

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA

Patrícia Guimarães Araújo

**Avaliação do potencial invasor de *Kappaphycus alvarezii*
(Rhodophyta, Gigartinales) no litoral da Paraíba, Brasil**



Foto: Renato Rocha Jorge

Recife

2013

Patrícia Guimarães Araújo

**Avaliação do potencial invasor de *Kappaphycus alvarezii*
(Rhodophyta, Gigartinales) no litoral da Paraíba, Brasil**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de doutor em Oceanografia na Área de Oceanografia Biológica.

Orientadora: Dra. Mutue Toyota Fujii

Co-orientadora: Dra. Nair Sumie Yokoya

Recife

2013

Catálogo na fonte

Bibliotecária Margareth Malta, CRB-4 / 1198

A663a Araújo, Patrícia Guimarães.

Avaliação do potencial invasor de *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) no litoral da Paraíba, Brasil / Patrícia Guimarães Araújo. - Recife: O Autor, 2013.

97 folhas, il., gráfs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Mutue Toyota Fujji.

Co-Orientadora: Profa. Dra. Nair Sumie Yokoya.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, 2013.

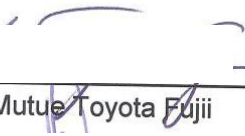
Inclui Referências e anexo.

Avaliação do potencial invasor de *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) no litoral da Paraíba, Brasil

Tese julgada e aprovada para obtenção do título de doutor em Oceanografia, na Área de concentração em Oceanografia Biológica, em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco.

Recife, 12 de junho de 2013

Banca avaliadora:


Dra. Mutue Toyota Fujii


Dr. Arsenio José Areces Mallea


Dra. Eliane Marinho-Soriano


Dra. Leila Hayashi


Dra. Sônia Maria Barreto Pereira

Suplentes:


Dra. Adilma de Lourdes Montenegro Cocentino


Dra. Sigrid Neumann Leitão

*Aos meus pais, Socorro e Luiz Alberto, meu irmão
Eduardo, dedico este trabalho.*

Agradecimentos

Aos meus pais e irmão, pelo amor, apoio, confiança e paciência depositados nesta etapa de minha vida. Minha profunda gratidão e amor.

À minha orientadora Dra. Mutue T. Fujii, não só pela orientação e dedicação profissional, mas também pelo acolhimento no decorrer deste trabalho.

À minha co-orientadora Dra. Nair S. Yokoya, pela orientação e apoio na etapa de cultivo em laboratório e pelas bibliografias disponibilizadas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de Doutorado e Benefício Doutorado Sanduiche por meio de Programa Nacional de Apoio ao Desenvolvimento da Botânica (PNADB).

Ao Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) e ao Laboratório de Algas Marinhas (LAM) do Departamento de Sistemática e Ecologia da Universidade Federal da Paraíba.

Aos colaboradores, MSc. Ana Lívia Ribeiro, Dra. Maria Beatriz Barros-Barreto e Dr. George Miranda pela contribuição, participação, sugestões e bibliografias disponibilizadas.

À Dra. Sílvia M. P.B. Guimarães pelas bibliografias disponibilizadas e auxílio na identificação da alga contaminante.

Às Dra. Jhoana Díaz-Larrea e Dra. Daniela Milstein pela ajuda nos procedimentos de deposição das sequências no NCBI Genbank.

À Dra. Aline P. Martins pelo auxílio e explicações nos procedimentos e cálculos envolvendo o fluorômetro Diving-PAM.

Aos técnicos de laboratório Rodrigo Pegorin, José Domingos, Valdilene dos Santos e Severino pela atenção e serviços prestados.

Ao Marivaldo Bastos, e todos os pescadores de Pitimbu e Ponta de Pedras pelas informações cedidas sobre a introdução e o cultivo de *Kappaphycus alvarezii*.

Aos pesquisadores e amigos do laboratório, Julyana Farias, Luanda Soares, Renato Rocha Jorge, Cecilia Hissami, Daniella Chen, Ingrid Balesteros, Émille, Pablo Riul, Adilma Cocentino, Edson Vasconcelos, Thiago Reis e Nathalia Guimarães, pelo incentivo, sugestões, discussões e momentos tão divertidos.

A todos os amigos que me apoiaram e contribuíram neste trabalho Gekbede, Tayna, Thainá, e aos companheiros e amigos de alojamento Thiara, Ana Lívia, Michel, Jadson, Pedro, Simone, Stéfano, Roberta, Stefania, Gisele, Lucineide, Gabrielle, Gustavo, Fernanda Kartedt, Majói, Daiane, Ana Kelly e Hellis pelas conversas, companhia, apoio e momentos de diversão.

A todos, minha profunda gratidão!

*“Que o fim a que nos empenhamos possa ao menos valer
a fadiga proporcionada pela viagem.”*

Adriano Zandoná

Resumo

Kappaphycus alvarezii (Doty) Doty ex P.C. Silva (Rhodophyta, Gigartinales) foi introduzida no litoral da Paraíba, nordeste do Brasil, no início da década de 2000 e tem sido cultivada em escala artesanal até o momento. Esta introdução gerou questionamentos acerca do risco de invasão ambiental na costa nordeste do Brasil. Assim, o presente estudo avaliou e monitorou o potencial de invasão de *K. alvarezii* no litoral da Paraíba, e teve como objetivos: (i) identificar a linhagem de *K. alvarezii* introduzida na Paraíba através de ferramenta molecular; (ii) avaliar a sobrevivência e crescimento da *K. alvarezii* arribada sob diferentes temperaturas (20, 24, 28, 32 °C) e salinidades (15, 25, 35, 45, 55 ups); (iii) avaliar e monitorar o potencial de estabelecimento de *K. alvarezii* na costa da Paraíba e de Pernambuco através de propagação vegetativa e pela produção de esporos/gametas e a dispersão por fragmentos arribados ao longo da costa. A análise de Máxima Verossimilhança (ML) e a Inferência Bayesiana (BI) mostraram semelhanças entre a linhagem de *K. alvarezii* cultivada na Paraíba e aquelas que são cultivadas em diversas partes do mundo e que não tem mostrado comportamento invasivo. A temperatura e a salinidade influenciaram a sobrevivência e crescimento de *K. alvarezii* arribada, a maior sobrevivência ocorreu a 20 e 24 °C e as algas coletadas na estação seca mostraram maior sobrevivência e crescimento a 25 e 35 ups de salinidade, enquanto que as algas coletadas na estação chuvosa, a 15 e 25 ups. Temperaturas de 32 °C e salinidade de 55 ups foram letais. Talos despigmentados e contaminação pela alga vermelha *Acrochaetium* ocorreu e prejudicou a sobrevivência e desenvolvimento da *K. alvarezii* arribada. O monitoramento indicou que a dispersão de *K. alvarezii* arribado é pontual, concentrada nas praias próximas ao local das balsas de cultivo. A direção do vento e a temperatura ambiente e da água do mar tiveram relação com a biomassa arribada. Não foram observadas estruturas reprodutivas nas algas arribadas, nem recrutamento e desenvolvimento de esporos ou gametas nos substratos artificiais. Também não foram observados talos de *K. alvarezii* crescendo fixos ou enroscados em substratos naturais das formações recifais e nódulos de algas calcárias. Portanto, os resultados indicam que, até o momento, não há estabelecimento de *K. alvarezii* no litoral da Paraíba, e o potencial de invasão desta espécie é baixo para a região. Todavia, é importante dar continuidade às ações de monitoramento ambiental na área sob influência do cultivo desta espécie exótica.

Palavras-chave: Alga exótica, *Kappaphycus alvarezii*, monitoramento ambiental.

Abstract

Kappaphycus alvarezii (Doty) Doty ex. P.C. Silva (Rhodophyta, Gigartinales) was introduced in Paraíba, northeastern coast of Brazil, in the early 2000s and since then they have been cultivated on an artisanal scale by local fishermen. This introduction has generated questions about the environmental risk of invasion in the northeastern coast of Brazil. Thus, the present study assessed and monitored the potential of invasion of *K. alvarezii* in the coast of Paraíba, having following objectives: (i) molecular identification of *K. alvarezii* strain introduced in Paraíba, (ii) to evaluate its potential to survive and growth of drifting *K. alvarezii* under different temperatures (20, 24, 28 and 32 °C) and salinities (15, 25, 35, 45, 55 psu), (iii) to monitor and evaluate the potential for *K. alvarezii* establishment in the coast of Paraíba state, extending up to Pernambuco throughout vegetative and sexual (spore/gameta) propagation, and dispersion of drifting biomass from farmed cuttings away to the coast. Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) analyses showed strong similarities between *K. alvarezii* cultivated in Paraíba and those lineages cultivated around the world, which have never shown invasive behavior. The temperature and salinity influenced survival and growth of drifting *K. alvarezii*. The higher survival and growth of drifting specimens occurred in 20 and 24°C. Drifting specimens collected in dry season showed higher survival and growth in 25 and 35 psu, while those collected in rainy season showed in 15 and 25 psu. Temperature of 32°C and salinity of 55 psu were lethal. Thallus despigmentation and contamination by red alga *Acrochaetium* occurred and inhibited the survival and development of drifting *K. alvarezii*. The monitoring indicated that the drifting *K. alvarezii* dispersion is punctual, and it was concentrated on the beaches near the site of the raft cultivation. The wind direction and temperature were related to drifting biomass. Reproductive structures were not observed in drifting seaweed, and recruitment and development of spores or gameta in artificial substrates were not observed during the studied period. Thallus fragments of *K. alvarezii* did not grow on natural substrates of the reef or nodules of calcareous algae. Therefore, the results indicate that up to date there is no establishment of *K. alvarezii* on the coast of Paraíba state, and the invasive potential of this species is low for the region. However, it is important to continue the environmental monitoring in the site under the influence of *K. alvarezii* cultivation.

