

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE AQUICULTURA
CURSO DE ENGENHARIA DE AQUICULTURA

Rebeka Lehner

**EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NUTRIENTES NO CULTIVO IN VITRO DA
MACROALGA *Ulva* sp.**

Florianópolis

2019

Rebeka Lehner

**EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NUTRIENTES NO CULTIVO IN VITRO DA
MACROALGA *Ulva* sp.**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em
Engenharia de Aquicultura do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina
como requisito para a obtenção do título de Bacharel em
Engenharia de Aquicultura.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Leila Hayashi

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra

Lehner, Rebeka

Efeito da concentração de nutrientes no cultivo in vitro da macroalga
Ulva sp. / Rebeka Lehner; orientadora, Leila Hayashi, 2019.
39 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade
Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,
Graduação em Engenharia de Aquicultura,
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Engenharia de Aquicultura. 2. Cultivo in vitro. 3. Indução
à esporulação. 4. Reprodução de *Ulva* sp. 5. Macroalgas. I. Hayashi,
Leila. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Engenharia de Aquicultura. III.
Título.

Rebeka Lehner

**EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NUTRIENTES NO CULTIVO IN VITRO DA
MACROALGA *Ulva* sp.**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de bacharelado em Engenharia de Aquicultura e aprovado em sua forma final pelo Curso de Engenharia de Aquicultura

Florianópolis, 26 de novembro de 2019.

Prof. Dr. Vinicius Ronzani Cerqueira
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dr.^a Leila Hayashi
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr.^a Carmen Simioni
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Msc. Thallis Felipe Boa Ventura
Avaliador
Secretaria da Educação do Estado de São Paulo

Dedico às meninas e mulheres para que nunca se esqueçam: não existe “seu lugar”, até o momento em que você simplesmente deseje um. Seu lugar será sempre onde você quiser!

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Adriana e Odin que, dentro do possível, puderam me proporcionar condições para acessar e permanecer em uma universidade pública gratuita e de qualidade, que ainda é, infelizmente, tão seletiva nesses quesitos.

À universidade por me proporcionar um crescimento além da esfera intelectual específica, mas também nas esferas de consciência política, justiça social, cidadania, meio ambiente, igualdade de gênero, entre tantas outras responsáveis por moldar seres humanos encorajados a construir um mundo com um olhar mais justo, solidário e responsável. Fora bozo!

Aos meus professores responsáveis, em grande parte, por apontar o caminho, bem como seus buracos e lombadas ao seu decorrer - elementos importantíssimos para a nossa evolução pessoal e profissional. Em especial à minha orientadora Leila por ter me acolhido com carinho e me ajudado em realizar esse trabalho tão desafiador e bonito. ♥

Aos servidores, técnicos (em especial Valmor e Jorge da informática) e terceirizados que trabalham de forma conjunta e contribuem para manter a universidade na sua plena excelência seja na qualidade de ensino, pesquisa e extensão, seja na limpeza dos ambientes (Dona Helena, Seu Otávio) seja no restaurante universitário (Raquel) e ainda na secretaria do curso.

Quanto à secretaria, esta merece um destaque principal a uma pessoa chamada Jussara Orige Bach Gonçalves. Jussara da lenda tupi era uma mulher guerreira, valente, corajosa e que possuía grandes habilidades de resolver problemas. E assim é a nossa Ju da secretaria, uma grande mulher com uma capacidade e sensibilidade para resolver problemas, sempre com o maior sorriso e alegria que melhora o nosso dia só de escutar um: “Oh, meu amor!”. Tão adorada por todos, nosso porto seguro da aquicultura merece todo o meu reconhecimento que, infelizmente, não é passível de ser pleno nessas poucas palavras que aqui escrevo. Muito obrigada por toda a sua gentileza. ♥

Aos meus amigos que estiveram comigo na UNIFESP (Santos meu amôôrr) como na UFSC, e aos meus colegas de turma pelos perrengues e risadas compartilhados. Em especial às minhas amigas de guerra Carol (a palhaça colorida), Tayná (a cobrinha) e Laila (a artista e engenheira), com as quais compartilhei e compartilho tantas risadas, alegrias, debates, decepções e preocupações. Obrigada, demônias. ♥

Aos meus colegas do laboratório de macroalgas, Fernando (“o técnico”) e Tati (a “quebra barraco”, só porque ela odeia), que me ajudaram de alguma forma em meu experimento e até aguentaram meu período de estresse (risadas).

Aos colegas do LMM, em especial aos “meus quirídos” Tatu (o que demora para entender a piada e me obriga a cantar Dazaranha, mesmo não gostando), Duda (o pai da larvicultura e da caipirinha), Chico (o chefinho da produção), João (o do crossfit), Gui (o da vieira), Luisa (a do carinha), Rita (a que não gostava de manézinho, até conviver dois anos com eles), Vanessa (a Maricotinha do lab), Grazi (a conselheira), Gabi (a do berbigão), Cássio (o remador good vibes), Aninha (a do melhor café) e o Alexandre (o do melhor churrasco) que também fizeram parte da minha história acadêmica e pessoal. Muito obrigada a todos. ♥

E por último à minha pessoa por enfrentar todos os desafios me colocados e tê-los vencidos, em sua maioria, com muita garra e persistência. Assim, agradeço à Rebeka de 17 anos que entrou na universidade e, sem medo, permitiu-se sair dela a Rebeka atual a qual me orgulho tanto. ♥

“Que nada nos limite, que nada nos defina, que nada nos sujeite. Que a liberdade seja nossa própria substância, já que viver é ser livre. Porque alguém disse e eu concordo que o tempo cura, que a mágoa passa, que decepção não mata. E que a vida sempre, sempre continua.”

(Simone de Beauvoir)

RESUMO

O cultivo da macroalga *Ulva* sp. ainda está em desenvolvimento no Brasil, diferente de outros países que dominam sua produção em escala comercial. O maior desafio em relação a domesticação desse gênero é estabelecer protocolos que induzam à sua esporulação. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de 3 diferentes concentrações de solução nutritiva de von Stosch para a indução à esporulação de talos seccionados. O experimento foi realizado com três tratamentos utilizando diferentes concentrações da solução nutritiva de von Stosch (10, 15 e 20 mL L⁻¹ – T10, T15 e T20, respectivamente) com 4 repetições para cada tratamento, durante 17 dias de cultivo separados em duas etapas (0-8 dias e 8-17 dias). Como controle (C), as algas foram cultivadas apenas em água do mar. Foram analisados: a taxa de crescimento (% dia⁻¹) dos esporófitos após a indução, a contagem média de plântulas por mm², o percentual de repetições com plântulas viáveis e o desenvolvimento das plântulas cultivadas até 37 dias. O efeito das concentrações de nutrientes sobre a quantidade de plântulas e na taxa de crescimento dos esporófitos após indução não foi significativo. Os resultados mostraram que as taxas de crescimento dos esporófitos de acordo com cada tratamento durante 17 dias foram $6,61 \pm 1,42$ % dia⁻¹ (T10), $6,43 \pm 2,29$ % dia⁻¹ (T15) e $2,78 \pm 2,69$ % dia⁻¹ (T20). Em relação a contagem média de plântulas por mm², T10, T15 e T20 apresentaram na primeira etapa 3,2; 4 e 2,3 plântulas por mm², respectivamente. Na segunda etapa, os valores foram 0,074; 0,76 e 0,074 plântulas por mm², respectivamente. Esses resultados sugerem que no T15, houve uma maior alocação de tecido vegetativo dos esporófitos para o processo de reprodução. Em relação ao percentual de repetições viáveis, na primeira etapa de quatro réplicas do T10, 2 foram viáveis (50%); em T15 e T20, de quatro réplicas cada, apenas 1 foi viável em cada tratamento (25%). Na segunda etapa, de quatro réplicas dos tratamentos T10 e T15, 3 foram viáveis para cada tratamento (75%) enquanto T20 teve as quatro réplicas viáveis (100%). O desenvolvimento das plântulas cultivadas apresentou diferentes tipos de morfologias, as quais podem ser descritas como estruturas alongadas, rosetas regulares e irregulares, folhas longas, largas e arredondadas. Considerando que todos os tratamentos, exceto o controle, apresentaram resultados quanto ao processo de esporogênese, diante dos resultados obtidos, o T15 é indicado para a indução de esporulação, porém é necessário que a metodologia seja aperfeiçoada de modo a contribuir para um protocolo definitivo.

Palavras-chave: Aquicultura. Macroalga *Ulva* sp. Esporulação.

ABSTRACT

The cultivation of the seaweed *Ulva* sp. has still been developed in Brazil, unlike other countries which dominate the production in commercial scale. The biggest challenge regarding the domestication of this genus is the definition of protocols that induce sporulation. Thus, the present work aimed to evaluate the effect of 3 different concentrations of von Stosch nutrient solution in the sporulation induction of sectioned thalli. The experiment was carried out with three treatments using different concentrations of von Stosch nutrient solution (10, 15 and 20 mL L⁻¹ – T10, T15 and T20) with 4 replicates for each treatment, during 17 days of cultivation, separated in two phases (0- 8 days and 8-17 days). As control, seaweeds were cultivated just in seawater. The growth rate (% day⁻¹) of the sporophytes after induction, the average seedlings per mm², the percentage of viable seedling repetitions and the seedling development cultivated up to 37 days were analyzed. There were no significant differences in the effect of nutrient concentrations on seedling quantity as well as on the growth rate of sporophytes after sporulation. Results showed that the growth rates of the sporophytes for 17 days were 10 mL L⁻¹ (6.61 ± 1.42 % day⁻¹), 20 mL L⁻¹ (6.43 ± 2.29 % day⁻¹) and 15 mL L⁻¹ (2.78 ± 2.69 % day⁻¹). Regarding the average seedling per mm², T10, T15 and T20 presented, in the first phase 3.2, 4 and 2.3 seedlings per mm² respectively. In the second phase, the seedlings presented in the same treatments 0.074; 0.76 and 0.074 seedlings per mm². These results suggest that in T15 greater allocation of vegetative tissue of sporophytes to the reproduction process had happened. In relation to the percentage of viable repetitions, in the first stage from four replicates, 2 were viable (50%) in T10; in T15 and T20, from four replicates only 1 was viable in each treatment (25%). In the second stage, from four replicates, 3 were viable for T10 and T15 (75%) while T20 had the four viable replicas (100%). The development of cultivated seedlings presented different types of morphologies, which can be described as elongated structures, regular and irregular rosettes, long, broad and rounded leaves. Considering that all treatments, except the control, presented results regarding the sporogenesis process, according to the results, the T15 is indicated to induce the process of sporulation; however, the improvement of the methodology is necessary in order to contribute to a definitive protocol.

