Julia Zardi de Castro

Caracterização fisiológica, bioquímica e morfológica de *Gracilaria domingensis* (Kützing) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta) submetida a variações de fatores abióticos

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

2017

Julia Zardi de Castro

.

Caracterização fisiológica, bioquímica e morfológica de *Gracilaria domingensis* (Kützing) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta) submetida a variações de fatores abióticos

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**

Castro, Julia Zardi de
C355c Caracterização fisiológica, bioquímica e morfológica de *Gracilaria domingensis* (Kützing) Sonder ex Dickie (Gacilariales, Rhodophyta) submetida a variações de fatores abióticos / Julia Zardi de Castro -- São Paulo, 2017.
70p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2017.
Bibliografia.

1. Algas. 2. Fatores ambientais. 3. Crescimento.
I. Título.

CDU: 582.26

Aos meus pais, Luciano e Evanici, e ao meu esposo Bruno, com muito amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram ou acompanharam a realização desse trabalho.

À minha querida orientadora, Dra. Nair Sumie Yokoya, pela orientação e apoio durante esse tempo, ensinamentos, dedicação, carinho, paciência e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/AUXPE-CIMAR 1991/2014) pela bolsa de mestrado concedida, pois sem esta seria impossível realizar este trabalho.

Ao César B. Pasqualetti e Jonatas M. Canuto de Souza, pelas conversas, risadas, e toda ajuda e auxílio no laboratório, por não terem medidos esforços e sempre foram prestativos em me ensinarem e me socorrerem!

Aos pesquisadores, funcionário e alunos do núcleo de pesquisa em Ficologia pelo carinho com que me acolheram, pela agradável convivência e pela amizade, em especial a Valdilene Maria dos Santos por todo apoio prestado no laboratório.

Ao instituto de Botânica de São Paulo, pela infra-estrutura oferecida, e em especial ao Núcelo de pesquisa em ficologia, pela disponibilização do laboratórios, equipamentos e materiais fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família que sempre me apoiaram, meus pais Evanici e Luciano que me ensinaram o valor do estudo, por estarem presente em todos os momentos. O que sou hoje é graças a eles. Ao meu irmão Rafael, à minha madrinha Ebe e avó Nayr por sempre mostrarem que sou capaz e me fortalecer a continuar minha jornada. Muito obrigada!

Ao meu amado esposo Bruno que me acompanha há sete anos ao meu lado, me apoiando e me ajudando sempre. Pelo carinho, amor, amizade, companheirismo, lealdade e respeito. Por ser paciente com meu stress, com minha tristeza, por sempre dizer palavras de conforto e colorir minha vida, sou feliz e realizada por ter você comigo. Te amo!

Ao meu Pingo de vida e o meu menino Nico, que nesses dois anos trouxeram muitas felicidades, me proporcionando um amor único e puro, e um sentimento inigualável! Meus anjos de quatro patas!

Aos meus queridos amigos da São Camilo, Diego Gonzalez, Débora Pinheiro, Gabriela Joia, Giovanna Boccuzzi, Evandro Biano e Thaís Ferreira que sempre estavam dispostos a me escutarem, pelos concelhos, encontros no Ed e a alegria que sempre reina quando estamos juntos!

À minha amiga desde a escola, Bruna Carvalho, por ser aquela ouvinte para todas as horas. Seguimos caminhos muito diferentes, mas a lealdade continua a mesma desde 2007.

As minhas amigas mackensistas, Beatriz Alonso e Camila Gimenez, por mostrarem que nossa amizade pode superar muitos obstáculos e mesmo assim a alegria, confiança e a sintonia continuam sempre! Agradeço muito por vocês fazerem parte da minha vida até hoje!

MUITO OBRIGADA!

Resumo geral

O gênero *Gracilaria* Greville apresenta uma ampla distribuição geográfica e é considerado uma das principais fontes de ágar. *Gracilaria domingensis* (Kützing) Sonder ex Dickie é uma das poucas espécies deste gênero que ocorre desde a região nordeste até a região sul do Brasil e sua importância comercial está associada à utilização na dieta humana (alimento *in natura*). Portanto, estudos sobre o seu desenvolvimento são necessários visando à implantação de um cultivo comercial para a produção sustentável de biomassa. Fatores como temperatura, luz e salinidade são de grande importância para o crescimento e produtividade das algas marinhas bentônicas. No presente estudo, foram avaliados os efeitos da variação de temperatura (15, 20, 25, 30 e 35°C) e da irradiância (20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 e 250 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}) no crescimento, morfologia, concentrações de pigmentos e proteínas em gametófitos femininos de *G. domingensis* provenientes do Espírito Santo (ES) e de Santa Catarina (SC). Foram avaliados também os efeitos da variação de salinidade (de 5 a 60 ups, em intervalos de 5 ups) no crescimento, morfologia, concentrações de pigmentos, de proteínas totais e carboidratos totais em gametófitos femininos de *G. domingensis* provenientes de SC. Para a obtenção das diferentes salinidades, foi adotado o procedimento de congelamento/descongelamento da água do mar. Os experimentos foram realizados no laboratório em culturas unialgáceas contendo meio von Stosch 50%, durante 31 dias. Os tratamentos foram testados com 3 repetições (n=3, nos experimentos de temperatura e irradiância) ou 6 repetições (n=6) no experimento de salinidade, sendo que cada repetição continha 6 segmentos apicais de 1cm. Os resultados foram submetidos à análise de variância de um ou dois fatores e ao teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls. *G. domingensis* provenientes de ES e SC toleraram a variação de temperatura de 15 a 30ºC, mas morreram quando cultivadas a 35ºC. A linhagem ES apresentou as maiores taxas de crescimento (TC, de 3,06 ± 0,35 a 6,08 ± 0,20 %.d^{-1}) em relação a linhagem SC (de 1,28 ± 0,48 a 4,13 ± 0,31 %.d^{-1}), mas as duas linhagens apresentaram as maiores TC na temperatura de 25ºC. A linhagem ES apresentou maior concentração de proteínas solúveis totais (1,90 ± 0,04 mg.g^{-1} MF) em baixa temperatura (15ºC) enquanto a linhagem SC apresentou maiores concentrações de proteínas (2,28 ± 0,37 e 2,78 ± 0,79 mg.g^{-1} MF) nas temperaturas de 25 e 30ºC, respectivamente. As concentrações de ficobiliproteínas não variaram nas diferentes temperaturas, mas a concentração de clorofila *a* da linhagem ES foi maior a 20ºC e menor na temperatura de 30ºC. A variação na irradiância influenciou a taxa de crescimento das duas linhagens (de 2,67 ± 0,12 a 6,04 ± 0,17 %.d^{-1}), sendo que as menores TC foram observadas na irradiância de 20 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} e as maiores TC foram observadas em irradiâncias maiores do que 40 a 60 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} para as linhagens SC e ES, respectivamente. As linhagens de *G. domingensis* apresentaram maiores concentrações de proteínas solúveis totais (1,43 ± 0,36 a 14,53 ± 0,79 mg.g^{-1}

MF) em baixas irradiâncias (20, 40 e 80 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}). As maiores concentrações de ficoeritrina (422,99 ± 41,38 µg.g^{-1} MF) e de ficocianina (215,31 ± 26,20 µg.g^{-1} MF) foram observadas na linhagem ES cultivada em baixa irradiância (40 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}), indicando uma fotoaclimatação. Os gametófitos femininos de *G. domingensis* provenientes de SC foram tolerantes a todas as salinidades testadas e apresentaram as maiores TC nas salinidades de 25 a 40 ups (5,6 ± 0,15 a 6,0 ± 0,13 %.d^{-1}). As concentrações de ficobiliproteínas (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina) não apresentaram diferenças significativas nas salinidades testadas, porém, a concentração de clorofila *a* em gametófitos femininos cultivados na salinidade de 60 ups (1,61 ± 0,37 µg.g^{-1} MF, n=3) foi significativamente menor quando comparada a salinidade de 30 ups (10,08 ± 6,61 µg.g^{-1} MF, n=3). Na análise de carboidratos totais, apenas a extração na fração etanólica (contendo os carboidratos de baixa massa molecular, CBMM) apresentou diferenças significativas, onde as algas cultivadas em salinidades de 55 e 60 ups apresentaram as maiores concentrações de CBMM. Esses resultados indicam que os gametófitos femininos de *G. domingensis* podem acumular maiores concentrações de CBMM em altas salinidades, uma vez que esses carboidratos podem atuar como osmólitos orgânicos, que são responsáveis para a manutenção da pressão de turgor, evitando a plasmólise celular. Os resultados obtidos indicam que as linhagens ES e SC de *G. domingensis* são euritérmicas e tolerantes a uma ampla variação de irradiância, e a linhagem SC é eurialina, características fisiológicas que podem ser explicadas pela sua ocorrência em regiões entre-marés dos costões rochosos, ficando expostas às variações de temperatura, irradiância e salinidade.

Palavras-chaves: *Gracilaria domingensis*, temperatura, irradiância, salinidade, crescimento, pigmentos, proteínas

Abstract

The genus *Gracilaria* Greville has wide geographical distribution and is considered one of the main sources of agar. *Gracilaria domingensis* (Kützing) Sonder ex Dickie is one of the few species of this genus that occurs from northeastern to the southern region of Brazil, and its commercial importance is associated in the use in the human diet (in natura food). Therefore, studies on its development are necessary in order to implement a commercial cultivation for the sustainable production of biomass. Factors such as temperature, light and salinity are important for the growth and productivity of benthic marine algae. In the present study, the effects of temperatures (15, 20, 25, 30 and 35ºC) and irradiance levels (20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 and 250 μmol of photons.$m^{-2}.s^{-1}$) on growth, morphology, pigment and protein concentrations were evaluated were evaluated in female gametophytes of *G. domingensis* from Espírito Santo (ES) and Santa Catarina (SC). The effects of salinity variation (from 5 to 60 psu, in interval of 5 psu) were also evaluated on growth, morphology, pigment concentrations, total proteins and total carbohydrates in were also evaluated in female gametophytes from SC. To obtain different salinities, the seawater freezing/ thawing procedure was adopted. All experiments were performed in the laboratory in unialgaceous cultures with 50% von Stosch media, for 31 days. Treatments were tested with 3 replicates (n=3) in temperature and irradiance experiments, with 6 replicates (n=6) in salinity experiments, and each treatment had 6 apical segments of 1cm. Results were submitted to analysis of variance of one or two factors, followed by the Student-Newman-Keuls comparison test. *G.* d*omingensis* from ES and SC tolerated the temperature variation from 15 to 30ºC, but died at 35ºC. The ES strain presented the highest growth reates (GR, from 3.06 ± 0.35 to 6.08 ± 0.20% .d^{-1}) in relation to the SC strain (from 1.28 ± 0.48 to 4.13 ± 0.31 % .d^{-1}), but the two strains had the highest GR at 25ºC. The ES strain had the highest concentration of total soluble proteins (1.90 ± 0.04 mg.g-1 MF) at low temperature (15ºC), while the SC strain presented higher protein concentrations (2.28 ± 0.37 and 2.78 ± 0.79 mg.g^{-1} FW) at temperatures of 25 and 30 °C, respectively). Phycobiliprotein concentrations did not vary in different temperatures, but the chlorophyll a concentration of the ES strain was higher at 20ºC and lower at 30ºC. The variation in irradiance influenced the GR of the two strains (from 2.67 ± 0.12 to 6.04 ± 0.17%.d^{-1}), and the lowest GR were observed at irradiance of 20 μmol of photons.$m^{-2}.s^{-1}$ and the highest GR were observed at irradiances higher than 40 to 60 μmol of photons.$m^{-2}.s^{-1}$ for the SC and ES strains, respectively. The *G. domingensis* strains showed higher concentrations of total soluble proteins (1.43 ± 0.36 to 14.53 ± 0.79 mg.g^{-1} FW) at low irradiances (20, 40 and 80 μmol of photons. $m^{-2}.s^{-1}$). The highest concentrations of phycoerythrin (422.99 ± 41.38 μg.g^{-1} FW) and phycocyanin (215.31 ± 26.20 μg.g^{-1} FW) were observed in the ES strain grown at low irradiance (40 μmol photons. $m^{-2}.s^{-1}$) and the lowest values were observed at high levels of irradiance,

indicating a photoacclimation. Female gametophytes of *G. domingensis* were tolerant to all tested salinities and presented the highest GR in the salinities of 25 to 40 psu (5. 6 ± 0.15 to 6.0 ± 0.13 %.d^{-1}).. The concentrations of phycobiliproteins (phycoerythrin, phycocyanin and allophycocyanin) did not show significant differences with the salinity variation, however, in chlorophyll *a* at salinity 60 psu (1.61 ± 0.37 μg.g^{-1} FW) was significantly lower than salinity 30 psu (10.08 ± 6.61 μg.g^{-1} FW). In the analysis of total carbohydrates, only ethanolic fraction showed significant differences, where the algae cultivated in salinities 55 and 60 psu showed the highest concentrations of lower molecular mass carbohydrates (LMMC, 4178.60 ± 511.51 and 4863.16 ± 1186.98 μg.g^{-1} FW). These results indicate that female gametophytes of *G. domingensis* are eurihalin, and, in high salinity, they can accumulate higher concentrations of LMMC, since these carbohydrates can act as organic osmolytes, which are responsible for the maintenance of the turgor pressure, avoiding the cell plasmolysis. Our results indicate that ES and SC strains of *G. domingensis* are eurythermic and tolerant to a wide variation of irradiance, and the SC strain is eurihaline, physiological characteristics that can be explained by their occurrence in intertidal regions of the rocky shores, and are exposed to wide variations in temperature, irradiance and salinity.

Key words: *Gracilaria domingensis*, temperature, irradiance, salinity, growth, pigments, proteins

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Histórico de vida de *Gracilaria domingensis* (adaptado de Oliveira e Plastino, 1994). 18

Figura 2. Aspecto geral do talo de *Gracilaria domingensis* (gametófitos femininos). A: Espírito Santo e B: Santa Catarina. Escala: 1 cm. 20

Capítulo 1 - Efeitos da temperatura e irradiância no crescimento, na morfologia e no conteúdo de proteínas e de pigmentos de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) provenientes de Espírito Santo e Santa Catarina

Figura 1. Efeito das temperaturas na taxa de crescimento (%. d-1) de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* do Espirito Santo (ES) e de Santa Catarina (SC) após 28 dias. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). * indica as diferenças significativas entre as linhagens. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$). † algas morreram. 35

Figura 2. Aspecto geral dos segmentos apicais de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* do Espirito Santo (ES) e de Santa Catarina (SC) cultivados em diferentes temperaturas durante 28 dias. Escala=1cm.....36

Figura 3. Efeito das temperaturas na morfologia de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* do Espirito Santo (ES) e de Santa Catarina (SC) após 28 dias. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). * indica as diferenças significativas entre as linhagens. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$). 36

Figura 4. Efeito das temperaturas nas concentrações de proteínas solúveis totais de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* do Espirito Santo (ES) e de Santa Catarina (SC) após 31 dias. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$). 36

Figura 5. Efeito das temperaturas nas concentrações de pigmentos fotossintetizantes de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* do Espirito Santo (ES) e de Santa Catarina (SC) após 31 dias. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls (p<0,05). 38

Figura 7. Aspecto geral dos segmentos apicais de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* do Espirito Santo (ES) e de Santa Catarina (SC) cultivados em diferentes temperaturas durante 28 dias. Escala=1cm.....36

Figura 8. Efeito das irradiâncias nas análises morfológicas de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* do Espirito Santo (ES) e de Santa Catarina (SC) após 28 dias. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). * indica as diferenças significativas de cada tratamento entre os indivíduos. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls (p<0,05). 40

Figura 9. Efeito das temperaturas nas concentrações de proteínas solúveis totais de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* do Espirito Santo (ES) e de Santa Catarina (SC) após 28 dias. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls (p<0,05). 41

Figura 10. Efeito das temperaturas nas concentrações de pigmentos fotossintetizantes de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* do Espirito Santo (ES) e de Santa Catarina (SC) após 28 dias. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls (p<0,05).....42

Capítulo 2 - Efeitos da salinidade no desenvolvimento e no conteúdo de metábolitos primários em *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta)

Figura 1. Efeito da salinidade na taxa de crescimento (%.d-1) de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 6). As letras indicam

tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).....58

Figura 2. Aspecto geral de segmentos apicais de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* cultivados em diferentes salinidades após 28 dias. Escala = 1cm. 59

Figura 3. Efeito da salinidade na análise morfológica de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).....60

Figura 4. Cortes transversais de segmentos apicais de gametófitos femininos *Gracilaria domingensis* cultivados em diferentes salinidades (de 5 a 60 ups) após 28 dias. Escala = 20 µm.....61

Figura 5. Efeito da salinidade na concentração de proteínas solúveis totais de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* após 31 dias. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05). 61

Figura 6. Efeito da salinidade na concentração de pigmentos fotossintetizantes gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* após 31 dias. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05). 62

Figura 7. Efeito da salinidade na concentração dos carboidratos totais de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* após 31 dias. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05). 63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL 15
1.1 Filo Rhodophyta 15
1.2. Gênero Gracilaria *Greville* 16
1.3 Gracilaria domingensis *(Kützing) Sonder ex Dickie e seus estudos* 17
2. OBJETIVOS GERAL E ESPESÍFICO 19
2.1. Objetivos específicos 19
3. MATERIAIS E MÉTODOS 20
3.1. Material estudado 20
3.1.1 Coleta e transporte 20
3.1.2 Cultivo unialgáceo e propagação 21
3.2 Procedimentos gerais de cultivos laboratoriais 21
3.2.1 Esterilização de água do mar 21
3.2.2 Condições laboratoriais 21
4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 22

Capítulo 1 - Efeitos da temperatura e irradiância no crescimento, na morfologia e no conteúdo de proteínas e de pigmentos de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) provenientes de Espírito Santo e Santa Catarina

Resumo 26
Abstract 28
INTRODUÇÃO 30
MATERIAIS E MÉTODOS 31
Material biológico 31
Isolamento e manutenção das culturas unialgáceas 31
Desenho experimental 32
Temperatura 32
Irradiância 32
Variáveis analisadas 33
Taxa de crescimento e morfologia 33
Extração e quantificação de pigmentos fotossintetizantes e proteínas solúveis totais 33
Análises estatísticas 34
RESULTADOS 34
Efeitos da temperatura 34
Taxa de Crescimento 34

Análises Morfológicas 35
Proteínas Solúveis Totais 37
Pigmentos Fotossintetizantes 37
Efeitos dos diferentes níveis de irradiância 38
Taxa de Crescimento 38
Análises Morfológicas 39
Proteínas Solúveis Totais 41
Pigmentos Fotossintetizantes 42
DISCUSSÃO 43
Temperatura 43
Irradiância 45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 47

Capítulo 2 - Efeitos da salinidade no desenvolvimento e no conteúdo de metábolitos primários em *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta)

Resumo 52
Abstract 53
INTRODUÇÃO 54
MATERIAIS E MÉTODOS 55
Material biológico 55
Isolamento e manutenção das culturas unialgáceas 56
Desenho experimental 56
Variáveis analisadas 57
Taxa de crescimento e análises morfológicas 57
Extração e quantificação de pigmentos fotossintetizantes e proteínas solúveis totais 57
Extração e quantificação de carboidratos totais 58
Análise estatística 59
RESULTADOS 59
Taxa de crescimento e análises morfológicas 59
Proteínas Solúveis Totais e Pigmentos Fotossintetizantes 62
Carboidratos Totais 63
DISCUSSÃO 64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 66
CONSIDERAÇÕES FINAIS 69

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Filo Rhodophyta

O Filo Rhodophyta, também conhecido como o grupo das algas vermelhas, possui aproximadamente 6000 espécies, que apresentam uma ampla distribuição pelo mundo, sendo abundantes em águas tropicais e são predominantemente marinhas, com apenas 3% ocorrendo em ambientes de água doce (Graham *et al.* 2009).