Key words: Exotic seaweed, *Kappaphycus alvarezii*, environmental monitoring

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

FIGURA 1. Produção de macroalgas cultivadas no mundo por grupo de espécies 15

FIGURA 2. Localização da Praia de Pitimbu, litoral sul da Paraíba, Brasil, e da área de cultivo de *Kappaphycus alvarezii* (seta) 20

CAPÍTULO 1. Identificação molecular da linhagem de *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) cultivada no litoral da Paraíba, Brasil

FIGURA 1. Localização da Praia de Pitimbu, litoral sul da Paraíba, Brasil 27

FIGURA 2. Árvore consenso da análise Máxima Verossimilhança (ML) com sequências do espaçador mitocondrial *cox 2-3*, baseado no modelo evolutivo GTR+I+G das amostras de *Kappaphycus alvarezii* arribadas, coletadas no litoral da Paraíba, nordeste do Brasil, e outras sequências obtidas no NCBI GenBank. Os valores indicam bootstrap (1.000 réplicas) referentes à análise de Máxima Verossimilhança (ML) e à Inferência Bayesiana (BI)..... 31

CAPÍTULO 2. Sobrevivência e crescimento de *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) proveniente de arribadas no litoral da Paraíba a variações de temperatura e salinidade

FIGURA 1. Localização da Praia de Pitimbu, litoral sul da Paraíba, Brasil..... 41

FIGURA 2. Exemplares de *Kappaphycus alvarezii* arribados na Praia de Pitimbu, Paraíba. A) Aspecto geral de *K. alvarezii* arribado na praia, com detalhe das variantes verde e marrom; B) Detalhe da variante verde 42

FIGURA 3. Taxa de crescimento (%d⁻¹) das variantes pigmentares de *K. alvarezii* coletadas no período seco e chuvoso, submetidas a diferentes temperaturas após 28 dias. As barras representam os valores médios da TC (± desvio padrão) (n=3). As letras distintas representam as diferenças significativas segundo o teste *a posteriori* de Neuman-Keuls (p<0,05). VD = variante verde, VM = variante vermelha e MR = variante marrom 49

FIGURA 4. Efeitos da temperatura no aspecto geral dos talos de *K. alvarezii*. A) Variante vermelha (VM) cultivada a 28°C na terceira semana de experimento, com detalhe da endófito *Acrochaetium* (seta); B) Variante marrom (MR) cultivada a 24°C na segunda semana de experimento, com detalhe da despigmentação; C) Variante verde (VD) cultivada a 32°C na segunda semana do experimento, com detalhe da endófito *Acrochaetium* presente na região medular do talo (seta); D) Variante marrom a cultivada 32°C na primeira semana de experimento. Todas as ilustrações são das algas coletadas no período chuvoso. Escala = 1cm 49

FIGURA 5. Concentração de clorofila a (mg de pigmento/g de massa fresca) de *K. alvarezii* cultivada em diferentes temperaturas após 32 dias. Os valores indicam a média das concentrações (± desvio padrão) (n=3). As letras distintas indicam as diferenças significativas de acordo com o teste *a posteriori* de Neuman-Keuls (p<0,05). VD = variante verde, VM = variante vermelha e MR = variante marrom 51

FIGURA 6. Concentração de aloficocianina, ficocianina e ficoietrina (mg de pigmento/g de massa fresca) de *K. alvarezii* cultivada em diferentes temperaturas após 32 dias. Os valores

indicam a média das concentrações ($\pm$ desvio padrão) (n=3). As letras distintas indicam as diferenças significativas de acordo com o teste *a posteriori* de Neuman-Keuls ($p < 0,05$). VD = variante verde, VM = variante vermelha e MR = variante marrom..... 52

FIGURA 7.Concentração de proteínas solúveis totais (mg de proteína/g de massa fresca) de *K. alvarezii* cultivada em diferentes temperaturas após 32 dias. Os valores indicam a média das concentrações ($\pm$ desvio padrão) (n=3). As letras distintas indicam as diferenças significativas de acordo com o teste *a posteriori* de Neuman-Keuls ($p < 0,05$). VD = variante verde, VM = variante vermelha e MR = variante marrom. 53

FIGURA 8.Taxa de crescimento ($\% \cdot d^{-1}$) das variantes pigmentares de *K. alvarezii* coletadas na estação seca e chuvosa, submetidas a diferentes salinidades após 28 dias. As barras representam os valores médios da TC ($\pm$ desvio padrão) (n=3). As letras distintas representam diferenças significativas segundo o teste *a posteriori* de Neuman-Keuls ($p < 0,05$). VD = variante verde, VM = variante vermelha e MR = variante marrom..... 57

FIGURA 9.Aspecto geral dos talos de *K. alvarezii* cultivados em diferentes salinidades. A) Variante marrom a 15 ups na segunda semana de experimento, com detalhe do talo claro; B) Variante vermelha a 55 ups na terceira semana do experimento, com detalhe do talo claro e ocorrência da endófito *Acrochaetium* (seta); C) Variante vermelha a 35 ups na segunda semana de experimento com detalhe da despigmentação do talo e ocorrência da endófito *Acrochaetium* (seta); D) Variante marrom a 45 ups na terceira semana de experimento com detalhe de despigmentação de porções do talo e ocorrência da endófito *Acrochaetium* (seta). A) Alga da estação seca, B,C e D) Alga da estação chuvosa. Escala = 1cm..... 58

FIGURA 10.Concentração de clorofila *a* (mg de pigmento/g de massa fresca) de *K. alvarezii* cultivada em diferentes salinidades após 32 dias. Os valores indicam a média das concentrações ($\pm$ desvio padrão) (n=3). As letras distintas indicam as diferenças significativas de acordo com o teste *a posteriori* de Neuman-Keuls ($p < 0,05$). VD = variante verde, VM = variante vermelha e MR = variante marrom 59

FIGURA 11.Concentração de aloficocianina, ficocianina e ficoietrina (mg de pigmento/g de massa fresca) de dos três variantes de *K. alvarezii* cultivadas em diferentes salinidades após 32 dias. Os valores indicam a média das concentrações ($\pm$ desvio padrão) (n=3). As letras distintas indicam as diferenças significativas de acordo com o teste *a posteriori* de Neuman-Keuls ($p < 0,05$). VD = variante verde, VM = variante vermelha e MR = variante marrom.... 60

FIGURA 12.Concentração de proteínas solúveis totais (mg de proteína/g de massa fresca) de *K. alvarezii* cultivada em diferentes salinidades após 32 dias. Os valores indicam a média das concentrações ($\pm$ desvio padrão) (n=3). VD = variante verde, VM = variante vermelha e MR = variante marrom 61

CAPÍTULO 3. Avaliação e monitoramento do potencial de invasão de *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) no litoral da Paraíba, nordeste do Brasil

FIGURA 1.Localização das áreas de monitoramento no litoral da Paraíba, estendendo até Pernambuco 74

FIGURA 2.Áreas de monitoramento ao longo do litoral da Paraíba com a presença e ausência de biomassa de *K. alvarezii* arribada (g/m^2). O símbolo $\odot$ significa ausência de *K.*

alvarezii arribada, o símbolo ● significa a presença de *K. alvarezii* arribada e o símbolo ⊗ representa a região do cultivo de *K. alvarezii*. As setas vermelhas indica a direção predominante dos ventos..... 79

FIGURA 3.A) Detalhe de variante pigmentar verde (VD) junto com outras algas arribadas; B) As três variantes pigmentares: verde (VD), marrom (MR) e vermelha (VM) coletadas em rede de pesca na praia de Pitimbu, Paraíba 80

FIGURA 4. Substratos artificiais utilizados para análise de estabelecimento de *K. alvarezii* por esporos, gametas ou propagação vegetativa. A) Detalhe do substrato no mar logo após a implantação; B) Substrato após dois meses de implantação; C) substrato após quatro meses de implantação; D) Substratos após oito meses de implantação, E) Substrato com 11 meses de implantação, e F) Substrato no mar após 10 meses de implantação (seta indica o substrato)..... 81

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

TABELA 1. Valores médios dos parâmetros ambientais ($\pm$ desvio padrão) na costa da Paraíba nos últimos 20 anos. Os dados de direção dos ventos correspondem aos ventos predominantes. Fonte: Banco de Dados da Rede do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) 21

CAPÍTULO 1. Identificação molecular da linhagem de *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) cultivada no litoral da Paraíba, Brasil

TABELA 1. Amostras das sequencias utilizadas na análise molecular..... 29

CAPÍTULO 2. Sobrevivência e crescimento de *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) proveniente de arribadas no litoral da Paraíba a variações de temperatura e salinidade

TABELA 1. Fórmulas utilizadas para quantificar as ficobiliproteínas segundo Kursar, van der Meer e Alberte (1983) e clorofila a, segundo Jeffrey e Humphrey (1975). 44

TABELA 2. Média ($\pm$ desvio padrão) da variação da biomassa (mg) e taxa de crescimento (médias $\pm$ desvio padrão) das variantes pigmentares de *Kappaphycus alvarezii* coletadas em arribadas na Praia de Pitimbu no período seco e cultivadas em diferentes temperatura..... 47

TABELA 3. Média ($\pm$ desvio padrão) da variação da biomassa (mg) e taxa de crescimento (médias $\pm$ desvio padrão) de *Kappaphycus alvarezii* coletadas em arribadas na Praia de Pitimbu no período chuvoso e cultivadas em diferentes temperatura..... 48

TABELA 4. Variação da biomassa (%) e taxa de crescimento (médias $\pm$ desvio padrão) das variantes pigmentares de *Kappaphycus alvarezii* coletadas em arribadas na Praia de Pitimbu (PB) no período seco e cultivadas em diferentes salinidades. 56

TABELA 5. Variação da biomassa (%) e taxa de crescimento (médias $\pm$ desvio padrão) das variantes pigmentares de *Kappaphycus alvarezii* coletadas em arribadas na Praia de Pitimbu (PB) no período chuvoso e cultivadas em diferentes salinidades. 57

CAPÍTULO 3. Avaliação e monitoramento do potencial de invasão de *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) no litoral da Paraíba, nordeste do Brasil

TABELA 1. Coordenadas geográficas e descrição do tipo de monitoramento em cada área de monitoramento 74

TABELA 2. Parâmetros ambientais da região de Pitimbu no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012 (Dados do INMET)..... 79

TABELA 3. Biomassa úmida (g.m^{-2}) de *Kappaphycus alvarezii* arribada por área e mês de monitoramento na costa da Paraíba 80

SUMÁRIO

Agradecimentos

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Introdução geral	15
<i>Kappaphycus alvarezii</i> (Doty) Doty ex P. C. Silva	16
Introdução de <i>Kappaphycus alvarezii</i> no Brasil	17
Hipótese	19
Objetivo Geral	19
Objetivos Específicos	19
Área de Estudo	20

CAPÍTULO 1. Identificação molecular da linhagem de *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) cultivada no litoral da Paraíba, Brasil

Abstract	23
Resumo	24
Introdução	25
Materiais e Métodos	27
Análise molecular	27
Análise das sequências	28
Resultados	30
Discussão e Conclusão	32

CAPÍTULO 2. Sobrevivência de crescimento de *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) provenientes de arribadas no litoral da Paraíba a variações de temperatura e salinidade.....

