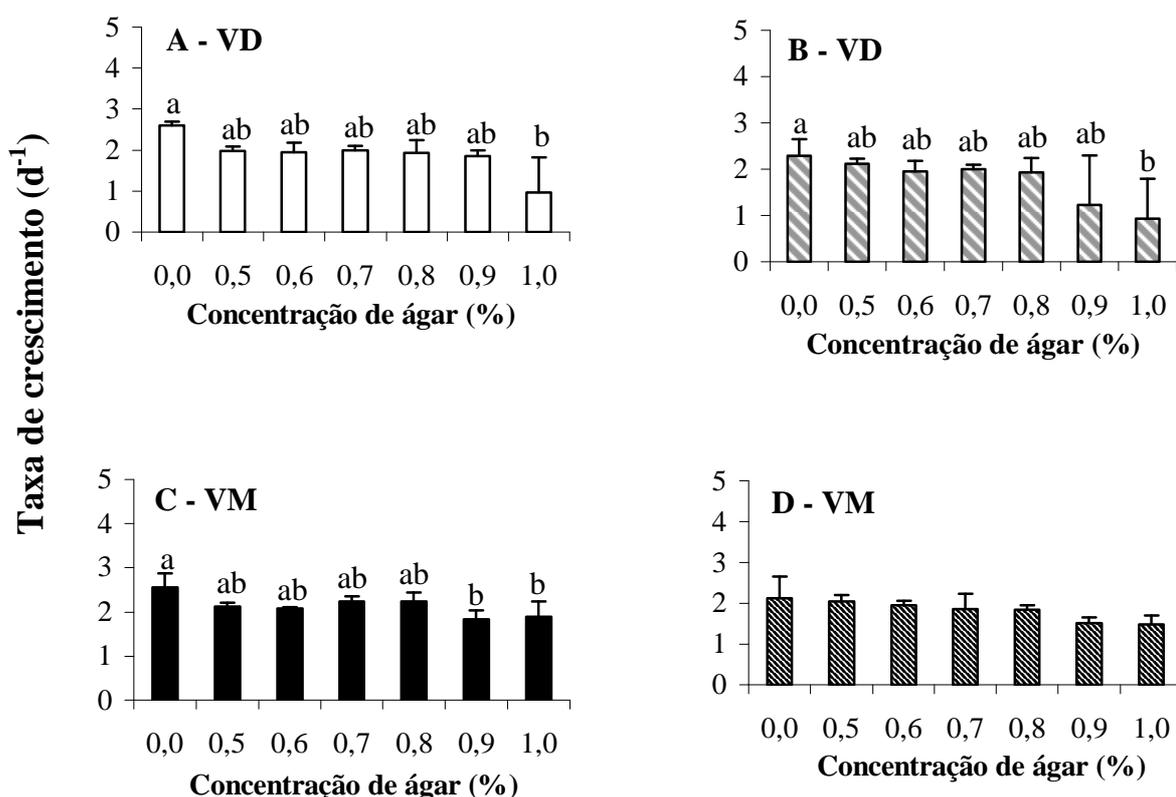


Figura 3: Efeito de diferentes concentrações de ágar na taxa de crescimento ($\% \cdot d^{-1}$) de segmentos apicais (A) e (C) e intercalares (B) e (D) dos morfos verde (VD) e vermelho (VM) de *Gracilaria domingensis* após oito semanas de cultivo em meio ASP 12-NTA. Cada valor corresponde a média de três repetições, com nove explantes em cada repetição. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

VARIAÇÃO NO COMPRIMENTO DOS EXPLANTES DO MORFO VERDE: Considerando a variação no comprimento do explante do morfo verde, tratamentos com ágar inibiram o crescimento de segmentos apicais quando comparados ao controle (figura 3A). Por outro lado, os segmentos intercalares apresentaram resposta oposta: o tratamento controle inibiu o crescimento e o maior crescimento foi observado no tratamento com 0,5% de ágar (figura 3B).

VARIAÇÃO NO COMPRIMENTO DOS EXPLANTES DO MORFO VERMELHO: Para o morfo vermelho, o crescimento em comprimento dos segmentos apicais não variou significativamente entre os tratamentos testados (figura 3C). Entretanto, tratamentos com ágar estimularam o crescimento de segmentos intercalares, enquanto que o controle inibiu o crescimento (figura 3D).

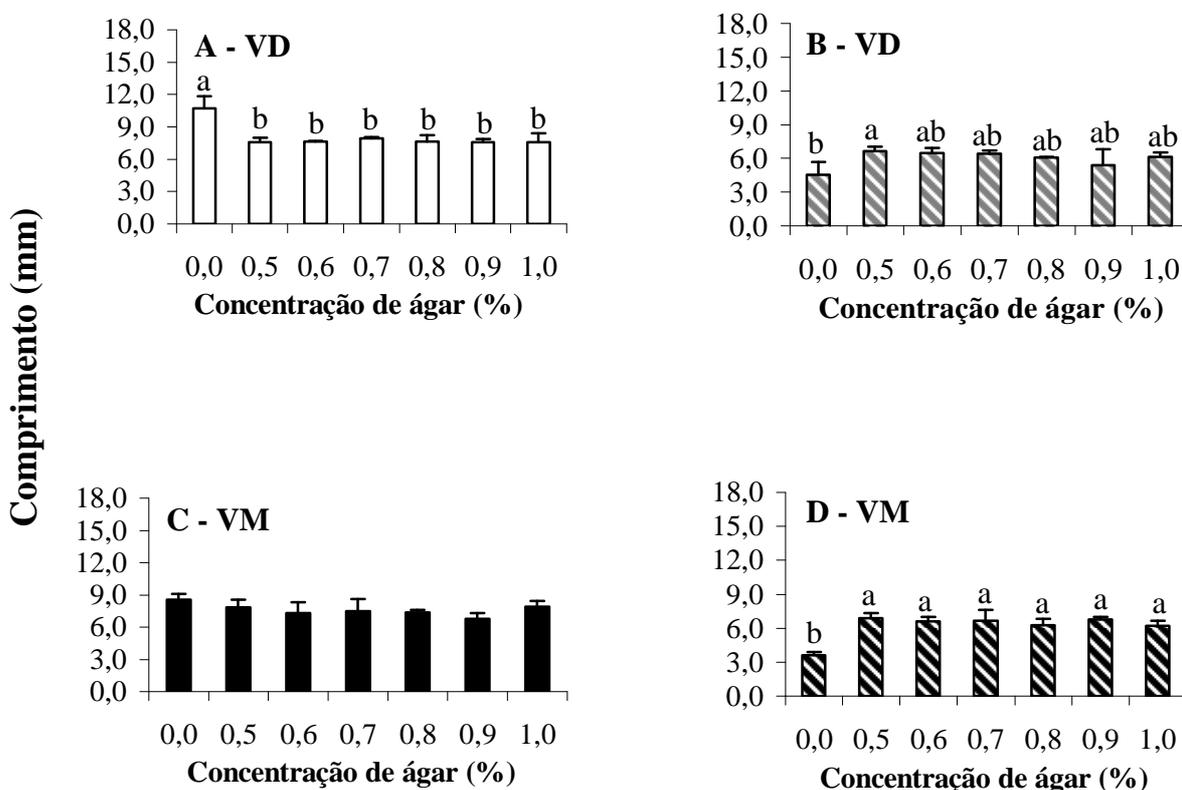


Figura 4: Efeito de diferentes concentrações de ágar no crescimento (comprimento – mm) de segmentos apicais (A) e (C) e intercalares (B) e (D) dos morfos verde (VD) e vermelho (VM) de *Gracilaria domingensis* após oito semanas de cultivo em meio ASP 12-NTA. Cada valor corresponde a média de três repetições, com nove explantes em cada repetição. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

Efeitos do ágar na formação de calos

Os segmentos intercalares dos morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* apresentaram polaridade, com a formação de regenerações apicais na região apical do explante e calo basal na região basal do explante. Três tipos de calos foram induzidos pelos diferentes tratamentos para ambos os morfos: calo basal (formado na região distal do explante, onde foi realizada a secção do explante no início dos experimentos), calo apical (formado na região apical dos segmentos apicais) e calo intermediário (formado nas regiões intermediárias do explante) (figura 4). A presença de regenerações apicais foi o critério utilizado para diferenciar a parte distal da parte proximal (apical) nos segmentos intercalares dos morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis*.

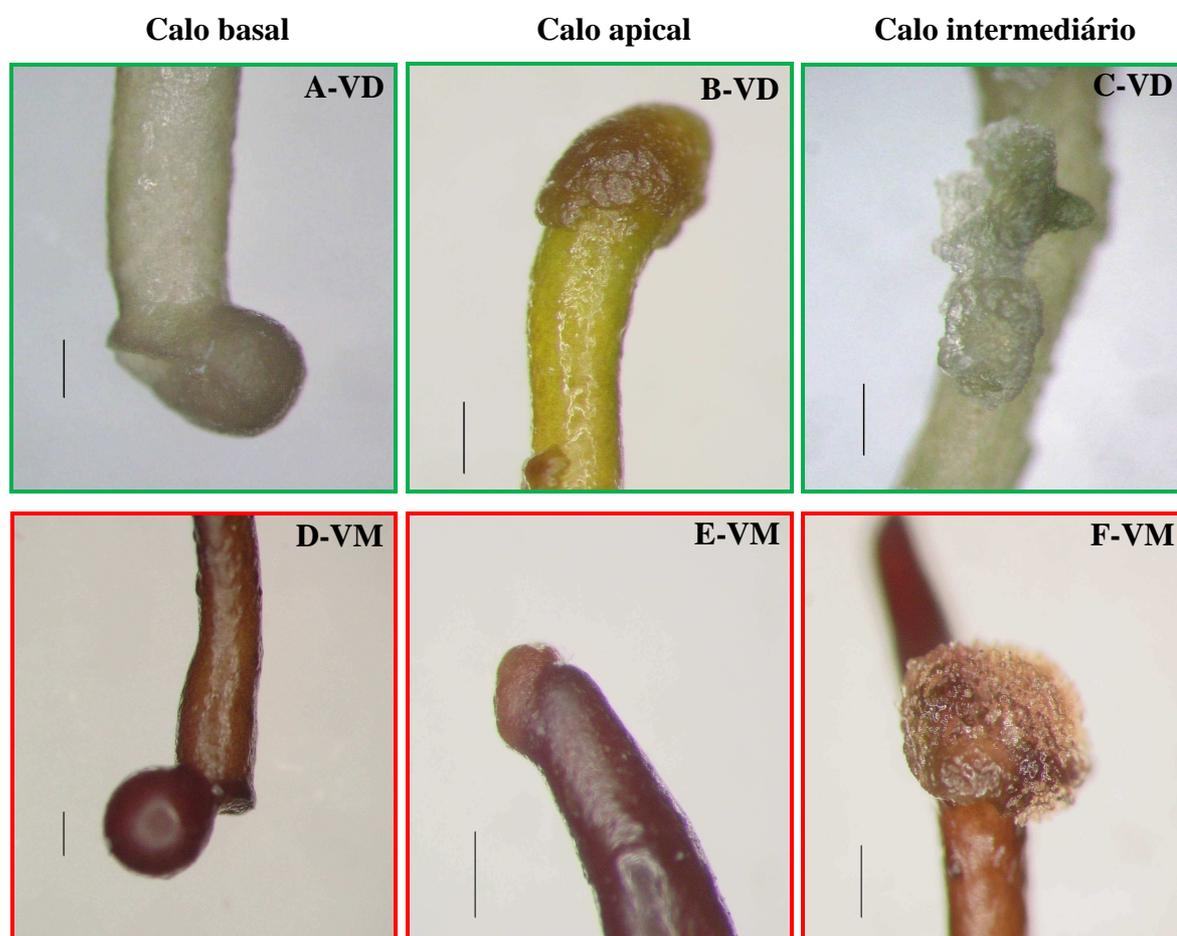


Figura 5: Aspecto geral dos diferentes tipos de calos formados nos morfos verde (A - C) e vermelho (D - F) de *Gracilaria domingensis*, após oito semanas de cultivo em meio ASP 12-NTA. (A) e (D) calo basal formado em um segmento intercalares (SI) cultivado no tratamento com 0,5% de ágar. (B) calo apical formado em um segmento apical (SA) cultivado no tratamento com 0,5% de ágar. (C) calo intermediário formado em um SA cultivado no tratamento com 0,7% de ágar. (E) calo apical formado em um SA cultivado no tratamento com 0,6% de ágar. (F) calo intermediário formado em um SI cultivado no tratamento com 0,5% de ágar. Escalas: 0,6 mm. VD e VM: morfos verde e vermelho, respectivamente.

FORMAÇÃO DE CALOS NO MORFO VERDE: Nos segmentos apicais do morfo verde houve a formação dos três tipos de calos. As maiores porcentagens de formação de calos basais foram nos tratamentos controle e 0,5% de ágar e altas concentrações de ágar (0,9% e 1%) inibiram a formação de calos basais (figura 5A). O tratamento de 0,7% de ágar estimulou a formação de calos intermediários, enquanto que nos tratamentos controle e 1% de ágar não houve a formação de calos intermediários (figura 5B). As porcentagens de formação de calos apicais não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, e no tratamento controle não foi observada a formação de calos apicais (figura 5C). Para os segmentos intercalares do morfo verde, os tratamentos que induziram a formação de calos basais e calos intermediários não apresentaram diferenças significativas entre si (figuras 5D e 5E). A formação de calos apicais não foi observada neste tipo de segmento.

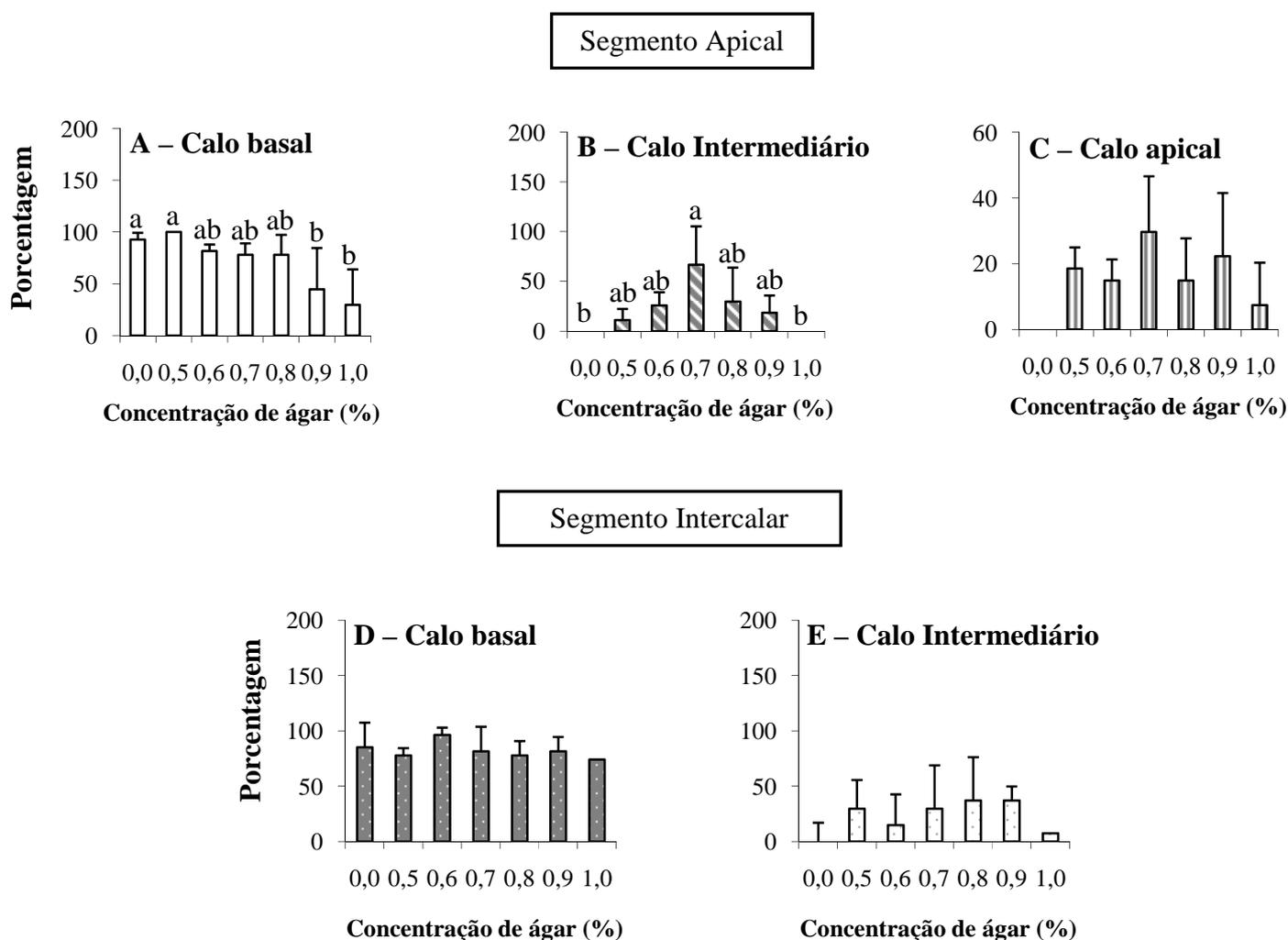


Figura 6: Efeito de diferentes concentrações de ágar na porcentagem de formação de calos (n° de calos por n° total de explantes x 100%) em segmentos apicais (A-C) e intercalares (D-E) do morfo verde de *Gracilaria domingensis* após oito semanas de cultivo em meio ASP 12-NTA. Cada valor corresponde a média de três repetições com nove explantes em cada repetição. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

FORMAÇÃO DE CALOS NO MORFO VERMELHO: Foi observada a formação dos três tipos de calos nos segmentos apicais do morfo vermelho de *Gracilaria domingensis*. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos que induziram a formação de calos basais (figura 6A), calos intermediários (figura 6B) e calos apicais (figura 6C). O tratamento controle (sem ágar) inibiu a formação de calos intermediários e apicais. Nos segmentos intercalares do morfo vermelho houve apenas a formação de calos basais e não houve diferenças significativas entre os tratamentos testados (figura 6D).

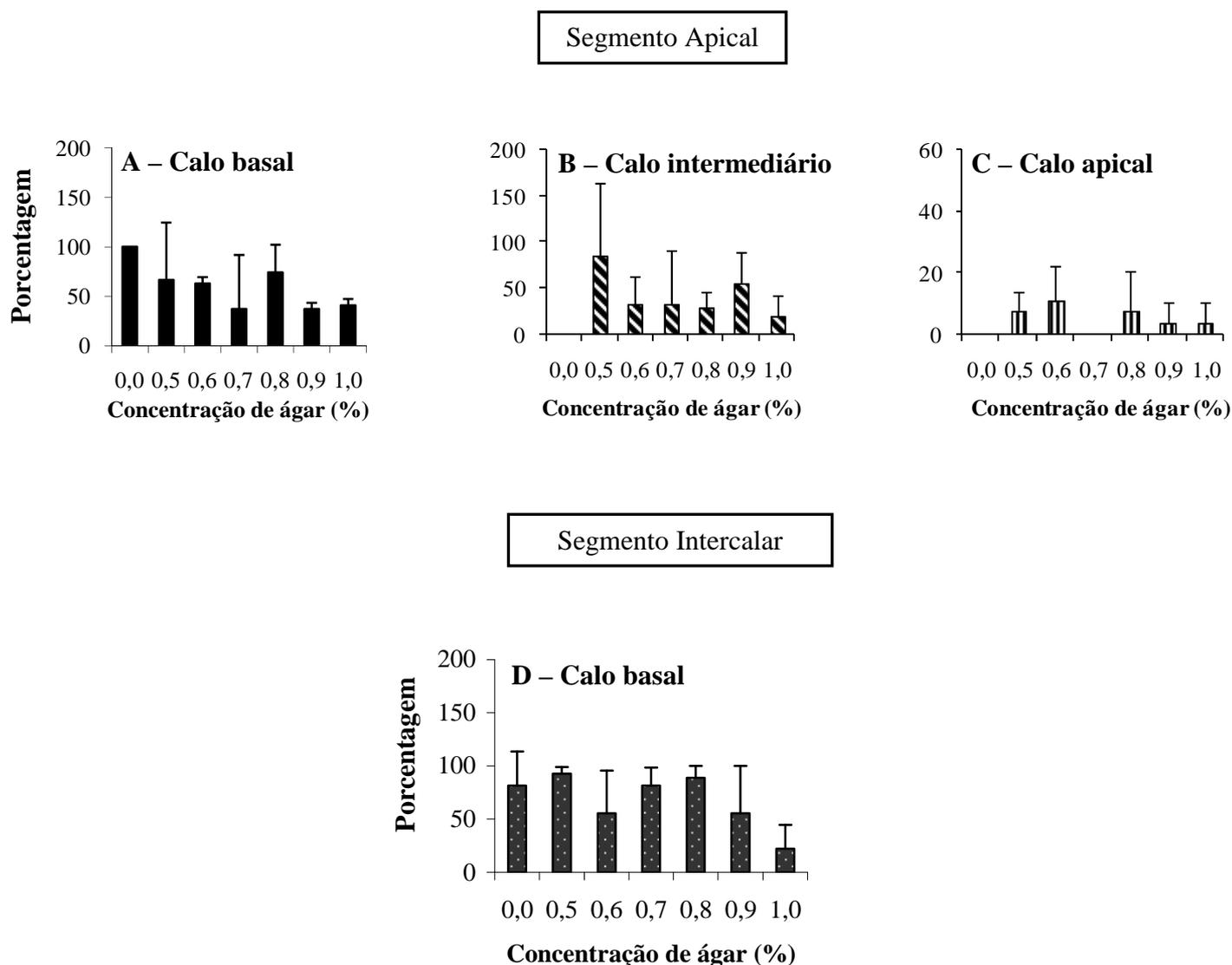


Figura 7: Efeito de diferentes concentrações de ágar na porcentagem de formação de calos (n° de calos por n° total de explantes x 100%) em segmentos apicais (A-C) e intercalares (D) do morfo vermelho de *Gracilaria domingensis* após oito semanas de cultivo em meio ASP 12-NTA. Cada valor corresponde a média de três repetições com nove explantes em cada repetição.

Efeitos do ágar no crescimento dos calos

CRESCIMENTO DOS CALOS DO MORFO VERDE: As diferentes concentrações de ágar não influenciaram o crescimento dos diferentes tipos de calos formados em segmentos apicais e intercalares do morfo verde (figura 7).

CRESCIMENTO DOS CALOS DO MORFO VERMELHO: As dimensões do calo (área) não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos para segmentos apicais e intercalares do morfo vermelho (figura 8).

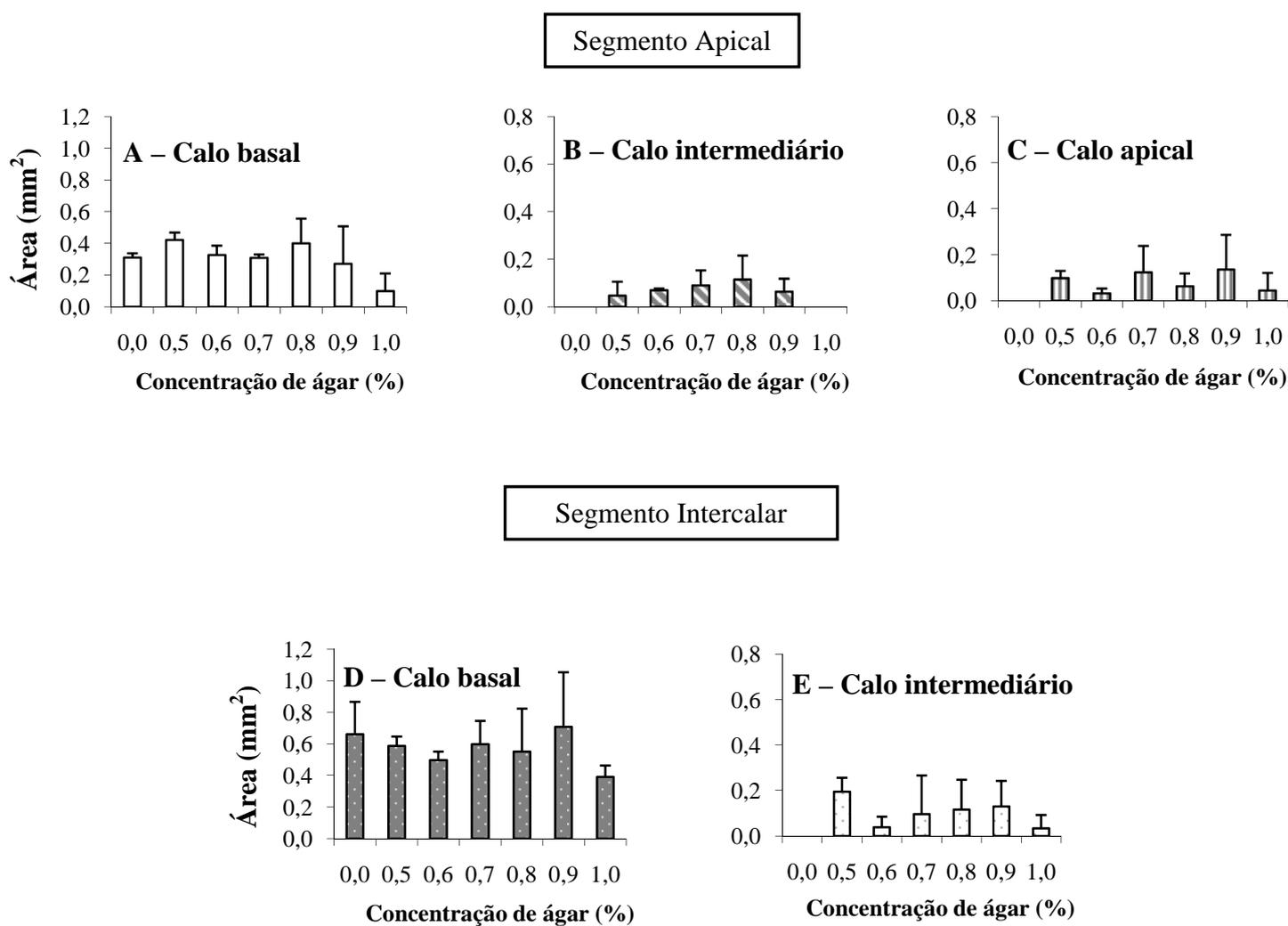


Figura 8: Efeito de diferentes concentrações de ágar no crescimento de calos formados em segmentos apicais (A-C) e intercalares (D-E) do morfo verde de *Gracilaria domingensis* após oito semanas de cultivo em meio ASP 12-NTA. Cada valor corresponde a média de três repetições com nove explantes em cada repetição.

