

JÔNATAS MARTINEZ CANUTO DE SOUZA

Efeitos das citocininas nas respostas fisiológicas e na
qualidade do ágar de *Gracilaria caudata* J. Agardh
(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

2015

JÔNATAS MARTINEZ CANUTO DE SOUZA

Efeitos das citocininas nas respostas fisiológicas e na
qualidade do ágar de *Gracilaria caudata* J. Agardh
(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

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Souza, Jônatas Martinez Canuto de
S729e Efeitos das citocininas nas respostas fisiológicas e na qualidade do ágar de
Gracilaria caudata J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) / Jônatas Martinez
Canuto de Souza -- São Paulo, 2015.
76 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do
Meio Ambiente, 2015
Bibliografia.

1. Algas. 2. Fitorreguladores. 3. Biorreatores. I. Título.

CDU: 582.26

Aos meus pais, Rita e Moacir,

À Náiali, com todo amor.

AGRADECIMENTOS

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 anos.

À Aline Paternostro Martins, pelo companheirismo e ensinamentos que foram fundamentais para o desenvolvimento do presente trabalho.

Aos meus companheiros amigos de todos os dias, Cesar Bertagia Pasqualetti e Cecília Hissami Kano, por todas as conversas, ajuda e conhecimento que foram compartilhados durante todos estes anos.

Ao José Domingos e à Valdilene, pela dedicação e organização do Laboratório de Cultura de Algas “Marilza Cordeiro Marino”, do Núcleo de Pesquisa em Ficologia e Cianobactérias.

Aos meus amigos do Laboratório de Cultura de Algas e Cianobactérias “Marilza Cordeiro Marinho”: Ana Livia, Camila, Edna, Fernanda Rios, Júlia, Juliana, Luanda, Maíra, João, Renato, Watson, pela amizade e ajuda em inúmeras ocasiões.

As pesquisadoras, Dra. Andréa Tutti Dra. Célia Leite Sant`Anna, Dra. Diclá Pupo Santos, Luciana Retz de Carvalho, Mutue Toyota Fujii, Silvia Maria Pita de Beuclair Guimarães, funcionários, estagiários e pós-graduandos do Núcleo de Pesquisa em Ficologia, pelo carinho com que me acolheram, pela agradável convivência, pelo apoio e pela amizade.

Ao Dr. Pio Colepicolo Neto (Instituto de Química da USP), pelo apoio necessário ao desenvolvimento do trabalho.

Ao Dr. Alan T. Critchley (Acadian Seaplants Limited, Canadá), por fornecer o AMPEP (Acadian Marine Plant Extract Powder) utilizados nos experimentos.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado da cota institucional do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica de São Paulo.

À família Lopes Ferreira, Mirian, Genaro, Dilean, Lucas e Paula, por todo apoio e carinho.

Aos meus pais, Rita e Moacir, pelo apoio sem o qual este trabalho não seria possível. Agradeço por estarem sempre presentes em minha vida, demonstrando acima de tudo, amor, carinho e compreensão nos momentos mais difíceis.

À Nátali, por estar sempre ao meu lado, pelo carinho e compreensão, mesmo nos momentos mais críticos. Obrigado por ser esta pessoa maravilhosa. Eu te amo, infinitamente!

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	III
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O Filo Rhodophyta.....	1
1.2. O gênero <i>Gracilaria</i> Greville	1
1.3. Fitorreguladores em macroalgas marinhas	4
1.4. Luz	6
2. OBJETIVO GERAL.....	8
2. 1. Objetivos específicos	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1. Espécie estudada	9
3.2. Metodologia geral de cultivo	9
3.2.1. Coleta e esterilização da água do mar	9
3.2.2. Manutenção das culturas unialgáceas	10
3.2.3. Experimentos com citocininas	11
3.3. Experimento com o extrato AMPEP (Acadian Marine Plant Extract Powder) ...	12
3.4. Análise dos experimentos	13
3.4.1. Taxa de crescimento.....	13
3.4.2. Morfometria	13
3.4.4. Extração e dosagem de pigmentos fotossintetizantes	13
3.4.5. Extração e dosagem de proteínas solúveis totais	14
3.5. Experimento com citocininas em biorreatores.....	14
3.5.1. Análise do ágar.....	15
3.6. Análises estatísticas	17

4. RESULTADOS	18
4.1. Efeitos das citocininas em diferentes irradiâncias	18
4.1.1. Taxas de crescimento	18
4.1.2. Morfometria	19
4.1.3. Pigmentos fotossintetizantes	21
4.1.4. Proteínas solúveis totais	29
4.1.5. Análise estatística.....	30
4.2. Efeitos do extrato AMPEP (Acadian Marine Plant Extract Powder)	36
4.2.1. Taxa de crescimento.....	36
4.2.2. Pigmentos fotossintetizantes	36
4.3. Cultivo de <i>Gracilaria caudata</i> em biorreatores.....	38
4.3.1. Fatores abióticos.....	38
4.3.2. Taxa de crescimento.....	39
4.3.3. Análise do ágar.....	40
5. DISCUSSÃO.....	41
5.1. Efeitos das citocininas	42
5.2. Efeitos do AMPEP.....	44
5.3. Efeitos das citocininas no rendimento e qualidade do ágar	45
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

Lista de figuras

Figura 1: Estruturas químicas de citocininas utilizadas neste trabalho. Estruturas realizadas através do programa digital Chempider (2015). 4

Figura 2: Aspecto geral do gametófito feminino de *Gracilaria caudata* cultivado em laboratório..... 9

Figura 3: Sistema de biorreatores modelo TE-BIT-E3 (TECNAL[®]), A – Sistema de aquisição dos dados; B – Sistema de controle; C – Compressor para injeção de ar no sistema; D – Estrutura para filtragem e umidificação do ar; E – Sistema dos vasos de cultura e os sensores. 15

Figura 4: Aspecto do ágar extraído de *Gracilaria caudata* cultivada nos biorreatores . 16

Figura 5: Efeitos de diferentes concentrações de 2-isopenteniladenina (2iP), *cis*-zeatina e *trans*-zeatina, nas irradiâncias de 50 (em branco) e 100 (em preto) $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sobre a taxa de crescimento de *Gracilaria caudata* cultivada em meio ASP 12 – NTA por 28 dias. Média $\pm$ DP (n=6). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). 18

Figura 6: Efeitos de diferentes concentrações de benzilaminopurina (BA) e cinetina (K) nas irradiâncias de 50 (em branco) e 100 (em preto) $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sobre a taxa de crescimento de *Gracilaria caudata* cultivada em meio ASP 12 – NTA por 28 dias. Média $\pm$ DP (n=6). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$) 19

Figura 7: Efeitos de diferentes concentrações de 2-isopenteniladenina (2iP), *cis*-zeatina e *trans*-zeatina, nas irradiâncias de 50 (em branco) e 100 (em preto) $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ na formação de ramos primários em *Gracilaria caudata* cultivada em meio ASP

12 – NTA por 28 dias. Média $\pm$ DP (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). 20

Figura 8. Efeitos de diferentes concentrações de benzilaminopurina e cinetina (K) nas irradiâncias de 50 (em branco) e 100 (em preto) $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ na formação de ramos primários em *Gracilaria caudata* cultivada em meio ASP 12 – NTA por 28 dias. Média $\pm$ DP (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). 21

Figura 9: Efeitos de diferentes concentrações de 2-isopenteniladenina (2iP), *cis*-zeatina e *trans* zeatina nas irradiâncias de 50 (em branco) e 100 (em preto) $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ no conteúdo de ficoeritrina de *Gracilaria caudata* cultivada em meio ASP 12 – NTA por 28 dias. Média $\pm$ DP (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). 22

Figura 10: Efeitos de diferentes concentrações de benzilaminopurina (BA) e cinetina (K), nas irradiâncias de 50 (em branco) e 100 (em preto) $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ no conteúdo de ficoeritrina de *Gracilaria caudata*, cultivada em meio ASP 12 – NTA por 28 dias. Média $\pm$ DP (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). 23

Figura 11: Efeitos de diferentes concentrações de 2-isopenteniladenina (2iP), *cis*-zeatina e *trans*-zeatina, nas irradiâncias de 50 (em branco) e 100 (em preto) $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ no conteúdo de ficocianina de *Gracilaria caudata* cultivada em meio ASP 12 – NTA por 28 dias. Média $\pm$ DP (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). 24

Figura 12: Efeitos de diferentes concentrações de benzilaminopurina (BA) e cinetina (K), nas irradiâncias de 50 (em branco) e 100 (em preto) μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ no conteúdo de ficocianina de *Gracilaria caudata*, cultivada em meio ASP 12 – NTA por 28 dias. Média $\pm$ DP (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo teste de comparação múltipla de Student- Newman- Keuls ($p < 0,05$). 25

Figura 13: Efeitos de diferentes concentrações de benzilaminopurina (BA) e cinetina (K), nas irradiâncias de 50 (em branco) e 100 (em preto) μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ no conteúdo de aloficocianina de *Gracilaria caudata* cultivada em meio ASP 12 – NTA por 28 dias. Média $\pm$ DP (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo teste de comparação múltipla de Student- Newman- Keuls ($p < 0,05$). 26

Figura 14: Efeitos de diferentes concentrações de benzilaminopurina (BA) e cinetina (K), nas irradiâncias de 50 (em branco) e 100 (em preto) μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ no conteúdo de aloficocianina de *Gracilaria caudata* cultivada em meio ASP 12 – NTA por 28 dias. Média $\pm$ DP (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo teste de comparação múltipla de Student- Newman- Keuls ($p < 0,05$). 27

Figura 15: Efeitos de diferentes concentrações de 2-isopenteniladenina (2iP), *cis*-zeatina e *trans*-zeatina, nas irradiâncias de 50 (em branco) e 100 (em preto) de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ no conteúdo de clorofila *a* de *Gracilaria caudata* cultivada em meio ASP 12–NTA por 28 dias. Média $\pm$ DP (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo teste de comparação múltipla de Student- Newman- Keuls ($p < 0,05$). 28

Figura 16: Efeitos de diferentes concentrações de benzilaminopurina (BA) e cinetina (K), nas irradiâncias de 50 (em branco) e 100 (em preto) μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ - no conteúdo de clorofila *a* de *Gracilaria caudata* cultivada em meio ASP 12 – NTA por 28 dias. Média $\pm$ DP (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente

diferentes entre si, segundo teste de comparação múltipla de Student- Newman- Keuls ($p < 0,05$). 29

Figura 17: Efeitos de diferentes concentrações de 2-isopenteniladenina (2iP), *cis*-zeatina e *trans*-zeatina, na variação no conteúdo de proteínas em *Gracilaria caudata* cultivada em meio ASP 12 – NTA, em irradiância de 50 (em branco) e 100 (em preto) $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durante 28 dias. Média $\pm$ DP ($n=3$). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls. ($p < 0,05$)..... 30

Figura 18: Diagrama de dispersão de componentes principais de dois eixos de análise de dados sobre os efeitos de 2-isopenteniladenina, *cis*-zeatina, *trans*-zeatina, benzilaminopurina e cinetina sobre o crescimento taxas, pigmentos e teores de proteínas solúveis totais de *Gracilaria caudata*, cultivadas em meio ASP 12 – NTA, em irradiâncias de 50 e 100 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durante 28 dias. Tratamentos: P05 (2iP 0 μM 50), P055 (2iP 0,5 μM 50), P55 (2iP 5,0 μM 50), P505 (2iP 50,0 μM 50), P01 (2iP 0 μM 100), P051 (2iP 0,5 μM 100), P51 (2iP 5,0 μM 100), P501 (2iP 50,0 μM 100), C05 (*cis*-Zeatina 0 μM 50), C055 (*cis*-Zeatina 0,5 μM 50), C55 (*cis*-Zeatina 5,0 μM 50), C505 (*cis*-Zeatina 50,0 μM 50), C01 (*cis*-Zeatina 0 μM 100), C051 (*cis*-Zeatina 0,5 μM 100), C51 (*cis*-Zeatina 5,0 μM 100), C501 (*cis*-Zeatina 50,0 μM 100), T05 (*trans*-Zeatina 0 μM 50), T055 (*trans*-Zeatina 0,5 μM 50), T55 (*trans*-Zeatina 5,0 μM 50), T505 (*trans*-Zeatina 50,0 μM 50), T01 (*trans*-Zeatina 0 μM 100), T051 (*trans*-Zeatina 0,5 μM 100), T51 (*trans*-Zeatina 5,0 μM 100), T501 (*trans*-Zeatina 50,0 μM 100), A05 (BA 0 μM 50), A055 (BA 0,5 μM 50), A55 (A 5,0 μM 50), A505 (BA 50,0 μM 50), A01 (BA 0 μM 100), A051 (BA 0,5 μM 100), A51 (BA 5,0 μM 100), A501 (BA 50,0 μM 100), K05 (K 0 μM 50), K055 (K 0,5 μM 50), K55 (K 5,0 μM 50), K505 (K 50,0 μM 50), K01 (K 0 μM 100), K051 (K 0,5 μM 100), K51 (K 5,0 μM 100), K501 (K 50,0 μM 100), sendo que 50 e 100 correspondem, respectivamente, às irradiâncias de 50 e 100 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Variáveis analisadas: TC (taxa de crescimento, FE (ficoeritrina), FC (ficocianina), AFC (aloficocianina), Cla (clorofila *a*), PST (proteínas solúveis totais). 35

Figura 19: Efeitos de diferentes concentrações (0,001 a 5,0 mg.L⁻¹) do extrato AMPEP (Acadian Marine Plant Extract Powder) sobre a taxa de crescimento de *Gracilaria caudata* cultivada em água do mar esterilizada (H₂O) ou água do mar enriquecida com 50% da solução de nutrientes de von Stosch (VSES/2) por 28 dias. Média ± DP (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo teste de comparação múltipla de Student- Newman- Keuls ($p < 0,05$). 36

Figura 20: Efeitos de diferentes concentrações (0,001 a 5,0 mg.L⁻¹) do extrato AMPEP (Acadian Marine Plant Extract Powder), no conteúdo de ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina e clorofila a de *Gracilaria caudata* cultivada em água do mar esterilizada (H₂O) ou água do mar enriquecida com 50% da solução de nutrientes de von Stosch (VSES/2) após 28 dias. Média ± DP (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo teste de comparação múltipla de Student- Newman- Keuls ($p < 0,05$). 37

Figura 21: Variação diária da temperatura do meio nos biorreatores. Tratamentos com 50% de meio von Stosch (VSES/2, controle) e adição de 0,5 e 5,0 µM de 2-isopenteniladenina (2iP) e 0,5 µM de benzilaminopurina (BA). Média ± DP (n=3). 38

Figura 22: Variação diária do O₂ dissolvido nos biorreatores. Tratamentos com 50% de meio von Stosch (VSES/2, controle) e adição de 0,5 e 5,0 µM de 2-isopenteniladenina (2iP) e 0,5 µM de benzilaminopurina (BA). Média ± DP (n=3). 39

Figura 23: Variação diária do pH do meio de cultura nos biorreatores. Tratamentos com 50% de meio von Stosch (VSES/2, controle) e adição de 0,5 e 5,0 µM de 2-isopenteniladenina (2iP) e 0,5 µM de benzilaminopurina (BA). Média ± DP (n=3). 39

Figura 24: Efeitos de diferentes tratamentos com 50% de meio von Stosch (VSES/2, controle) com adição de 0,5 e 5,0 µM de 2-isopenteniladenina (2iP) e 0,5 µM de benzilaminopurina (BA) sobre a taxa de crescimento de *Gracilaria caudata* cultivada em biorreatores por 28 dias. Média ± DP (n=3). 40

Figura 25: Efeitos de diferentes tratamentos com 50% de meio von Stosch (VSES/2, controle) e adição de 0,5 e 5,0 μM de 2-isopenteniladenina (2iP) e 0,5 μM de benzilaminopurina (BA) no rendimento do ágar de *Gracilaria caudata* cultivada em biorreatores por 28 dias. Média $\pm$ DP (n=3)..... 40

Figura 26: Efeitos de diferentes tratamentos com 50% de meio von Stosch (VSES/2, controle) e adição de 0,5 e 5,0 μM de 2-isopenteniladenina (2iP) e 0,5 μM de benzilaminopurina (BA) no teor percentual de 3,6 anidrogactose do ágar de *Gracilaria caudata* cultivada em biorreatores por 28 dias. Média $\pm$ DP (n=3). 41

Figura 27: Efeitos de diferentes tratamentos com 50% de meio von Stosch (VSES/2, controle) e adição de 0,5 e 5,0 μM de 2-isopenteniladenina (2iP) e 0,5 μM de benzilaminopurina (BA) no teor percentual de sulfato do ágar de *Gracilaria caudata* cultivada em biorreatores por 28 dias. Média $\pm$ DP (n=3). 41

Lista de tabelas

Tabela 1: Composição química da solução de nutrientes de von Stosch preparada segundo Edwards (1970), com modificações segundo Yokoya (1996). 10

Tabela 2: Composição química do meio de cultura sintético ASP 12-NTA, segundo Iwasaki (1961), modificado por Yokoya (1996). 11

Tabela 3: Solução de metais-traço PII utilizada na composição do meio ASP 12-NTA. 12

Tabela 4: Solução de metais-traço SII utilizada na composição do meio ASP 12-NTA. 12

Tabela 5: Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas nas irradiâncias de 50 e 100 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ com *Gracilaria caudata* cultivadas por 28 dias em meio ASP 12-NTA com diferentes concentrações de 2-isopenteniladenina. Em cada célula da tabela, o primeiro valor corresponde ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de *p*. Negrito, correlação significativa. Taxa de Crescimento (TC), ficoeritrina (FE), ficocianina (FC), aloficocianina (AFC), clorofila *a* (Cla) e proteínas solúveis totais (PST)..... 31

Tabela 6: Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas nas irradiâncias de 50 e 100 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ com *Gracilaria caudata* cultivadas por 28 dias em ASP 12-NTA com diferentes concentrações de *cis*-zeatina. Em cada célula da tabela, o primeiro valor corresponde ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de *p*. Negrito, correlação significativa. Taxa de Crescimento (TC), ficoeritrina (FE), ficocianina (FC), aloficocianina (AFC), clorofila *a* (Cla) e proteínas solúveis totais (PST)..... 31

Tabela 7: Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas nas irradiâncias de 50 e 100 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ com *Gracilaria caudata* cultivada por 28 dias em ASP 12-NTA com diferentes concentrações de *trans*-Zeatina. Em cada célula da tabela, o primeiro valor corresponde ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de *p*. Negrito, correlação significativa. Taxa de Crescimento (TC), ficoeritrina (FE), ficocianina (FC), aloficocianina (AFC), clorofila *a* (Cla) e proteínas solúveis totais (PST)..... 32

Tabela 8: Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas nas irradiâncias de 50 e 100 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ com *Gracilaria caudata* cultivada por 28 dias em ASP 12-NTA com diferentes concentrações de benzilaminopurina. Em cada célula da tabela, o primeiro valor corresponde ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de *p*. Negrito, correlação significativa. Taxa de Crescimento (TC), ficoeritrina (FE), ficocianina (FC), aloficocianina (AFC), clorofila *a* (Cla) e proteínas solúveis totais (PST)..... 32

Tabela 9: Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas nas irradiâncias de 50 e 100 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ com *Gracilaria caudata* cultivada por 28 dias em ASP 12-NTA com diferentes concentrações de cinetina. Em cada célula da tabela, o primeiro valor corresponde ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de *p*. Negrito, correlação significativa. Taxa de Crescimento (TC), ficoeritrina (FE), ficocianina (FC), aloficocianina (AFC), clorofila *a* (Cla) e proteínas solúveis totais (PST). 33

Tabela 10: Análise de componentes principais (PCA) mostrando a explicabilidade dos dois principais eixos que formam o diagrama de dispersão da Figura 19 e a importância das variáveis em cada eixo. As variáveis analisadas foram taxa de Crescimento (TC), ficoeritrina (FE), ficocianina (FC), aloficocianina (AFC), clorofila *a* (Cla) e proteínas solúveis totais (PST) de *Gracilaria caudata* cultivadas em meio ASP 12 – NTA com adição de diferentes citocininas em irradiâncias de 50 e 100 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durante 28 dias..... 34

Tabela 11: Análise de correlação de Pearson das variáveis analisadas em *Gracilaria caudata* cultivada por 28 dias com diferentes concentrações de AMPEP adicionadas a água do mar e VSES/2. Em cada célula da tabela, o primeiro valor corresponde ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de *p*. Negrito, correlação significativa. Taxa de Crescimento (TC), ficoeritrina (FE), ficocianina (FC), aloficocianina (AFC), clorofila *a* (Cla). 38

RESUMO

No litoral brasileiro, a espécie *Gracilaria caudata* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) é explorada comercialmente como fonte de matéria prima para a produção de ágar. Estudos visando o conhecimento do desenvolvimento da espécie são necessários para a conservação das populações naturais e para a produção sustentável de biomassa. Desta forma, os objetivos do presente estudo foram: 1. avaliar os efeitos de cinco citocininas sob dois níveis de irradiância (50 e 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) no desenvolvimento, no conteúdo de pigmentos e de proteínas de *G. caudata*, 2. comparar os efeitos de citocininas com estrutura química distinta: citocininas aromáticas (benzilaminopurina (BA) e cinetina (K)), e derivadas do isoprenóide (2-isopenteniladenina (2iP), *cis*-zeatina e *trans*-zeatina), 3. avaliar o efeito do extrato AMPEP (Acadian Marine Plant Extract Powder), produzido a partir da alga parda *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) L. Jolis no crescimento e no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes e 4. avaliar os efeitos de duas citocininas (benzilaminopurina e 2-isopenteniladenina) no crescimento e no rendimento e na qualidade do ágar de *G. caudata* cultivada em biorreatores. As citocininas foram testadas em concentrações de zero, 0,5, 5,0, e 50,0 μM que foram adicionadas ao meio de cultura sintético ASP 12-NTA (salinidade 30 ups), sob dois níveis de irradiância (50 e 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Foram analisadas as concentrações de proteínas totais e de pigmentos (clorofila *a*, ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina), a taxa de crescimento e a formação de ramos primários. Os efeitos do extrato AMPEP foram testados em quatro concentrações (0, 0,1, 1,0 e 5,0 mg L^{-1}) em água do mar e em nove concentrações (0, 0,001, 0,01, 0,1, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 mg L^{-1}) em água do mar enriquecida com 50% da solução de von Stosch (VSES/2). O experimento nos biorreatores foi composto por doze vasos de cultura, com volume total de 2,5 L sendo 2,0 L com meio de cultura (VSES/2) e foram adicionadas as citocininas BA e 2iP. Nos biorreatores, foram monitorados diariamente a temperatura, oxigênio dissolvido e pH do meio e foram realizadas análises de rendimento e da qualidade do ágar (teores de 3,6 anidrogactose e de sulfato). As condições gerais de todos os experimentos foram: temperatura média de 23°C, salinidade de 30-32 ups e fotoperíodo de 14h. Os tratamentos foram testados com três ou seis repetições ($n=3$ ou $n=6$), e foram realizadas análises de variância de um ou dois fatores, correlação de Pearson e análise de componente principal (PCA). Em geral, as citocininas apresentaram efeito nulo (2iP, BA e K) ou inibitório (*cis*-zeatina) na taxa de

crescimento de *G. caudata*. A formação de ramos laterais foi inibida em concentrações de 5,0 μM de 2iP tanto em 50 e 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Por outro lado, *cis* e *trans*-zeatina, BA e K nas concentrações de 0,5 e/ou 5,0 μM estimulou a formação de ramos primários na irradiância de 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Em geral, as concentrações de *cis* e *trans*-zeatina apresentaram correlação negativa com o conteúdo dos pigmentos fotossintetizantes e de proteínas nas duas irradiâncias testadas. Por outro lado, a BA não apresentou correlação significativa com o conteúdo de pigmentos e proteínas, e a K apresentou correlação com alguns pigmentos em função da irradiância testada. Os tratamentos com AMPEP resultaram em maiores taxas de crescimento e maior conteúdo de pigmentos fotossintetizantes quando utilizadas em combinação com VSES/2. As diferentes concentrações de citocininas nos biorreatores não influenciaram a taxa de crescimento, rendimento e qualidade do ágar. Porém, a quantidade de 3,6 anidrogallactose é maior do que o teor de sulfato, conferindo ao ágar de *G. caudata* uma maior propriedade gelificante, e aumentando o seu valor comercial. Os resultados obtidos indicam que a estrutura química das citocininas e o nível de irradiância influenciam o crescimento, a morfologia e o conteúdo de pigmentos fotossintetizantes e de proteínas em *G. caudata*.