Abstract	37
Resumo	38
Introdução	39
Materiais e Métodos	40
Coleta	40
Cultivo de <i>Kappaphycus alvarezii</i> em laboratório	41

Experimentos de temperatura e salinidade	42
Variação da biomassa de <i>Kappaphycus alvarezii</i>	43
Extração e quantificação de pigmentos	43
Extração e quantificação das proteínas solúveis totais	45
Análise estatística	45
Resultados	45
Efeito da temperatura em <i>Kappaphycus alvarezii</i>	45
Efeito da salinidade em <i>Kappaphycus alvarezii</i>	53
Discussão e Conclusão	61
 CAPÍTULO 3. Avaliação e monitoramento do potencial de invasão de <i>Kappaphycus alvarezii</i> (Rhodophyta, Gigartinales) no litoral da Paraíba, nordeste do Brasil.....	 69
Abstract	69
Resumo	70
Introdução	71
Materiais e Métodos	72
Avaliação e monitoramento da biomassa de <i>K. alvarezii</i> arribada às praias	75
Avaliação e monitoramento da biomassa de <i>K. alvarezii</i> no mar	75
Avaliação do potencial de estabelecimento de <i>Kappaphycus alvarezii</i> via produção de estruturas de reprodução e recrutamento de propágulos nos substratos artificiais	76
Análise estatística	76
Resultados	77
Avaliação e monitoramento da biomassa de <i>K.alvarezii</i> arribada às praias	77
Avaliação e monitoramento da biomassa de <i>K. alvarezii</i> no mar	80
Avaliação do potencial de estabelecimento de <i>Kappaphycus alvarezii</i> via produção de estruturas de reprodutivas e recrutamento de propágulos nos substratos artificias.....	80
Discussão e Conclusão	82
 Considerações Finais	 87
Referências Bibliográficas	80
Anexo 1.....	97

INTRODUÇÃO GERAL

A produção de algas marinhas vem crescendo progressivamente nas últimas décadas, registrando um aumento de 3,8 milhões de toneladas em 1990 para 19 milhões de toneladas em 2010 (FAO, 2012). Os principais países e territórios produtores são: China, Indonésia, Filipinas, Coreia, Japão, Malásia e Tanzânia (HAYASHI et al., 2010).

As macroalgas vermelhas constituem o grupo com maior número de espécies de importância econômica, que são cultivadas ou colhidas dos bancos naturais e utilizadas como fonte de alimentos, mas principalmente, como matéria prima para produtos farmacêuticos, nutracêuticos, cosméticos e vários outros produtos industriais (OLIVEIRA; ALVEAL; ANDERSON, 2000; REDDY; GUPTA; JHA, 2010; BIXLER; PORSE, 2011). Atualmente, as principais espécies de algas cultivadas como fonte de carragenanas são as rodófitas *Kappaphycus* Doty e *Eucheuma* J. Agardh, as quais tem apresentado um aumento expressivo na produção nos últimos anos (FAO, 2012) (Figura 1).

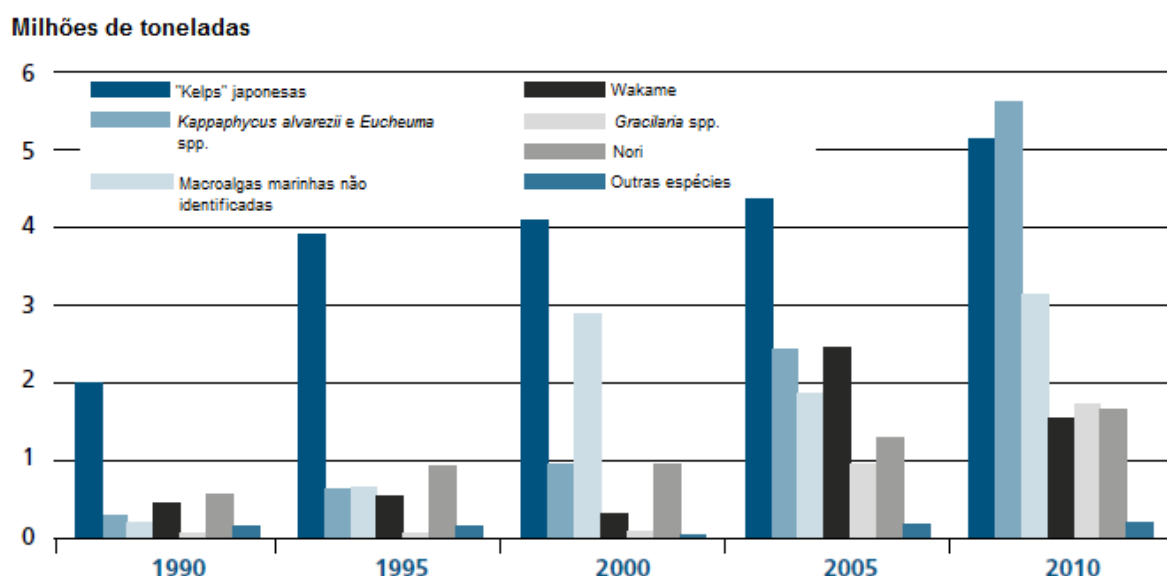


Figura 1. Produção de macroalgas cultivadas no mundo por grupo de espécies. (Fonte: FAO, 2012).

***Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C. Silva**

Originária da região do Indo-Pacífico tropical, a carragenófito *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. C. Silva (Gigartinales, Solieriaceae) é uma espécie perene, de talo cilíndrico, multiaxial e ereto, que ocorre na zona infralitoral raso com hidrodinamismo moderado (DOTY, 1985; ARECES, 1995). Tem melhor desenvolvimento em águas transparentes e mornas, com temperatura variando entre 21 – 32 °C (ARECES, 1995; PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999; BULBOA; PAULA, 2005). Apresenta grande plasticidade morfológica em função do ambiente (ZUCCARELLO et al., 2006) e, em condições de cultivo, é comum a ocorrência das variantes pigmentares marrons, vermelhas e verdes, para as quais não há um consenso sobre a causa deste evento (PAULA; PEREIRA; OSTINI, 1998).

A reprodução sexuada de *K. alvarezii* é rara, observada apenas em seu ambiente natural, em condições de maricultura, as algas permanecem inférteis (DOTY, 1985; ARECES, 1995). A espécie apresenta um ciclo de vida trifásico isomórfico, com uma fase haploide (gametófito) e duas diploides (carposporófito e tetrasporófito) (DOTY, 1985; ARECES, 1995). Embora existam relatos da liberação e germinação de estruturas reprodutivas em condições de cultivo em laboratório no Brasil, as taxas de sobrevivência foram muito baixas (PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999; BULBOA; PAULA, 2005; BULBOA; PAULA; CHOW, 2008).

Atualmente, *K. alvarezii* representa a principal espécie no setor da algicultura, pois tem elevado potencial de produção (ASK et al., 2003; PICKERING; SKELTON; SULU, 2007) e relevância econômica e social (ASK; AZANZA, 2002; BIXLER; PORSE, 2011). Por estas razões a espécie tem sido introduzida em diversas regiões tropicais e subtropicais do mundo com propósitos de maricultura, incluindo o Brasil (OLIVEIRA; SILVA; AMANCIO, 2009; HAYASHI et al., 2010; BINDU; LEVINE, 2011).

A introdução de macroalgas com propósito de aquicultura representa um tema exaustivamente discutido nas últimas décadas (PAULA; PEREIRA; OSTINI, 1998; PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999; CASTRO, 1999; ASK et al., 2003; OLIVEIRA; PAULA, 2003; PICKERING, 2006; PICKERING; SKELTON; SULU, 2007; OLIVEIRA; SILVA; AMANCIO, 2009; SILVA; AMANCIO; OLIVEIRA, 2010). As implicações ecológicas de uma introdução são difíceis de serem previstas, sobretudo quando não há planejamento (SCHAFFELKE; SMITH; HEWITT, 2006; VALENTINE; MAGIEROWSKI; JOHNSON, 2007; SCHAFFELKE; HEWITT, 2007; WILLIAMS; SMITH, 2007), em contraposição aos benefícios socioeconômicos, o que tem gerado grande polêmica no meio científico e órgãos ambientais competentes (OLIVEIRA; SILVA; AMANCIO, 2009; BIXLER; PORSE, 2011).

Após quatro décadas de introduções bem sucedidas com *K. alvarezii* (ASK et al., 2003), poucos casos de estabelecimento efetivo do talo da alga introduzida foram comprovados (HAYASHI et al., 2010; BINDU; LEVINE, 2011). A invasão de espécies de *Eucheuma/Kappaphycus* nos recifes de corais no Havaí é o mais conhecido (RODGERS; COX, 1999; CONKLIN; SMITH, 2005; CONKLIN; KURIHARA; SHERWOOD, 2009). Nesse evento, após dez anos de introdução, as algas se propagaram na baía de Kane’ohe (Havaí) causando a morte dos corais por sombreamento e atualmente continua a se dispersar (CONKLIN; SMITH, 2005; CONKLIN; KURIHARA; SHERWOOD, 2009). Segundo Zuccarello et al. (2006) as algas que se estabeleceram nas comunidades recifais do Havaí representam uma linhagem geneticamente diferente, o que explica o caráter invasivo das algas. No sul da Índia, foi relatada a invasão e danos ambientais por uma linhagem de *K. alvarezii* (BAGLA, 2008; CHANDRASEKARAN et al., 2008; KAMALAKANNAN et al., 2010). Na Venezuela foi observado *K. alvarezii* crescendo em pradarias de fanerógamas e recifes de corais (BARRIOS, 2005; BARRIOS; BOLAÑOS; LOPEZ, 2007) e no Zanzibar, (HALLING et al., 2013) os autores relataram fragmentos de *K. alvarezii* de origem asiática (material introduzido) crescendo sobre os recifes de corais.