Keywords: Aquaculture. Macroalgae *Ulva* sp. Sporulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do gênero <i>Ulva</i>	15
Figura 2. Coleta das algas na praia da Armação, Florianópolis-SC.....	19
Figura 3. a: A seta indica o esbranquiçamento da região marginal do talo. b: A seta indica o corte realizado ao redor do comprimento padronizado. Escala: 1 cm.....	20
Figura 4. a: Primeira etapa de indução. b: Segunda etapa de indução.....	21
Figura 5. a: Esporos germinados assentados no frasco. b: Desprendimento dos esporos. c: Esporos livres.	22
Figura 6. Plântulas na câmara de Neubauer em microscópio (aumento 4x).	22
Figura 7. Taxa média de crescimento (% dia ⁻¹) dos esporófitos por controle e tratamento na primeira etapa (0-8 dias). As barras representam os desvios padrões.	24
Figura 8. Taxa média de crescimento (% dia ⁻¹) dos esporófitos por controle e tratamento na segunda etapa (8-17 dias). As barras representam os desvios padrões.	24
Figura 9. Taxa média de crescimento (% dia ⁻¹) dos esporófitos por controle e tratamento ao longo do experimento (0-17 dias). As barras representam os desvios padrões.....	25
Figura 10. Contagem média de plântulas por mm ² por tratamento e controle (1 ^a etapa). As barras representam os desvios padrões.....	26
Figura 11. Contagem média de plântulas por mm ² por tratamento e controle (2 ^a etapa). As barras representam os desvios padrões.....	26
Figura 12. Morfologias por tratamento referentes à primeira etapa, com 37 dias de cultivo. a, b: T10; c: T15; d, e: T20. Escala: 1 cm.	29
Figura 13. Morfologias referentes ao T10 apresentadas na segunda etapa, com 30 dias de cultivo. Escala: 1 cm.....	29
Figura 14. Morfologias referentes ao T15 apresentadas na segunda etapa, com 30 dias de cultivo. Escala: 1 cm.....	30
Figura 15. Morfologias referentes ao T20 apresentadas na segunda etapa, com 30 dias de cultivo. Escala: 1 cm.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química da solução von Stosch (Edwards, 1970), modificado por Yokoya (2000).....	20
Tabela 2. Biomassa (mg) dos talos seccionados (média ± desvio padrão)	23
Tabela 3. Características descritivas e comparativas de desenvolvimento.	27

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo Geral.....	17
1.1.2	Objetivos Específicos	18
2	MATERIAIS E MÉTODOS	18
2.1	LOCAL DE ESTUDO	18
2.2	LOCAL DE COLETA E TRANSPORTE DE AMOSTRAS.....	18
2.3	INDUÇÃO À ESPORULAÇÃO.....	19
2.4	DESENVOLVIMENTO DAS PLÂNTULAS	22
2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
3	RESULTADOS	23
4	DISCUSSÃO	31
5	CONCLUSÃO.....	33
	REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

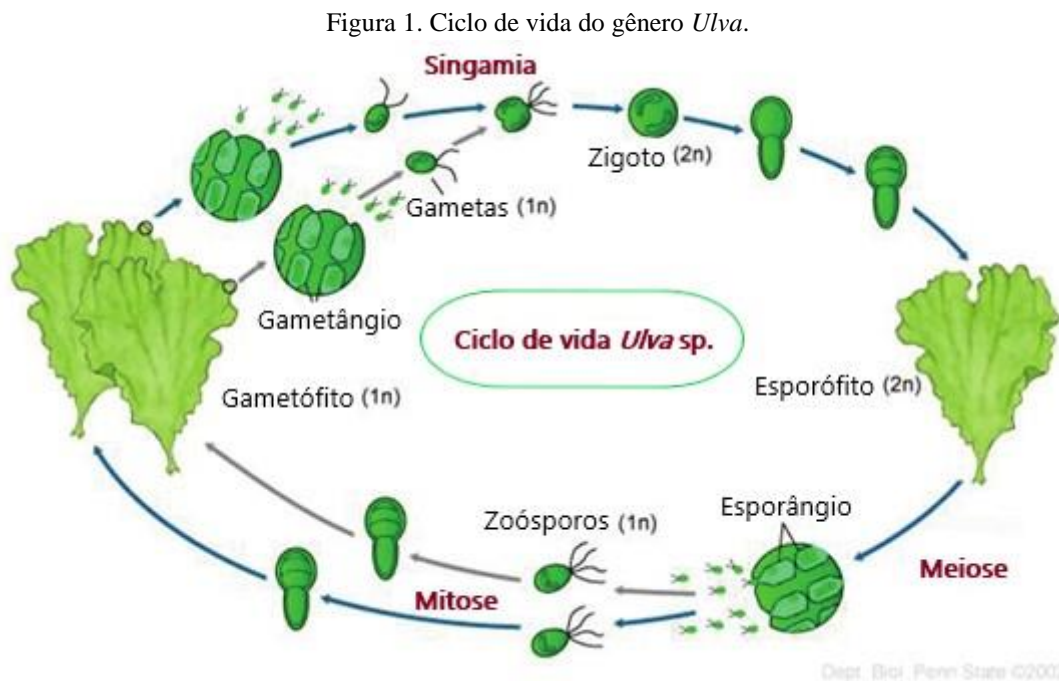
As macroalgas marinhas apresentam uma grande relevância não somente ecológica, mas também do ponto de vista econômico, pois sintetizam compostos bioativos, proteínas, vitaminas, minerais, carotenoides e ácidos graxos (KUMAR *et al.*, 2008). Por esse motivo, são utilizadas mundialmente por diversos setores produtivos tanto de forma direta na alimentação quanto indireta, como na produção de fármacos e cosméticos (McHUGH, 2003; BIXLER & PORSE, 2010). Na alimentação humana, são utilizadas na forma de salada, cozida, secas e trituradas para confecção de temperos, como o "aonori" ou o "furikake" (MOURITSEN, 2009). Dessa forma, as macroalgas estão inseridas num cenário de grande relevância econômica mundial, o qual é evidenciado através dos dados da FAO (2018) que mostram um crescimento na produção de macroalgas de 13,5 milhões de toneladas em 1995 para um pouco mais de 30 milhões de toneladas em 2016. O principal contribuinte para esse crescimento, segundo a FAO (2018), foi a demanda por carragenana, matéria-prima extraída de macroalgas como *Kappaphycus alvarezii* e *Eucheuma* spp.

No Brasil, a produção de macroalgas por setores produtivos ainda é pequena. Atualmente, as produções de que se tem registros são voltadas para a espécie introduzida *Kappaphycus alvarezii* (cultivada na região Sudeste) e as espécies nativas de *Gracilaria* no Nordeste, ambas cultivadas em pequena escala (HAYASHI *et al.*, 2014; REBOURS *et al.*, 2014; CASTELAR *et al.*, 2015). O potencial do Brasil para a produção de macroalgas é grande, quando se analisa os fatores importantes para o seu sucesso, como clima tropical e subtropical, condições oceanográficas favoráveis, ambientes de baías e estuários e um litoral de 8.000 km de extensão (OLIVEIRA, 2006; CASTELAR *et al.*, 2015). Essas condições propiciam, por exemplo, a ocorrência de 12 espécies da macroalga do gênero *Ulva* pelo Brasil, as quais podem ser encontradas em águas marinhas, em estuário e águas continentais, dentro dos seus valores de salinidade tolerantes (MOURA, 2010).

A espécie *Ulva* sp. pertence ao Filo Chlorophyta, Ordem Ulvales e Família Ulvaceae. Conhecida como alface do mar, possui coloração esverdeada translúcida e talos foliáceos. Possui organização parenquimatosa, em forma de lâmina expandida, composta por duas camadas de células contendo um grande cloroplasto cada (JOLY, 1965; LEE, 2008; GRAHAM; GRAHAM; WILCOX, 2009). Apesar da *Ulva* ser organizada com pouca diferenciação funcional dentro do talo, este consiste em pelo menos dois tipos de células: células rizoides, nas partes basais, e células da fronde, nas partes marginais do talo (GAO *et al.*, 2017a). Quanto à

sua parede celular, é constituída por polissacarídeos solúveis em água, denominados ulvana, que representam de 8-29% da massa seca da alga (LAHAYE & ROBIC, 2007).

O ciclo de vida da *Ulva* pode ser diplobionte isomórfico com uma fase gametofítica mitótica e uma fase esporofítica meiótica (Figura 1). A fase gametofítica envolve a liberação de gametas femininos ou masculinos por mitose pelos gametófitos (n). Os gametas, que são biflagelados, fecundam-se formando um zigoto tetraflagelado, que perderá seus flagelos no processo de crescimento e se tornará um esporófito (2n). Na fase esporofítica, o esporófito forma zoósporos tetraflagelados (n) por meiose. Esses esporos são liberados no meio aquático e a fase é evidenciada pelo embranquecimento da região marginal do talo. Os zoósporos dão origem então ao longo de seu processo de crescimento aos gametófitos (n). Os gametas possuem fototaxia positiva enquanto os zoósporos apresentam fototaxia negativa (RAVEN *et al.*, 2008).



Fonte: Penn State University, 2002. Modificações feitas pela autora.

Espécies do gênero *Ulva* possuem crescimento rápido e são capazes de formar bancos naturais em costões rochosos na zona de entremarés, devido à sua alta eficiência em absorver compostos nitrogenados e fósforo – provindos em sua maior parte de escoamento terrestre. Essa capacidade confere ao gênero a oportunidade de colonizar e dominar facilmente ambientes eutrofizados. Os ambientes, como orlas marinhas, acabam por muitas vezes em provocar “blooms” em decorrência do aumento rápido de sua biomassa no ambiente (YE *et al.*, 2011). Dessa forma, as espécies do gênero *Ulva* possuem grande potencial no desenvolvimento

sustentável da aquicultura, podendo ser utilizadas de forma a biorremediar ambientes com excesso de nutrientes como amônia e fósforo - produtos do efluente de cultivo de organismos aquáticos - demonstrando alto potencial de uso em sistemas multitróficos integrados com sistema de recirculação (HAYASHI *et al.*, 2008; NEORI, 2008; MARINHO *et al.*, 2013).

Segundo trabalho realizado por Cohen & Neori (1991) utilizando a macroalga *Ulva lactuca* como biofiltro para a remoção de amônia provinda de efluentes de viveiros de cultivo intensivo de peixes, os resultados obtidos indicam que 10 m² de macroalga podem remover mais de 90% de amônia produzida para cada 1 kg de ração diária. Segundo Alencar (2005), em um trabalho de cultivo integrado de *Ulva* e camarões marinhos usando sistema de recirculação, observou uma melhora no crescimento dos camarões em 7,5% em densidade de 1,5 g L⁻¹; além disso, foi observado que a alga reduziu, durante 50 dias, as concentrações de amônia em 94% e ortofosfato em 39,5% do sistema. Costa (2006), obteve resultados de 83% de remoção de NH₄⁺ e NO₃⁻ em viveiros de camarão, demonstrando assim a eficiência da macroalga para a biofiltração.