Esse grupo apresenta algumas peculiaridades, como a presença de grânulos de amidos das florídeas em seu citoplasma (principal produto de reserva), a ausência de centríolos, que são substituídos por anéis polares (centro de organização de microtúbulos) e a ausência de células flageladas em seu histórico de vida, enquanto os outros filos possuem gametas flagelados, esse filo não apresenta essa característica, precisando exclusivamente do hidrodinâmismo da água para sua produtividade. Essa característica pode ter sido responsável pelo aparecimento de um histórico de vida mais complexo, 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 suprindo assim a falta de estruturas com flagelos (Cole & Sheath, 1990; Raven *et al.* 2007; Graham *et al.* 2009).

Outras características deste filo são os cloroplastos que possuem a 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, sendo que cada um absorve um comprimento de onda específico (Gvindjee & Shevala, 2011). Por essa razão, a coloração verde da clorofila muitas vezes é ocultada, dando a cor vermelha característica deste filo. Esses pigmentos também atuam como reserva de nitrogênio (N), uma vez que na falta de N, a ficoeritrina tende a ser degradada (Bird *et al.* 1982).

Outra característica marcante desse filo é a presença de polissacarídeos sulfadados nas paredes celulares, onde possuem uma 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). Além disso, os ficocolóides possuem uma grande importância econômica, sendo aplicados na indústria alimentícia, farmacêutica e biotecnológica devido a suas propriedades gelificante, estabilizante e emulsificante (Critchley 1993; Renn 1997; Oliveira *et al.* 2000; McHugh 2003).

As algas vermelhas também são utilizadas como fonte de alimento, fornecendo sais minerais essenciais, inúmeras vitaminas e fibras. Algumas espécies de *Pyropia* (citadas como *Porphyra* spp.

chamadas popularmente de Nori) são as mais consumidas no sudeste asiático, e estão muito presentes na culinária japonesa na confecção do sushi e onigiri, gerando um rendimento anual de US $ 1 500 milhões no mercado japonês. Outras duas rodófitas que se destacam como alimento são *Palmaria palmata* (Linnaeus) F.Weber & D.Mohr e *Gracilaria* spp. (Ogonori), sendo consumidas como temperos e em saladas (McHugh 2003; Raven *et al.* 2007).

1.2. Gênero Gracilaria *Greville*

O gênero *Gracilaria* Greville apresenta uma ampla distribuição geográfica e possui mais de 110 espécies descritas (Gurgel & Fredericq 2004). Este gênero está entre os mais cultivados e é considerado uma das principais fontes de ágar (Oliveira & Aveal 1990; Oliveira & Plastino 1994; Critchley 1993; Oliveira *et al.* 2000). Outras são fontes de alimentos ou podem ser utilizadas como matéria-prima na produção de metabolitos secundários para produção de medicamentos e cosméticos (Zemke-White & Ohno 1999; Smit 2004).

O ágar é um polissacarídeo sulfatado presente na parede celular das rodófitas e sua quantidade e qualidade variam com a espécie (Oliveira *et al.* 2000). Algumas espécies do gênero *Gracilaria* são responsáveis por cerca de 50% da produção mundial desse polissacarídeo sulfatado, sendo utilizado como meio de cultura em microbiologia, alimentação, medicina, cosmética, química, biotecnologia, farmácia, têxtil, dentre outras (McHugh 2003).

Diversas espécies de *Gracilaria* vêm sendo cultivadas em diferentes países (Critchley 1993). Em 2000 a América Latina totalizou 33.642 toneladas de produção de *Gracilaria* a partir do cultivo, sendo o Chile o maior produtor (McHugh 2003). O Brasil é um país com uma extensa costa, banhada por águas tropicais e subtropicais, local supostamente propício para o crescimento de algas e com grande riqueza de espécies, principalmente espécies com alto valor económico (Oliveira & Miranda 1998). Porém, a falta de tradição dessa atividade traz uma escassez nas tentativas de cultivos, além disso, a falta do consumo de algas na alimentação humana e a carência de informações sobre a fisiologia das espécies a serem selecionadas potencializam a falta de cultivo e o aumento no extrativismo de espécies de *Gracilaria* para consumo (Camara-Neto 1987; Oliveira 1998; Hayashi *et al.* 2014).

1.3 Gracilaria domingensis *(Kützing) Sonder ex Dickie e seus estudos*

A distribuição de *Gracilaria domingensis* (Kützing) Sonder ex Dickie está localizada na região tropical, caracterizando-a como uma alga de águas tropicais. Há registros de sua ocorrência nas Ilhas Caribenhas, na Região Central (Cuba e Panamá), na América do Sul (Brasil, Colômbia e Venezuela) e no Sudeste Asiático (Indonésia) (Guiry & Guiry, 2017). No Brasil, *G. domingensis* apresenta uma ampla distribuição e é encontrada no Maranhão, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Espirito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, sendo uma das poucas espécies do gênero com ocorrência na região sul do país (Oliveira, 1997; Nunes, 2005; Costa, 2013).

Gracilaria domingensis apresenta grande importância comercial, sendo utilizada na dieta humana (alimento *in natura*) e há registros de exportação esporádica do Brasil para o mercado alimentício japonês (Guimarães & Plastino 1999; Plastino *et al.* 1999). Apresenta um talo achatado com ramificações curtas saindo paralelamente ao longo do talo e porções cilíndricas, com ápices dicotômicos, chegando a medir 26 cm de altura e largura variando de 2-8 mm, de cor enegrecida à amarelada. Plantas femininas apresentam cistocarpos bastante proeminentes (Costa, 2013).

O histórico de vida de *G. domingensis* é do tipo “Polysiphonia” (Figura 1), com alternância de gerações isomórficase e com três fases, sendo uma fase haplóide (gametófito) e duas fases diplóides (tetrasporófito e carposporófico) (Guimarães *et al.* 1999; Plastino *et al.* 1999). Enquanto o gametófito e o tetrasporófito são estágios independentes, o carposporófito se desenvolve sobre o gametófito feminino (Plastino *et al.* 1999).

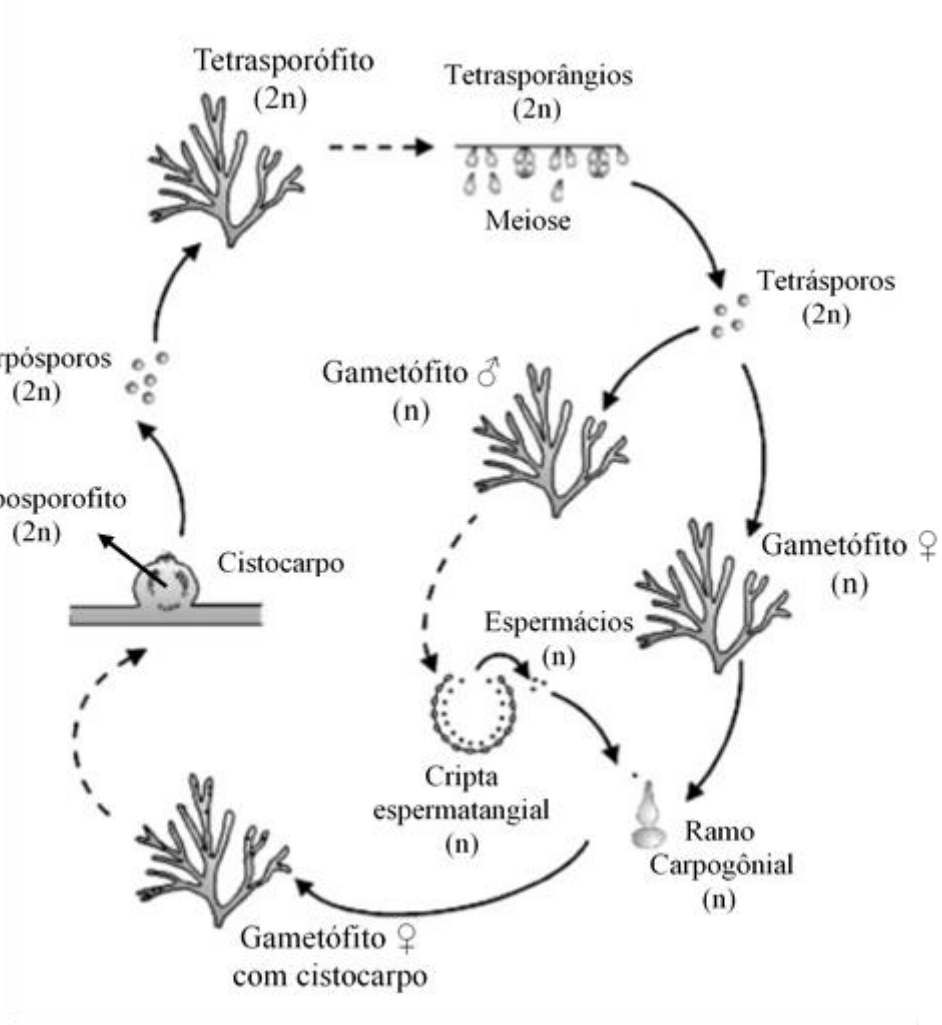

Figura 1. Histórico de vida de *Gracilaria domingensis* (adaptado de Oliveira e Plastino, 1994).

No litoral brasileiro, *Gracilaria domingensis* pode apresentar morfos de cor vermelha (selvagem), verde e marrom. As colorações vermelha, verde e marrom são determinadas por um par de alelos com herança mendeliana de origem nuclear codominantes. Morfos de coloração vermelha e verde são homozigotos e os heterozigotos expressam a coloração marrom apenas na fase tetrasporofítica. (Plastino *et al.* 1999).

Os morfos verdes e vermelhos não apresentam diferenças na morfologia interna, porém morfos verdes possuem menores concentrações de ficoeritina e em populações naturais são encontrados em menor frequência (Guimarães & Plastino 1999; Guimarães *et al.* 2002). Morfos verdes apresentam maiores taxas de fotossíntese, maior síntese de "amonoácidos tipo micosporinas" quando expostas à radiação UV-B em relação a morfos vermelhos (Ferreira 2008). As composições de polissacarídeos são semelhantes em morfos homozigotos, entretanto, morfos vermelhos podem apresentar melhores desempenhos na formação de regeneração comparada com os morfos verdes

quando estimulados por fitorreguladores sob altos níveis de irradiância (Guimarães *et al.* 2007; Ramlov, 2007).

O polissacarídeo sulfatado derivado de *G. domingensis* apresenta atividades biológicas importantes como atividade antitumural, e pode ser utilizado em cosméticos. Extrato desta espécie pode ser utilizado como matéria prima para produção de biodisel e biofertilizantes, e a espécie pode ser bioindicadora da degradação dos ecossistemas marinhos por metais pesados (Fernandéz *et al.* 1989; Cardozo, 2007; Rebouças, 2013; Mendes *et al.* 2013).

O cultivo de *Gracilaria domingensis* no Brasil foi realizado nos litorais dos estados da Bahia (Accioly 2004) e de Santa Catarina (Yoshimura 2006, Salles *et al.* 2010), apresentando boas perspectivas econômicas. Salles *et al.* (2010) destacaram a susceptibilidade da espécie à herbivoria, sendo este um dos principais entraves para uma produção estável. O crescimento de *G. domingensis* também foi avaliado em viveiros de camarão, onde a espécie apresentou baixas taxas de crescimento nas estações chuvosa e seca, apresentando correlação negativa com a quantidade de amônio, ortofasfato e transparência da água nos locais de cultivo (Pereira *et al.* 2007).

Apesar dos vários estudos realizados com *G. domingensis*, pouco se conhece sobre os limites de tolerância a variações de fatores ambientais e os seus efeitos sobre o crescimento, metabólitos primários e morfologia da espécie, além de comparações das respostas fisiológicas de indivíduos provenientes de diferentes regiões do Brasil.

2. OBJETIVOS GERAL E ESPESÍFICO

O objetivo geral do presente trabalho foi determinar os limites de tolerância e avaliar os efeitos de fatores ambientais no crescimento, nas respostas bioquímicas e morfológicas de *Gracilaria domingensis* (Kützing) Sonder ex Dickie em laboratório.

2.1. Objetivos específicos

a) Comparar os efeitos da variação de temperatura e irradiância no crescimento, na morfologia, e no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes e de proteínas solúveis totais em gametófitos femininos coletados em duas regiões do litoral brasileiro (Capítulo 1);

b) Avaliar os efeitos da variação da salinidade no crescimento, na morfologia, e no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes, de proteínas solúveis totais e de carboidratos totais em gametófitos femininos adultos cultivados em laboratório (Capítulo 2).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material estudado

Foram utilizados gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* coletados na Praia de Parati, Anchieta, ES (20º48'52" S e 40º38'18" W) no dia 09/09/2014, pela Dra. Mutue Toyota Fujii (Instituto de Botânica, SP), e na Praia de Lagoinha, Florianópolis, SC (27º23'20" S e 48º25'20" W) no dia 14/10/2008 pela Dra. Fernanda Ramlov (Universidade Federal de Santa Catarina). Alguns exemplares de cada população foram depositados no Herbário SP, Instituto de Botânica, São Paulo, com os números SP 428.787 (Espírito Santo) e SP 400.837 (Santa Catarina).

Os táxons estudados receberam confirmação taxonômica com base em análises moleculares.

Figura 2. Aspecto geral do talo de *Gracilaria domingensis* (gametófitos femininos). A: Espírito Santo e B: Santa Catarina. Escala: 1 cm.

3.1.1 Coleta e transporte

As algas foram coletadas em período de maré baixa, com auxílio de espátulas, acondicionadas em frascos de plásticos contendo água do mar e mantidas em caixa térmica com gelo durante o transporte até o Laboratório de Cultura de Algas e Cianobactérias "Marilza Cordeiro Marino" do Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica de São Paulo.

3.1.2 Cultivo unialgáceo e propagação

As culturas unialgáceas de *G. domingensis* foram estabelecidas a partir da propagação de segmentos apicais de gametófitos femininos coletados em SC e no ES, formando clones que serão designados de linhagem SC e linhagem ES, respectivamente. Semanalmente, os segmentos apicais foram limpos com papel absorvente e lavados com água do mar esterilizada, cultivados em meio de cultura composto por água do mar esterilizada enriquecida com solução de von Stosch (VSES/2), preparado segundo Oliveira *et al.* (1995) e modificado por Yokoya (2000), e adição de 1 $ml.L^{-1}$ de dióxido de germânio (GeO_2). Durante esse período de isolamento, foram usados frascos de vidros com aproximadamente 50 ml de meio de cultura. Após a obtenção de uma cultura unialgácea, foi realizada a propagação dos espécimes para a produção de biomassa necessária para os experimentos de temperatura, irrâdiancia e salinidade. O talo foi seccionado em duas regiões (segmento apical e segmento intercalar) para a regeneração de novos ápices. Em todos os experimentos, foram utilizados segmentos apicais que foram submetidos a um pré-tratamento com frascos de vidros contendo 90 ml de meio VSES/2.

3.2 Procedimentos gerais de cultivos laboratoriais

3.2.1 Esterilização de água do mar

A água do mar utilizada no presente estudo foi coletada na Base Norte do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, na Praia do Lamberto, Ubatuba (SP). A água do mar foi filtrada em pré-filtro AP 20 (Millipore) e aquecida em banho-maria durante 1 hora após o início da fervura, e este processo foi realizado duas vezes. Para a realização de cada experimento, um único lote de água do mar foi utilizado para a padronização da composição química da água.

3.2.2 Condições laboratoriais

Toda a vidraria utilizada para a obtenção de culturas unialgáceas, propagação, aclimatação e experimentos foi esterilizada a 121°C por meia hora e os demais instrumentos foram esterilizados em álcool 70% e flambados. As culturas foram mantidas em temperatura média de 23 ± 3 ºC, fotoperíodo de 14 h, salinidade 34 ups, pH 8,0, densidade de fluxo fotônico de 75 a 90 μmol de fótons m^{-2} s^{-1}, provenientes de duas lâmpadas fluorescentes de 40 W do tipo “luz do dia” dispostas horizontalmente acima dos frascos de cultura. As trocas do meio de cultura VSES/2 foram realizadas semanalmente, juntamente com os frascos.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Accioly, M.C. 2004. Desenvolvimento da maricultura artesanal de macroalgas no baixo-sul baiano. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 164p.

Bird, K. T., Habig, C., Debusk, T. 1982. Nitrogen allocation and storage patterns in *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta). Journal. Phycology 18:344-348.

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

Cardozo, K.H.M. 2007. Estudos de compostos fotoprotetores da radiação ultravioleta em algas: aminoácidos tipo micosporinas (MAAs). Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 173p.

Cole, K.M & Sheath, R.G. 1990. Biology of the red algae. 1ª ed. Cambridge university press. Cambrigde.

Costa, E. S. 2013 Algas Gracilarióides (Gracilariaceae, Rhodophyta) na costa brasileira: uma abordagem morfológica e molecular. Tese de doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

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

Fernández, L.E., Valiente, O.G., Mainardi, V., Bello, J.L., Vélez, H. & Rosado, A. 1989. Isolation and characterization of antitumor active agar-type polysaccharide of *Gracilaria domingensis.* Carboydrate Research 190: 77-83.

Ferreira, L.B. 2008 Diversidade intraespecífica em *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta): estudos fisiológicos na interpretação do polimorfismo de cor. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo. 200p.

Guimarães, M. & Plastino, E.M. 1999. Plastid organization of color variants of the red macroalga *Gracilaria domingensis* (Gracilariales). Acta Microscopica 8: 795-796.

Guimarães, M., Plastino, E.M. & Destombe, C. 2002. Green mutant frequency in natural populations of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. Europen Journal of Phycolgy 38: 165-169.

Guimarães, M., Plastino, E.M. & Oliveira, E.C. 1999. Life history, reproduction and growth of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. Botanica Marina 42:481-486.

Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2017. AlgaeBase. Worldwide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: http://www.algaebase.org (último acesso em 11 abril 2017).

Gurgel, C.F.D. & Fredericq, S. 2004. Systematics of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta): a critical assessment based on rbcL sequence analysis. Journal of Phycology 40:138–59.

Gvindjee & Shevala, D. 2011. Adventures with cyanobacteria: a personal perspective. Frontiers in Plant Science. 2(28):1-17.

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

McHugh, D. J. 2003. A guide to seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper nº 441. Rome. 105p.

Mendes, L.F, Zambotti-Villela, L., Colepicolo, P., Marinho-Soriano, E., Cassius Vinicius Stevani, C.V. & Yokoya, N.S. 2013. Metal cation toxicity in the alga *Gracilaria domingensis* as evaluated by the daily growth rates in synthetic seawater. Journal of Applied Phycology. 10.1007/s10811-013-0036.

Nunes, J.M.C. 2005. Rodofíceas marinhas bentônicas do estado da Bahia, Brasil. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 410p.

Oliveira, E. C. 1998. The seaweed resources of Brazil. In: Critcheley, A. T.; Ohno, M., Seaweed resources of the world. JICA. 366-371.

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

Oliveira, E.C. & Miranda, G.E.C. 1998. Aspectos sociais e econômicos da explotação de algas marinhas no Brasil. Anais IV Congr Latino-amer, II Reunião Iberoamericana e VII Reunião Brasileira de Ficologia 2:149-156.

Oliveira, E.C. & Plastino, E.M. 1994. Gracilariaceae. In: I. Akatsuka (ed.) Biology economic algae. SPB Academic Publishing, The Hauge, pp. 185-226.

Oliveira, E.C. 1997. Macroalgas marinhas de valor comercial: técnicas de cultivo. Panorama da Aqüicultura 7: 42-45.

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

Pereira, D., Cardozo, K.H.M., Colepicolo, P. & Marinho-Soriano, E. 2007. Efeito dos parâmetros ambientais sobre o conteúdo de pigmentos da macroalga *Gracilaria domingensis* cultivada em viveiros de camarão. In: S. Rosso (ed.). VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambú, PP. 1-2.

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.

Ramlov, F. 2007. Efeitos dos fitorreguladores e da irradiância no crescimento e na morfogênese de morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* (Kützing) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta). Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo, 113p.