O planejamento das introduções de espécies exóticas com programas de avaliação de risco, quarentena e monitoramento é fundamental para o sucesso da introdução e evitar danos ambientais indesejáveis (OLIVEIRA; SILVA; AMANCIO, 2009). No entanto, essas atividades ainda são incipientes (ASK et al., 2003; CONKLIN; SMITH, 2005).

Introdução de *Kappaphycus alvarezii* no Brasil

No Brasil, *Kappaphycus alvarezii* foi introduzida pela primeira vez em 1995, litoral de São Paulo, com aprovação do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, com objetivo de desenvolver um programa de avaliação de risco ambiental e viabilidade de produção das algas (PAULA; PEREIRA; OSTINI, 1998). Desde então, as pesquisas indicaram o potencial remoto de invasão e boas taxas de crescimento na costa do Rio de Janeiro (GÓES; REIS, 2011, 2012), São Paulo (PAULA; PEREIRA; OSTINI, 1998; PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999, 2002; PAULA; ERBERT; PEREIRA, 2001; OLIVEIRA; PAULA, 2003; PAULA; OLIVEIRA, 2004; BULBOA; PAULA, 2005) e Santa Catarina (HAYASHI et al., 2011; PELLIZZARI; REIS, 2011). Em 1998, *K. alvarezii* foi introduzida na Baía da Ilha Grande, Rio de Janeiro, para desenvolvimento de cultivo em pequena escala, e em 2004, esta introdução se expandiu para a Baía de Sepetiba, com início da produção em escala comercial (REIS; BASTOS; GÓES, 2007; CASTELAR; REIS;

BASTOS, 2009; CASTELAR et al., 2009; GÓES; REIS, 2011, 2012; PELLIZZARI; REIS, 2011).

Na costa nordeste do Brasil há registros da introdução irregular de *K. alvarezii* nos estados da Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará (LUCENA et al., 2007; OLIVEIRA; SILVA; AMANCIO, 2009). Na Paraíba, a introdução desta espécie ocorreu no início da década de 2000, no município de Pitimbu, litoral sul do Estado (Figura 2) e atualmente esta espécie é cultivada em escala familiar por pescadores locais.

Os resultados de potencial remoto de invasão por *K. alvarezii* obtidos para região sul e sudeste do país podem não ser aplicáveis para a costa nordeste, uma vez que esta região apresenta características ambientais diferentes da região sul e sudeste do Brasil (CASTELAR; REIS; BASTOS, 2009). Segundo Horta et al. (2001) o litoral sul e sudeste constituem uma província temperada quente do Brasil, enquanto que a costa nordeste é considerada província tropical. Por esta razão, é de crucial importância o desenvolvimento de um estudo que avalie o risco ambiental da introdução e cultivo de *K. alvarezii* no litoral da Paraíba, nordeste do Brasil. Estas informações subsidiarão o estabelecimento do protocolo de monitoramento ambiental e ações de biossegurança da produção de *K. alvarezii*, além de contribuir para o ordenamento do setor de algicultura no estado e na elaboração de políticas públicas.

Portanto, o presente trabalho representa o primeiro estudo de avaliação do potencial de invasão de *K. alvarezii* na costa nordeste do Brasil, e será apresentado em três capítulos: (i) **Capítulo 1** que trata de identificação da linhagem de *K. alvarezii* cultivada no litoral da Paraíba utilizando marcador molecular e comparação com outras linhagens de *Kappaphycus* disponíveis no banco de genes; (ii) **Capítulo 2** que avalia, em laboratório, o efeito da temperatura e salinidade na sobrevivência, no crescimento e no conteúdo de pigmentos e de proteínas de *K. alvarezii* arribada e (iii) **Capítulo 3** que faz uma avaliação do potencial de invasão de *K. alvarezii* no litoral da Paraíba e Pernambuco e monitoramento da dispersão dos talos desta alga exótica por meio de mergulhos livres e por recrutamento de propágulos em substratos artificiais implantados próximo às balsas de cultivo, e o monitoramento dos talos arribados ao longo da linha de praia.

HIPÓTESE

Considerando que a linhagem de *Kappaphycus alvarezii* cultivada em diversas regiões do mundo apresenta baixo potencial de invasão e que mesmo após uma década de introdução no litoral da Paraíba não foi observado nenhum estabelecimento do talo no ambiente natural até o momento, a hipótese do presente estudo é: o potencial de invasão de *K. alvarezii* no litoral da Paraíba é pequeno, e que é possível o seu cultivo nesta região, desde que a atividade esteja condicionada a procedimentos sistemáticos de monitoramento ambiental e de biossegurança.

OBJETIVO GERAL

Avaliar o risco de invasão ambiental da macroalga exótica *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C. Silva no litoral da Paraíba, costa do nordeste brasileiro, contribuindo para a conservação dos ecossistemas marinhos e ordenamento da algicultura da região.

Objetivos Específicos

- Identificar a linhagem de *K. alvarezii* introduzida no litoral da Paraíba utilizando o marcador molecular e comparar com outras linhagens que estão sendo cultivadas em várias regiões do mundo;
- Avaliar, em laboratório, o efeito da temperatura e salinidade na sobrevivência, no crescimento e no conteúdo de pigmentos e de proteínas de *K. alvarezii* arribada.
- Monitorar e quantificar a dispersão de *K. alvarezii* encontrada arribada ao longo do litoral paraibano;
- Verificar a ocorrência de estruturas reprodutivas nos talos de *K. alvarezii* encontrados arribados, provenientes do cultivo;
- Avaliar e monitorar a possibilidade de estabelecimento de *K. alvarezii* no ambiente natural através de produção de esporos/gametas ou por fixação de fragmentos nos substratos disponíveis no litoral da Paraíba;

ÁREA DE ESTUDO

O litoral da Paraíba tem uma extensão de 138 km, e o município de Pitimbu está localizado ao sul do estado ($07^{\circ}28'32.28''\text{S}$ – $34^{\circ}48'24.87''\text{L}$) (Figura 2). O litoral desta região é formado por substratos não consolidados (arenoso e cascalho) e consolidados (formações recifais areníticas e coralíneas e bancos de algas calcárias) (CARVALHO, 1982; LUCENA et al., 2007). A região caracteriza-se por um clima quente e úmido, com temperaturas médias anuais entre 22 a 31 °C, umidade relativa do ar de 80% e forte influência dos ventos alísios de sudeste (CARVALHO, 1982). A sazonalidade dos fatores ambientais diferencia a região em duas estações do ano: (i) estação chuvosa, de março a agosto e (ii) estação seca, de setembro a fevereiro (Tabela 1).

A temperatura da água do mar na costa nordestina segue um padrão sazonal, com valores elevados durante o verão (estação seca), e mais baixos, no inverno (estação chuvosa) (CASTRO; MIRANDA, 1998). A menor salinidade e transparência da água estão associadas ao período de maior precipitação (MACEDO; MUNIZ; MONTES, 2004; SASSI; OLIVEIRA, 1983). No entanto, Castro e Miranda (1998) discutem que estas variações estão restritas às regiões próximas a desembocadura de rios, devido à contribuição das chuvas.

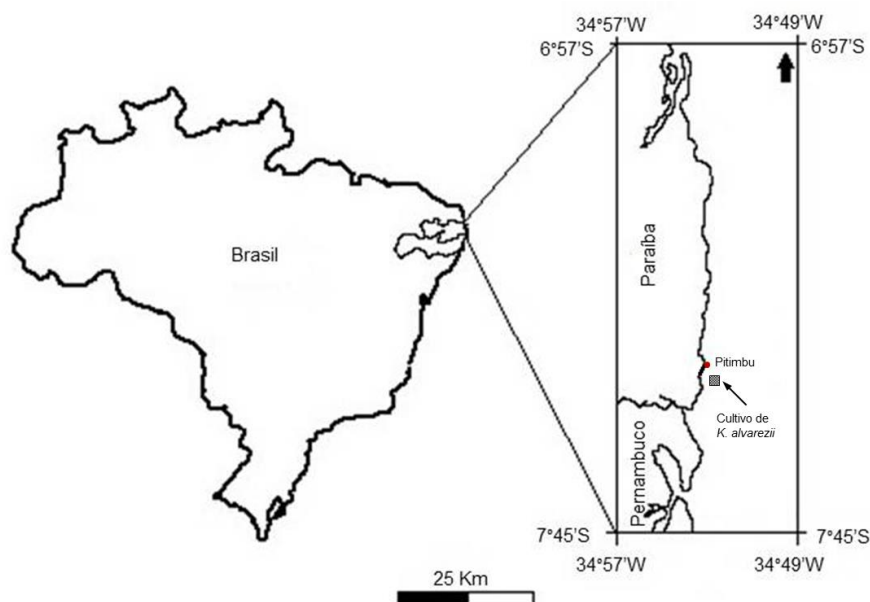


Figura 2. Localização da Praia de Pitimbu, litoral sul da Paraíba, Brasil e da área de cultivo de *Kappaphycus alvarezii* (seta).