Embora a *Ulva* sp. tenha todos esses potenciais mencionados, a produção desse gênero ainda é restrita a Ásia, em países como China, Japão e Coreia (OHNO, 2006), por três principais motivos: consumo alimentar cultural, baixa produção de biomassa (alga foliácea) e necessidade de recrutamento de esporos para reprodução, seja no ambiente natural ou de forma induzida em laboratório, pois o cultivo nesses países não são feitos apenas por propagação vegetativa (ruptura e crescimento do talo) (CASTELAR *et al.*, 2014). Dessa forma, é importante compreender os principais fatores que induzem a *Ulva* sp. à reprodução. Segundo Hiraoka & Enomoto (1998), as células vegetativas são transformadas em células reprodutivas de forma induzida por fatores intrínsecos e extrínsecos. De acordo com Lobban & Harrison (1994), os principais fatores que promovem a esporulação em grande parte das espécies de macroalgas estão ligados principalmente à qualidade e quantidade de luz, fotoperíodo e a temperatura.

Em espécies como *Ulva lactuca*, até 60 % da biomassa total pode ser alocada mensalmente para reprodução, dependendo da estação do ano (NORDBY & HOXMARK, 1972; NIESENBAUM, 1988). Niesenbaum (1988) observou que quando as temperaturas atingiram máximas sazonais em Groton, EUA, a biomassa de *Ulva lactuca* para a formação e liberação de gametas e zoósporos foi maior, enquanto a taxa de substituição vegetativa diminuiu quando as temperaturas se tornaram subótimas e depois inibitória para o crescimento. Isso poderia explicar os aumentos em porcentagem de tecido reprodutivo durante agosto e setembro, ou seja, nos meses mais quentes nos EUA. Além disso, a liberação de esporos para a espécie

Ulva intestinalis são impulsionadas por ciclos lunares (CHRISTIE & EVANS, 1962; PRINGLE, 1986). A formação e liberação de zoósporos e gametas de *Ulva*, em ambientes temperados, são induzidos por estímulos incluindo desidratação (SMITH, 1947; CORRADI *et al.*, 2006), escuridão estendida durante vários dias (CORRADI *et al.*, 2006; THIADENS *et al.*, 1967), fragmentação (DAN *et al.*, 2002; NORDBY *et al.*, 1972; GAO *et al.*, 2010), renovação do meio de cultura (THIADENS *et al.*, 1967; KUWANO *et al.*, 2012), salinidade (DAN *et al.*, 2002) e mudança de temperatura (NORDBY *et al.*, 1972; NORDBY *et al.*, 1974; BRATEN *et al.*, 1973; NIESENBAUM, 1988).

Dessa forma, segundo Castelar *et al.*, (2014), os estresses abióticos são capazes de induzir a *Ulva* à esporulação em ambientes tropicais. Esse trabalho testou alguns métodos para a indução de formação de esporos em condições controladas de laboratório como choque osmótico; dessecação, (também avaliado por Carl *et al.*, 2014); alta concentração de nutrientes (como testado também por Barbosa, 2014); ruptura do talo (realizado também por Nordby, 1977 e Carl *et al.*, 2014); e alta irradiância. O tratamento que proporcionou maior número de esporos liberados foi através da utilização de alta concentração de nutrientes (CASTELAR *et al.*, 2014). Já a temperatura associada à fragmentação do talo foi verificada por Nordby (1977) para a *Ulva mutabilis* e mostrou bons resultados para as temperaturas de 21 a 22 °C. Para a salinidade, Mantri *et al.*, (2011) mostrou bons resultados para a *Ulva fasciata* na salinidade de 15‰. Portanto, choques utilizando estresses abióticos são métodos eficientes de indução à esporulação e obtenção de recrutas de *Ulva* sp. in vitro (OHNO, 2006).

O Laboratório de Camarões Marinhos da UFSC, trabalha com linhas de pesquisas voltadas a cultivos multitróficos integrados (IMTA). Dessa forma, a utilização da *Ulva* sp. como componente biorremediador de compostos nitrogenados nesses tipos de cultivo vem apresentando uma forte demanda. Por conta disso, surge a necessidade de cultivar a própria *Ulva* sp., possibilitando a formação e manutenção de cepas em laboratório na Seção de Macroalgas. Para tanto, é necessário compreender quais são os parâmetros que influenciam no processo de esporulação da *Ulva* para estabelecer um protocolo de cultivo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Determinar a influência da quantidade de nutrientes no processo de esporulação, de modo a contribuir futuramente para o estabelecimento de um protocolo de reprodução e manejo para a macroalga *Ulva* sp. na Seção Macroalgas do LCM-UFSC.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar e comparar 3 diferentes concentrações de solução nutritiva de von Stosch para a indução à esporulação (10, 15 e 20 mL L⁻¹);
- Avaliar a taxa de crescimento dos esporófitos após a esporulação;
- Analisar o desenvolvimento das plântulas cultivadas nos diferentes tratamentos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 LOCAL DE ESTUDO

O presente trabalho foi realizado na Seção de Macroalgas pertencente ao Laboratório de Camarões Marinhos da UFSC, localizado na Estação de Maricultura Professor Elpídio Beltrame, situado no bairro Barra da Lagoa em Florianópolis – SC.

2.2 LOCAL DE COLETA E TRANSPORTE DE AMOSTRAS

As algas foram coletadas em setembro de 2019 na praia da Armação do Pântano do Sul, localizada na cidade de Florianópolis – SC (Figura 2). A temperatura da água do mar se encontrava por volta dos 19 °C e a maré a 0,6 m.

Os espécimes de *Ulva* sp. foram acondicionadas em uma caixa de isopor contendo água do mar e transportada de carro para o laboratório. No laboratório, foram transferidas para uma caixa de plástico de 60 L com água do mar esterilizada à temperatura de 19 °C para a retirada de epífitas e macrofauna presentes. Após a triagem, as algas foram separadas para o início do experimento no laboratório.

Figura 2. Coleta das algas na praia da Armação, Florianópolis-SC.



2.3 INDUÇÃO À ESPORULAÇÃO

Delineamento experimental

Para induzir à esporulação, diferentes concentrações de nutrientes foram testadas, com base em Castelar *et al.*, (2014), com modificações. A esporulação foi evidenciada pelo esbranquiçamento das células da região periférica do talo, visíveis a olho nu (Figura 3a).

As algas foram cultivadas em temperatura de 24 ± 1 °C, irradiância de 100 ± 20 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, salinidade de 35 ± 1 ‰, fotoperíodo de 12 horas em água do mar esterilizada enriquecida com solução nutritiva von Stosch (Tabela 1) em 3 diferentes concentrações: 10 mL L^{-1} (T10); 15 mL L^{-1} (T15) e 20 mL L^{-1} (T20). No controle (C), as algas foram cultivadas apenas em água do mar esterilizada. Foram realizadas 4 réplicas para cada tratamento e controle ($n=4$). Foram utilizados frascos de vidro de 100 mL, com um volume útil de 50 mL água do mar esterilizada em luz U.V. Foram realizadas secções de diferentes talos tendo como base um comprimento padrão de 1,8 cm e, a partir dessa medida, foi cortado seu entorno (Figura 3b). Esses talos foram secos com auxílio de papel absorvente para remoção do excesso de água e pesados (g) através de uma balança analítica de precisão para acompanhar as possíveis perdas de biomassa ao longo do processo de esporulação. Essa pesagem ocorreu uma vez por semana, assim como a troca de meio de cultura, durante os **17** dias de cultivo.

Figura 3. **a:** A seta indica o esbranquiçamento da região marginal do talo. **b:** A seta indica o corte realizado ao redor do comprimento padronizado. Escala: 1 cm.



Fonte: autora.

Tabela 1. Composição química da solução von Stosch (Edwards, 1970), modificado por Yokoya (2000).

Componentes	Quantidade para cada L de solução
NaNO ₃	5,3125 g
Na ₂ HPO ₄	1,3438 g
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,0248 g
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,4650 g
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,0348 g
Tiamina	0,0125 g*
Biotina	0,000625 g*
Cianocobalamina	0,000625 g*

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

Para o cálculo da taxa de crescimento dos talos (TC) foi utilizada a fórmula proposta por Yong, Yong & Anton (2013).

$$TC = \left[\left(\frac{Bf}{Bi} \right)^{1/t} - 1 \right] \times 100$$

Onde, Bf = biomassa final; Bi = biomassa inicial; t = tempo em dias

Primeira etapa de indução (0 – 8 dias)

Cada talo seccionado foi introduzido em um frasco de vidro (Figura 4a) e, após 7 dias de cultivo, foram mantidos no escuro por 24 horas conforme Ohno (2006), para o assentamento dos esporos (FLETCHER & CALLOW, 1992). Após o período de assentamento (Figura 5a), os esporos assentados foram desprendidos do fundo dos frascos com o auxílio de uma haste de madeira (Figura 5b), homogeneizados (Figura 5c) e uma amostra de 1 μ L foi retirada para a contagem na câmara de Neubauer. Posteriormente, seus meios de cultivo foram renovados e os esporos cultivados nas mesmas condições.

Segunda etapa de indução (8 – 17 dias)

Os talos (esporófitos) retirados dos frascos da primeira etapa foram secos em papel toalha para a remoção de excesso de água, pesados, e colocados em novos frascos nas mesmas condições anteriores, com as mesmas concentrações de von Stosch, para indução da segunda etapa de esporulação, por mais 9 dias (Figura 4b). Todos os procedimentos da primeira etapa foram realizados de forma igual para a segunda etapa. Após a contagem na câmara de Neubauer, os esporos da segunda etapa também foram cultivados com as mesmas concentrações de von Stosch. Posteriormente, ambas as etapas tiveram suas plântulas transferidas para Erlenmeyers de 250 mL para dar continuidade aos cultivos.

Figura 4. **a:** Primeira etapa de indução. **b:** Segunda etapa de indução.