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.

Rebouças, R.F.C. 2013. Estudo do Teor de Lipídios e Avaliação dos resíduos das Algas Marinhas: *Gracilaria caudata, Gracilaria birdiae, Gracilaria domingensis* para preparação de Biodiesel e Biofertilizante. Dissertação de mestrado, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. 78p.

Renn, D. 1997. Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry: status, needs and prospects. Trends Biotechnol. 15: 9-14.

Salles, J.P., Scherner, F., Yoshimura, C.Y., Fanganiell, M., Bouzon, Z.L. & Horta, P.A. 2010. Cultivation of Native Seaweed *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta) in Southern Brazil. Brazilian Archives of Biology and Technology 53: 633-640.

Smit, A.J. 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. Journal of Applied Phycology 16: 245-262.

Usov, A.I. 2011. Polysaccharides of the red algae. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 65:115–217.

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.

Yoshimura, C.Y. 2006. Avaliação do potencial de cultivo e produção de ágar de *Gracilaria domingensis* e de *Gracilaria caudata* (Rhodophyta, Gracilariales) na Enseada de Armação do Itapocoroy (Penha, Santa Catarina). Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 163p.

Zemke-White, W.L. & Ohno, M. 1999. World seaweed utilization: an end-of-century summary. Journal of Applied Phycology 11: 369-376.

CAPÍTULO 1

Efeitos da temperatura e irradiância no crescimento, na morfologia e no conteúdo de proteínas e de pigmentos de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) provenientes de Espírito Santo e Santa Catarina

Resumo

O gênero *Gracilaria* Greville apresenta ampla distribuição geográfica e é considerado uma das principais fontes de ágar. *Gracilaria domingensis* (Kützing) Sonder ex Dickie pode ser utilizada na alimentação humana (alimento *in natura*) e há registros de sua exportação para o mercado japonês. Fatores como a temperatura e a luz são fundamentais para o crescimento, reprodução e distribuição das algas marinhas bentônicas. Os objetivos do presente trabalho foram determinar os limites de tolerância a variações de temperatura e irradiância e avaliar comparativamente os seus efeitos no crescimento, na morfologia e nos conteúdos de proteínas solúveis totais e de pigmentos em duas linhagens de *G. domingensis* provenientes das regiões sudeste e sul do Brasil (Espírito Santo (linhagem ES) e de Santa Catarina (linhagem SC)). Foram testadas variações de temperaturas (de 15 a 35°C) e de irradiância (20 a 250 μmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}) em gametófitos femininos das linhagens ES e SC. As duas linhagens toleraram a variação de temperatura de 15 a 30ºC, mas morreram quando cultivadas a 35ºC. A linhagem ES apresentou as maiores TC (de 3,06 ± 0,35 a 6,08 ± 0,20 %.d^{-1}) em relação a linhagem SC (de 1,28 ± 0,48 a 4,13 ± 0,31 %.d^{-1}), mas as duas linhagens apresentaram as maiores TC na temperatura de 25ºC. A formação de ramos de 1ª ordem e de 2ª ordem foi maior e menor nas temperaturas de 25ºC e 30ºC, respectivamente, nas duas linhagens, sendo que linhagem ES se destacou na quantidade de ramos de 1ª ordem, enquanto a de SC destacou-se na quantidade de ramos de 2º ordem. A linhagem ES apresentou maior concentração de proteínas solúveis totais (1907,41 ± 48,88 μg/g MF) em baixa temperatura (15ºC) enquanto a linhagem SC apresentou maiores concentrações de proteínas (2284,39 ± 376,07 e 2785,04 ± 796,23 μg/g MF) em temperaturas altas (25 e 30ºC). Além disso, a concentração de clorofila *a* da linhagem ES foi maior na temperatura de 20ºC e menor na temperatura de 30ºC. A variação na irradiância influenciou a taxa de crescimento das duas linhagens (de 2,67 ± 0,12 a 6,04 ± 0,17 %.d^{-1}), sendo que as menores taxas de crescimento foram observadas na irradiância de 20 μmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} e as maiores taxas de crescimento foram observadas em

irradiâncias maiores do que 40 a 60 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} para as linhagens SC e ES, respectivamente. As linhagens de *G. domingensis* estudadas apresentaram maiores concentrações de proteínas solúveis totais (1431,00 ± 361,18 a 14533,18 ± 791,60 µg/g MF) em baixas irradiâncias (20, 40 e 80 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}) do que em altas irradiâncias. As maiores concentrações de ficoeritrina (422,99 ± 41,38 µg/g MF) e de ficocianina (215,31 ± 26,20 µg/g MF) foram observadas na linhagem ES cultivada em baixa irradiância (40 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}) e os menores valores foram observados em altos níveis de irradiância. A concentração de clorofila *a* das duas linhagens diminuiu com o aumento da irradiância, indicando uma fotoaclimatação. Os resultados obtidos indicam que as linhagens ES e SC de *G. domingensis* são euritérmicas e tolerantes a ampla variação de irradiância, o que pode ser explicado pela sua ocorrência em regiões entre-marés dos costões rochosos, ficando exposta a altos níveis de irradiância e de temperatura. Entretanto, as baixas irradiâncias de saturação para o crescimento destas linhagens indicam que *G. domingensis* é uma espécie adaptada a ambientes com baixos níveis de irradiância.

Palavras-chaves: *Gracilaria domingensis*, temperatura, irradiância, crescimento, pigmentos, proteínas

Abstract

The genus *Gracilaria* Greville shows a wide geographical distribution and is considered one of the main sources of agar. *Gracilaria domingensis* (Kützing) Sonder ex Dickie can be used in human food (*in natura* food) and there are records of its export to the Japanese market. Factors such as temperature and light are fundamental for the growth, reproduction, and distribution of benthic seaweed. The objectives of the present work were to determine the limits of tolerance to variations in temperature and irradiance and to evaluate comparatively their effects on the growth, morphology and content of total soluble proteins and pigments in two strains of *G. domingensis* from the southeast and Southern Brazil (Espírito Santo (line ES) and Santa Catarina (line SC)). Variations in temperature (from 15 to 35ºC) and irradiance (20 to 250 μmol of photons.m^{-2}.s^{-1}) were tested in female gametophytes of the ES and SC strains. Both strains tolerated the temperature variation from 15 to 30ºC, but died when grown at 35ºC. The ES line presented the highest TC (from 3.06 ± 0.35 to 6.08 ± 0.20% .d-1) in relation to the SC lineage (from 1.28 ± 0.48 to 4.13 ± 0 , 31% .d-1), but the two strains had the highest TC at 25ºC. The first and second order branches were higher and lower in the temperatures of 25 and 30ºC, respectively, in the two strains, and ES lineage was highlighted in the number of 1st order branches, while SC was highlighted in Quantity of 2nd order branches. The ES lineage had the highest concentration of total soluble proteins (1907,41 ± 48,88 μg / g FW) at low temperature (15ºC) while the SC line presented higher protein concentrations (2284,39 ± 376,07 and 2785,04 ± 796.23 μg / g FW) at high temperatures (25 and 30ºC). In addition, the chlorophyll a concentration of the ES lineage was higher at the temperature of 20ºC and lower at the temperature of 30ºC. The variation in irradiance influenced the growth rate of the two strains (from 2.67 ± 0.12 to 6.04 ± 0.17% .d-1), and the lowest growth rates were observed at irradiance of 20 μmol of photons.m^{-2}.s^{-1} and the highest growth rates were observed at irradiances greater than 40 to 60 μmol of photons.m^{-2}.s^{-1} for the lines SC and ES, respectively. The studied strains of *G. domingensis* showed higher concentrations of total soluble proteins (1431,00 ± 361,18 to 14533,18 ± 791,60 μg/g FW) at low irradiances (20, 40 and 80 μmol of photons.m^{-2}.s^{-1}) than at high irradiances. The highest concentrations of phycoerythrin (422.99 ± 41.38 μg/g FW) and phycocyanin (215.31 ± 26.20 μg/g FW) were observed in the ES lineage grown at low irradiance (40 μmol of photons.m^{-2}.s^{-1}) and the lowest values were observed at high levels of irradiance. The chlorophyll *a* concentration of the two strains decreased with increasing irradiance, indicating a photoaclimation. The results obtained indicate that ES and SC strains of *G. domingensis* are eurythermic and tolerant to a wide range of irradiance, which can be explained by their occurrence in inter-tidal regions of the rocky shores, being exposed to high levels of irradiance and temperature.

However, the low saturation irradiance for the growth of these strains indicates that *G. domingensis* is a species adapted to environments with low levels of irradiance.

Key words: *Gracilaria domingensis*, temperature, irradiance, growth, pigments, proteins

INTRODUÇÃO

O gênero *Gracilaria* Greville é conhecido pela sua ampla distribuição geográfica e está entre os mais cultivados do mundo (Oliveira e Plastino, 1994). É considerado uma das principais fontes de ágar, sendo o Chile e a Indonésia os principais países produtores (Oliveira & Plastino 1994; Bixler e Porse 2011; Hayashi *et al*. 2014). Algumas espécies do gênero são fontes de alimentos ou podem ser utilizadas como matéria-prima na produção de metabolitos secundários para produção de medicamentos e cosméticos (Zemke-White & Ohno 1999; Smit 2004).

A espécie *Gracilaria domingensis* (Kützing) Sonder ex Dickie é encontrada principalmente nas regiões tropical e subtropical e apresenta uma ampla distribuição no litoral brasileiro, sendo uma das poucas espécies do gênero com ocorrência na região sul do país (Oliveira, 1997; Nunes, 2005; Costa, 2013; Guiry & Guiry, 2017). Sua importância comercial se dá na utilização na dieta humana (alimento *in natura*) e existem registros de sua exportação esporádica do Brasil para o mercado Japão (Guimarães & Plastino 1999; Plastino *et al.*, 1999).

A temperatura e a luz são fatores fundamentais para o crescimento e produtividade das algas marinhas bentônicas (Oliveira 1997). A temperatura é um fator limitante para o crescimento e distribuição geográfica das espécies de macroalgas (Lobban & Harrison 1994). A temperatura do mar varia de -1,9ºC a um máximo de 42ºC em regiões semi-isoladas como Mar Vermelho e o Golfo Pérsico. Em poças-de-marés e em algumas regiões vulcânicas, a temperatura pode chegar a extremos 50ºC (Crespo Pereira & Soares-Gomes, 2002). Yokoya & Oliveira (1992) observaram que *G. cornea* J. Agardh e *G. caudata* J. Agardh coletadas no Brasil apresentaram ótimos de crescimento nas temperaturas de 26 e 30°C, diferentemente de *G. chilensis* C.J.Bird, McLachlan & E.C.Oliveira e *G. verrucosa* (Hudson) Papenfuss provenientes do Chile e Argentina, respectivamente, que tiveram seus crescimentos ótimos a 22°C. Para variantes de coloração vermelha de *G. birdiae* E.M.Plastino & E.C.Oliveira coletados nos estados do Ceará e do Espírito Santo, o morfo proveniente do Ceará apresentou maior crescimento em 32,7°C quando comparada à coletada no Espírito Santo. No entanto, em baixa temperatura, a situação foi inversa, sugerindo uma possível diferenciação ecotípica (Ursi, 2005).

A luz afeta a fotossíntese e, por consequência, o crescimento e o conteúdo pigmentar das algas marinhas bentônicas (Lobban & Harrison 1994). As algas se distinguem pelos seus pigmentos acessórios, sendo esses, importantes para captação de luz em diferentes comprimentos de onda, como em algas vermelhas, que apresentam clorofila *a*, carotenóides e ficobiliproteínas (Gantt 1990; Lüning 1990; Lobban e Harrison 1994). As espécies de *Gracilaria* estão distribuídas em uma ampla variedade

de habitats, ocorrendo desde águas oceânicas até estuários (Ursi, 2005; Nunes 2005). As taxas de crescimento dos morfos de cor de *G. birdiae* provenientes de populações do Ceará e do Espírito Santo foram diferenciadas quando cultivados em irradiâncias de 100 e 200 μmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (Ursi, 2005). Plântulas originadas da germinação de carpósporos e tetrasporófitos adultos de *G. domingensis* tiverem taxas de crescimento superiores quando submetidas a irradiância de 100 μmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, além disso, os tetrasporófitos adultos submetidos a irradiâncias altas acumularam de carotenóides, enquanto na irradiância de 50 μmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} apresentaram maior conteúdo de ficobiliproteínas (Ramlov *et al.* 2012).

Fatores como temperatura e luz são primordiais para o desenvolvimento das algas marinhas bentônicas, porém uma espécie que ocorre por quase toda costa brasileira pode apresentar populações com respostas fisiológicas distintas. Os objetivos do presente trabalho foram determinar os limites de tolerância a variações de temperatura e irradiância, e avaliar comparativamente os seus efeitos na taxa de crescimento (TC), na morfologia e nos conteúdos de proteínas solúveis totais e de pigmentos em gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* provenientes de duas regiões distintas do litoral brasileiro (Espírito Santo e Santa Catarina).

MATERIAIS E MÉTODOS

Material biológico

Gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* foram coletados na Praia de Parati, Anchieta, Espírito Santo, Brasil (20º48’31” S e 40º36’39” W) no dia 09/09/2014 e na Praia da Lagoinha, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil (27º23’21” S e 48º25’29” W) no dia 14/10/2008. Espécimes coletados nas duas regiões foram depositados no Herbário SP, Instituto de Botânica, São Paulo, recebendo os números SP 428.787 (Espírito Santo) e SP 400.837 (Santa Catarina).

Isolamento e manutenção das culturas unialgáceas

As culturas unialgáceas de *G. domingensis* foram estabelecidas a partir da propagação de segmentos apicais de gametófitos femininos coletados em SC e no ES, formando clones que serão designados de linhagem SC e linhagem ES, respectivamente.

As algas foram cultivadas em meio de cultura composto por água do mar esterilizada enriquecida com 50% da solução de nutrientes de von Stosch preparada segundo Oliveira *et al.* (1995)

e modificada segundo Yokoya (2000). As culturas foram mantidas na sala de cultivo do Laboratório "Marilza Cordeiro-Marino" do Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica, nas seguintes condições: temperatura de 23 ± 3 ºC, fotoperíodo de 14h, salinidade 34 ups, pH 8,0, densidade de fluxo fotônico de 75 a 90 μmol de fótons m^{-2} s^{-1}, provenientes de duas lâmpadas fluorescentes de 40 W do tipo "luz do dia" dispostas horizontalmente acima dos frascos de cultura.

Desenho experimental

Temperatura

O experimento com diferentes temperaturas foi realizado em estufas incubadoras (Eletrolab e Fanem). Foram testadas cinco temperaturas (15, 20, 25, 30 e 35°C) e cada tratamento foi testado com três repetições simultâneas para as linhagens de Espirito Santo (ES) e de Santa Catarina (SC). Cada repetição constou de seis segmentos apicais (1cm de comprimento). Esses segmentos apicais foram cultivados em frascos de vidros contendo 90 ml de meio von Stosch 50%.

Foi realizado um pré-tratamento onde as algas foram cultivadas nas mesmas condições experimentais em uma temperatura de 23 ± 3ºC por uma semana antes de serem submetidas a diferentes temperaturas. As demais condições experimentais foram as mesmas descritas para a manutenção das culturas unialgáceas e foi utilizado o mesmo lote de água do mar durante todo o período experimental (28 dias). Ao final do experimento, foi realizada a troca de meio de cultura e, após 3 dias, as algas foram pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20ºC até a realização das análises bioquímicas.

Irradiância

O experimento de irradiância foi realizado na sala de cultivo e foram testados 8 níveis de irradiância (20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 e 250 μmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}) que foram mensuradas com um sensor subaquático esférico submerso na água (modelo LI 193SA, marca LI-COR), conectado a um medidor de quanta (modelo LI-250, marca LI-COR). Cada tratamento foi testado com três repetições simultâneas para as linhagens de Espirito Santo (ES) e de Santa Catarina (SC). Cada repetição constou de seis segmentos apicais (1cm de comprimento). Esses segmentos apicais foram cultivados em frascos de vidros contendo 90 ml de meio von Stosch 50%.

Foi realizado um pré-tratamento onde as algas foram cultivadas nas mesmas condições experimentais em uma irradiância de de 75 a 90 μmol de fótons m^{-2} s^{-1} por uma semana antes de serem submetidas aos diferentes níveis de irradiância. As demais condições experimentais foram as mesmas descritas para a manutenção das culturas unialgáceas e foi utilizado o mesmo lote de água do mar durante todo o período experimental (28 dias). Ao final do experimento, foi realizada a troca de meio de cultura e, após 3 dias, as algas foram pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20oC até a realização das análises bioquímicas.

Variáveis analisadas

Taxa de crescimento e morfologia

O crescimento foi avaliado por medidas semanais de massa fresca, mensuradas com o auxílio de uma balança analítica. Os dados de massa fresca foram utilizados para cálculo das taxas de crescimento segundo a fórmula de Young (2013):

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

(TC = taxa de crescimento, Mt= massa final, Mi= massa inicial e t= período experimental).

No fim do experimento, os segmentos apicais de cada tratamento foram fotografados com o auxílio de uma câmera fotográfica digital e foram analisados o comprimento do eixo principal, o número de ramos laterais (1ª e 2ª ordem) e o comprimento de ramos laterais de 1ª ordem com o auxílio do software Axiovision v. 3.1 (Carl Zeiss).

Extração e quantificação de pigmentos fotossintetizantes e proteínas solúveis totais

A extração dos pigmentos e de proteínas solúveis totais foram realizadas com a biomassa de 80 mg (massa fresca) de cada amostra. O material foi triturado em nitrogênio líquido em Eppendorfs com o auxílio do pistilo e suspenso em 1mL de tampão fosfato 50 mM, pH 5,5 e temperatura de 4°C.

A solução foi centrifugada por 20 minutos (14.000 rpm a 4°C) e após a centrifugação foi coletado 200μL do sobrenadante e reservado para a determinação de proteínas solúveis totais. O restante do sobrenadante, contendo as ficobiliproteínas, foi retirado e mantido no escuro até a leitura em espectrofotômetro (Shimadzu – UV 1800; λ= 498,5, 615 e 651 nm). O sedimento foi ressuspendido em 1mL de acetona 90%, até a obtenção de um homogeneizado. A solução foi centrifugada (10.000

rpm a 4°C) durante 15 minutos, e o sobrenadante, contendo a clorofila a, foi retirado e mantido no escuro até a leitura em espectrofotômetro (λ = 630, 647 e 664 nm). A determinação da concentração das ficobiliproteínas (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina) foi baseada em Kursar *et al.* (1983) e a concentração de clorofila a, em Jeffrey e Humphey (1975).

A concentração das proteínas solúveis totais foi determinada por espectrofotometria UV-vis (Shimadzu – UV 1800; λ= 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 e os resultados foram expressos em mg de proteína por g^{-1} de massa fresca ($mg.g^{-1}$ MF).

Análises estatísticas

Os valores de taxas de crescimento, morfologia, conteúdo de pigmentos e de proteínas solúveis totais foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de dois fatores seguido do teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls. Nos gráficos, as diferenças significativas foram representadas por letras maiúsculas em cima das barras ($p<0,05$). Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa Statistica (versão 8.0).

RESULTADOS

Efeitos da temperatura

Taxa de Crescimento

Os gametófitos femininos adultos de *Gracilaria domingensis* provenientes do Espírito Santo (linhagem ES) e de Santa Catarina (linhagem SC) foram tolerantes a variações de temperaturas de 15 a 30ºC (Fig. 1). Ambas não toleraram a temperatura de 35ºC, e a linhagem ES sobreviveu até o 3º dia e a linhagem SC sobreviveu até o 5º dia após o início do experimento.