Tabela 1. Valores médios dos parâmetros ambientais ($\pm$ desvio padrão) na costa da Paraíba nos últimos 20 anos. Os dados de direção dos ventos correspondem aos ventos predominantes. Fonte: Banco de Dados da Rede do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

Meses	Direção do vento	Velocidade do vento (m/s)	Precipitação total (mm)	Temperatura máxima do ar (°C)	Temperatura mínima do ar (°C)	Umidade do ar (%)
Janeiro	Sudeste e Leste	2,95 ($\pm$ 0,43)	95,78 ($\pm$ 81,27)	30,6 ($\pm$ 0,42)	25,11 ($\pm$ 0,56)	74,08 ($\pm$ 2,73)
Fevereiro	Sudeste e Leste	2,98 ($\pm$ 0,46)	105,35 ($\pm$ 82,28)	30,90 ($\pm$ 0,49)	25,15 ($\pm$ 0,67)	74,02 ($\pm$ 2,23)
Março	Sudeste e Leste	2,93 ($\pm$ 0,38)	179,09 ($\pm$ 87,76)	30,96 ($\pm$ 0,62)	24,83 ($\pm$ 0,69)	75,30 ($\pm$ 2,36)
Abril	Sudeste	2,76 ($\pm$ 0,45)	234,27 ($\pm$ 138,35)	30,59 ($\pm$ 0,62)	24,17 ($\pm$ 0,71)	77,87 ($\pm$ 3,06)
Maio	Sudeste e Sul	2,69 ($\pm$ 0,32)	283,05 ($\pm$ 155,29)	30,05 ($\pm$ 0,46)	23,49 ($\pm$ 0,42)	79,70 ($\pm$ 2,54)
Junho	Sudeste e Sul	2,71 ($\pm$ 0,31)	381,92 ($\pm$ 170,29)	28,93 ($\pm$ 0,48)	22,51 ($\pm$ 0,46)	82,39 ($\pm$ 2,38)
Julho	Sudeste e Sul	2,99 ($\pm$ 0,44)	276,81 ($\pm$ 120,72)	28,52 ($\pm$ 0,36)	21,96 ($\pm$ 0,41)	80,80 ($\pm$ 2,25)
Agosto	Sudeste e Sul	3,37 ($\pm$ 0,39)	151,87 ($\pm$ 82,12)	28,64 ($\pm$ 0,34)	21,92 ($\pm$ 0,53)	77,91 ($\pm$ 1,62)
Setembro	Sudeste	3,53 ($\pm$ 0,36)	62,15 ($\pm$ 46,10)	29,19 ($\pm$ 0,36)	23,10 ($\pm$ 0,40)	74,04 ($\pm$ 2,05)
Outubro	Sudeste e Leste	3,41 ($\pm$ 0,41)	29,72 ($\pm$ 19,40)	29,84 ($\pm$ 0,39)	24,34 ($\pm$ 0,78)	72,25 ($\pm$ 2,41)
Novembro	Sudeste e Leste	3,24 ($\pm$ 0,38)	23,70 ($\pm$ 17,32)	30,33 ($\pm$ 0,36)	24,95 ($\pm$ 0,67)	72,34 ($\pm$ 2,01)
Dezembro	Sudeste e Leste	3,12 ($\pm$ 0,42)	33,77 ($\pm$ 27,37)	30,58 ($\pm$ 0,36)	25,32 ($\pm$ 0,68)	73,14 ($\pm$ 2,22)

CAPÍTULO 1

Identificação molecular da linhagem de *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) cultivada no litoral da Paraíba, Brasil

Colaboradores: George E.C. Miranda¹, Maria B. Barros-Barreto²

¹ Departamento de Sistemática e Ecologia / Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

² Departamento de Botânica / Universidade Federal do Rio de Janeiro

Abstract

Kappa carrageenan is an important phycocolloid extracted from the red seaweed *Kappaphycus alvarezii*. This species has been introduced into several regions, most recently in Brazil. The remote invasive potential of this seaweed in both south and southeast waters of Brazil (subtropical regions) has been established, but introduction in the Northeastern tropical area is contested due to the absence of biological information. An unknown exotic lineage of *K. alvarezii* has been introduced and cultivated in an area characterized by the presence of coral reefs in Paraíba, the Northeastern Brazilian coast, since the beginning of the last decade. This work focuses on the molecular identification of these samples in comparison with sequences of other strains of *K. alvarezii* and congeners available in NCBI Genbank. Maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) analyses showed strong similarities between *K. alvarezii* cultivated in the tropical waters in Brazil and those lineages cultivated worldwide, that have never shown invasive behavior. However, more detailed investigations and use of environmental monitoring are recommended before commercial cultivation of this species can be authorized in tropical region of Brazil.

Key words: bioinvasive potential, carrageenophyte, *cox2-3* spacer, cultivation.

Resumo

Kappaphycus alvarezii é a principal fonte de matéria prima para produção de *kappa* carragenana, e tem sido introduzida em diversos países do mundo, dentre eles, o Brasil. O presente trabalho identificou a linhagem de *K. alvarezii* introduzida no litoral da Paraíba, utilizando o marcador molecular *cox2-3* e comparou as sequências com as de outras linhagens desta espécie disponíveis no NCBI GenBank. As árvores foram construídas com base nos métodos de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) fundamentados no modelo evolutivo GTR+G+I. As análises de ML e BI mostraram semelhanças entre a linhagem de *K. alvarezii* cultivada na Paraíba e aquelas linhagens cultivadas em diversas regiões do mundo, as quais não mostraram comportamento invasivo até o momento. Este resultado sugere que a linhagem cultivada no nordeste do Brasil apresenta baixo potencial para invadir o ambiente. Entretanto, estes são resultados preliminares, sendo necessários estudos mais detalhados sobre as causas e interações da introdução de *K. alvarezii* na costa nordeste do Brasil.

Palavras-chave: carragenófito, cultivo, *cox2-3*, potencial de invasão.

INTRODUÇÃO

A algicultura tem um papel importante no desenvolvimento da maricultura sustentável, e representa uma alternativa de incremento de renda para as comunidades costeiras (ASK; AZANZA, 2002; BINDU; LEVINE, 2011). A produção mundial de algas de importância econômica tem aumentado significativamente nas últimas décadas, estimando um valor total de US\$ 5,7 bilhões em 2010 (FAO, 2012). Entre estas algas, os gêneros *Kappaphycus* Doty e *Eucheuma* J. Agardh (Rhodophyta, Solieriaceae), também conhecidas como algas eucheumóides, são as mais cultivadas como fonte de carragenana (DOTY, 1985; ARECES, 1995; HAYASHI et al., 2010; FAO, 2012). A espécie *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. C. Silva, destacada no setor da aquicultura como a principal matéria prima de *kappa* carragenana e por sua facilidade e potencial de produção, já foi introduzida em diversas regiões tropicais e subtropicais do mundo para fins de maricultura (DOTY; ALVAREZ, 1975; DOTY, 1985; ARECES, 1995; ASK; AZANZA, 2002; AGUILAN et al, 2003; HAYASHI; PAULA; CHOW, 2007; BINDU; LEVINE 2011, BIXLER; PORSE, 2011).

As espécies *Kappaphycus* e de *Eucheuma* possuem ampla plasticidade morfológica, o que gera grande confusão na taxonomia do grupo que, por sua vez, provoca dificuldade nas pesquisas aplicadas que envolvem tais algas (DOTY; ALVAREZ, 1975; DOTY, 1985). Zuccarello et al. (2006) e Conklin, Kurihara e Sherwood (2009) têm destacado a necessidade de estudos mais detalhados para confirmar a exata identificação da espécie alvo e de acesso à informação genotípica, antes de um programa de introdução de espécies para maricultura. Em aquicultura, esta correta identificação representa um aspecto importante para selecionar as linhagens com maior potencial de produtividade (ZHAO; HE, 2011; HALLING et al., 2013).

Neste aspecto, os estudos com uma abordagem molecular têm sido amplamente utilizados para certificar a identificação de linhagens com alto valor comercial e baixo potencial de invasão. Os marcadores moleculares como o mitocondrial *cox1*, o gene nuclear rRNA 28S, o gene da subunidade pequena de rRNA (SSU), o marcador plastidial *Universal Plastid Amplicon* (UPA) e o plastidial (*rbcL*) são mais adequados para identificação e análise filogenética em nível de gênero (LLUISMA; RAGEN 1995, FREDERICQ; FRESWATER; HOMMERSAND, 1999; CONKLIN; KURIHARA; SHERWOOD, 2009; TAN et al., 2012), enquanto que para a análise inter-e intraespecífica, os segmentos mitocondriais do espaçador *cox2-3*, o espaçador plastidial *rbcL-rbcS*, eo espaçador nuclear ribossomal (ITS) são mais eficientes devido à maior taxa de variação (ZUCCARELLO et al., 2006; CONKLIN; KURIHARA; SHERWOOD, 2009; ZHAO; HE, 2011; TAN; LIM; PHANG, 2013).

No Brasil, *K. alvarezii* foi introduzido em 1995, no litoral de São Paulo, com autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, com o objetivo de avaliar o risco ambiental e viabilidade econômica da espécie (PAULA; PEREIRA; OSTINI, 1998). As pesquisas indicam potencial remoto de invasão e boas taxas de crescimento para as regiões sudeste e sul do país (PAULA; PEREIRA; OSTINI, 1998; PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999, 2002; BULBOA; PAULA, 2005). Na costa nordeste, *K. alvarezii* foi introduzida de forma irregular nos estados do Ceará, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte para fins de maricultura (OLIVEIRA; SILVA; AMANCIO, 2009). Na Paraíba, esta alga foi introduzida no início da década de 2000, e desde então são cultivadas por pescadores locais (Comunicação pessoal de Marivaldo Basto, maricultor local). Desde então, são questionados os riscos de invasão desta espécie exótica para região, uma vez que esta região apresenta características ambientais diferentes da costa sul e sudeste do Brasil, além da presença dos recifes de corais (CASTELAR et al., 2009).

Portanto, o presente estudo teve por objetivo identificar a linhagem de *K. alvarezii* introduzida e cultivada no litoral da Paraíba, utilizando marcador molecular e comparar com as sequências de outras linhagens espalhadas pelo mundo (nativas e cultivadas), disponível no NCBI GenBank.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de *Kappaphycus alvarezii* foram coletadas em outubro de 2010 na Praia de Pitimbu, Paraíba, região tropical do Brasil ($07^{\circ}30'10.5''\text{S}$ - $34^{\circ}47'53.5''\text{L}$) (Figura 1). Para este estudo foram coletadas algas arribadas, que se destacam das balsas de cultivo e chegam até a praia através das correntes marinhas locais. Foram coletados nove indivíduos, sendo três de cada variante pigmentar: verde, vermelho e marrom. Os vouchers do material coletado foram depositados no Herbário do Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil (SP 400964).