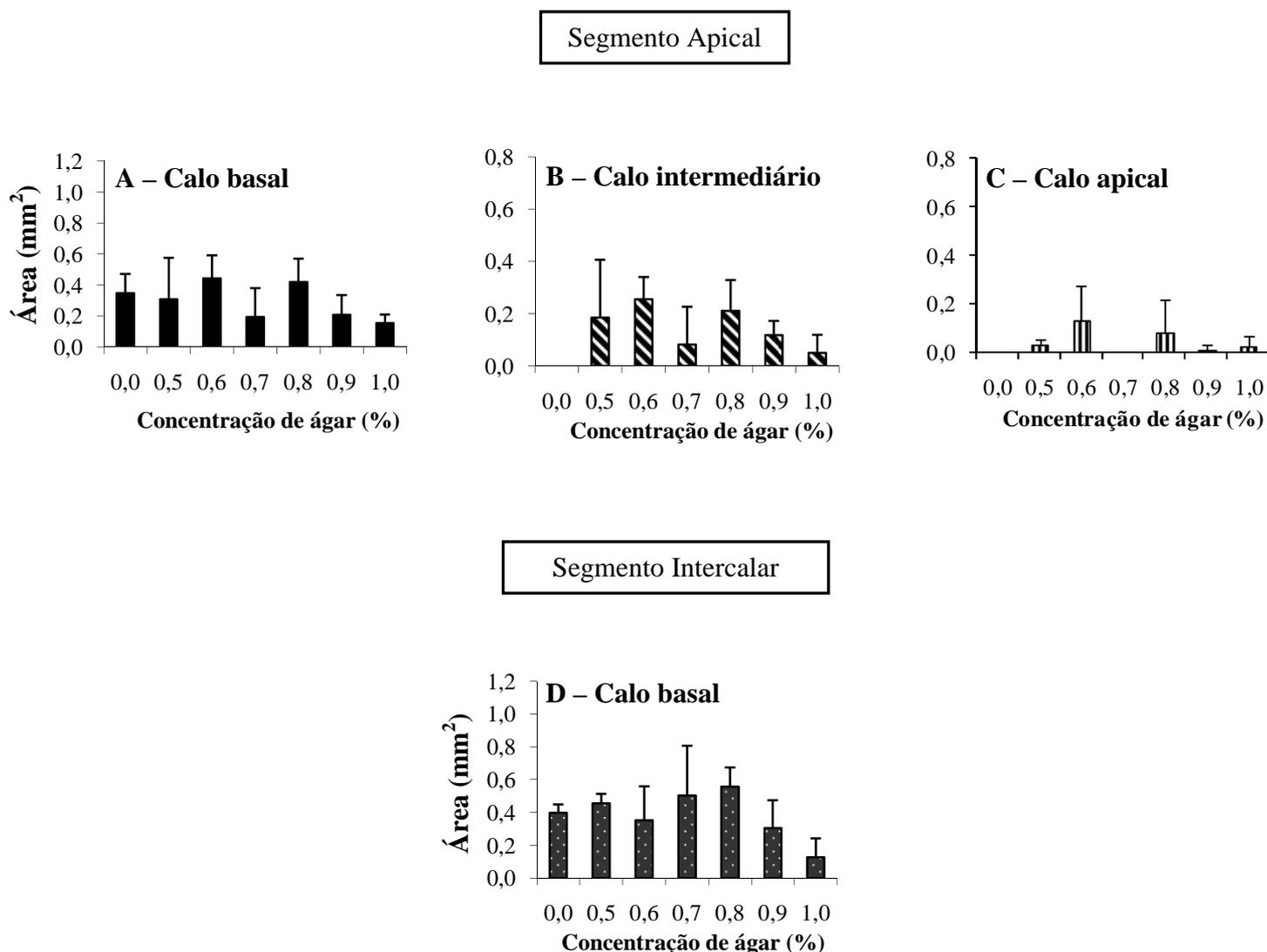


Figura 9: Efeito de diferentes concentrações de ágar no crescimento de calos formados em segmentos apicais (A-C) e intercalares (D) do morfo vermelho de *Gracilaria domingensis* após oito semanas de cultivo em meio ASP 12-NTA. Cada valor corresponde a média de três repetições com nove explantes em cada repetição.

Efeitos do ágar no crescimento dos explantes – Análise de variância bifatorial

TC: As TC dos segmentos apicais foram influenciadas tanto pela coloração do morfo quanto pelas diferentes concentrações de ágar, porém não houve interação entre esses dois fatores (tabela 5). O morfo vermelho apresentou maiores TC nos tratamentos de 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8% e 1% de ágar do que o morfo verde. Para os segmentos intercalares, apenas as diferentes concentrações de ágar influenciaram as TC (tabela 5), sendo que o morfo verde

apresentou maiores TC do que o morfo vermelho nas concentrações de 0,5%, 0,7%, 0,8%, 0,9% e 1% de ágar.

Tabela 3: Análise de variância bifatorial da taxa de crescimento dos segmentos apicais e intercalares dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis*, após oito semanas de cultivo em meio ASP 12-NTA com diferentes concentrações de ágar. Variáveis: (A): concentrações de ágar; (B): morfos. **Negrito:** efeito significativo.

Tipo de Segmento	Efeito	Graus de Liberdade	F	P
Segmento	A	6	10,073	<0,0001
Apical	B	1	6,838	0,0147
	Interação A/B	6	0,918	0,4979
Segmento	A	6	4,568	0,0024
Intercalar	B	1	3,437	0,0743
	Interação A/B	6	0,596	0,7310

VARIAÇÃO NO COMPRIMENTO: Com relação a variação no comprimento, tanto as concentrações de ágar quanto a coloração do morfo influenciaram o crescimento dos segmentos apicais, no entanto, não houve interação entre esses dois fatores (tabela 6). O morfo verde apresentou maior crescimento em comprimento nos tratamentos controle, 0,6%, 0,7%, 0,8% e 0,9% de ágar do que o morfo vermelho. Para os segmentos intercalares apenas as diferentes concentrações de ágar influenciaram o crescimento em comprimento (tabela 6). O morfo vermelho apresentou maior crescimento em relação ao morfo verde em todos os tratamentos testados, com exceção do tratamento controle.

Tabela 6: Análise de variância bifatorial do crescimento em comprimento dos segmentos apicais e intercalares dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis*, após oito semanas de cultivo em meio ASP 12-NTA com diferentes concentrações de ágar. Variáveis: (A): concentrações de ágar; (B): morfos. **Negrito:** efeito significativo.

Tipo de Segmento	Efeito	Graus de Liberdade	F	P
Segmento	A	6	8,40	<0,0001
Apical	B	1	5,16	0,0317
	Interação A/B	6	2,24	0,0716
Segmento	A	6	11,586	<0,0001
Intercalar	B	1	0,868	0,3595
	Interação A/B	6	1,495	0,2161

Efeitos do ágar na formação de calos – Análise de variância bifatorial

FORMAÇÃO DE CALOS BASAIS: As porcentagens de formação de calos basais em segmentos apicais foram influenciadas apenas pelas diferentes concentrações de ágar (tabela 7). O morfo verde apresentou maiores porcentagens de formação de calos basais do que o morfo vermelho em todas as concentrações de ágar testadas, exceto nos tratamentos controle e 1% de ágar. Para os calos basais formados em segmentos intercalares, apenas as concentrações de ágar influenciaram as porcentagens de formação de calos basais (tabela 7). O morfo verde apresentou maiores porcentagens de formação de calos basais em relação ao morfo vermelho nos tratamentos controle, 0,6%, 0,9% e 1% de ágar.

Tabela 7: Análise de variância bifatorial da porcentagem de formação de calos basais dos segmentos apicais e intercalares dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis*, após oito semanas de cultivo em meio ASP 12-NTA com diferentes concentrações de ágar. Variáveis: (A): concentrações de ágar; (B): morfos. **Negrito:** efeito significativo.

Tipo de Segmento	Efeito	Graus de Liberdade	F	P
Segmento Apical	A	6	3,995	0,0052
	B	1	2,065	0,1618
	Interação A/B	6	0,768	0,6012
Segmento Intercalar	A	6	488,161	<0,0001
	B	1	0,0402	0,8426
	Interação A/B	6	0,0228	0,9999

FORMAÇÃO DE CALOS INTERMEDIÁRIOS: As concentrações de ágar e a coloração do morfo não influenciaram as porcentagens de formação de calos intermediários em segmentos apicais (tabela 8).

Tabela 8: Análise de variância bifatorial da porcentagem de formação de calos intermediários dos segmentos apicais dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis*, após oito semanas de cultivo em meio ASP 12-NTA com diferentes concentrações de ágar. Variáveis: (A): concentrações de ágar; (B): morfos. **Negrito:** efeito significativo.

Efeito	Graus de Liberdade	F	P
A	6	1,89	0,1174
B	1	2,08	0,1607
Interação A/B	6	1,54	0,2028

FORMAÇÃO DE CALOS APICAIS: Apenas a coloração do morfo influenciou as porcentagens de formação de calos apicais (tabela 9). O morfo verde apresentou porcentagens de formação de calos apicais superiores ao morfo vermelho em todos os tratamentos testados.

Tabela 9: Análise de variância bifatorial da porcentagem de formação de calos apicais dos segmentos apicais dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis*, após oito semanas de cultivo em meio ASP 12-NTA com diferentes concentrações de ágar. Variáveis: (A): concentrações de ágar; (B): morfos. **Negrito**: efeito significativo.

Efeito	Graus de Liberdade	F	P
A	6	1,61	0,1811
B	1	11,11	0,0024
Interação A/B	6	1,52	0,2085

CRESCIMENTO DE CALOS BASAIS: Somente as concentrações de ágar influenciaram o crescimento dos calos basais formados em segmentos apicais (tabela 10). O morfo vermelho apresentou maior crescimento de calos basais em relação ao morfo verde nos tratamentos controle, 0,6%, 0,8% e 1% de ágar. Para os segmentos intercalares, apenas a coloração do morfo influenciou o crescimento dos calos basais (tabela 10). O morfo verde apresentou maior crescimento dos calos basais em relação ao morfo vermelho.

Tabela 10: Análise de variância bifatorial do crescimento de calos basais dos segmentos apicais e intercalares dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis*, após oito semanas de cultivo em meio ASP 12-NTA com diferentes concentrações de ágar. Variáveis: (A): concentrações de ágar; (B): morfos. **Negrito**: efeito significativo.

Tipo de Segmento	Efeito	Graus de Liberdade	F	P
Segmento Apical	A	6	29,165	0,0245
	B	1	0,0300	0,8637
	Interação A/B	6	0,6003	0,7276
Segmento Intercalar	A	6	1,978	0,1028
	B	1	10,564	0,0030
	Interação A/B	6	0,841	0,5489

CRESCIMENTO DE CALOS INTERMEDIÁRIOS: Para os calos intermediários formados em segmentos apicais, tanto a coloração do morfo quanto as diferentes concentrações de ágar influenciaram o crescimento do calo, não havendo interação significativa entre esses fatores

(tabela 11). O crescimento dos calos intermediários foi maior no morfo vermelho em relação ao morfo verde, exceto no tratamento de 0,7% de ágar.

Tabela 11: Análise de variância bifatorial do crescimento de calos intermediários dos segmentos apicais dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis*, após oito semanas de cultivo em meio ASP 12-NTA com diferentes concentrações de ágar. Variáveis: (A): concentrações de ágar; (B): morfos. **Negrito:** efeito significativo.

Efeito	Graus de Liberdade	F	P
A	6	2,709	0,0335
B	1	6,436	0,0170
Interação A/B	6	0,844	0,5471

CRESCIMENTO DE CALOS APICAIS: Para os calos apicais, tanto as concentrações de ágar quanto a coloração do morfo não influenciaram o crescimento do calo (tabela 12).

Tabela 12: Análise de variância bifatorial do crescimento de calos apicais dos segmentos apicais dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis*, após oito semanas de cultivo em meio ASP 12-NTA com diferentes concentrações de ágar. Variáveis: (A): concentrações de ágar; (B): morfos. **Negrito:** efeito significativo.

Efeito	Graus de Liberdade	F	P
A	6	0,739	0,6227
B	1	1,647	0,2099
Interação A/B	6	1,507	0,2121

Discussão

Protocolo para obtenção de explantes axênicos

A exposição do explante a uma solução de hipoclorito de sódio e detergente se faz necessária para a obtenção de culturas axênicas para algumas espécies de macroalgas. O hipoclorito de sódio é um agente desinfestante utilizado principalmente em plantas vasculares. A concentração da solução de hipoclorito de sódio e o tempo em que o material deve ficar em contato com esta solução variam em função da sua sensibilidade (Grattapaglia & Machado 1998).

Para ambos os morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis*, explantes axênicos foram obtidos através do pré-tratamento por 48 h em solução de água do mar esterilizada contendo $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de nistatina e 1 ml.L^{-1} da solução antibiótica e antimicótica de Provasoli, seguida de uma lavagem com solução de água do mar esterilizada com hipoclorito de sódio a 0,5% e $200 \mu\text{l.L}^{-1}$ de detergente por 20 segundos e três lavagens sucessivas em água do mar autoclavada. Procedimento similar foi adotado para *Gracilariopsis tenuifrons* (Yokoya 2000) e *Solieria filiformis* (Yokoya & Handro 2002) onde se utilizou apenas um antibiótico (ciprofloxacina) e nistatina por 48 h e imersão em solução de hipoclorito de sódio (0,5%) e detergente por 10 segundos. Para *Grateloupia dichotoma* e *Gracilaria vermiculophylla* o tempo de imersão em solução de hipoclorito de sódio e detergente foi de 20 segundos, assim como para os morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis*, porém o antibiótico utilizado foi diferente (Yokoya & Handro 1996, Yokoya *et al.* 1999). Os explantes de *Hypnea musciformis*, *Gracilaria tenuistipitata* e *Gracilaria perplexa* não passaram pelo pré-tratamento em solução de antibiótico e antimicótico, sendo apenas imersos em solução de hipoclorito de sódio e detergente por 20 segundos para *Hypnea musciformis* e 10 segundos para as espécies de *Gracilaria* (Yokoya *et al.* 2003, Yokoya *et al.* 2004). No entanto, há resultados que mostram que a utilização de hipoclorito de sódio pode causar lesões e a morte dos explantes, como no caso de *Gracilaria verrucosa* (Kaczyna e Megnet 1993), ou ainda, que este composto seja insuficiente para a produção de explantes axênicos, como foi observado em *Laminaria angustata* (Saga & Sakai 1983).

Efeitos do ágar no crescimento do explante e na formação e crescimento de calos

Os resultados obtidos com relação à TC dos explantes dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis* nas diferentes concentrações de ágar seguiram um padrão semelhante. Para os segmentos apicais de ambos os morfos, as TC foram maiores no tratamento controle (sem adição de ágar). Em decorrência disto, as menores TC para os segmentos apicais foram observadas nos tratamentos onde a concentração de ágar foi maior (0,9% e 1% de ágar). Segundo Stoltz (1971), a concentração de ágar no meio de cultura deve ser mantida baixa, suficiente para suportar o peso físico dos explantes, em virtude das altas concentrações causarem restrição ao crescimento pela redução na disponibilidade de água.

O crescimento em comprimento foi outra variável afetada pelas diferentes concentrações de ágar em segmentos apicais do morfo verde, que apresentaram o maior

crescimento no tratamento controle. Os segmentos apicais dos morfos verde e vermelho apresentaram maior crescimento em relação aos segmentos intercalares. Estes resultados podem ser explicados pela presença das células apicais nos segmentos apicais, que promovem o crescimento do explante.

A presença de polaridade nos explantes de *Gracilaria domingensis* pode estar relacionada à existência de um gradiente fisiológico formado ao longo do eixo do talo (Buggeln 1981, Yokoya *et al.* 1993). Respostas semelhantes foram observadas em *Laurencia* sp. (Robaina *et al.* 1992), *Grateloupia filiformis* Kützing (Yokoya *et al.* 1993) e *Gracilaria chilensis* (Collantes *et al.* 2004).

A porcentagem de formação de calos basais foi alta nos dois tipos de explantes estudados para ambos os morfos de *Gracilaria domingensis*. A ocorrência desta estrutura é mais comum entre as rodofíceas e sua formação é provocada pela secção feita no explante. Esta resposta foi observada em nossos experimentos, onde houve a formação de calos basais tanto em meio líquido quanto em meio sólido. O processo de formação de calos em resposta a uma lesão causada no explante foi também observado em algumas espécies de rodofíceas, feofíceas e clorofíceas (Polne-Fuller & Gibor 1987b), em *Laurencia* sp. (Robaina *et al.* 1992), *Grateloupia filiformis* (Yokoya *et al.* 1993), *Grateloupia dichotoma* (Yokoya & Handro 1996), *Meristotheca papulosa* (Montagne) J. Agardh (Huang & Fujita 1997b), *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss (Yokoya *et al.* 1999), *Kappaphycus alvarezii* (Reddy *et al.* 2003), *Gracilaria tenuistipitata* Chang et Xia e *Gracilaria perplexa* Byrne et Zuccarello (Yokoya *et al.* 2004).

A concentração ótima de ágar para a formação de calos basais em segmentos apicais do morfo verde de *Gracilaria domingensis* foi 0,5%. Resultados similares foram observados para calos basais de *Gracilaria vermiculophylla* (Yokoya *et al.* 1999) e calos apicais de *Hypnea musciformis* (Yokoya *et al.* 2003). Entretanto, baixas concentrações de ágar (0,4%) induziram a formação de calos basais em *Grateloupia dichotoma* (Yokoya & Handro 1996), calos apicais em *Gracilariopsis tenuifrons* (Bird et Oliveira) Fredericq et Hommersand (Yokoya 2000) e explantes filamentosos em *Solieria filiformis* (Yokoya & Handro 2002).

A concentração ótima de ágar para formação de calos intermediários no morfo verde de *Gracilaria domingensis* foi 0,7%, coincidindo com os resultados obtidos por Yokoya *et al.* (2004) para *Gracilaria tenuistipitata* e *Gracilaria perplexa*. Estes resultados são comparáveis às respostas obtidas para *Chondrus crispus* (Chen & Taylor 1978), *Gracilaria verrucosa* (Kaczyna & Megnet 1993), *Grateloupia doryphora* (Garcia-Jimenez *et al.* 1998) e *Gelidiella acerosa* (Kumar *et al.* 2004) que apresentaram a maior taxa de formação de calos na concentração de 0,8% de ágar. A formação de calos intermediários é menos freqüente do que

a de calos basais, e em nossos estudos, a formação desta estrutura pode estar relacionada à dessecação, uma vez que o explante ficou exposto ao ar durante todo o período experimental. Nossos resultados coincidem com os obtidos para *Gracilaria tenuistipitata* e *Gracilaria perplexa* (Yokoya *et al.* 2004).

As diferentes concentrações de ágar não influenciaram a porcentagem de formação de calos apicais em ambos os morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis*. A formação desta estrutura também pode estar relacionada à dessecação, como foi observado nos calos intermediários. Estes resultados corroboram com os resultados obtidos para calos apicais de *Hypnea musciformis* (Yokoya *et al.* 2003, Bravin 2005) e *Gracilaria tenuistipitata* (Yokoya *et al.* 2004). A formação de calos apicais foi descrita para outras espécies, em decorrência de outros fatores tais como estímulo mecânico para *Solieria filiformis* (Robledo & Garcia-Reina 1993) e a presença de fitorreguladores para *Gracilariopsis tenuifrons* (Yokoya 2000) e *Gracilaria perplexa* (Yokoya *et al.* 2004).

A principal diferença entre os morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis* está relacionada à porcentagem de formação de calos, onde o morfo verde apresentou porcentagens maiores tanto para os segmentos apicais quanto para os segmentos intercalares. Além disso, os segmentos intercalares do morfo verde apresentaram dois tipos de calos (calos basais e calos intermediários), enquanto que no morfo vermelho foi observada apenas a formação de calos basais. Estes resultados mostram que os morfos apresentam respostas distintas quando cultivados em diferentes concentrações de ágar, e a presença de ágar no meio promove respostas morfogênicas nos morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis*.

Referências bibliográficas

- Aguirre-Lipperheide, M., Estrada-Rodríguez, F.J. & Evans, L.V.** 1995. Facts, problems and needs in seaweeds tissue culture: an appraisal. *Journal of Phycology* 31: 677-688.
- Bradley, P.M. & Cheney, D.P.** 1990. Some effects of plant regulators on tissue cultures of the marine red alga *Agardhiella subulata* (Gigartinales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 204/205: 353-360.
- Bravin, I.C.** 2005. Micropropagação e potencial biotecnológico de *Hypnea musciformis* (Gigartinales – Rhodophyta). Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 148 p.
- Bravin, I.C., Valentin, Y.Y. & Yokoya, N.S.** 2006. Formação de calos e regeneração de segmentos apicais de *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Gigartinales, Rhodophyta): obtenção de culturas axênicas e efeitos de diferentes concentrações de ágar. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 175-182.

- Buggeln, R.G.** 1981. Morphogenesis and growth regulators. *In*: C.S. Lobban & M.J. Wynne (eds.). The biology of seaweeds. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 627-660.
- Chen, L.C.M. & McCracken, I.** 1993. An antibiotic protocol for preparing axenic cell cultures of *Porphyra linearis*. *Botanica Marina* 36: 29-33.
- Chen, L.C.M. & Taylor, A.R.A.** 1978. Medullary tissue culture of the red alga *Chondrus crispus*. *Canadian Journal of Botany* 56: 883-886.
- Collantes, G., Melo, C. & Candia, A.** 2004. Micropropagation by explants of *Gracilaria chilensis* Bird, McLachlan and Oliveira. *Journal of Applied Phycology* 16: 203-213.
- Evans, L.V. & Trewavas, A.J.** 1991. Is algal development controlled by plant growth substances? *Journal of Phycology* 27: 322-326.
- Fries, L.** 1963. On the cultivation of axenic red algae. *Physiologia Plantarum* 16: 695-708.
- Garcia-Jimenez, P., Rodrigo, M. & Robaina, R.R.** 1998. Influence of plant growth regulators, polyamines and glycerol on growth and morphogenesis of carposporelings of *Grateloupia* cultured *in vitro*. *Journal of Applied Phycology* 10: 95-100.
- Grattapaglia, D. & Machado, M.A.** 1998. Micropropagação. *In*: A.C. Torres & L.S. Caldas (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. ABCTP/EMBRAPA, Brasília, pp. 183-260.
- Huang, W. & Fujita, Y.** 1997a. Callus induction and thallus regeneration in some species of red algae. *Phycological Research* 45: 105-111.
- Huang, W. & Fujita, Y.** 1997b. Callus induction and thallus regeneration of the red alga *Meristotheca papulosa* (Rhodophyta, Gigartinales). *Botanica Marina* 40: 55-61.
- Iwasaki, H.** 1961. The life cycle of *Porphyra tenera* *in vitro*. *The Biological Bulletin* 121: 173-187.
- Jin, H., Seo, G., Cho, Y.C., Hwang, E., Sohn, C.H. & Hong, Y.** 1997. Gelling agents for tissue culture of the seaweed *Hizikia fusiformis*. *Journal of Applied Phycology* 9: 489-493.
- Kaczyna, F. & Megnet, R.** 1993. The effects of glycerol and plant growth regulators on *Gracilaria verrucosa* (Gigartinales, Rhodophyceae). *Hydrobiologia* 268: 57-64.
- Kumar, G.R., Reddy, C.R.K., Ganesan, M., Thiruppathi, S., Dipakkore, S., Eswaran, K., Subba Rao, P.V. & Jha, B.** 2004. Tissue culture and regeneration of thallus from callus of *Gelidiella acerosa* (Gelidiales, Rhodophyta). *Phycologia* 43 (5): 596-602.
- Lawlor, H.J., McComb, J.A. & Borowitzka, M.A.** 1991. A rapid and inexpensive method for surface sterilization of *Ecklonia radiata* (Phaeophyta) for tissue culture. *Botanica Marina* 34: 261-264.
- Liu, X., Rochas, C. & Kloareg, B.** 1990. Callus culture of *Pterocladia capillacea* (Rhodophyta) and analysis of cell wall polysaccharides. *Journal of Applied Phycology* 2: 297-303.

- McLachlan, J.** 1973. Growth media-marine. *In*: J.R. Stein (ed.). Handbook of phycological methods: cultures methods and growth measurements. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 25-51.
- Polne-Fuller, M. & Gibor, A.** 1987a. Tissue culture of seaweeds. *In*: K.T. Bird & P.H. Benson (eds.). Seaweed cultivation for renewable resources. Elsevier Scientific Publications, Amsterdam, pp. 219-239.
- Polne-Fuller, M. & Gibor, A.** 1987b. Calluses and callus-like growth in seaweeds: induction and culture. *Hydrobiologia* 151/152: 131-138.
- Reddy, C.R.K., Kumar, G.R.K., Siddhanta, A.K. & Tewari, A.** 2003. *In vitro* somatic embryogenesis and regeneration of somatic embryos from pigmented callus of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty (Rhodophyta, Gigartinales). *Journal of Phycology* 39: 610-616.
- Robaina, R.R., Garcia, P., García-Jimenez, P. & Luque, A.** 1990. Morphogenetic effect of glycerol on tissue cultures of the red seaweed *Grateloupia doryphora*. *Journal of Phycology* 2: 137-143.
- Robaina, R.R., García-Jimenez, P. & Luque, A.** 1992. The growth pattern and structure of callus from the red alga *Laurencia* sp. (Rhodophyta, Ceramiales) compared to shoot regeneration. *Botanica Marina* 35: 267-272.
- Roberts, L.W., Stiff, C.M. & Baba, S.** 1984. Effects of six different agars on tracheary element differentiation in explants of *Lactuca*. *Plant Tissue Culture Letters* 1: 22-24.
- Robledo, D.R. & Garcia-Reina, G.** 1993. Apical callus formation in *Solieria filiformis* (Gigartinales, Rhodophyta) cultured in tanks. *Hydrobiologia* 260/261: 401-406.
- Saga, N. & Sakai, Y.** 1983. Axenic tissue culture and callus formation of the marine algae *Laminaria angustata*. *Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Oceanography* 49: 1561-1563.
- Stoltz, L.P.** 1971. Agar restriction of the growth of excised mature *Iris* embryos. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 96: 681-684.
- Yokoya, N.S.** 1996. Controle do desenvolvimento e da morfogênese por auxinas e citocininas em três espécies de rodófitas: *Gracilariopsis tenuifrons*, *Grateloupia dichotoma* e *Solieria filiformis*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 202p.
- Yokoya, N.S.** 2000. Apical callus formation and plant regeneration controlled by plant growth regulators on axenic culture of the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycological Research* 48: 133-142.
- Yokoya, N.S., Guimarães, S.M.P.B. & Handro, W.** 1993. Development of callus-like structures and plant regeneration in thallus segments of *Grateloupia filiformis* Kützinger (Rhodophyta). *Hydrobiologia* 260/261: 407-413.
- Yokoya, N.S. & Handro, W.** 1996. Effects of auxins and cytokinin on tissue culture of *Grateloupia dichotoma* (Gigartinales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 326/327: 393-400.

- Yokoya, N.S. & Handro, W.** 2002. Effects of plant growth regulators and culture medium on morphogenesis of *Solieria filiformis* (Rhodophyta) cultured in vitro. *Journal of Applied Phycology* 14: 97-102.
- Yokoya, N.S., Kakita, H., Obika, H. & Kitamura, T.** 1999. Effects of environmental factors and plant growth regulators on growth of the red alga *Gracilaria vermiculophylla* from Shikoku Island, Japan. *Hydrobiologia* 398: 339-347.
- 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: A.R.O. Chapman, R.J. Anderson, V.J. Vreelnd & J.R. Dawison (eds.). Proceedings of the XVIIth International Seaweed Symposium, Oxford University Press, New York, pp. 425-433.*
- Yokoya, N.S., West, J.A. & Luchi, A.E.** 2004. Effects of plants growth regulators on callus formation, growth and regeneration in axenic tissue cultures of *Gracilaria tenuispitata* and *Gracilaria perplexa* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycological Research* 52: 244-25.

CAPÍTULO 2

Influência dos fitorreguladores e da irradiância no crescimento e na morfogênese em morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta)

Abstract

[The influence of plant growth regulators and irradiance on growth and morphogenesis in color morphs of *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta)]

The effects of plant growth regulators and irradiance on growth, callus formation and process of direct and indirect regeneration were studied in axenic cultures of the green and red morphs of *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie. Apical and intercalary segments from both color morphs were cultivated in ASP 12-NTA solid medium (0.5% agar) supplemented with two auxins [indole-3-acetic acid (IAA) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)] and two cytokinins [kinetin (K) and 6-benzylaminopurine (BA)] in concentrations from 0.5 to 50.0 μM , under two photon flux densities (50 and 150 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). In experiments to induce direct and indirect regenerations, explants and basal calluses isolated from apical and intercalary segments were cultivated in ASP 12-NTA liquid medium for four week, and afterwards in von Stosch liquid medium for three weeks, with the same concentrations of plant growth regulators and irradiances when cultured in solid medium. Experiments were conducted under temperature of $22\pm 2^\circ\text{C}$, photoperiod of 14 h, pH 8, and salinity of 30 psu. Treatments were tested with 3 replicates with 9 explants in each. Data were submitted to analysis of variance of one or two factors, followed by Student-Newman-Keuls' test. In general, 2,4-D inhibited growth processes while IAA and cytokinins stimulated them. Plant growth regulators and irradiance did not influence callus formation and indirect regeneration. On the other hand, 2,4-D and the cytokinins promoted the rate of direct regeneration in apical and intercalary segments of the green morph under high irradiance (150 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). For both color morphs, rates of direct and indirect regeneration on explants and basal calluses, respectively, were higher when cultivated under higher irradiance than the lower irradiance. Stimulatory effects of plant growth regulators in apical and intercalary segments of green and red morphs of *Gracilaria domingensis* occurred mainly in high irradiance. Our results indicate that plant growth regulators have a regulatory role on growth processes and on direct regeneration. Moreover, the red morph showed higher performance than the green morph, indicating that this morph could be more suitable for micropropagation, considering the commercial cultivation of *Gracilaria domingensis*.