As duas linhagens apresentaram diferenças significativas ($F = 9,83$ $p = 0,0006$) na taxa de crescimento (TC) nas temperaturas testadas (15 a 30ºC). A linhagem ES apresentou as maiores TC (de $3,06 \pm 0,35$ a $6,08 \pm 0,20$ $\%.d^{-1}$) em relação a linhagem SC (de $1,28 \pm 0,48$ a $4,13 \pm 0,31$ $\%.d^{-1}$), mas as duas linhagens apresentaram as maiores TC na temperatura de 25ºC (Fig. 1).

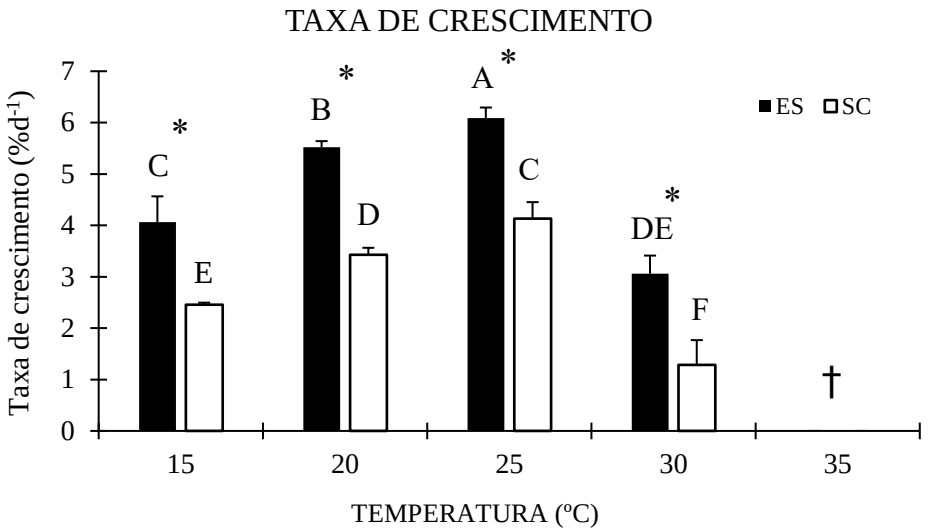

Figura 1. Efeito das temperaturas na taxa de crescimento (%. d^{-1}) de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* do Espirito Santo (ES) e de Santa Catarina (SC) após 28 dias. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). * indica as diferenças significativas entre as linhagens. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$). † algas morreram.

Análises Morfológicas

As linhagens ES e SC não apresentaram diferenças em suas colorações ao longo do período experimental (Fig. 2).

O comprimento do eixo principal variou de 1,68 ± 0,15 a 4,29 ± 0,13 cm nas linhagens estudadas (Fig. 2). A linhagem ES apresentou maiores comprimentos do eixo ($F = 0,17$ $p = 0,9117$) principal do que a linhagem SC, mas ambas apresentaram respostas similares com o maior e menor valores na temperatura de 25ºC e 30ºC, respectivamente (Fig. 3). O mesmo padrão foi observado com os dados de comprimento dos ramos de 1ª ordem ($F = 0,03$ $p = 0,9900$), que variaram de 0,13 ± 0,07 a 1,57 ± 0,75 cm, entretanto esses resultados não evidenciaram diferenças entre as linhagens. Os números de ramos de 1ª ordem (2 ± 0,57 a 15 ± 2,51 ramos) ($F = 0,61$ $p = 0,6195$) e 2ª ordem (0 a 13 ± 1 ramos) ($F= 0,95$ $p = 0,4378$) foram maiores e menores nas temperaturas de 25ºC e 30ºC, respectivamente, nas duas linhagens. A linhagem ES apresentou maior formação de ramos de 1ª ordem e a linhagem SC apresentou maior formação de ramos de 2ª ordem (Fig. 3).

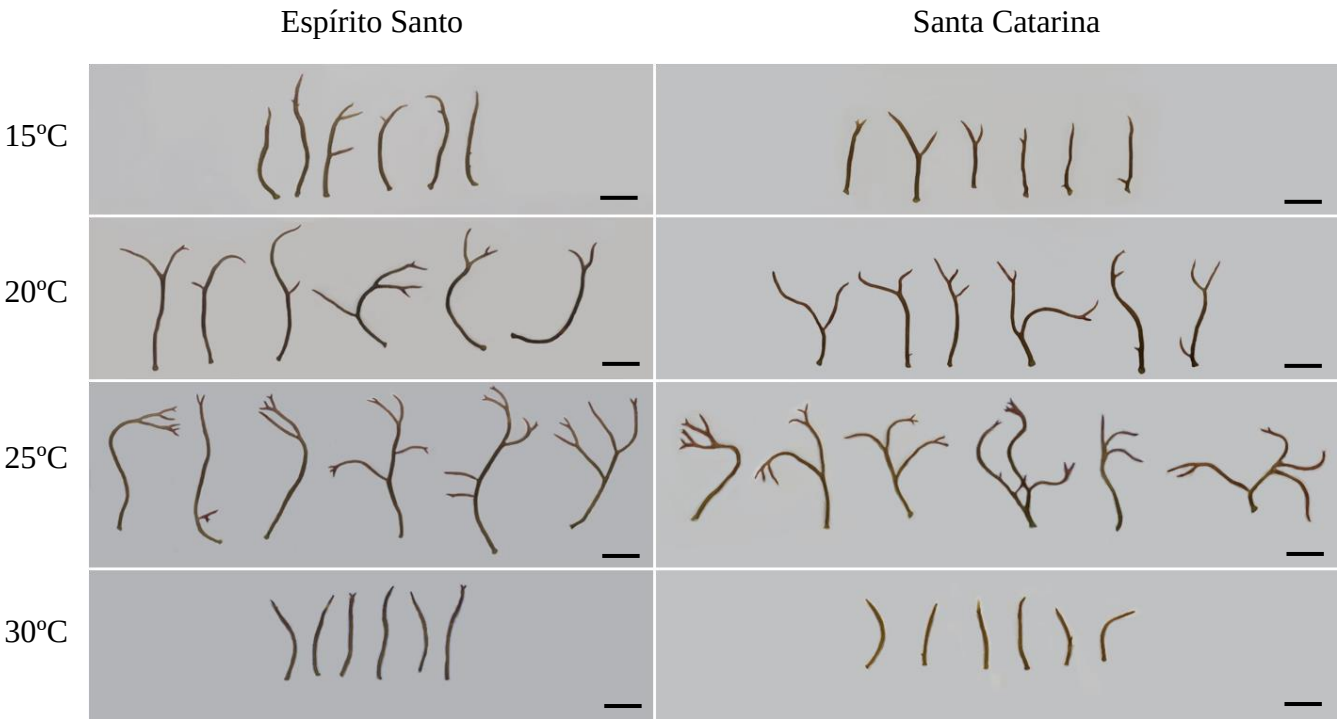

Figura 2. Aspecto geral dos segmentos apicais de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* do Espirito Santo (ES) e de Santa Catarina (SC) cultivados em diferentes temperaturas durante 28 dias. Escala= 1cm.

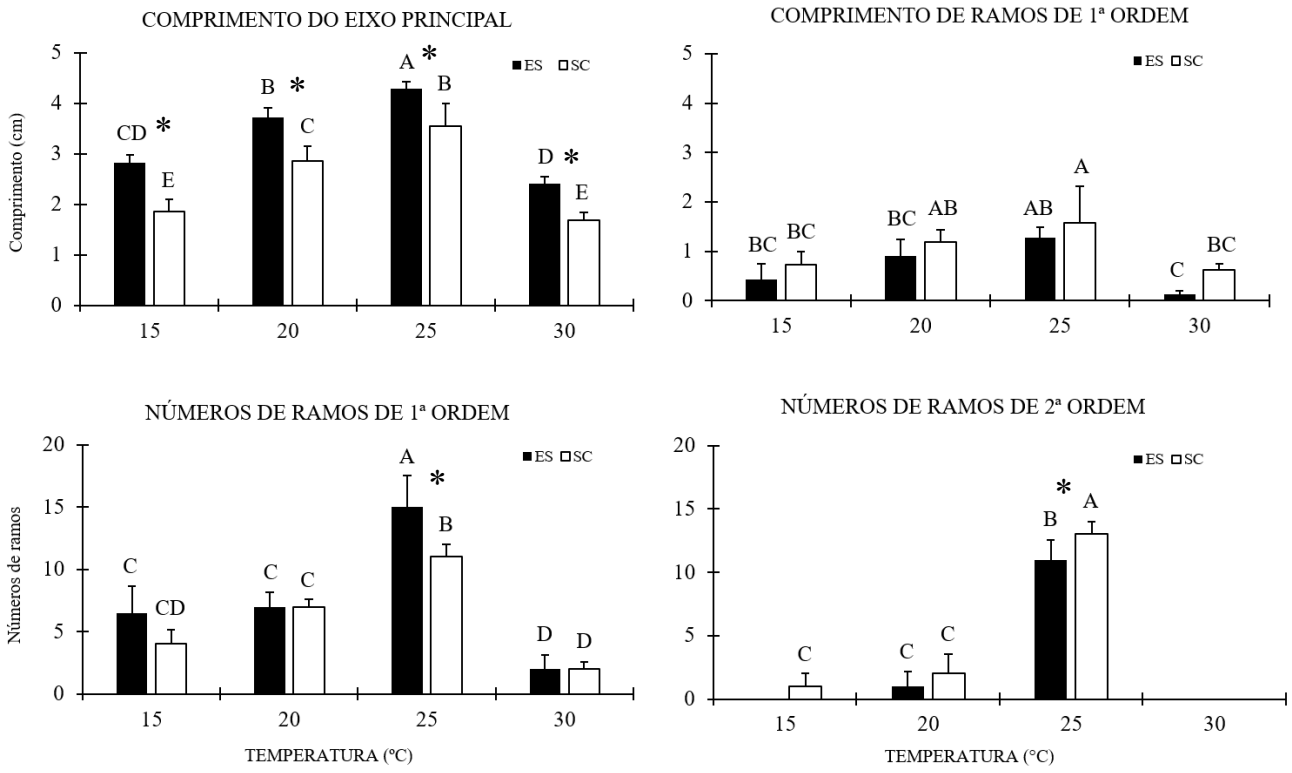

Figura 3. Efeito das temperaturas na morfologia de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* do Espirito Santo (ES) e de Santa Catarina (SC) após 28 dias. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). * indica as diferenças significativas entre as linhagens. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).

Proteínas Solúveis Totais

A concentração de proteínas solúveis (F= 43,51 p= 0,0000) totais variou significativamente entre as linhagens ES e SC cultivadas nas temperaturas de 15, 25 e 30ºC (0,87 ± 0,12 a 2,78 ± 0,79 mg.g^{-1} MF). Na temperatura de 15ºC a linhagem ES apresentou maior concentração comparada com a linhagem SC e nas temperaturas de 25 e 30ºC a linhagem SC apresentou maiores concentrações de proteínas em relação a de ES (Fig. 4).

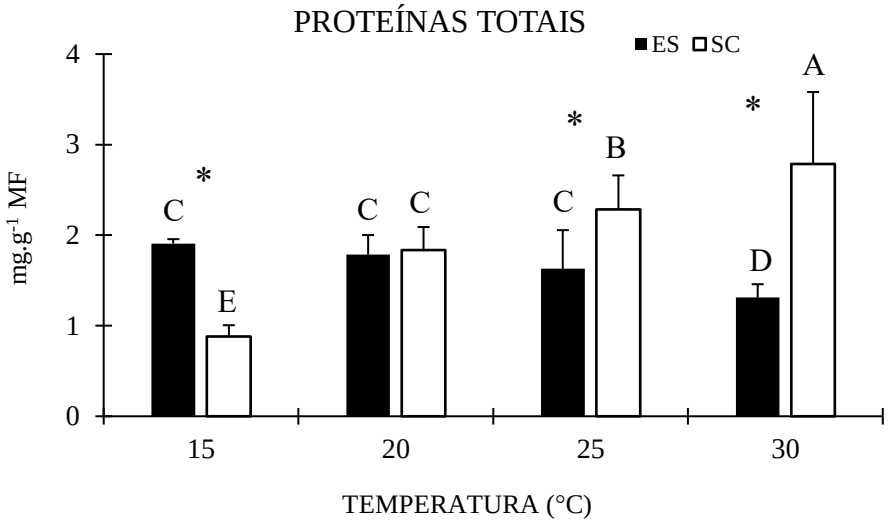

Figura 4. Efeito das temperaturas na concentração de proteínas solúveis totais de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* do Espirito Santo (ES) e de Santa Catarina (SC) após 31 dias. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). * indica diferenças significativas entre as linhagens. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

Pigmentos Fotossintetizantes

As concentrações de ficobiliproteínas das linhagens ES e SC não variaram significativamente nas diferentes temperaturas testadas (Fig. 5). As concentrações de ficoeritrina (F = 1,11 p = 0,3713), ficocianina (F = 0,62 p = 0,6089) e aloficocianina (F = 0,10 p = 0,9541) variaram, respectivamente, de 97,14 ± 35,12 a 224,41 ± 11,71, de 77,04 ± 26,33 a 131,34 ± 11,85 e de 20,85 ± 24,47 a 110,37 ± 36,31. Por outro lado, a concentração de clorofila a (F = 3,43 p = 0,0423) da linhagem ES foi maior na temperatura de 20ºC e menor na temperatura de 30ºC (Fig. 5). As concentrações de ficobiliproteínas das linhagens ES e SC não variaram significativamente nas diferentes temperaturas testadas (Fig. 5). As concentrações de ficoeritrina variaram de 97,14 ± 35,12 a 224,41 ± 11,71 µg.g^{-1} MF (F = 1,11 *p* = 0,3713), de ficocianina variaram de 77,04 ± 26,33 a 131,34 ± 11,85 µg.g^{-1} MF (F = 0,62 *p* = 0,6089) e de aloficocianina variaram de 20,85 ± 24,47 a 110,37 ± 36,31 µg.g^{-1} MF (F = 0,10 *p* = 0,9541) e por

outro lado, a concentração de clorofila *a* da linhagem ES foi maior na temperatura de 20ºC e menor na temperatura de 30ºC (F = 3,43 *p* = 0,0423) (Fig. 5).

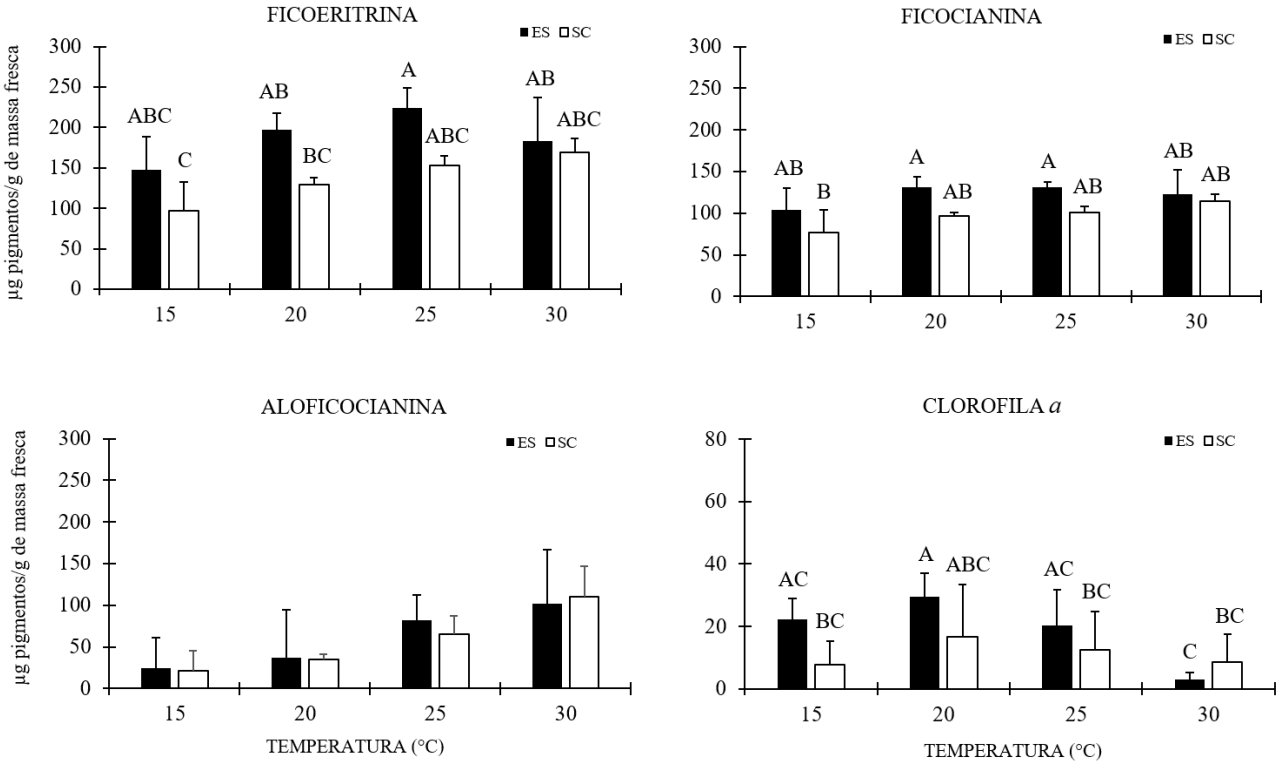

Figura 5. Efeito das temperaturas nas concentrações de pigmentos fotossintetizantes de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* do Espirito Santo (ES) e de Santa Catarina (SC) após 31 dias. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls (p<0,05)

Efeitos dos diferentes níveis de irradiância

Taxa de Crescimento

Os gametófitos femininos adultos de *Gracilaria domingensis* provenientes de Espírito Santo (ES) e de Santa Catarina (SC) foram tolerantes a variações de irradiâncias de 20 a 250 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (Fig. 6). Na irradiância de 40 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} a taxa de crescimento da linhagem SC (5,34 ± 0,36 %.d^{-1}) foi maior do que a da linhagem ES (4,42 ± 0,88 %.d^{-1}). As menores taxas de crescimento das linhagens ES e SC foram observadas na irradiância de 20 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} e as irradiâncias de saturação para o crescimento das linhagens SC e ES foram, respectivamente, 40 e 60 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (F = 1,00 *p* = 0,4521) (Fig. 6).

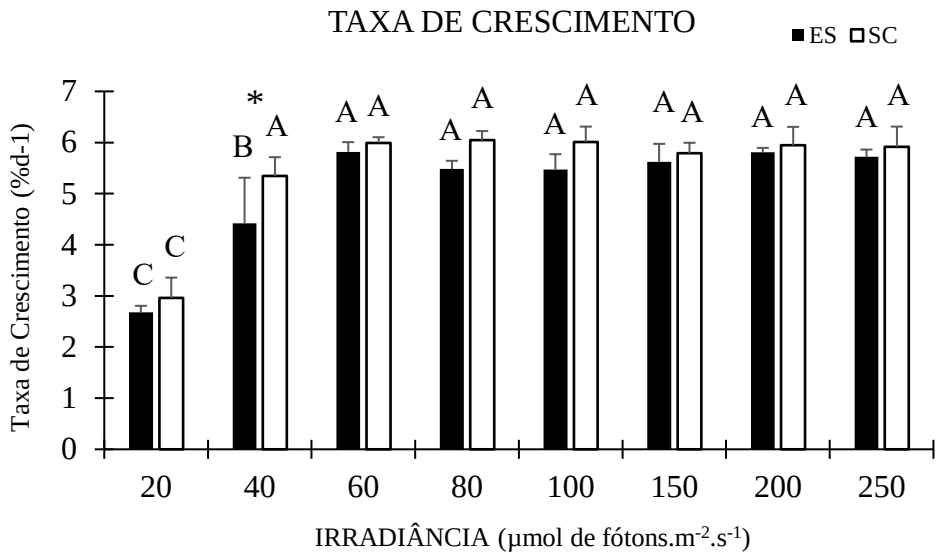

Figura 6. Efeito das irradiâncias na taxa de crescimento (%.d^{-1}) de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* do Espirito Santo (ES) e de Santa Catarina (SC) após 28 dias. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n=3). * indica as diferenças significativas de cada tratamento entre os indivíduos. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).