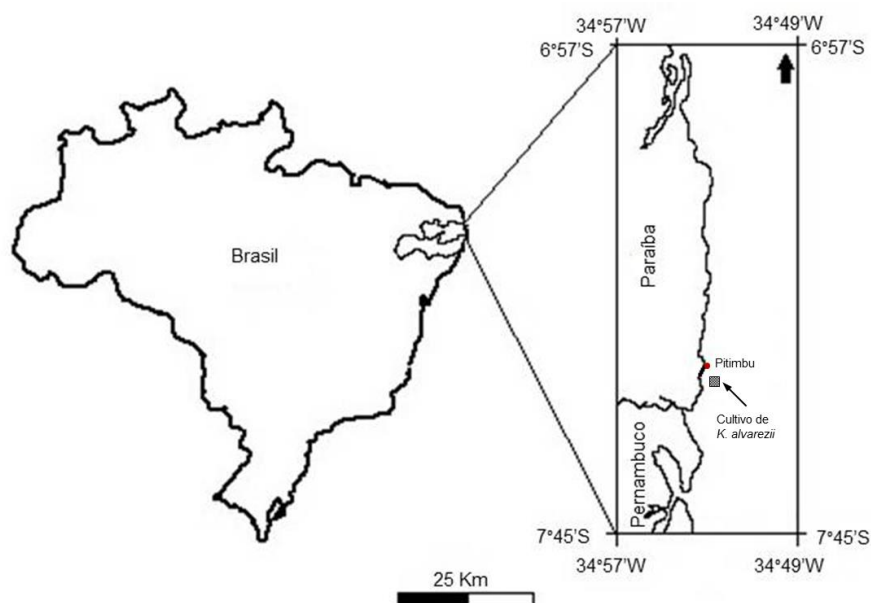


Figura 1. Localização da Praia de Pitimbu, litoral sul da Paraíba, Brasil.

Análise molecular

Foi utilizado cerca de 40 mg de biomassa seca de *K. alvarezii* de cada variante pigmentar para extração do DNA, processada no homogeneizador Precellys (Bertin, Technologies, França) com o kit de extração DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, EUA). O espaçador mitocondrial *cox2-3* foi amplificado através da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), usando os “primers” de acordo com Zuccarello et al (1999). A análise do produto de PCR foi realizada por eletroforese em gel agarose a 0,7%. Em seguida, os produtos da PCR foram purificados com o kit MicroSpin TMS-300 HR columns (GE

Healthcare Life Sciences, Piscataway, USA). A reação de sequenciamento foi realizada com o kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Reaction (Applied Biosystems, NJ, EUA) em um sequenciador genético ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems). Os “primers” utilizados no sequenciamento foram os mesmos utilizados em PCR.

Análise das sequencias

Todas as sequencias foram alinhadas no programa BioEdit 7.1.3.0 (HALL, 1999) e depositadas no NCBI Genbank. Foram acessadas no NCBI Genbank outras sequencias de espécies de *Kappaphycus* e de *Eucheuma* para comparação com as sequencias do presente estudo (Tabela 1).

As relações filogenéticas foram inferidas pelo método de Máxima Verossimilhança (ML) com a utilização do programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011). Os “gaps” ou dados ausentes foram tratados como deleção completa e o bootstrap foi estabelecido como 1.000 réplicas. A análise da Inferência Bayesiana (BI) foi realizada através do programa MrBayes v3.0 beta 4 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001). Os modelos evolutivos foram selecionados através do “Akaike Information Criterion (AIC)” e “Bayesian Information Criterion (BIC)” através do programa MEGA 5.05. Foi utilizado o modelo evolutivo GRT+I+G, que assume o modelo Geral de Reversão ao Longo do Tempo (GTR), com proporção de sítios invariáveis (I) e distribuição gamma (G) para acomodar as diferentes taxas de sítios invariáveis (TAMURA et al., 2011). Para a Inferência Bayesiana (BI) foi utilizado o método de Markov Monte Carlo. A árvore consenso foi amostrada aleatoriamente a cada 10 gerações e reamostrada a cada 1.000.000 de gerações. A espécie *Betaphycus philippinensis* Doty foi utilizada como grupo externo.

Tabela 1. Amostras das sequências utilizadas na análise molecular.

Nº de acesso ao NCBI GenBank	Nome da espécie	Local	Referência
KC122263	<i>Kappaphycus alvarezii</i> (IBt 708)	Paraíba, Brasil	Presente estudo
KC122262	<i>K. alvarezii</i> (IBt 713)	Paraíba, Brasil	Presente estudo
KC122264	<i>K. alvarezii</i> (IBt 729)	Paraíba, Brasil	Presente estudo
JQ713902	<i>K. alvarezii</i>	Tanzânia	Halling et al. (2013)
AY687436	<i>K. alvarezii</i>	Zanzibar	Zuccarello et al. (2006)
AY687432	<i>K. alvarezii</i>	Havaí	Zuccarello et al. (2006)
AY687433	<i>K. alvarezii</i>	Havaí	Zuccarello et al. (2006)
AY687427	<i>K. alvarezii</i>	Venezuela	Zuccarello et al. (2006)
AY687430	<i>K. alvarezii</i>	Madagascar	Zuccarello et al. (2006)
JN234759	<i>K. alvarezii</i>	Malásia	Não publicada
JN234760	<i>K. alvarezii</i>	Malásia	Não publicada
JN234761	<i>K. alvarezii</i>	Malásia	Não publicada
FJ554860	<i>K. striatum</i>	Havaí	Conklin; Kurihara; Shewood (2009)
AY687431	<i>K. striatum</i>	Indonésia	Zuccarello et al. (2006)
AY687435	<i>K. striatum</i>	Indonésia	Zuccarello et al. (2006)
AY687434	<i>K. striatum</i>	Filipinas	Zuccarello et al. (2006)
JN234763	<i>K. striatum</i>	Malásia	Não publicada
JN234764	<i>K. striatum</i>	Malásia	Não publicada
AY687426	<i>K. cottonii</i>	Filipinas	Zuccarello et al. (2006)
FJ554861	<i>Kappaphycus</i> sp	Havaí	Conklin; Kurihara; Shewood (2009)
JQ713903	<i>Eucheuma denticulatum</i>	Tanzânia	Halling et al. (2013)
FJ554859	<i>E. denticulatum</i>	Havaí	Conklin; Kurihara; Shewood (2009)
FJ561733	<i>E. denticulatum</i>	Havaí	Conklin; Kurihara; Shewood (2009)
JN234756	<i>E. denticulatum</i>	Malásia	Não publicada
AY684737	<i>E. denticulatum</i>	Indonésia	Zuccarello et al. (2006)
AY687425	<i>Eucheuma</i> sp.	Havaí	Zuccarello et al. (2006)
AY687424	<i>Eucheuma</i> sp.	Tanzânia	Zuccarello et al. (2006)
AY687423	<i>E. platycladum</i>	Tanzânia	Zuccarello et al. (2006)
AY687422	<i>E. platycladum</i>	Kênia	Zuccarello et al. (2006)
AY687428	<i>E. denticulatum</i>	Madagascar	Zuccarello et al. (2006)
AY687421	<i>E. isiforme</i>	Flórida	Zuccarello et al. (2006)
AY687420	<i>E. isiforme</i>	Flórida	Zuccarello et al. (2006)
AY687417	<i>Betaphycus philippinensis</i>	Filipinas	Zuccarello et al. (2006)

RESULTADOS

As sequências finais com o espaçador *cox2-3* variaram entre 398 a 399 nucleotídeos. A topologia das árvores pelos métodos de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) foram semelhantes, mas a melhor resolução foi observada com o método de ML (Figura 2). Ambas as árvores separaram *Kappaphycus* e *Eucheuma* em grupos distintos.

As amostras de *Kappaphycus* formaram um grande grupo, com *Kappaphycus cottonii* das Filipinas, a mais basal. As outras amostras formaram três principais clados com alto suporte (ML=99%): *K. alvarezii* (A1 e A2), as amostras de *Kappaphycus* do Havaí (B) e *K. striatum* (C1 e C2) (Figura 2).

As sequências de *K. alvarezii* coletadas na região nordeste do Brasil agruparam com aquelas amostras cultivadas no Havaí, Venezuela, Tanzânia e Malásia, formando o subclado A1, com moderado suporte de bootstrap (ML=81%, BI=0.91). As sequências de *K. alvarezii* de Zanzibar e de Madagascar formaram o subclado A2, com moderado suporte (ML=70%/BI=0.98).

As espécies de *Kappaphycus* do Havaí formaram um clado distinto (B) com alto suporte de bootstrap (ML=99%, BI=1.00), confirmando o agrupamento já observado por Zuccarello et al. (2006) e Conklin, Kurihara e Sherwood (2009). As sequências de *Kappaphycus striatum* ficaram dividida em dois subclados (C1 e C2), com alto suporte (ML=99/-). O subclado C1 incluiu as espécies da Indonésia, e o subclado C2, as espécies da Malásia e das Filipinas.

As sequências de *Eucheuma* foram divididas em cinco clados (E1-E5) de acordo com as espécies e com as regiões geográficas.