Resumo

Os efeitos dos fitorreguladores e da irradiância no crescimento, na formação de calos e nos processos de regeneração direta e indireta foram avaliados em culturas axênicas de morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie. Segmentos

apicais e intercalares dos dois tipos de morfos foram cultivados em meio sólido ASP 12-NTA (0,5% de ágar) com duas auxinas [ácido indolil-3-acético (AIA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)] e duas citocininas [cinetina (K) e benzilaminopurina (BA)] em concentrações de 0,5 a 50,0 μM , sob dois níveis de irradiância (50,0 e 150,0 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Para a indução de regenerações direta e indireta, os explantes e calos basais isolados de segmentos apicais e intercalares foram cultivados em meio líquido ASP 12-NTA por quatro semanas e, posteriormente, foram cultivados em meio líquido von Stosch por mais três semanas, mantendo-se as mesmas concentrações de fitorregulador e de irradiância utilizadas no cultivo com meio sólido. Todos os experimentos foram realizados em temperatura de $22\pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 14 h, pH 8 e salinidade 30 ups. Os tratamentos foram testados com 3 repetições com 9 explantes em cada. Os resultados foram submetidos a análise de variância de um ou de dois fatores e ao teste de comparação de Student-Newman-Keuls. De maneira geral, o 2,4-D inibiu os processos de crescimento e as citocininas e o AIA estimularam. O efeito dos fitorreguladores na formação de calos foi nulo para ambos os morfos de *Gracilaria domingensis*. O efeito dos fitorreguladores e da irradiância na formação de regenerações indiretas foi nulo. Por outro lado, o 2,4-D e as citocininas estimularam a taxa de regeneração direta de segmentos apicais e intercalares do morfo verde, cultivados sob a irradiância de 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Para ambos os morfos, as taxas de regeneração direta e indireta foram maiores quando os explantes e os calos basais foram cultivados sob alta irradiância (150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Os efeitos estimulatórios dos fitorreguladores em segmentos apicais e intercalares dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis* ocorreram principalmente quando cultivados sob alta irradiância. Os resultados indicam que os fitorreguladores exercem um papel regulador nos processos de crescimento e na regeneração direta. Além disso, o morfo vermelho apresentou um desempenho superior ao morfo verde, indicando que esse morfo pode ser mais adequado para a micropropagação, tendo em vista o cultivo comercial de *Gracilaria domingensis*.

Introdução

As técnicas de cultura *in vitro*, embora possam ser aplicadas às macroalgas marinhas visando a seleção e propagação de linhagens com características específicas e que possuam maior potencial econômico (Huang & Fujita 1997a, Yokoya & Handro 1996, Yokoya 2000), são pouco exploradas devido a falta de conhecimento sobre aspectos do desenvolvimento de cada espécie. A fim de contribuir ao entendimento do desenvolvimento das macroalgas marinhas, estudos sobre a influência da aplicação exógena de fitorreguladores têm sido realizados, principalmente no que diz respeito a formação de calos e regeneração de plântulas adventícias a partir destes, uma vez que essas plântulas adventícias podem ser utilizadas como mudas para o cultivo comercial (Roberts *et al.* 1984, Jin *et al.* 1997). Nesse contexto, podem ser citados os estudos realizados com *Furcellaria fastigiata* (Turner) J.V. Lamouroux, *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss, *Phyllophora nervosa* (A.P. de Candolle) Greville (Gusev *et al.* 1987), *Eckonia radiata* (C. Agardh) J. Agardh (Lawlor *et al.* 1988), *Agardhiella subulata* (C. Agardh) Kraft & M.J. Wynne (Bradley & Cheney 1990), *Porphyra umbilicalis* (Linnaeus) Kützting (Liu & Kloareg 1991) e *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty (Muñoz *et al.* 2006), onde a aplicação de auxinas e ou/citocininas exerceram um efeito estimulatório na formação e crescimento de calos. Para *Grateloupia dichotoma* J. Agardh, a aplicação exógena de altas concentrações de auxinas e citocininas estimularam o processo de regeneração de plântulas adventícias (Yokoya & Handro 1996). Em *Meristotheca papulosa* J. Agardh a combinação de ácido indolil-3-acético (AIA) e benzilaminopurina (BA) não teve efeito significativo em relação à taxa de indução de calos, mas estimulou o crescimento desta estrutura (Huang e Fujita 1997b). Huang & Fujita (1997b) demonstraram que AIA e BA foram eficientes para indução de calos e regeneração de plântulas em um estudo realizado com 14 espécies de rodofíceas. O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) promoveu a indução de calos em *Grateloupia doryphora* (Montagne) M.A. Howe, enquanto que BA e cinetina (K) foram inibitórios (Garcia-Jimenez *et al.* 1998). Para *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss, a adição de auxinas e citocininas promoveu a formação de calos (Yokoya *et al.* 1999). Tratamentos com zeatina (Z) e ácido fenilacético promoveram a regeneração de plântulas adventícias a partir de calos em *Octodes secundiramea* (Montagne) Howe (Maliakal *et al.* 2001). As auxinas e/ou citocininas estimularam o crescimento de filamentos em explantes de *Solieria filiformis* (Kützting) Gabrielson (Yokoya e Handro 2002). As auxinas AIA, 2,4-D e a citocinina K estimularam a indução de calos e regeneração de plântulas adventícias de *Gracilaria perplexa* Byrne et Zuccarello e *Gracilaria tenuistipitata* Chang et Xia (Yokoya *et al.* 2004). Bravin (2005) observou que baixas concentrações de auxinas e

citocininas induziram as maiores taxas de formação de calos e o crescimento de regenerações em *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux.

A interação entre luz e fitorreguladores pode influenciar os níveis e o metabolismo dos fitorreguladores (Tian & Reed 2001), como também pode alterar a sensibilidade das células ao fitorregulador (Evans 1984). No entanto, poucos estudos investigaram a influência destes dois fatores na formação de calos e na regeneração de plântulas adventícias nas macroalgas marinhas. Em *Grateloupia dichotoma*, o processo de regeneração não ocorre em calos cultivados em baixa irradiância, apesar da presença de fitorreguladores (Yokoya & Handro 1996). Em baixa irradiância, a linhagem verde clara de *Hypnea musciformis* apresentou formação de calos em todos os tratamentos com auxinas e citocininas, enquanto que a linhagem marrom produziu calos somente em tratamentos com altas concentrações destes fitorreguladores (Yokoya *et al.* 2003).

Tendo em vista a escassez de estudos relacionados à influência da irradiância e de fitorreguladores sobre o desenvolvimento *in vitro* de macroalgas marinhas, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência de diferentes concentrações de fitorreguladores (AIA, 2,4-D, K e BA) sob dois níveis de irradiância (50,0 e 150,0 $\mu\text{mol de fótons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) no crescimento e na morfogênese de segmentos apicais e intercalares dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder *ex* Dickie.

Materiais & Métodos

Culturas unialgáceas

Três indivíduos do morfo verde (VD – 124, 125, e 126) e três indivíduos do morfo vermelho (VM – 127, 128 e 129) de *Gracilaria domingensis* foram cultivados em frascos (100 ml) contendo 50 ml de meio von Stosch a 25%, temperatura de $22\pm 2^\circ\text{C}$, irradiância de 50 - 80 $\mu\text{mol de fótons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 14 h luz. A troca do meio de cultura foi realizada semanalmente.

Efeitos dos fitorreguladores e da irradiância no crescimento de explantes e na formação de calos

Com base nos resultados descritos no Capítulo 2, os explantes axênicos dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis* foram obtidos a partir do tratamento por 48 h em meio von Stosch a 25% acrescido de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de nistatina (Sigma) e 1 $\text{ml}\cdot\text{L}^{-1}$ da solução

antibiótica e antimicótica de Provasoli (Sigma), e posterior lavagem por 20s em solução de água do mar esterilizada com hipoclorito de sódio a 0,5% (Synth) e 200 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de detergente orgânico (Anway).

Segmentos apicais e intercalares axênicos de 3 mm, provenientes dos indivíduos de ambos os morfos foram inoculados em 40 ml de meio ASP 12-NTA (Iwasaki 1961) na forma sólida. Após a adição de auxinas ou citocininas ao meio, o pH foi ajustado para 8,0. Para obter-se o meio sólido, acrescentou-se 0,5% de ágar (Merck) ao meio ASP 12-NTA. Este meio foi distribuído em frascos de vidro vedados com tampas de polipropileno (ambos da Sigma) e autoclavado a 121°C durante 15 minutos.

As auxinas [ácido indolil-3-acético (AIA) (Merck) e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Merck)] e as citocininas [benzilaminopurina (BA) (Merck) e cinetina (K) (Merck)] foram testadas isoladamente nas concentrações de 0,5, 5,0 e 50,0 μM . No presente estudo, os tratamentos testados receberam a seguinte numeração:

Fitorregulador	Controle	AIA			2,4-D			K			BA		
Concentrações (μM)	0,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0
Nº do tratamento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

A inoculação dos explantes foi realizada em condições assépticas, no interior de uma câmara de fluxo laminar (VECO) e os frascos foram vedados com filme de PVC transparente (esterilizado com radiação UV).

Os experimentos foram realizados sob as mesmas condições descritas para as culturas unialgáceas, com exceção da irradiância. As irradiâncias testadas foram $50,0 \pm 5 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e $150,0 \pm 5 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Cada tratamento constituiu-se de 3 repetições com 9 explantes em cada repetição (3 explantes de cada indivíduo). Após 8 semanas, foram analisadas a massa da matéria fresca (para o cálculo da taxa de crescimento), comprimento do explante, área do calo (comprimento x largura) e a porcentagem de indução de calos (n° total de calos/ n° total de explantes x 100%). Os explantes foram fotografados com o auxílio de uma câmera fotográfica digital (Sony DSC-S75) e analisados no software Axiovision v. 3.1 (Carl Zeiss).

A taxa de crescimento (TC) foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{TC} = (\ln \text{ massa final} - \ln \text{ massa inicial}) / (\text{Tempo final} - \text{tempo inicial})$$

Efeitos dos fitorreguladores e da irradiância na regeneração direta e indireta

Os experimentos de regeneração foram realizados nas mesmas condições descritas para o experimento de crescimento e formação de calos (item anterior), diferindo somente no estado do meio ASP 12-NTA. Calos basais produzidos no experimento anterior foram isolados e transferidos para frascos com 40 ml de meio líquido ASP 12-NTA, contendo a mesma concentração de fitorregulador e cultivados no mesmo nível de irradiância por quatro semanas. Ao final de quatro semanas, o meio ASP 12-NTA foi substituído pelo meio líquido von Stosch a 25%, com a mesma concentração de fitorregulador, o mesmo nível de irradiância e demais condições experimentais. Após três semanas, foram avaliados o número de eixos eretos por calo (taxa de regeneração indireta – expressa em porcentagem), o número de eixos eretos por explante (taxa de regeneração direta – expressa em porcentagem) e o comprimento dos eixos eretos resultantes das regenerações.

Cada tratamento constituiu-se de 3 repetições com 3 calos basais para cada repetição. A troca do meio de cultura foi realizada semanalmente em câmara de fluxo laminar.

Estudos anatômicos

Ao final do experimento, os explantes foram fixados em formol a 4% em água do mar. Para os estudos anatômicos, foram realizados cortes longitudinais e transversais das estruturas com o auxílio de lâmina de barbear. Os cortes foram corados com solução aquosa de azul de anilina a 0,5% acidificada pela adição de HCl 1 N (Wiseman 1976). Os cortes foram fotografados com o auxílio de uma câmera fotográfica digital (Sony DSC-S75) acoplada ao microscópio (Axioskop 2 – Carl Zeiss) e analisadas no software Axiovision v. 3.1 (Carl Zeiss). As medidas apresentadas são resultados da média de 10 medições aleatórias.

Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de um e dois fatores e ao teste de comparação de Student-Newman-Keuls. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SigmaStat (versão 1.0).

Resultados

Anatomia dos calos formados em morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis*

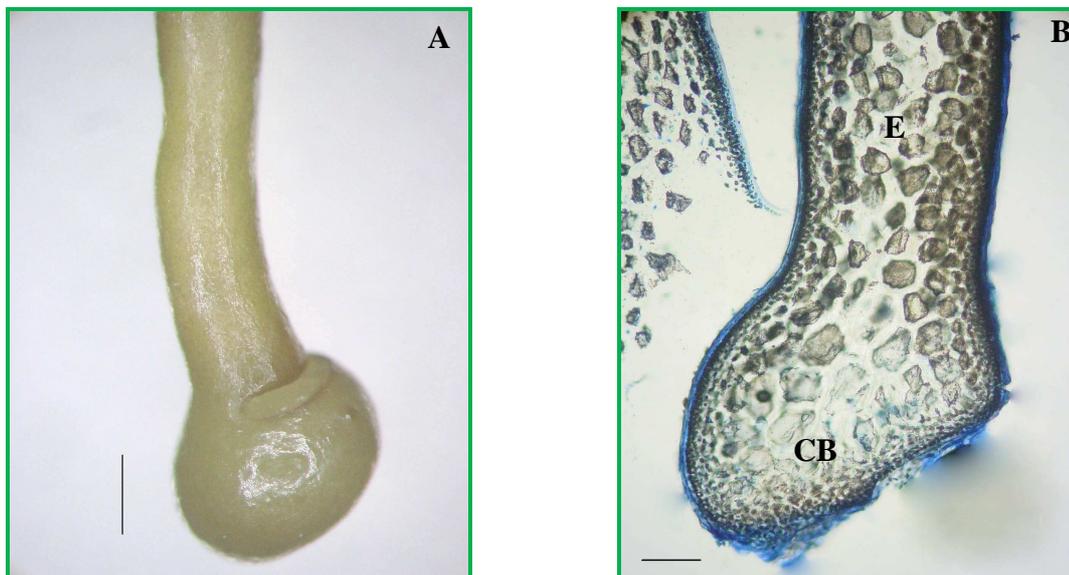
Os segmentos apicais e intercalares dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis* desenvolveram calos em diferentes regiões do explante: os segmentos apicais de ambos os morfos desenvolveram calo basal, formado na região distal do explante, onde foi realizada inicialmente a secção do mesmo, calo apical formado na região apical dos segmentos apicais, e calo intermediário, formado nas regiões intermediárias do explante. Nos segmentos intercalares dos morfos verde e vermelho observou-se apenas a formação de calo basal e calo intermediário.

O calo basal de ambos os morfos apresentou aspecto compacto, formado pelas divisões e aumento nas dimensões das células corticais e medulares do explante, na região onde foi feita a secção do segmento. O calo basal apresentou uma organização estrutural semelhante a do talo, com a diferenciação de uma região cortical e medular. As células da camada cortical do calo basal do morfo verde e vermelho de *Gracilaria domingensis* medem cerca de 10-17 μm de diâmetro e as células da camada medular de 90-115 x 110-160 μm ; no explante, as células corticais possuem diâmetro de 10-20 μm e as células medulares 90-170 x 100-250 μm (figuras 1A-D).

Os calos apicais de ambos os morfos se originaram a partir da divisão das células apicais e corticais localizada na região apical do segmento. As células da região apical dividiram-se várias vezes, produzindo células pequenas, pigmentadas e que não apresentaram uma organização semelhante ao talo, ou seja, sem a diferenciação das regiões cortical e medular. As células dos calos apicais possuem de 12-15 μm de diâmetro; no explante, as células apicais do talo possuem diâmetro de 9-16 μm e as células medulares 70-100 x 100-130 μm (figuras 2A-D).

Os calos intermediários formados nos segmentos dos morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* foram originados a partir da divisão das duas camadas de células corticais, formando uma estrutura desorganizada, sem diferenciação de córtex e medula como o talo. As células dos calos intermediários possuem de 10-18 μm de diâmetro; no explante, as células corticais possuem diâmetro de 10-20 μm e as células medulares 80-120 x 100-140 μm (figuras 3A-D).

Morfo Verde



Morfo Vermelho

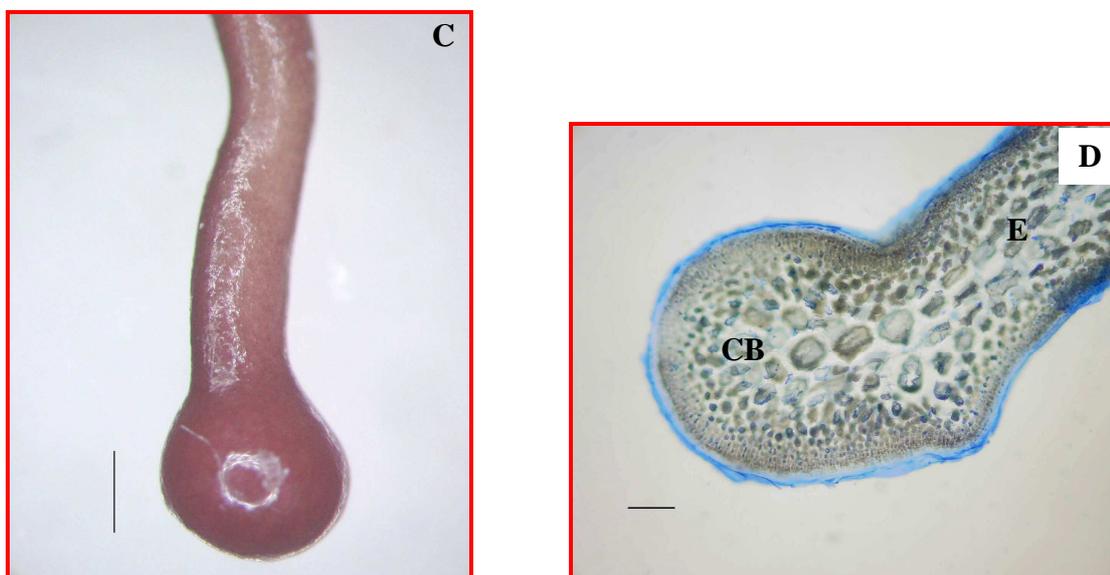
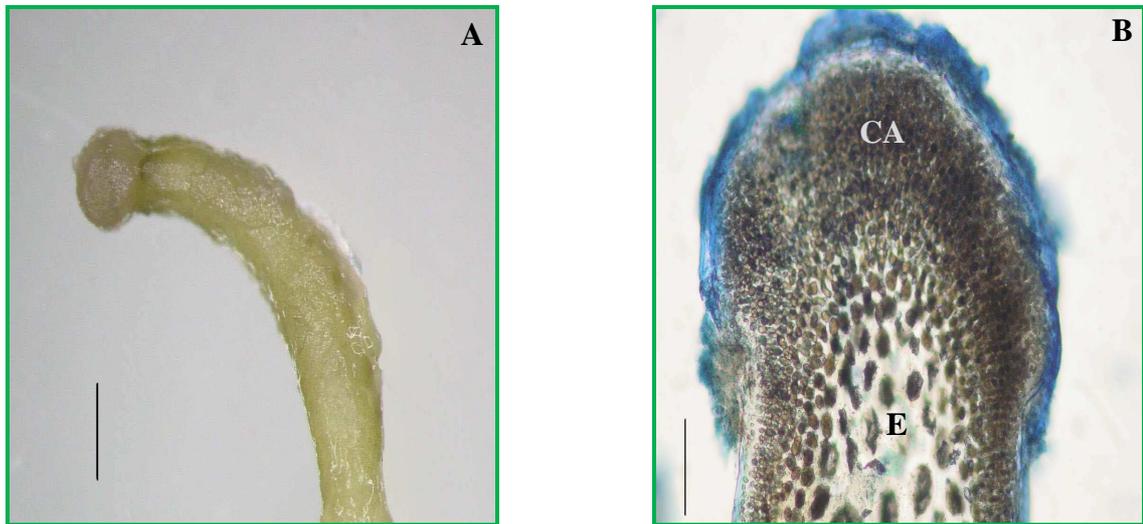


Figura 1: Calos basais dos morfos verde (A-B) e vermelho (C-D) de *Gracilaria domingensis*. Aspecto geral (A) e Corte longitudinal (B) do calo basal do segmento apical cultivado em meio sólido ASP 12-NTA (0,5% de ágar) com 2,4-D (5,0 μM) sob a irradiância 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Aspecto geral (C) e Corte longitudinal (D) do calo basal do segmento intercalar cultivado em meio sólido ASP 12-NTA (0,5% de ágar) com K (50,0 μM) sob a irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ E: explante; CB: calo basal. Escalas: 0,6 mm (A); 200 μm (B); 1,0 mm (C); 200 μm (D).

Morfo Verde



Morfo Vermelho

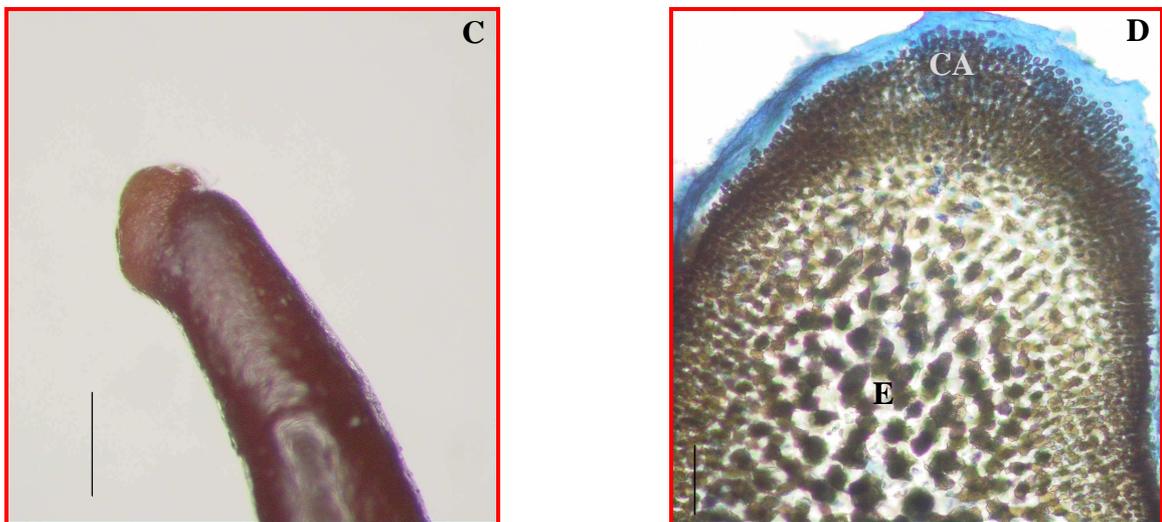
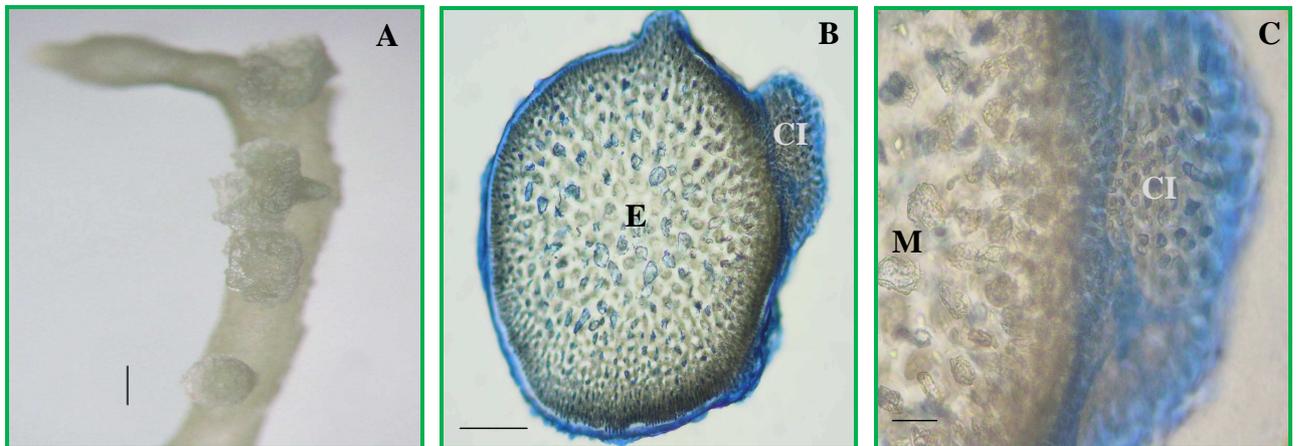


Figura 2: Calos apicais dos morfos verde (A-B) e vermelho (C-D) de *Gracilaria domingensis*. Aspecto geral (A) e Corte longitudinal (B) do calo apical do segmento apical cultivado em meio sólido ASP 12-NTA (0,5% de ágar) com AIA (0,5 μM) sob a irradiância 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Aspecto geral (C) e Corte longitudinal (D) do calo apical do segmento apical cultivado em meio sólido ASP 12-NTA (0,5% de ágar) com 2,4-D (0,5 μM) sob a irradiância de 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ E: explante; CA: calo apical. Escalas: 1,0 mm (A); 200 μm (B); 0,6 mm (C); 200 μm (D).

Morfo Verde



Morfo Vermelho

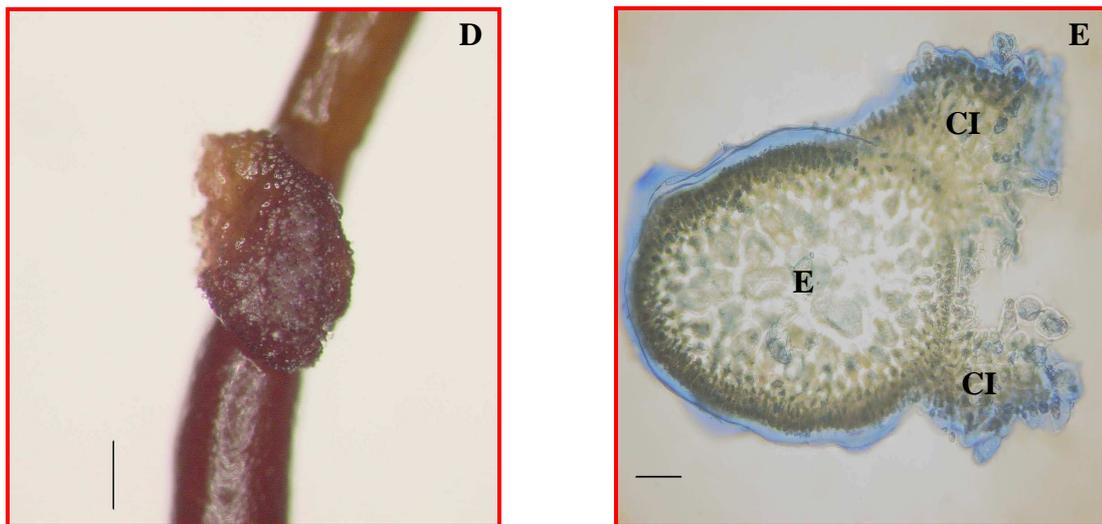


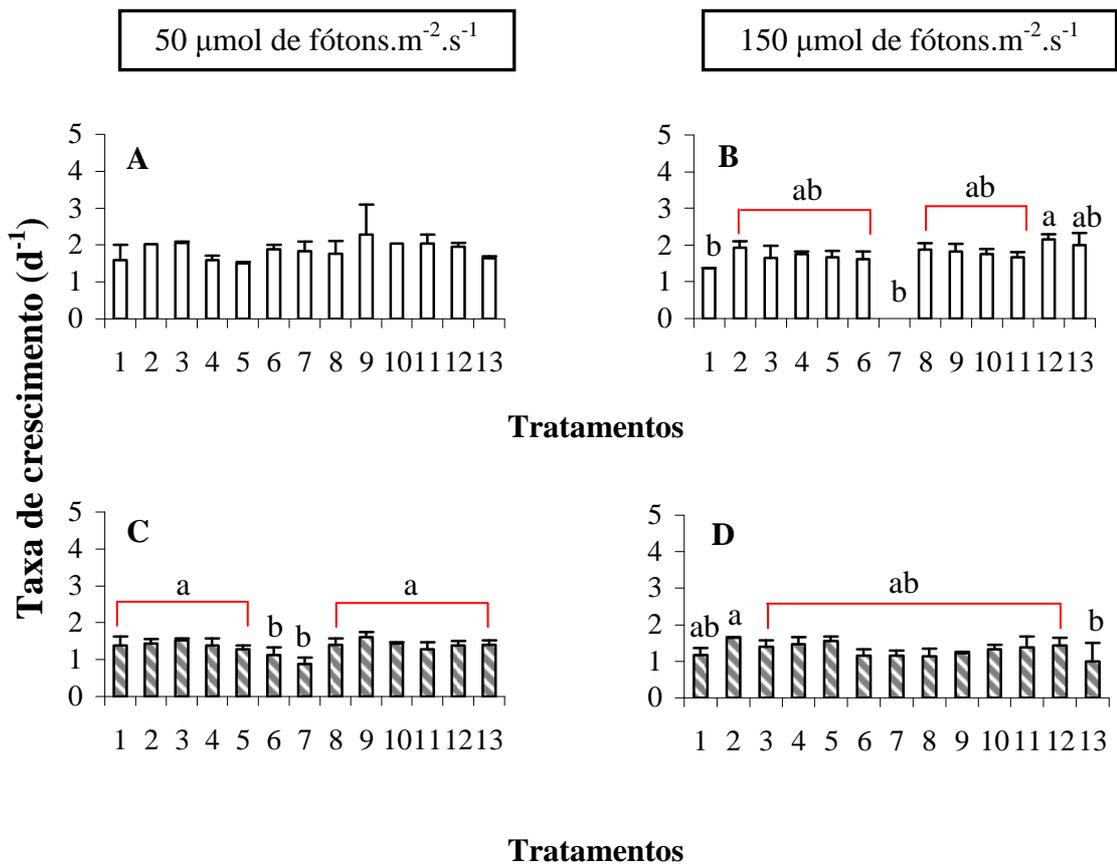
Figura 3: Calos intermediários dos morfos verde (A-B) e vermelho (C-D) de *Gracilaria domingensis*. Aspecto geral (A) e Corte longitudinal (B e C) do calo intermediário do segmento intercalar cultivado em meio sólido ASP 12-NTA (0,5% de ágar) com 2,4-D (0,5 μM) sob a irradiância 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Aspecto geral (D) e Corte longitudinal (E) do calo intermediário do segmento intercalar cultivado em meio sólido ASP 12-NTA (0,5% de ágar) com AIA (50,0 μM) sob a irradiância de 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ E: explante; CI: calo intermediário; M: células medulares. Escalas: 0,6 mm (A); 200 μm (B); 60 μm (C); 0,6 mm (D); 100 μm (E).