Análises Morfológicas

As linhagens ES e SC apresentaram respostas semelhantes na coloração dos talos ao final do experimento (Fig. 7). Ambas apresentaram variações na coloração do talo quando cultivadas nas irradiâncias de 150, 200 e 250 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, onde os segmentos apicais apresentaram uma coloração esverdeada e os ápices com coloração avermelhada. As algas apresentaram cor vermelho-escuro quando cultivadas em baixa irradiância (20 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}).

As irradiâncias de 40 a 250 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} não influenciaram o comprimento do eixo principal (Fig. 8). Entretanto, a linhagem ES (2,71 ± 0,08 cm), quando cultivada a 20 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} apresentou maior comprimento do eixo principal comparada com a linhagem SC (2,16 ± 0,14 cm) ($F = 2,34$ $p = 0,0476$). Quanto ao comprimento dos ramos de 1ª ordem, a linhagem SC apresentou valores maiores quando comparada com a linhagem ES nas irradiâncias de 20, 80, 100, 200 e 250 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} ($F = 0,00$ $p = 1,0000$) A linhagem SC (8 ± 1,15 ramos) apresentou um número maior de ramos de 1ª ordem comparada com a amostra de ES (4 ± 0,57 ramos) na irradiância de 20 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} ($F = 1,94$ $p = 0,0952$) Por outro lado, a linhagem ES (4 ± 0,57 ramos) apresentou um número maior de ramos de 2ª ordem em relação a linhagem SC (2 ± 1 ramos) na irradiância de 40 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} ($F = 5,01$ $p = 0,0006$) (Fig.8).

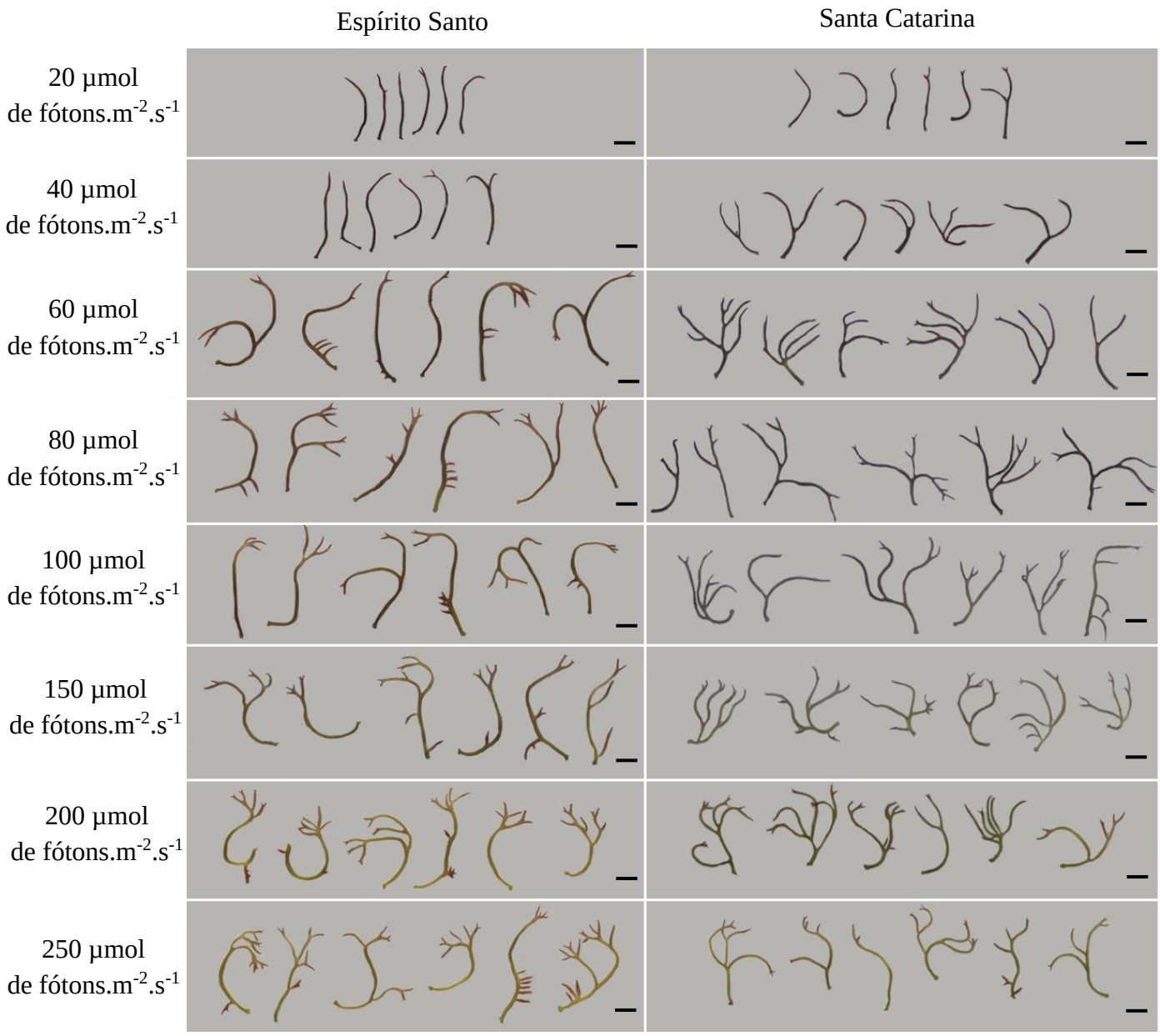

Figura 7: Aspecto geral de segmentos apicais de gametófitos femininos *Gracilaria domingensis* do Espirito Santo (ES) e de Santa Catarina (SC) cultivados em diferentes níveis de irradiância após 28 dias. Escala= 1cm

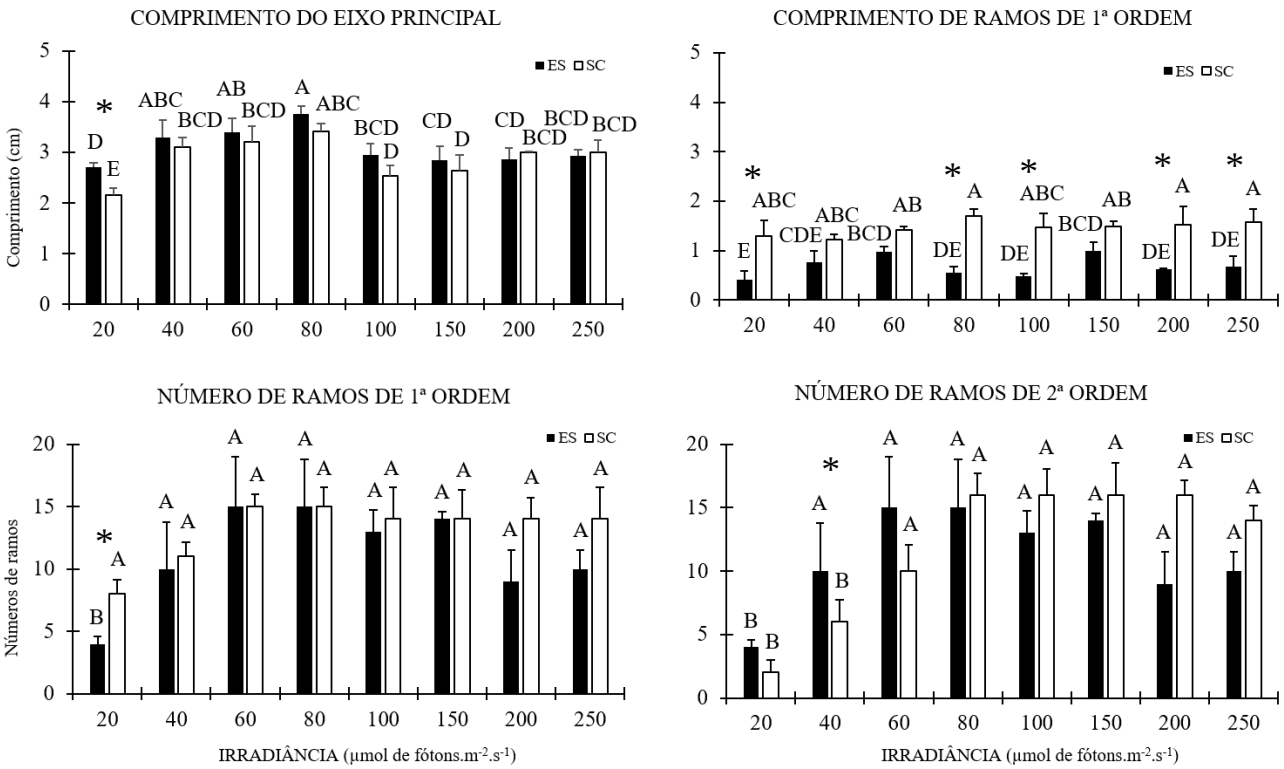

Figura 8. Efeito das irradiâncias na morfologia do talo de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* do Espirito Santo (ES) e de Santa Catarina (SC) após 28 dias. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). * indica as diferenças significativas de cada tratamento entre os indivíduos. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).

Proteínas Solúveis Totais

A concentração de proteínas solúveis totais variou de 1,43 ± 0,36 a 14,53 ± 0,79 mg.g^{-1} MF. A linhagem SC apresentou maiores concentração quando comparada com a linhagem ES nas irradiâncias de 20, 40 e 80 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (F = 13,75 p = 0,0000) (Fig. 9).

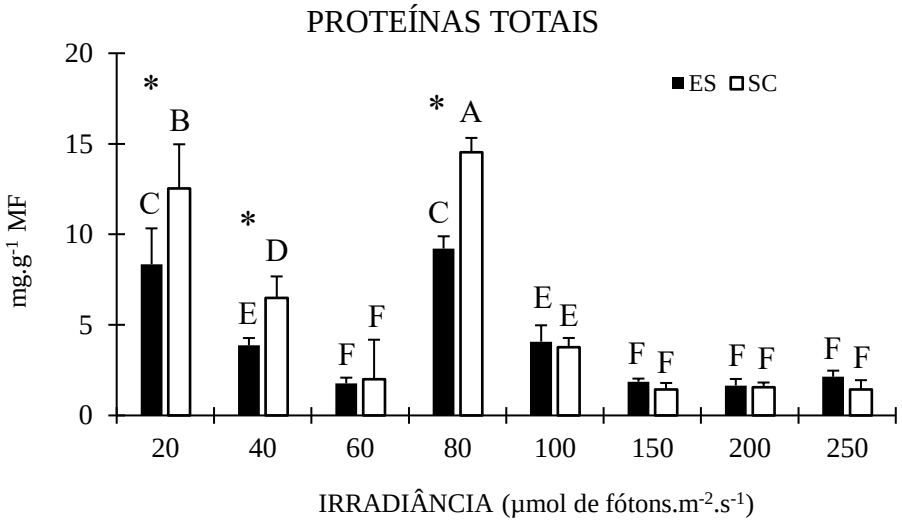

Figura 9. Efeito das irradiâncias na concentração de proteínas solúveis totais de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* do Espirito Santo (ES) e de Santa Catarina (SC) após 31 dias. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). * indica as diferenças significativas de cada tratamento entre os indivíduos. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).

Pigmentos Fotossintetizantes

As linhagens ES e SC cultivadas sob a irradiância de 40 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} apresentaram diferenças nas concentrações de ficoeritrina ($F = 2,03$ $p = 0,0807$) e ficocianina ($F = 2,71$ $p = 0,0223$) A linhagem ES (422,99 ± 41,38 e 215,31 ± 26,20 µg.g^{-1} MF) apresentou maiores concentrações do que a linhagem SC (285,45 ± 33,28 e 163,19 ± 11,59 µg.g^{-1} MF) (Fig. 10). As concentrações de aloficocianina ($F = 2,47$ $p = 0,0380$) não diferiram entre os diferentes níveis de irradiância. Por outro lado, as concentrações de clorofila a ($F = 4,02$ $p = 0,0007$) diminuíram com o aumento da irradiânica e foram maiores na linhagem ES do que na linhagem SC, exceto os valores obtidos na irradiância de 200 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (Fig. 10).

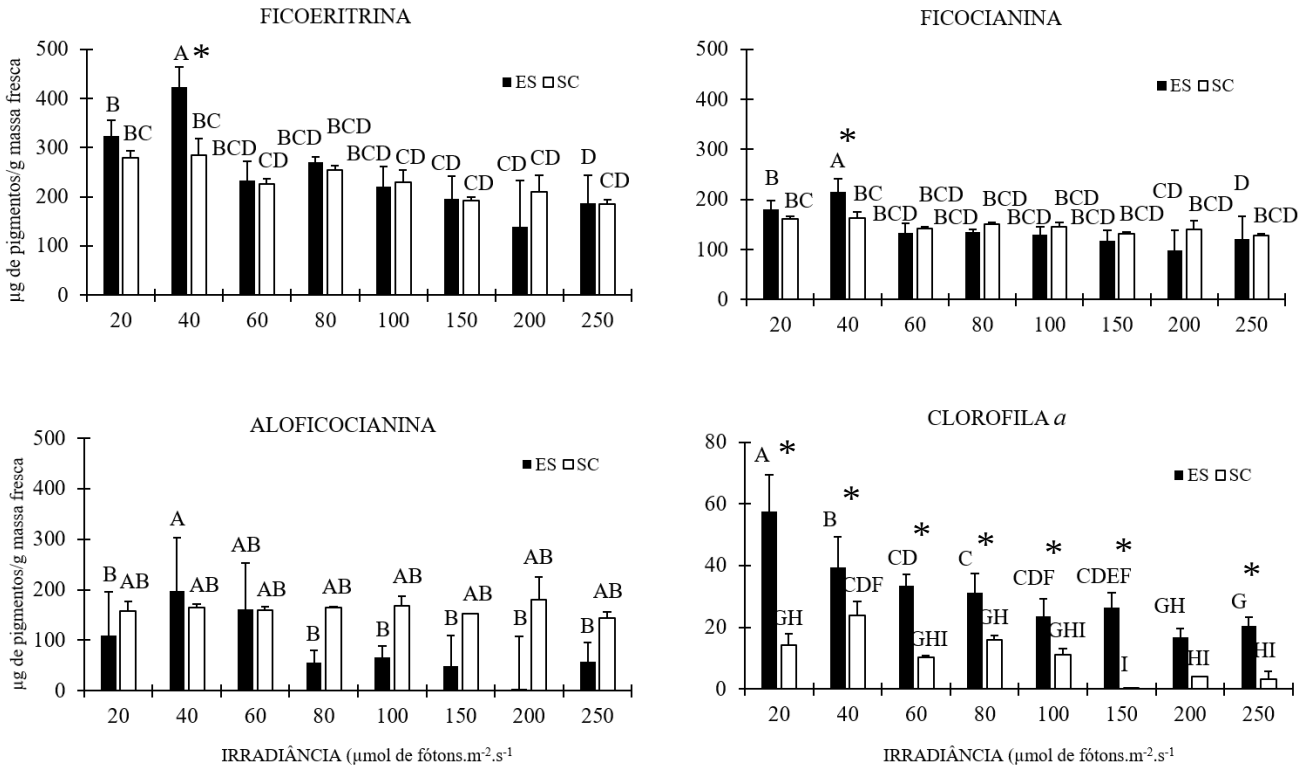

Figura 10. Efeito das irradiâncias na concentração de pigmentos fotossintetizantes de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* do Espirito Santo (ES) e de Santa Catarina (SC) após 31 dias. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). * indica as diferenças significativas de cada tratamento entre as amostras. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).

DISCUSSÃO

Temperatura

As linhagens ES e SC apresentaram tolerância à variação de temperatura de 15 a 30°C e morreram quando submetidas à temperatura de 35°C, mas a linhagem SC tolerou até o 5° dia após o início do cultivo e a linhagem ES tolerou somente o 3° dia. As maiores taxas de crescimento foram observadas nas linhagens ES e SC cultivadas a 25ºC. Resultados similares foram observados em tetrasporófitos de *Gracilaria domingensis* coletados em SC que também apresentaram tolerância a variação de temperatura de 15 a 30°C e apresentaram seu ótimo de crescimento nas temperaturas de 20 e 25°C. (Ramlov *et al.* 2012). Outras espécies como *G. gracilis* (proveniente da Argentina) e *G. chilensis* (proveniente do Chile) também apresentaram tolerância em uma ampla variação de temperatura (14 a 30ºC) e o ótimo de crescimento das duas espécies foi 22ºC (Yokoya & Oliveira 1992). Yokoya *et al.* (1999) observaram que gametófitos femininos de *G. vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss (proveniente do Japão) tolerou temperaturas de 15 a 30°C e apresentaram seu ótimo de

crescimento em 25°C. Raikar *et al.* (2001) e Choi *et al.* (2006) observaram que as espécies, *G. chorda* Holmes (Coreia), *G. corticata* (J.Agardh) J.Agardh (India), *G. follifera* (Forssk.) BØrgesen (India), *G. incurvata* Okamura (Japão) e *G. verrucosa* (Coreia), apresentaram seus ótimos de crescimentos nas temperaturas de 25°C. Yokoya & Oliveira (1993) analisaram que carpóporos de *G. verrucosa* e tetrásporos de *G. caudata* foram tolerantes a uma variação de temperatura de 14 a 30°C e ambas apresentaram seu ótimo de crescimento em 26°C. Miranda *et al.* (2012) relataram que plântulas originadas de carpósporos de *G. caudata* apresentaram o ótimo de crescimento em temperatura de 25°C.

A linhagem ES apresentou maior concentração de proteínas solúveis totais em baixa temperatura (15ºC) enquanto a linhagem SC apresentou maiores concentrações de proteínas em temperaturas altas (25 e 30ºC). Além disso, a concentração de clorofila *a* da linhagem ES foi maior na temperatura de 20ºC e menor na temperatura de 30ºC. Essa diferença entre as duas linhagens pode estar relacionada com a variação de temperatura da região de procedência das linhagens, uma vez que o litoral do Espírito Santo sofre influência do fenômeno de ressurgência (Valentin, 1984; Torres 1995; Nunes, 2007), e as algas estão sujeitas a variações extremas de temperatura, o que difere da região de Santa Catarina. Guimarães (2000) observou que morfos pigmentares de *G. domingensis*, provenientes do Estado do Ceará, apresentaram baixas taxas fotossintéticas em cultivos em laboratório em temperaturas extremas (16 e 34°C). No entanto, quando cultivadas a 20, 25 e 30°C apresentaram taxas fotossintéticas maiores e semelhantes. Os resultados observados para *G. domingensis* proveniente dos estados do Ceará, Espírito Santo e Santa Catarina podem estar relacionados às condições ambientais particulares de cada região. No Estado do Ceará, temperaturas inferiores a 20°C são pouco freqüentes e em Santa Catarina, temperaturas inferiores a 15°C são raras, o que explicaria o menor desempenho a 15°C, porém, no Espírito Santo, essa baixa temperatura pode ocorrer devido ao fenômeno da ressurgência. Em relação ao desempenho a 30°C, a diferença era esperada, uma vez que as temperaturas máximas nos Estados da região nordeste são superiores às observadas na região sul.

Estudos têm demonstrado a ocorrência de ecótipos, que são originados da pressão de diferentes fatores, principalmente os regimes de temperatura nas diferentes áreas geográficas (Pakker & Breeman 1996, Orfanidis & Breeman 1999, Orfanidis *et al.* 1999). A presença de ecótipos em espécies de *Gracilaria* foi registrada (Santelices & Ugarte 1990, Buschmann *et al.* 1992, Ursi 2005). Resultados em que as temperaturas ótimas para o crescimento em laboratório coincidem com as condições ambientais já foram descritos por Raikar *et al.* (2001), para outras espécies de *Gracilaria*.