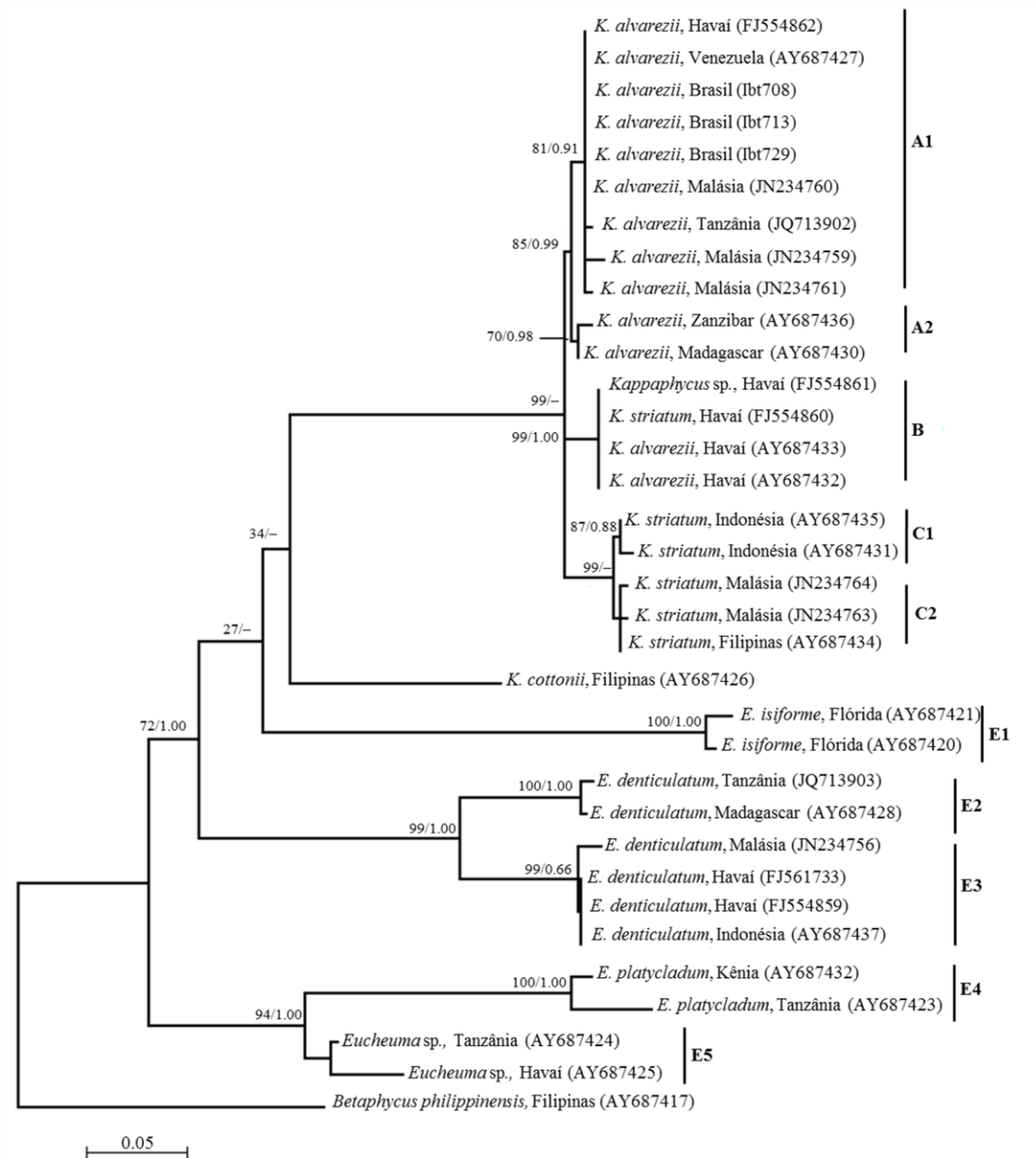


Figura 2. Árvore consenso da análise Máxima Verossimilhança (ML) com sequencias com espaçador mitocondrial *cox2-3*, baseado no modelo evolutivo GTR+I+G das amostras de *Kappaphycus alvarezii* arribadas coletadas no litoral da Paraíba, nordeste do Brasil e outras sequencias acessadas no NCBI GenBank. Os valores indicam bootstrap (1.000 réplicas) referentes da análise Máxima Verossimilhança (ML) e da Inferência Bayesiana (BI).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que a linhagem de *Kappaphycus alvarezii* cultivada no litoral da Paraíba faz parte do clado A, representada pelas linhagens cultivadas pelo mundo como foi referido por Zuccarello et al.(2006) e Conklin; Kurihara; Sherwood (2009). Este clado já foi observado em diversos trabalhos reforçando a hipótese que esta linhagem apresenta um haplótipo mitocondrial similar, e que tem sido introduzida em diversas regiões do mundo com propósito de maricultura e apresenta baixo potencial de estabelecimento no ambiente (ZUCCARELLO et al., 2006; CONKLIN; KURIHARA; SHERWOOD, 2009; BARROS-BARRETO et al., 2012; TAN et al., 2013). Barros-Barreto et al. (2012) também observaram resultados semelhantes com as linhagens de *K. alvarezii* cultivadas no litoral do Rio de Janeiro e Santa Catarina, utilizando o espaçador *cox2-3*, confirmando assim que as cepas de *K. alvarezii* introduzidas no Brasil fazem parte das “linhagens cultivadas”.

De acordo com os resultados, a linhagem de *K. alvarezii* cultivada na Paraíba é geneticamente semelhante às linhagens de algas cultivadas na Venezuela, Malásia, Havaí e Tanzânia (clado A). A presente informação é importante e pode auxiliar na identificação da origem das cepas introduzidas e cultivadas no nordeste, como também em futuras ações de gestão, estudos ecológicos e monitoramento ambiental. De acordo com Conklin; Kurihara e Sherwood (2009), a identificação molecular desempenha um papel crucial na determinação taxonômica da espécie-alvo e de linhagens invasivas, na compreensão de suas relações ecológicas no ambiente introduzido, e na algicultura, auxilia na seleção das linhagens mais produtivas, aprimorando o setor da produção de algas (TAN et al., 2012; TAN; LIM; PHANG, 2013).

Estas linhagens cultivadas em diversas regiões do mundo através de propagação vegetativa do talo (DOTY, 1985; ARECES, 1998) são consideradas biologicamente limitadas em relação à reprodução sexuada, pois não produzem células reprodutivas viáveis sob condições de cultivo (DOTY, 1985; BULBOA; PAULA e CHOW, 2008), e possuem baixo potencial de estabelecimento no ambiente por propagação vegetativa (ZUCCARELLO et al., 2006; CONKLIN; KURIHARA; SHERWOOD, 2009). Na costa sudeste do Brasil, Paula; Pereira; Ohno (1999) observaram a produção de tetrásporos de *K. alvarezii* em laboratório uma única vez, no entanto ocorreu baixa taxa de sobrevivência, sugerindo que esta linhagem poderia ser estéril (BULBOA; PAULA, 2005; BULBOA; PAULA; CHOW, 2008). Segundo Bulboa, Paula e Chow (2008) a ausência de produção de esporos viáveis ocorre devido ao processo meiótico deletério durante o desenvolvimento dos esporos, resultante da propagação clonal ou da origem híbrida desta linhagem cultivada (PAULA;

PEREIRA; OHNO, 1999). A propagação vegetativa poderia representa uma alternativa de estabelecimento no ambiente, mas que é limitada em diversas regiões por fatores ambientais, como temperatura, herbivoria (BULBOA; PAULA, 2005; CASTELAR; REIS; BASTOS, 2009; Castelar et al., 2009).

Todavia, Barrios, Bolaños & Lopes (2007) demonstraram que as cepas de *K. alvarezii* cultivadas na Venezuela apresentam um caráter invasivo através da propagação vegetativa, apesar de serem geneticamente semelhantes a outras linhagens do clado A. Segundo estes autores, talos de *K. alvarezii* se dispersaram das fazendas de cultivo e se estabeleceram sobre recifes de corais provocando a morte por branqueamento. É possível que características ambientais peculiares à costa da Venezuela como as correntes de ressurgência tenham favorecido a dispersão de *K. alvarezii*. Além disso, Ask et al. (2003) destaca que em muitos dos casos de bioinvasão de *K. alvarezii* ocorreu em virtude do abandono das fazendas de algas ou a falta de monitoramento.

No Brasil, estudos demonstraram baixo risco de invasão na região sul e sudeste (PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999; 2002; BULBOA; PAULA; CHOW, 2008; CASTELAR; REIS; BASTOS, 2009; HAYASHI et al., 2011). Estruturas reprodutivas não foram observadas nos cultivos, e os talos de *K. alvarezii* encontrados à deriva não sobrevivem por ações como herbivoria, variação da temperatura e transparência da água do mar (BULBOA; PAULA, 2005; BULBOA; PAULA; CHOW, 2008; CASTELAR et al., 2009; HAYASHI et al., 2011). No entanto, estes resultados não são aplicáveis para a costa nordeste brasileira, que tem diferentes condições ambientais, tais como transparência da água, temperatura e nutrientes, além da presença de formações recifais (CASTELAR et al. 2009). Portanto, são necessários estudos mais detalhados que incluam estes aspectos, além de programas de monitoramento ambiental.

A análise molecular do presente estudo mostrou que os subclados A1 e A2 correspondem às linhagens de *Kappaphycus* de cultivos (ZUCCARELLO et al., 2006; CONKLIN; KURIHARA; SHERWOOD, 2009); e que o clado B foi formado por diferentes espécies de *Kappaphycus* do Havaí. Diversos autores discutem a inconsistência da identificação destas algas do clado B, e sugerem estudos mais detalhados da taxonomia deste grupo (CONKLIN; SMITH, 2005; ZUCCARELLO et al., 2006; CONKLIN; KURIHARA; SHERWOOD, 2009). No entanto, Zuccarello et al. (2006) afirmam que estas algas apresentam um haplótipo único de *Kappaphycus* do Havaí, e que expressa características invasivas próprias (CONKLIN; SMITH, 2005). *Kappaphycus cottonii* teve alta divergência e foi considerado um grupo irmão das outras espécies de *Kappaphycus*, corroborando os resultados obtidos por Zuccarello et al. (2006) e por Tan et al. (2012) e Tan, Lim e Phang (2013), que relatam a necessidade de estudos mais detalhados da taxonomia desta espécie.

O espaçador mitocondrial *cox2-3* foi eficiente na identificação e comparação de nossa linhagem de *K. alvarezii* com outras linhagens da mesma espécie, confirmando sua eficácia em estudos de comparação de linhagens, análises filogenéticas e como marcador molecular para o DNA Barcode para o gênero *Kappaphycus* e *Eucheuma* (ZUCCARELLO et al., 2006; CONKLIN; KURIHARA; SHERWOOD, 2009; BARROS-BARRETO et al, 2012; TAN et al., 2012; HALLING et al., 2013; Tan; Lim; Phang, 2013). No entanto Zhao; He (2011) discutem a maior eficiência do marcador ITS para análises inter- e intraespecíficas, argumentando que este marcador é mais preciso nos protocolos moleculares de identificação e comparação de algas eucheumatóides quando comparado com outros marcadores moleculares.

Portanto, este estudo representa a primeira investigação para o conhecimento de *Kappaphycus alvarezii* cultivada na costa nordeste Brasil e os resultados confirmaram a identificação da espécie e sua similaridade com as linhagens cultivadas em diversas regiões do mundo, e que raramente apresentaram comportamento invasivo, ou registros de bioinvasão no ambiente. No entanto, esta conclusão não descarta a necessidade e importância das ações de monitoramento ambiental nas áreas sob influência do cultivo.