Palavras-chave: 2-isopenteniladenina, ágar, benzilaminopurina, cinetina, citocininas, *Gracilaria caudata*, zeatina

ABSTRACT

In Brazil, *Gracilaria caudata* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) is commercially exploited as a source of raw material for the production of agar. Studies on the knowledge of its development are necessary for the conservation of natural populations and the sustainable production of biomass. Thus, the objectives of the present study were: 1. Evaluate the effects of five cytokinins under two levels of irradiance (50 and 100 μmol of photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) in the development, content of photosynthetic pigments and proteins of *G. caudata*, 2. Compare the effects of cytokinins with different chemical structures: aromatic cytokinins (benzylaminopurine (BA) and kinetin (K)) and isoprenoid cytokinins (2-isopentenyladenine (2iP), *cis*-zeatin and *trans*-zeatin) , 3. Evaluate the effects of AMPEP extract (Acadian Marine Plant Extract Powder), produced by the brown alga *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) L. Jolis on growth and content of photosynthetic pigments, and 4. Evaluate the effects of two cytokinins (BA and 2iP) in the growth, and agar yield and quality of *G. caudata* cultivated in bioreactors. The cytokinins were tested in concentrations of zero, 0.5, 5.0, and 50.0 μM , which were added to the ASP 12-NTA synthetic medium (salinity 30 psu) under two levels of irradiance (50 and 100 μmol of photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Concentrations of total proteins and pigments (chlorophyll, phycoerythrin, phycocyanin and allophycocyanin), growth rates and formation of primary branches were analyzed. The effects of AMPEP extract were tested at four concentrations (0, 0.1, 1.0 and 5.0 mg L^{-1}) added to seawater, and nine concentrations (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 and 5.0 mg L^{-1}) added to seawater enriched with 50% of von Stosch solution (VSES/2). The experiment in bioreactors comprised twelve culture vessels with a total volume of 2.5 L, and 2.0 L of culture medium (VSES/2) with addition of BA or 2iP. Daily variations of temperature, dissolved oxygen and pH of the medium were monitored, and growth and agar yield and quality (3,6 anhydrogalactose and sulfate contents) were determined. General conditions of all experiments were temperature of 23 °C, salinity of 30-32 psu and photoperiod of 14h. All treatments were tested with three or six replicates ($n = 3$ or $n = 6$). Data were analysed by one or two-way analysis of variance, Pearson correlation and principal component analysis (PCA). In general, cytokinins showed no effect (2iP, BA and K) or inhibitory (*cis*-zeatin) in the growth rate of *G. caudata*. The formation of primary branches was inhibited at concentrations of 5.0 μM of 2iP, under both 50 and 100 μmol of photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Moreover, *cis* and *trans*-zeatin, BA and K at the concentrations of 0.5 and/or 5.0 μM stimulated the formation of the primary branches under irradiance of

100 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. In general, concentrations of *cis* and *trans*-zeatin showed negative correlation with the contents of photosynthetic pigments and proteins under the two irradiances. On the other hand, BA showed no correlation with the content of pigments and proteins, and K correlated only with some pigments as a function of irradiance level. Treatments with AMPEP resulted in higher growth rates and higher content of photosynthetic pigments when combined with VSES/2. The different concentrations of cytokinin in the bioreactors did not influence the growth rate, and agar yield and quality. However, the 3,6 anhydrogalactose content was higher than the sulphate content, and this chemical characteristic gives higher gelling property to *G. caudata* agar, increasing its commercial value. The results of the present study indicate that the chemical structure of cytokinins and the irradiance level influence the growth, morphology and contents of photosynthetic pigments and s in *G. caudata*.

Key-words: 2-isopentenyladenine, agar, benzylaminopurine, kinetin, cytokinins, *Gracilaria caudata*, zeatin

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Filo Rhodophyta

O Filo Rhodophyta (algas vermelhas) é composto aproximadamente de 4000 a 6000 espécies conhecidas, que apresentam diversas formas e tamanhos, desde organismos unicelulares microscópicos à organismos macroscópicos e estruturalmente mais complexos (Raven *et al.*, 2007). É um grupo amplamente distribuído pelo mundo, e a grande maioria se encontra em ambiente marinho, crescendo geralmente fixa às rochas ou sobre outras algas, como epífitas. As características deste filo podem ser encontradas no histórico de vida, nos cloroplastos, no material de reserva e na parede celular desses organismos (Raven *et al.*, 2007).

A ausência de gametas flagelados pode ter sido responsável pelo aparecimento de um histórico de vida mais complexo do que aqueles dos demais grupos de algas, apresentando alternância de gerações e mais uma fase diplóide (o carposporofito), que auxilia a produzir uma maior quantidade de esporos, ampliando a sua dispersão e suprimindo assim a falta de estruturas com flagelos (Raven *et al.*, 2007).

Os cloroplastos das algas vermelhas são providos de clorofila *a* e ficobilinas, que são pigmentos acessórios com a função de ampliar a faixa de absorção de luz, possibilitando a sobrevivência em ambientes mais profundos. As ficobilinas incluem 3 tipos de pigmentos, a ficoeritrina, a ficocianina e a aloficocianina, que apresentam picos de absorção em comprimentos de onda específicos (Gvindjee & Shevala, 2011). Assim como os cloroplastos, a parede celular das algasvermelhas apresentam polissacarídeos sulfatados com função estrutural, denominados ficocolóides. Estes carboidratos são de grande importância, pois proporcionam proteção contra a ação das ondas, herbivoria e dessecação em períodos de maré baixa (Usov, 2011)

1.2. O gênero *Gracilaria* Greville

O gênero *Gracilaria* apresenta um histórico de vida do tipo Polysiphonia. É um histórico com três fases, sendo uma fase haplóide, o gametófito; e duas fases diplóides, o tetrasporófito e o carposporófito (Kain & Destombe, 1995). O gametófito feminino é fertilizado *in situ* e o zigoto dá origem ao carposporófito diploide, uma geração produtora de esporos e parasita do gametófito feminino. Os carpósporos dão origem a tetrasporófitos diplóides que produzem tetrasporângios onde ocorrerá a meiose produzindo tetrásporos haplóides (Oliveira & Plastino, 1994).

As espécies do gênero *Gracilaria* Greville são responsáveis por cerca de 60% da produção mundial de ágar (Tseng, 2001), pelo fato de apresentar altas taxas de crescimento e fácil propagação vegetativa que favorecem o seu cultivo (Kain & Destombe, 1995). A expressão “algas gracilarióides” tem sido empregada na literatura para designar espécies da família Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta), pertencentes aos gêneros *Gracilaria* Greville, *Gracilariopsis* E. Y. Dawson e *Hydropuntia* Montagne. Esses gêneros ocorrem predominantemente nas regiões tropicais (Oliveira & Plastino, 1994) e incluem espécies que são consideradas importantes fontes de ágar (Oliveira *et al.*, 2000).

Gracilaria caudata J. Agardh é uma espécie encontrada em regiões entre-marés, apresentando uma distribuição ampla, desde o Caribe até o Estado de Santa Catarina (Platino & Oliveira, 1997). É uma espécie de talo cilíndrico de coloração vermelha, com até 34 cm de comprimento e 1,7 mm de diâmetro, e do apressório parte um ou mais ramos que podem atingir até a quinta ordem (Oliveira & Plastino, 1984).

Diversos estudos foram realizados com espécies de *Gracilaria* mostrando diferenças nas taxas de crescimento, conteúdo pigmentar e fotossíntese entre tetrasporófitos e gametófitos de diferentes localidades do Brasil (Araújo *et al.*, 2014; Barufi, 2004; Plastino *et al.*, 2004; Ursi, 2005). Estudos sobre os efeitos da salinidade, temperatura e irradiância mostraram diferenças nas taxas de crescimento de *Gracilaria caudata* (Miranda *et al.*, 2012) e de *Gracilaria birdiae* E.M. & Oliveira, E.C (Ursi & Plastino, 2001). Foram realizados estudos em *Gracilaria* spp. sobre a composição de polissacarídeos (Ursi *et al.*, 2013), efeitos da radiação ultravioleta (Araújo *et al.*, 2014; Ayres-Ostrock & Plastino, 2014), atividades da nitrato redutase (Chow *et al.*, 2007), e análise da fotossíntese (Ursi *et al.*, 2003; Ayres-Ostrock & Plastino, 2014, Araújo *et al.*, 2014). Estudos sobre fitorreguladores em espécies de *Gracilaria* evidenciaram efeitos estimulatórios no crescimento (Yokoya *et al.*, 1999, 2000, 2004; Ramlov *et al.*, 2013; Kaczyna, 1993). Efeitos do ágar no crescimento e no desenvolvimento de calos de *G. domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie foram estudados por Ramlov *et al.* (2009).

Algumas espécies pertencentes aos gêneros *Gracilaria* e *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta) são exploradas comercialmente como matéria prima para a produção de ágar. O ágar é responsável pela movimentação de cerca de US\$ 583 milhões/ano e sua utilização está amplamente difundida nas indústrias alimentícia, farmacêutica e biotecnológica (McHugh, 2003).

Dentre os componentes do ágar, os teores de 3,6-anidrogactose e de sulfato estão relacionados à força que o gel apresentará, sendo esta diretamente proporcional à quantidade de 3,6-anidrogactose e inversamente proporcional ao teor de sulfato (Cosson *et al.*, 1995). O ágar é produzido e armazenado em uma estrutura denominada agarócito presente em algumas macroalgas vermelhas, destacando-se representantes das ordens Gracilariales e Gelidiales como as mais exploradas mundialmente (Oliveira *et al.*, 1992; Mouradi-Givernaud *et al.*, 1999; Aliste, 2006; Boral & Bohidar, 2009; González-Leija *et al.*, 2009).

A quantificação dos teores de sulfato na molécula de ágar fornece um dos parâmetros de qualidade deste ficocolóide, e a retirada de sulfato e a sua transformação em 3,6 anidrogactose aumentam a qualidade do gel (Mathieson *et al.*, 1984; Lahaye & Rochas, 1991; Murano *et al.*, 1996; Rebello *et al.*, 1997). Além disso, tratamentos alcalinos possibilitam o melhoramento da qualidade de seu gel e torna atrativa a sua utilização (Yoshimura, 2006). A avaliação de métodos de extração de ágar em *Gracilaria domingensis* e *Gracilaria caudata* evidenciou que métodos com tratamentos alcalinos apresentaram melhores resultados na qualidade do ágar (Yoshimura, 2006).

Com isso 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).

Na América do Sul, o país com maior destaque para utilização dos recursos macroalgas é o Chile, que apresentou nos últimos dez anos um grande desenvolvimento na indústria de processamento de ficocolóides. Esses avanços foram possíveis através da propagação de métodos, estudos detalhados das condições e técnicas de cultivo. Atualmente, a única agarófita cultivada em larga escala e utilizada no Chile é a espécie *Gracilaria chilensis*. Há uma grande demanda desta espécie na indústria alimentícia deste país, produzindo atualmente 120.000 toneladas de biomassa seca por ano. A produção satisfatória de biomassa da macroalga *G. chilensis* C.J.Bird, McLachlan & E.C.Oliveira deve-se ao conhecimento de aspectos da biologia e da fisiologia da espécie (Buschmann *et al.*, 2001).

No Brasil, a exploração de macroalgas marinhas iniciou-se por volta da década de 1940. O impacto social e econômico que tal atividade causava era reduzido e estava restrito basicamente à região nordeste do país (Oliveira, 1998). O cultivo de macroalgas alcançou uma produção comercial significativa entre as décadas de 1970 e 1980, sendo

restritas para a produção de ágar e carragenanas para exportação (Streit *et al.*, 2004). A produção de ficocolóides das macroalgas vermelhas é sem dúvida, uma oportunidade do Brasil de desenvolver indústrias sólidas, não só para abastecer o comércio interno como também para exportação (Oliveira, 1981).

No litoral brasileiro, a espécie *Gracilaria caudata* está diminuindo drasticamente devido à maior demanda por ágar (Oliveira & Miranda, 1998) e para a conservação das populações naturais de *G. caudata*, é fundamental o conhecimento dos fatores limitantes para o desenvolvimento da espécie.

1.3. Fitorreguladores em macroalgas marinhas

Os fitorreguladores são substâncias que agem como sinais químicos no controle do crescimento e do desenvolvimento vegetal. Geralmente são reconhecidas cinco classes de fitorreguladores em plantas vasculares: as auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno (Fosket, 1994).

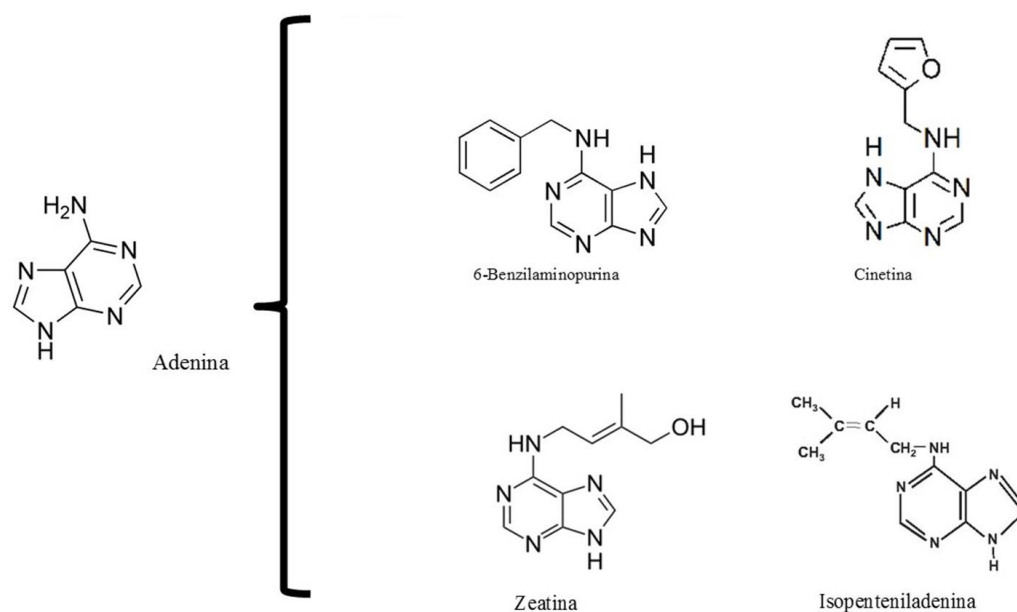


Figura 1: Estruturas químicas de citocininas utilizadas neste trabalho. Estruturas realizadas através do programa digital Chemspider (2015).

de diferentes espécies pertencentes a sete divisões de algas indica que as citocininas podem afetar os processos de divisão e alongamento celular, morfogênese, retardamento da senescência, respiração e fotossíntese (Mooney & Van Staden, 1986).

As citocininas apresentam uma importante função no desenvolvimento vegetal atuando na biossíntese de proteínas (Benková *et al.*, 1999), e o seu papel no processo de divisão celular está também relacionado à biossíntese de proteínas (Evans, 1984). Além disso, as citocininas também podem atuar no processo de síntese de clorofila, aumentando a sua produção (Fletcher & McCullagh, 1971). A isopenteniladenina e seus derivados são as principais citocininas produzidas em bactérias, algas e briófitas (Mooney & Van Staden, 1986).

Alguns estudos mostram os efeitos das citocininas como, por exemplo, em *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss as citocininas promoveram a formação de calos (Yokoya *et al.*, 1999). Tratamentos com zeatina e ácido fenilacético promoveram a regeneração de plântulas a partir de calos em *Occhodes secundiramea* (Montagne) M.A. Howe (Maliakal *et al.*, 2001). A cinetina promoveu o crescimento de *Ectocarpus fasciculatus* Harvey (Pedersén, 1968) e de *Ecklonia* sp. e *Hypnea* sp. (Jennings, 1969). A cinetina também promoveu o aumento nos níveis de proteínas e clorofila *a* em *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V.Lamouroux (Jennings *et al.*, 1972), A zeatina e isopenteniladenina estimularam o crescimento e o aumento do diâmetro do talo de *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) C.Agardh (de Nys *et al.*, 1991). Efeitos significativos com a utilização de benzilaminopurina no processo de regeneração em *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C.Silva foram observados por (Hayashi *et al.*, 2008).

Com relação ao processo de regeneração, as auxinas e citocininas em altas concentrações estimularam a regeneração em *Grateloupia dichotoma* J. Agardh (Yokoya & Handro 1996). As auxinas e/ou citocininas estimularam a formação de explantes filamentosos e influenciou a taxa de regeneração em *Solieria filiformis* (Kützinger) Gabrielson (Yokoya & Handro, 2002).

Nos últimos anos, as técnicas de detecção das citocininas endógenas tornaram-se mais sensíveis, permitindo a sua detecção tanto em macroalgas (Stirk *et al.*, 2003) quanto em microalgas (Stirk *et al.*, 2004), com base na técnica de quantificação de citocininas descrita por Nývák *et al.* (2003). Stirk *et al.* (2003) estudaram 31 espécies de macroalgas marinhas provenientes do litoral da África do Sul e determinaram a concentração de 10 compostos diferentes derivados da zeatina, 3 diferentes compostos derivados da isopenteniladenina e 6 tipos de citocininas aromáticas, incluindo a benzilaminopurina. Yokoya *et al.* (2010) estudaram as citocininas endógenas e foram quantificadas em 11 de algas vermelhas coletadas no litoral brasileiro. Dentre as

citocininas identificadas estão as derivadas dos isoprenóide (2-isopenteniladenina, *cis*-Zeatina, e *trans*-Zeatina) e citocininas aromáticas (benzilaminopurina, orto e meta-Topolinas) que foram detectadas nas espécies, *Porphyra acanthophora* E.C.Oliveira & Coll (linhagens verde e vermelha), *Gelidium floridanum* W.R.Taylor, *Gracilaria birdiae* E.M.Plastino & E.C.Oliveira, *Gracilaria cervicornis* (Turner) J.Agardh, *Gracilariopsis tenuifrons* (C.J.Bird & E.C.Oliveira) Fredericq & Hommersand, *Chondracanthus teedei* (Mertens ex Roth) Kützinger, *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V.Lamouroux (linhagens marrom e verde) e *Hypnea nigrescens* Greville ex J.Agardh.

Estudos utilizando o extrato em pó solúvel denominado AMPEP (Acadian Marine Plant Extract Powder), um produto comercial fabricado a partir de *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) L. Jolis (Phaeophyceae) em culturas de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C. Silva, apresentaram resultados promissores na melhoria das plântulas em cultura de tecidos, aumentando as taxas de crescimento diárias e a diminuição de epífitas (Hurtado *et al.*, 2009; Loureiro *et al.*, 2010; Yunque *et al.*, 2011; Borlongan *et al.*, 2011). No entanto, os mecanismos de ação do extrato AMPEP ainda são pouco compreendidos. Experimentos realizados por Khan *et al.* (2009) evidenciaram a presença de citocininas no extrato AMPEP. Além disso, o extrato AMPEP pode ser usado como um agente remediador em mudas de *Kappaphycus alvarezii* afetadas por estresse térmico (baixas temperaturas) melhorando a força do gel (Loureiro *et al.*, 2012).

Apesar da grande diversidade química das citocininas endógenas, os seus efeitos nos processos fisiológicos e bioquímicos das algas são pouco conhecidos.

1.4. Luz

A luz é um importante fator que controla o crescimento e o desenvolvimento das macroalgas marinhas. Em geral, estas podem utilizar a luz basicamente como fonte de energia para a fotossíntese (McDonald, 2003).

A fotossíntese responde tanto quantitativamente como qualitativamente às mudanças de luz e variações do ambiente, por isso representa grande parte da variação da fisiologia das algas (Necchi, 2004). A taxa fotossintética pode ser alterada quando há mudanças fisiológicas como luz, temperatura e nutrientes (Figuerola *et al.*, 2003).

Em relação à interação entre luz e fitorreguladores, 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). Dentro

deste contexto, a luz e os fitorreguladores apresentam um papel importante no controle do crescimento e dos processos morfogênicos das algas e estudos são necessários para se compreender estes mecanismos.

Em *Grateloupia dichotoma* J.Agardh, 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).

As citocininas benzilaminopurina e cinetina estimularam a taxa de crescimento de segmentos apicais de *Gracilaria domingensis* em irradiância de 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e os efeitos estimulatórios dos fitorreguladores foram observados, em sua maioria, sob altos níveis de irradiância (Ramlov *et al.*, 2013).

O presente trabalho visa o conhecimento da fisiologia de *Gracilaria caudata*, que é fundamental para melhorar os programas de cultivo de algas. Dentro deste contexto, os reguladores de crescimento vegetal e a luz têm um papel importante no controle do crescimento de algas e nos processos morfogênicos. Considerando a importância de *G. caudata* como matéria-prima para produção de ágar, é fundamental o conhecimento dos fatores que atuam sobre o seu crescimento e desenvolvimento visando a conservação das populações e a produção sustentável de biomassa.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos das citocininas nas respostas fisiológicas e na qualidade do ágar de *Gracilaria caudata* J. Agardh (Rhodophyta, Gracilariales).

2. 1. Objetivos específicos

1. Avaliar os efeitos das citocininas nas respostas fisiológicas e bioquímicas (taxa de crescimento, morfologia, conteúdo de pigmentos fotossintetizantes e de proteínas solúveis totais) de *Gracilaria caudata*;
2. Comparar os efeitos de citocininas com estrutura química distinta: citocininas aromáticas e derivadas do isoprenóide;
3. Avaliar os efeitos das citocininas no rendimento e na qualidade do ágar em *G. caudata* cultivada em biorreatores;
4. Avaliar o efeito do extrato AMPEP (Acadian Marine Plant Extract Powder), produzido a partir da alga parda *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) L. Jolis no crescimento e no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes de *G. caudata*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Espécie estudada

O estudo foi realizado com a espécie *Gracilaria caudata* J.Agardh coletada na praia de Boa Viagem, Recife, PE, em 9 de outubro de 2006. Alguns espécimes foram fixados em formaldeído a 4% (diluído em água do mar) e depositados no herbário SP, recebendo o número de acesso SP 365602. As culturas unialgáceas de *G. caudata* foram estabelecidas a partir da propagação de segmentos apicais de gametófitos femininos e fazem parte da Coleção de Culturas de Algas, fungos e Cianobactérias do Instituto de Botânica (CCIBt).



Figura 2: Aspecto geral do gametófito feminino de *Gracilaria caudata* cultivado em laboratório.