Irradiância

A irradiância influenciou as taxas de crescimento das duas linhagens, sendo que as menores taxas foram observadas na irradiância de 20 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} e as maiores foram observadas em irradiâncias maiores do que 40 e 60 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} para as linhagens SC e ES, respectivamente. Kakita *et al.* (2006) observaram que *G. chorda* apresentou as maiores taxas de crescimento em irradiâncias maiores que 60 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} e Martins *et al.* (2007) observaram em *Hypnea pseudomusciformis* (citada como *H. musciformis* (Wulfen) J.V.Lamouroux) as maiores taxas de crescimento em irradiâncias maiores que 40 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}. O crescimento em altas irradiâncias já era esperado, uma vez que *G. domingensis* cresce em regiões entre-marés dos costões rochosos e, durante a maré baixa, fica sujeita a exposição a altos níveis de irradiância. Guimarães (2000) observou que as maiores taxas de crescimentos foram encontradas em altos níveis de irradiância para *G. domingensis*. Esse resultado está de acordo com os estudos realizados em espécies de *Gracilaria*, em que altas irradiâncias induziram maiores taxas de crescimento e maior número de ramificações (Yokoya *et al.* 1999; Raikar *et al.* 2001; Ursi 2005; Ramlov *et al.* 2012; Miranda *et al.* 2012 Barufi *et al.* 2015; Faria 2015; Souza 2015).

As linhagens de *Gracilaria domingensis* estudadas apresentaram maiores concentrações de proteínas solúveis totais em baixas irradiâncias (20, 40 e 80 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}) do que em altas irradiâncias. Além disso, a linhagem ES de *G. domingensis* apresentou as maiores concentrações de ficoeritrina e ficocianina quando cultivada em baixa irradiância (40 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}) e os menores valores foram observados em altos níveis de irradiância. Ramlov *et al.* (2012) encontraram resultados semelhantes, onde tetrasporófitos adultos de *G. domingensis* apresentaram maiores concentrações de ficobiliproteínas quando cultivados na irradiância de 50 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} quando comprada com a irradiância de 100 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}. Serra (2013) observou que a quantidade de ficobilinas em em *Gracilariopsis tenuifrons* (C.J.Bird & E.C.Oliveira) Fredericq & Hommersand foi maior em irradiância de 60 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} do que em alta irradiância e Souza (2015) relatou que o teor de ficobiliproteínas em *Gracilaria caudata* foi maior em algas submetidas às irradiâncias baixas do que em altas. Skriptsova & Yakovleva (2002) observaram a diminuição de pigmentos com o aumento da irradiância em *Gracilaria gracilis* (Stackhouse) M.Steentoft, L.M.Irvine & W.F.Farnham.

O aumento da concentração de ficobiliproteínas já foi relatada para outras espécies de *Gracilaria* (Lapointe 1981; Ramus e van der Meer 1983; Carnicas *et al.* 1999; Zou & Gao 2009) e está associada à fotoaclimatação das espécies à baixa irradiância. A concentração de clorofila *a* das

linhagens ES e SC de *G. domingensis* diminuiu com o aumento da irradiância, indicando uma fotoaclimatação às variações de irradiâncias. *Gracilaria domingensis* é uma espécie que cresce em regiões entre-marés dos costões rochosos e, durante a maré baixa, fica exposta a altos níveis de irradiância, o que explica a tolerância e o crescimento em uma ampla variação de irradiância (de 20 a 250 μmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}). Entretanto, as irradiâncias de saturação para o crescimento das linhagens SC e ES foram, respectivamente, 40 e 60 μmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, indicando que *G. domingensis* é uma espécie adaptada a ambientes com baixos níveis de irradiância.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Bixler, H.J. & Porse, H. 2011. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. J Appl Phycol 23:321335.

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.

Buschmann, A., Kuschel, F., Vergara, P. & Schulz, J. 1992. Intertidal *Gracilaria* farming in southern Chile: differences of the algal provenience. Aquatic Botany 42: 327-337.

Carnicas, E., Jimenez, C. & Niell, F.X. 1999. Effects of changes of irradiance on the pigment composition of *Gracilaria tenuistipitata* var. liui Zhang et Xia. Journal of Photochemistry and Photobiology 50: 149-158.

Choi, H.G., Kim, Y.S., Kim, J.H., Lee, S.J., Park, E.J., Ryu, J. & Nam, K.J. 2006. Effects of temperature and salinity on the growth of *Gracilaria verrucosa* and *G. chorda*, with the potential for mariculture in Korea. Journal of Applied Phycology 18: 269–277.

Costa, E. S. 2013 Algas Gracilarióides (Gracilariaceae, Rhodophyta) na costa brasileira: uma abordagem morfológica e molecular. Emmanuelle da Silva Costa – Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

Faria, A.V.F. 2015. Efeitos da irradiância na fisiologia de *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): uma abordagem intraespecífica. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo. 97p.

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

Guimarães, M. & Plastino, E.M. 1999. Plastid organization of color variants of the red macroalga Gracilaria domingensis (Gracilariales). Acta Microscopica 8: 795-796.

Guiry, M.D. & Guiry, G.M., 2017. AlgaeBase. Worldwide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: http://www.algaebase.org (último acesso em 11 abril 2017).

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

Janeiro, 143 pp.

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. Biochem. Physiol. Pflanzen (BPP). 167: 191-194.

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

Lapointe, B.E. 1981. The effects of light and nitrogen on growth, pigment content, and biochemical compostion of *Gracilaria foliifera v. angustissima* (Gigartinales, Rhodophyta). Journal of Phycology 17: 90-95.

Lobban, C.S. & Harrison, P.J. 1994. Seaweed Ecology and Physiology. Cambridge University Press, Cambridge, 366p.

Lünning, K. 1990. Seaweeds: their environment biogeography and physiology. John Wiley & Sons, New York, 527p.

Martins, A.P.; Yokoya, N.S.; Carvalho, M.A.; Plastino, E.M. 2007. 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.

Miranda, G.E.C. de; Yokoya, N.S.; Fujii, M.T. 2012. Effects of temperature, salinity and irradiance on carposporeling development of *Hydropuntia caudata* (Gracilariales, Rhodophyta). Revista Brasileira de Farmacognosia 22: 818 – 824.

Nunes, A.L. 2007. Determinação das marés meteorológicas na região da baía do espírito santo e sua influência na drenagem de águas continentais. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo. 131p.

Nunes, J.M. De C. 2005. Rodofíceas marinhas bentônicas do estado da Bahia, Brasil. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 410p.

Oliveira, E.C. & Plastino, E.M. 1994. Gracilariaceae. In: I. Akatsuka (ed.) Biology economic algae. SPB Academic Publishing, The Hauge, pp. 185-226.

Oliveira, E.C. 1997. Macroalgas marinhas de valor comercial: técnicas de cultivo. Panorama da Aqüicultura 7: 42-45.

Orduña-Rojas, J. & Robledo, D. 1999. Effects of irradiance and temperature on the release and growth of carpospores from *Gracilaria cornea* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta). Botanica Marina 42: 315-319.

Orfanidis, S. & Breeman, A. 1999. Geographic variation in thermal traits in Digenea simplex and *Champia parvula* (Rhodophyta) in relation to present and glacial temperatures regimes. Journal of Phycology 35: 919-930.

Orfanidis, S., Venekamp, L. & Breeman, A. 1999. Ecophysiological adaptations of two Mediterranean red algae in relation to distribution. European Journal of Phycology 34: 469-476.

Pakker, H. & Breeman, A. 1996. Temperature responses of tropical to warm temperate seaweeds. II. Evidence for ecotypic differentiation in amphi-Atlantic Tropical Mediterranean species. European Journal of Phycology 31: 133-141.

Pereira, R.C. & Gomes-Soares, A. 2002. Biologia Marinha. 1ª ed. Editora Interciência. Rio de Janeiro.

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.

Raikar, S.V., Iima, M. & Fujita, Y. 2001. Effect of temperature, salinity and light intensity on the growth of *Gracilaria spp*. (Gracilariales, Rhodophyta) from Japan, Malaysia and India. Indian Journal of Marine Science 30: 98-104.

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

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

Santelices, B. & Ugarte, R. 1990. Ecological differences among Chilean population of commercial *Gracilaria*. Journal of Applied Phycology 2: 17-26.

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.

Skriptsova, A. &Yakovleva, I.M. 2002. The influence of variations in irradiance upon morphology in unattached formo of *Gracilaria gracilis* (Steackhouse) Steentoft during field cultivation, South Primorye, Russia. Aquatic Ecology 36: 511-518.

Smit, A.J. 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. Journal of Applied Phycology 16: 245-262.

Souza, J.M.C. 2015. Efeitos das citocininas nas respostas fisiológicas e na qualidade do ágar de *Gracilaria caudata* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta). Dissertação de mestrado, Instituto de Botanica de São Paulo. 76p.

Torres J.R. 1995. Resposta da ressurgência costeira de Cabo Frio a forçantes locais. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 143p.

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

Valentin, J. L. 1984. Analyse des paramètres hydrobiologiques dans la remontée de Cabo Frio (Brésil). Marine Biology, n. 82, p. 259-276.

Yokoya, N. S. & Oliveira, E. C. 1993. Effects of temperature and salinity on spore germination and sporeling development in South American agarophytes (Rhodophyta). Japanese Journal of Phycology (Sôrui) 41: 283-293.

Yokoya, N.S. & Oliveira, E.C. 1992. Geographic distribution and growth responses to temperature variation of some South American red algae of economic importance. Journal of Applied Phycology 4:339-345.

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., 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.

Yong, Y.S, Yong, W.T.L & Anton, A. 2013. Analysis of formulae for determination of seaweed growth rate J Appl Phycol 25:1831–1834.

Zemke-White, W.L. & Ohno, M. 1999. World seaweed utilization: an end-of-century summary. Journal of Applied Phycology 11: 369-376.

Zou, D. & Gao, K. 2009. Effects of elevated CO2 on the red seaweed *Gracilaria lemaneiformis* (Gigartinales, Rhodophyta) grown at different irradiance levels. Phycologia 48: 510–517.

CAPÍTULO 2

Efeitos da salinidade no desenvolvimento e no conteúdo de metábolitos primários em *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta)

Resumo

A salinidade é um fator que interfere na osmorregulação e nas concentrações de íons no interior das células. As macroalgas marinhas bentônicas sintetizam carboidratos de baixa massa molecular (CBMM), que são de grande importância para a manutenção da pressão de turgor das células. O objetivo do presente trabalho foi determinar os limites de tolerância a variações de salinidade e avaliar os seus efeitos na taxa de crescimento (TC), na morfologia e nos conteúdos de proteínas solúveis totais, de pigmentos e de carboidratos totais de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* (Kützing) Sonder ex Dickie provenientes de Santa Catarina, Brasil. Foram testadas salinidades de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 ups. Os gametófitos femininos de *G. domingensis* foram tolerantes a todas as salinidades testadas e apresentaram as maiores TC nas salinidades de 25 a 40 ups (5,6 ± 0,15 a 6,0 ± 0,13 %.d^{-1}, n=6). O alongamento do eixo principal do talo e os números de ramificações foram inibidos nas salinidades extremas (5, 10, 55 e 60 ups). As concentrações de ficobiliproteínas (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina) não apresentaram diferenças significativas com a variação de salinidade, porém, a concentração de clorofila *a* em gametófitos femininos cultivados na salinidade de 60 ups (1,61 ± 0,37 µg.g^{-1} MF, n=3) foi significativamente menor quando comparada a salinidade de 30 ups (10,08 ± 6,61 µg.g^{-1} MF, n=3). Na análise de carboidratos totais, apenas a extração na fração etanólica (contendo os CBMM) apresentou diferenças significativas, onde as algas cultivadas em salinidades de 55 e 60 ups apresentaram as maiores concentrações de CBMM (respectivamente, 4178,60 ± 511,51 e 4863,16 ± 1186,98 µg.g^{-1} MF, n=3). Os resultados indicam que os gametófitos femininos de *G. domingensis* são eurialinos e, em altas salinidades, podem acumular maiores concentrações de CBMM, uma vez que esses carboidratos podem atuar como osmólitos orgânicos, que são responsáveis para a manutenção da pressão de turgor, evitando a plasmólise celular.

Palavras-chaves: *Gracilaria domingensis*, salinidade, tolerância, crescimento, carboidratos

Abstract

Salinity is a factor that interferes with osmoregulation and ion concentrations inside the cells. Benthic marine macroalgae synthesize low-molecular-mass carbohydrates (LMMC), which play an important role in the maintenance of the osmotic pressure of the cells. The objectives of the present work were to determine the limits of tolerance to salinity variations and to evaluate their effects on the growth rates (GR), morphology and contents of total soluble proteins, pigments and total carbohydrates in female gametophytes of *Gracilaria domingensis* (Kützing) Sonder ex Dickie from Santa Catarina State, Brazil). Salinity variations of 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 and 60 psu were tested. The female gametophytes of *G. domingensis* were tolerant to all tested salinities and presented the highest GR in the salinities of 25 to 40 ups (5. 6 ± 0.15 to 6.0 ± 0.13 %.d^{-1}, n=6). The thallus elongation and the numbers of branches were inhibited at the extreme salinities (5, 10, 55 and 60 psu). The concentrations of phycobiliproteins (phycoerythrin, phycocyanin and allophycocyanin) did not show significant differences with the salinity variation, however, in chlorophyll *a* at salinity 60 psu (1.61 ± 0.37 μg.g^{-1} FW, n=3) was significantly lower than salinity 30 psu (10.08 ± 6.61 μg.g-1 FW, n=3). In the analysis of total carbohydrates, only ethanolic fraction showed significant differences, where the algae cultivated in salinities 55 and 60 psu showed the highest concentrations of LMMC (4178.60 ± 511.51 and 4863.16 ± 1186.98 μg.g^{-1} FW, n=3). The results indicate that female gametophytes of *G. domingensis* are eurihalin, and, in high salinity, they can accumulate higher concentrations of LMMC, since these carbohydrates can act as organic osmolytes, which are responsible for the maintenance of the turgor pressure, avoiding the cell plasmolysis.

Key-words: *Gracilaria domingensis*, salinity, tolerance, growth, carbohydrates

INTRODUÇÃO

A temperatura, salinidade, luz, nutrientes e hidrodinâmismo da água são fatores de grande importância para o crescimento e produtividade das algas marinhas bentônicas (Oliveira 1997). A salinidade é um fator que interfere nos sistemas e processos biológicos de diversas formas, afetando a osmorregulação e a concentração de íons no interior das células (Lobban & Harrison 1994). Desta forma, a salinidade tem um papel determinante na distribuição das macroalgas em diversos ambientes, bem como na seleção de locais para a instalação de cultivos comerciais (Kirst, 1989).

A variação da salinidade nos diferentes oceanos e mares é pequena, sendo que no Oceano Pacífico, a salinidade média é 35,5 ups, no Oceano Atlântico é 37 ups e no Mar Vermelho é 40 ups (Pereira &Soares-Gomes 2002). Por outro lado, em locais isolados, a salinidade pode atingir valores extremos, como na lagoa de Araruma, RJ, onde a salinidade pode atingir até 90 ups. Em lugares com precipitações intensa ou com uma grande contribuição de descarga de rios, a salinidade pode ser bastante reduzida, como por exemplo 8 ups no Mar Báltico (Pereira & Soares-Gomes 2002).

As algas vermelhas possuem polissacarídeos sulfatados com função estrutural, denominados ficocolóides, em suas paredes celulares. Estes carboidratos são de grande importância, já que oferecem proteção contra a ação das ondas, herbivoria e dessecação em períodos de maré baixa (Usov, 2011). Além disso, esses ficocolóides possuem grande importância econômica, como o ágar, um polissacarídeo utilizado na fabricação de produtos alimentícios e farmacêuticos, além de serem utilizados em meios de cultura para análises microbiológicas (Pengzhan *et al.* 2003). Além dessas aplicações, Fernandéz *et al*. (1989) verificaram a atividade antitumoral de polissacarídeo sulfatado derivado de *Gracilaria domingensis*. Outros carboidratos também são encontrados nas rodofíceas, como o amido das florídeas, que é o produto de reserva dessas algas. Este polissacarídeo é formado por D-glicopiranoses unidas por ligações α (1,4) e α (1,3) em alguns casos, além disso, podem ocorrer ramificações no C6. Assim como o amido das plantas, estes polissacarídeos formam grânulos, porém são armazenados no citoplasma da célula (Yu *et al*. 2002).

Além dos polissacarídeos, as algas vermelhas sintetizam carboidratos de baixa massa molecular (CBMM), que são de grande importância para a manutenção da pressão de turgor das células (Kirst, 1989). Estes podem ser heterosídeos e polióis (Karsten *et al.* 1999). Os heterosídeos presentes nas rodofíceas são classificados em floridosídeos, formados por moléculas de galactose ligadas a molécula de glicerol (α-D-galactopiranosil-(1→2)-glicerol), e seus dois isômeros de posição D-isofloridosídeo (α-D-galactopiranosil-(1→1)-D-glicerol) e L-isofloridosídeo (α-D-galactopiranosil-(1→1)-L-

glicerol) e digeneasídeos, que são formados por moléculas de manose e ácido glicérico (α-D-manopiranosil-(1→2)-glicerato) (Karsten *et al.* 1993; Karsten *et al.* 1999).

Os polióis são formados a partir da redução de unidades de monossacarídeos como manose, galactose e glicose, originando respectivamente manitol, dulcitol e sorbitol. Estes compostos são considerados como principais responsáveis pela manutenção das pressões osmótica e de turgescência, embora este mecanismo ainda não esteja bem esclarecido (Crowe *et al.* 1987). Os CBMM apresentam atividade osmorreguladora, funcionando como osmólitos ou solutos compatíveis, tendo efeito estabilizante em enzimas, membranas e em estruturas de macromoléculas sob condições de hipersalinidade, acumulando-se no citoplasma celular (Kirst, 1989; Karsten *et al*. 1999).

As alterações da salinidade afetam os organismos de três maneiras: a) estresse osmótico com impacto direto no potencial hídrico da célula; b) estresse iônico causado pela absorção ou perda de íons; c) mudanças dos íons celulares devido à permeabilidade seletiva dos íons pela membrana (Kirst, 1989). Ascêncio (2006) observou atividade osmorreguladora do floridosídeo, uma vez que a concentração deste composto aumentou em *Hypnea pseudomusciformis* Nauer, Cassano & M.C.Oliveira (citada como *H. musciformis* (Wulfen) J.V. Lamouroux), quando submetida ao aumento da salinidade em no meio de cultura, aumentando o potencial hídrico interno esse aumento pode estar relacionado à proteção osmótica, uma vez que os carboidratos de baixa massa molecular atuam como osmólitos (Crowe *et al.* 1987).

O presente trabalho teve como objetivos avaliar os limites de tolerância às variações de salinidade e os efeitos no desenvolvimento e no conteúdo de metabólitos primários em gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* (Kützing) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta).

MATERIAIS E MÉTODOS

Material biológico

Gametofíticos femininos com cistocarpos de *Gracilaria domingensis* foram coletados no dia 14/10/2008, na Praia de Lagoinha, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil (27º23’21” S e 48º25’29” W), e depositados no Herbário SP, Instituto de Botânica, São Paulo, recebendo o número SP 400.837.

Isolamento e manutenção das culturas unialgáceas

As culturas unialgáceas de *G. domingensis* foram estabelecidas a partir da propagação de segmentos apicais dos gametófitos femininos férteis coletados em SC.

As algas foram cultivadas em meio de cultura composto por água do mar esterilizada enriquecida com 50% da solução de nutrientes de von Stosch preparada segundo Oliveira *et al.* (1995) e modificada segundo Yokoya (2000). As culturas foram mantidas na sala de cultivo do Laboratório "Marilza Cordeiro-Marino" do Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica, nas seguintes condições: temperatura de 23 ± 3ºC, fotoperíodo de 14h, salinidade 34 ups, pH 8,0, densidade de fluxo fotônico de 75 a 90 μmol de fótons m^{-2} s^{-1}, provenientes de duas lâmpadas fluorescentes de 40 W do tipo "luz do dia" dispostas horizontalmente acima dos frascos de cultura.