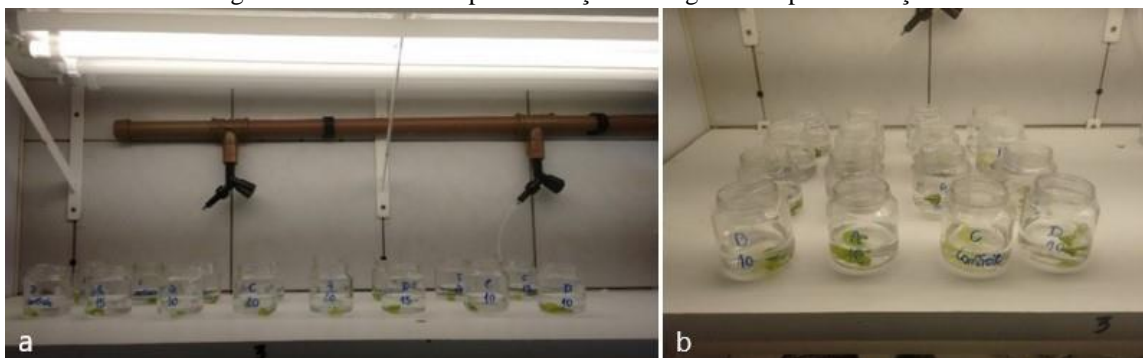
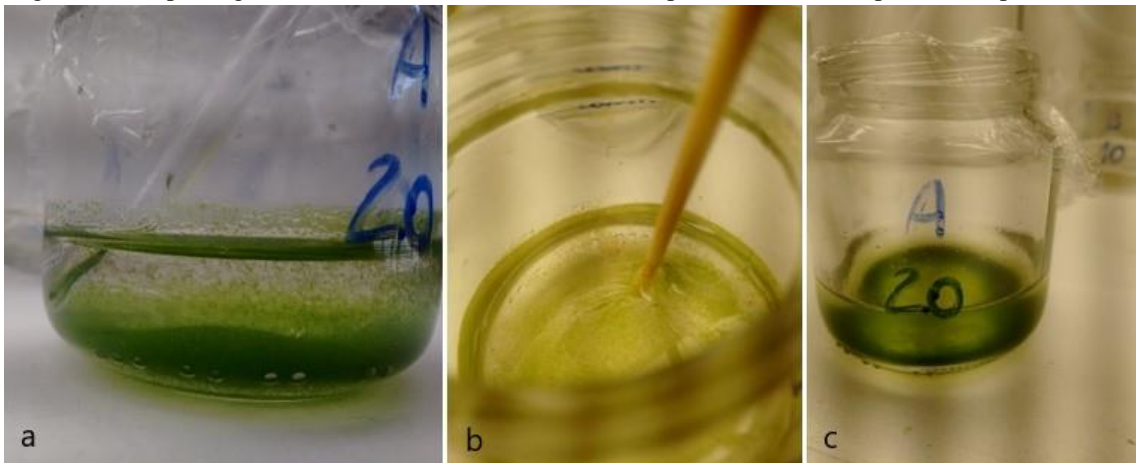
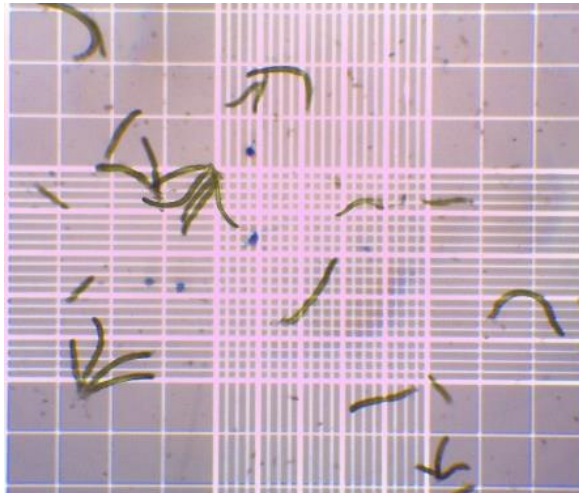


Figura 5. **a:** Esporos germinados assentados no frasco. **b:** Desprendimento dos esporos. **c:** Esporos livres.



O efeito dos nutrientes na esporulação foi avaliado pela contagem média de plântulas para cada repetição por tratamento. Para isso, foram realizadas três contagens para cada repetição, utilizando uma câmara de Neubauer com uma área total de 9 mm².

Figura 6. Plântulas na câmara de Neubauer em microscópio (aumento 4x).



2.4 DESENVOLVIMENTO DAS PLÂNTULAS

As plântulas resultantes da primeira e segunda etapas de esporulação foram cultivadas nos diferentes tratamentos, com trocas de cultura semanalmente, por 37 e 30 dias, respectivamente. Após esse período, a morfologia das plântulas nos diferentes tratamentos foi descrita e o percentual de repetições com plântulas viáveis foi contabilizado. O percentual foi

verificado em relação a quantidade de réplicas totais viáveis por tratamento, ao final do experimento, pela quantidade de réplicas iniciais totais por tratamento, exceto o controle.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise de variância unifatorial (ANOVA) foi utilizada para verificar se as diferentes concentrações de von Stosch tiveram efeito significativo no ganho de biomassa (mg) dos esporófitos ao longo do experimento, bem como na quantidade de esporos germinados. Os dados foram analisados quanto a normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Cochran) para que a realização da ANOVA fosse válida. Para isso, foi utilizado o Programa PAST 2001 (HAMMER *et al.*, 2001).

3 RESULTADOS

Taxa de crescimento dos talos induzidos

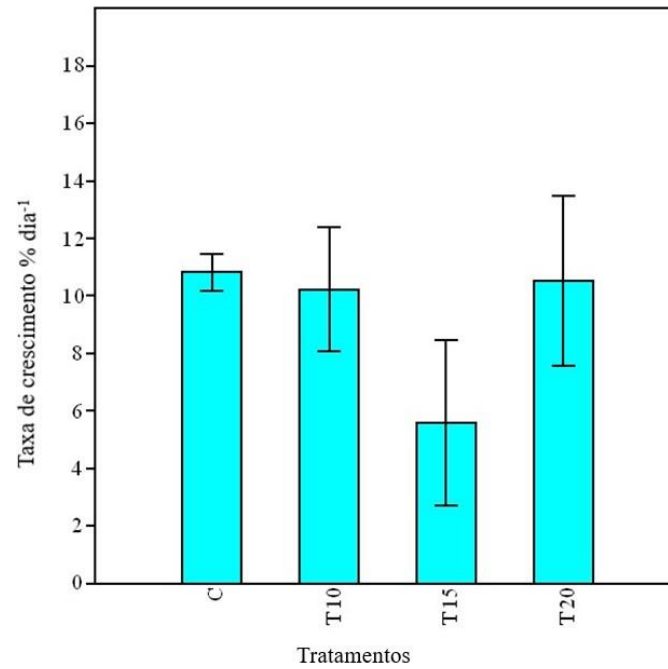
A Tabela 2 mostra a biomassa média úmida (g) dos talos seccionados por tratamento no início e ao longo dos 17 dias de experimento.

Tabela 2. Biomassa (mg) dos talos seccionados (média \pm desvio padrão)

Biomassa média úmida dos talos seccionados (mg)			
Tratamento	0 dia	8 dias	17 dias
Controle	17,43 \pm 1,87	40,03 \pm 6,55	49,00 \pm 9,89
10	19,08 \pm 4,23	40,88 \pm 6,84	55,63 \pm 8,07
15	20,28 \pm 3,62	31,98 \pm 10,29	34,98 \pm 15,07
20	17,85 \pm 4,50	38,55 \pm 5,38	50,03 \pm 6,71

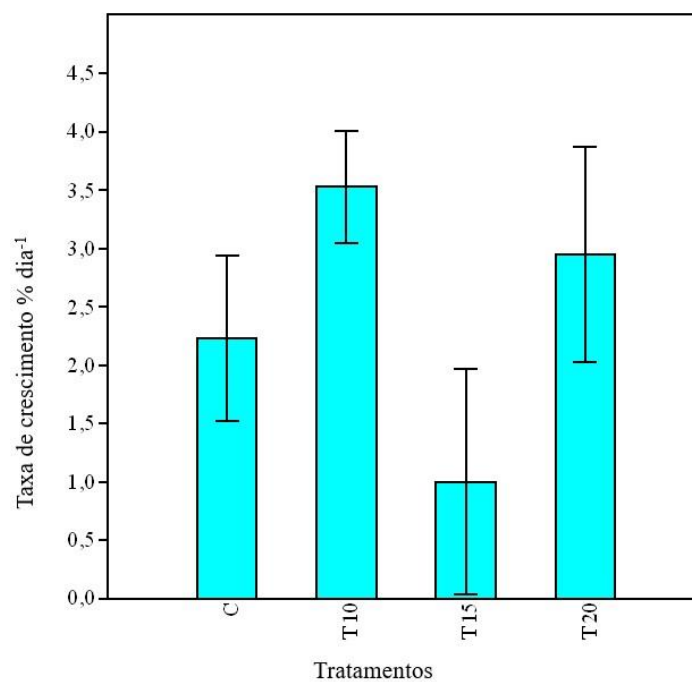
A Figura 7 apresenta os dados de crescimento na primeira etapa de experimento, onde o controle e os tratamentos obtiveram os seguintes valores em relação a taxa de crescimento: 10,83 \pm 1,11 % dia⁻¹ (C); 10,23 \pm 3,72 % dia⁻¹ (T10); 5,37 \pm 5,20 % dia⁻¹ (T15) e 10,52 \pm 5,12 % dia⁻¹ (T20).

Figura 7. Taxa média de crescimento (% **dia**⁻¹) dos esporófitos por controle e tratamento na primeira etapa (0-8 dias). As barras representam os desvios padrões.



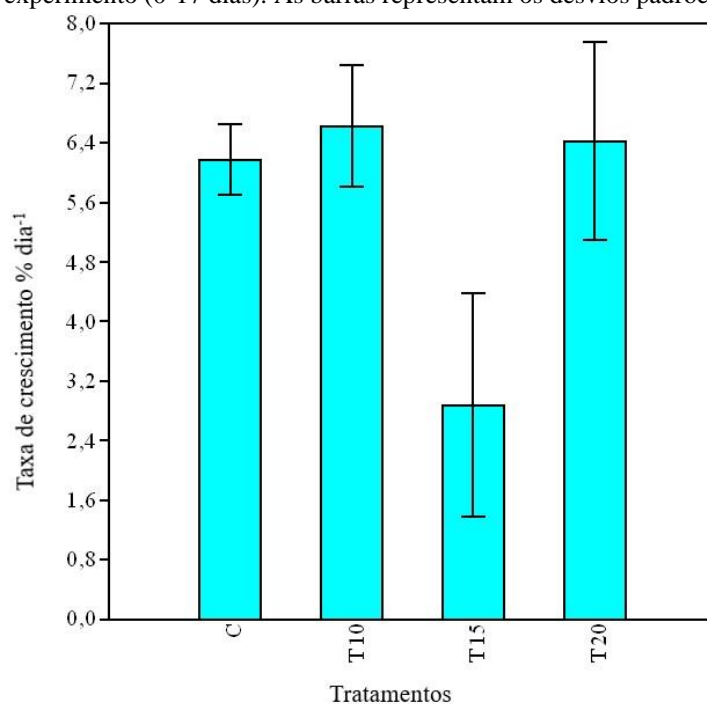
Na segunda etapa os valores foram: $2,21 \pm 1,24$ % dia⁻¹ (controle); $3,53 \pm 0,81$ % dia⁻¹ (T10); $0,59 \pm 2,00$ % dia⁻¹ (T15) e $2,98 \pm 1,59$ % dia⁻¹ (T20) (Figura 8).