Efeitos dos fitorreguladores e da irradiância no crescimento dos explantes

TC DOS EXPLANTES DO MORFO VERDE: As TC dos segmentos apicais do morfo verde cultivados sob a irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos testados (figura 4A). Quando cultivados sob a irradiância de 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, o tratamento BA (5,0 μM) estimulou o crescimento, enquanto que o tratamento com alta concentração de 2,4-D (50,0 μM) foi letal para os mesmos (figura 4B). Para os segmentos intercalares cultivados sob a irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, altas concentrações de 2,4-D (5,0 e 50,0 μM) inibiram as TC (figura 4C). Sob a irradiância de 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, baixa concentração de AIA (0,5 μM) promoveu o crescimento dos segmentos intercalares, enquanto que alta concentração de BA (50,0 μM) inibiu o seu crescimento (figura 4D).

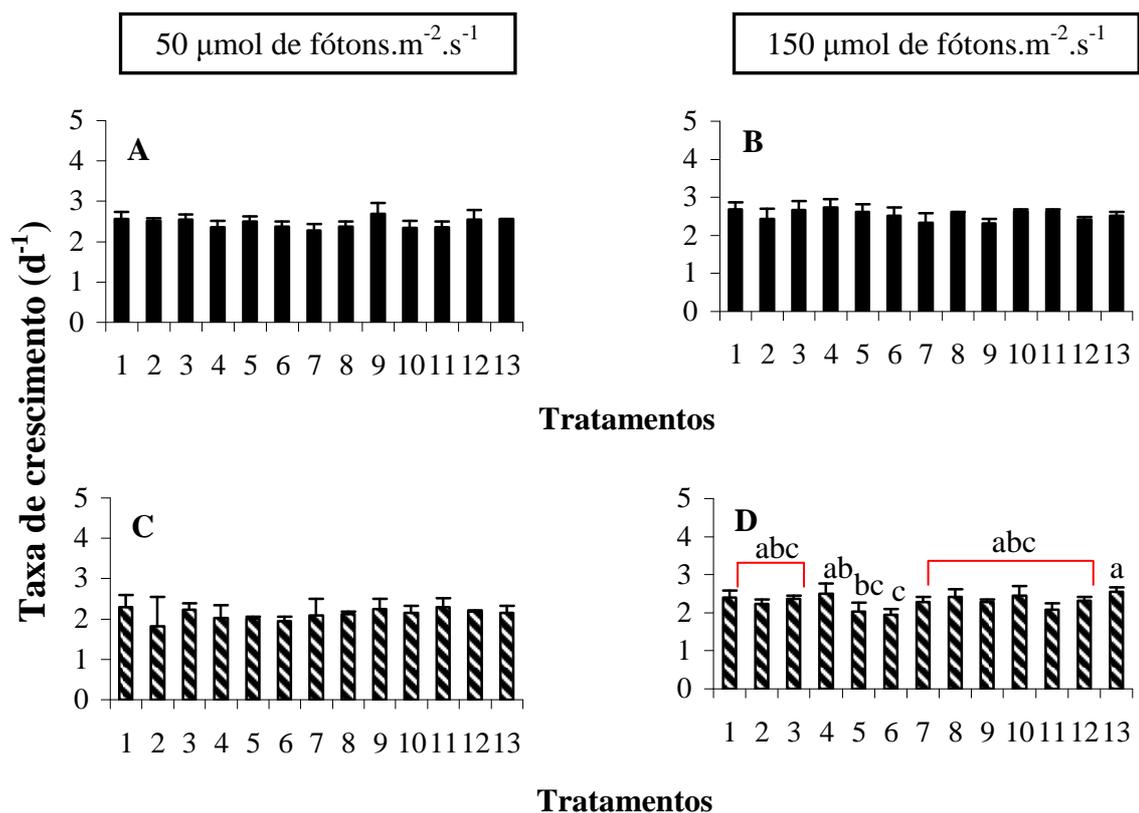
TC DOS EXPLANTES DO MORFO VERMELHO: Para o crescimento do morfo vermelho, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos testados para os segmentos apicais cultivados sob as irradiâncias de 50 e 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (figuras 5A e B).

As TC dos segmentos intercalares do morfo vermelho não foram influenciadas pelos diferentes tratamentos com fitorreguladores quando cultivados sob a irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (figura 5C). Por outro lado, as TC dos segmentos intercalares cultivados sob a irradiância de 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foram estimuladas pelos tratamentos com altas concentrações de AIA e BA (50,0 μM) e inibida pelos tratamentos com baixa concentração de 2,4-D (0,5 e 5,0 μM) (figura 5D).



Tratamentos													
Fitorregulador	Controle	AIA			2,4-D			K			BA		
Concentrações (μM)	0,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0
Nº do tratamento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Figura 4: Taxa de crescimento ($\%.\text{d}^{-1}$) de segmentos apicais (A e B) e intercalares (C e D) do morfo verde de *Gracilaria domingensis* cultivados em meio ASP 12-NTA com 0,5% de ágar em diferentes concentrações de fitorreguladores nas irradiâncias de 50 e 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ após 8 semanas. Explante inicial com 3 mm de comprimento. Valores correspondem a média ($n=3 \pm$ desvio padrão) com nove explantes em cada repetição. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

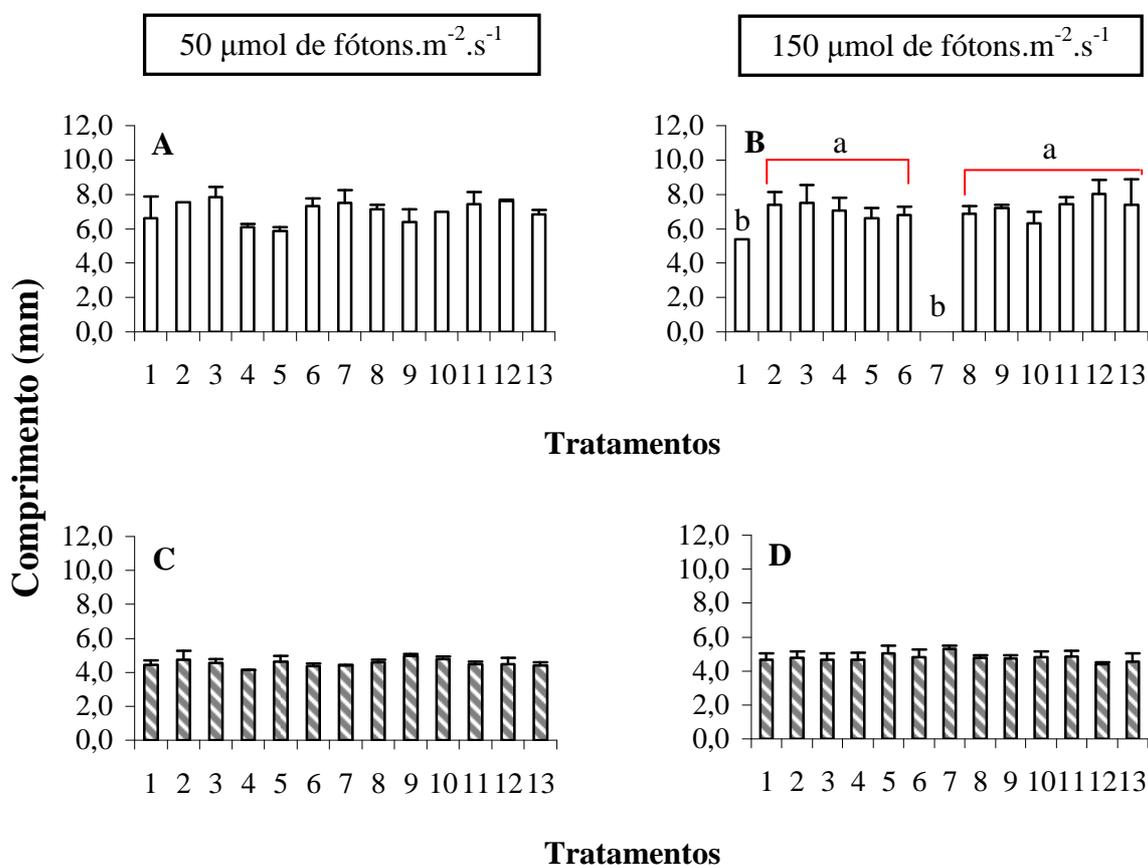


Fitorregulador	Controle	AIA			2,4-D			K			BA		
Concentrações (μM)	0,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0
Nº do tratamento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Figura 5: Taxa de crescimento ($\%.\text{d}^{-1}$) de segmentos apicais (A e B) e intercalares (C e D) do morfo vermelho de *Gracilaria domingensis* cultivados em meio ASP 12-NTA com 0,5% de ágar em diferentes concentrações de fitorreguladores nas irradiâncias de 50 e 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ após 8 semanas. Explante inicial com 3 mm de comprimento. Valores correspondem a média ($n=3 \pm$ desvio padrão) com nove explantes em cada repetição. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

VARIAÇÃO NO COMPRIMENTO DOS EXPLANTES DO MORFO VERDE: Com relação ao crescimento em comprimento, os diferentes tratamentos com auxinas e citocininas não apresentaram efeitos significativos para os segmentos apicais do morfo verde cultivados sob a irradiância de 50 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (figura 6A). Por outro lado, os tratamentos com auxinas e citocininas promoveram o crescimento dos segmentos apicais cultivados sob a irradiância de 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ quando comparados ao controle, e o tratamento com alta concentração de 2,4-D (50,0 μM) foi letal para este tipo de segmento (figura 6B). O

crescimento em comprimento dos segmentos intercalares cultivados sob as irradiâncias de 50 e 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ não foi influenciado pelos diferentes tratamentos testados (figuras 6C e D).

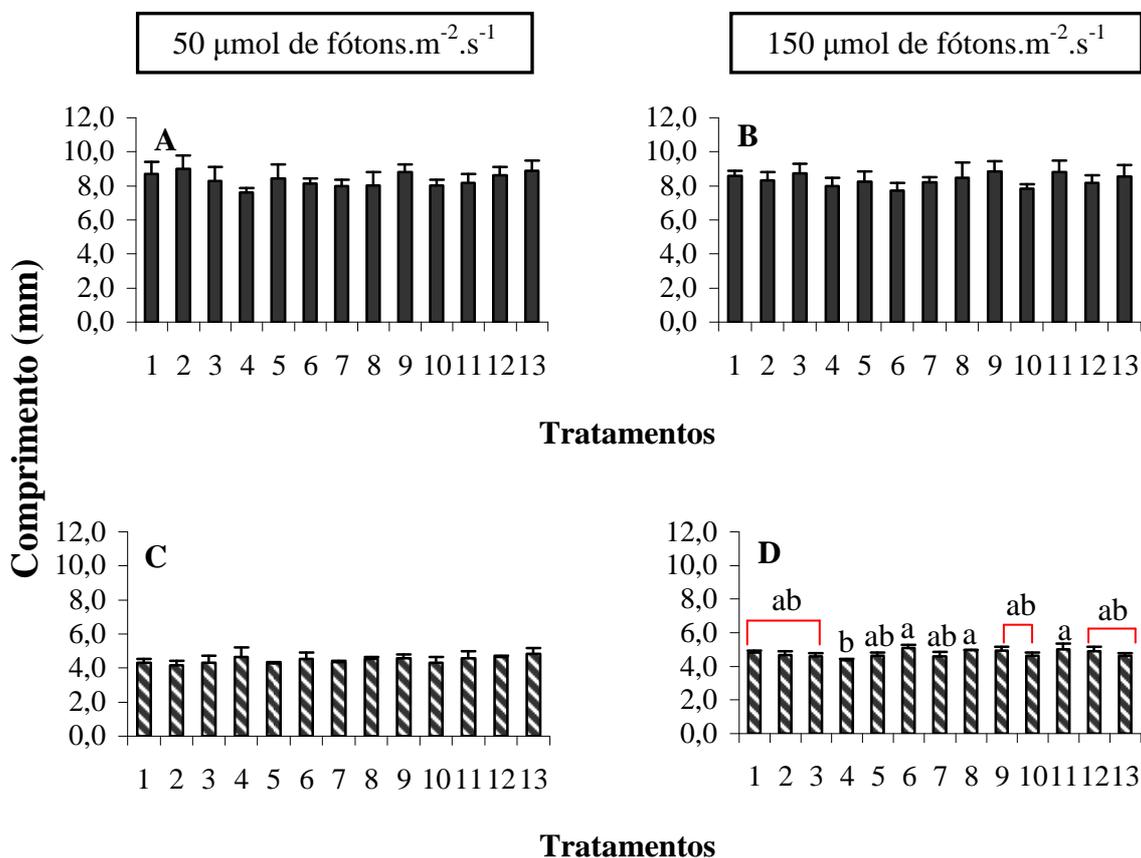


Fitorregulador	Controle	AIA			2,4-D			K			BA		
Concentrações (μM)	0,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0
Nº do tratamento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Figura 6: Variação do comprimento de segmentos apicais (A e B) e intercalares (C e D) do morfo verde de *Gracilaria domingensis* cultivados em meio ASP 12-NTA com 0,5% de ágar em diferentes concentrações de fitorreguladores nas irradiâncias de 50 e 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ após 8 semanas. Explante inicial com 3 mm de comprimento. Valores correspondem a média ($n=3 \pm$ desvio padrão) com nove explantes em cada repetição. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

VARIAÇÃO NO COMPRIMENTO DOS EXPLANTES DO MORFO VERMELHO: O crescimento em comprimento dos segmentos apicais do morfo vermelho não foi influenciado pelos diferentes tratamentos com fitorreguladores quando cultivados sob as irradiâncias de 50 e 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (figuras 7A e B). Para os segmentos intercalares do morfo vermelho

cultivados sob a irradiância de $50 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, os fitorreguladores não apresentaram efeitos significativos no crescimento em comprimento (figura 7C), enquanto que o 2,4-D ($5,0 \mu\text{M}$) e baixas concentrações de citocininas (K - $0,5 \mu\text{M}$ e BA - $0,5 \mu\text{M}$) estimularam e alta concentração de AIA ($50,0 \mu\text{M}$) inibiu o crescimento dos segmentos intercalares cultivados sob a irradiância de $150 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (figura 7D).



Fitorregulador	Controle	AIA			2,4-D			K			BA		
Concentrações (μM)	0,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0
Nº do tratamento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

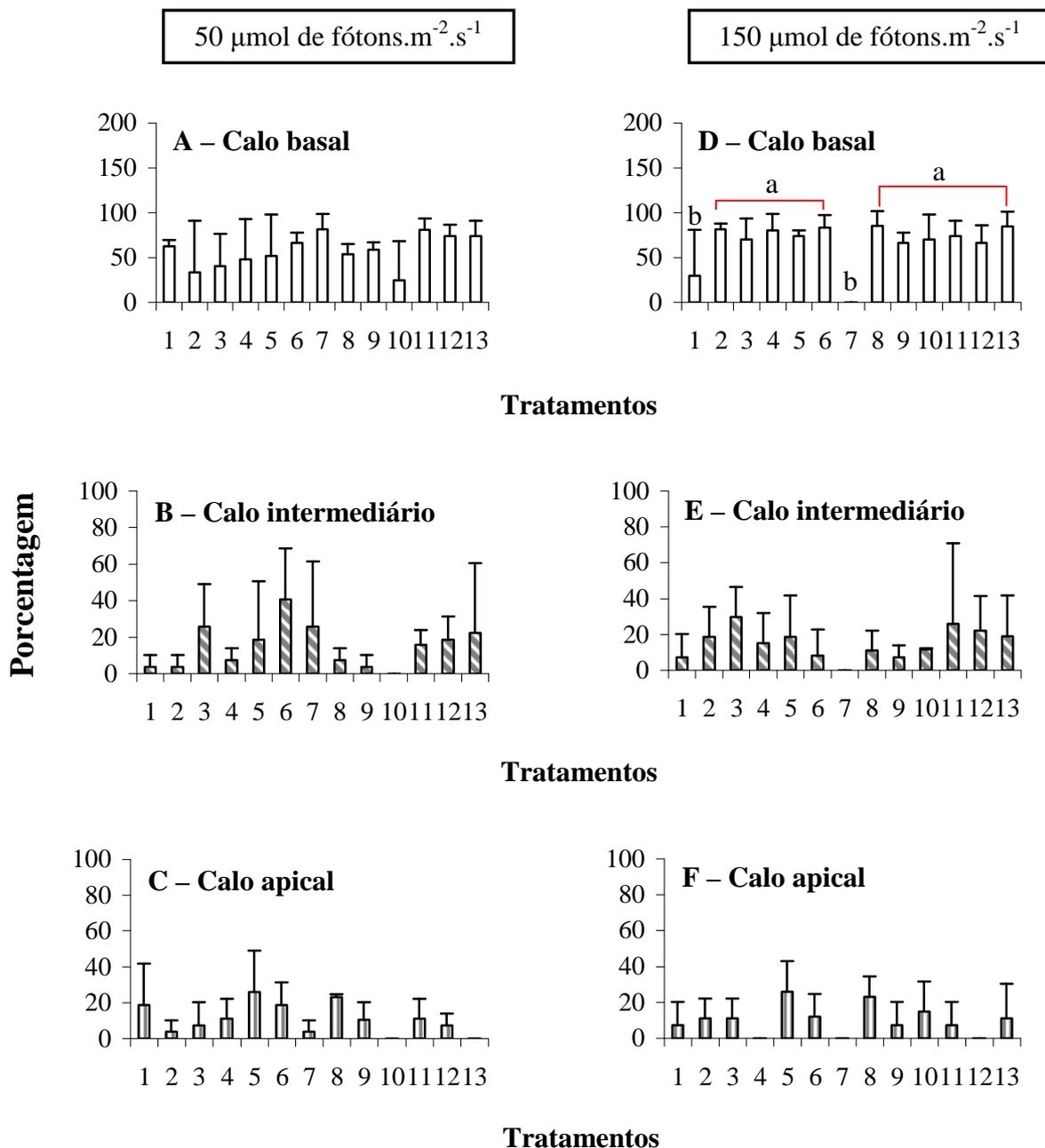
Figura 7: Variação do comprimento de segmentos apicais (A e B) e intercalares (C e D) do morfo vermelho de *Gracilaria domingensis* cultivados em meio ASP 12-NTA com 0,5% de ágar em diferentes concentrações de fitorreguladores nas irradiâncias de 50 e $150 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ após 8 semanas. Explante inicial com 3 mm de comprimento. Valores correspondem a média ($n=3 \pm$ desvio padrão) com nove explantes em cada repetição. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

Efeitos dos fitorreguladores e da irradiância na formação e no crescimento de calos

FORMAÇÃO DE CALOS NO MORFO VERDE: Nos segmentos apicais do morfo verde cultivados sob as irradiâncias de 50 e 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foram observadas a formação dos três tipos de calos. As porcentagens de formação de calos basais foram maiores em relação aos calos apicais e intermediários. As porcentagens de formação dos três tipos de calos não foram influenciadas pela aplicação exógena de auxinas e citocininas sob a irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (figuras 8A, B e C). Quando cultivados sob a irradiância de 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, todos os tratamentos testados estimularam a formação de calo basal em segmentos apicais quando comparados ao tratamento controle, exceto o tratamento com alta concentração de 2,4-D (50,0 μM), que foi letal aos explantes (figura 8D). Tanto a formação de calos intermediários quanto a de calos apicais não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos testados (figuras 8E e F).

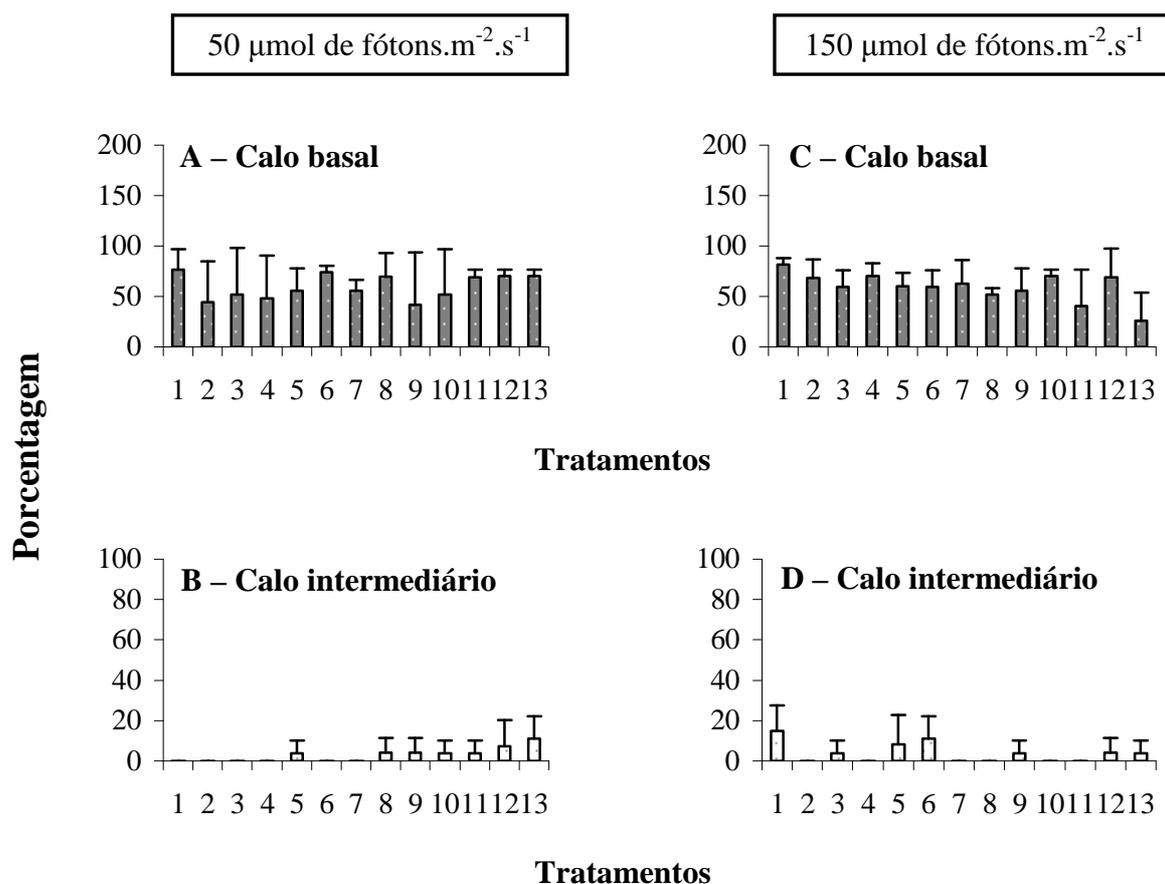
Os segmentos intercalares do morfo verde cultivados sob as irradiâncias de 50 e 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ apresentaram apenas a formação de calos basais e calos intermediários. Os diferentes tipos de fitorreguladores não apresentaram efeitos significativos nas porcentagens de formação de calos dos segmentos intercalares quando cultivados sob a irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (figuras 9A e B). As porcentagens de formação de calos basais e intermediários não foram influenciadas pelos diferentes tratamentos testados quando cultivados sob a irradiância de 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (figuras 9C e D). Calos intermediários não se desenvolveram nos tratamentos com baixa concentração de AIA, K e BA (0,5 μM) e com alta concentração de AIA e K (50,0 μM) (figura 9D).

FORMAÇÃO DE CALOS NO MORFO VERMELHO: Para os segmentos apicais do morfo vermelho cultivados sob as irradiâncias de 50 e 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, também foram observadas a formação dos três tipos de calos. Em ambas as irradiâncias testadas, os diferentes tratamentos com fitorreguladores não influenciaram as porcentagens de formação de calos para este segmento (figuras 10A-F). No tratamento 2,4-D (0,5 μM) cultivado sob a irradiância de 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ não houve formação de calos intermediários (figura 10F). Os diferentes tratamentos com auxinas e citocininas não influenciaram as porcentagens de formação de calos basais e intermediários nos segmentos intercalares do morfo vermelho quando cultivados sob as irradiâncias de 50 e 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (figuras 11 A-D).