3.2. Metodologia geral de cultivo

3.2.1. 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 resfriar 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.

3.2.2. Manutenção das culturas unialgáceas

As algas foram cultivadas em meio de cultura composto por água do mar esterilizada enriquecida com 25% da solução de nutrientes de von Stosch (Tabela 1) preparada segundo Edwards (1970) e modificada segundo Yokoya (1996). 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. As culturas foram mantidas em uma sala no Laboratório de Cultura de Algas “Marilza Cordeiro Marino” do Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica nas seguintes condições: temperatura de 23 ± 2 °C, fotoperíodo de 14 horas, salinidade 30-32 ups, densidade de fluxo fotônico de 60 a 70 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecidas por duas lâmpadas fluorescentes de 40W, do tipo “Luz do dia” dispostas horizontalmente acima dos frascos de cultura. A irradiância foi mensurada com um sensor subaquático esférico, modelo LI 193 (marca LI-COR), conectado a um medidor de quanta, modelo LI-250 (marca LI-COR).

Tabela 1: 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).

3.2.3. Experimentos com citocininas

Foram testadas três citocininas derivadas do isoprenóide (*cis* – zeatina, *trans* – zeatina e 2-isopenteniladenina) e duas citocininas aromáticas (benzilaminopurina e cinetina) nas concentrações de zero a 100,0 μM , e em dois níveis de irradiância (50 e 100 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Os experimentos foram realizados com meio de cultura sintético ASP 12-NTA (Tabelas 2-4), preparado segundo (Iwasaki, 1961) com modificações propostas por (Yokoya, 1996). Os experimentos foram realizados em frascos de vidro (100 mL), contendo 70 mL de meio ASP 12-NTA. Cada tratamento foi testado com 6 repetições simultâneas, e cada repetição foi composta por 5 segmentos apicais com 15 mm de comprimento do gametófito feminino de *G. caudata*.

Tabela 2: 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 3: Solução de metais-traço PII utilizada na composição do meio ASP 12-NTA.

Elemento	Concentração do elemento (μM)	Sais utilizados	Concentração do sal em 100 ml
B	18,5	H_3BO_3	114,0 mg
Fe	1,8	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4,9 mg
Mn	7,3	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16,4 mg
Zn	0,8	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,2 mg
Co	0,17	$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,48 mg
EDTA	26,9	Na_2EDTA	100 mg

Tabela 4: Solução de metais-traço SII utilizada na composição do meio ASP 12-NTA.

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	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	12,5 mg

3.3. Experimento com o extrato AMPEP (Acadian Marine Plant Extract Powder)

Foi avaliado o efeito do extrato AMPEP (Acadian Marine Plant Extract Powder), produzido a partir da alga parda *Ascophyllum nodosum* pela empresa canadense Acadian Seaplants Limited, Nova Escócia, no crescimento e no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes de *Gracilaria caudata*. Os efeitos do extrato AMPEP foram testados em quatro concentrações (0, 0,1, 1,0 e 5,0 mg L^{-1}) em água do mar e em nove concentrações (0, 0,001, 0,01, 0,1, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 mg L^{-1}) em água do mar enriquecida com 50% da solução de von Stosch (VSES/2). Tratamentos sem adição de AMPEP (controle) foram realizados simultaneamente e cada tratamento foi testado com três repetições ($n=3$) em frascos de vidro do tipo “baby food” de 100 mL, com 75 mL

de meio de cultura, contendo quatro segmentos apicais (15 mm) isolados de gametófitos femininos de *G. caudata*. As condições experimentais utilizadas para o experimento foram salinidade 32 ups, temperatura média de 23°C, e fotoperíodo de 14h e período experimental de 28 dias. Foram determinadas as taxas de crescimento e concentrações de pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a*, ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina).

3.4. Análise dos experimentos

3.4.1. Taxa de crescimento

As taxas de crescimentos foram analisadas semanalmente através das pesagens das algas frescas. Foi retirado o excesso de água dos talos das algas com papel absorvente e a massa da matéria fresca foi determinada em balança analítica (modelo AUX – 220, SHIMADZU). Todo o processo foi realizado com pinças esterilizadas para não haver contaminação na alga. Posteriormente as algas foram colocadas em frascos com meio de cultura.

As respostas aos diferentes tratamentos foram analisadas pela taxa de crescimento (TC) utilizando a fórmula $TC = (\ln \text{ Massa final} - \ln \text{ Massa inicial}) / (\text{Tempo final} - \text{Tempo inicial})$.

3.4.2. Morfometria

A determinação dos ramos laterais primários foi feita por meio de imagens dos segmentos apicais com câmera fotográfica (Panasonic modelo Lumix DC Vario). Os resultados foram obtidos a partir de imagens de três segmentos apicais de cada tratamento (n=3) e foi determinado o número de ramos primários por segmento apical. .

3.4.4. Extração e dosagem de pigmentos fotossintetizantes

A extração dos pigmentos foi realizada através da trituração de 75 mg (massa fresca) de cada amostra em nitrogênio líquido. O macerado foi suspenso em 1 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 5,5 e temperatura de 4°C. A solução foi centrifugada por 20 minutos (14000 rpm a 4 °C), e o sobrenadante, contendo as ficobiliproteínas, foi retirado e mantido no escuro até a leitura em espectrofotômetro (Shimadzu – UV 1800; $\lambda = 498,5, 615 \text{ e } 651 \text{ nm}$). O sedimento foi ressuspensionado em 750 μL de acetona 90%, até a obtenção de um homogeneizado. A solução foi centrifugada (10000 rpm a 4 °C) durante

15 minutos, e o sobrenadante, contendo a clorofila a, foi transferido para tubos do tipo Eppendorfs vedados e mantidos no escuro até a leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 630, 647 \text{ e } 664 \text{ nm}$). A determinação da concentração das ficobiliproteínas foi realizada utilizando-se as fórmulas descritas por Kursar *et al.* (1983) e da concentração de clorofila a utilizando-se a fórmula descrita por Jeffrey & Humphrey (1975). Os resultados foram expressos em mg de pigmentos por g de massa fresca.

3.4.5. Extração e dosagem de proteínas solúveis totais

A extração das proteínas solúveis totais foi realizada através da trituração das amostras (75 mg – massa fresca) em nitrogênio líquido. O macerado foi suspenso em tampão de extração (0,2 M tampão fosfato, pH 8,0, 5 mM EDTA; 1 mM DTT) na proporção de 1g de massa fresca por 10 mL de tampão. A solução foi centrifugada (12000 rpm a 4°C) por 15 minutos. A concentração das proteínas solúveis totais foi determinada por espectrofotometria UV-vis (Shimadzu – UV 1800) a 595 nm, após a adição de solução de Coomassie Blue (Bio-Rad), segundo o método de Bradford (1976). A concentração proteica foi determinada com a utilização de curva-padrão externa, utilizando-se soro albumina bovina (BSA, Bio-Rad) como padrão (2 a 10 $\mu\text{L mL}^{-1}$) e os resultados foram expressos em mg de proteína por g de massa fresca.

3.5. Experimento com citocininas em biorreatores

Os experimentos com biorreatores foram realizados com culturas unialgáceas de gametófitos femininos de *G. caudata*, no Laboratório de Cultura de Algas “Marilza Cordeiro Marinho” do Núcleo de Pesquisa em Ficologia no Instituto de Botânica, nas seguintes condições: fotoperíodo de 14 horas, salinidade 30-32 ups, densidade de fluxo fotônico de $90 \pm 10 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecidas por duas lâmpadas fluorescentes de 40W, do tipo “Luz do dia” dispostas horizontalmente e na lateral dos biorreatores. Todo o experimento foi realizado com água do mar proveniente de um único lote coletado em Julho de 2014.

O sistema de biorreatores (modelo TE-BIT-E3, Tecnal, Brasil) foi composto por doze vasos de cultura, com volume total de 2,5 L sendo 2,0L de volume útil, dispostos de sustentação e tampas de aço inox apresentando anel de vedação tipo “O-Ring”.

O sistema possui entradas de sensores de temperatura (Tecnal), pH, Oxigênio dissolvido e CO_2 dissolvido (Metter Toledo) conectados a um sistema de controle e aquisição de dados (Tecbio-soft). Foi realizada a aeração por meio de um compressor

(TEC-BioAI) que borbulha ar esterilizado (filtro HEPA-VENT 0,3 μm Whatman) em água destilada que em seguida é direcionado aos biorreatores por meio de mangueiras de silicone ligadas a um “manifold” com controle de vazão regulada por um rotômetro para 0,5 L $\text{ar} \cdot \text{min}^{-1}$ (de forma intermitente, a cada 30 minutos) em cada vaso de cultura. O conjunto de vasos, suportes, tampas mangueiras e sensores foram esterilizados por autoclavagem a 121 °C e 1,5 atm por 30 min antes do início dos experimentos. O sistema completo é apresentado na Figura 4.

Os tratamentos testados foram VSES/2, VSES/2 com adição de 2-isopenteniladenina nas concentrações de 0,5 e 5,0 μM e VSES/2 com adição de benzilaminopurina na concentração de 0,5 μM . Cada tratamento foi composto por três repetições ($n=3$) em vasos de cultura com aproximadamente 10 indivíduos de *Gracilaria caudata* em casa vaso. A biomassa inicial foi de 600 mg por vaso, e esta biomassa foi produzida cultivando-se as algas conforme as condições descritas no item 3.2.2 durante 50 dias.

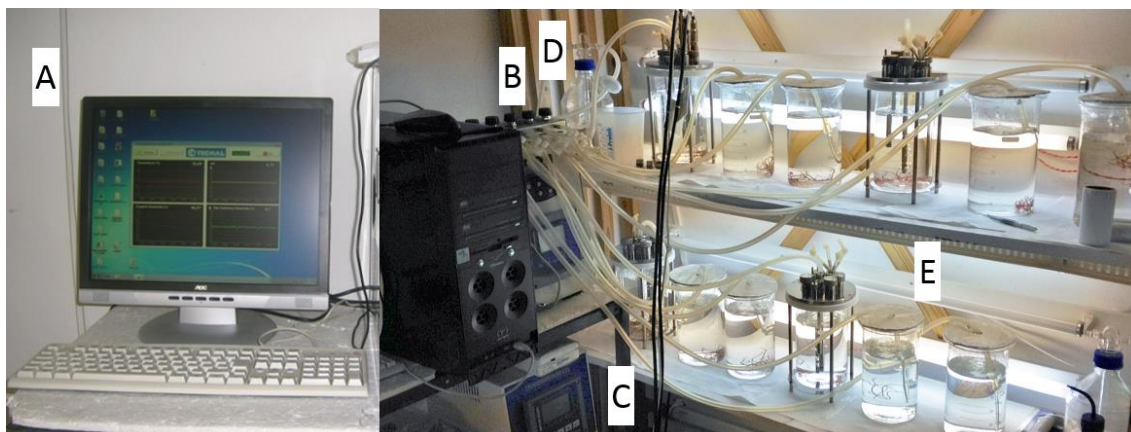


Figura 3: Sistema de biorreatores modelo TE-BIT-E3 (TECNAL[®]), A – Sistema de aquisição dos dados; B – Sistema de controle; C – Compressor para injeção de ar no sistema; D – Estrutura para filtragem e umidificação do ar; E – Sistema dos vasos de cultura e os sensores.

3.5.1. Análise do ágar

A extração de ágar foi realizada com as algas cultivadas nos biorreatores. A extração do ágar nativo foi realizada segundo o método descrito por Marinho-Soriano *et al.* (1999). A biomassa de *Gracilaria caudata* obtida em cada tratamento foi seca a 60 °C, por 48 horas, que visa a retirada da água do talo para facilitar a lavagem e o

armazenamento para posterior análise; em seguida, foi realizada uma lavagem com água corrente para remoção de sais e contaminantes, posteriormente, foi feita a sanitização com 1 % de hipoclorito de sódio. Logo após a sanitização, foi feita a adição de água destilada na proporção 100 mL por porção de alga (aproximadamente 500 mg de alga seca), durante 2 horas; o excesso de água foi retirado e a alga foi triturada. A alga foi colocada em banho-maria a 100 °C, por 2 horas; em seguida, a alga foi filtrada à quente em tecido de algodão e o filtrado ficou em repouso para gelificar por 24 horas; decorrido este tempo, o filtrado foi colocado em congelador (-4°C) por mais 24 horas. Após este período, o filtrado foi retirado do congelador para o seu descongelamento. O filtrado foi colocado em estufa de circulação de ar por 72 horas a 65 °C para a sua secagem.

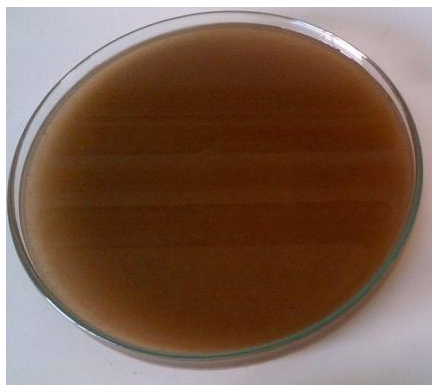


Figura 4: Aspecto do ágar extraído de *Gracilaria caudata* cultivada nos biorreatores

O rendimento do ágar foi determinado através da equação: $\text{Teor de ágar \%} = \frac{\text{massa (g) do ágar seco} \times 100}{\text{massa (g) de macroalga seca}}$

3.5.1.1. Protocolo para a quantificação de 3,6-anidrogactose

No presente estudo, foi utilizado o protocolo para a quantificação de 3,6-anidrogactose modificado segundo Matsuiro (1995) e Saito (1997). Aproximadamente 24 ± 1 mg de ágar (peso seco) foi dissolvido em 40 mL de água Milli-Q em banho-maria a 80-85 °C até sua completa dissolução (90 a 120 min). As amostras foram resfriadas em água com gelo e o volume foi completado para 50 mL com água Milli-Q (solução de trabalho). A seguir, foram dissolvidos 10 mL da solução trabalho em 5 mL de água Milli-Q (dissolução da amostra). Em um tubo Falcon, foram

pipetados 2 mL de água Milli-Q e adicionados: 0,5 mL de timol 5%, 5 mL de cloreto férrico 0,5% e 2 mL da dissolução da amostra. As amostras foram homogeneizadas, aquecidas em banho-maria por 13 min a 80 °C e resfriadas em água com gelo. Foram adicionadas 10 mL de etanol 98% nas amostras. Após estes procedimentos, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 635 nm e as absorbâncias foram registradas para se calcular a quantidade de 3,6-anidrogactose (%) utilizando-se a curva de calibração.

3.5.1.2. Protocolo para a quantificação de sulfato

Foi utilizado o protocolo para a quantificação de sulfato segundo Saito (1997). Amostras de ágar de aproximadamente 30 ± 1 mg foram umedecidas em 100 µL de HCl 0,5 N. As amostras foram hidrolisadas em água fervente por 2 h. O volume foi completado com água Milli-Q até atingir 10 mL. As amostras foram centrifugadas em 12.000 rpm durante 15 min em temperatura ambiente para remover materiais em suspensão. Foram dissolvidos 2 mL do sobrenadante em 18 mL de água Milli-Q e 2 mL de HCl 0,5 N. Após a adição de HCl, as amostras foram levemente agitadas, seguindo-se a adição de 1 mL de solução de cloreto de bário-gelatina. As amostras foram novamente agitadas, deixando-as à temperatura ambiente por 30 min. Após este período, as absorbâncias das amostras foram obtidas em espectrofotômetro a 550 nm. A partir das absorbâncias, a quantidade de sulfato (%) foi calculada utilizando-se curva de calibração.

3.6. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de um fator e, quando necessário, de dois fatores, seguido do teste de comparação de Student-Newman-Keuls, considerando-se um limite de confiança de 95%. Nos resultados com diferentes concentrações de fitorreguladores foram feitas análises de componentes principais (PCA). Os resultados também foram submetidos à análise de correlação de Pearson. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa Statistica (versão 8.0).

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos das citocininas em diferentes irradiâncias

4.1.1. Taxas de crescimento

No experimento com 2-isopenteniladenina, as taxas de crescimento dos segmentos apicais de *Gracilaria caudata* apresentaram diferenças significativas ($F = 1,23$ $p = 0,030$) entre as irradiâncias de 50 e 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, porém não diferiram entre as concentrações testadas (Figura 5). Na irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, os tratamentos com *cis*-zeatina nas concentrações de 0,5, 5,0 e 50,0 μM inibiram as taxas de crescimento de *G. caudata* quando comparadas ao controle (Figura 5).

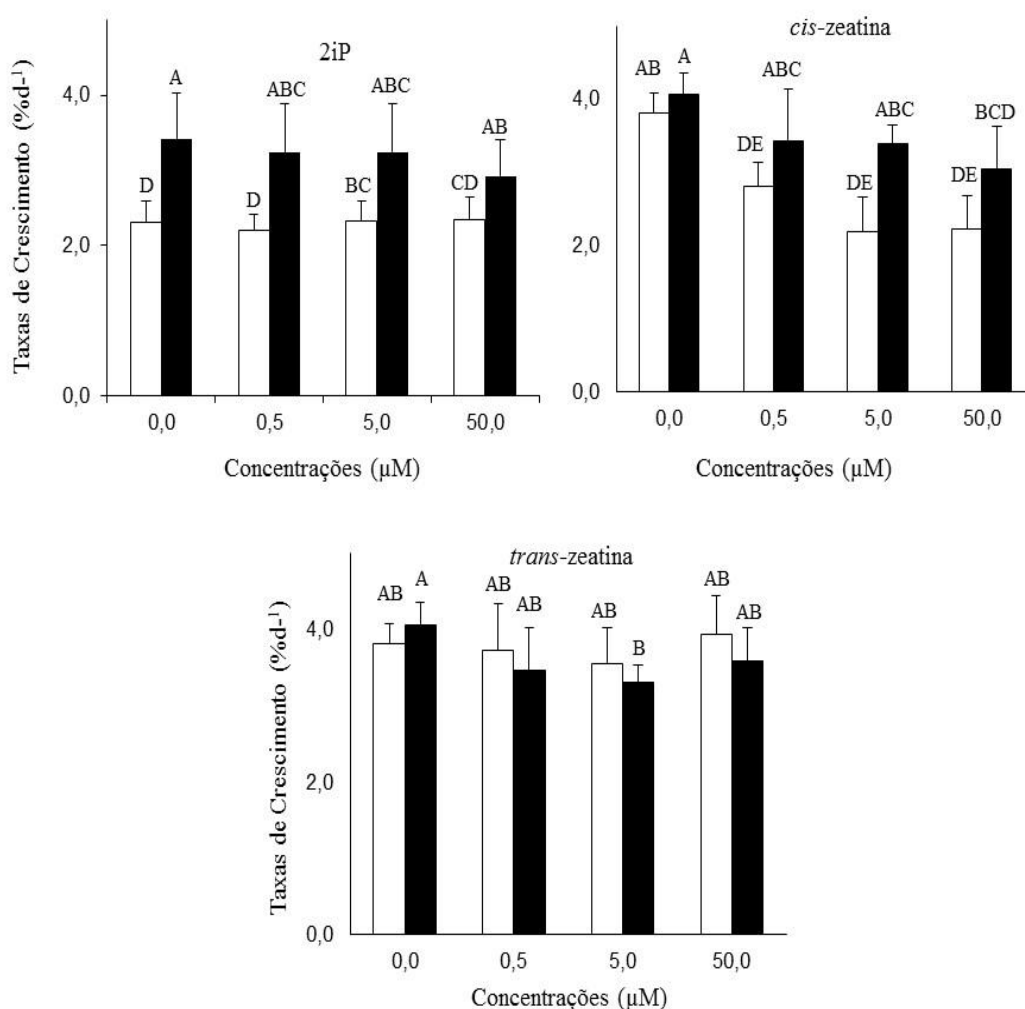


Figura 5: Efeitos de diferentes concentrações de 2-isopenteniladenina (2iP), *cis*-zeatina e *trans*-zeatina, nas irradiâncias de 50 (em branco) e 100 (em preto) μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sobre a taxa de crescimento de *Gracilaria caudata* cultivada em meio ASP 12 – NTA por 28 dias. Média $\pm$ DP ($n=6$). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo teste de comparação múltipla de Student- Newman- Keuls ($p < 0,05$).

Na irradiância de $100 \mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, somente a alta concentra\u00e7\u00e3o ($50,0 \mu\text{M}$) de *cis*-zeatina inibiu a taxa de crescimento. As taxas de crescimento de *G. caudata* tamb\u00e9m foram diferentes quando comparadas entre as irradi\u00e2ncias de 50 e $100 \mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ nas concentra\u00e7\u00f5es de 0,5 e $5,0 \mu\text{M}$ de *cis*-zeatina (Figura 6). Nos tratamentos com *trans*-zeatina, a concentra\u00e7\u00e3o de $5,0 \mu\text{M}$ em $100 \mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ inibiu a taxa de crescimento quando comparada ao controle ($F = 1,57$ $p = 0,021$) (Figura 5).

As taxas de crescimento de *Gracilaria caudata* n\u00e3o apresentaram diferen\u00e7as entre o controle e os tratamentos com adi\u00e7\u00e3o das citocininas arom\u00e1ticas, benzilaminopurina ($F = 6,62$ $p = 0,130$) e cinetina ($F = 16,84$ $p = 0,067$) (Figura 5).

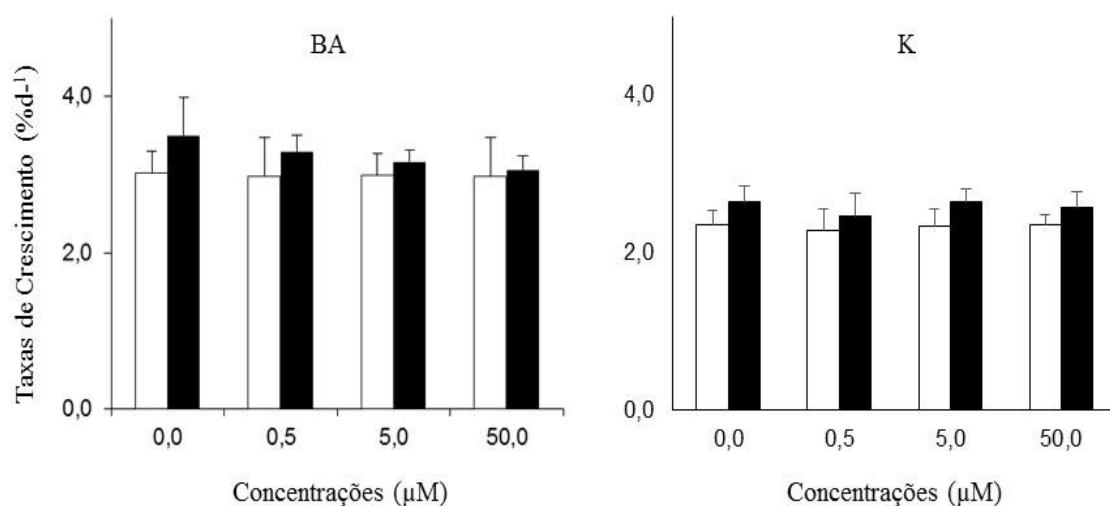


Figura 6: Efeitos de diferentes concentra\u00e7\u00f5es de benzilaminopurina (BA) e cinetina (K) nas irradi\u00e2ncias de 50 (em branco) e $100 \mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sobre a taxa de crescimento de *Gracilaria caudata* cultivada em meio ASP 12 – NTA por 28 dias. M\u00e9dia $\pm$ DP ($n=6$). Tratamentos com letras distintas s\u00e3o significativamente diferentes entre si, segundo teste de compara\u00e7\u00e3o m\u00faltipla de Student- Newman- Keuls ($p < 0,05$)

4.1.2. Morfometria

O tratamento com baixa concentra\u00e7\u00e3o de 2-isopenteniladenina ($0,5 \mu\text{M}$) inibiu a forma\u00e7\u00e3o de ramos prim\u00e1rios em *Gracilaria caudata* quando comparada ao controle ($F = 2,28$ $p = 0,038$) nas irradi\u00e2ncias de 50 e $100 \mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figura 7). Por outro lado, os tratamentos com *cis*-zeatina nas concentra\u00e7\u00f5es de $0,5 \mu\text{M}$ e $5,0 \mu\text{M}$ em $100 \mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ estimularam a forma\u00e7\u00e3o de ramos prim\u00e1rios quando comparados ao controle ($F = 1,58$ $p = 0,023$), e as concentra\u00e7\u00f5es de 0,5, 5,0 e $50,0 \mu\text{M}$ em $50 \mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ inibiram a forma\u00e7\u00e3o de ramos prim\u00e1rios (Figura 7). A

formação de ramos primários foi estimulada ($F = 2,28$ $p = 0,008$) pelo tratamento com 5,0 μM de *trans*-zeatina em 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ quando comparada ao controle, porém os tratamentos com 0,5 μM de *trans*-zeatina em 50 e 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 50,0 μM de *trans*-zeatina em 50 μmol de fótons. m^{-2} inibiram esta resposta (Figura 7).