Desenho experimental

Para avaliar a tolerância a variação de salinidade, foi testada uma amplitude de 5 a 60 ups com intervalos de 5 ups. Para a obtenção das diferentes salinidades, foi adotado o procedimento de congelamento e descongelmaneto da água do mar descrito por Yokoya *et al.* (1999). A água do mar esterilizada foi congelada em frascos de plástico (2L) a -20ºC e, posteriormente, descongelada em temperatura ambiente. A coleta das primeiras alíquotas de água descongelada forneceu o estoque de água com salinidades altas (80-70 ups), posteriormente, o estoque com salinidade média (35-25 ups) e as alíquotas finais, após o descongelamento total, forneceram os estoques de baixas salinidades (20-10 ups). Com a mistura desses estoques, foram ajustadas e obtidas todas as demais salinidades desejadas. Após confirmação das salinidades no refratômetro (American Optical), a água foi filtrada em membrana Millipore HA (0,45μm). Foi utilizado um único lote de água do mar para a obtenção das diferentes salinidades utilizadas em todo o período experimental.

Foi realizado um pré-tratamento no qual as algas foram cultivadas nas mesmas condições experimentais em uma salinidade 34 ups por uma semana antes de serem submetidas a diferentes salinidades. As demais condições experimentais foram as mesmas descritas para a manutenção das culturas unialgáceas. Ao final do experimento, foi realizada a troca de meio de cultura e, após três dias, as algas foram pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20ºC até a realização das análises bioquímicas.

Todos os tratamentos foram testados com seis repetições simultâneas (n=6) e cada repetição continha seis segmentos apicais (1 cm de comprimento), que foram cultivados em frascos de vidros contendo 90 ml de meio von Stosch 50% e o meio foi trocado semanalmente. Para as análises bioquímicas, foram utilizadas três repetições (n=3) para cada tratamento.

Variáveis analisadas

Taxa de crescimento e análises morfológicas

O crescimento dos segmentos apicais cultivados nos diferentes tratamentos (n=6) foi avaliado por medidas semanais de massa fresca, mensuradas com o auxílio de uma balança analítica. Os dados de massa fresca foram utilizados para cálculo das taxas de crescimento segundo a fórmula de Young (2013):

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

(TC = taxa de crescimento, Mt= massa final, Mi= massa inicial e t= período experimental)

No fim do experimento, os segmentos apicais de cada tratamento foram fotografados com o auxílio de uma câmera fotográfica digital e foram analisados o comprimento do eixo principal, o número de ramos laterais (1ª e 2ª ordem) e o comprimento de ramos laterais de 1ª ordem com o auxílio do software Axiovision v. 3.1 (Carl Zeiss). Além disso, foram realizados cortes transversais na região apical para a observação da organização das células medulares e corticais do talo, com o foco de se verificar o grau de turgidez das células e uma possível ocorrência de plasmólise.

Extração e quantificação de pigmentos fotossintetizantes e proteínas solúveis totais

A extração dos pigmentos e de proteínas solúveis totais foram realizadas com a biomassa de 80 mg (massa fresca) de cada tratamento (n=3). O material foi triturado em nitrogênio líquido em Eppendorfs com o auxílio do pistilo e suspenso em 1mL 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 após a centrifugação foi coletado 200µL do sobrenadante e reservado para a determinação de proteínas solúveis totais. O restante do sobrenadante, contendo as ficobiliproteínas, foi retirado e mantido no escuro até a leitura

em espectrofotômetro (Shimadzu – UV 1800; λ= 498,5, 615 e 651 nm). O sedimento foi ressuspendido em 1mL 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 retirado e mantido no escuro até a leitura em espectrofotômetro (λ = 630, 647 e 664 nm). A determinação da concentração das ficobiliproteínas (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina) foi baseada em Kursar *et al.* (1983) e a concentração de clorofila a, em Jeffrey e Humphey (1975).

A concentração das proteínas solúveis totais foi determinada por espectrofotometria UV-vis (Shimadzu – UV 1800; λ= 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 e os resultados foram expressos em mg de proteína por g de massa fresca.

Extração e quantificação de carboidratos totais

Para extração de carboidratos solúveis totais foi utilizado o método de Carvalho *et al.* (1998) com modificações, onde a amostra com 75 mg de massa fresca de alga foi triturada em nitrogênio líquido em Eppendorfs com o auxílio do pistilo e resuspendida em 1 mL de etanol 80%, mantida em banho-maria a 80ºC por 1h e em seguida centrifugada 14000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi armazenado e o precipitado foi submetido ao mesmo procedimento por mais duas vezes. O resíduo final foi ressuspendido em 1mL de água destilada, mantido em banho-maria a 60ºC durante 1h. O sobrenadante foi armazenado e o precipitado foi submetido ao mesmo procedimento por mais duas vezes. Os sobrenadantes etanólicos e aquosos foram armazenados separadamente e liofilizados, depois ressuspendidos em 1 mL de água destilada e armazenados a -20°C. Nesta análise, foram realizadas três repetições (n=3) para cada amostra. A análise quantitativa de açúcares solúveis totais dos extratos de macroalgas foi realizada através do método colorimétrico de fenol-sulfúrico, determinado por Dubois *et al.* (1956) e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro, regulado para um comprimento de onda de 490 nm. A determinação dos teores estimados de açúcar foi calculada com base na equação da reta gerada a partir da curva confeccionada utilizando glicose como padrão.

Análise estatística

Os valores de taxas de crescimento, morfologia, conteúdo pigmentar e proteínas totais, foram submetidos a análise de variância unifatorial (ANOVA), seguido do teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls. As diferenças significativas foram apresentadas nos gráficos através de letras maiúsculas em cima das barras ($p<0,05$). Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa Statistica (versão 8.0).

RESULTADOS

Taxa de crescimento e análises morfológicas

Os gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* apresentaram amplo limite de tolerância às variações de salinidades, tolerando as salinidades de 5 a 60 ups (F= 414,77 e *p*= 0,00) (Fig. 1).

As maiores taxas de crescimento de *G. domingensis* foram observadas nas salinidades de 25 a 40 ups (5,6 ± 0,15 a 6,0 ± 0,13 $\%.d^{-1}$) e a menor taxa foi observada no tratamento de 60 ups (0,5 ± 0,2 $\%.d^{-1}$) (Fig. 1).

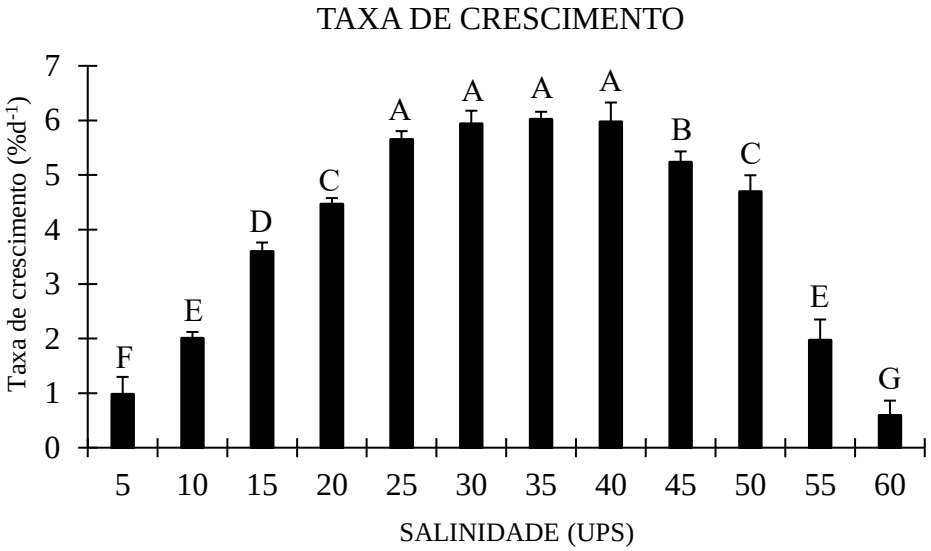

Figura 1: Efeito da salinidade na taxa de crescimento ($\%.d^{-1}$) de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 6). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).

Nos tratamentos de 10 a 55 ups, os segmentos apicais de *G. domingensis* apresentaram um aspecto saudável e ausência de necrose (Fig. 2). Por outro lado, na salinidade de 5 ups, os segmentos apicais apresentaram uma coloração esverdeada na região inferior do talo e os ápices apresentaram regiões despigmentadas. Na salinidade de 60 ups, os segmentos apicais apresentaram uma coloração esverdeado-claro, mas sem regiões despigmentadas (Fig. 2).

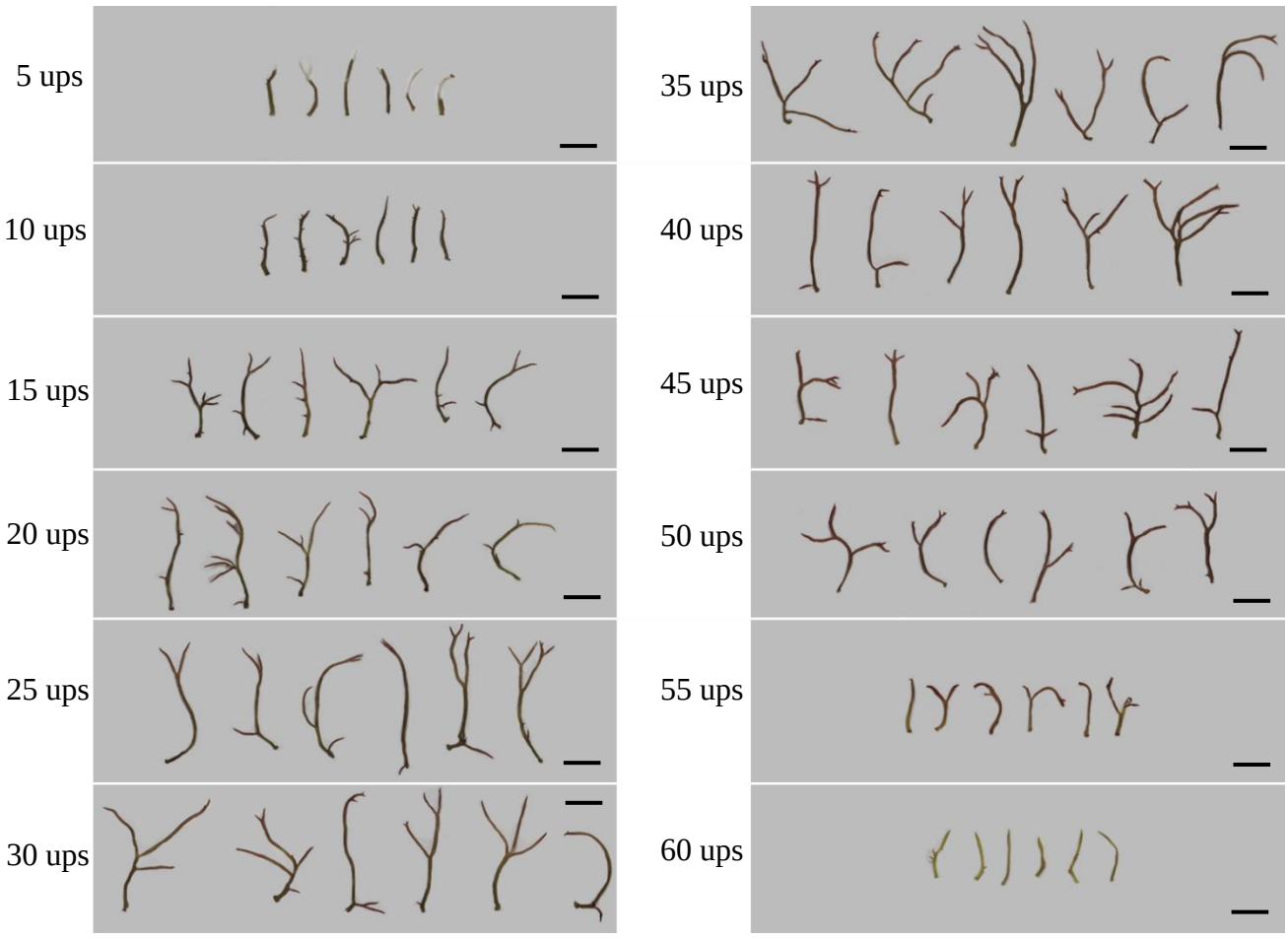

Figura 2: Aspecto geral de segmentos apicais de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* cultivados em diferentes salinidades após 28 dias. Escala = 1cm.

Nas salinidades de 25 a 40 ups, os segmentos apicais apresentaram os maiores comprimentos dos eixos principais (F= 88,09 e *p*= 0,00) (3,35 ± 0,17 a 3,59 ± 0,13 cm) e os ramos de 1ª ordem (F= 24,77 e *p*= 0,00) foram maiores no de 35 ups (1,39 ± 0,29 cm) (Fig. 3). O número de ramos de 1ª ordem (F= 6,97 e *p*= 0,00) foi maior nas salinidades de 10 a 50 ups (9 ± 2,5 a 15 ± 1,5 ramos) e os

ramos de 2ª ordem (F= 17,51 e *p*= 0,00) foi maior nas salinidades de 25 a 50 ups (5 ± 2,6 a 11 ± 1 ramos) (Fig. 3).

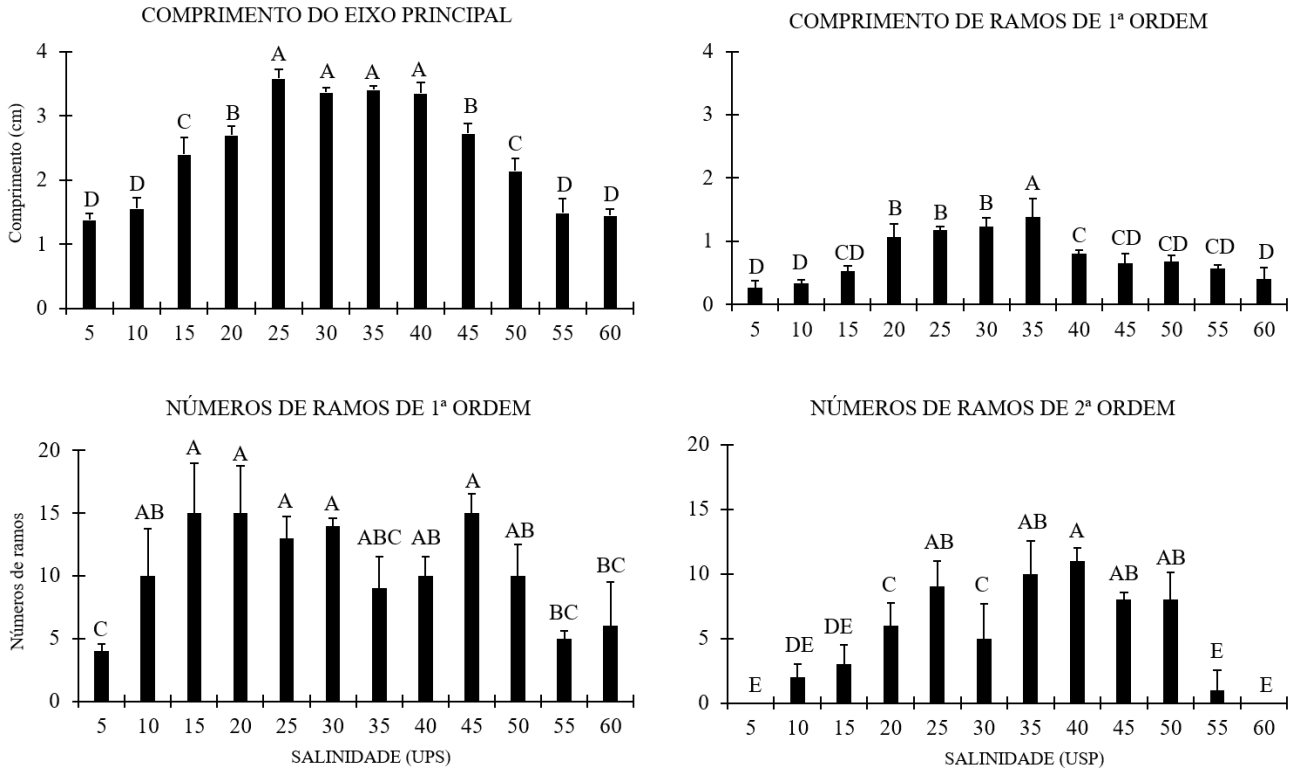

Figura 3. Efeito da salinidade na análise morfológica de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

Nos cortes transversais dos segmentos apicais foi possível observar as células medulares túrgidas dos tratamentos de 5 a 15 ups e as células medulares plasmolisadas dos tratamentos de 55 a 60 ups (Fig. 5).

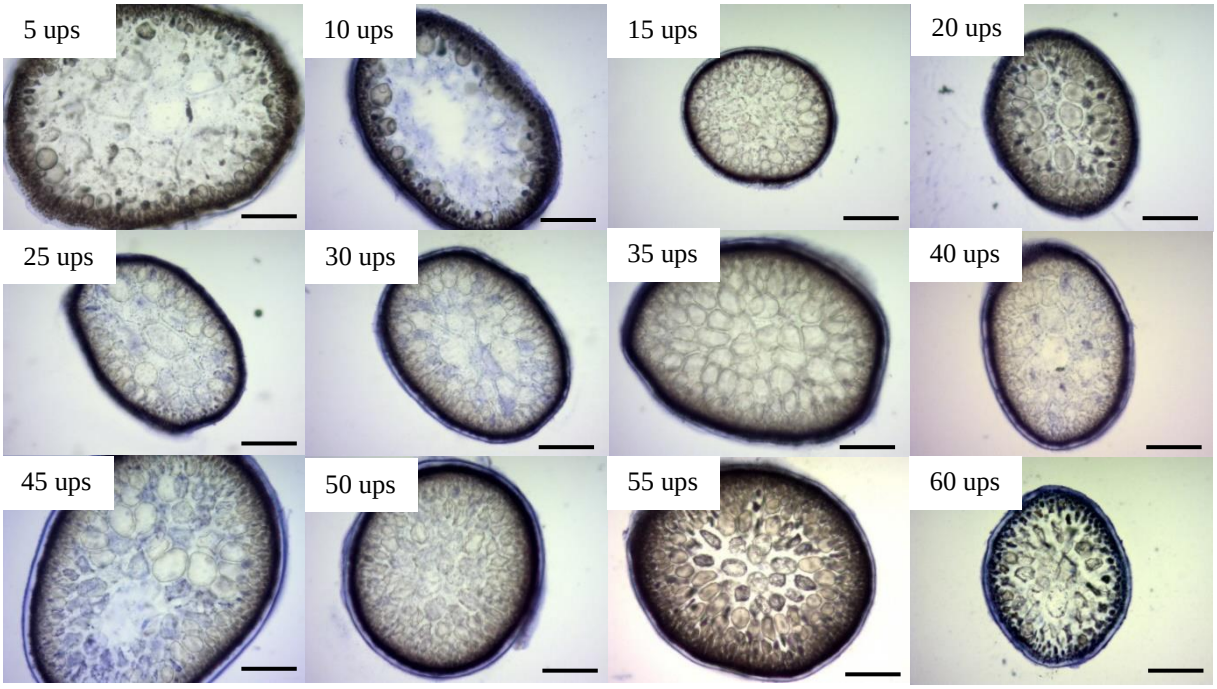

Figura 4: Cortes transversais de segmentos apicais de gametófitos femininos *Gracilaria domingensis* cultivados em diferentes salinidades (de 5 a 60 ups) após 28 dias. Escala = 20 µm

Proteínas Solúveis Totais e Pigmentos Fotossintetizantes

A concentração de proteínas solúveis totais na salinidade 20 ups (8,75 ± 0,72 mg.g^{-1} MF) foi maior em relação a demais salinidades testadas (F= 65,30 *p*= 0,00). As menores concentrações foram observadas nos tratamentos de 15 e de 30 a 60 ups (1,77 ± 0,08 a 3,06 ± 1,13 mg.g^{-1} MF) (Fig. 5).