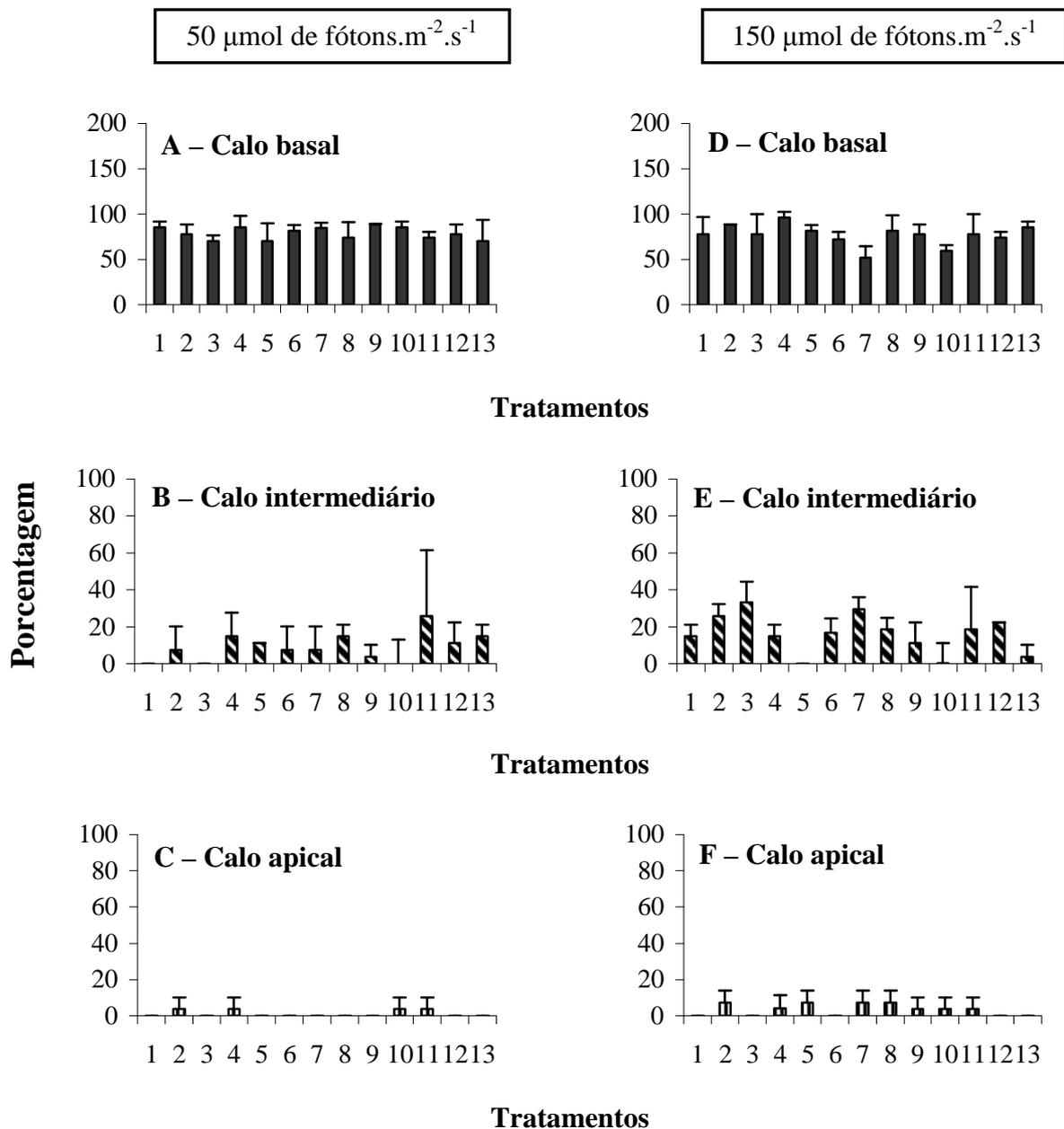
Fitorregulador	Controle	AIA			2,4-D			K			BA		
Concentrações (μM)	0,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0
Nº do tratamento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Figura 8: Porcentagem de formação de calos (nº de calos por nº total de explantes x 100%) em segmentos apicais do morfo verde de *Gracilaria domingensis* cultivados em meio ASP 12-NTA com 0,5% de ágar em diferentes concentrações de fitorreguladores nas irradiâncias de 50 (A-C) e 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (D-F) após 8 semanas. Explante inicial com 3 mm de comprimento. Valores correspondem a média ($n=3 \pm$ desvio padrão) com nove explantes em cada repetição. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.



Fitorregulador	Controle	AIA			2,4-D			K			BA		
Concentrações (μM)	0,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0
Nº do tratamento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Figura 9: Porcentagem de formação de calos (nº de calos por nº total de explantes x 100%) em segmentos intercalares do morfo verde de *Gracilaria domingensis* cultivados em meio ASP 12-NTA com 0,5% de ágar em diferentes concentrações de fitorreguladores nas irradiâncias de 50 (A-B) e 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (C-D) após 8 semanas. Explante inicial com 3 mm de comprimento. Valores correspondem a média ($n=3 \pm$ desvio padrão) com nove explantes em cada repetição.



Fitorregulador	Controle	AIA			2,4-D			K			BA		
Concentra\u00e7\u00f5es (μM)	0,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0
N\u00b0 do tratamento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Figura 10: Porcentagem de forma\u00e7\u00e3o de calos (n\u00b0 de calos por n\u00b0 total de explantes x 100%) em segmentos apicais do morfo vermelho de *Gracilaria domingensis* cultivados em meio ASP 12-NTA com 0,5% de \u00e1gar em diferentes concentra\u00e7\u00f5es de fitorreguladores nas irradi\u00e2ncias de 50 (A-C) e 150 $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (D-F) ap\u00f3s 8 semanas. Explante inicial com 3 mm de comprimento. Valores correspondem a m\u00e9dia ($n=3 \pm$ desvio padr\u00e3o) com nove explantes em cada repeti\u00e7\u00e3o.

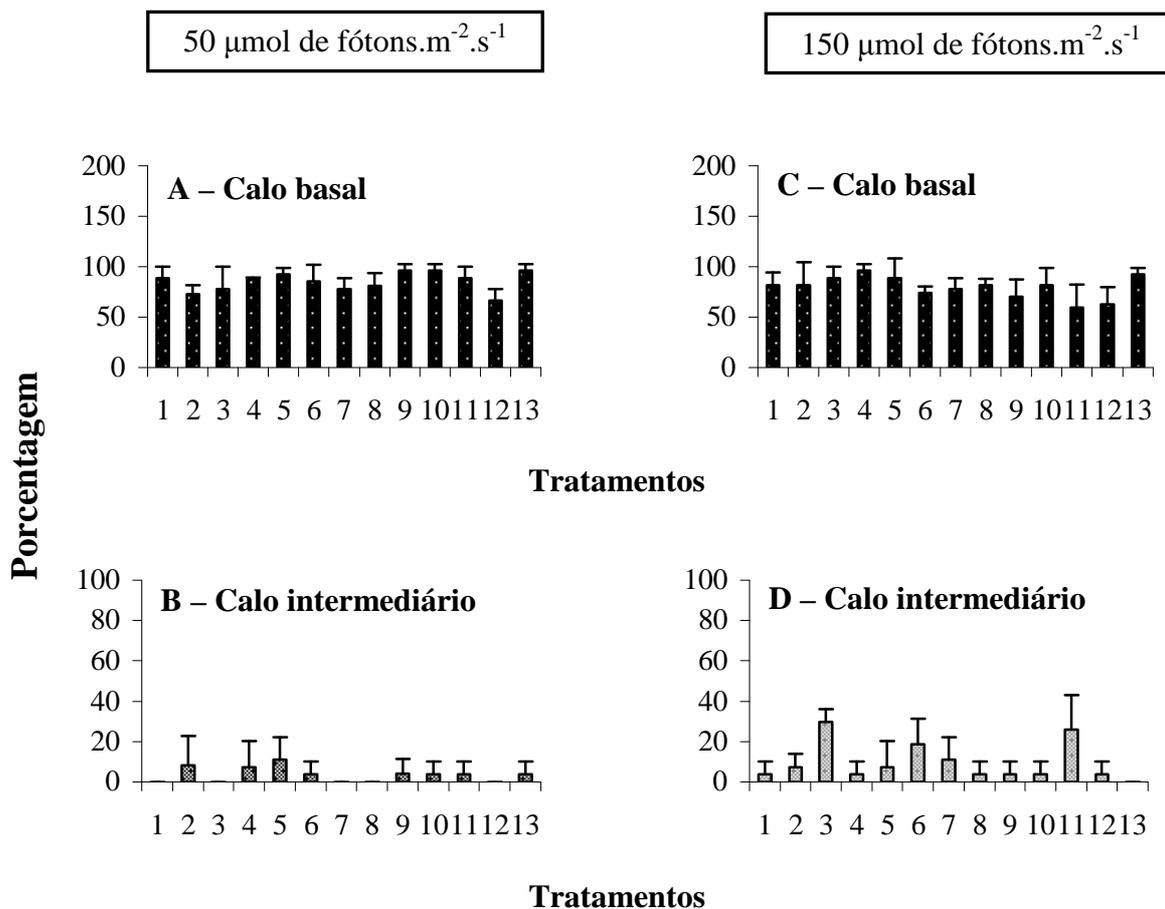
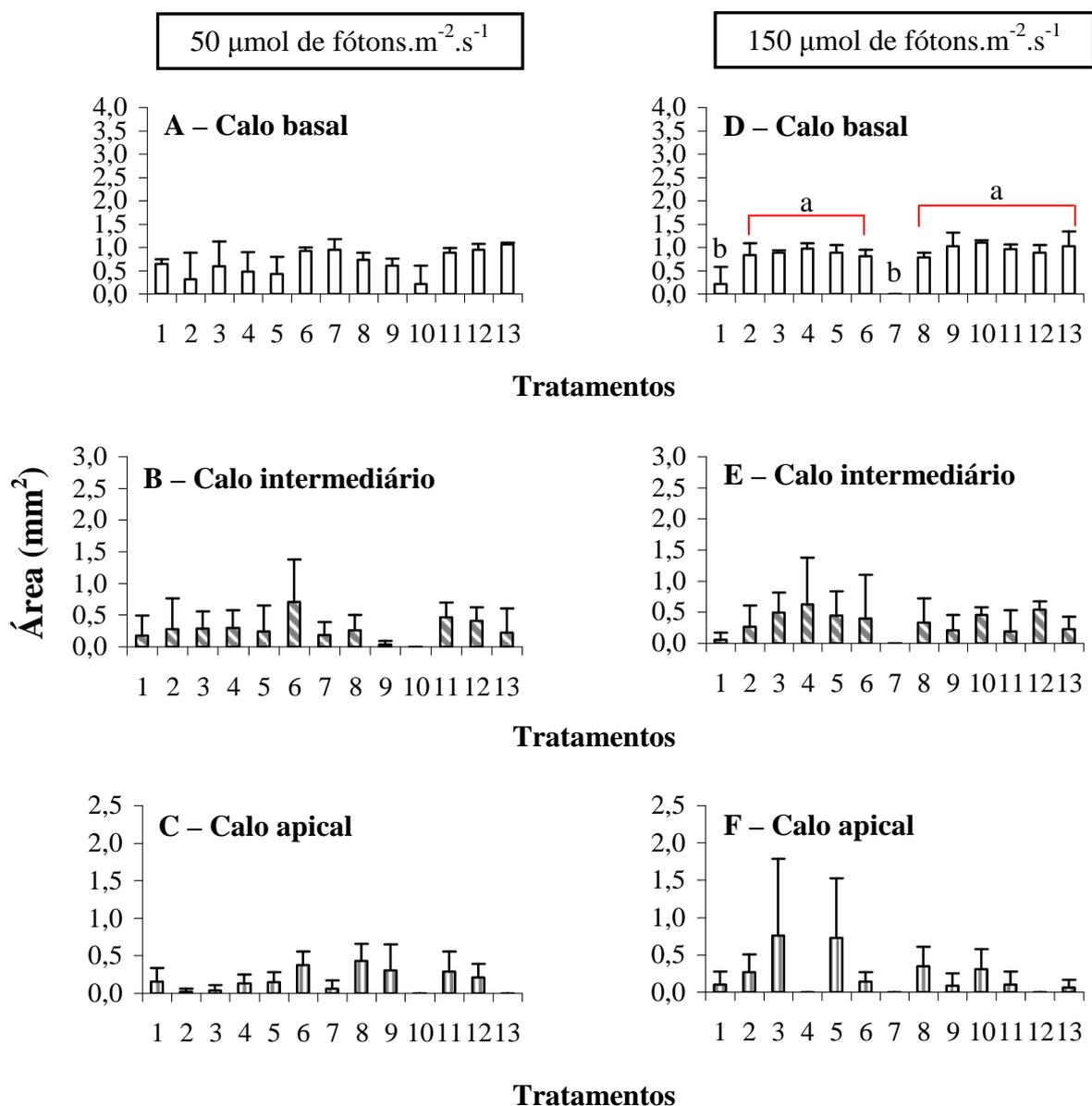


Figura 11: Porcentagem de formação de calos (nº de calos por nº total de explantes x 100%) em segmentos intercalares do morfo vermelho de *Gracilaria domingensis* cultivados em meio ASP 12-NTA com 0,5% de ágar em diferentes concentrações de fitorreguladores nas irradiâncias de 50 (A-B) e 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (C-D) após 8 semanas. Explante inicial com 3 mm de comprimento. Valores correspondem a média ($n=3 \pm$ desvio padrão) com nove explantes em cada repetição.

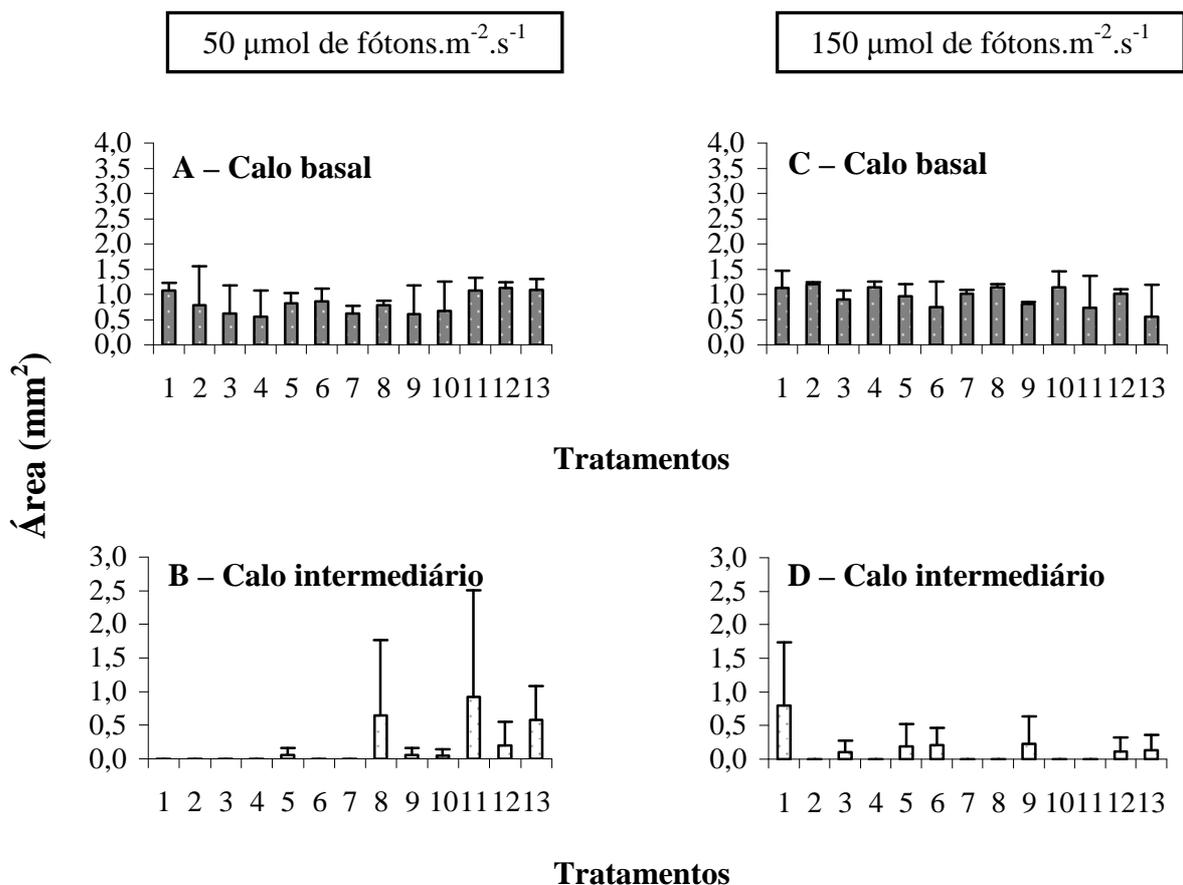
CRESCIMENTO DOS CALOS DO MORFO VERDE: Os diferentes tratamentos com fitorreguladores não influenciaram o crescimento dos calos formados em segmentos apicais do morfo verde de *Gracilaria domingensis*, quando cultivados sob irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (figuras 12A-C). Quando cultivados sob a irradiância de 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, o crescimento de calos basais formados em segmentos apicais do morfo verde foi estimulado por todos os tratamentos, exceto pelo tratamento 2,4-D (50,0 μM) que foi letal aos explantes (figura 12D), enquanto que os fitorreguladores não influenciaram o crescimento de calos intermediários e apicais quando comparado ao controle (figuras 12E e F). Em

segmentos intercalares cultivados sob as irradiâncias de 50 e 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ os fitorreguladores não influenciaram o crescimento dos calos (figuras 13A-D).



Fitorregulador	Controle	AIA			2,4-D			K			BA		
Concentrações (μM)	0,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0
Nº do tratamento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

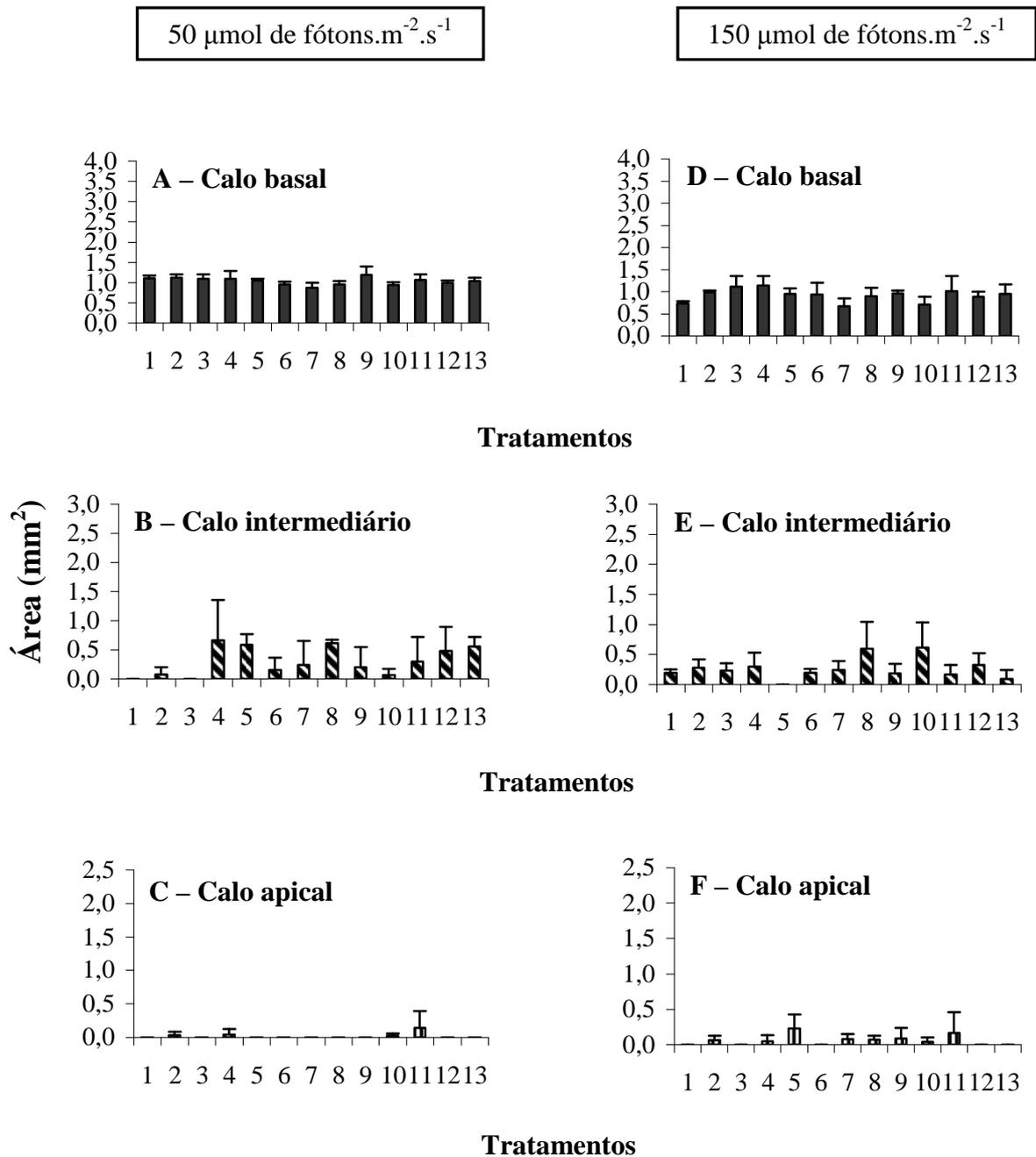
Figura 12: Variação da área dos calos formados em segmentos apicais do morfo verde de *Gracilaria domingensis* cultivados em meio ASP 12-NTA com 0,5% de ágar em diferentes concentrações de fitorreguladores nas irradiâncias de 50 (A-C) e 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (D-F) após 8 semanas. Explante inicial com 3 mm de comprimento. Valores correspondem a média ($n=3 \pm$ desvio padrão) com nove explantes em cada repetição. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.



Fitorregulador	Controle	AIA			2,4-D			K			BA		
Concentrações (μM)	0,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0
Nº do tratamento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

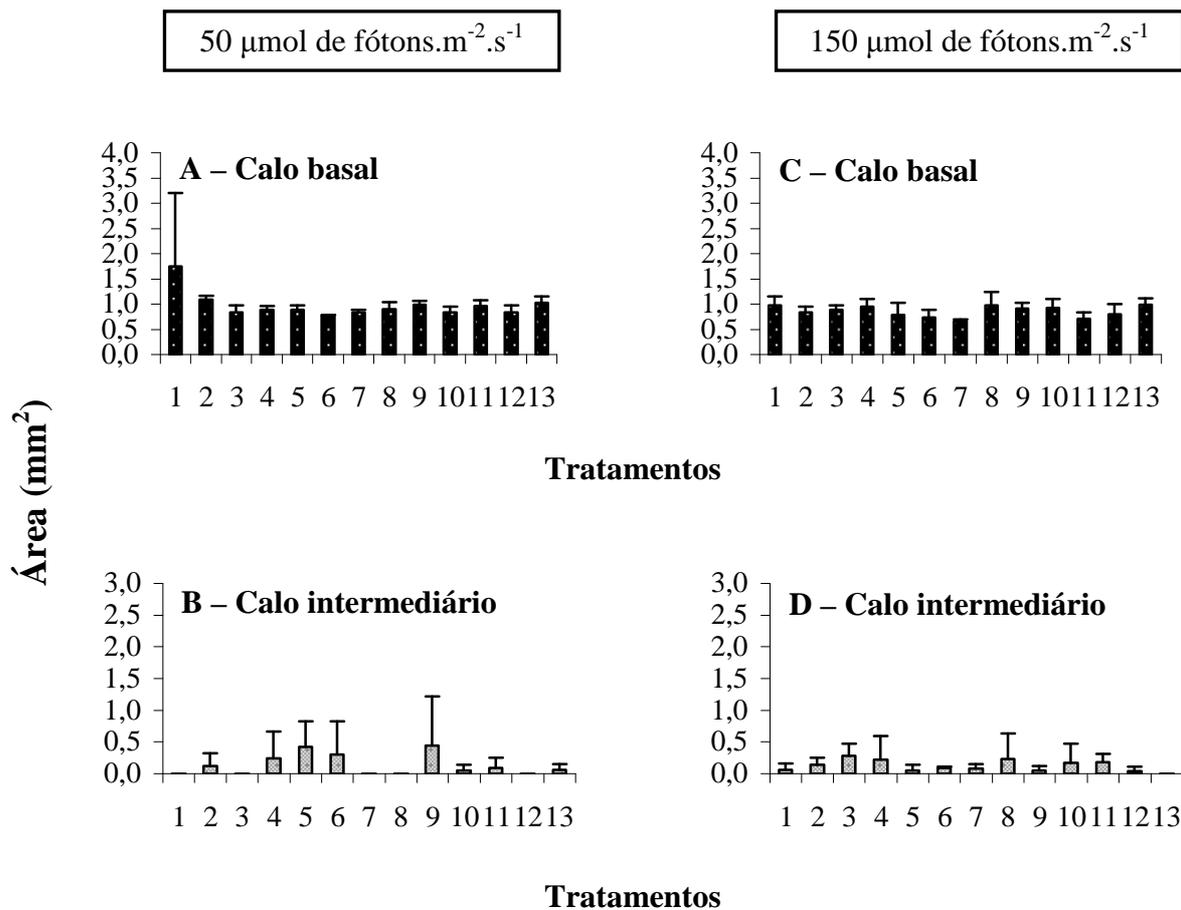
Figura 13: Variação da área dos calos formados em segmentos intercalares do morfo verde de *Gracilaria domingensis* cultivados em meio ASP 12-NTA com 0,5% de ágar em diferentes concentrações de fitorreguladores nas irradiâncias de 50 (A-B) e 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (C-D) após 8 semanas. Explante inicial com 3 mm de comprimento. Valores correspondem a média ($n=3 \pm$ desvio padrão) com nove explantes em cada repetição.

CRESCIMENTO DOS CALOS DO MORFO VERMELHO: Os tratamentos com auxinas e citocininas não influenciaram o crescimento dos calos formados tanto nos segmentos apicais (figuras 14A-F) quanto nos segmentos intercalares (figuras 15A-D), quando cultivados sob as irradiâncias de 50 e 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.



Fitorregulador	Controle	AIA			2,4-D			K			BA		
Concentrações (μM)	0,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0
Nº do tratamento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Figura 14: Variação da área dos calos formados em segmentos apicais do morfo vermelho de *Gracilaria domingensis* cultivados em meio ASP 12-NTA com 0,5% de ágar em diferentes concentrações de fitorreguladores nas irradiâncias de 50 (A-C) e 150 $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (D-F) após 8 semanas. Explante inicial com 3 mm de comprimento. Valores correspondem a média ($n=3 \pm$ desvio padrão) com nove explantes em cada repetição.



Fitorregulador	Controle	AIA			2,4-D			K			BA		
Concentrações (μM)	0,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0
N° do tratamento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Figura 15: Variação da área dos calos formados em segmentos intercalares do morfo vermelho de *Gracilaria domingensis* cultivados em meio ASP 12-NTA com 0,5% de ágar em diferentes concentrações de fitorreguladores nas irradiâncias de 50 (A-B) e 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (C-D) após 8 semanas. Explante inicial com 3 mm de comprimento. Valores correspondem a média ($n=3 \pm$ desvio padrão), com nove explantes em cada repetição.

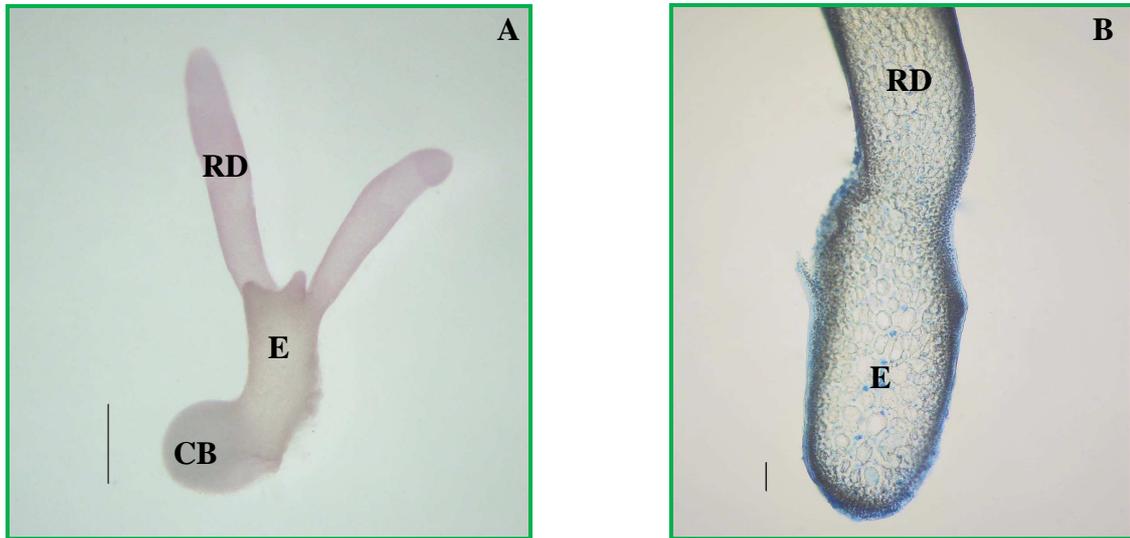
Efeitos dos fitorreguladores e da irradiância no processo de regeneração direta

No presente estudo, o processo que originou as regenerações a partir de células do explante é designado como regeneração direta (figuras 16A-D). As regenerações diretas ocorreram a partir de regiões do explante que ficaram próximas aos calos basais.