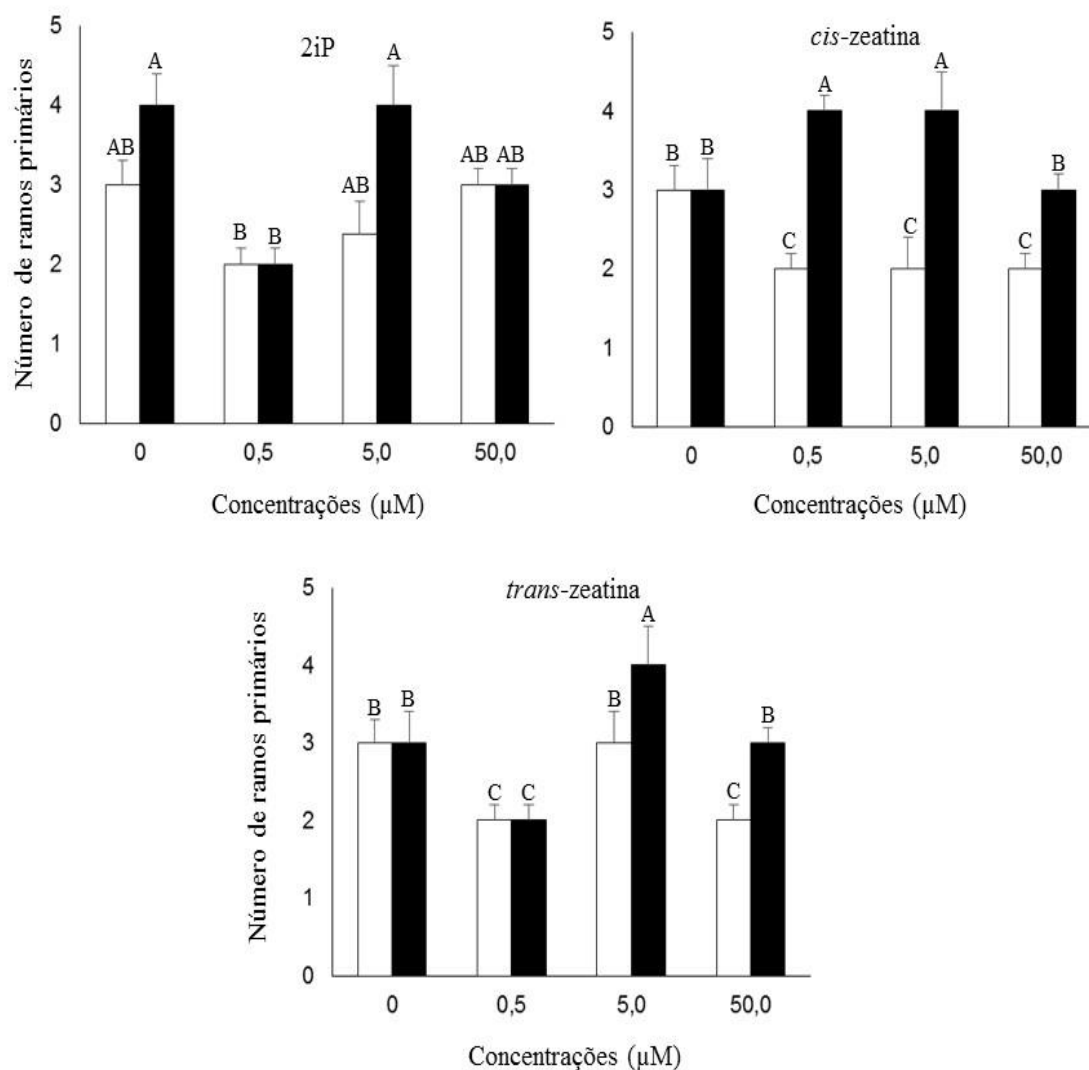


Figura 7: Efeitos de diferentes concentrações de 2-isopenteniladenina (2iP), *cis*-zeatina e *trans*-zeatina, nas irradiâncias de 50 (em branco) e 100 (em preto) μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ na formação de ramos primários em *Gracilaria caudata* cultivada em meio ASP 12 – NTA por 28 dias. Média $\pm$ DP (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo teste de comparação múltipla de Student- Newman- Keuls ($p < 0,05$).

Quanto aos efeitos das citocininas aromáticas, observou-se que BA na concentração de 5,0 μM em 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ estimulou a formação de ramos primários em *G. caudata* ($F = 1,57$ $p = 0,021$), (Figura 8). Por outro lado, esta mesma

concentração (5,0 μM) de cinetina inibiu a formação de ramos primários quando cultivada em 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($F = 0,52$ $p = 0,047$) (Figura 8).

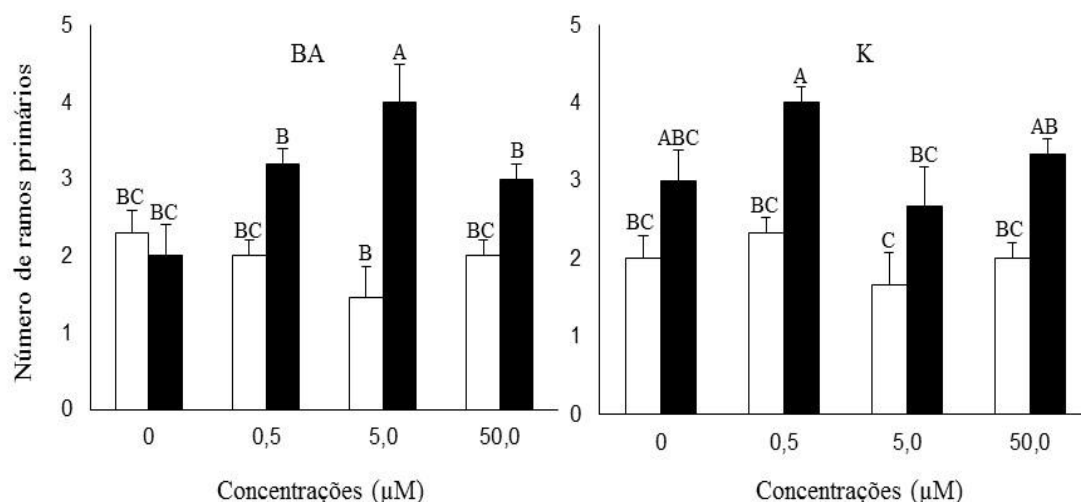


Figura 8. Efeitos de diferentes concentrações de benzilaminopurina e cinetina (K) nas irradiâncias de 50 (em branco) e 100 (em preto) μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ na formação de ramos primários em *Gracilaria caudata* cultivada em meio ASP 12 – NTA por 28 dias. Média $\pm$ DP ($n=3$). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo teste de comparação múltipla de Student- Newman- Keuls ($p < 0,05$).

4.1.3. Pigmentos fotossintetizantes

4.1.3.1. Ficoeritrina

Os efeitos das citocininas derivadas do isoprenóide no conteúdo de ficoeritrina em *G. caudata* estão representados na Figura 9. Observou-se que 2-isopenteniladenina apresentou um efeito nulo quando comparada ao controle, mas há diferenças entre os tratamentos com a concentração 0,5 μM em 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($F = 1,14$ $p = 0,036$) e a concentração de 5,0 μM em 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figura 9). Os tratamentos com *cis*- zeatina em 50 e 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ inibiram o conteúdo de ficoeritrina ($F = 0,144$ $p = 0,017$), quando comparada ao controle. Resposta semelhante também foi observada nos tratamentos com *trans*-zeatina ($F = 0,385$ $p = 0,012$) (Figura 9).

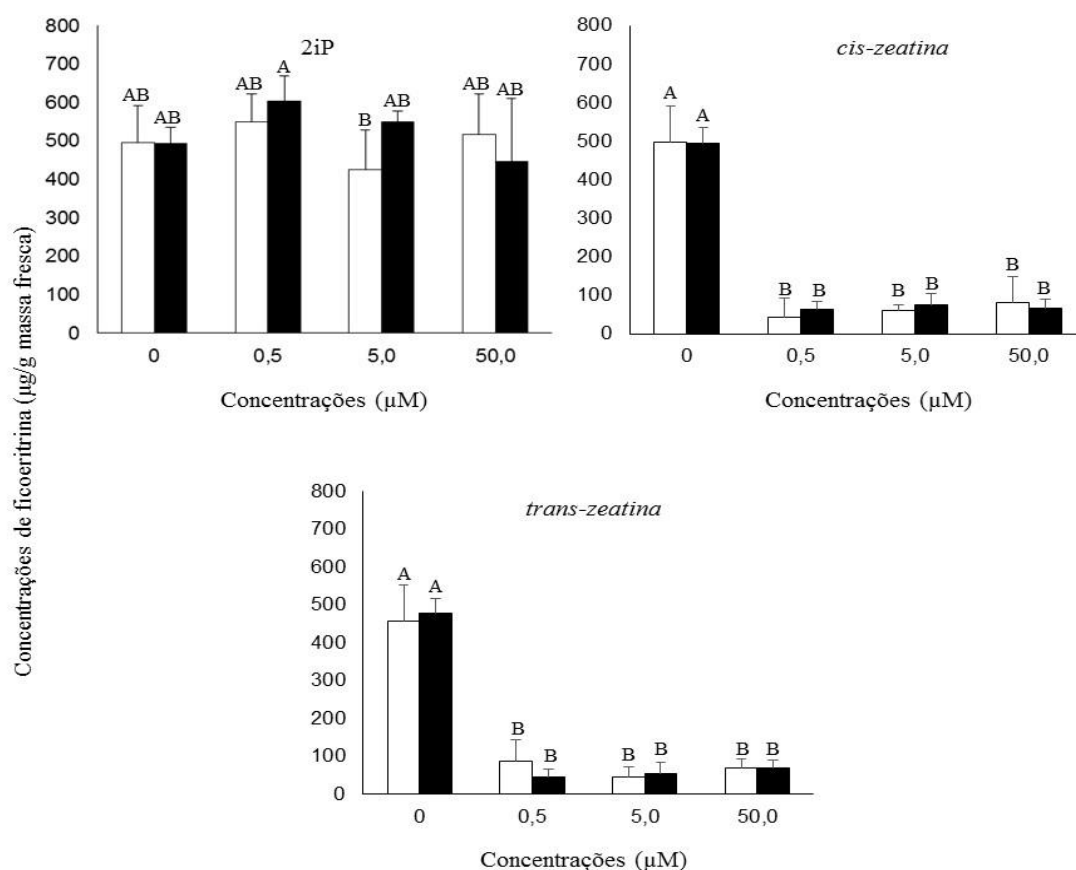


Figura 9: Efeitos de diferentes concentrações de 2-isopenteniladenina (2iP), *cis*-zeatina e *trans* zeatina nas irradiâncias de 50 (em branco) e 100 (em preto) $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ no conte\u00fado de ficoeritrina de *Gracilaria caudata* cultivada em meio ASP 12 – NTA por 28 dias. M\u00e9dia $\pm$ DP ($n=3$). Tratamentos com letras distintas s\u00e3o significativamente diferentes entre si, segundo teste de compara\u00e7\u00e3o m\u00faltipla de Student- Newman- Keuls ($n < 0.05$)

Os efeitos da benzilaminopurina foram nulos no conte\u00fado de ficoeritrina de *Gracilaria caudata* quando comparados ao controle nas duas irradi\u00e2ncias testadas (Figura 10), apesar de haver diferen\u00e7as entre os tratamentos com a concentra\u00e7\u00e3o de 50,0 μM de benzilaminopurina em 50 $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 5,0 e 50,0 μM em 100 $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($F = 2,043$ $p = 0,014$) (Figura 10). A cinetina apresentou efeito inibit\u00f3rio no conte\u00fado de ficoeritrina nas concentra\u00e7\u00f5es de 0,5 e 50,0 μM em 50 e 100 $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($F = 0,904$ $p = 0,046$), por\u00e9m o efeito do tratamento com a concentra\u00e7\u00e3o de 5,0 μM de cinetina em 100 $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ n\u00e3o diferiu do controle (Figura 10).

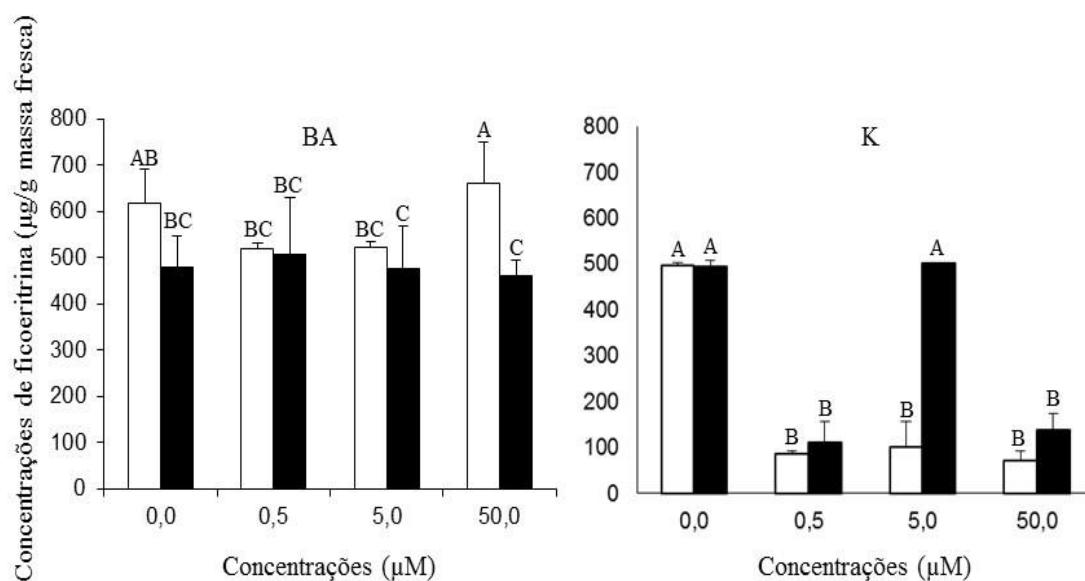


Figura 10: Efeitos de diferentes concentrações de benzilaminopurina (BA) e cinetina (K), nas irradiâncias de 50 (em branco) e 100 (em preto) $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ no conte\u00fado de ficoeritrina de *Gracilaria caudata*, cultivada em meio ASP 12 – NTAp\u00f3r 28 dias. M\u00e9dia $\pm$ DP (n=3). Tratamentos com letras distintas s\u00e3o significativamente diferentes entre si, segundo teste de compara\u00e7\u00e3o m\u00faltipla de Student- Newman- Keuls ($p < 0,05$).

4.1.3.2. Ficocianina

Os efeitos das citocininas derivadas do isopren\u00f3ide no conte\u00fado de ficocianina de *Gracilaria caudata* foram nulos (2-isopenteniladenina) ou inibit\u00f3rios (formas *cis* e *trans* de zeatina), como mostra a Figura 11. Entretanto, foram observadas diferen\u00e7as entre os tratamentos com as concentra\u00e7\u00f5es de 5,0 e 50,0 μM de 2-isopenteniladenina em 50 $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($F = 1,80$ $p = 0,018$). Os tratamentos com *cis*-zeatina ($F = 0,596$ $p = 0,048$) e *trans*-zeatina ($F = 0,424$ $p = 0,027$), nas concentra\u00e7\u00f5es de 0,5, 5,0 e 50,0 μM nas duas irradi\u00e2ncias testadas inibiram a produ\u00e7\u00e3o de ficocianina em *Gracilaria caudata*, quando comparadas ao controle (Figura 11).

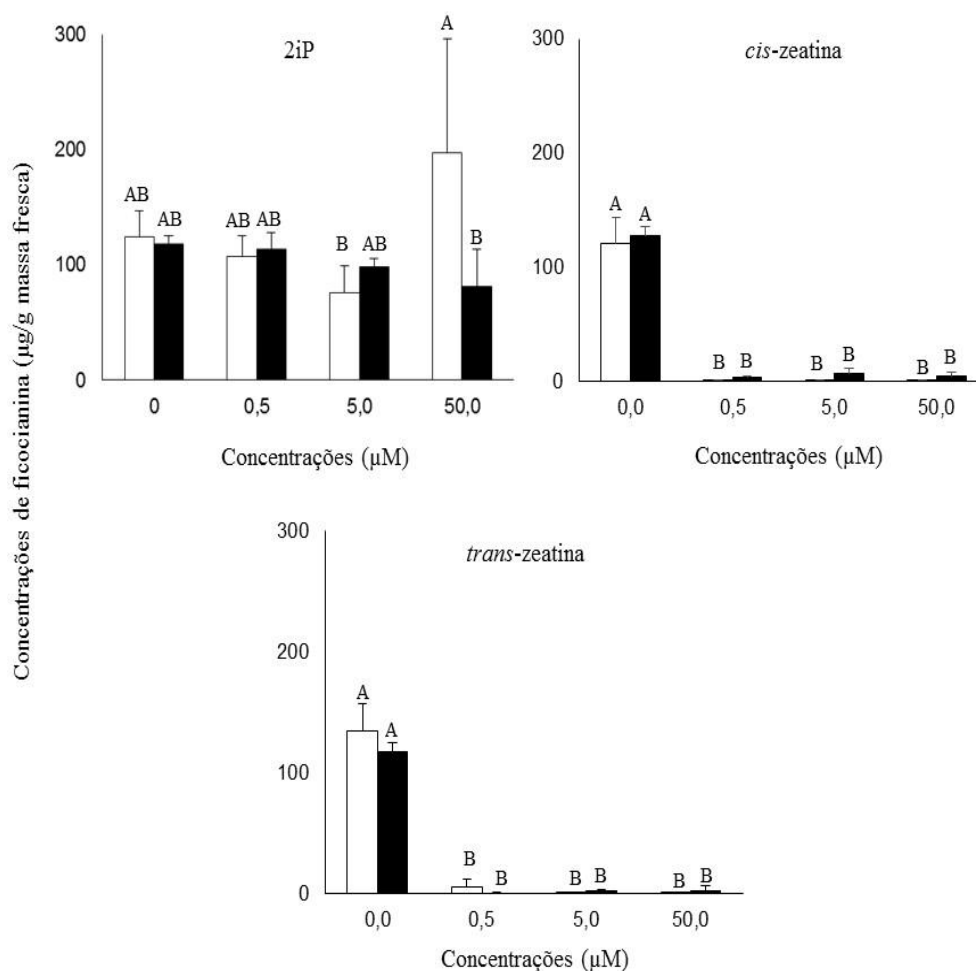


Figura 11: Efeitos de diferentes concentrações de 2-isopenteniladenina (2iP), *cis*-zeatina e *trans*-zeatina, nas irradiancias de 50 (em branco) e 100 (em preto) $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ no conte\u00fado de ficocianina de *Gracilaria caudata* cultivada em meio ASP 12 – NTAp\u00f3r 28 dias. M\u00e9dia $\pm$ DP (n=3). Tratamentos com letras distintas s\u00e3o significativamente diferentes entre si, segundo teste de compara\u00e7\u00e3o m\u00faltipla de Student- Newman- Keuls ($p < 0,05$).

As citocininas arom\u00e1ticas apresentaram respostas semelhantes \u00e0s citocininas derivadas do isopren\u00f3ide, onde a benzilaminopurina apresentou efeito nulo e a cinetina apresentou efeito inibit\u00f3rio sobre o conte\u00fado de ficocianina em *G. caudata* quando comparadas ao controle (Figura 12). Entretanto, foram observadas diferen\u00e7as entre o tratamento de 50,0 μM de benzilaminopurina ($F = 3,067$ $p = 0,049$) em 50 $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e os tratamentos controle, 5,0 e 50,0 μM de BA em 100 $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figura 12). Resultado diferente foi observado nos tratamentos com cinetina, onde todas as concentra\u00e7\u00f5es de ficocianina diminu\u00edram ($F = 0,614$ $p = 0,043$), como pode-se observar na Figura 12.

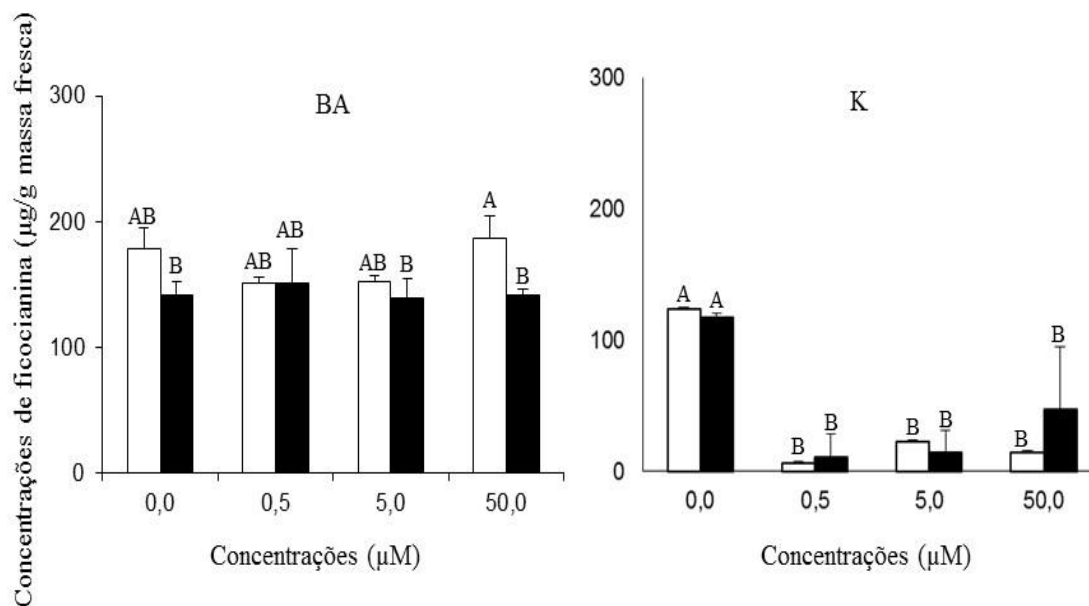


Figura 12: Efeitos de diferentes concentrações de benzilaminopurina (BA) e cinetina (K), nas irradiâncias de 50 (em branco) e 100 (em preto) $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ no conteúdo de ficocianina de *Gracilaria caudata*, cultivada em meio ASP 12 – NTA por 28 dias. Média $\pm$ DP ($n=3$). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo teste de comparação múltipla de Student- Newman- Keuls ($p < 0,05$).