Figura 8. Taxa média de crescimento (% **dia**⁻¹) dos esporófitos por controle e tratamento na segunda etapa (8-17 dias). As barras representam os desvios padrões.



De forma geral, ao longo de todo o experimento, as taxas de crescimento foram: $6,18 \pm 0,83 \text{ \% dia}^{-1}$ (C); $6,61 \pm 1,42 \text{ \% dia}^{-1}$ (T10); $2,78 \pm 2,69 \text{ \% dia}^{-1}$ (T15) e $6,43 \pm 2,29 \text{ \% dia}^{-1}$ (T20) (Figura 9).

Figura 9. Taxa média de crescimento (\% dia^{-1}) dos esporófitos por controle e tratamento ao longo do experimento (0-17 dias). As barras representam os desvios padrões.



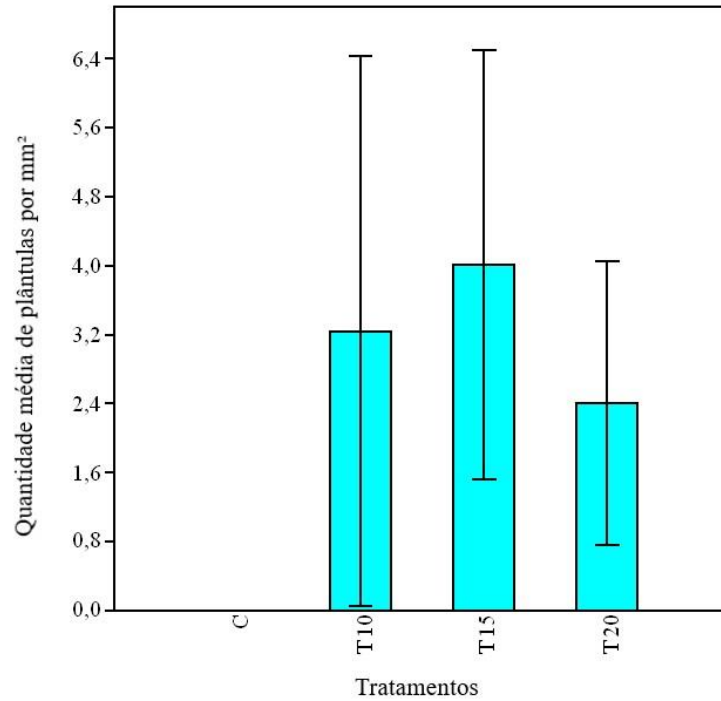
As concentrações de nutrientes utilizadas não influenciaram significativamente na taxa de crescimento dos talos ao longo do experimento ($F_{\text{calculado}} = 2,62 < F_{\text{crítico}} = 3,49$; $p_{\text{calculado}} = 0,098 > p = 0,05$).

Contagem média das plântulas

O controle foi o único que não apresentou nenhum processo de esporulação em todo o experimento. As figuras 12 e 13 mostram as contagens médias das plântulas por mm^2 de acordo com cada tratamento e o controle.

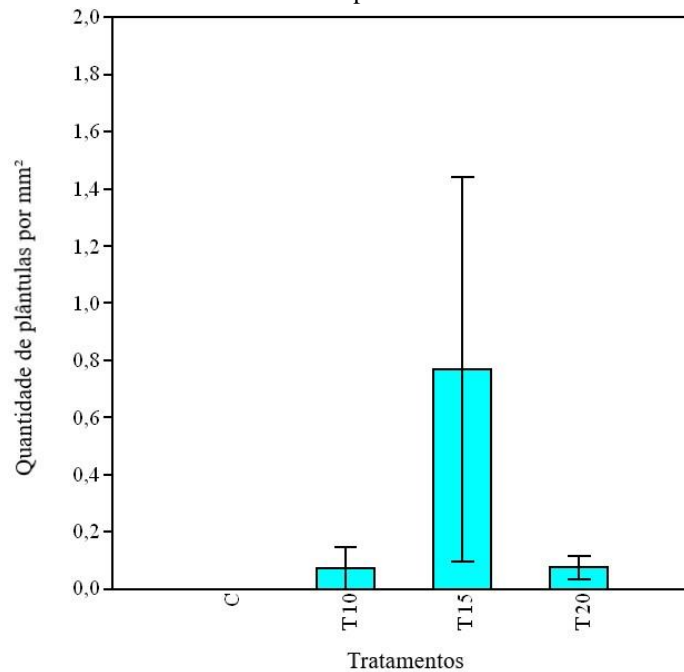
Em relação a primeira etapa, os tratamentos 10, 15 e 20 mL L^{-1} , demonstraram as seguintes contagens média: $3,24 \pm 5,52$ plântulas por mm^2 (T10), $4,00 \pm 4,30$ plântulas por mm^2 (T15), e $2,41 \pm 2,85$ plântulas por mm^2 (T20) (Figura 10).

Figura 10. Contagem média de plântulas por mm² por tratamento e controle (1ª etapa). As barras representam os desvios padrões.



Na segunda etapa foram contabilizados: $0,07 \pm 0,12$ plântulas por mm² (T10), $0,77 \pm 1,16$ plântulas por mm² (T15) e $0,07 \pm 0,06$ plântulas por mm² (T20) (Figura 11).

Figura 11. Contagem média de plântulas por mm² por tratamento e controle (2ª etapa). As barras representam os desvios padrões.



Os resultados indicaram que não houve diferenças significativas entre a concentração de nutrientes na quantidade de plântulas por mm² (F calculado = 1,184 < F crítico = 4,06; p calculado = 0,37 > $p = 0,05$).

Percentual de repetições contendo plântulas viáveis

Em relação a quantidade de repetições contendo plântulas viáveis após 37 dias (primeira etapa) e 30 dias (segunda etapa), algumas repetições apresentaram contaminações, as quais interferiram na continuidade do cultivo. Assim, no tratamento T10, de quatro réplicas, 2 foram viáveis (50%); T15 e T20, de quatro réplicas cada, apenas 1 foi viável em cada tratamento (25%). A segunda etapa, nos tratamentos T10 e T15, de quatro réplicas cada, 3 foram viáveis para cada tratamento (75%) enquanto T20 as quatro réplicas foram viáveis (100%). Além da viabilidade, as plântulas da segunda etapa tiveram, visivelmente, melhores performances em crescimento e robustez.

Descrição das morfologias

As plântulas foram cultivadas e, conforme seu crescimento, as morfologias foram se apresentando de forma diversa (Figuras 12-15). Portanto, uma descrição foi realizada para comparar os diferentes tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3. Características descritivas e comparativas de desenvolvimento.

Tratamento	Formato (Figura)	Coloração	Tamanho	Crescimento	Quantidade
Primeira etapa					
10	Alongado, “fitas lobadas” (Figura 12b)	Verde claro	> 10 cm	Rápido	Média
	Fronde longa (Figura 12a)	Verde claro	> 8 cm	Rápido	Média
15	Rosetas finas (Figura 12c)	Claro/escuro	≤ 1 cm	Lento	Muita

20	Roseta irregular (Figura 12d), “fitas lobadas” (Figura 12e)	Verde claro	> 3 cm; > 15 cm	Rápido	Média
Segunda etapa					
10	Fronde irregulares, “pontiagudas” (Figura 13a)	Verde claro	> 3 cm	Rápido	Pouca
	Rosetas regulares (Figura 13b)	Verde claro	≤ 2cm	Moderado	Média
	Fronde longa, larga, robusta (Figura 13c)	Verde escuro	> 7 cm	Rápido	Pouca
15	Fita lobada longa, robusta (Figura 14a)	Verde escuro	> 7 cm	Rápido	Média
	Fronde largas, arredondadas (Figura 14b)	Verde claro	> 4 cm	Rápido	Média
	Fronde finas, irregulares (Figura 14c)	Claro/escuro	≤ 1 cm	Lento	Muita
20	Fronde larga (Figura 15a,b)	Verde claro	> 3 cm	Rápido	Média
	Rosetas alongadas (Figura 15c)	Verde claro	> 3 cm	Rápido	Média
	Roseta finas, alongadas (Figura 15d)	Verde claro	> 3 cm	Rápido	Média

*Quantidade: Muita: > 16 plântulas por Erlenmeyer. Média: > 8 plântulas. Pouca: < 4 plântulas.

* Crescimento: Rápido: > 3 cm. Moderado: ≤ 2 cm. Lento: ≤ 1cm.

*As fotos e a análise foram realizadas pela autora em 17/10/2019.

Figura 12. Morfologias por tratamento referentes à primeira etapa, com 37 dias de cultivo. **a, b:** T10; **c:** T15; **d, e:** T20. Escala: 1 cm.



Figura 13. Morfologias referentes ao **T10** apresentadas na segunda etapa, com 30 dias de cultivo. Escala: 1 cm.