REGENERAÇÃO DIRETA EM EXPLANTES DO MORFO VERDE: As porcentagens de regeneração direta em explantes isolados de segmentos apicais do morfo verde não foram influenciadas pelos diferentes tratamentos com fitorreguladores, quando cultivados por quatro semanas em meio ASP 12-NTA e em meio von Stosch por três semanas, sob a irradiância de $50 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (figura 17A). Quando cultivados sob a irradiância de $150 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, os tratamentos com citocininas (BA- $0,5 \mu\text{M}$ e $50,0 \mu\text{M}$; K- $0,5 \mu\text{M}$) e baixa concentração de 2,4-D ($0,5 \mu\text{M}$) promoveram um aumento na formação de regenerações direta. O tratamento 2,4-D ($50,0 \mu\text{M}$) foi letal aos explantes (figura 17B). Para os explantes isolados de segmentos intercalares do morfo verde, não houve diferença significativa nas porcentagens de regeneração direta entre os tratamentos testados quando cultivados sob a irradiância de $50 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (figura 17C). Por outro lado, o tratamento BA ($5,0 \mu\text{M}$) promoveu significativamente a formação de regenerações, enquanto que o tratamento 2,4-D ($50,0 \mu\text{M}$) inibiu a formação das mesmas em explantes isolados de segmentos intercalares cultivados sob a irradiância de $150 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (figura 17D).

REGENERAÇÃO DIRETA EM EXPLANTES DO MORFO VERMELHO: As porcentagens de regeneração direta de explantes isolados de segmentos apicais do morfo vermelho de *Gracilaria domingensis* não foram influenciadas pelos diferentes tratamentos com auxinas e citocininas quando cultivados sob as irradiâncias de 50 e $150 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (figuras 18A e B). Para os explantes isolados de segmentos intercalares do morfo vermelho, as porcentagens de regeneração direta não foram influenciadas pelos diferentes tratamentos quando cultivados sob as irradiâncias de 50 e $150 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (figuras 18C e D).

Morfo Verde



Morfo Vermelho

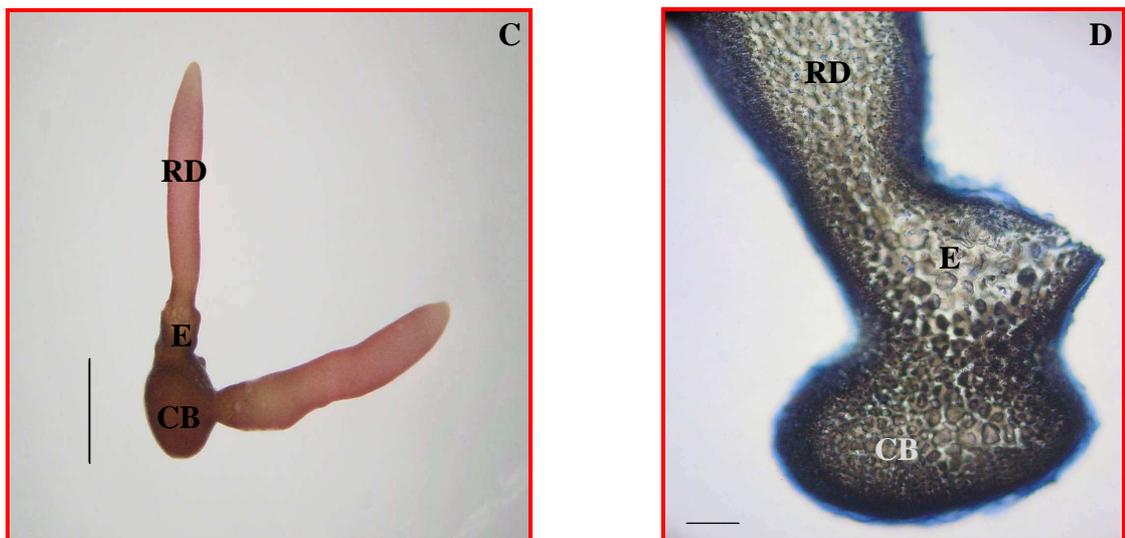
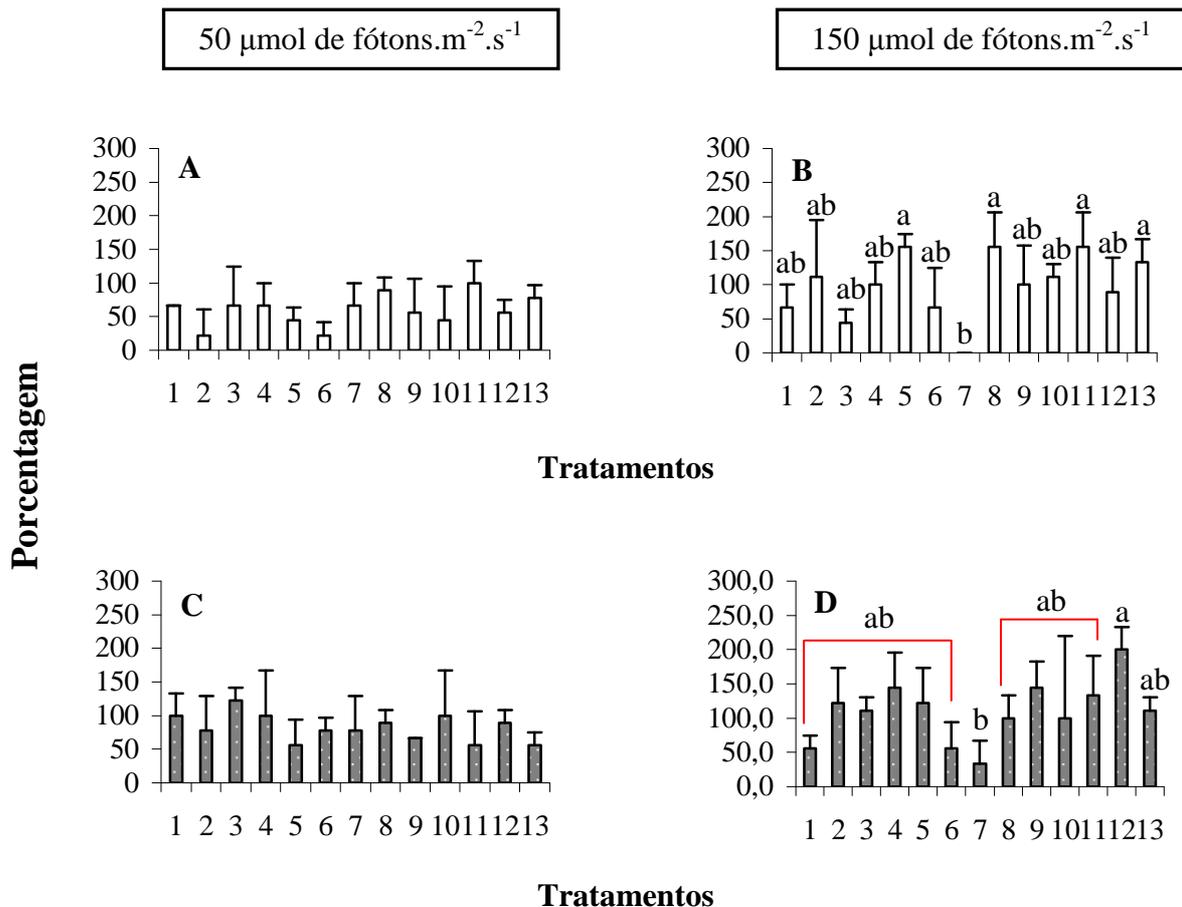
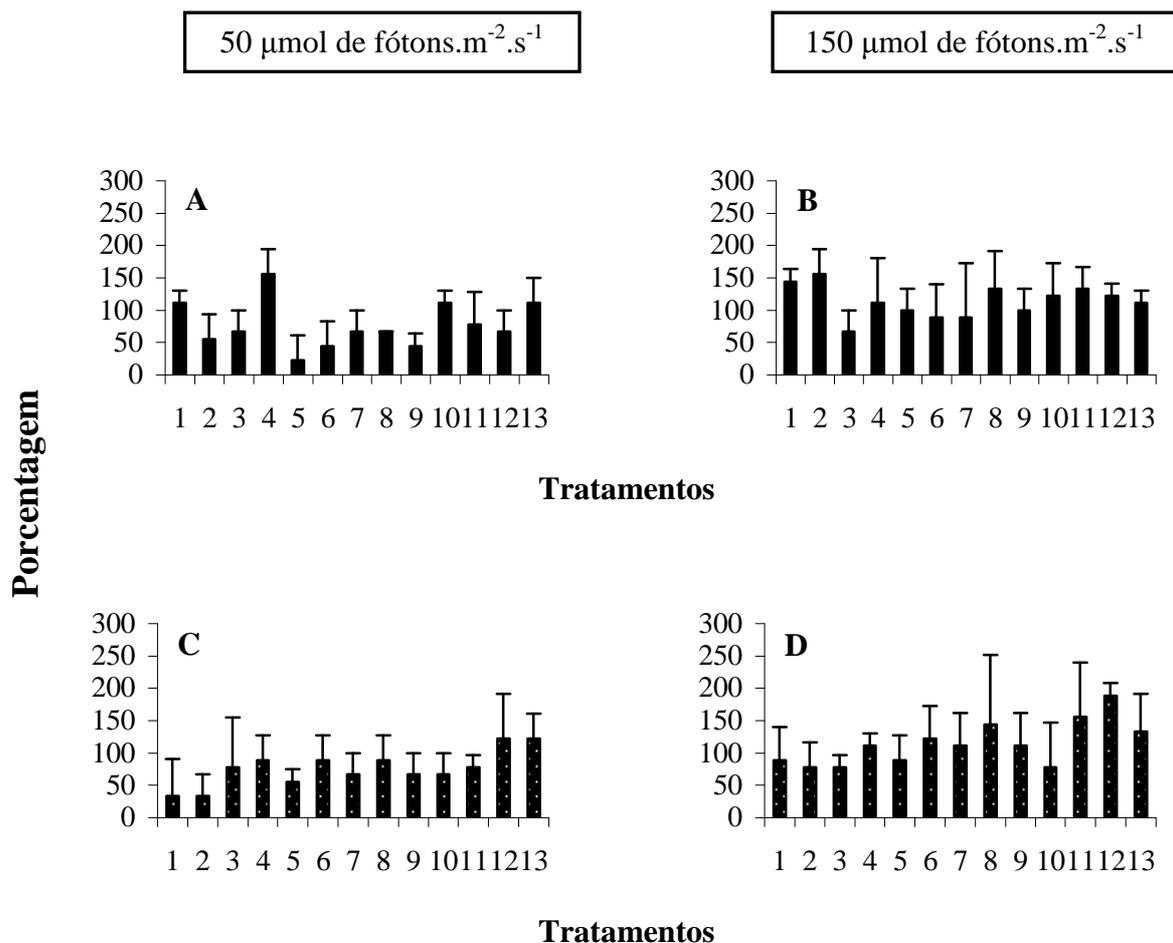


Figura 16: Processo de regeneração direta em explantes dos morfos verde (A-B) e vermelho (C-D) de *Gracilaria domingensis* cultivados em meio líquido ASP 12-NTA com BA (0,5 μM) sob a irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ (A) Aspecto geral do explante isolado do segmento intercalar do morfo verde e (B) Detalhe mostrando a origem de uma regeneração direta a partir do explante. (C) Aspecto geral de explante isolado do segmento apical do morfo vermelho e (D) Detalhes de uma regeneração direta. E: explante; CB: calo basal; RD: regeneração direta. Escalas: 1,0 mm (A e C); 200 μm (B e D).



Fitorregulador	Controle	AIA			2,4-D			K			BA		
Concentrações (μM)	0,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0
Nº do tratamento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Figura 17: Porcentagem de regeneração direta (n° regenerações direta/explante \times 100%) em explantes isolados de segmentos apicais (A e B) e intercalares (C e D) do morfo verde de *Gracilaria domingensis* cultivados por quatro semanas em meio ASP 12-NTA (líquido) e em meio von Stosch (líquido) por três semanas em diferentes concentrações de fitorreguladores nas irradiâncias de 50 e 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Valores correspondem a média ($n=3 \pm$ desvio padrão) com três explantes em cada repetição. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.



Fitorregulador	Controle	AIA			2,4-D			K			BA		
Concentrações (μM)	0,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0
Nº do tratamento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Figura 18: Porcentagem de regeneração direta (n° regenerações direta/explante \times 100%) em explantes isolados de segmentos apicais (A e B) e intercalares (C e D) do morfo vermelho de *Gracilaria domingensis* cultivados por quatro semanas em meio ASP 12-NTA (líquido) e em meio von Stosch (líquido) por três semanas em diferentes concentrações de fitorreguladores nas irradiâncias de 50 e 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Valores correspondem a média ($n=3 \pm$ desvio padrão) com três explantes em cada repetição.

CRESCIMENTO DAS REGENERAÇÕES DIRETAS EM EXPLANTES DO MORFO VERDE: Os fitorreguladores não influenciaram o crescimento das regenerações dos explantes isolados de segmentos apicais cultivados sob a irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (tabela 1), enquanto que aqueles cultivados sob a irradiância de 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, apresentaram diferenças significativas em relação ao tratamento 2,4-D (50,0 μM), que foi letal aos explantes (tabela 1). As regenerações dos explantes isolados de segmentos intercalares, não tiveram o

seu comprimento alterado significativamente pelos tratamentos com auxinas e citocininas quando cultivados sob as irradiâncias de 50 e 150 $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (tabela 1).

CRESCIMENTO DAS REGENERAÇÕES DIRETAS EM EXPLANTES DO MORFO VERMELHO:

N\u00e3o foram observadas diferen\u00e7as significativas entre os tratamentos para os explantes isolados de segmentos apicais e intercalares cultivados sob as irradi\u00e2ncias de 50 e 150 $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (tabela 1).

Tabela 1: An\u00e1lise de vari\u00e2ncia e teste de compara\u00e7\u00e3o de Student-Newman-Keuls ($p \leq 0,05$) dos dados de crescimento em comprimento das regenera\u00e7\u00f5es diretas em explantes isolados de segmentos apicais e intercalares dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis* cultivados por quatro semanas em meio ASP 12-NTA (l\u00edquido) e em meio von Stosch (l\u00edquido) por tr\u00eas semanas com fitorreguladores, nas irradi\u00e2ncias de 50 e 150 $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Valores correspondem a m\u00e9dia ($n=3 \pm$ desvio padr\u00e3o) com tr\u00eas explantes em cada repeti\u00e7\u00e3o. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes entre si. ns= n\u00e3o significativo.

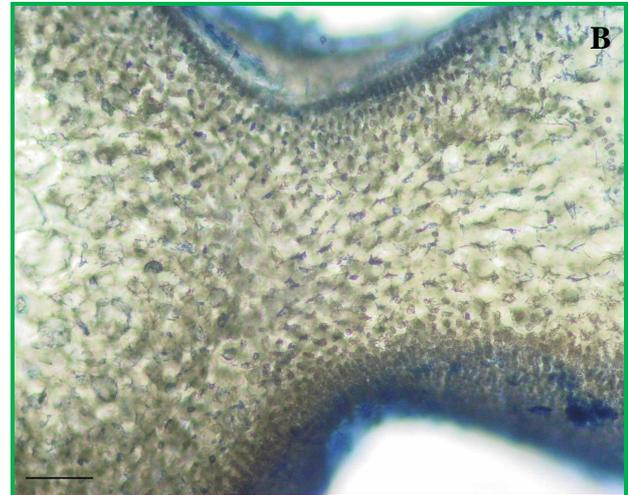
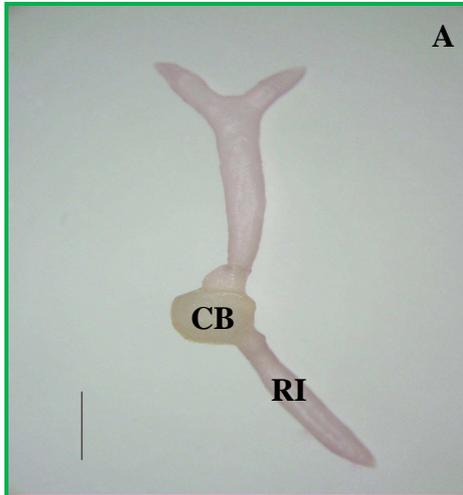
Fitor- regulador	Conc. (μM)	Comprimento (mm)							
		Morfo Verde				Morfo Vermelho			
		SA (50)	SA (150)	SI (50)	SI (150)	SA (50)	SA (150)	SI (50)	SI (150)
Controle	0,0	3,6 \pm 1,9	5,0 \pm 2,8 a	6,5 \pm 2,0	8,0 \pm 3,6	3,8 \pm 0,1	9,2 \pm 0,7	2,4 \pm 4,2	7,7 \pm 4,5
AIA	0,5	2,9 \pm 5,1	8,5 \pm 2,2 a	7,4 \pm 1,4	6,3 \pm 2,4	8,1 \pm 1,6	9,9 \pm 0,8	5,4 \pm 4,7	11,0 \pm 4,0
	5	4,1 \pm 3,6	7,1 \pm 3,0 a	7,9 \pm 2,4	8,1 \pm 3,4	6,0 \pm 2,1	11,1 \pm 6,6	6,8 \pm 1,8	10,1 \pm 4,0
	50	4,0 \pm 1,7	5,9 \pm 2,4 a	6,3 \pm 1,1	7,8 \pm 1,1	4,8 \pm 0,7	9,9 \pm 2,1	5,2 \pm 0,7	10,9 \pm 2,7
2,4-D	0,5	3,9 \pm 1,3	6,4 \pm 0,9 a	6,3 \pm 2,3	5,2 \pm 3,3	1,3 \pm 2,2	7,6 \pm 2,1	3,4 \pm 2,5	10,2 \pm 1,3
	5	3,8 \pm 3,3	5,9 \pm 1,9 a	6,4 \pm 1,2	9,2 \pm 1,9	4,5 \pm 4,4	6,5 \pm 5,8	6,7 \pm 1,8	9,1 \pm 2,6
	50	6,9 \pm 2,0	0,0 \pm 0,0 b	4,4 \pm 0,5	3,8 \pm 3,3	5,6 \pm 1,0	5,5 \pm 4,8	5,3 \pm 1,1	9,8 \pm 2,7
K	0,5	6,1 \pm 1,0	4,9 \pm 2,7 a	7,0 \pm 0,9	3,7 \pm 1,3	6,2 \pm 1,1	8,7 \pm 2,1	3,9 \pm 0,7	6,6 \pm 0,5
	5	3,7 \pm 3,4	5,6 \pm 0,4 a	7,6 \pm 2,5	7,7 \pm 2,9	6,8 \pm 0,8	9,9 \pm 4,4	3,9 \pm 2,6	11,7 \pm 1,0
	50	3,9 \pm 3,4	5,9 \pm 1,7 a	8,6 \pm 1,6	3,2 \pm 2,8	5,1 \pm 1,1	9,2 \pm 5,4	6,1 \pm 1,9	9,2 \pm 8,0
BA	0,5	5,7 \pm 2,3	5,9 \pm 1,7 a	3,3 \pm 3,1	6,2 \pm 2,3	6,4 \pm 1,5	6,6 \pm 2,0	5,4 \pm 0,5	9,8 \pm 2,9
	5	7,0 \pm 1,7	7,8 \pm 1,8 a	5,1 \pm 1,9	3,7 \pm 1,2	6,8 \pm 0,8	7,4 \pm 1,8	4,7 \pm 0,7	8,0 \pm 0,7
	50	5,9 \pm 0,6	5,9 \pm 0,8 a	6,3 \pm 1,3	5,4 \pm 1,6	5,9 \pm 2,1	9,1 \pm 5,3	5,4 \pm 1,3	10,2 \pm 1,9
<i>F</i>		1,61 ns	3,23	1,88 ns	1,89 ns	1,89 ns	0,530 ns	0,912 ns	1,10 ns

Efeitos dos fitorreguladores e da irradi\u00e2ncia no processo de regenera\u00e7\u00e3o indireta

No presente estudo, o processo de regenera\u00e7\u00e3o indireta refere-se \u00e0s regenera\u00e7\u00f5es originadas a partir de c\u00e9lulas dos calos basais. Estas pl\u00e2ntulas advent\u00edcias s\u00e3o semelhantes

àquelas formadas a partir da germinação de esporos e se originaram à partir das células localizadas na região externa do calo basal (figuras 19A-D).

Morfo Verde



Morfo Vermelho

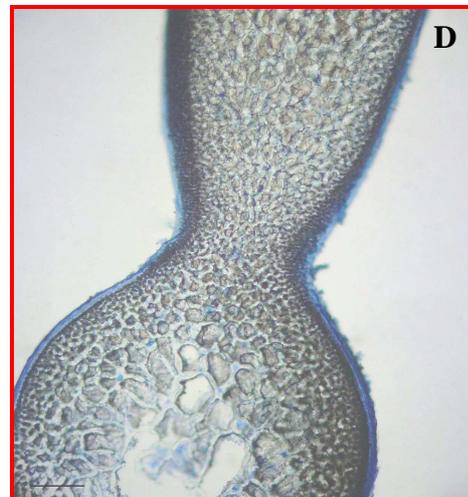
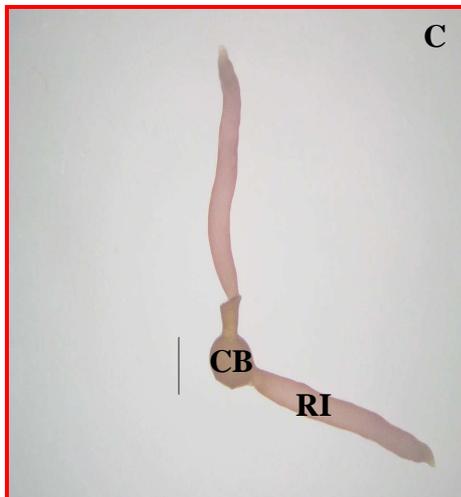
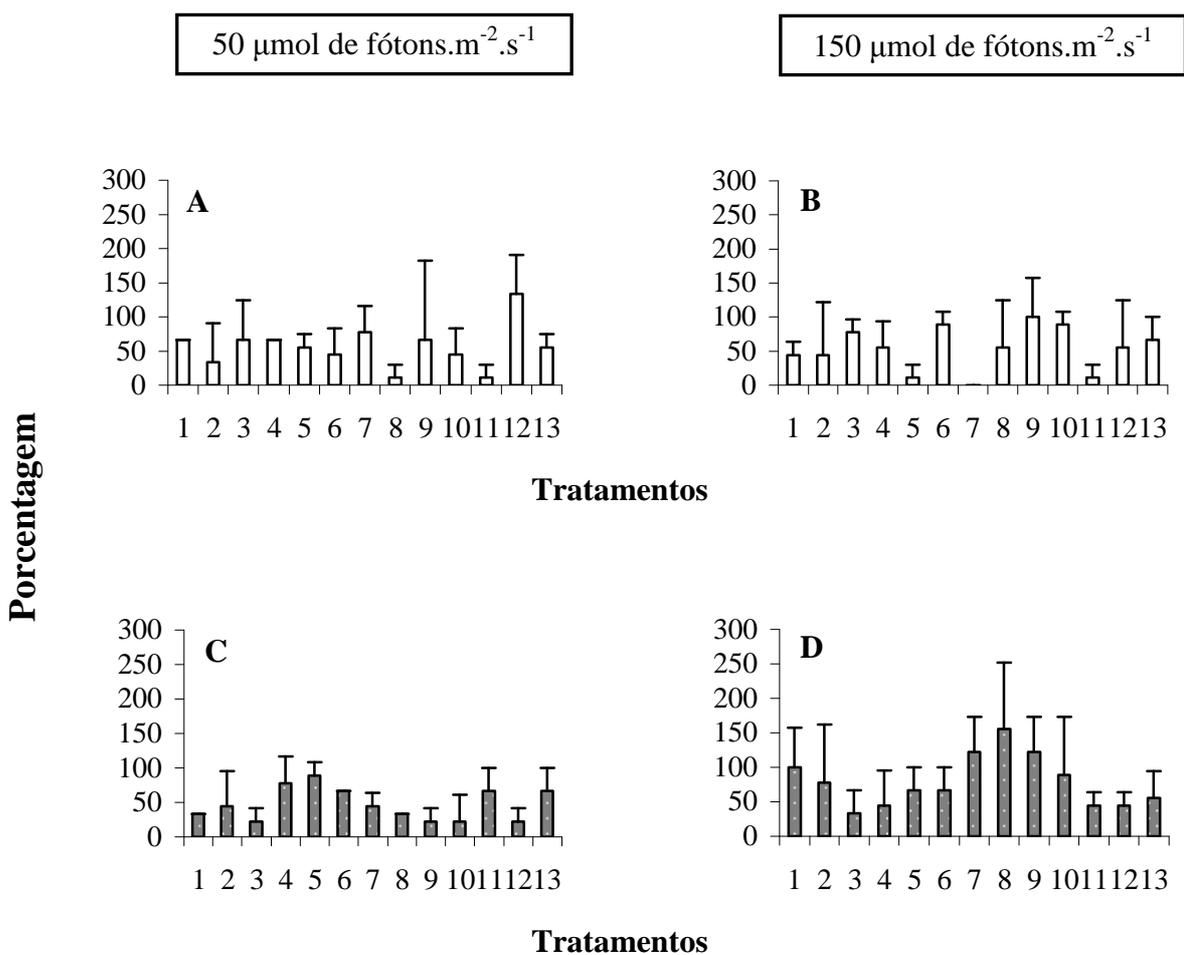


Figura 19: Processo de regeneração indireta em calos basais isolados a partir de segmentos apicais e intercalares dos morfos verde (A-B) e vermelho (C-D) de *Gracilaria domingensis* cultivado em meio líquido ASP 12-NTA/von Stosch com BA (5,0 μM) sob a irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (A) Aspecto geral de uma regeneração indireta de calo basal isolado do segmento apical do morfo verde e (B) Detalhe mostrando a região de transição entre o calo e a regeneração indireta. (C) Aspecto geral de uma regeneração indireta de calo basal isolado do segmento apical do morfo vermelho e (D) Detalhes do processo de regeneração indireta. E: explante; CB: calo basal; RI: regeneração indireta. Escalas: 2,0 mm (A); 100 μm (B); (C) 1,0 mm; 200 μm (D).

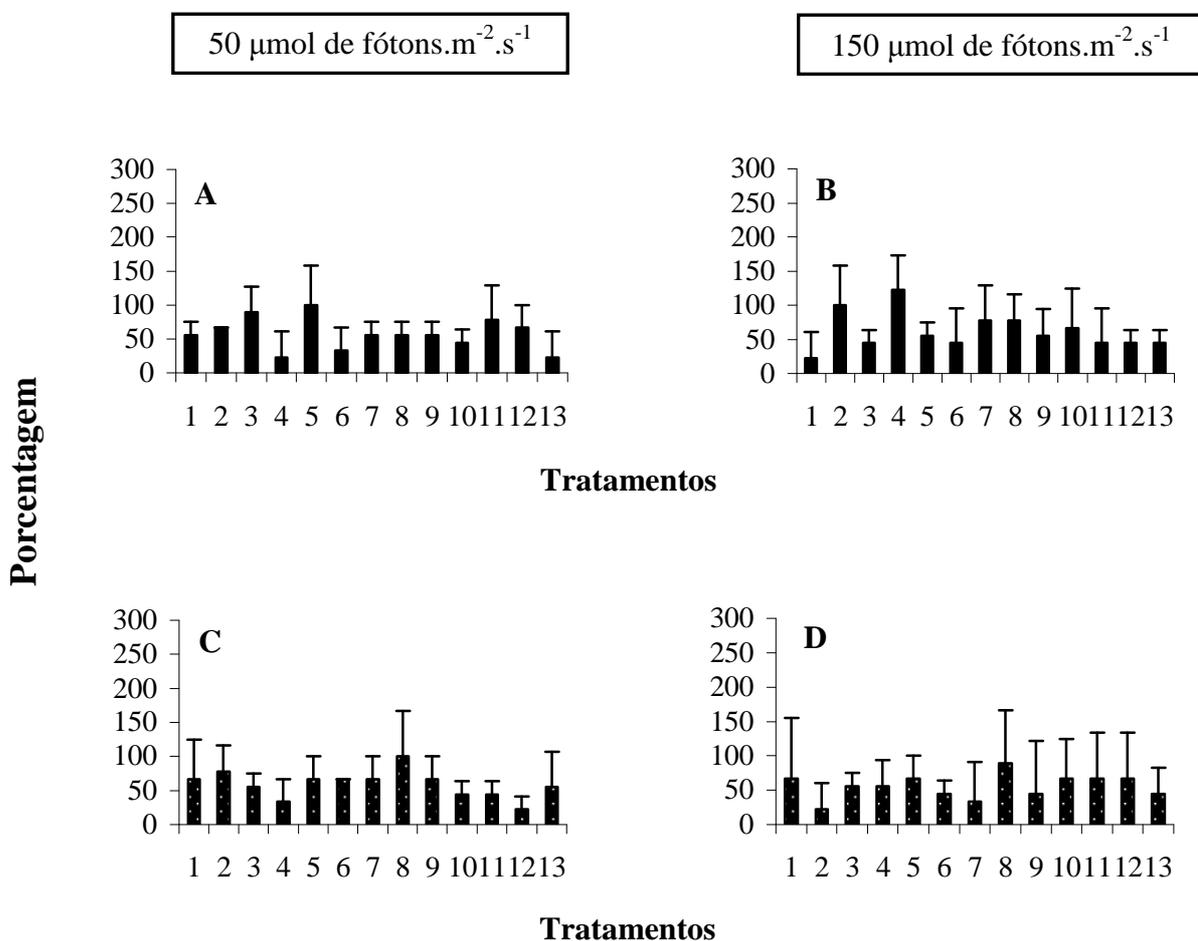
REGENERAÇÃO INDIRETA EM CALOS BASAIS DO MORFO VERDE: As porcentagens de regeneração indireta de calos basais isolados de segmentos apicais do morfo verde de *Gracilaria domingensis* não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos com fitorreguladores nas irradiâncias testadas (figuras 20A e B). Os calos basais isolados de segmentos intercalares não tiveram as porcentagens de regeneração influenciadas pela aplicação exógena de auxinas e citocininas quando cultivados sob as irradiâncias de 50 e 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (figura 20C e D).