4.1.3.3. Aloficocianina

Em geral, as citocininas derivadas do isoprenóide inibiram a produção de aloficocianina quando comparadas ao seu respectivo controle, como mostra a Figura 13. A maioria dos tratamentos com 2-isopenteniladenina nas duas irradiâncias foram inibitórias, exceto o tratamento com 50,0 μM em 100 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($F = 0,83$ $p = 0,037$). Todos os tratamentos com *cis*-zeatina e *trans*-zeatina, nas irradiâncias de 50 e 100 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($F = 0,184$ $p = 0,010$) inibiram a produção de aloficocianina em *G. caudata* (Figura 13).

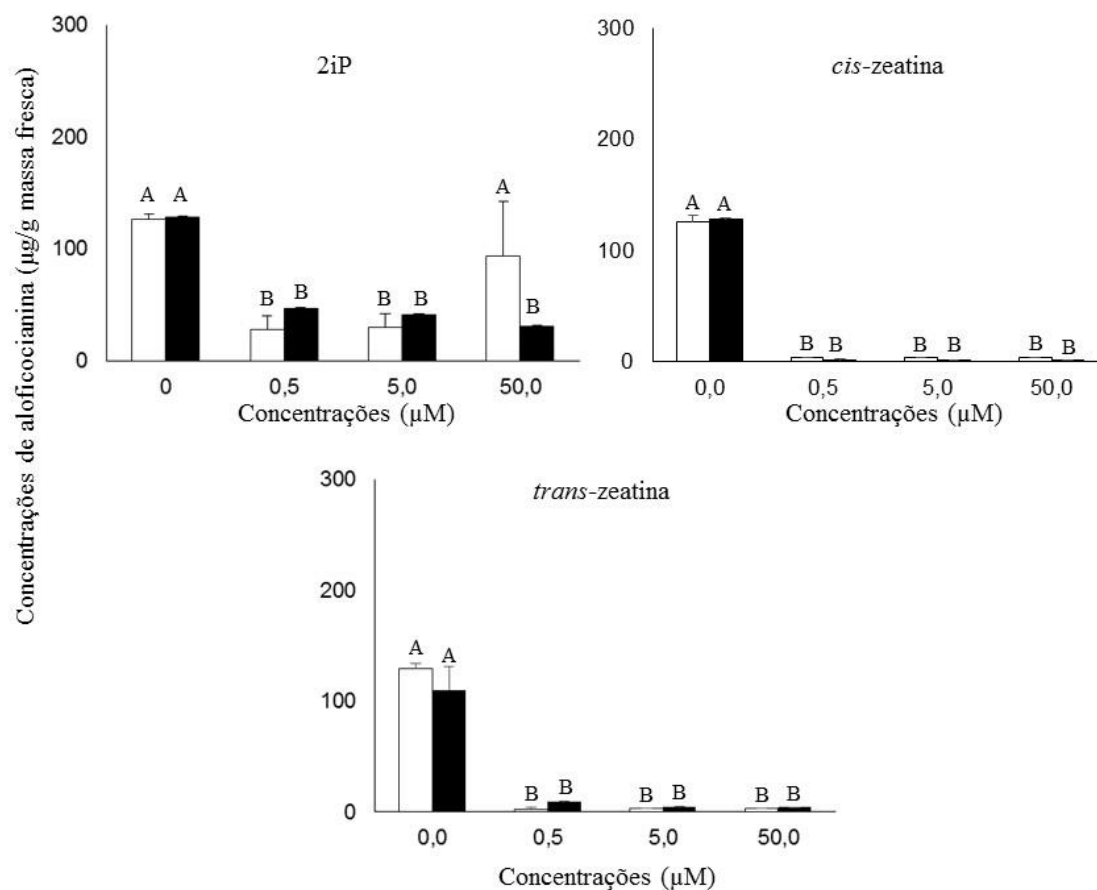


Figura 13: Efeitos de diferentes concentrações de benzilaminopurina (BA) e cinetina (K), nas irradiâncias de 50 (em branco) e 100 (em preto) $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ no conte\u00fado de alopecianina de *Gracilaria caudata* cultivada em meio ASP 12 – NTA por 28 dias. M\u00e9dia $\pm$ DP (n=3). Tratamentos com letras distintas s\u00e3o significativamente diferentes entre si, segundo teste de compara\u00e7\u00e3o m\u00faltipla de Student- Newman- Keuls ($p < 0,05$).

As citocininas arom\u00e1ticas apresentaram respostas semelhantes \u00e0s citocininas derivadas do isopren\u00f3ide, onde a benzilaminopurina apresentou efeito nulo ($F = 6,023$ $p = 0,001$) e a cinetina apresentou efeito inibit\u00f3rio ($F = 0,078$ $p = 0,012$) sobre o conte\u00fado de alopecianina em *G. caudata* quando comparadas ao controle (Figura 14).

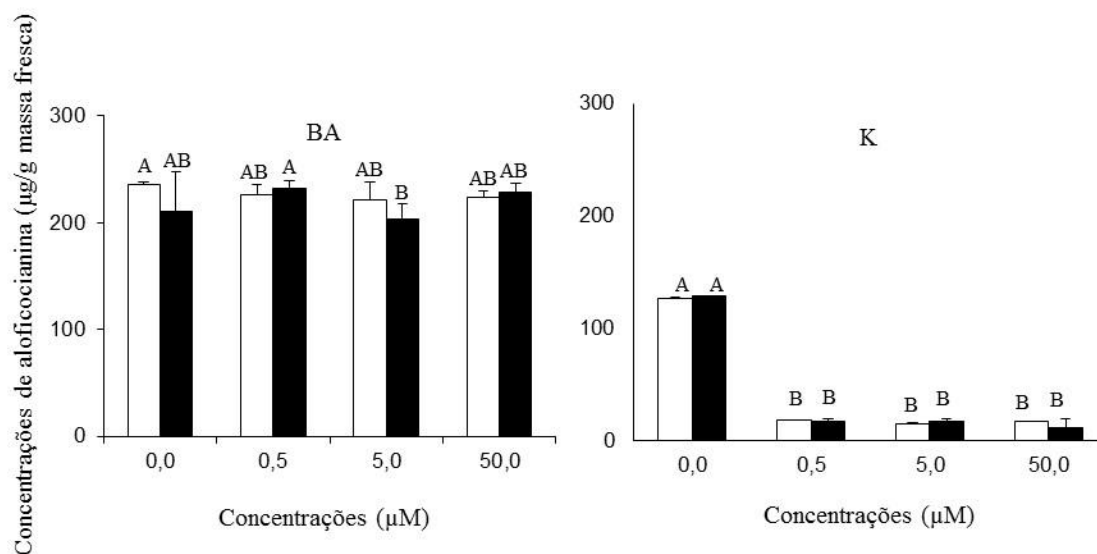


Figura 14: Efeitos de diferentes concentrações de benzilaminopurina (BA) e cinetina (K), nas irradiâncias de 50 (em branco) e 100 (em preto) μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ no conteúdo de alofocianina de *Gracilaria caudata* cultivada em meio ASP 12 – NTA por 28 dias. Média $\pm$ DP (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo teste de comparação múltipla de Student- Newman- Keuls ($p < 0,05$).

4.1.3.4. Clorofila *a*

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a alta concentração de 2-isopenteniladenina (50,0 μM) na baixa irradiância estimulou a produção de clorofila *a*, mas os outros tratamentos tiveram efeito nulo quando comparados ao controle ($F = 2,055$ $p = 0,014$) (Figura 15). Por outro lado, todos os tratamentos com *cis*-zeatina e *trans*-zeatina nas duas irradiâncias testadas inibiram a produção de clorofila *a* quando comparada ao controle ($F = 0,373$ $p = 0,007$) e ($F = 0,256$ $p = 0,006$) (Figura 15).

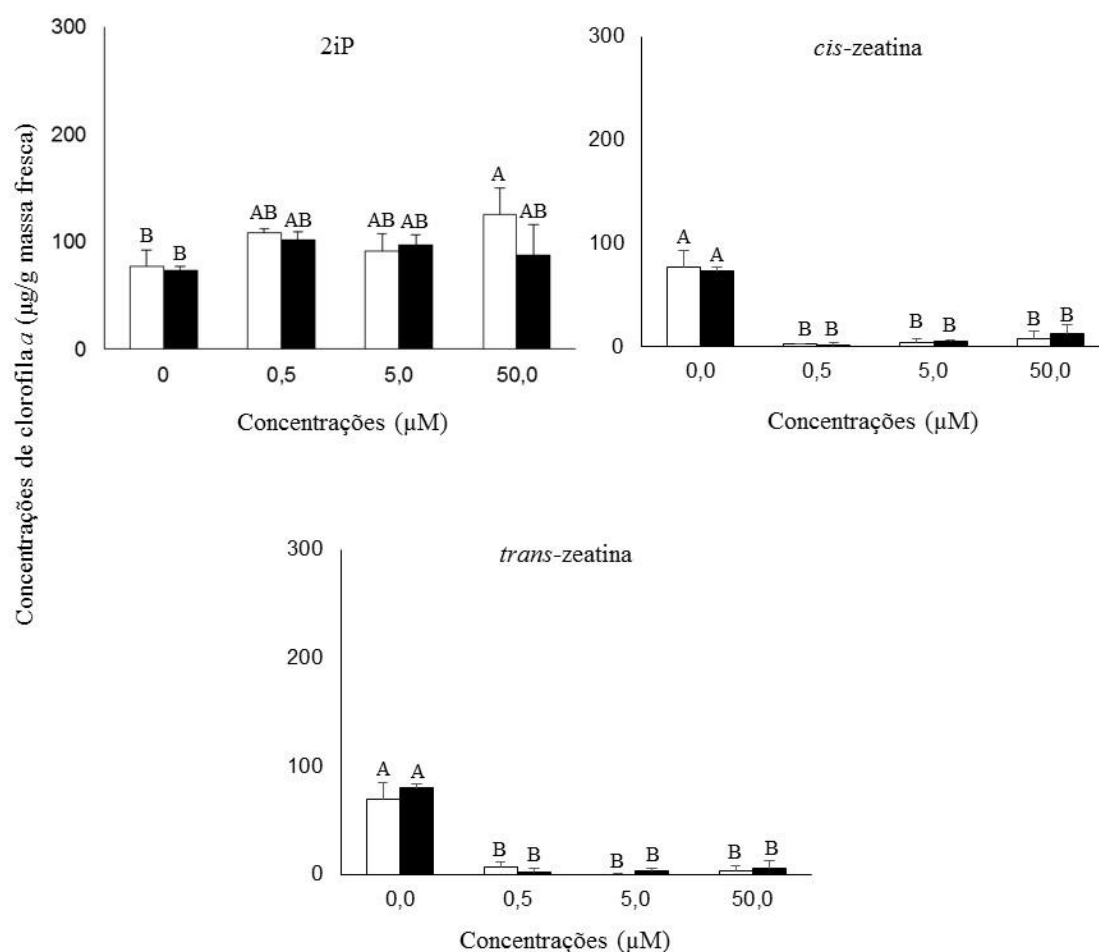


Figura 15: Efeitos de diferentes concentrações de 2-isopenteniladenina (2iP), *cis*-zeatina e *trans*-zeatina, nas irradiâncias de 50 (em branco) e 100 (em preto) de fótons.m⁻².s⁻¹ no conteúdo de clorofila *a* de *Gracilaria caudata* cultivada em meio ASP 12–NTA por 28 dias. Média ± DP (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo teste de comparação múltipla de Student- Newman- Keuls ($p < 0,05$).

Nas duas irradiâncias testadas, a benzilaminopurina apresentou efeito nulo sobre a produção de clorofila *a* em *G. caudata* quando comparada ao controle ($F = 0,711$ $p = 0,040$), mas há diferença entre os tratamentos com concentrações de BA de 5,0 µM em alta irradiância e 50,0 µM em baixa irradiância (Figura 18). Por outro lado, todos os tratamentos com cinetina inibiram a produção de clorofila *a* nas irradiâncias de 50 e 100 de fótons.m⁻².s⁻¹ quando comparadas ao controle ($F = 0,651$ $p = 0,005$) (Figura 16).

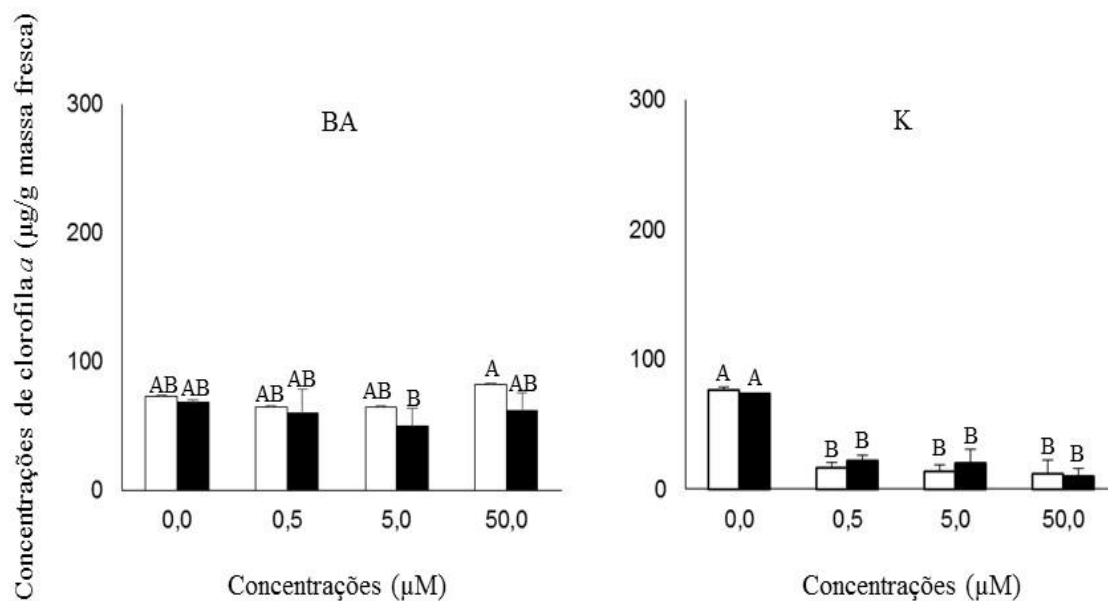


Figura 16: Efeitos de diferentes concentrações de benzilaminopurina (BA) e cinetina (K), nas irradiâncias de 50 (em branco) e 100 (em preto) $\mu\text{mol de f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ - no conteúdo de clorofila *a* de *Gracilaria caudata* cultivada em meio ASP 12 – NTA por 28 dias. Média $\pm$ DP ($n=3$). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo teste de comparação múltipla de Student- Newman- Keuls ($p < 0,05$).

4.1.4. Proteínas solúveis totais

Os tratamentos com diferentes concentrações de 2-isopenteniladenina não apresentaram diferenças significativas ($F = 1,60$ $p = 0,097$). *Cis*-zeatina nas concentrações de 0,5 a 50 μM inibiram as concentrações de proteínas em 50 e 100 $\mu\text{mol de f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ quando comparadas ao controle ($F = 0,972$ $p = 0,043$) (Figura 17). Respostas semelhantes foram observadas nos tratamentos com *trans*-zeatina ($F = 2,493$ $p = 0,009$).

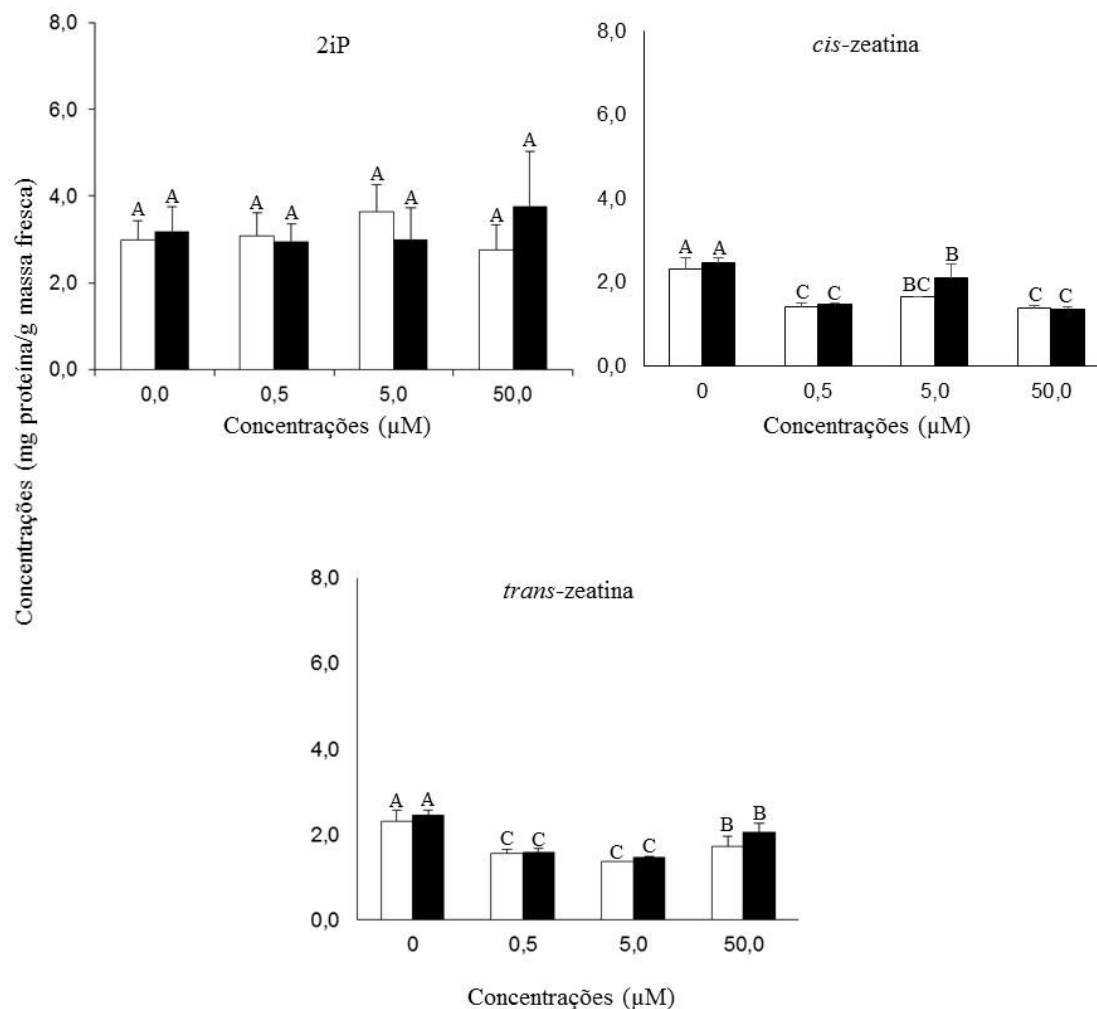


Figura 17: Efeitos de diferentes concentrações de 2-isopenteniladenina (2iP), *cis*-zeatina e *trans*-zeatina, na variação no conteúdo de proteínas em *Gracilaria caudata* cultivada em meio ASP 12 – NTA, em irradiância de 50 (em branco) e 100 (em preto) $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durante 28 dias. Média $\pm$ DP (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls. ($p < 0,05$).

Quando comparadas ao controle, os tratamentos com benzilaminopurina ($F = 0,34$ $p = 0,792$) e com cinetina ($F = 0,85$ $p = 0,48$) apresentaram efeitos nulos na produção de proteínas solúveis totais em *Gracilaria caudata*, como mostra a Figura 18.

4.1.5. Análise estatística

Nas análises de correlação de Pearson, *G. caudata* cultivada com diferentes concentrações de 2-isopenteniladenina na irradiância de 50 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ apresentou correlação positiva significativa entre a concentração de 2-

isopenteniladenina e Cla (Tabela 5). Para a irradiância de 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, houve correlação negativa significativa entre a concentração de 2-isopenteniladenina e FE e AFC (Tabela 5).

Tabela 5: Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas nas irradiâncias de 50 e 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ com *Gracilaria caudata* cultivadas por 28 dias em meio ASP 12-NTA com diferentes concentrações de 2-isopenteniladenina. Em cada célula da tabela, o primeiro valor corresponde ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de p . Negrito, correlação significativa. Taxa de Crescimento (TC), ficoeritrina (FE), ficocianina (FC), aloficocianina (AFC), clorofila a (Cla) e proteínas solúveis totais (PST).

50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Variáveis	TC	FE	FC	AFC	Cla	PST
[2iP]	0,376	-0,084	0,340	-0,226	0,639	-0,028
p	0,228	0,795	0,279	0,478	0,025	0,931

100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Variáveis	TC	FE	FC	AFC	Cla	PST
[2iP]	-0,132	-0,233	-0,670	-0,827	0,256	0,314
p	0,682	0,465	0,017	0,001	0,421	0,320

Os tratamentos com diferentes concentrações de *cis*-zeatina na irradiância de 50 e 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ apresentaram correlações negativas significativas com as variáveis TC, FE, FC, AFC, CLa, e PST (Tabela 6).

Tabela 6: Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas nas irradiâncias de 50 e 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ com *Gracilaria caudata* cultivadas por 28 dias em ASP 12-NTA com diferentes concentrações de *cis*-zeatina. Em cada célula da tabela, o primeiro valor corresponde ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de p . Negrito, correlação significativa. Taxa de Crescimento (TC), ficoeritrina (FE), ficocianina (FC), aloficocianina (AFC), clorofila a (Cla) e proteínas solúveis totais (PST).

50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Variáveis	TC	FE	FC	AFC	Cla	PST
[<i>cis</i> -zeatina]	-0,874	-0,703	-0,763	-0,774	-0,714	-0,718
p	0,000	0,011	0,004	0,003	0,009	0,008

100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Variáveis	TC	FE	FC	AFC	Cla	PST
[<i>cis</i> -zeatina]	-0,895	-0,763	-0,762	-0,766	-0,677	-0,685
p	0,000	0,004	0,004	0,004	0,015	0,014

Os tratamentos com diferentes concentrações de *trans*-Zeatina na irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ onde apresentaram correlações negativas significativas entre as concentrações e FE, FC, AFC, *Cl**a*, e PST (Tabela 7). No entanto, na irradiância de 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, não houve correlação significativa entre PST e as concentrações de *trans*-Zeatina, mas foram observadas correlações negativas significativas com as outras variáveis (Tabela 7).

Tabela 7: Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas nas irradiâncias de 50 e 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ com *Gracilaria caudata* cultivada por 28 dias em ASP 12-NTA com diferentes concentrações de *trans*-Zeatina. Em cada célula da tabela, o primeiro valor corresponde ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de *p*. Negrito, correlação significativa. Taxa de Crescimento (TC), ficoeritrina (FE), ficocianina (FC), aloficocianina (AFC), clorofila *a* (*Cl**a*) e proteínas solúveis totais (PST).