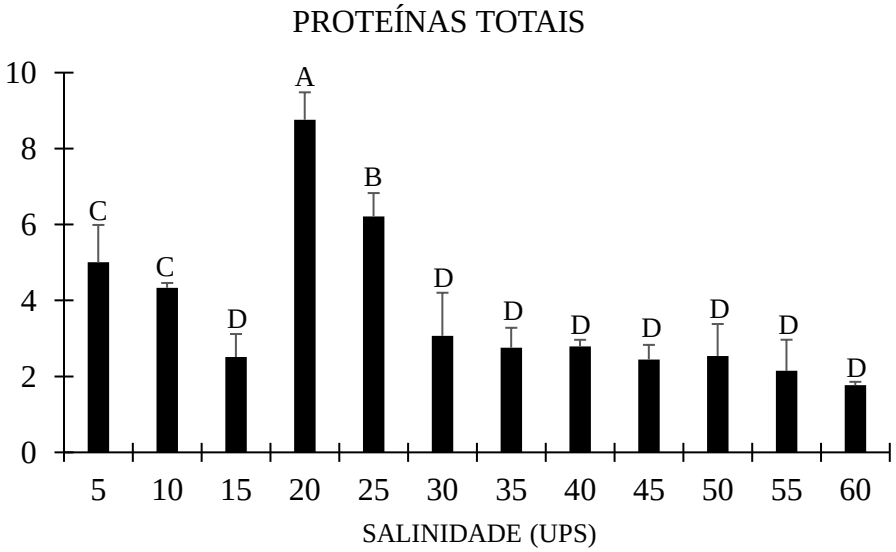

Figura 5: Efeito da salinidade na concentração de proteínas solúveis totais de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* após 31 dias. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

As concentrações de ficobiliproteínas (ficoeritrina (F= 1,83 *p*= 0,10), ficocianina (F= 1,49 *p*= 0,19) e aloficocianina (F= 1,09 *p*= 0,40)) não apresentaram diferenças significativas entre as salinidades testadas e as concentrações de clorofila *a* (F= 2,43 *p*= 0,03) foram maiores na salinidade de 30 ups (10,08 ± 6,61 µg.g^{-1} MF) em relação a salinidade de 60 ups (1,61 ± 0,37 µg.g^{-1} MF) (Fig. 7).

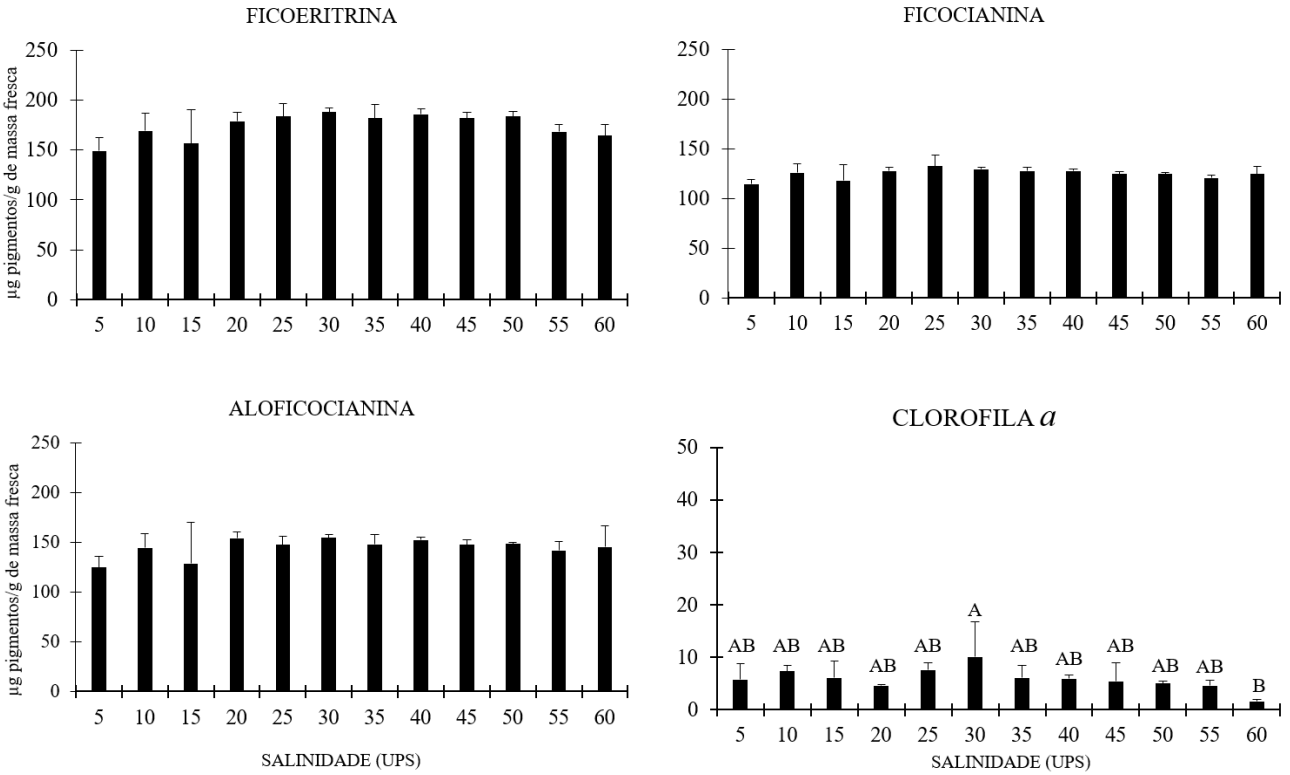

Figura 6: Efeito da salinidade na concentração de pigmentos fotossintetizantes em gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* após 31 dias. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

Carboidratos Totais

As concentrações de carboidratos totais da fração etanólica variaram significativamente entre as salinidades testadas (F= 7,85 *p*= 0,00). As salinidades 55 e 60 ups (4178,60 ± 511,51 e 4863,16 ± 1186,98 µg.g^{-1} MF) foram maiores quando comparadas com as salinidades 10, 15, 20, 25, 30 e 40 ups (1704,50 ± 953,04 a 2507,33 ± 1114,82 µg.g^{-1} MF). Por outro lado, as concentrações de carboidratos totais da fração aquosa não variaram entre os tratamentos testados (F= 2,06 *p*= 0,06) (Fig. 7).

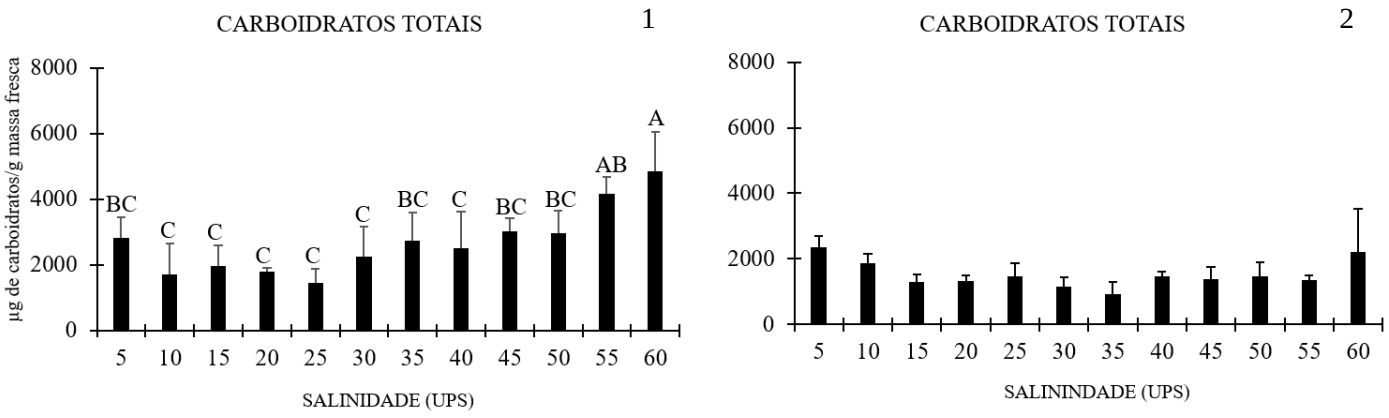

Figura 7: Efeito da salinidade na concentração dos carboidratos totais de gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* após 31 dias. 1) Fração etanólica e 2) Fração aquosa. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos indicaram que *Gracilaria domingensis* é euralina, sendo tolerante a uma ampla variação de salinidade (5 a 60 ups). Esses resultados diferem dos resultados observados por Ramlov *et al.* (2012), onde tetrasporófitos adultos da mesma espécie não foram tolerantes em salinidade de 60 ups. Entretanto, se assemelham com as respostas de outras espécies do gênero, como *G. caudata* J.Agardh e *G. vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss que foram tolerantes ao tratamento de 60 ups (Yokoya & Oliveira, 1992; Yokoya *et al.* 1999). Os gametófitos femininos de *G. domingensis* apresentaram as maiores taxas de crescimento em salinidades de 25 a 40 ups, resposta similar aos resultados descritos em outros trabalhos que avaliaram o melhor desempenho vegetativo em diferentes espécies de *Gracilaria* (Bird & McLachlan, 1986; Yokoya & Oliveira, 1992; Yokoya & Oliveira, 1993; Wilson & Critchley, 1997; Raikar *et al.* 2001; Choi *et al.* 2006). Nas altas salinidades (55 e 60 ups) e baixas salinidades (5 e 10 ups) o crescimento do talo e ramos laterais foram inibidos, e além disso, na salinidade de 5 ups os talos apresentaram regiões despigmentadas, de preferencialmente nos ápices dos talos, indicando que células jovens podem ser mais sensíveis a baixa salinidade (Kirts, 1989). As espécies de *Gracilaria* são encontradas em habitats com ampla variação de salinidade e existem algumas espécies desse gênero que apresentam seus ótimos de crescimento em salinidades mais baixas (Bird & McLachlan 1986; Haglund & Pedersén, 1992).

As maiores concentrações de carboidratos totais da fração etanólica foram observadas em segmentos apicais de *G. domingensis* cultivados em altas salinidades (55 e 60 ups). Esses resultados

podem estar relacionados ao papel dos carboidratos de baixa massa molecular (CBMM) na osmorregulação, uma vez que os carboidratos de baixa massa molecular atuam como osmólitos orgânicos (Crowe *et al*. 1987; Kirst, 1989). Ascêncio (2006) relatou maiores concentrações de floridosídeos em *Hypnea pseudomusciformis* (citada como *H. musciformis*) quando submetida a altas salinidades. O crescimento das algas pode ser prejudicado para manter o ajuste osmótico em altas salinidades, e as concentrações de osmólitos orgânicos podem aumentar, servindo como um dreno sobre os metabólitos necessários para o crescimento celular, isso se reflete em mudanças obivias como no tamanho e na morfologia das algas ao longo do stress salino (Kirst, 1989).

Os resultados obtidos indicam que os gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* são eurihalinos, apresentando amplos limites de tolerância à variação de salinidade (5 a 60 ups) e, em altas salinidades, podem acumular maiores concentrações de CBMM, uma vez que esses carboidratos podem atuar como osmólitos orgânicos, que são responsáveis para a manutenção da pressão de turgor, evitando a plasmólise celular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ascencio, S. D. 2006. Heterosídeos sintetizados por linhagens de cor e estádios reprodutivos de macroalgas vermelhas dos gêneros *Hypnea* e *Gracilaria*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. 135 p.

Bird, C.J. & McLachlan, J. 1986. The effect of salinity on distribution of species of *Gracilaria* Grev. (Rhodophyta, Gigartinales): an experimental assessment. Botanica Marina 29: 231-238.

Bird, K. T., Habig, C., Debusk, T. 1982. Nitrogen allocation and storage patterns in *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta). Journal. Phycology 18:344-348.

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.

Carvalho, M. A. M., Pinto, M. M. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. 1998. Inulin production by *Vernonia herbacea* as influenced by mineral fertilization and time of harvest. Revista Brasileira de Botânica 21:275-280.

Choi, H.G., Kim, Y.S., Kim, J.H., Lee, S.J., Park, E.J., Ryu, J. & Nam, K.J. 2006. Effects of temperature and salinity on the growth of *Gracilaria verrucosa* and *G. chorda*, with the potential for mariculture in Korea. Journal of Applied Phycology 18: 269–277.

Crowe, J. H., Crowe, L. M., Carpenter, J. F., Aurell Wistrom. 1987. Stabliziation of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. Biochemical Journal 242:1-10.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A.; Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28:350-356.

Fernández, L.E., Valiente, O.G., Mainardi, V., Bello, J.L., Vélez, H. & Rosado, A. 1989. Isolation and characterization of antitumor active agar-type polysaccharide of *Gracilaria domingensis*. Carboydrate Research 190: 77-83.

Haglund, K. & Pedersen. M. 1992. Growth of the red alga *gracilaria tenuistipitata* at high ph. influence of some environmental factors and correlation to na ncreased carbonic-anhydrase activity. Bot Mar 35: 579-587.

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. Biochem. Physiol. Pflanzen (BPP). 167: 191-194.

Karsten, U., Barrow, K. D., Nixdorf, O., King, R. J. 1996. The compatibility of unusual organic osmolytes from mangrove red algae with enzyme activity. Australian Journal of Plant Physiology 23:577–582.

Karsten, U., West, J. A., Ganesan., E. K. 1993. Comparative physiological ecology of Bostrychia moritziana (Ceramiales, Rhodophyta) from freshwater and marine habitats. Phycologia 32:401-409.

Karsten, U., West, J. A., Zuccarello, G. C., Nixdorf, O., Barrow, K. D., King, R. J. 1999. Low molecular weight carbohydrate patterns in the Bangiophyceae (RHODOPHYTA). Journal of Phycology, Lawrence, v. 35, p. 967-976.

Kirst, G.O. 1989. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 40:21-53.

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.

Lobban, C.S. & Harrison, P.J. 1994. Seaweed Ecology and Physiology. Cambridge University Press, Cambridge, 366p.

Oliveira, E.C. 1997. Macroalgas marinhas de valor comercial: técnicas de cultivo. Panorama da Aqüicultura 7: 42-45.

Pengzhan, Y., Quanbin, Z., Ning, L., Zuhong, X., Yanmei, W., Zhi'en, L. 2003. Polysaccharides from Ulva pertusa (Chlorophyta) and preliminary studies on their antihyperlipidemia activity. Journal of Applied Phycology 15:21-27.

Pereira, R.C. & Gomes-Soares, A. 2002. Biologia Marinha. 1ª ed. Editora Interciência. Rio de Janeiro

Raikar, S.V., Iima, M. & Fujita, Y. 2001. Effect of temperature, salinity and light intensity on the growth of *Gracilaria spp.* (Gracilariales, Rhodophyta) from Japan, Malaysia and India. Indian Journal of Marine Science 30: 98-104.

Ramlov F, Souza Jmc, Farias A, Maraschin M, Horta Ph, Yokoya N S 2012 Effects of temperatura, irradiance, and nutrients on the development of carposporelings and

tetrasporophytes in *Gracilaria domingensis* (Kütz.) Sonder ex Dickie (Rhodophyta, Gracilariales). Bot Mar 55: 253 – 259.

Sernapesca. 2003. Anuario estadístico de pesca. Servicio Nacional de Pesca, Ministerio de Economía Fomento y Reconstrucción, Santiago, Chile.

Wilson, A.J. & Critchley, A.T. 1997. Studies on *Gracilaria gracilis* (Stackhouse) Steentoft, Farnham and Irvine and *Gracilaria aculeata* (Hering) Papenfuss from southern Africa. I. The influence of temperature, irradiance, salinity and nitrogen-nutrition on growth. South African Journal of Botany 63: 465-473

Yokoya, N. S. & Oliveira, E. C. 1992. Efectos de la salinidade en la tasa de crescimiento, morfologia y contenido de agua de algunas algas rojas brasileñas de importância economica. Ciencias Marinas 18: 49-64.

Yokoya, N. S. & Oliveira, E. C. 1993. Effects of temperature and salinity on spore germination and sporeling development in South American agarophytes (Rhodophyta). Japanese Journal of Phycology (Sôrui) 41: 283-293.

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.; 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.

Yong, Y.S, Yong, W.T.L, Anton, A. 2013. Analysis of formulae for determination of seaweed growth rate J Appl Phycol 25:1831–1834.

Yu, S., Blennow, A., Bojko, M., Madsen, F., Olsen, C. E., Engelsen, S. B. 2002. Physicochemical characterization of floridean starch of red algae. Starch 54:66-74.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As espécies do gênero *Gracilaria* são alvos de inúmeros estudos, devido a sua relevância econômica como matéria-prima para extração de ágar. Também são utilizadas como fonte de alimento, fornecendo sais minerais essenciais e inúmeras vitaminas, como a espécies *Gracilaria domingensis*. Portanto, estudos sobre o seu desenvolvimento são necessários visando à implantação de um cultivo comercial para a produção sustentável de biomassa, evitando o extrativismo de bancos naturais. Dessa forma o objetivo deste trabalho foi caracterizar fisiologicamente as diferenças entre duas linhagens de *G.domingensis* provenientes de dois locais diferentes, visando fornecer informações sobre condições ótimas de crescimento e limites de tolerância frente a fatores que interferem na produtividade em sistemas de cultivo, como a temperature e irradiância. Podemos concluir que:

- As linhagens ES e SC de *G. domingensis* foram tolerantes a uma ampla variação de temperetatura (15 a 30°C) e apresentaram seu ótimo de crescimento em 25ºC. A linhagem ES apresentou maiores taxas de crescimento em relação a linhagem SC.
- A linhagem ES apresentou maior concentração de proteínas solúveis totais em baixa temperatura (15ºC) enquanto a linhagem SC apresentou maiores concentrações de proteínas em temperaturas altas (25 e 30ºC).
- As linhagens ES e SC foram tolerantes a ampla variação de irradiância e apresentaram as maiores taxas de cresimento nas irradiâncias maiores do que 40 a 60 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} para as linhagens SC e ES, respectivamente e as menores taxas de crescimento foram observadas na irradiância de 20 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}.
- As duas linhagens apresentaram maiores concentrações de proteínas solúveis totais em baixas irradiâncias (20, 40 e 80 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}) do que em altas irradiâncias.
- As maiores concentrações de ficoeritrina e de ficocianina foram observadas na linhagem ES cultivada em baixa irradiância (40 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}) e os menores valores foram observados em altos níveis de irradiância. A concentração de clorofila *a* das duas linhagens diminuiu com o aumento da irradiância, indicando uma fotoaclimatação.

Este trabalho ainda teve como objetivo avaliar os efeitos da variação da salinidade em gametófitos femininos de *G.domingensis* de Santa Catarina, Brasil e foi possível concluir que:

- Os gametófitos femininos de *G.domingensis* foram tolerantes a todas as salinidades testadas (5 a 60 ups) e apresentaram as maiores taxas de crescimento nas salinidades de 25 a 40 ups.
- Nas salinidades mais altas (55 e 60 ups) os gametófitos apresentaram maiores concentrações de carboidratos de baixa massa molecular (CBMM).

Os resultados obtidos indicam que as linhagens ES e SC de *G. domingensis* são euritérmicas e tolerantes a ampla variação de irradiância, o que pode ser explicado pela sua ocorrência em regiões entre-marés dos costões rochosos, ficando exposta a altos níveis de irradiância e de temperatura. Entretanto, as baixas irradiâncias de saturação para o crescimento destas linhagens indicam que *G. domingensis* é uma espécie adaptada a ambientes com baixos níveis de irradiância.

Os gametófitos femininos de *Gracilaria domingensis* provenientes de SC são eurialinos, apresentando amplos limites de tolerância à variação de salinidade (5 a 60 ups), em altas salinidades, podem acumular maiores concentrações de CBMM, uma vez que esses carboidratos podem atuar como osmólitos orgânicos, que são responsáveis para a manutenção da pressão de turgor, evitando a plasmólise celular.

Considerando o conjunto dos resultados obtidos no presente trabalho, espera-se que esses dados possam ser utilizados em sistemas de cultivo de *G. domingensis*, visando uma maior produtividade e reduzindo o extrativismo a partir de bancos naturais e contribuindo para sua conservação.