Fitorregulador	Controle	AIA			2,4-D			K			BA		
Concentrações (μM)	0,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0
Nº do tratamento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Figura 20: Porcentagem de regeneração indireta (n° regenerações indireta/calco \times 100%) em calos basais isolados de segmentos apicais (A e B) e intercalares (C e D) do morfo verde de *Gracilaria domingensis* cultivados por quatro semanas em meio ASP 12-NTA (líquido) e em meio von Stosch (líquido) por três semanas em diferentes concentrações de fitorreguladores nas irradiâncias de 50 e 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Valores correspondem a média ($n=3 \pm$ desvio padrão) com três calos basais em cada repetição.

REGENERAÇÃO INDIRETA EM CALOS BASAIS DO MORFO VERMELHO: Para o morfo vermelho, não foram observadas diferenças entre os tratamentos testados, tanto para calos basais formados em segmentos apicais quanto para os formados em segmentos intercalares quando cultivados sob as irradiâncias de 50 e 150 $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (figura 21A-D).



Fitorregulador	Controle	AIA			2,4-D			K			BA		
Concentrações (μM)	0,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0	0,5	5,0	50,0
N ^o do tratamento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Figura 21: Porcentagem de regeneração indireta (n° regenerações indireta/calos x 100%) em calos basais isolados de segmentos apicais (A e B) e intercalares (C e D) do morfo vermelho de *Gracilaria domingensis* cultivados por quatro semanas em meio ASP 12-NTA (líquido) e em meio von Stosch (líquido) por três semanas em diferentes concentrações de fitorreguladores nas irradiâncias de 50 e 150 $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Valores correspondem a média ($n=3 \pm$ desvio padrão), com três calos basais em cada repetição.

CRESCIMENTO DAS REGENERAÇÕES INDIRETAS EM CALOS BASAIS DO MORFO VERDE: Os efeitos das auxinas e citocininas no crescimento nas regenerações indiretas não foram significativos quando cultivados sob as irradiâncias de 50 e 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (tabela 2).

CRESCIMENTO DAS REGENERAÇÕES INDIRETAS EM CALOS BASAIS DO MORFO VERMELHO: O crescimento das regenerações foi estimulado pelo tratamento com baixa concentração de AIA (0,5 μM) e inibido pelo tratamento com alta concentração de BA (50,0 μM) quando cultivados sob a irradiância de 50 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (tabela 2). Quando cultivados sob a irradiância de 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, o crescimento das regenerações não foi influenciado pelos diferentes tratamentos com fitorreguladores (tabela 2). O comprimento das regenerações de calos basais isolados de segmentos intercalares não foi afetado pelos diferentes tratamentos testados, quando cultivados sob as irradiâncias de 50 e 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (tabela 2).

Tabela 2: Análise de variância e teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p \leq 0,05$) dos dados de crescimento em comprimento das regenerações indiretas em calos basais isolados de segmentos apicais e intercalares dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis* cultivados por quatro semanas em meio ASP 12-NTA (líquido) e em meio von Stosch (líquido) por três semanas com fitorreguladores, nas irradiâncias de 50 e 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Valores correspondem a média ($n=3 \pm$ desvio padrão) com três calos basais em cada repetição. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes entre si. ns= não significativo.

Fitor-regulador	Conc. (μM)	Comprimento (mm)							
		Morfo Verde				Morfo Vermelho			
		SA (50)	SA (150)	SI (50)	SI (150)	SA (50)	SA (150)	SI (50)	SI (150)
Controle	0,0	2,5 \pm 0,7	2,8 \pm 0,5	6,2 \pm 0,3	7,5 \pm 0,6	7,4 \pm 1,2 ab	2,9 \pm 5,1	5,1 \pm 4,4	5,4 \pm 4,7
AIA	0,5	3,4 \pm 5,8	2,7 \pm 4,7	5,6 \pm 4,9	2,9 \pm 2,8	8,3 \pm 0,5 a	10,1 \pm 0,7	5,5 \pm 1,1	3,4 \pm 5,9
	5	6,7 \pm 2,3	8,8 \pm 3,4	5,1 \pm 5,0	6,4 \pm 5,5	5,5 \pm 0,6 ab	6,9 \pm 5,8	6,5 \pm 0,6	11,1 \pm 4,1
	50	5,8 \pm 0,9	8,0 \pm 2,0	3,3 \pm 3,1	4,7 \pm 4,0	1,8 \pm 3,2 ab	10,4 \pm 1,7	4,4 \pm 4,4	7,1 \pm 2,5
2,4-D	0,5	3, \pm 2,4	3,6 \pm 6,2	4,4 \pm 0,3	6,3 \pm 0,3	6,7 \pm 1,6 ab	12,0 \pm 4,3	4,3 \pm 0,7	8,3 \pm 0,8
	5	2,8 \pm 2,4	5,4 \pm 0,9	5,6 \pm 2,7	6,1 \pm 2,6	4,9 \pm 4,3 ab	7,4 \pm 6,6	5,1 \pm 0,1	6,9 \pm 4,4
	50	5,6 \pm 1,9	0,0 \pm 0,0	3,9 \pm 1,4	4,5 \pm 0,2	7,8 \pm 0,4 ab	9,1 \pm 1,9	6,2 \pm 0,5	3,6 \pm 6,2
K	0,5	1,5 \pm 2,5	2,3 \pm 2,4	7,1 \pm 0,8	4,6 \pm 1,1	6,8 \pm 0,3 ab	11,0 \pm 3,8	4,4 \pm 2,2	6,0 \pm 5,2
	5	0,7 \pm 1,3	7,1 \pm 3,5	3,7 \pm 5,1	6,7 \pm 3,0	7,5 \pm 3,3 ab	11,9 \pm 2,7	6,0 \pm 1,0	4,2 \pm 7,3
	50	4,4 \pm 0,7	5,2 \pm 1,7	2,5 \pm 4,4	2,6 \pm 2,7	6,6 \pm 2,3 ab	7,7 \pm 7,1	5,7 \pm 2,4	7,5 \pm 5,6
BA	0,5	2,0 \pm 3,5	4,2 \pm 7,2	3,0 \pm 1,0	8,4 \pm 2,7	7,0 \pm 2,8 ab	6,7 \pm 6,5	5,6 \pm 1,0	4,0 \pm 3,6
	5	5,9 \pm 1,3	3,4 \pm 4,0	4,2 \pm 4,1	4,6 \pm 2,3	6,9 \pm 0,1 ab	10,0 \pm 1,5	4,4 \pm 3,9	6,6 \pm 5,8
	50	5,7 \pm 0,9	6,5 \pm 2,2	6,7 \pm 2,1	6,3 \pm 1,8	1,6 \pm 2,7 b	8,2 \pm 4,0	3,8 \pm 3,4	3,0 \pm 2,8
<i>F</i>		1,88 ns	1,45 ns	0,603 ns	0,812 ns	2,72	1,02 ns	0,938 ns	0,686 ns

Efeitos dos fitorreguladores e da irradiância no crescimento dos explantes – Análise de variância bifatorial

TC: As TC de segmentos apicais, cultivados sob a irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foram influenciadas somente pela coloração do morfo (tabela 3), sendo que o morfo vermelho apresentou TC maiores do que o morfo verde. Quando cultivados sob a irradiância de 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, as TC de segmentos apicais foram influenciadas tanto pela coloração do morfo quanto pelos diferentes tratamentos com auxinas e citocininas (tabela 3), não havendo interação entre estes dois fatores. O morfo vermelho apresentou maior TC no tratamento com alta concentração de 2,4-D (50,0 μM), enquanto que este tratamento foi letal aos explantes do morfo verde. Para os segmentos intercalares cultivados sob a irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ tanto a coloração do morfo quanto as diferentes concentrações de fitorreguladores influenciaram as TC (tabela 3), porém, não houve interação significativa entre esses dois fatores. O morfo vermelho apresentou TC maiores do que o morfo verde nos tratamentos com alta concentração de 2,4-D (50,0 μM) e alta concentração de BA (50,0 μM). Sob a irradiância de 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, as TC foram influenciadas tanto pela coloração do morfo quanto pelos diferentes tratamentos com fitorreguladores (tabela 3), sendo que nos tratamentos com AIA (0,5 e 50,0 μM) e 2,4-D (5,0 μM) as TC do morfo vermelho foram superiores em relação ao morfo verde.

Tabela 3: Análise de variância bifatorial da taxa de crescimento de segmentos apicais e intercalares dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis*, após oito semanas de cultivo em meio ASP 12-NTA com diferentes fitorreguladores sob as irradiâncias de 50 e 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Variáveis: (A): fitorreguladores; (B): morfos. Negrito: efeito significativo.

Tipo de Segmento	Irradiância	Efeito	Graus de Liberdade	F	P
Segmento Apical	50	A	12	1,72	0,0939
		B	1	90,09	<0,0001
		Interação A/B	12	1,15	0,3457
	150	A	12	2,342	0,0189
		B	1	207,172	<0,0001
		Interação A/B	12	0,871	0,5806
Segmento Intercalar	50	A	12	2,342	0,0189
		B	1	207,172	<0,0001
		Interação A/B	12	0,871	0,5806
	150	A	12	2,01	0,0425
		B	1	491,31	<0,0001
		Interação A/B	12	3,46	0,0009

Efeitos dos fitorreguladores e da irradiância na formação de calos – Análise de variância bifatorial

FORMAÇÃO DE CALOS BASAIS: Apenas a coloração do morfo influenciou as porcentagens de formação de calos basais para os segmentos apicais cultivados sob a irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (tabela 4). As porcentagens de formação de calos basais do morfo vermelho foram superiores ao morfo verde em todos os tratamentos testados, exceto no tratamento BA (0,5 μM). Sob a irradiância de 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, apenas os diferentes tratamentos com fitorreguladores influenciaram as porcentagens de formação de calos basais (tabela 4) onde a principal diferença se encontra no tratamento com alta concentração de 2,4-D (50,0 μM) que foi letal aos segmentos apicais do morfo verde. De maneira geral, a formação de calos basais foi maior no morfo vermelho. Para os segmentos intercalares cultivados sob as irradiâncias de 50 e 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (tabela 4), apenas a coloração do morfo influenciou as porcentagens de formação de calos basais. Em ambos os níveis de irradiâncias testados, o morfo vermelho apresentou porcentagens de formação de calos basais superiores em relação ao morfo verde.

Tabela 4: Análise de variância bifatorial da porcentagem de formação de calos basais dos segmentos apicais e intercalares dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis*, após oito semanas de cultivo em meio ASP 12-NTA com diferentes fitorreguladores sob as irradiâncias de 50 e 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Variáveis: (A): fitorreguladores; (B): morfos. **Negrito:** efeito significativo.

Tipo de Segmento	Irradiância	Efeito	Graus de Liberdade	F	P
Segmento Apical	50	A	12	1,10	0,3804
		B	1	17,72	0,0001
		Interação A/B	12	1,18	0,3185
	150	A	12	4,38	<0,0001
		B	1	3,76	0,0580
		Interação A/B	12	1,99	0,0437
Segmento Intercalar	50	A	12	0,625	0,8115
		B	1	23,888	<0,0001
		Interação A/B	12	0,719	0,7260
	150	A	12	1,60	0,1194
		B	1	25,24	<0,0001
		Interação A/B	12	1,50	0,1559

FORMAÇÃO DE CALOS INTERMEDIÁRIOS: Não houve influencia das variáveis analisadas sob as porcentagens de formação de calos intermediários formados em segmentos apicais, quando cultivados sob as irradiâncias de 50 e 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (tabela 5) . As porcentagens de formação de calos intermediários formados em segmentos intercalares não foram influenciadas pelas variáveis analisadas, quando cultivados sob a irradiância de 50 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (tabela 5). Por outro lado, quando cultivados sob a irradiância de 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, as porcentagens de formação de calos intermediários foram influenciadas tanto pela coloração do morfo quanto pelos diferentes tratamentos com fitorreguladores (tabela 5), sendo que o morfo vermelho apresentou maiores porcentagens de formação de calos intermediários do que o morfo verde, principalmente nos tratamentos AIA (5,0 μM) e BA (0,5 μM).

Tabela 5: Análise de variância bifatorial da porcentagem de formação de calos intermediários dos segmentos apicais e intercalares dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis*, após oito semanas de cultivo em meio ASP 12-NTA com diferentes fitorreguladores sob as irradiâncias de 50 e 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Variáveis: (A): fitorreguladores; (B): morfos. **Negrito:** efeito significativo.

Tipo de Segmento	Irradiância	Efeito	Graus de Liberdade	F	P
Segmento Apical	50	A	12	0,969	0,4896
		B	1	1,739	0,1931
		Interação A/B	12	0,921	0,5329
	150	A	12	1,138	0,3516
		B	1	0,471	0,4954
		Interação A/B	12	0,928	0,5264
Segmento Intercalar	50	A	12	0,762	0,6848
		B	1	0,152	0,6985
		Interação A/B	12	0,834	0,6159
	150	A	12	2,49	0,0118
		B	1	9,10	0,0040
		Interação A/B	12	2,52	0,0108

FORMAÇÃO DE CALOS APICAIS: As porcentagens de formação de calos apicais em segmentos apicais foram influenciadas apenas pela coloração do morfo quando cultivados sob a irradiância de 50 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, como quando cultivados sob a irradiância de 150

μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (tabela 6). As porcentagens de formação de calos apicais do morfo verde foram superiores ao morfo vermelho na maioria dos tratamentos testados.

Tabela 6: Análise de variância bifatorial da porcentagem de formação de calos apicais dos segmentos apicais e intercalares dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis*, após oito semanas de cultivo em meio ASP 12-NTA com diferentes fitorreguladores sob as irradiâncias de 50 e 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Variáveis: (A): fitorreguladores; (B): morfos. **Negrito:** efeito significativo.

Tipo de Segmento	Irradiância	Efeito	Graus de Liberdade	F	P
Segmento Apical	50	A	12	1,22	0,2931
		B	1	23,42	<0,0001
		Interação A/B	12	1,64	0,1105
	150	A	12	1,552	0,1360
		B	1	9,733	0,0030
		Interação A/B	12	0,981	0,4784

Efeitos dos fitorreguladores e da irradiância na formação de regenerações direta e indireta – Análise de variância bifatorial

FORMAÇÃO DE REGENERAÇÃO DIRETA: As porcentagens de regeneração direta de explantes isolados de segmentos apicais cultivados sob a irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foram influenciadas tanto pela coloração do morfo quanto pelos diferentes tratamentos com auxinas e citocininas, no entanto, não houve interação entre esses dois fatores (tabela 7). O morfo vermelho apresentou porcentagens de regeneração direta superiores ao morfo verde, principalmente no tratamento com alta concentração de AIA (50,0 μM). Sob a irradiância de 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, as porcentagens de regeneração direta foram influenciadas apenas pelos diferentes tratamentos com fitorreguladores (tabela 7). Os tratamentos com baixa concentração de AIA (0,5 μM) e baixa concentração de K e BA (0,5 μM) promoveram as maiores porcentagens de regeneração direta em ambos os morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis*. Para os explantes isolados de segmentos intercalares cultivados sob a irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ambas as variáveis analisadas não influenciaram as porcentagens de regeneração direta (tabela 7). Quando cultivados sob a irradiância de 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, apenas os diferentes tratamentos com auxinas e citocininas influenciaram as porcentagens de regeneração direta (tabela 7), sendo que o tratamento BA (5,0 μM) foi o

tratamento que estimulou o maior número de regenerações por explante para ambos os morfos pigmentares.

Tabela 7: Análise de variância bifatorial da porcentagem de regeneração direta de explantes isolados de segmentos apicais e intercalares dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis*, após quatro semanas de cultivo em meio ASP 12-NTA e três semanas em meio von Stosch (líquido) com diferentes fitorreguladores sob as irradiâncias de 50 e 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Variáveis: (A): fitorreguladores; (B): morfos. **Negrito:** efeito significativo.

Tipo de Segmento	Irradiância	Efeito	Graus de Liberdade	F	P
Segmento Apical	50	A	12	3,18	0,0018
		B	1	5,00	0,0297
		Interação A/B	12	1,64	0,0194
	150	A	12	2,86	0,0044
		B	1	2,01	0,1625
		Interação A/B	12	1,22	0,2922
Segmento Intercalar	50	A	12	0,904	0,5491
		B	1	0,392	0,5340
		Interação A/B	12	1,085	0,3915
	150	A	12	2,331	0,0179
		B	1	0,125	0,7251
		Interação A/B	12	0,938	0,5180

FORMAÇÃO DE REGENERAÇÃO INDIRETA: As porcentagens de regeneração indireta dos calos basais isolados de segmentos apicais e de segmentos intercalares não foram influenciadas pelos diferentes tratamentos com fitorreguladores e pela coloração do morfo quando cultivados sob as irradiâncias de 50 e 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (tabela 8).

Tabela 8: Análise de variância bifatorial da porcentagem de regeneração indireta de calos basais isolados de segmentos apicais e intercalares dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis*, após quatro semanas de cultivo em meio ASP 12-NTA e três semanas em meio von Stosch (líquido) com diferentes fitorreguladores sob as irradiâncias de 50 e 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Variáveis: (A): fitorreguladores; (B): morfos. **Negrito:** efeito significativo.

Tipo de Segmento	Irradiância	Efeito	Graus de Liberdade	F	P
Segmento Apical	50	A	12	1,321	0,2350
		B	1	0,00769	10,000
		Interação A/B	12	1,444	0,1764
	150	A	12	1,299	0,2476
		B	1	0,643	0,4263
		Interação A/B	12	1,606	0,1189
Segmento Intercalar	50	A	12	1,31	0,2435
		B	1	2,65	0,1096
		Interação A/B	12	1,42	0,1875
	150	A	12	0,891	0,5614
		B	1	3,314	0,0745
		Interação A/B	12	0,733	0,7127

INFLUÊNCIA DA IRRADIÂNCIA NA FORMAÇÃO DE REGENERAÇÕES DIRETAS: Esta análise foi realizada com o intuito de comparar se os níveis de irradiância influenciaram as porcentagens de regeneração direta em segmentos apicais e intercalares dos morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis*. Para os explantes isolados de segmentos apicais do morfo verde, tanto os fitorreguladores quanto os níveis de irradiância influenciaram as porcentagens de regeneração direta, não havendo interação entre estes dois fatores (tabela 9). As porcentagens de regeneração direta foram maiores na irradiância de 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, principalmente nos tratamentos com baixas concentrações de citocininas (K - 0,5 μM e BA - 0,5 μM). Já para os explantes isolados de segmentos intercalares, apenas os níveis de irradiância influenciaram as porcentagens de regeneração direta (tabela 9), sendo que as mesmas foram maiores na irradiância de 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Para os explantes isolados de segmentos apicais e intercalares do morfo vermelho, tanto os diferentes tratamentos com fitorreguladores quanto os níveis de irradiância influenciaram as porcentagens de regeneração direta (tabela 9). As porcentagens de regeneração foram maiores quando os explantes foram cultivados sob a irradiância de 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Tabela 9: Análise de variância bifatorial da porcentagem de regeneração direta de explantes isolados de segmentos apicais e intercalares dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis*, após quatro semanas de cultivo em meio ASP 12-NTA e três semanas em meio von Stosch (líquido) com diferentes fitorreguladores sob as irradiâncias de 50 e 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Variáveis: (A): fitorreguladores; (B): nível de irradiância. **Negrito:** efeito significativo.

Morfo	Segmento	Efeito	Graus de Liberdade	F	P
Verde	Apical	A	12	3,03	0,0027
		B	1	19,06	<0,0001
		Interação A/B	12	2,08	0,0348
	Intercalar	A	12	1,59	0,1226
		B	1	7,46	0,0086
		Interação A/B	12	1,82	0,0691
Vermelho	Apical	A	12	2,20	0,0252
		B	1	16,36	0,0002
		Interação A/B	12	1,39	0,2017
	Intercalar	A	12	1,947	0,0496
		B	1	11,313	0,0015
		Interação A/B	12	0,310	0,9847

INFLUÊNCIA DA IRRADIÂNCIA NA FORMAÇÃO DE REGENERAÇÕES INDIRETAS: Com relação às porcentagens de regeneração indireta do morfo verde de *Gracilaria domingensis*, os calos basais isolados de segmentos apicais do morfo verde não tiveram suas porcentagens de regeneração influenciadas por ambas às variáveis analisadas (tabela 10). No entanto, as porcentagens de regeneração dos calos basais isolados de segmentos intercalares foram influenciadas apenas pelos níveis de irradiância (tabela 10), sendo que as maiores porcentagens de regeneração ocorreram em calos basais cultivados sob a irradiância de 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Para os calos basais isolados de segmentos apicais e intercalares do morfo vermelho, ambas as variáveis analisadas não influenciaram as porcentagens de regeneração indireta (tabela 10).

Tabela 10: Análise de variância bifatorial da porcentagem de regeneração indireta de calos basais isolados de segmentos apicais e intercalares dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis*, após quatro semanas de cultivo em meio ASP 12-NTA e três semanas em meio von Stosch (líquido) com diferentes fitorreguladores sob as irradiâncias de 50 e 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Variáveis: (A): fitorreguladores; (B): nível de irradiância. **Negrito:** efeito significativo.

Morfo	Segmento	Efeito	Graus de Liberdade	F	P
Verde	Apical	A	12	1,602	0,1200
		B	1	0,113	0,7384
		Interação A/B	12	1,349	0,2210
	Intercalar	A	12	1,04	0,4273
		B	1	10,22	0,0024
		Interação A/B	12	2,02	0,410
Vermelho	Apical	A	12	0,974	0,4854
		B	1	0,247	0,6210
		Interação A/B	12	1,706	0,0924
	Intercalar	A	12	0,452	0,9330
		B	1	0,100	0,7531
		Interação A/B	12	0,479	0,9180

Discussão

Efeitos dos fitorreguladores e da irradiância no processo de crescimento

Em uma análise geral das respostas observadas nos processos de crescimento (TC e crescimento em comprimento dos explantes, crescimento dos calos e crescimento em comprimento das regenerações diretas e indiretas), constatou-se que o efeito inibitório das auxinas foi maior do que o estimulatório. As principais respostas inibitórias estão relacionadas às altas concentrações de 2,4-D, que foram letais aos segmentos apicais do morfo verde de *Gracilaria domingensis* cultivados em 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e que inibiu as TC de segmentos apicais do morfo verde e segmentos intercalares do morfo vermelho cultivados sob a irradiância de 50 e 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente. Estes resultados são contraditórios, uma vez que o 2,4-D é considerada uma auxina com efeito estimulatório sobre o crescimento. Yokoya *et al.* (1999) observaram que a aplicação de 2,4-D (0,1 a 10,0 mg.L^{-1})

estimulou o crescimento (peso fresco) de segmentos apicais e intercalares de *Gracilaria vermiculophylla*. Os segmentos apicais de *Gracilariopsis tenuifrons* tiveram crescimento máximo em alta concentração de 2,4-D (5,0 mg.L⁻¹) (Yokoya 2000). Baixa concentração de 2,4-D (0,1 µmol) estimulou a taxa de crescimento de segmentos apicais e intercalares de *Gracilaria perplexa* (Yokoya *et al.* 2004). Entretanto, o efeito inibitório do 2,4-D já foi relatado para outras espécies de algas. Bertagnoli & Nadakavakaren (1974) relataram o efeito inibitório do 2,4-D sobre as funções fotossintéticas e mitocondriais da microalga *Chlorella pyrenoidosa* Starr & Zeikus. Alta concentração de 2,4-D (10⁻³ M) inibiu o crescimento de *Alaria esculenta*, enquanto que baixas concentrações (<10⁻³ M) apresentaram efeitos inibitório ou nulo (Buggeln 1976). O crescimento de *Codium fragile* subsp. *tomentosoides* não foi estimulado por auxinas sintéticas, inclusive pelo 2,4-D (Hanisak 1979). O efeito inibitório do 2,4-D observado em nossos experimentos pode ser explicado pela aplicação de alta concentração de 2,4-D. Segundo Fosket (1994) o aumento dos níveis de auxina interna (por exemplo, pela aplicação exógena de auxina) pode cessar o crescimento, tornando-se desta forma, inibitórios.

Por outro lado, o AIA estimulou o crescimento de segmentos intercalares dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis* quando cultivados sob a irradiância de 150 µmol de fótons.m⁻².s⁻¹. Isto pode ter ocorrido pelo fato dos segmentos intercalares não possuírem células apicais, onde provavelmente pode ocorrer a síntese das auxinas. Assim quando o AIA é adicionado ao meio de cultura, há um aumento na quantidade de auxina interna que acaba promovendo o crescimento. Estas observações também podem estar relacionadas aos efeitos estimulatórios do AIA sobre os processos de divisão e expansão celular. Resultados similares foram observados para outras espécies de macroalgas marinhas. Iwasaki (1965) verificou que concentrações de AIA inferiores a 0,05 mg.L⁻¹ estimularam o crescimento da fase Conchocelis de *Porphyra tenera*. Baixas concentrações de AIA (0,002 e 0,02 mg.L⁻¹) foram suficientes para estimular o crescimento de *Fucus spiralis* (Fries 1984). A aplicação de AIA (5,0 mg.L⁻¹) estimulou o crescimento de segmentos apicais de *Gracilariopsis tenuifrons* (Yokoya 2000). O AIA também promoveu o crescimento das regenerações indiretas formadas em calos basais isolados de segmentos apicais do morfo verde de *Gracilaria domingensis*. O efeito estimulatório do AIA no crescimento das regenerações está relacionado ao seu papel no alongamento celular. Respostas semelhantes foram obtidas por Yokoya (2000) que observou que o crescimento das plântulas de *Gracilariopsis tenuifrons* originadas a partir de calos apicais formados em segmentos apicais foi estimulado por baixa concentração de AIA.

Em geral, as citocininas estimularam o crescimento em morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis*. A BA estimulou as TC de segmentos apicais do morfo verde e de

segmentos intercalares do morfo vermelho, ambos cultivados sob a irradiância de 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A K estimulou o crescimento em comprimento de segmentos intercalares do morfo vermelho cultivados sob a irradiância de 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Foi observado também o efeito inibitório da BA sobre as TC de segmentos intercalares do morfo verde cultivados sob a irradiância de 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e sobre o crescimento das regenerações indiretas de calos basais isolados de segmentos apicais do morfo vermelho cultivados sob a irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As citocininas também estão envolvidas no processo de divisão e expansão celular e há estudos que relatam tanto o efeito estimulatório quanto o efeito inibitório de BA no crescimento. A aplicação exógena de BA (5,0 mg.L^{-1}) promoveu significativamente o crescimento (peso fresco) de segmentos intercalares de *Solieria filiformis* (Yokoya 1996). Baixas concentrações de BA (0,1 mg.L^{-1} e 1,0 mg.L^{-1}) estimularam o crescimento de segmentos apicais e intercalares de *Gracilaria vermiculophylla*, enquanto que alta concentração de BA (10,0 mg.L^{-1}) causou a necrose de ambos os tipos de segmentos (Yokoya *et al.* 1999). A diferença nas respostas dos segmentos intercalares dos morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* quanto a aplicação de BA pode estar relacionada à sensibilidade de cada morfo ao fitorregulador, uma vez que, segundo Trewavas (1982), a concentração do fitorregulador não constitui o único mecanismo de regulação do desenvolvimento vegetal. Cada morfo possui diferentes níveis endógenos de substâncias que podem influenciar na resposta ao fitorregulador.