50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Variáveis	TC	FE	FC	AFC	<i>Cl</i> <i>a</i>	PST
[<i>trans</i> -zeatina]	0,7607	-0,768	-0,778	-0,771	-0,779	-0,646
<i>p</i>	0,004	0,003	0,003	0,003	0,003	0,023

100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Variáveis	TC	FE	FC	AFC	<i>Cl</i> <i>a</i>	PST
[<i>trans</i> -zeatina]	0,737	-0,740	-0,751	-0,784	-0,743	-0,333
<i>p</i>	0,006	0,006	0,005	0,002	0,006	0,289

Os tratamentos com diferentes concentrações de benzilaminopurina na irradiância de 50 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ não apresentaram correlação significativa com nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 8). No entanto, em 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, as diferentes concentrações de benzilaminopurina apresentaram correlação negativa significativa com a taxa de crescimento (Tabela 8).

Tabela 8: Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas nas irradiâncias de 50 e 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ com *Gracilaria caudata* cultivada por 28 dias em ASP 12-NTA com diferentes concentrações de benzilaminopurina. Em cada célula da tabela, o primeiro valor corresponde ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de *p*. Negrito, correlação significativa. Taxa de Crescimento (TC), ficoeritrina (FE), ficocianina (FC), aloficocianina (AFC), clorofila *a* (*Cl**a*) e proteínas solúveis totais (PST).

50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Variáveis	TC	FE	FC	AFC	<i>Cl</i> <i>a</i>	PST
[BA]	-0,077	0,182	0,152	-0,462	0,299	-0,002
<i>p</i>	0,810	0,571	0,637	0,130	0,344	0,993

100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Variáveis	TC	FE	FC	AFC	<i>Cl</i> <i>a</i>	PST
[BA]	-0,670	-0,133	-0,089	0,140	-0,263	0,308
<i>p</i>	0,017	0,679	0,783	0,663	0,409	0,330

As diferentes concentrações de cinetina apresentaram correlação negativa com FE, FC, AFC, Cla na irradiância de 50 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e correlação positiva com FE, AFC e Cla na irradiância de 100 (B) $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Tabela 9).

Tabela 9: Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas nas irradiâncias de 50 e 100 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ com *Gracilaria caudata* cultivada por 28 dias em ASP 12-NTA com diferentes concentrações de cinetina. Em cada célula da tabela, o primeiro valor corresponde ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de *p*. Negrito, correlação significativa. Taxa de Crescimento (TC), ficoeritrina (FE), ficocianina (FC), aloficocianina (AFC), clorofila *a* (Cla) e proteínas solúveis totais (PST).

50 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Variáveis	TC	FE	FC	AFC	Cla	PST
[K]	0,039	-0,780	-0,646	-0,766	-0,797	0,343
<i>P</i>	0,904	0,003	0,023	0,004	0,002	0,274

100 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Variáveis	TC	FE	FC	AFC	Cla	PST
[K]	-0,036	-0,726	-0,481	-0,784	-0,853	0,308
<i>P</i>	0,910	0,007	0,113	0,003	0,000	0,330

Foi realizada análise de componentes principais (PCA) com os resultados sobre os efeitos das diferentes concentrações de citocininas em diferentes irradiâncias na taxa de crescimento, no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes e de proteínas de *G. caudata*. Os resultados da PCA evidenciam que os eixos 1 e 2 tem uma explicabilidade de 74,30% e 12,20%, respectivamente (Tabela 10). No Eixo 1, as variáveis com maiores influências foram os pigmentos fotossintetizantes e proteínas solúveis totais enquanto que no eixo 2, a variável de maior influência foi a taxa de crescimento.

O diagrama de dispersão (Figura 19) resultante da PCA demonstra a presença de cinco grupos (circulados). O grupo 1 é formado pelos tratamentos com 2-iP e *cis*-zeatina nas duas irradiâncias testadas, o grupo 2 é formado pelos tratamentos com *cis*-zeatina em alta irradiância e *trans*-zeatina nas duas irradiâncias, o grupo 3 é formado por todos os tratamentos com benzilaminopurina nas duas irradiâncias testadas e 2-iP em baixa irradiância, o grupo 4 é formado pelos tratamentos controle com *trans*-zeatina e cinetina em alta e baixa irradiância e o grupo 5 é formado pelos tratamentos com *cis*-zeatina em baixa irradiância e cinetina nas duas irradiâncias (Figura 18).

Tabela 10: Análise de componentes principais (PCA) mostrando a explicabilidade dos dois principais eixos que formam o diagrama de dispersão da Figura 19 e a importância das variáveis em cada eixo. As variáveis analisadas foram taxa de Crescimento (TC), ficoeritrina (FE), ficocianina (FC), aloficocianina (AFC), clorofila *a* (Cla) e proteínas solúveis totais (PST) de *Gracilaria caudata* cultivadas em meio ASP 12 – NTA com adição de diferentes citocininas em irradiâncias de 50 e 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durante 28 dias.

Variáveis	Componentes Principais	
	Eixo 1	Eixo 2
TC	-0.0565	0.9675
FE	-0.5103	0.0607
FC	-0.4792	-0.0495
AFC	-0.4774	-0.2097
Cla	-0.3806	0.1167
PST	-0.3661	-0.0169
Explicabilidade do Eixo	74,30%	12,20%

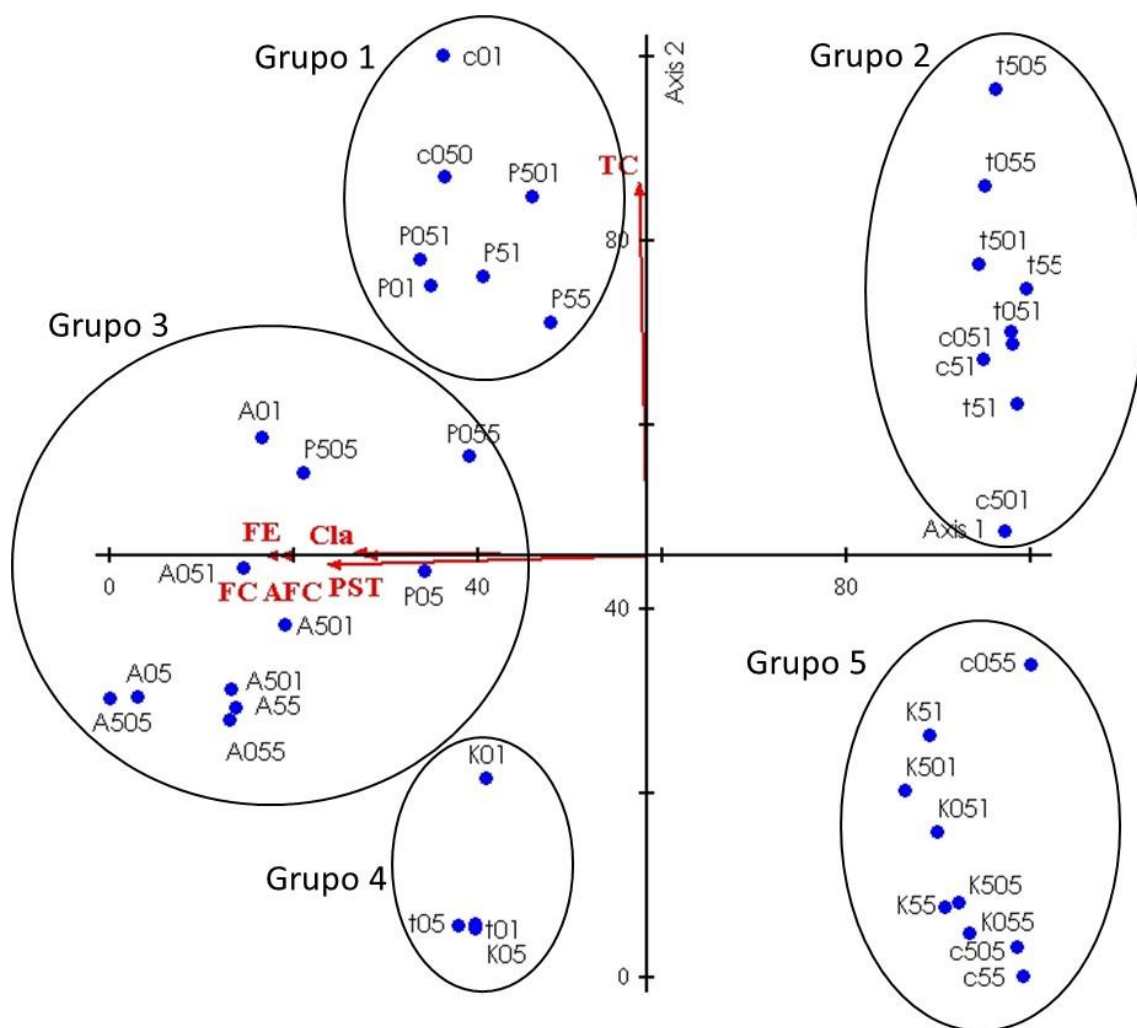


Figura 18: Diagrama de dispersão de componentes principais de dois eixos de análise de dados sobre os efeitos de 2-isopenteniladenina, *cis*-Zeatina, *trans*-Zeatina, benzilaminopurina e cinetina sobre o crescimento taxas, pigmentos e teores de proteínas solúveis totais de *Gracilaria caudata*, cultivadas em meio ASP 12 – NTA, em irradiâncias de 50 e 100 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durante 28 dias. Tratamentos: P05 (2iP 0 μM 50), P055 (2iP 0,5 μM 50), P55 (2iP 5,0 μM 50), P505 (2iP 50,0 μM 50), P01 (2iP 0 μM 100), P051 (2iP 0,5 μM 100), P51 (2iP 5,0 μM 100), P501 (2iP 50,0 μM 100), C05 (*cis*-Zeatina 0 μM 50), C055 (*cis*-Zeatina 0,5 μM 50), C55 (*cis*-Zeatina 5,0 μM 50), C505 (*cis*-Zeatina 50,0 μM 50), C01 (*cis*-Zeatina 0 μM 100), C051 (*cis*-Zeatina 0,5 μM 100), C51 (*cis*-Zeatina 5,0 μM 100), C501 (*cis*-Zeatina 50,0 μM 100), T05 (*trans*-Zeatina 0 μM 50), T055 (*trans*-Zeatina 0,5 μM 50), T55 (*trans*-Zeatina 5,0 μM 50), T505 (*trans*-Zeatina 50,0 μM 50), T01 (*trans*-Zeatina 0 μM 100), T051 (*trans*-Zeatina 0,5 μM 100), T51 (*trans*-Zeatina 5,0 μM 100), T501 (*trans*-Zeatina 50,0 μM 100), A05 (BA 0 μM 50), A055 (BA 0,5 μM 50), A55 (A 5,0 μM 50), A505 (BA 50,0 μM 50), A01 (BA 0 μM 100), A051 (BA 0,5 μM 100), A51 (BA 5,0 μM 100), A501 (BA 50,0 μM 100), K05 (K 0 μM 50), K055 (K 0,5 μM 50), K55 (K 5,0 μM 50), K505 (K 50,0 μM 50), K01 (K 0 μM 100), K051 (K 0,5 μM 100), K51 (K 5,0 μM 100), K501 (K 50,0 μM 100), sendo que 50 e 100 correspondem, respectivamente, às irradiâncias de 50 e 100 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Variáveis analisadas: TC (taxa de crescimento, FE (ficoeritrina), FC (ficocianina), AFC (aloficocianina), Cla (clorofila *a*), PST (proteínas solúveis totais).

4.2. Efeitos do extrato AMPEP (Acadian Marine Plant Extract Powder)

4.2.1. Taxa de crescimento

Os testes com AMPEP mostraram que as maiores taxas de crescimento de *G. caudata* foram observadas nos tratamentos com VSES/2, VSES/2+0,001 VSES+1,0, VSES+2,0 e VSES+5,0 mg.L⁻¹ e VSES/2+0,01 mg.L⁻¹ e as menores nos tratamentos com água do mar e água do mar com 5,0 mg.L⁻¹ (Figura 19).

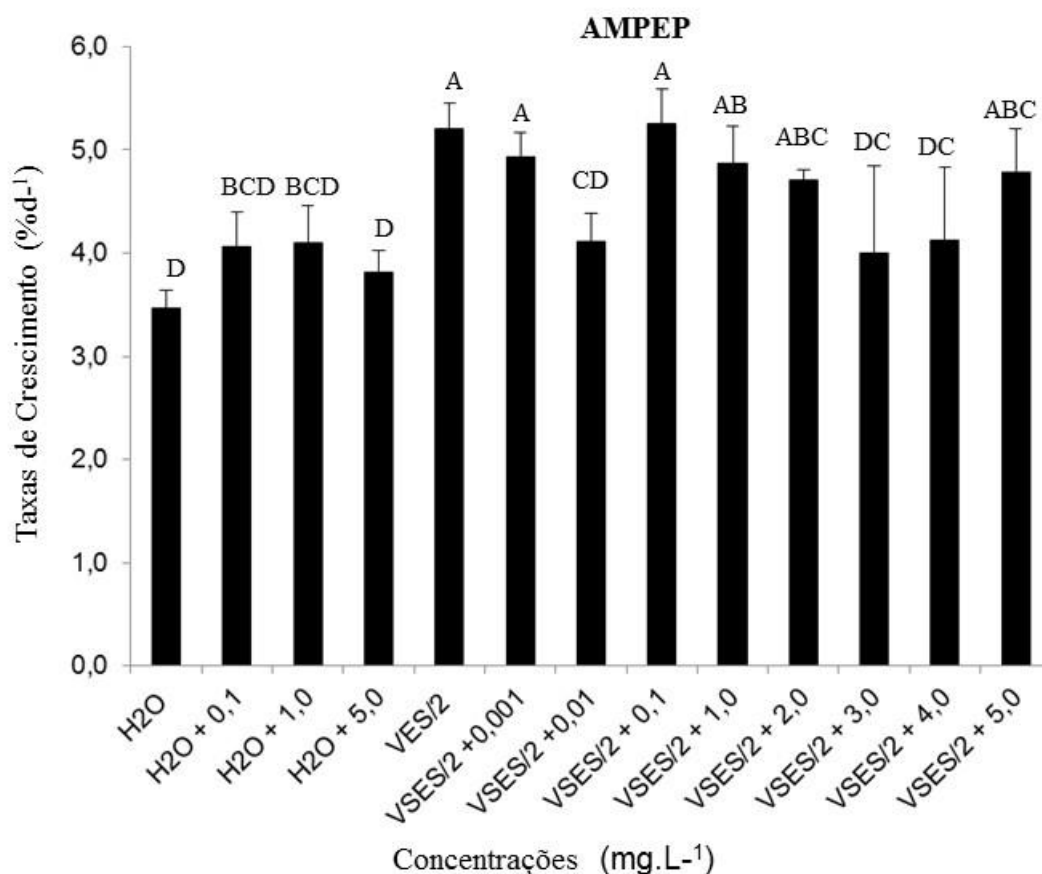


Figura 19: Efeitos de diferentes concentrações (0,001 a 5,0 mg.L⁻¹) do extrato AMPEP (Acadian Marine Plant Extract Powder) sobre a taxa de crescimento de *Gracilaria caudata* cultivada em água do mar esterilizada (H₂O) ou água do mar enriquecida com 50% da solução de nutrientes de von Stosch (VSES/2) por 28 dias. Média ± DP (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo teste de comparação múltipla de Student- Newman- Keuls ($p < 0,05$).

4.2.2. Pigmentos fotossintetizantes

As maiores concentrações da ficoeritrina foram observadas nos tratamentos com diferentes concentrações de AMPEP adicionadas ao meio VSES/2 enquanto ficocianina, aloficocianina e clorofila *a* não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 20).

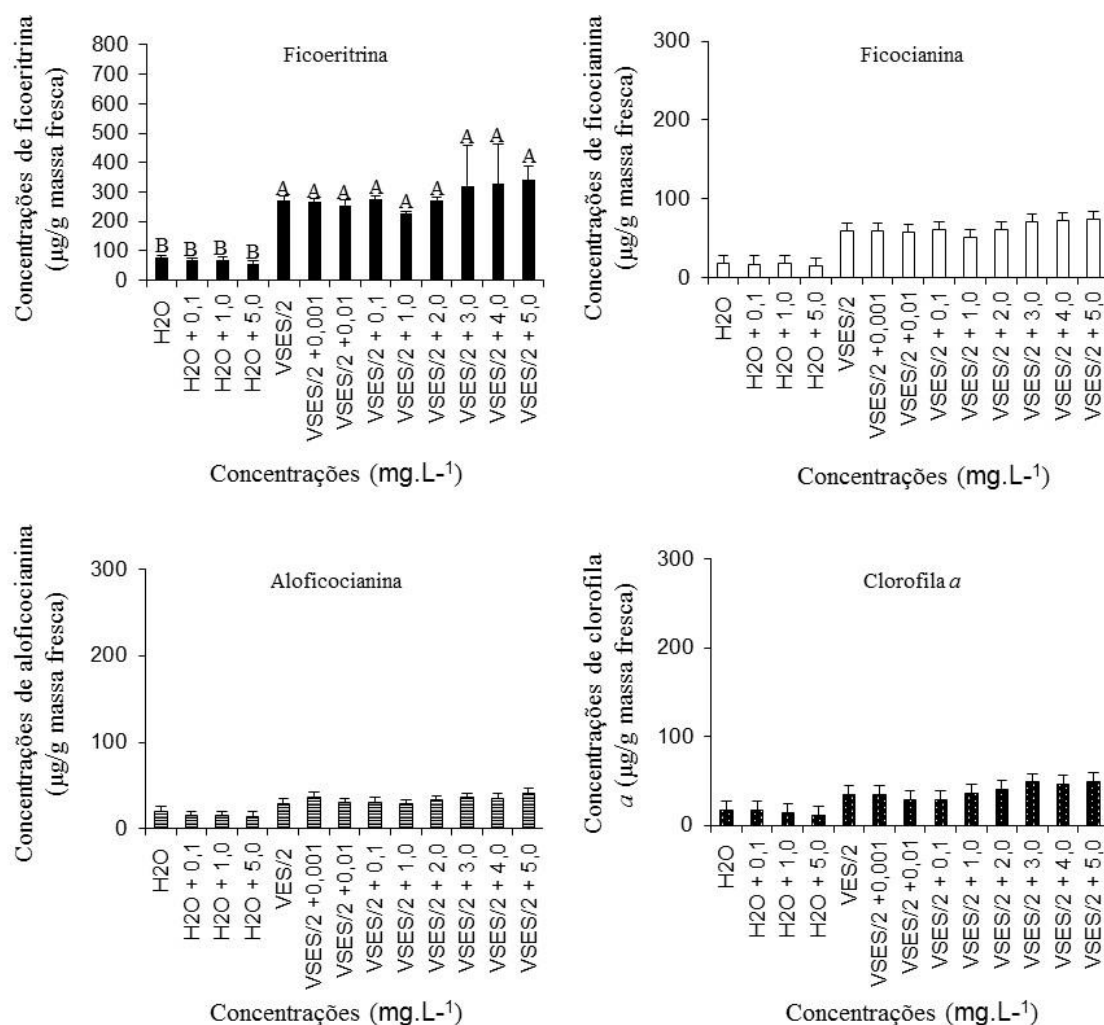


Figura 20: Efeitos de diferentes concentrações (0,001 a 5,0 mg.L⁻¹) do extrato AMPEP (Acadian Marine Plant Extract Powder), no conteúdo de ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina e clorofila a de *Gracilaria caudata* cultivada em água do mar esterilizada (H₂O) ou água do mar enriquecida com 50% da solução de nutrientes de von Stosch (VSES/2) após 28 dias. Média ± DP (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

4.2.3. Análise estatística

As diferentes concentrações de AMPEP adicionada a água do mar apresentaram correlações negativas significativas com as variáveis FC, AFC e Cla. Nos tratamentos com AMPEP adicionada ao meio VSES/2, foram observadas correlações positivas significativas com FE, FC, e Cla e correlação negativa com a TC (Tabela 11).

Tabela 11: Análise de correlação de Pearson das variáveis analisadas em *Gracilaria caudata* cultivada por 28 dias com diferentes concentrações de AMPEP adicionadas a água do mar e VSES/2. Em cada célula da tabela, o primeiro valor corresponde ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de p . Nêgrito, correlação significativa. Taxa de Crescimento (TC), ficoeritrina (FE), ficocianina (FC), aloficocianina (AFC), clorofila a (Cla).

Variáveis	TC	FE	FC	AFC	Cla
AMPEP+H ₂ O	0,396	-0,353	-0,822	-0,594	-0,577
p	0,202	0,259	0,001	0,041	0,049

Variáveis	TC	FE	FC	AFC	Cla
AMPEP+VSES	-0,405	0,487	0,513	0,365	0,668
p	0,036	0,010	0,006	0,061	0,000

4.3. Cultivos de *Gracilaria caudata* em biorreatores

4.3.1. Fatores abióticos

A variação diária da temperatura, do oxigênio dissolvido e do pH no meio correspondente aos diferentes tratamentos testados nos biorreatores estão representados nas Figuras 21 a 23. A variação média de temperatura foi de 24 a 26°C (Figura 21), de oxigênio dissolvido foi de 8,2 a 9,5 mg.L⁻¹ (Figura 22) e do pH foi de 7,8 a 7,9 (Figura 23). Os resultados da ANOVA de um fator mostraram que não há diferença significativa entre os tratamentos para a variação de temperatura ($F = 3,763$ $p = 0,190$), oxigênio dissolvido ($F = 3,763$ $p = 0,124$) e pH ($F = 1,752$ $p = 0,163$).

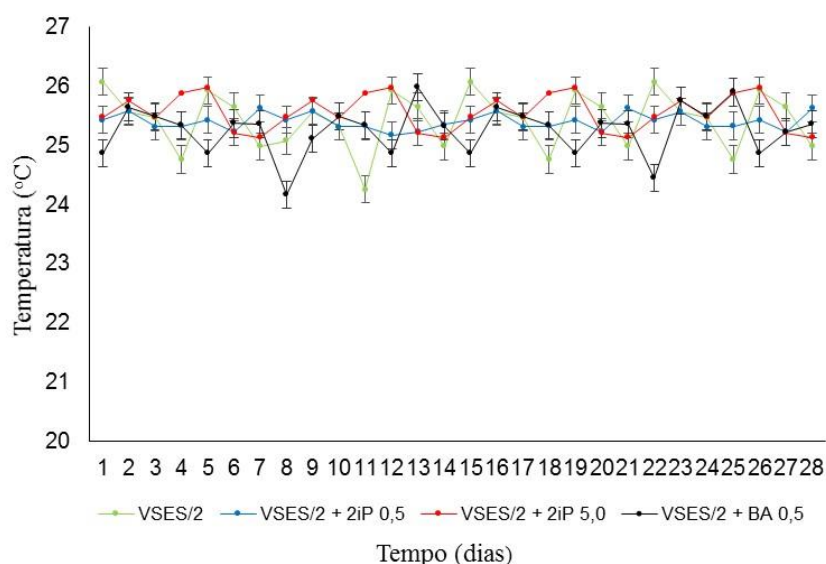


Figura 21: Variação diária da temperatura do meio nos biorreatores. Tratamentos com 50% de meio von Stosch (VSES/2, controle) e adição de 0,5 e 5,0 μ M de 2-isopenteniladenina (2iP) e 0,5 μ M de benzilaminopurina (BA). Média $\pm$ DP (n=3).