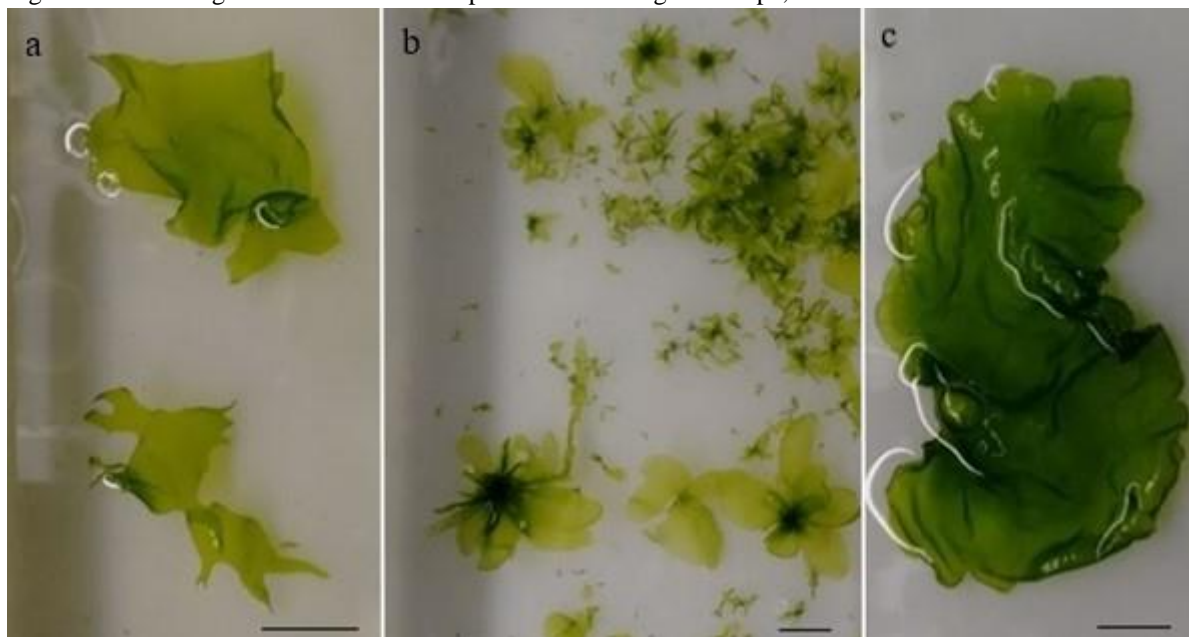


Figura 14. Morfologias referentes ao **T15** apresentadas na segunda etapa, com 30 dias de cultivo. Escala: 1 cm.

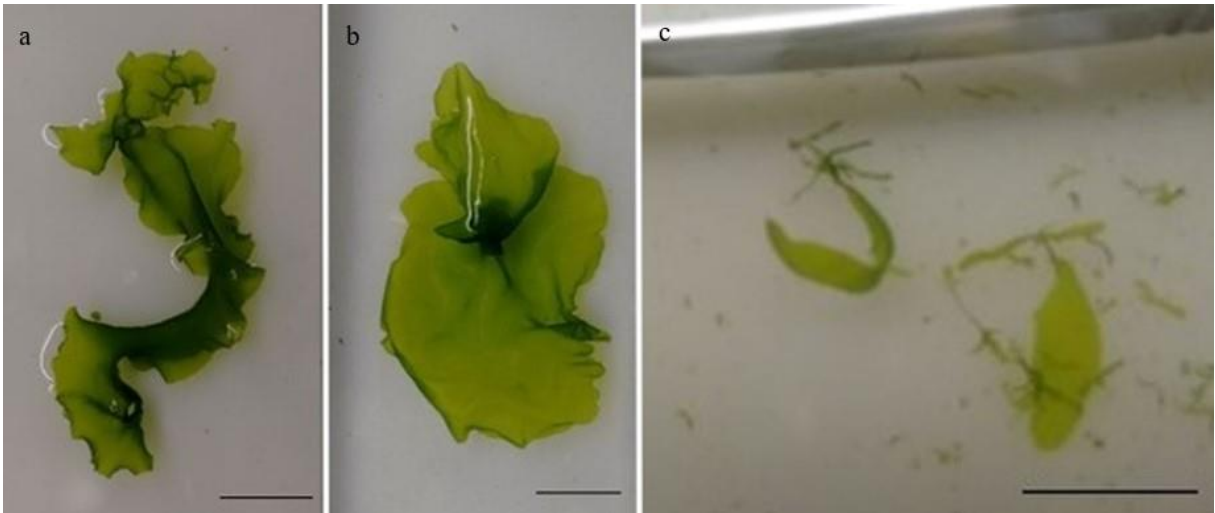
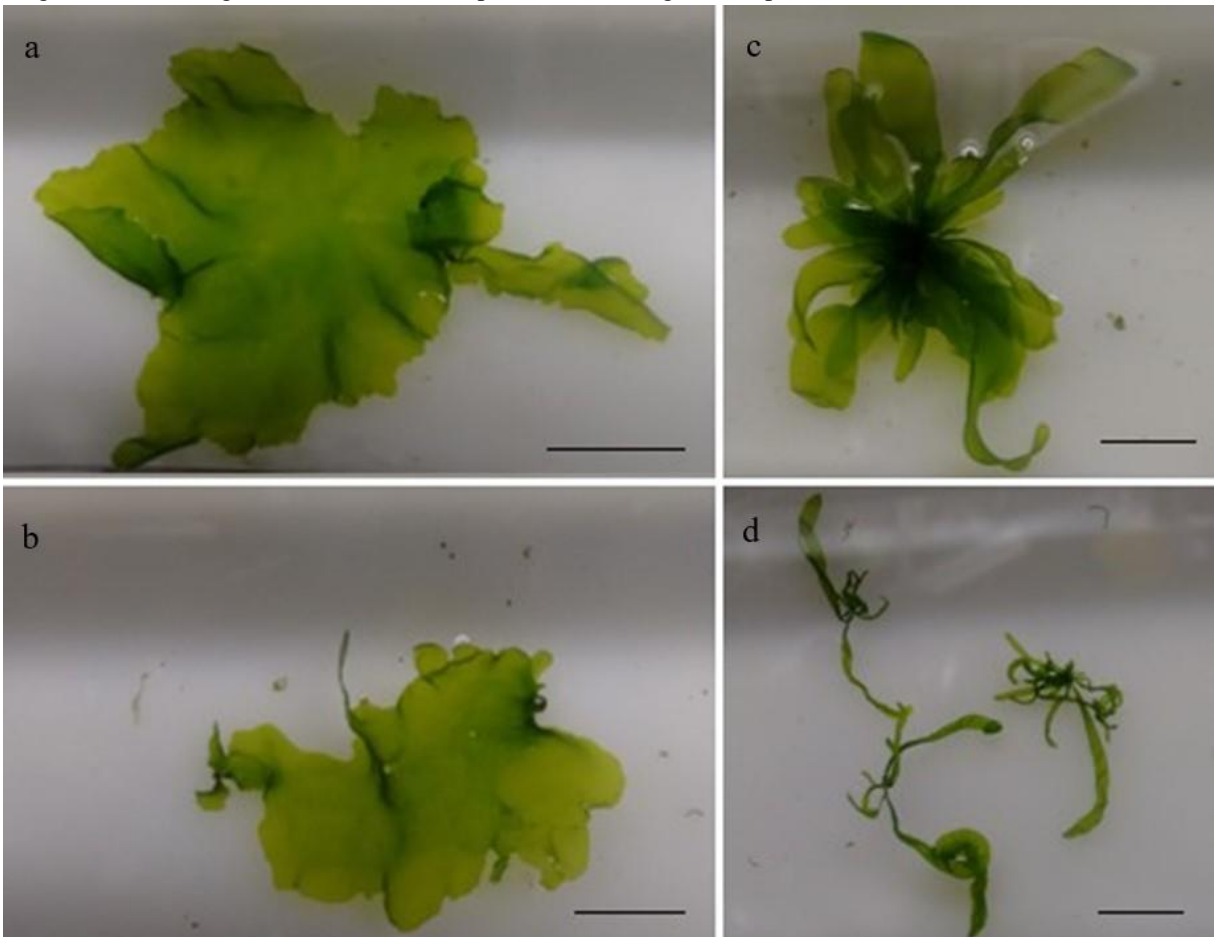


Figura 15. Morfologias referentes ao **T20** apresentadas na segunda etapa, com 30 dias de cultivo. Escala: 1 cm.



4 DISCUSSÃO

O processo de esporulação foi verificado no experimento levando-se em consideração a perda de coloração da região marginal dos talos após a inclusão de nutrientes. Esse processo foi desencadeado em algumas repetições do T15 logo no dia seguinte, enquanto nos demais tratamentos, a esporulação ocorreu após alguns dias (T10 e T20). No T15, isso pode ter ocorrido não apenas pela estimulação das condições expostas aos talos, mas por estes já se apresentarem em um estado pré-fértil acelerando o processo de liberação de células reprodutivas, como demonstrado por Niesenbaum, (1988) e Carl *et al.*, (2014). Segundo Wichard & Oertel (2010), um tempo sugestivo para esse processo de mudança do estado vegetativo para o reprodutivo seria de no mínimo dois dias. Essa falta de sincronismo observada no processo de esporulação entre os talos, resultou em germinações rápidas e tardias entre algumas repetições, inclusive dentro do mesmo tratamento, interferindo posteriormente no método de contagem, já que em algumas repetições as plântulas se apresentavam em fases mais desenvolvidas.

Em relação ao controle, provavelmente a falta de nutrientes ao longo de todo o período experimental não foi limitante para o seu desenvolvimento, demonstrado através da sua crescente taxa de crescimento. Além disso, por não ter esporulado, a energia dos talos pode ter sido utilizada para a formação de tecido vegetativo de modo a garantir a sua sobrevivência.

A perda de biomassa dos esporófitos foi evidente após o processo de esporulação. De forma geral, ao longo de todo o experimento, os esporófitos do T15 apresentaram a menor taxa de crescimento. Isso pode ser justificado por ter sido o primeiro tratamento a esporular e em grande quantidade. Além disso, o T15 foi o tratamento com maior média de biomassa úmida de esporófito (mg), sugerindo uma vantagem em relação aos demais tratamentos, por disponibilizar uma maior área tecidual para o processo de transformação das células vegetativas em reprodutivas.

Esse resultado corrobora com os encontrados por Barbosa (2014) para a *Ulva lactuca*, nos quais as macroalgas tratadas em maiores concentrações de nutrientes von Stosch (16, 32 e 64 mL L⁻¹) foram as que também tiveram as menores taxas de crescimento.

Em contrapartida, os esporófitos do T10 apresentaram esporulação mais tardias. Essa discrepância no tempo para iniciar a esporogênese pode estar ligada às diferentes regiões dos talos utilizadas no presente experimento. Em *Ulva pertusa*, discos excisados da região apical do talo esporularam em mais de 90%, enquanto os discos excisados da região basal não entraram em processo reprodutivo após três dias (HIRAOKA & ENOMOTO, 1998). Lüning *et*

al., (2008) também observaram uma tendência no aumento do grau de maturidade do talo de forma ascendente. Essas diferenças podem estar associadas a distribuição desuniforme de inibidores de esporulação dentro do talo, onde a concentração maior tende a estar na região basal de fixação (STRATMANN *et al.*, 1996).

Stratmann *et al.* (1996) identificaram dois fatores reguladores que mantêm *U. mutabilis* no estado vegetativo: uma glicoproteína denominada inibidor de esporulação-1 (SI-1) e um composto não proteico denominado inibidor de esporulação-2 (SI-2). SI-1 é um componente da parede celular, cuja excreção diminui com a maturação do talo, enquanto o SI-2 ocorre no espaço entre as duas camadas de células da lâmina. A concentração total de SI-2 no talo permanece constante durante todo o ciclo de vida. Além disso, liberação de gametas após gametogênese em espécies de *Ulva*, poderia ser controlada por uma terceira substância, denominada inibidor de gametas (WICHARD & OERTEL, 2010; VESTY *et al.*, 2015).