O crescimento dos calos e das regenerações diretas não foi influenciado pela aplicação de fitorreguladores, independentemente da irradiância testada. Esta resposta difere das observadas para outras espécies da ordem Gracilariales. Para *Gracilaria vermiculophylla*, o crescimento dos calos formados em segmentos apicais foi estimulado por tratamentos com baixas concentrações de auxinas e BA (1,0 mg.L^{-1}), enquanto que o crescimento dos calos formados em segmentos intercalares foi estimulado pelos tratamentos com AIA (0,1 mg.L^{-1}) e 2,4-D (10,0 mg.L^{-1}) e inibido por AIA (10,0 mg.L^{-1}) (Yokoya *et al.* 1999). O tratamento com 2,4-D (0,5 mg.L^{-1} e 5,0 mg.L^{-1}) promoveu o crescimento de calos apicais formados em segmentos apicais de *Gracilariopsis tenuifrons*, enquanto que para os segmentos intercalares, a maioria dos tratamentos com auxinas e citocininas foram efetivos na promoção do crescimento de calos apicais (Yokoya 2000). O efeito estimulatório e/ou inibitório dos fitorreguladores sobre o crescimento de calos também foi mencionado para outras espécies de macroalgas marinhas. Yokoya & Handro (1996) relataram que o crescimento dos calos formados em segmentos intercalares de *Grateloupia dichotoma* foi estimulado por todos os tratamentos com auxinas e citocininas. A adição de AIA (0,1 mg.L^{-1}) e BA (0,05 mg.L^{-1}) promoveu um aumento significativo no crescimento dos calos na alga vermelha *Meristotheca*

papulosa (Huang & Fujita 1997b). Em *Grateloupia doryphora*, o 2,4-D (10^{-3} M) promoveu o crescimento dos calos, enquanto que BA (10^{-3} M) e K (10^{-6} e 10^{-3}) foram inibitórios (Garcia-Jimenez *et al.* 1998). Nossos resultados foram semelhantes aos descritos para *Kappaphycus alvarezii* (Reddy *et al.* 2003) e para *Gelidiella acerosa* (Kumar *et al.* 2004) onde os fitorreguladores não influenciaram o crescimento dos calos. Segundo Endreß (1994) um único fitorregulador pode induzir diferentes efeitos no mesmo tecido em diferentes espécies ou fases do desenvolvimento.

Os segmentos apicais e intercalares dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis* apresentaram diferenças na resposta aos fitorreguladores, sendo que os segmentos intercalares foram mais sensíveis a aplicação de fitorreguladores do que os segmentos apicais. No entanto, os segmentos apicais de ambos os morfos apresentaram crescimento superior aos segmentos intercalares. Segundo Yokoya *et al.* (1999), estas diferenças podem estar relacionadas ao gradiente bioquímico e/ou fisiológico ao longo do talo causado pela presença das células apicais nos segmentos apicais.

Efeitos dos fitorreguladores e da irradiância nos processos morfogênicos

FORMAÇÃO DE CALOS: As porcentagens de formação de calos não foram influenciadas pela aplicação de auxinas e citocininas. Nossos resultados divergem dos obtidos para outras espécies de Gracilariales. Kaczyna & Megnet (1993) observaram que a aplicação de AIA ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$) levou a um aumento na taxa de indução de calos de *Gracilaria verrucosa*. Tratamentos com auxinas e citocininas promoveram a formação de calos a partir de segmentos apicais e intercalares de *Gracilaria vermiculophylla* (Yokoya *et al.* 1999). Para *Gracilaria tenuistipitata*, a porcentagem de formação de calos basais foi maior do que a porcentagem de formação de calos apicais e intermediários, e os tratamentos com auxinas e K estimularam a formação de calos basais para esta espécie (Yokoya *et al.* 2004). Por outro lado, resultados similares aos descritos no presente estudo foram obtidos por Huang & Fujita (1997b) que observaram que a adição de AIA ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) e BA ($0,05 \text{ mg.L}^{-1}$) não influenciaram a taxa de formação de calos em *Meristotheca papulosa*. Para *Kappaphycus alvarezii*, a aplicação de ANA (ácido naftalenoacético) ou BA, individualmente ou em combinação não resultou no aumento da taxa de formação de calos basais (Reddy *et al.* 2003). A adição de AIA, ANA, BA ou K não foi efetiva no aumento da taxa de formação de calos em *Gelidiella acerosa* (Kumar *et al.* 2004).

Foi observada a inibição da formação de calos apicais e intermediários em alguns tratamentos para ambos os morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis*. As respostas foram muito variadas e dependentes do morfo, do tipo de segmento, do fitorregulador e do nível de irradiância. O efeito inibitório dos fitorreguladores na formação de calos apicais e intermediários foi relatado para outras espécies de *Gracilaria*. Para *Gracilaria tenuistipitata*, a aplicação de K (1,0 - 100,0 μmol) foi inibitória para as taxas de formação de calos apicais e alta concentração de 2,4-D e K (100,0 μmol) foram inibitórias para as taxas de formação de calos intermediários (Yokoya *et al.* 2004). Em *Gracilaria perplexa*, a formação de calos intermediários foi inibida pela maioria dos tratamentos com a adição de fitorreguladores, sendo estimulado somente pelo tratamento com K (1,0 μmol) e calos apicais foram formados apenas nos tratamentos com baixa concentração de AIA (1,0 - 10,0 μmol), alta concentração de 2,4-D (10,0 - 100,0 μmol) e baixa concentração de K (0,1 μmol) (Yokoya *et al.* 2004). Entretanto, os resultados obtidos em nossos experimentos diferiram dos obtidos para *Gracilariopsis tenuifrons*, onde a aplicação de fitorreguladores aumentou significativamente a formação de calos apicais em segmentos apicais e foi essencial para a formação de calos em segmentos intercalares (Yokoya *et al.* 2000), e dos obtidos para *Hypnea musciformis*, onde a aplicação de AIA (1,0 μM) e BA (1,0 μM) induziu o aumento nas taxas de formação de calos apicais de ramos laterais (Bravin 2005).

TAXAS DE REGENERAÇÃO INDIRETA: As porcentagens de regeneração indireta também não foram influenciadas pelos fitorreguladores e pelos níveis de irradiância. Estes resultados diferiram dos obtidos para outras espécies de Gracilariales. Para *Gracilariopsis tenuifrons*, foram observadas diferenças entre os segmentos testados: alta concentração de AIA (5,0 mg.L^{-1}) estimulou a formação de regenerações indiretas em calos originados por segmentos apicais enquanto que alta concentração de BA (5,0 mg.L^{-1}) promoveu a formação em calos originados por segmentos intercalares (Yokoya 2000). Em *Gracilaria tenuistipitata*, as taxas de regeneração indireta em calos basais, apicais e intermediários foram estimuladas por tratamentos com auxinas ou citocininas (Yokoya *et al.* 2004). Para *Gracilaria perplexa*, AIA e K (1,0 mg.L^{-1}) e 2,4-D (1,0 - 10,0 mg.L^{-1}) estimularam as taxas de regeneração indireta em segmentos intercalares (Yokoya *et al.* 2004).

TAXAS DE REGENERAÇÃO DIRETA: De maneira geral, o morfo verde foi mais sensível a adição de fitorreguladores no processo de formação de regenerações diretas. As respostas obtidas nos experimentos diferiram entre os segmentos testados. Para os explantes isolados de segmentos apicais do morfo verde cultivados sob a irradiância de 150 $\mu\text{mol. f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, as porcentagens de regeneração direta foram estimuladas pelos tratamentos com 2,4-D (0,5 μM), BA (0,5 μM e 50,0 μM) e K(0,5 μM). Para os explantes isolados de segmentos intercalares do

morfo verde cultivados sob a irradiância de $150 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, as porcentagens de regeneração direta foram estimuladas pelo tratamento com BA ($5,0 \mu\text{M}$) e inibida por 2,4-D ($50,0 \mu\text{M}$). Nossos resultados diferiram dos obtidos por Yokoya (1996) para *Grateloupia dichotoma* e *Gracilariopsis tenuifrons*, onde a adição de auxinas e citocininas inibiram o processo de regeneração direta, mas são similares aos descritos para *Solieria filiformis*, onde a formação de regenerações apicais foi estimulada pelos tratamentos com AIA, BA e K e inibida pela presença do 2,4-D (Yokoya 1996).

Segundo a análise de variância bifatorial, as porcentagens de regeneração direta e indireta foram maiores quando os explantes e calos basais foram cultivados sob a irradiância de $150 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Segundo Das *et al.* (2002), é possível que sob condições de alta irradiância, a sinalização celular seja desviada das vias metabólicas para as vias do desenvolvimento. A alta irradiância pode aumentar a divisão das células apicais (Murray & Dixon 1975), bem como aumentar o diâmetro das células (Garbary 1979). Em *Grateloupia dichotoma*, o processo de regeneração não ocorreu em calos cultivados em baixa irradiância ($2 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), sendo que a presença de luz foi o fator determinante para induzir a regeneração, já que foram observadas a ocorrência de plântulas adventícias nos calos cultivados sob alta irradiância ($40 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (Yokoya & Handro 1996).

Em conclusão, os fitorreguladores influenciaram os processos de crescimento dos morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis*. Ainda, os efeitos estimulatórios dos fitorreguladores ocorreram na irradiância de $150 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sugerindo que altos níveis de irradiância podem estimular a resposta do explante ao fitorregulador. Segundo a análise de variância bifatorial, o morfo vermelho apresentou desempenho superior ao morfo verde em todas as variáveis analisadas confirmando a variabilidade intraespecífica nas respostas aos fitorreguladores em *G. domingensis*.

Referências bibliográficas

- Bertagnoli, B.L. & Nadakavukaren, M.J.** 1974. Some physiological responses of *Chlorella pyrenoidosa* to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Journal of Experimental Botany* 25: 180-188.
- Bradley, P.M. & Cheney, D.P.** 1990. Some effects of plant regulators on tissue cultures of the marine red alga *Agardhiella subulata* (Gigartinales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 204/205: 353-360.

- Bravin, I.C.** 2005. Micropropagação e potencial biotecnológico de *Hypnea musciformis* (Gigartinales – Rhodophyta). Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 148 p.
- Buggeln, R.G.** 1976. Auxin, an endogenous regulator of growth in algae? *Journal of Phycology* 12: 355-358.
- Das, D.K., Reddy, M.K., Upadhyaya, S.K.** 2002. An efficient leaf-disc culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Report* 20: 999-1005.
- Endreß, R.** 1994. *Plant cell biotechnology*. Springer Verlag, Berlin, 353 p.
- Evans, M.L.** 1984. Functions of hormones at the cellular level of organization. In: T.K. Scott (ed.). *Encyclopedia of Plant Physiology*. v. 10. Springer-Verlag, Berlin, pp. 23-80.
- Evans, L.V. & Trewavas, A.J.** 1991. Is algal development controlled by plant growth substances? *Journal of Phycology* 27: 322-326.
- Fosket, D.F.** 1994. *Plant growth and development. A molecular approach*. Academic Press, California, 580 p.
- Fries, L.** 1984. Induction of plantlets in axenically cultivated rhizoids of *Fucus spiralis*. *Canadian Journal of Botany* 62: 1616-1620.
- Garbary, D.J.** 1979. Daylength and development in four species of Ceramiaceae (Rhodophyta). *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 32: 213-227.
- Garcia-Jimenez, P., Rodrigo, M. & Robaina, R.R.** 1998. Influence of plant growth regulators, polyamines and glycerol on growth and morphogenesis of carposporelings of *Grateloupia* cultured *in vitro*. *Journal of Applied Phycology* 10: 95-100.
- Gusev, M.V., Tambiev, A.H., Kikova, N.N., Shelyastina, N.N. & Aslanyan, R.R.** 1987. Callus formation in seven species of ágarophyte marine algae. *Marine Biology* 95: 593-597.
- Hanisak, M.D.** 1979. Effect of indole-3-acetic acid on growth of *Codium fragile* subsp. *tomentosoides* (Chlorophyceae) in culture. *Journal of Phycology* 15: 124-127.
- Huang, W. & Fujita, Y.** 1997a. Callus induction and thallus regeneration in some species of red algae. *Phycological Research* 45: 105-111.
- Huang, W. & Fujita, Y.** 1997b. Callus induction and thallus regeneration of the red alga *Meristotheca papulosa* (Rhodophyta, Gigartinales). *Botanica Marina* 40: 55-61.
- Iwasaki, H.** 1961. The life cycle of *Porphyra tenera* in vitro. *The Biological Bulletin* 121: 173-187.
- Iwasaki, H.** 1965. Nutritional studies of the edible seaweed *Porphyra tenera*. I. The influence of different B₁₂ analogues, plant hormones, purines and pyrimidines on the growth of *Conchocelis*. *Plant and Cell Physiology* 6: 325-336.

- Jin, H., Seo, G., Cho, Y.C., Hwang, E., Sohn, C.H. & Hong, Y.** 1997. Gelling agents for tissue culture of the seaweed *Hizikia fusiformis*. *Journal of Applied Phycology* 9: 489-493.
- Kaczyna, F. & Megnet, R.** 1993. The effects of glycerol and plant growth regulators on *Gracilaria verrucosa* (Gigartinales, Rhodophyceae). *Hydrobiologia* 268: 57-64.
- Kumar, G.R., Reddy, C.R.K., Ganesan, M., Thiruppathi, S., Dipakkore, S., Eswaran, K., Subba Rao, P.V. & Jha, B.** 2004. Tissue culture and regeneration of thallus from callus of *Gelidiella acerosa* (Gelidiales, Rhodophyta). *Phycologia* 43 (5): 596-602.
- Lawlor, H.J., McComb, J.A. & Borowitzka, M.A.** 1988. The development of filamentous and callus-like growth in axenic tissue culture of *Ecklonia radiata*. In: T. Standler, M.C.V. Moillon, Y. Karamanos, H. Morvan & D. Christiaen (eds.). *Algal Biotechnology*. Elsevier Applied Science, London, pp. 139-150.
- Liu, X.W. & Kloareg, B.** 1991. Tissue culture of *Porphyra umbilicalis* (Bangiales, Rhodophyta). I. The effects of plant hormones on callus induction from tissue explants. *CR Academic Paris Serie III* 321: 517-522.
- Maliakal, S., Cheney, C. & Rorrer, G.** 2001. Halogenated monoterpene production in regenerated plantlet cultures of *Ochtodes secundiramea* (Rhodophyta, Cryptonemiales). *Journal of Phycology* 37: 1010-1019.
- Muñoz, J., Cahue-López, A.C., Patiño, R. & Robledo, D.** 2006. Use of plant growth regulators in micropropagation of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) in airlift bioreactors. *Journal of Applied Phycology* 18: 209-218.
- Murray, S.N. & Dixon, P.S.** 1975. The effect of light intensity and light period on the development of thallus form in the marine red alga *Pleonosporium squarrulosum* (Harvey) Abbott (Rhodophyta, Ceramiales). II. Cell enlargement. *Journal of Experience Marine Biology and Ecology* 19: 165-176.
- Reddy, C.R.K., Kumar, G.R.K., Siddhanta, A.K. & Tewari, A.** 2003. *In vitro* somatic embryogenesis and regeneration of somatic embryos from pigmented callus of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty (Rhodophyta, Gigartinales). *Journal of Phycology* 39: 610-616.
- Roberts, L.W., Stiff, C.M. & Baba, S.** 1984. Effects of six different ágars on tracheary element differentiation in explants of *Lactuca*. *Plant Tissue Culture Letters* 1: 22-24.
- Tian, Q. & Reed, J.W.** 2001. Molecular links between light and auxin signaling. *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 274-280, 2001.
- Trewavas, A.J.** 1982. Growth substances sensitivity: the limiting factor in plant development. *Physiologia Plantarum* 55: 60-72.
- Wiseman, D.R.** 1976. Observation of the vegetative morphology of the red algal genus *Ochtodes* J. Agardh (Rhizophyllidaceae, Gigartinales). *Phycologia* 15: 143-147.
- Yokoya, N.S.** 1996. Controle do desenvolvimento e da morfogênese por auxinas e citocininas em três espécies de rodofíceas: *Gracilariopsis tenuifrons*, *Grateloupia dichotoma* e *Solieria filiformis*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 202p.

- Yokoya, N.S.** 2000. Apical callus formation and plant regeneration controlled by plant growth regulators on axenic culture of the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycological Research* 48: 133-142.
- Yokoya, N.S. & Handro, W.** 1996. Effects of auxins and cytokinin on tissue culture of *Grateloupia dichotoma* (Gigartinales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 326/327: 393-400.
- Yokoya, N.S. & Handro, W.** 2002. Effects of plant growth regulators and culture medium on morphogenesis of *Solieria filiformis* (Rhodophyta) cultured in vitro. *Journal of Applied Phycology* 14: 97-102.
- Yokoya, N.S., Kakita, H., Obika, H. & Kitamura, T.** 1999. Effects of environmental factors and plant growth regulators on growth of the red alga *Gracilaria vermiculophylla* from Shikoku Island, Japan. *Hydrobiologia* 398: 339-347.
- 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: A.R.O. Chapman, R.J. Anderson, V.J. Vreelnd & J.R. Dawison (eds.). Proceedings of the XVIIth International Seaweed Symposium, Oxford University Press, New York, pp. 425-433.*
- Yokoya, N.S., West, J.A. & Luchi, A.E.** 2004. Effects of plants growth regulators on callus formation, growth and regeneration in axenic tissue cultures of *Gracilaria tenuispitata* and *Gracilaria perplexa* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycological Research* 52: 244-25.

DISCUSSÃO GERAL

Para se atingir os objetivos propostos neste estudo, foram realizados estudos para estabelecer um protocolo para obtenção de explantes axênicos, bem como avaliar a influência do ágar e os efeitos dos fitorreguladores e da irradiância no crescimento e na morfogênese dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis*.

Um dos primeiros passos para se estabelecer a cultura de tecidos é a obtenção de culturas axênicas (livre de qualquer tipo de contaminação), uma vez que a interação da macroalga com outros organismos pode interferir no seu desenvolvimento (Aguirre-Lipperheide *et al.* 1995). No presente trabalho, o protocolo para a obtenção de explantes axênicos de ambos os morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* envolveu as seguintes etapas: a) pré-tratamento por 48 h em solução de água do mar esterilizada contendo 100 µg.L⁻¹ de nistatina e 1 ml.L⁻¹ da solução antibiótica e antimicótica de Provasoli; b) lavagem com solução de água do mar esterilizada com hipoclorito de sódio a 0,5% e 200 µl.L⁻¹ de detergente por 20 segundos; e c) três lavagens sucessivas com água do mar autoclavada. Foram realizados testes preliminares para determinar o melhor protocolo, uma vez que a sensibilidade aos agentes utilizados para a obtenção de explantes axênicos variam de espécie para espécie.

Outro aspecto importante na cultura de tecidos de macroalgas é a utilização do meio sólido para indução de calos, já que para algumas espécies a presença do gelificante é responsável pela ocorrência desta estrutura (Jin *et al.* 1997). Neste estudo, pode-se observar que a presença de ágar no meio de cultura inibiu o crescimento dos segmentos apicais de ambos os morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis*, mas foi responsável pela formação de calos apicais e intermediários, devido, provavelmente, à dessecação do explante, que ficou exposto ao ar durante todo o período experimental. Entretanto, as diferentes concentrações de ágar não influenciaram o crescimento dos calos formados em segmentos apicais e intercalares dos morfos estudados.

Considerando as condições experimentais adotadas no presente estudo, constatou-se que a aplicação de fitorreguladores teve um efeito maior nos processos de crescimento do que nos processos morfogenéticos em ambos os morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis*. Além disso, o morfo verde foi mais sensível aos fitorreguladores do que o morfo vermelho. O efeito mais expressivo está relacionado à inibição das TC de segmentos apicais e intercalares de ambos os morfos pigmentares pelo 2,4-D. Este efeito pode estar relacionado ao aumento

nos níveis de auxina interna ou na incapacidade de metabolizar auxinas sintéticas, fato já relatado para outras espécies de macroalgas marinhas (Dawes 1971, Buggeln 1976, Hanisak 1979).

Com relação aos processos morfogenéticos, em geral, os efeitos dos fitorreguladores e da irradiância foram nulos para a formação de calos e para a regeneração indireta, tanto para o morfo verde quanto para o morfo vermelho de *Gracilaria domingensis*, com exceção da formação de regenerações diretas de segmentos apicais e intercalares do morfo verde cultivados sob a irradiância de 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Estes resultados diferem dos obtidos para outras espécies de Gracilariales, onde os fitorreguladores têm efeito estimulatório na formação destas estruturas. Este fato comprova que os fitorreguladores exercem efeitos diferentes dependendo da espécie em estudo e que a formação destas estruturas depende também de outros fatores, como o estado fisiológico do talo e o tipo de segmento (Huang & Fujita 1997).

Os estudos sobre a regeneração a partir de explantes e de calos é de extrema importância, uma vez que as regenerações originarão novas plantas que poderão ser utilizadas como mudas para o cultivo comercial. Nesse contexto, torna-se importante o conhecimento dos vários aspectos envolvidos no processo de regeneração direta e indireta, a fim de melhorar a micropropagação. Os resultados observados durante o desenvolvimento deste estudo evidenciaram a necessidade de altos níveis de irradiância para o desenvolvimento de regenerações em morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis*. Estes resultados corroboram com a hipótese de que sinais celulares podem ser desviados para os processos de desenvolvimento vegetal sob altos níveis de irradiância (Das *et al.* 2002). Além disso, os efeitos estimulatórios dos fitorreguladores em segmentos apicais e intercalares dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis* ocorreram, em sua maioria, sob altos níveis de irradiância. Assim, altos níveis de irradiância podem alterar os níveis endógenos de fitorreguladores ou a sensibilidade celular aos fitorreguladores, promovendo desta forma, um número maior de respostas aos fitorreguladores.

Os resultados do presente estudo confirmam a variabilidade intraespecífica nas respostas dos morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* aos fitorreguladores. Em estudos relacionados ao crescimento, a maior parte das variantes pigmentares de Rhodophyta apresenta menor desempenho do que o tipo selvagem (van der Meer 1990), embora, em alguns casos, este desempenho seja semelhante (Dawes *et al.* 1994). O morfo vermelho de *Gracilaria domingensis* (selvagem) apresentou desempenho superior ao morfo verde, indicando que esse morfo pode ser mais adequado para a micropropagação tendo em vista o cultivo comercial de *Gracilaria domingensis*.

Considerações Finais

Os resultados apresentados no presente trabalho contribuem para o conhecimento sobre a fisiologia do desenvolvimento de *Gracilaria domingensis* englobando aspectos de sua diversidade intraespecífica. No presente estudo verificou-se que o morfo vermelho de *Gracilaria domingensis* apresenta maior desempenho em relação ao morfo verde, corroborando com estudos anteriores em que variantes pigmentares de espécies de Rhodophyta apresentaram desempenho inferior quando comparado ao fenótipo selvagem (van der Meer 1990). Com base neste resultado, sugere-se a utilização do morfo vermelho para estudos de micropropagação visando o cultivo comercial de *Gracilaria domingensis*.

Adicionalmente, os resultados apresentados permitiram caracterizar os efeitos dos fitorreguladores no crescimento e na morfogênese de ambos os morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis*. Para futuros estudos, sugere-se a determinação dos níveis endógenos de auxinas e citocininas presentes no talo e no calo dos dois tipos de morfos e de outras espécies de macroalgas, a fim de se entender o efeito inibitório do 2,4-D no crescimento e esclarecer como os fitorreguladores promovem a formação de calos e regenerações em determinadas espécies de macroalgas.

Estudos posteriores, como a investigação da ocorrência de metabólitos secundários e da atividade biológica de extratos produzidos a partir das regenerações originadas da cultura de tecidos, são necessários para se conhecer os efeitos dos fitorreguladores e da irradiância na síntese e no acúmulo destes compostos. Ainda, sugere-se que a propagação clonal dos morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* seja realizada através do processo de regeneração direta e em altos níveis de irradiância, uma vez que nestas condições as porcentagens de regenerações foram mais altas. As regenerações produzidas a partir da cultura de tecidos poderão ser utilizadas como um “banco de sementes” para serem introduzidas em cultivos no mar, produzindo, de forma sustentável, a biomassa necessária para a síntese de fármacos e outros compostos de interesse econômico. Portanto, a cultura de tecidos é uma técnica que gera muitos benefícios, reduzindo o extrativismo de macroalgas a partir de bancos naturais, e contribuindo para a sua conservação.

CONCLUSÕES

- Os segmentos apicais e intercalares dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis* cultivados em diferentes concentrações de ágar apresentam o desenvolvimento de três tipos de calos denominados de acordo com a região de origem: calo basal, calo intermediário e calo apical. As características anatômicas dos calos não variam entre os dois tipos de morfos;
- A presença de ágar no meio de cultura inibe o crescimento de segmentos apicais, sendo essencial para a formação de calos apicais e intermediários nos dois tipos de segmentos de talo dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis*;
- As diferentes concentrações de ágar não influenciam o crescimento dos calos formados nos segmentos apicais e intermediários dos morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis*;
- Os morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* não apresentam diferenças quanto a anatomia dos calos formados em segmentos apicais e intercalares;
- O 2,4-D apresenta um efeito inibitório sobre os processos de crescimento nos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis*. Por outro lado, o AIA estimula o crescimento de segmentos intercalares de ambos os morfos;
- As citocininas apresentam efeito estimulatório sobre os processos de crescimento;
- De maneira geral, os fitorreguladores não influenciam a formação de calos e o processo de regeneração indireta. Entretanto, os fitorreguladores e a alta irradiância estimulam a formação de regenerações diretas em segmentos apicais e intercalares do morfo verde;
- Os efeitos estimulatórios dos fitorreguladores ocorrem, em sua maioria, sob altos níveis de irradiância;

- Nas condições experimentais adotadas no presente estudo, o desempenho do morfo vermelho é superior ao morfo verde, o que caracteriza a variabilidade intraespecífica nas respostas dos morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis*.

Referências bibliográficas

- Aguirre-Lipperheide, M., Estrada-Rodríguez, F.J. & Evans, L.V.** 1995. Facts, problems and needs in seaweeds tissue culture: an appraisal. *Journal of Phycology* 31: 677-688.
- Buggeln, R.G.** 1976. Auxin, an endogenous regulator of growth in algae? *Journal of Phycology* 12: 355-358.
- Das, D.K., Reddy, M.K., Upadhyaya, S.K.** 2002. An efficient leaf-disc culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Report* 20: 999-1005.
- Dawes, C.J.** 1971. Indole-3-acetic acid in the green algal coenocyte *Caulerpa prolifera* (Chlorophyceae, Siphonales). *Phycologia* 10 (4): 375-379.
- Dawes, C.J., Lluisma, A.O. & Trono, G.C.** 1994. Laboratory and field growth studies of commercial strains of *Eucheuma denticulatum* and *Kappaphycus alvarezii* in the Philippines. *Journal of Applied Phycology* 6: 21-24.
- Hanisak, M.D.** 1979. Effect of indole-3-acetic acid on growth of *Codium fragile* subsp. *tomentosoides* (Chlorophyceae) in culture. *Journal of Phycology* 15: 124-127.
- Huang, W. & Fujita, Y.** 1997. Callus induction and thallus regeneration in some species of red algae. *Phycological Research* 45: 105-111.
- Jin, H., Seo, G., Cho, Y.C., Hwang, E., Sohn, C.H. & Hong, Y.** 1997. Gelling agents for tissue culture of the seaweed *Hizikia fusiformis*. *Journal of Applied Phycology* 9: 489-493.
- van der Meer, M.L.** 1990. Genetics. *In*: K.M. Cole & R.G. Sheath (ed.). *Biology of the red algae*. Cambridge University Press, Cambridge, pp.103-119.