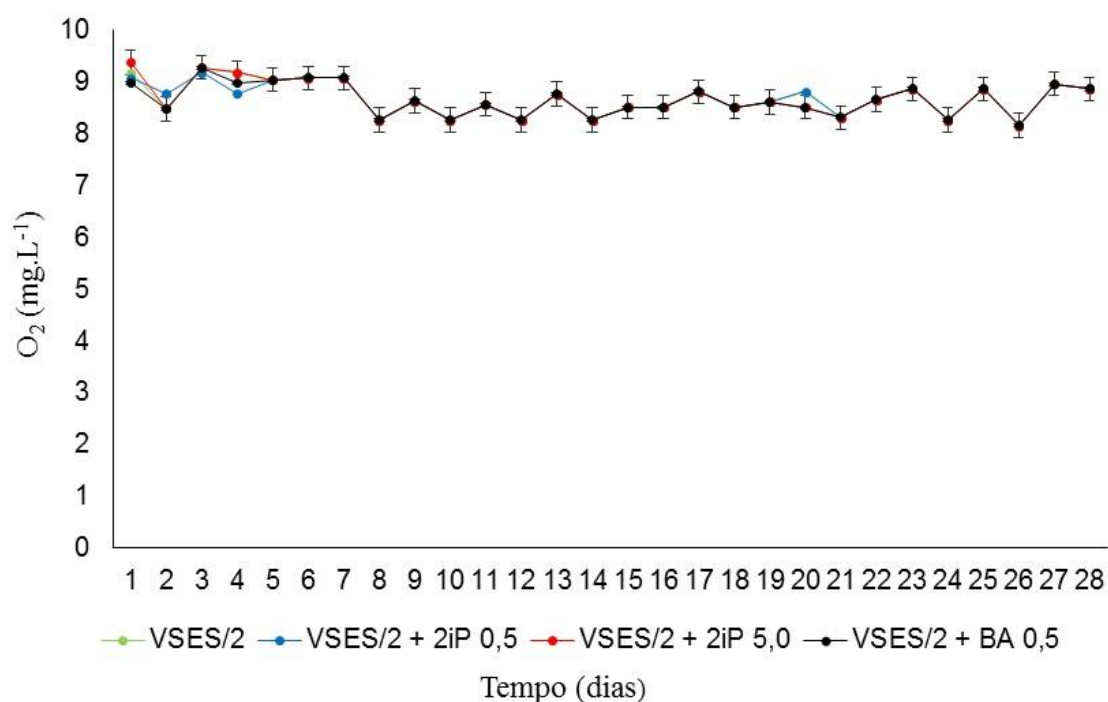


Figura 22: Variação diária do O_2 dissolvido nos biorreatores. Tratamentos com 50% de meio von Stosch (VSES/2, controle) e adição de 0,5 e 5,0 μ M de 2-isopenteniladenina (2iP) e 0,5 μ M de benzilaminopurina (BA). Média $\pm$ DP (n=3).

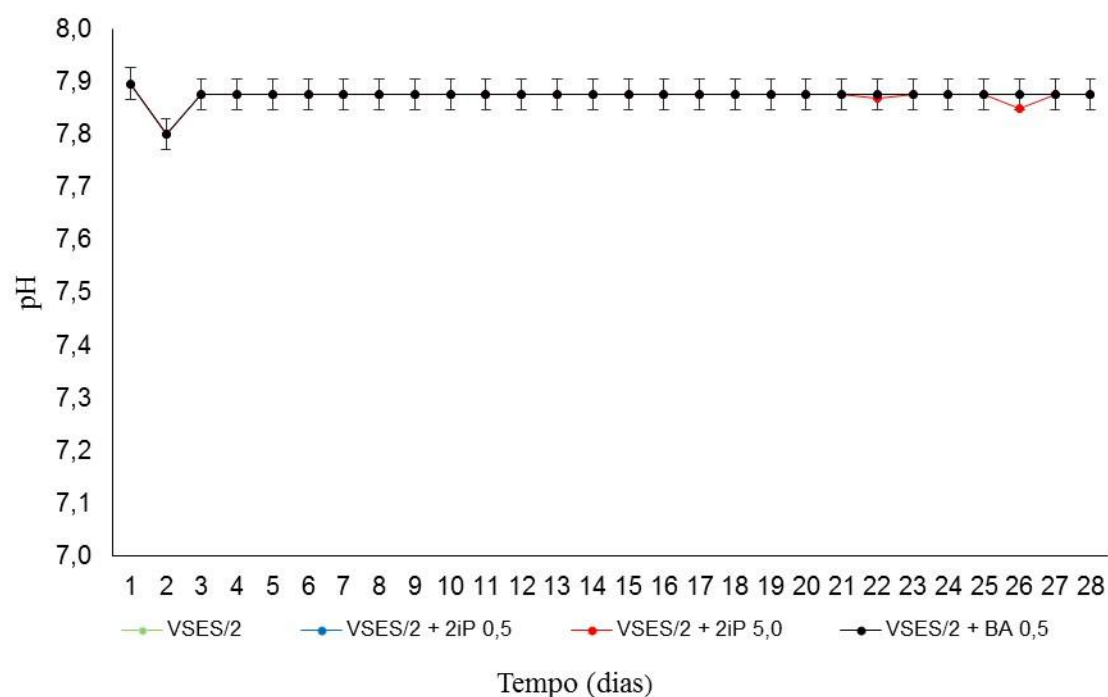


Figura 23: Variação diária do pH do meio de cultura nos biorreatores. Tratamentos com 50% de meio von Stosch (VSES/2, controle) e adição de 0,5 e 5,0 μ M de 2-isopenteniladenina (2iP) e 0,5 μ M de benzilaminopurina (BA). Média $\pm$ DP (n=3).

4.3.2. Taxa de crescimento

As taxas de crescimento de *G. caudata* não variaram entre os tratamentos com VSES/2 com adição de 2-isopenteniladenina e benzilaminopurina (Figura 24).

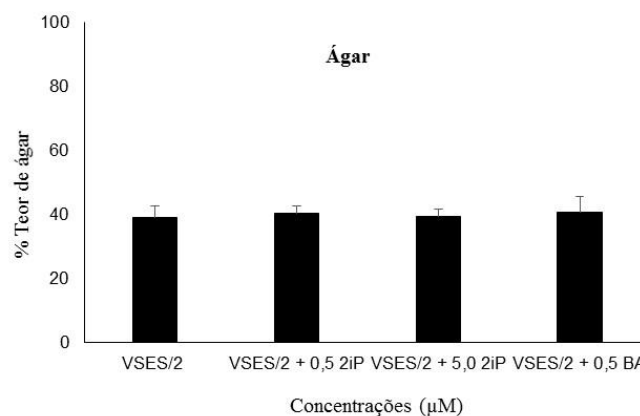


Figura 24: Efeitos de diferentes tratamentos com 50% de meio von Stosch (VSES/2, controle) com adição de 0,5 e 5,0 μM de 2-isopenteniladenina (2iP) e 0,5 μM de benzilaminopurina (BA) sobre a taxa de crescimento de *Gracilaria caudata* cultivada em biorreatores por 28 dias. Média ± DP (n=3).

4.3.3. Análise do ágar

4.3.3.1. Rendimento

O rendimento do ágar não foi influenciado pelos tratamentos com diferentes concentrações de 2-isopenteniladenina e benzilaminopurina, variando entre 38 e 40% (Figura 25).

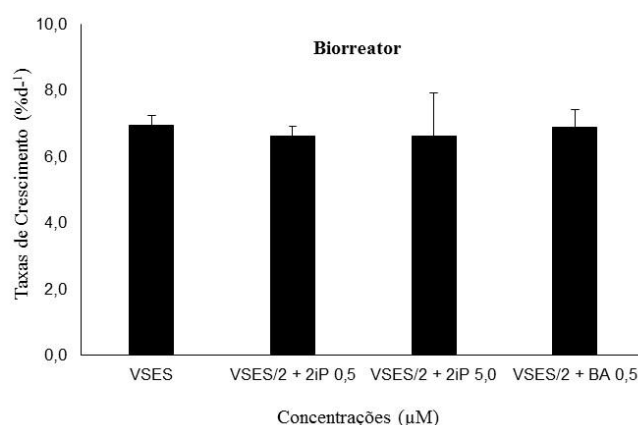


Figura 25: Efeitos de diferentes tratamentos com 50% de meio von Stosch (VSES/2, controle) e adição de 0,5 e 5,0 μM de 2-isopenteniladenina (2iP) e 0,5 μM de benzilaminopurina (BA) no rendimento do ágar de *Gracilaria caudata* cultivada em biorreatores por 28 dias. Média ± DP (n=3).

4.3.3.2. 3,6 anidrogallactose

A quantidade de 3,6 anidrogallactose no ágar não diferiu entre os tratamentos com diferentes concentrações de, 2-isopenteniladenina e benzilaminopurina, variando entre 40 e 43% (Figura 26).

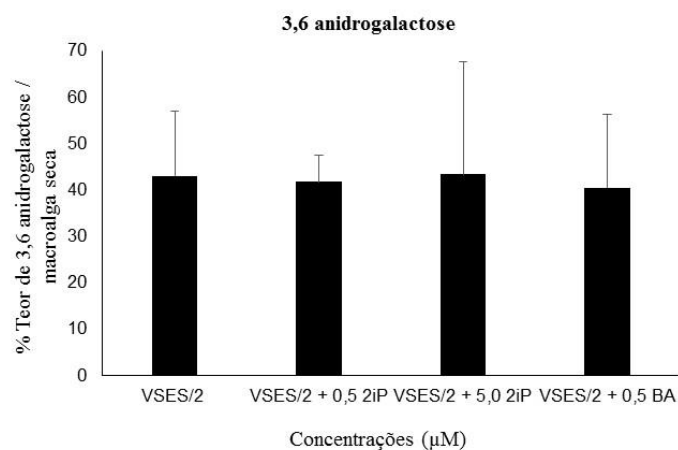


Figura 26: Efeitos de diferentes tratamentos com 50% de meio von Stosch (VSES/2, controle) e adição de 0,5 e 5,0 µM de 2-isopenteniladenina (2iP) e 0,5 µM de benzilaminopurina (BA) no teor percentual de 3,6 anidrogallactose do ágar de *Gracilaria caudata* cultivada em biorreatores por 28 dias. Média ± DP (n=3).

4.3.3.3. Sulfato

A quantidade de sulfato no ágar também não diferiu entre os tratamentos com diferentes concentrações de 2-isopenteniladenina e benzilaminopurina, variando entre 0,36 e 0,43% (Figura 27).

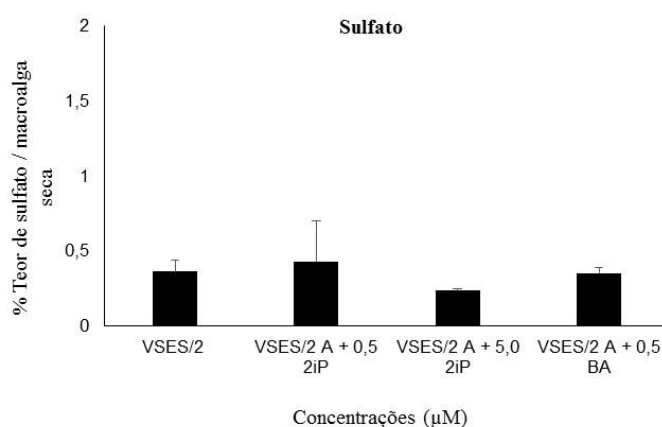


Figura 27: Efeitos de diferentes tratamentos com 50% de meio von Stosch (VSES/2, controle) e adição de 0,5 e 5,0 µM de 2-isopenteniladenina (2iP) e 0,5 µM de benzilaminopurina (BA) no teor percentual de sulfato do ágar de *Gracilaria caudata* cultivada em biorreatores por 28 dias. Média ± DP (n=3).

5. DISCUSSÃO

5.1. Efeitos das citocininas

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os tratamentos com 2-isopenteniladenina não influenciaram as taxas de crescimento de *Gracilaria caudata* nas duas irradiâncias testadas, porém podemos observar que na irradiância de 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ as taxas de crescimento foram maiores quando comparadas a irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Kaczyna & Megnet (1993) observaram que 2-isopenteniladenina quando combinada com outros fitorreguladores, como AIA, estimulou a formação de calos em *G. verrucosa*, o que não ocorreu quando testada apenas com 2-isopenteniladenina. Por outro lado, 2-isopenteniladenina inibiu o crescimento de *Pilayella littoralis* (Pedersén, 1973) e altas concentrações de 2-isopenteniladenina também inibiu o crescimento de *Ahnfeltia plicata* (Mansilla *et al.*, 2013).

As citocininas *cis*-zeatina e *trans*-zeatina não estimularam o crescimento de *Gracilaria caudata* nas diferentes concentrações testadas. Efeitos inibitórios de citocininas como zeatina e 2-isopenteniladenina foram observados no crescimento de calos filamentosos de *Ecklonia radiata* por Lawlor *et al.* (1988). Além disso, altas concentrações de zeatinas inibiram as regenerações em *Agardhiella subulata* (Bradley & Cheney, 1990). Por outro lado, a zeatina foi estimulatória para o crescimento de *Solieria filiformis* (Yokoya, 1996), e zeatina e 2iP estimularam o crescimento de *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Agardh (de Nys *et al.*, 1991).

As diferentes concentrações de benzilaminopurina e cinetina não influenciaram a taxa de crescimento de *Gracilaria caudata*. No entanto, efeitos inibitórios nas taxas de crescimento foram observados em *Grateloupia dichotoma* e *Solieria filiformis* quando testadas com benzilaminopurina e cinetina, mas o crescimento de *Gracilaria tenuifrons* foi estimulado pelas diferentes concentrações de benzilaminopurina (Yokoya, 1996). No trabalho de Ramlov *et al.* (2013), benzilaminopurina e cinetina estimularam o crescimento de segmentos apicais de *Gracilaria domingensis* em irradiância alta de 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Resultados similares aos obtidos com benzilaminopurina na taxa de crescimento de *Gracilaria caudata* foram observados por Yokoya *et al.* (2014), onde diferentes concentrações de benzilaminopurina não estimularam o crescimento de *Chondracantus chamissoi*. Por outro lado, altas concentrações de benzilaminopurina inibiram a regeneração em *Agardhiella subulata* (Bradley & Cheney, 1990). Iwasaki

(1961) observou que baixas concentrações de cinetina, estimularam o crescimento da fase Conchocelis de *Porphyra tenera*. Alguns estudos também mostraram efeitos de cinetina no crescimento de *Ectocarpus fasciculatus* e *Pilayella littoralis* (Pedersén, 1968), e *Bryopsis mucosa* Lamourex, *Ulva rígida* C. Agardh, *Stypocaulon scoparium* Kutzing e *Petroglossum nicaeense* (Augier, 1974).

A formação de ramos primários de *Gracilaria caudata* foi estimulada pelas concentrações de 0,5 e 5,0 μM de *cis*-zeatina na irradiância de 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Resultados similares foram observados por Yokoya (1996), onde a zeatina promoveu a formação de ramos laterais em *Solieria filiformis*.

A citocinina aromática benzilaminopurina na concentração de 5,0 μM e irradiância de 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ estimulou a formação de ramos primários em *Gracilaria caudata*. Efeitos estimulatórios da benzilaminopurina também foram observados na formação de ramos laterais de *Grateloupia dichotoma* (Yokoya & Handro, 1996). Por outro lado, baixas concentrações de benzilaminopurina (0,5 μM) inibiram o crescimento dos segmentos intercalares de *Gracilaria domingensis* quando submetidas às irradiâncias de 50 e 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Ramlov *et al.*, 2013). Yokoya *et al.* (2014) observou que os segmentos apicais de *Chondracanthus chamissoi* apresentaram diferentes respostas a benzilaminopurina: altas concentrações da BA estimulou a formação de calos e baixa concentração, porém nenhuma concentração de BA estimulou a formação de ramos laterais. O efeito estimulador de BA (uma citocinina aromático) na formação do calo é um resultado do seu papel na divisão das células.

A citocinina 2-isopenteniladenina não influenciou o conteúdo de ficoeritrina em *Gracilaria caudata*, porém as citocininas *cis*-zeatina e *trans*-zeatina inibiram o conteúdo de ficoeritrina em todas as concentrações e irradiâncias testadas. Nas citocininas aromáticas, as concentrações de 5,0 e 50,0 μM de benzilaminopurina em irradiância de 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ inibiram o teor de ficoeritrina. Cinetina inibiu o conteúdo de ficoeritrina nas concentrações de 0,5 e 50,0 nas duas irradiâncias testadas. Resultados similares foram observados por Martins *et al.* (2008), que verificaram que a cinetina em concentrações até 50,0 μM em irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ não estimulou o conteúdo de ficoeritrina em *Hypnea musciformis*.

O teor de ficobiliproteínas em *Gracilaria caudata* foi maior em algas submetidas às irradiâncias baixas do que em altas. Ápices de *Gracilaria tenuifrons* expostos a 60 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ apresentaram maior conteúdo de ficoeritrina do que os expostos a irradiância de 60 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Serra, 2013).

As citocininas *cis*-zeatina, *trans*-zeatina e cinetina inibiram o conteúdo de ficocianina em *Gracilaria caudata* em alta e baixa irradiâncias. Martins *et al.* (2008) também observou que a cinetina não influenciou no conteúdo de ficocianinas em *Hypnea musciformis*. Serra (2013) observou que a quantidade de ficobilinas em *Gracilaria tenuifrons* foi maior em irradiância de 60 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ do que em alta irradiância.

As citocininas derivadas do isoprenóide testadas no presente estudo inibiram o conteúdo de aloficocianina em *Gracilaria caudata*, fato que ocorreu também com a citocininas aromática cinetina. Martins *et al.* (2008) observaram que a cinetina não influenciou a produção de aloficocianina em *Hypnea musciformis*.

Alta concentração de 2-isopenteniladenina (50,0 μM) na irradiância 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ aumentou o conteúdo de clorofila *a* em *Gracilaria caudata*. Serra (2013) também obsevou maior conteúdo de clorofila *a* em tratamentos com baixa irradiância em *Gracilaria tenuifrons*. Tratamentos com *cis*-Zeatina, *trans*-Zeatina e cinetina em todas as concentrações e irradiâncias testadas neste trabalho inibiram o conteúdo clorofila *a* em *Gracilaria caudata*. Porém, os tratamentos com benzilaminopurina não influenciaram o conteúdo de clorofila *a* em *G. caudata*. Por outro lado, o aumento do conteúdo de clorofila *a* foi observado em tratamentos com cinetina em *Hypnea musciformis* (Jennings *et al.*, 1972). Resultados que mostram a diminuição de pigmentos com o aumento da irradiância foram observados por Skriptsova & Yakovleva (2002) para *Gracilaria gracilis* e Schmidt *et al.* (2010) para *G. domingensis* e *Gelidium floridanum*.

No presente trabalho, as citocininas 2-isopenteniladenina, benzilaminopurina e cinetina não influenciaram o conteúdo de proteínas solúveis totais. Por outro lado, Martins *et al.* (2008) observaram que cinetina, em concentrações de 0,5 a 50,0 μM , estimulou o conteúdo de proteínas totais nas linhagens verde e marrom de *Hypnea musciformis*. Resultados distintos foram observados nos tratamentos com *cis*-zeatina e *trans*-zeatina, que inibiram o conteúdo de proteínas de *Gracilaria caudata* em todas as concentrações e irradiâncias. Por outro lado, a cinetina aumentou o conteúdo de proteínas em *Hypnea musciformis* (Jennings *et al.*, 1972).

5.2. Efeitos do AMPEP

Os tratamentos com VSES/2 e AMPEP apresentaram maiores taxas de crescimento de *Gracilaria caudata* quando comparados com tratamentos de água do

mar e AMPEP. Altas taxas de crescimento das mudas de *Kappaphycus alvarezii* foram obtidas quando submetidas ao tratamento AMPEP (Hayashi *et al.*, 2011). Alguns estudos evidenciaram que as citocininas presentes no AMPEP podem ser responsáveis pela sua atividade estimulatória (Reitz & Trumble, 1996; Khan *et al.*, 2009). O AMPEP estimulou o crescimento em três variantes de *K. alvarezii* (Loureiro *et al.*, 2010). A aplicação do AMPEP tornou as algas mais resistentes à algumas epífitas e aumentou o crescimento e rendimento de carragenana (Hurtado *et al.*, 2009; Loureiro *et al.*, 2010; Yunque *et al.*, 2011; Borlongan *et al.*, 2011; Loureiro *et al.*, 2012).

Os tratamentos com VSES/2 e AMPEP apresentaram maiores concentrações de ficoeritrina do que os tratamentos com água do mar e AMPEP. Estes resultados estão relacionados com a composição de nutrientes de VSES, que é rica em nitrato, aumentando a quantidade de pigmentos. A ficoeritrina, que é uma forma de reserva de nitrogênio em algas vermelhas, variou muito nos diferentes tratamentos com água do mar com VSES e AMPEP quando comparada aos tratamentos com água do mar e AMPEP. Trabalhos com citocininas e nitrato mostraram diferenças no conteúdo de pigmentos em *Hypnea musciformis* e *Gracilaria domingensis* (Martins *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2012).

O efeito do AMPEP foi indiferente aos efeitos fisiológicos em *G. caudata*, sendo o fator estimulante VSES, pois VSES apresenta em sua composição fonte de nitrogênio que é estimulante para o crescimento das algas.

5.3. Efeitos das citocininas no rendimento e qualidade do ágar

As diferentes concentrações de 2-isopenteniladenina e benzilaminopurina cultivos de *Gracilaria caudata* em biorreatores não tiveram efeitos sobre a sua taxa de crescimento, rendimento do ágar e qualidade do ágar (3,6 anidrogactose e sulfato). Por outro lado, estudos com cinetina e benzilaminopurina em biorreatores mostraram que estas citocininas estimularam a indução de calos em *Kappaphycus alvarezii*.

Yoshimura (2006) observou que o rendimento de ágar em *Gracilaria caudata* é baixo (20%), mesmo quando as extrações foram feitas com diferentes tratamentos alcalinos. Porém, o rendimento do ágar de *Gracilaria domingensis* foi maior (35%), e este rendimento aumentou para 50% quando as extrações foram feitas com tratamentos alcalinos (Yoshimura, 2006). Os rendimentos do ágar de *Gracilaria caudata* obtidos nos diferentes tratamentos com os biorreatores variaram de 38 a 40%, valores superiores aos obtidos por Yoshimura (2006). Marinho-Soriano *et al.* (2001) observaram que o

rendimento do ágar de *Gracilaria cervicornis* foi de 11 a 20%, valores inferiores aos obtidos no presente estudo com *Gracilaria caudata*. Os resultados de rendimento de ágar de *Gracilaria caudata* foram maiores do que os obtidos com tratamentos alcalinos em outras espécies de *Gracilaria* (Levy *et al.*, 1990; Hurtado-Ponce, 1992, Orosco *et al.*, 1992; Rebello *et al.*, 1997). Teores maiores de ágar foram obtidos em espécies de *Gracilaria* por Durairatnam *et al.* (1990), por Yoshimura (2006) e Santos (2011) para *Gracilaria domingensis*, e por Yenigul (1993) para *Gracilaria verrucosa*.

As diferentes concentrações de citocininas não influenciaram o conteúdo de 3,6 anidrogactose e o teor de sulfato do ágar de *Gracilaria caudata*. Porém, *Gracilaria caudata* produz um ágar de melhor qualidade, pois o nível de 3,6 anidrogactose é maior. Segundo Yoshimura (2006), os teores de 3,6 anidrogactose comercialmente aceitos estão acima de 15%. Os altos valores de 3,6 anidrogactose verificados no presente estudo evidenciam que a qualidade do ágar de *Gracilaria caudata* é bem superior a aquela determinada para utilização comercial. Yoshimura (2006) obteve ágar com níveis de 3,6 anidrogactose acima de 14% em *G. caudata* coletada na Enseada da Armação Itapocoroy (Penha, Santa Catarina). Estes níveis são inferiores aos apresentados no presente estudo, onde o valor máximo foi de 43%. O maior teor de 3,6 anidrogactose confere ao ágar uma propriedade gelificante maior (Matulewicz, 1996), aumentando o seu valor de mercado. Porém Yoshimura (2006) observou que os tratamentos alcalinos produziram porcentagens de 3,6 anidrogactose entre 9 e 15%, valores que não os tornam comerciáveis.