Compreender os fatores intrínsecos é de extrema relevância quando o cultivo em laboratório ou em escala comercial é considerado. Um trabalho realizado com espécimes jovens (menos de 60 dias após germinação) e adultas (mais de 60 dias após germinação) de *U. rigida*, mostrou que nenhum evento reprodutivo ocorreu durante 60 dias de cultivo em relação às jovens. Porém, as adultas cultivadas em temperaturas mais altas e condições de alta concentração de nutrientes (nitrato), tiveram uma taxa de reprodução de $64 \pm 5\%$ no décimo segundo dia (GAO *et al.*, 2017b). Assim, jovens *Ulvas* são consideradas preferenciais ao cultivo comercial quando comparada às adultas, pois poderiam evitar a reprodução periódica (HIRAOKA & OKA, 2008).

Quanto aos tipos de morfologias encontradas no presente trabalho, foi possível descrever estruturas alongadas, em formas de roseta regulares e irregulares, frondes arredondadas e largas. Em *Ulva fasciata* Delile foi descrita a morfologia dos talos como tipicamente longa em forma de cinta (PHILLIPS, 1988). Porém, para a mesma espécie talos pequenos foram observados além de morfologias parecidas com rosetas e irregularmente lobadas, quando expostas a ambientes com ondas. (MSHIGENI & KAJUMULO, 1979).

O gênero *Ulva* possui alto grau de plasticidade fisiológica e morfológica em diversos ambientes (LOBBAN & HARRISON, 1997). As condições ambientais influenciam no processo de diferenciação, como a estação do ano, energia das ondas, latitude e localização geográfica dentro de uma mesma população (STEFFENSEN, 1976; TANNER, 1986; WOOLCOTT & KING, 1999). Verificou-se, por exemplo, que a energia das ondas provocava crescimento atrofiado em *Ulva fasciata* (MSHIGENI & KAJUMULO, 1979), enquanto a

morfologia da *Ulva lactuca* foi alterada quando cultivada de forma axênica (PROVASOLI & PINTNER, 1980). Muitos trabalhos utilizando culturas axênicas já demonstraram que o crescimento, desenvolvimento e morfogênese em Ulvales são controlados por fatores bacterianos (FRIES, 1975; BONNEAU, 1977; PROVASOLI & PINTNER, 1980; NAKANISHI *et al.*, 1996; MATSUO *et al.*, 2005; MARSHALL *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2011; SPOERNER *et al.*, 2012).

Trabalhos voltados a genética vem sendo realizados para o melhor entendimento sobre o genoma e perfis de expressão gênica durante o desenvolvimento de *Ulva*. Compreender os mecanismos que controlam a morfogênese de algas verdes pode ser uma importante ferramenta de identificação de genes que dão características únicas e que poderão ser rastreados através de linhagens celulares (WICHARD *et al.*, 2015).

Os resultados estatísticos reforçam a necessidade de melhorias na metodologia, principalmente no número de amostras a serem utilizadas, como também no método de contagem num menor espaço de tempo, de modo a diminuir o erro causado pelos fatores não controláveis que regem o desenvolvimento dos esporos.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados do presente trabalho, as plântulas formadas em todos os tratamentos, exceto o controle, podem indicar que a modificação na concentração de nutrientes seja um método eficiente na indução à esporulação. Além disso, a indução em laboratório na concentração de 15 mL L⁻¹, é a mais indicada a curto prazo, dentro dos parâmetros e métodos utilizados. Todavia, é necessário que mais estudos sejam realizados, principalmente acerca da influência de outras variáveis no processo de esporulação - fundamentais para o estabelecimento de um protocolo futuro.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, Jefferson Rosano de. **Cultivo da macroalga *Ulva lactuca* Linneaus (Chlorophyta) integrado à produção do camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), para tratamento de efluentes em sistema fechado de recirculação**. 2005. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- BARBOSA, Êmile Natane de Araújo. **Resposta ecofisiológica da alga *Ulva lactuca* L. (Chlorophyta) à variação da concentração de nutrientes**. 2014. Disponível em: <<http://www.ccen.ufpb.br/cccb/contents/monografias/2014.2/resposta-ecofisiologica-da-alga-ulva-lactuca-l-chlorophyta-a-variacao-da-concentracao-de-nutrientes.pdf>>. Acesso em abril de 2019.
- BIXLER, Harris J.; PORSE, Hans. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 23, n. 3, p.321-335, 22 maio 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-010-9529-3>.
- BONNEAU, Edmund. Polymorphic behavior of *Ulva lactuca* (chlorophyta) in axenic culture.: i. occurrence of *Enteromorpha*-like plants in haploid clones. **Journal of Phycology**, [s.l.], v. 13, n. 2, p.133-140, jun. 1977. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.1977.tb02900.x>.
- BRATEN, T; NORDBY, Ø. Ultrastructure of meiosis and centriole behaviour in *Ulva mutabilis* Føyn. **Journal of Cell Science**, 13: p.69–81, 1973.
- CARL, Christina; NYS, Rocky de; PAUL, Nicholas A. The Seeding and Cultivation of a Tropical Species of Filamentous *Ulva* for Algal Biomass Production. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 6, p.1-10, 4 jun. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0098700>.
- CASTELAR, Beatriz; REIS, Renata P.; CALHEIROS, Ana Carolina dos Santos. *Ulva lactuca* and *U. flexuosa* (Chlorophyta, Ulvophyceae) cultivation in Brazilian tropical waters: recruitment, growth, and ulvan yield. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 26, n. 5, p.1989-1999, 13 maio 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-014-0329-z>.
- CASTELAR, Beatriz *et al.* Risk analysis using species distribution modeling to support public policies for the alien alga *Kappaphycus alvarezii* aquaculture in Brazil. *Aquaculture*, [s.l.], v. 446, p.217-226, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.012>.
- COHEN, I.; NEORI, A. *Ulva lactuca* Biofilters for Marine Fishpond Effluents. I. Ammonia Uptake Kinetics and Nitrogen Content. **Botanica Marina**, [s.l.], v. 34, n. 6, p.475-482, 1991. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/botm.1991.34.6.475>.
- CORRADI, Maria Grazia; GORBI, Gessica; ZANNI, Corrado. Hypoxia and sulphide influence gamete production in *Ulva sp.* **Aquatic Botany**, [s.l.], v. 84, n. 2, p.144-150, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquabot.2005.08.007>.

COSTA, Vanessa Macedo Freire da. **Utilização da macroalga *Ulva lactuca* Linnaeus na redução de nutrientes (NH_4^+ , NO_3^- e PO_4^{2-}) provenientes da carcinicultura.** 2006. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Bioecologia Aquática, Oceanografia e Limnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.

CHRISTIE, A. O.; EVANS, L. V. Periodicity in the Liberation of Gametes and Zoospores of *Enteromorpha intestinalis* Link. **Nature**, [s.l.], v. 193, n. 4811, p.193-194, jan. 1962. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/193193a0>.

DAN, Akinori; HIRAOKA, Masanori; OHNO, Masao. Observations on the effect of salinity and photon fluence rate on the induction of sporulation and rhizoid formation in the green alga *Enteromorpha prolifera* (Muller) J. Agardh (Chlorophyta, Ulvales). **Fisheries Science**, [s.l.], v. 68, n. 6, p.1182-1188, dez. 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1444-2906.2002.00553.x>.

EDWARDS P. Illustrated guide to the seaweeds and seagrass in the vicinity of Port Aransas, Texas. *Contrib Mar Sc Austin*. v. 15, p.1-228, 1970.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome, Italy, 2018.

FLETCHER, Robert L.; CALLOW, Maureen E. The settlement, attachment and establishment of marine algal spores. **British Phycological Journal**, [s.l.], v. 27, n. 3, p.303-329, set. 1992. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00071619200650281>.

FRIES, Lisbeth. Short Communication. **Botanica Marina**, [s.l.], v. 18, n. 4, p.251-253, 1975. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/botm.1975.18.4.251>.

GAO, Shan *et al.* A Strategy for the Proliferation of *Ulva prolifera*, Main Causative Species of Green Tides, with Formation of Sporangia by Fragmentation. *Plos One*, [s.l.], v. 5, n. 1, e8571, 5 jan. 2010. **Public Library of Science** (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0008571>.

GAO, Guang *et al.* Intrinsic and extrinsic control of reproduction in the green tide-forming alga, *Ulva rigida*. **Environmental and Experimental Botany**, [s.l.], v. 139, p.14-22, jul. 2017a. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.03.016>.

GAO, Guang *et al.* Eutrophication and warming-driven green tides (*Ulva rigida*) are predicted to increase under future climate change scenarios. **Marine Pollution Bulletin**, [s.l.], v. 114, n. 1, p.439-447, jan. 2017b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.003>.

GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W.; GRAHAM, J. M. **Algae**. 2 ed. p.80. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings, 2009.

HAMMER, Øyvind; HARPER, David A.T.; PAUL D. RYAN, 2001. Past: **Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis**. [s.i] Palaeontologia Electronica. 2001. p.9. Disponível em: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>. Acesso em outubro de 2019.