As citocininas testadas nos biorreatores não influenciaram a quantidade de sulfato do ágar de *Gracilaria caudata*. Os valores similares de sulfato também foram observados por Yoshimura (2006) em *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis*, por Villanueva *et al.* (1999) em *Gelidiella acerosa* e *Gracilaria eucheumoides*, por Meena *et al.* (2008) em *Gracilaria edulis*, *Gracilaria crassa* e *Gracilaria foliifera*.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os principais resultados do presente estudo foram:

- Em geral, as citocininas 2iP, BA e K apresentaram efeito nulo, ou inibitório (*cis* e *trans*-Zeatina) na taxa de crescimento de *G. caudata*;
- A formação de ramos laterais foi inibida em concentrações de 5,0 μM de 2iP tanto em 50 e 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Por outro lado, *cis* e *trans*-zeatina, BA e K nas concentrações de 0,5 e/ou 5,0 μM estimularam a formação de ramos primários na irradiância de 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$;
- As concentrações de *cis* e *trans*-zeatina apresentaram correlação negativa com o conteúdo dos pigmentos fotossintetizantes e de proteínas nas duas irradiâncias testadas. Por outro lado, a benzilaminopurina não apresentou correlação significativa com o conteúdo de pigmentos e proteínas, e a cinetina apresentou correlação somente com alguns pigmentos em função da irradiância testada;
- Os tratamentos com AMPEP resultaram em maiores taxas de crescimento e maior conteúdo de pigmentos fotossintetizantes quando utilizadas em combinações com VSES/2; sendo assim o VSES foi o fator estimulatório nos efeitos fisiológicos em *G. caudata* e não AMPEP.
- As diferentes concentrações de citocininas nos biorreatores não influenciaram a taxa de crescimento, rendimento e a qualidade do ágar. Porém, a quantidade de 3,6 anidrogallactose foi maior do que o teor de sulfato, conferindo ao ágar de *G. caudata* uma maior propriedade gelificante, aumentando o seu valor comercial.

Os resultados obtidos indicam que a estrutura química das citocininas e o nível de irradiância influenciam as respostas fisiológicas e bioquímicas em *Gracilaria caudata*. Para estudos futuros devem ser determinados os níveis de fitorreguladores endógenos em *Gracilaria caudata* a fim de entender os efeitos das citocininas na formação de ramos primários, pigmentos e conteúdo de proteínas. Efeitos de outros fitorreguladores também devem ser estudados para identificar as suas funções fisiológicas em macroalgas.

Os estudos fisiológicos em *Gracilaria caudata* devem ser continuados a fim de obter resultados que possibilitam seu cultivo no mar, reduzindo o extrativismo a partir de banco naturais e contribuindo para sua conservação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aliste, A. J.** 2006. Uso de substâncias antioxidantes na resposta a radiação dos hidrocoloides carragenanas, agaranas e alginatos utilizados na indústria alimentícia. Tese de Doutorado (Tecnologia Nuclear- Aplicação). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo. Universidade de São Paulo. 104p.
- Araujo, F.O., Ursi, S., Plastino, E.M.** 2014. Intraspecific variation in *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): Growth, pigmentcontent and photosynthesis. Journal of Applied Phycology 26: 849-858.
- Augier, H.** 1976. Les hormones des algues. II. Etude physiologique. Annual Science national Botany 15: 119-180.
- Ayres-Ostrock, L. M. & Plastino, E. M.** 2014. Effects of short-term exposure to ultraviolet-B radiation on photosynthesis and pigment content of red (wild types), greenish-brown, and green strains of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). Journal of Applied Phycology 26:867- 879.
- Barufi, J.B.** 2004. Efeitos da luz na reprodução, no crescimento e no conteúdo pigmentar de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo. 112p.
- Benková, E.; Witters, E.; Dongen, W.** 1999. Cytokinins in tobacco and wheat chloroplasts. Occurrence and changes due to light/dark treatment. Plant Physiology 121:245–252.
- Boral, S. & Bohidar, H.B.** 2009. Hierarchical structures in agar hydrogels. Polymer 50: 5585-5588.
- Borlongan, I.A.G.; Tibudos, K.R.; Yunque, D.A.T.; Hurtado, A.Q.; Critchley, A.T.** 2011. Impact of AMPEP on the growth and occurrence of epiphytic *Neosiphonia* infestation on two varieties of commercially cultivated *Kappaphycus alvarezii* grown at different depths in the Philippines. Journal of Applied Phycology 23: 615–621.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- 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.

- Buschmann, A. H.; Correa, J. A.; Westermeier, R. Hernandezgonzalez, M. C.; Norambuena, R.** 2001. Red algal farming in Chile: a review. *Aquaculture* 194: 203-220.
- Cosson, J.; Deslandes, E.; Zinoun, M.; Mourandi-Givernaud, A.** 1995. Carrageenans and agars, red algal polysaccharides. *Prog. Phycol. Res.* 11: 269-324.
- Chow, F.; Capociama, F.V.; Faria, R.B.M.; Oliveira, M.C.** 2007. Characterization of nitrate reductase activity in vitro in *Gracilaria caudata* J. Agardh (Rhodophyta, Gracilariales). *Revista Brasileira de Botânica* 30: 123-129.
- 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.
- Destombe, C.; Godin, J.; Nocher, M.; Richerd, S.; Valero, M.** 1993. Differences in response between haploid and diploid isomorphic phases of *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta, Gigartinales) exposed to artificial environmental conditions. *Hydrobiologia* 260: 131-137.
- Durairatnam, M.; Medeiros, T. M. B; Sena, A. M.** 1990. Studies on the yield and gel strength of agar from *Gracilaria domingensis* Sonder ex Kuetzing (Gracilariales, Rhodophyta) following the addition of calcium. *Hydrobiologia* 204/205: 551-553.
- 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 (edition). *Encyclopedia of Plant Physiology*. Springer-Verlag v: 10: 23-80.
- Evans, L.V. & Trewavas, A.J.** 1991. Is algal development controlled by plant growth substances? *Journal of Phycology* 27: 322-326.
- Fletcher, R.A. & McCullagh, D.** 1971. Cytokinin induced chlorophyll formation in cucumber cotyledons. *Planta* 101: 88-90.
- Fosket, D. F.** 1994. *Plant Growth and Development: A Molecular Approach* Academic Press, California. 580.
- Freile-Pelegrin, Y; Murano, E.** 2005. Agars from three species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Yucatán Peninsula. *Bioresource Technology* 96: 295-302.
- González, M.A.; Montoya, R. & Candya, A.** 1995. Organellar DNA restriction analysis of four morphotypes of *Gracilaria* from Lenga, VIIIth Region, Chile. *Biological Research* 28: 177-184.

- Gonzalez-Leija, J.A.; Hernández-Garibay, E.; Pacheco-Ruíz, I.; Guardado-Puentes, J.; Espinoza-Avalos, J.; López-Vivas, J. M; Bautista-Alcantar, J.** 2009. Optimization of the yield and quality of agar from *Gracilariopsis lemaneiformis* (Gracilariales) from the Gulf of California using an alkaline treatment. *Journal of Applied Phycology* 21: 331-326.
- Gvindjee & Shevala, D.** 2011. Adventures with cyanobacteria: a personal perspective. *Frontiers in Plant Science*. Vol.2 (28):1-17
- Hayashi, L.; Yokoya, N. S.; Kikuchi, D.M.; Oliveira, E. C.** 2008. Callus induction and micropropagation improved by colchicine and phytohormones in *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae). *Journal of Applied Phycology* 20: 653-659.
- Hayashi, L.; Santos, A.A.; Faria, G.S.M., Nunes, B.G.; Souza, M.S.; Fonseca, A.L.D.; Barreto, P.L.M.; Oliveira, E.C.; Bouzon, Z.L.** 2011. *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Areschougaceae) cultivated in subtropical waters in southern Brazil. *Journal of Applied Phycology* 23:337–343
- Hsu, Y. T & Lee, T. M.** 2012. Nitric Oxide up-regulates the expression of methionine sulfoxide reductase genes in the intertidal macroalgae *Ulva fasciata* for high light acclimation. *Plant Cell Physiol.* 53(2): 445-456.
- Hurtado-Ponce, A. Q.** 1990. Vertical rope cultivation of *Gracilaria* (Rhodophyta) using vegetative fragments. *Botanica Marina* 33: 447-481.
- Hurtado, A.Q.; Yunque, D.A.; Tibudos, K.; Critchley, A.T.** (2009). Use of Acadian marine plant extract powder from *Ascophyllum nodosum* in tissue culture of *Kappaphycus* varieties. *Journal of Applied Phycology* 21: 633–639.
- Kaczyna, F. & Megnet, R.** 1993. The effects of glycerol and plant growth regulators on *Gracilaria verrucosa* (Gigartinales, Rhodophyceae). *Hydrobiologia* 268: 57-64.
- Iwasaki, H.** 1961. The life cycle of *Porphyra tenera* *in vitro*. *The Biological Bulletin* 121: 173-187.
- Jeffrey, S. W. & Humphrey, G.F.** 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 e c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemical Physiology Pflanzen* 167: 191-194.
- 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.

- Kain, J.M. & Destombe, C.** 1995. A review of the life history, reproduction and phenology of *Gracilaria*. *Journal of Applied Phycology* 7: 269-281.
- Khan, W; Rayirath, U.P.; Subramanian, U.P.; Jitesh, M.N.; Rayorath, P.; Hodges, D.M.; Critchley, A.C; Craigie, J.S.; Norrie, J.; Prithiviraj, B.** 2009. Seaweed Extracts as 75 Biostimulants of Plant Growth and Development. *Journal of Plant Growth Regulators* 28:386–399.
- Kursar, T. A.; Van Der Meer, J.; Alberte, R. S.** 1983. Light-harvesting system of red alga *Gracilaria tikvahiae*. Biochemical analyses of pigment mutations. *Plant Physiology* 73:353-360.
- Lahaye, M.; Rochas, C.** 1991. Chemical structure and physico-chemical properties of agar. *Hydrobiologia* 221: 137-148.
- 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. Sandler, 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.
- Loureiro, R.R.; Reis, R.P.; Critchley, A.T.** 2010. In vitro cultivation of three *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Areschougiaceae) variants (green, red and brown) exposed to a commercial extract of the brown alga *Ascophyllum nodosum* (Fucaceae, Ochrophyta). *Journal of Applied Phycology* 22:101–104.
- Loureiro, R. R.; Reis, R.P.; Berrogain, F.D.; Critchley, A.T.** 2012. Extract powder from the brown alga *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis (AMPEP): a vaccine-like effect on *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C. Silva. *Journal of Applied Phycology* 24: 427-432.
- 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.
- Mansilla, A.; Rodriguez, J.P.; Souza, J.M.C.; Rosenfeld, S.; Ojeda, J.; Yokoya, N.S.** 2014. Growth responses to temperature, salinity and nutrient variations, and

- biomass variation and phenology of *Ahnfeltia plicata* (Rhodophyta, Ahnfeltiales), a commercially interesting agarophyte from the Magellanic Region, Chile. *Journal of Applied Phycology* 26: 1133-1139.
- Martins, A.P.; Yokoya, N.S.; Carvalho, M.A.; Plastino, E.M.** 2008. Effects of kinetin and nitrogen on growth rates, pigment and protein contents of wild and phycoerythrin-deficient strains of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 20: 767-773.
- Mathieson, A.; Penniman, C. E.; Tveter-Gallagher, E.** 1984. Phycocolloid ecology of underutilized economic red algae. *Hydrobiologia* 116/117: 542-546.
- Matulewicz, M. C.** 1996. Polisacáridos de algas rojas: agar. In: Ferrario, M & Sar, E. (Eds). *Macroalgas de interes econômico. Cultivo, manejo, industrialización*. Editorial de La Universidad Nacional de La Plata. 111-133.
- Marinho-Soriano, E.; Bourret, E.; Casabianca, M.L.; Maury, L.** 1999. Agar from the reproductive and vegetative stages of *Gracilaria bursapastoris*. *Bioresource Technology* 67: 1-5.
- Marinho-Soriano, E.; Silva, T. S. F.; Moreira, W.S.C.** 2001. Seasonal variation in the biomass and agar yield from *Gracilaria cervicornis* and *Hydropuntia cornea* from Brazil. *Bioresource Technology* 77: 115-120.
- Matsuhiro, B.** 1995. Aislamiento y caracterización de ficocolóides. In: Alveal, K.; Ferrario, M.E.; Oliveira, E.C.; SAR, E. *Manual de métodos ficocolóide*. Universidad de Concepción. Concepción, Chile. pp. 657-689.
- McDonald, M.S.** 2003. *Photobiology of Higher Plants*. John Wiley & Sons, Nova York, 368.
- McHugh, D. J.** 1991. Worldwide distribution of commercial resources of seaweeds including *Gelidium*. *Hydrobiologia* 221: 19-29.
- McHugh, D. J.** 2003. A guide to seaweed industry. *FAO Fisheries Technical Paper* n° 441. Rome. 105p.
- 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.
- Meena, R.; Prasad, K.; Ganesan, M.; Siddhanta, A. K.** 2008. Superior quality agar from *Gracilaria* species (Gracilariales, Rhodophyta) collected from the Gulf of Mannar, India. *Journal of Applied Phycology* 20: 397-402.

- Miranda, G.E.C. de; Yokoya, N.S.; Fujii, M.T.** 2008. Effects of temperature, salinity and irradiance on carposporeling development of *Hydropuntia caudata* (Gracilariales, Rhodophyta). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 22: 818 – 824.
- Mouradi-Givernaud, A.; Hassani, L.A.; Givernaud, T.; Lemoide, Y.; Benharbet, O.** 1999. Biology and agar composition of *Gelidium sesquipedale* harvested along the Atlantic coast of Morocco. *Hydrobiologia* 398-399: 391- 395.
- 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 agars from *Gracilaria*. *Journal of Applied Phycology* 7: 245-254.
- Mooney, P. A. & J. Van Staden.** 1986. Algae and Cytokinins. *Journal of Phycology*. 13 (Suppl):45.
- Necchi, O.J.** 2004. Light-related photosynthetic characteristics of lotic macroalgae. *Hydrobiologia* 525: 139-155.
- Novák, O.; Tarkowsk, P.; Tarkowská, D.; Dolezal, K.; Lenobel, R.; Strnad, M.** 2003. Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography/single-quadrupole mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 480: 207-218.
- Oliveira, E.C. & Plastino, E.M.** 1984. The life history of some species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Brazil. *Japanese Journal of Phycology* 32:203-208.
- Oliveira, E. C.; Oliveira, M. C.; Satio, R. M.; Garófalo, G. M. C.** 1992. Carragenanas - algas polivalentes. *Ciência Hoje* 14: 73 -77.
- Oliveira, E.C., Alveal, K., Anderson, R.** 2000. Mariculture of agar-producing gracilarioid red algae. *Reviews in Fisheries Science* 8: 345-378.
- Oliveira, E. C.** 1998. The seaweed resources of Brazil. *In*: Critcheley, A. T.; Ohno, M., Seaweed resources of the world. JICA. 366-371.
- Oliveira-Filho, E. C.** 1981. A exploração de algas marinhas no Brasil: situação atual e perspectivas futuras. *Phycologia. lat.- amer.*1:5-18.
- Oliveira, E.C. & Miranda, G.E.C.** 1998. Aspectos sociais e econômicos da exploração de algas marinhas no Brasil. *Anais IV Congr Latino-amer, II Reunião Ibero-americana e VII Reunião Brasileira de Ficologia* 2:149-156.
- Orosco, C. A., Saito, Y., Sawamura, M., Ohno, M., Kusunose, H.** 1991. Studies on chemical properties of agar from *Gracilaria chorda*. *Research Reports of Kochi University* 40: 1-6.

- Plastino, E.M. & Oliveira, E.C.** 1988. Sterility barriers among species of *Gracilaria* (Rhodophyta, Gigartinales) from the São Paulo Littoral, Brazil. *Br. Journal of Phycology* 23: 267-271.
- Plastino, E.M. & Oliveira, E.C.** 1997. *Gracilaria caudata* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) - restoring and old name for a common western Atlantic algae. *Phycologia* 36: 225-232.
- Plastino, E.M., Guimarães, M., Matioli, S.R. & Oliveira, E.C.** 1999. Codominant inheritance of polymorphic color variants of *Gracilaria domingensis* Gracilariales, Rhodophyta). *Genetics and Molecular Biology* 22: 105-108.
- Plastino, E.M.; Ursi, S. & Fujii, M.T.** 2004. Color inheritance, pigment characterization, and growth of a rare light green strain of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycological Research* 52: 45-52.
- Pedersén, M.** 1968. *Ectocarpus fasciculatus*: marine brown alga requiring kinetin. *Nature* 218: 776.
- Pedersén M.** 1973. Identification of a cytokinin, 6-(3 methyl-2- butenylamino) purine, in seawater and the effect of cytokinins on brown algae. *Physiologia Plantarum* 28: 101–105.
- Ramlov, F.; Plastino, E.M.; Yokoya, N.S.** 2013. Growth, callus formation and plant regeneration in color morphs of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) cultured under different irradiance and plant growth regulators. *Phycologia* 52: 508-516.
- Ramlov, F.; Souza, J.M.C.; Farias, A.; Maraschin, M.; Horta, P.A.; Yokoya, N.S.** 2011. Growth and accumulation of carotenoids and nitrogen compounds in *Gracilaria domingensis* (Kütz.) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta) cultured under different irradiance and nutrient levels. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 21: 255-261.
- Raven, P. H., Evert, R. F.; Eichhorn, S. E.** 2007. *Biologia Vegetal*, 7a. ed. Coord. Trad. J.E.Kraus. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Rebello, J.; Ohno, M.; Ukeda, H.; Sawamakura, M.** 1997. Agar quality of commercial agarophytes from different geographical origins: Physical and rheological properties. *Journal of Applied Phycology* 43: 70-77.
- Reitz, S.R. & Trumble J.T.** 1996. Cytokinin-containing seaweed extract does not reduce damage by an insect herbivore. *Hortscience* 31:102–105.

- Saito, R.M.M.** 1997. Extração e propriedades físico-químicas do colóide de uma alga brasileira (*Gracilariopsis tenuifrons* – Rhodophyta). Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo. 80p.
- Santos, J. P.** 2011. Avaliação do teor e análise quantitativa do ágar da espécie *Gelidiella acerosa* (Forskall) Feldmann and G. Hamel (Gelidiales, Rhodophyta) e *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie em costões rochosos dos municípios de Ilhéus e Uruçuca. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Feira de Santana. Feira de Santana – Bahia.
- Serra, D.R.** 2013. Resposta de *Gracilaria tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta) a estímulos de irradiância in vitro. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo. pp. 29-43.
- Stirk, W. A.; NOVÁK, O.; Strnad, M.; Van Staden, J.** 2003. Cytokinins in macroalgae. *Plant Growth Regulation* 41: 13-24.
- Stirk, W. A.; Novák, O.; Strnad, M.; Van Staden, J.; Ördög, V.** 2004. Endogenous cytokinins in three genera of microalgae from the Chlorophyta. *Journal of Phycology* 40: 88-95.
- Schmidt, E.C., Santos, R., Horta, P. A., Maraschin, M., Bouzon, Z. L.** 2010. Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta): Changes in cell organization, growth and photosynthetic performance. *Micron* 41: 919-930.
- Streit, D. P.; Lupchinski, E.; Moreira, H.L.M; Ribeiro, R.P.; Moraes, G.V.; Varga, L.D.** 2004. Perspectivas atuais da aquicultura marinha no Brasil. *Quadrimestral - Maringá*– PR.4: 1-2. Universidade Estadual de Maringá.
- Skriptsova, A. & Yakovleva, I.M.** 2002. The influence of variations in irradiance upon morphology in unattached form of *Gracilaria gracilis* (Steackhouse) Steentoft during field cultivation, South Primorye, Russia. *Aquatic Ecology* 36: 511-518.
- Tian, Q. & Reed, J.W.** 2001. Molecular links between light and auxin signaling. *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 274-280.
- Tseng C.K.** 2001. Algal biotechnology industries and research activities in China. *Journal of Applied Phycology* 13: 375-380.
- Ursi, S.; Plastino, E.M.** 2001. Crescimento in vitro de linhagens de coloração vermelha e verde clara de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) em dois meios de cultura: análise de diferentes estádios reprodutivos. *Revista Brasileira de Botânica* 24: 587-594.

- Ursi, S.; Pédersen, M.; Plastino, E.M.; Snoeijs, P.** 2003. Intraspecific variation of photosynthesis, respiration and photoprotective carotenoids in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales: Rhodophyta). *Marine Biology* 142: 997-1007.
- Ursi, S.** 2005. Diversidade intraespecífica de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): crescimento, fotossíntese, pigmentos, polissacarídeos e genes da ficoeritrina de linhagens selvagens e variantes. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 121p.
- Ursi, S.; Costa, V.L.; Hayashi, L.; Pereira, R.T.L. ; Paula, E.J. ; Plastino, E.M.** 2013. Intraspecific variation in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): growth, and agar yield and quality of color strains under aquaculture. *Botanica Marina* 56: 241-248.
- Villanueva, R.D.; Montaña, N.E.; Romero, J.B.; Aliganga, A.K.A.; Enriquez, E.P.** 1999. Seasonal variation in the yield, gelling properties and chemical composition of agars from *Gracilaria eucheumoides* e *Gelidiella acerosa* (Rhodophyta) from Philippines. *Botanica Marina* 42: 175-182.
- Yenigül, M.** 1993. Seasonal changes in the chemical and gelling characteristics of agar from *Gracilaria verrucosa* collected in Turkey. *Hydrobiologia* 260/261: 627-631.
- Yokoya, N.S.** 1996. Controle do crescimento 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. pp. 68-76.
- 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.** 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.** 2002. Effects of plant growth regulators and culture medium on morfogenesis 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. Vreelnad & 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: 244-254.
- Yokoya, N.S.; Stirk, W.A.; van Staden, J.; Novák, O.; Turečková, V.; Pěňčík, A.; Strand, M.** 2010. Endogenous cytokinins, auxins and abscisic acid in red algae from Brazil. Journal of Phycology 46: 1198-1205.
- Yokoya, N.S.; Ávila, M.; Piel, M.I.; Villanueva, F.** 2014. Effects of plant growth regulators on growth and morphogenesis in tissue culture of *Chondracanthus chamissoi* (Gigartinales, Rhodophyta). Journal of Applied Phycology 26: 819-823.
- Yoshimura, C.Y.** 2006. Avaliação do potencial de cultivo e produção de ágar de *Gracilaria domingensis* e de *Gracilaria caudata* (Rhodophyta, Gracilariales) na enseada da Armação Itapocoroy (Penha, Santa Catarina). Tese (Doutorado em Botânica). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Universidade de São Paulo. 163p.
- Yunque, D.A.T.; Tibudos, K.R.; Hurtado, A.Q.; Critchley, A.T.** 2011. Optimization of culture conditions for tissue culture production of young plantlets of carrageenophyte *Kappaphycus*. Journal of Applied Phycology 23: 433–438.