- HAYASHI, Leila *et al.* Cultivation of red seaweeds: a Latin American perspective. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.719-727, 24 set. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-013-0143-z>.
- HAYASHI, L. *et al.* Nutrients removed by *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in integrated cultivation with fishes in recirculating water. *Aquaculture*, v. 277, p. 185–191, 2008.
- HIRAOKA, Masanori; ENOMOTO, Sachito. The induction of reproductive cell formation of *Ulva pertusa* Kjellman (Ulvales, Ulvophyceae). **Phycological Research**, [s.l.], v. 46, n. 3, p.199-203, set. 1998. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1835.1998.tb00114.x>.
- HIRAOKA, Masanori; OKA, Naohiro. Tank cultivation of *Ulva prolifera* in deep seawater using a new “germling cluster” method. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.97-102, 12 jul. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-007-9186-3>.
- JOLY, A. B. **Flora marinha do litoral norte do estado de São Paulo e regiões circunvizinhas**. Separata do Boletim 294. Fac. Fil., Ciênc. e Letras da USP, Botânica, v. 21, p. 32-33, 1965.
- KUMAR, Chandini S. *et al.* Seaweeds as a source of nutritionally beneficial compounds-a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 45, n. 1, p.1, 2008.
- KUWANO, Kazuyoshi *et al.* Durations of gamete motility and conjugation ability of *Ulva compressa* (Ulvophyceae)1. **Journal of Phycology**, [s.l.], v. 48, n. 2, p.394-400, 17 jan. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01110.x>.
- LAHAYE, Marc; ROBIC, Audrey. Structure and Functional Properties of Ulvan, a Polysaccharide from Green Seaweeds. **Biomacromolecules**, [s.l.], v. 8, n. 6, p.1765-1774, jun. 2007. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bm061185q>.
- LEE, Robert Edward. *Phycology*. 4. ed. Colorado State University: **Cambridge University Press**, 2008. 503 p. Cambridge University Press. <http://dx.doi.org/10.1017/cbo9780511812897>.
- LOBBAN, Christopher S.; HARRISON, Paul J. *Seaweed ecology and physiology*. **Cambridge University Press**, [s.l.], p.163-209, 1994. <http://dx.doi.org/10.1017/cbo9780511626210>.
- LOBBAN, Christopher S.; HARRISON, Paul J. *Seaweed ecology and physiology*. **Cambridge University Press**, [s.l.], p.366, 1997.
- LÜNING, Klaus; KADEL, Petra; PANG, Shaojun. Control of reproduction rhythmicity by environmental and endogenous signals in *Ulva pseudocurvata* (Chlorophyta). **Journal of Phycology**, [s.l.], v. 44, n. 4, p.866-873, ago. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00535.x>.
- MANTRI, Vaibhav A. *et al.* Differential response of varying salinity and temperature on zoospore induction, regeneration and daily growth rate in *Ulva fasciata* (Chlorophyta, Ulvales). **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 23, n. 2, p.243-250, 3 jul. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-010-9544-4>.

- MARINHO, Gonçalo *et al.* The IMTA-cultivated Chlorophyta *Ulva* spp. as a sustainable ingredient in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) diets. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 25, n. 5, p.1359-1367, 9 jan. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-012-9965-3>.
- MARSHALL, Katrina *et al.* Effect of Marine Bacterial Isolates on the Growth and Morphology of Axenic Plantlets of the Green Alga *Ulva linza*. **Microbial Ecology**, [s.l.], v. 52, n. 2, p.302-310, ago. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-006-9060-x>.
- MSHIGENI, K. E.; KAJUMULO, A. Effects of the Environment on Polymorphism in *Ulva fasciata* Delile (Chlorophyta, Ulvaceae). **Botanica Marina**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.145-148, 1979. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/botm.1979.22.3.145>.
- MATSUO, Y. *et al.* Isolation of an Algal Morphogenesis Inducer from a Marine Bacterium. **Science**, [s.l.], v. 307, n. 5715, p.1598-1598, 11 mar. 2005. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1105486>.
- MCHUGH, D. J. A guide to the seaweed industry. p.105. **FAO**, Rome, Italy, 2003. Disponível em: < <http://www.fao.org/3/a-y4765e.pdf>>. Acesso em maio de 2019.
- MOURA, C.W.N. Ulvophyceae. In: FORZZA, R.C. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Vol. 1. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. p.438-448, 2010.
- MOURITSEN, Ole G. SUSHI Food for the eye, the body & the soul. **Springer US**, [s.l.], p.2-330, 2009. Springer US. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-0618-2>.
- NAKANISHI, Koichi *et al.* Bacteria that induce morphogenesis in *Ulva pertusa* (chlorophyta) grown under axenic conditions. **Journal of Phycology**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.479-482, jun. 1996. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-3646.1996.00479.x>.
- NEORI, Amir. Essential role of seaweed cultivation in integrated multi-trophic aquaculture farms for global expansion of mariculture: an analysis. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 20, n. 5, p.567-570, 24 jul. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-007-9206-3>
- NIESENBAUM, Richard A. The ecology of sporulation by the macroalga *Ulva lactuca* L. (Chlorophyceae). **Aquatic Botany**, [s.l.], v. 32, n. 1-2, p.155-166, out. 1988. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3770\(88\)90095-2](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3770(88)90095-2).
- NORDBY, Ø. Light microscopy of meiotic zoosporogenesis and mitotic gametogenesis in *Ulva mutabilis* Føyn. **Journal of Cell Science**, v. 15, n. 2, p. 443-455, 1974.
- NORDBY, Ø. Optimal conditions for meiotic spore formation in *Ulva mutabilis* Føyn. **Botanica Marina**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.19-28, 1977. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/botm.1977.20.1.19>.
- NORDBY, Ø; HOXMARK, R. C. Changes in cellular parameters during synchronous meiosis in *Ulva mutabilis* Føyn. **Experimental Cell Research**, [s.l.], v. 75, n. 2, p.321-328, dez. 1972. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827\(72\)90436-3](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827(72)90436-3).

OLIVEIRA, E C. **World seaweed resources an authoritative reference system**. In: Critchley, A. T.; Ohno, M.; Largo, D. B. Seaweed resources of Brazil. (ed). ETI BioInformatics, Amsterdam. DVD-ROM, 2006.

OHNO, M. Recent developments in the seaweed cultivation and industry in Japan. In: Advances in seaweed cultivation and utilization in Asia: proceedings of a workshop held in conjunction with the **7th Asian Fisheries Forum**, Penang. Kuala Lumpur: University of Malaya, p.1-20, 2006.

PENN STATE UNIVERSITY. **Protists II - Kingdoms Stramenopila, Rhodophyta and Chlorophyta**, Dept. Biol. Penn State University, 2002. Disponível em: <<https://wikispaces.psu.edu/display/110Master/Protists+II+-+Kingdoms+Stramenopila,+Rhodophyta,+and+Chlorophyta>>. Acesso em setembro de 2019.

PHILLIPS, J.A. Field, anatomical and development studies on southern Australian species of *Ulva* (Ulveae, Chlorophyta). **Australian Systematic Botany**, [s.l.], v. 1, n. 4, p.411-456, 1988. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/sb9880411>.

PROVASOLI, Luigi; PINTNER, Irma J. Bacteria induced polymorphism in an axenic laboratory strain of *Ulva lactuca* (chlorophyceae). **Journal of Phycology**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.196-201, jun. 1980. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.1980.tb03019.x>.

PRINGLE, J.D. Swarmer release and distribution of life-cycle phases of *Enteromorpha intestinalis* (L.) (Chlorophyta) in relation to environmental factors. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, [s.l.], v. 100, n. 1-3, p.97-111, set. 1986. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981\(86\)90157-7](http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981(86)90157-7).

RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. **Biology of Plants**, 5^a ed. Ed, Biology of Plants, 2008.

REBOURS, Céline *et al.* Seaweeds: an opportunity for wealth and sustainable livelihood for coastal communities. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 26, n. 5, p.1939-1951, 3 maio 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-014-0304-8>.

STARR, Richard C.; ZEIKUS, Jeffrey A. UTEX-the culture collection of algae at the University of Texas at Austin 1993 list of cultures. **Journal of Phycology**, [s.l.], v. 29, n. 2, p.1-106, abr. 1993. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-3646.1993.00001.x>.

STRATMANN, Johannes; PAPUTSOGLU, Georg; OERTEL, Wolfgang. Differentiation of *Ulva mutabilis* (chlorophyta) gametangia and gamete release are controlled by extracellular inhibitors. **Journal of Phycology**, [s.l.], v. 32, n. 6, p.1009-1021, dez. 1996. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-3646.1996.01009.x>.

SINGH, R. P *et al.* Isolation of seaweed-associated bacteria and their morphogenesis-inducing capability in axenic cultures of the green alga *Ulva fasciata*. **Aquatic Biology**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.13-21, 3 mar. 2011. Inter-Research Science Center. <http://dx.doi.org/10.3354/ab00312>.

SMITH, G.M. On the reproduction of some Pacific coast species of *Ulva*. **American Journal of Botany**, 34: p. 80–87, 1947.

SPOERNER, Michael *et al.* Growth and Thallus Morphogenesis of *Ulva mutabilis* (Chlorophyta) Depends on A Combination of Two Bacterial Species Excreting Regulatory

Factors. **Journal of Phycology**, [s.l.], v. 48, n. 6, p.1433-1447, 16 out. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01231.x>.

STEFFENSEN, D.A. The effect of nutrient enrichment and temperature on the growth in culture of *Ulva lactuca* L. **Aquatic Botany**, [s.l.], v. 2, p.337-351, jan. 1976. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3770\(76\)90031-0](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3770(76)90031-0).

TANNER, Christopher E. Investigations of the taxonomy and morphological variation of *Ulva* (Chlorophyta): *Ulva californica* Wille. **Phycologia**, [s.l.], v. 25, n. 4, p.510-520, dez. 1986. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2216/i0031-8884-25-4-510.1>.

THIADENS, Albert J. H.; ZEUTHEN, Erik. Meiosis and sporulation induced in sporophytes of *Ulva mutabilis* ("slender") with synchronous mitosis. **Planta**, [s.l.], v. 72, n. 1, p.60-65, 1966. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00388145>.

VESTY, Eleanor F. *et al.* Regulation of gametogenesis and zoosporogenesis in *Ulva linza* (Chlorophyta): comparison with *Ulva mutabilis* and potential for laboratory culture. **Frontiers In Plant Science**, [s.l.], v. 6, p.1-8, 26 jan. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00015>.

WOOLCOTT, G. W; KING, R. J. *Ulva* and *Enteromorpha* (Ulvales, Ulvophyceae, Chlorophyta) in Eastern Australia: comparison of morphological features and analysis of nuclear rDNA sequence data. **Australian Systematic Botany**, 12: p.709 -725, 1999.

WICHARD, Thomas; OERTEL, Wolfgang. Gametogenesis and gamete release of *Ulva mutabilis* and *Ulva lactuca* (chlorophyta): regulatory effects and chemical characterization of the "swarming inhibitor". **Journal of Phycology**, [s.l.], v. 46, n. 2, p.248-259, abr. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00816.x>.

WICHARD, Thomas. Exploring bacteria-induced growth and morphogenesis in the green macroalga order Ulvales (Chlorophyta). **Frontiers In Plant Science**, [s.l.], v. 6, p.1-19, 3 mar. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00086>.

YE, Nai-hao *et al.* 'Green tides' are overwhelming the coastline of our blue planet: taking the world's largest example. **Ecological Research**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.477-485, 2 abr. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1007/s11284-011-0821-8>.

YOKOYA, Nair S. Apical callus formation and plant regeneration controlled by plant growth regulators on axenic culture of the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). **Phycological Research**, [s.l.], v. 48, n. 3, p.133-142, 11 set. 2000. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1835.2000.00198.x>.

YONG, Yoong Soon; YONG, Wilson Thau Lym; ANTON, Ann. Analysis of formulae for determination of seaweed growth rate. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 25, n. 6, p.1831-1834, 23 mar. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-013-0022-7>.