CAPÍTULO 2

Sobrevivência e crescimento de *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) provenientes de arribadas no litoral da Paraíba a variações de temperatura e salinidade

Colaboradora: MSc. Ana Livia N. L. Ribeiro

Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Instituto de Botânica, São Paulo

Abstract

Survival and growth of drifting specimens of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. C. Silva were tested under different temperatures (20, 24, 28 and 32 °C) and salinities (15, 25, 35, 45, 55 psu) to evaluate its potential to survive and growth in other areas. Three colour variants of *K. alvarezii* were collected from drifts in Paraíba, northeastern coast of Brazil, during dry and rainy seasons. The temperature and salinity influenced survival and growth of drifting *K. alvarezii*. The higher survival and growth of drifting specimens occurred in 20 and 24°C. Drifting specimens collected in dry season showed higher survival and growth in 25 and 35 psu, while those collected in rainy season showed in 15 and 25 psu. Temperature of 32°C and salinity of 55 psu were lethal. Thallus depigmentation and contamination by red alga *Acrochaetium* occurred and inhibited the survival and development of drifting *K. alvarezii*. Specimens collected during the dry season were more resistant to contaminants than those collected during rainy season, and green variant was more tolerant to temperature and salinity variations than the red and brown variants. The Chlorophyll a, phycobiliprotein (allophycocyanin, phycocyanin and phycoerythrin) and protein contents varied according to temperature, salinity and physiological conditions. These results suggest that temperature, salinity and contamination with filamentous red alga were limiting factors affecting the survival and development of drifting *K. alvarezii* in the northeastern coast of Brazil. The survival of drifting *K. alvarezii* decreases during the rainy season. In conclusion, the survival of drifting *K. alvarezii* is reduced drastically under temperature and salinity variations what indicates that these specimens have a limiting physiological conditions to survive and growth in other areas along Brazilian coast.

Key words: Contamination, survival, salinity and temperature.

Resumo

A sobrevivência e crescimento de espécimes de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. C. Silva arribada foram testados *in vitro* sob diferentes temperaturas (20, 24, 20 e 32 °C) e salinidade (15, 25, 35, 45 e 55 ups). Amostras das três variantes de cor de *K. alvarezii* foram coletadas de arribadas na Paraíba, costa nordeste do Brasil, durante as estações seca e chuvosa. A temperatura e crescimento influenciaram a sobrevivência e crescimento das *K. alvarezii* arribada. A maior sobrevivência e crescimento dos espécimes ocorreram a 20 e 24 °C. As algas coletadas na estação seca mostraram maior sobrevivência a 25 e 35 ups, enquanto que aquelas coletadas na estação chuvosa, a maior sobrevivência e crescimento ocorreram a 15 e 25 ups. Temperaturas de 32 °C e salinidades de 55 ups foram letais. Talos despigmentados e contaminação pela alga vermelha *Acrochaetium* ocorreu e prejudicou a sobrevivência e desenvolvimento da *K. alvarezii* arribada. Espécimes coletadas durante a estação seca foram mais resistentes às contaminações que aquelas coletadas durante a estação chuvosa, e a variante de cor verde apresentou maior tolerância às variações de temperatura e salinidade que as variantes vermelha e marrom. Os conteúdos de clorofila *a*, ficobiliproteínas (aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina) e proteínas solúveis totais variaram em função das condições de temperatura, salinidade e estado fisiológico da alga. Estes resultados sugerem que a temperatura, salinidade e contaminação por alga vermelha filamentosa são fatores limitantes que afetam a sobrevivência e desenvolvimento da *K. alvarezii* arribada na costa nordeste do Brasil e que durante a estação chuvosa, a capacidade de sobrevivência desta espécie diminui. Portanto, a sobrevivência da *K. alvarezii* arribada é reduzida drasticamente sob flutuações de temperatura e salinidade, o que indica que estes espécimes tem condições fisiológicas limitantes a sobrevivência e crescimento em áreas ao longo da costa brasileira.

Palavras chaves: Contaminação, sobrevivência, salinidade, temperatura.

INTRODUÇÃO

As macroalgas vermelhas constituem o grupo com maior número de espécies de importância econômica, que são cultivadas ou colhidas dos bancos naturais e utilizadas como fonte de alimentos, ficocolóides, ficosuplementos, produtos farmacêuticos, nutracêuticos e cosméticos (REDDY; GUPTA; JHA, 2010). Dentre estas, *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C. Silva é amplamente cultivada para a produção da *kappa* carragenana, um ficocolóide utilizado como agente emulsificante e estabilizante (BINDU; LEVINE, 2011; BIXLER; PORSE, 2011). Nos últimos anos, a introdução desta espécie tem se expandido em regiões tropicais e subtropicais, suscitando questionamentos, estudos e monitoramento ambiental que avaliam os riscos de invasão da espécie (PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999; ASK et al., 2003; CASTELAR, et al., 2009; OLIVEIRA; SILVA; AMANCIO, 2009; HAYASHI et al., 2011a).

Devido à sua importância relacionada aos aspectos econômico e ambiental, diversos estudos sobre a fisiologia de *K. alvarezii* já foram realizados (ARECES 1995; PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999; PAULA; ERBERT; PEREIRA, 2001; AGUIRRE-von-WOBESER; FIGUEROA; CABELLO-PASSINI, 2001; BULBOA; PAULA, 2005; ANDERSON et al., 2006; BULBOA; PAULA; CHOW, 2008; LOUREIRO; REIS; CRITCHLEY, 2010; SCHMIDT; MARASCHIN; BOUZON, 2010; HAYASHI et al., 2011a,b; REIS; LOUREIRO; MESQUITA, 2011; LOUREIRO et al., 2012; HURTADO et al., 2012; LIDEMAN et al., 2013). O conhecimento da fisiologia da espécie auxilia no aumento da produção e no rendimento da carragenana, na identificação de novas áreas de cultivo, e também nas ações de monitoramento e de investigações de riscos ambientais como na capacidade de sobrevivência e de desenvolvimento das algas (ASK; AZANZA, 2002; ASK et al., 2003).

Estudos em campo e em laboratório comprovam que a temperatura e salinidade são importantes fatores ambientais que influenciam o desenvolvimento de *K. alvarezii*, atuando como fatores ambientais controladores (PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999; BULBOA; PAULA, 2005). A temperatura tem influência no crescimento de *K. alvarezii*, e seu limite de tolerância varia em torno de 25 a 32 °C (PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999; BULBOA; PAULA, 2005). Poucos estudos do efeito da salinidade sob a fisiologia de *K. alvarezii* foram realizados (ASK; AZANZA, 2002). Hayashi et al. (2011b) e Reis, Loureiro e Mesquita (2011) discutem que a salinidade

afeta o crescimento e o rendimento da carragenana, e que a espécie sobrevive em um intervalo de 25 a 45 ups de salinidade.

No Brasil, *K. alvarezii* foi introduzida experimentalmente em 1995, no litoral sudeste, e as pesquisas demonstraram baixo risco de invasão ambiental nas regiões sul e sudeste (PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999, 2002; CASTELAR et al., 2009; HAYASHI et al., 2011a). No entanto, a introdução desta espécie exótica na costa nordeste do país, região tropical do Brasil (LUCENA et al., 2007; OLIVEIRA; SILVA; AMANCIO, 2009), vem gerando discussões sobre o risco de propagação no ambiente, que se agrava com a ausência de informações sobre os efeitos desta introdução até o momento.

Deste modo, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar o potencial de sobrevivência e de crescimento de algas arribadas de *K. alvarezii* para outras áreas do litoral brasileiro. Para atingir este objetivo, foram avaliados em laboratório, os efeitos da temperatura e salinidade no crescimento e no conteúdo de pigmentos e de proteínas de três variantes pigmentares de *K. alvarezii* provenientes de arribadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta

Foram coletadas três amostras de cada variante pigmentar: verde (VD), vermelha (VM) e marrom (MR) de *K. alvarezii* arribada na praia de Pitimbu, Paraíba (07°28'32.28"S–34°48'24.87"L) (Figura 1). As coletas foram realizadas na estação seca (novembro/2011) e chuvosa (agosto/2012). As algas arribadas se originaram a partir de talos que se quebravam das balsas de cultivo localizadas em região próxima, e que chegavam à praia através das correntes locais ou nas redes de pescadores (Figura 2).

As amostras foram transportadas para o Laboratório de Algas Marinhas (LAM) do Departamento de Sistemática e Ecologia da Universidade Federal da Paraíba (DSE)/CCEN/UFPB, onde foram limpas e mantidas em cultura por três dias, em aquários de 15 L contendo água do mar filtrada e esterilizada, a 24 ± 2 °C, 34 ± 1 ups e fotoperíodo de 12 h. O processo de filtragem e esterilização da água do mar consistiu

em uma pré-filtragem com membrana de 10 μm de diâmetro do poro (Millipore), seguido de uma filtragem com filtro de membrana de 0,45 μm diâmetro do poro (Millipore). Logo após a filtragem, a água do mar é aquecida a 90 °C por duas horas, resfriada, e novamente aquecida a 90 °C por duas horas.

Cultivo de *K. alvarezii* em laboratório

As variantes pigmentares de *K. alvarezii* foram transferidas para o Laboratório de Cultura de Algas e Cianobactérias “Marilza Cordeiro Marino” do Núcleo de Pesquisa em Ficologia, do Instituto de Botânica, em São Paulo (IBt/SP). As algas foram mantidas em cultura por um período de 15 dias antes do início dos experimentos, em água do mar filtrada, esterilizada e enriquecida com 25% da solução de nutrientes de Von Stosch (VSES/4), preparada segundo Edwards (1970) e modificada por Yokoya (2000). Dióxido de germânio (GeO_2) na concentração de 1 mg.L^{-1} foi adicionado ao meio VSES/4 para inibir o crescimento de diatomáceas. As condições de cultura foram: temperatura 23 ± 3 °C, salinidade 32 ± 1 ups, densidade de fluxo fotônico de 70 a 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40 W do tipo “luz do dia” e fotoperíodo de 12 h. Nesta etapa foram selecionados, limpos e cultivados segmentos apicais com cerca de 5 cm de comprimento.

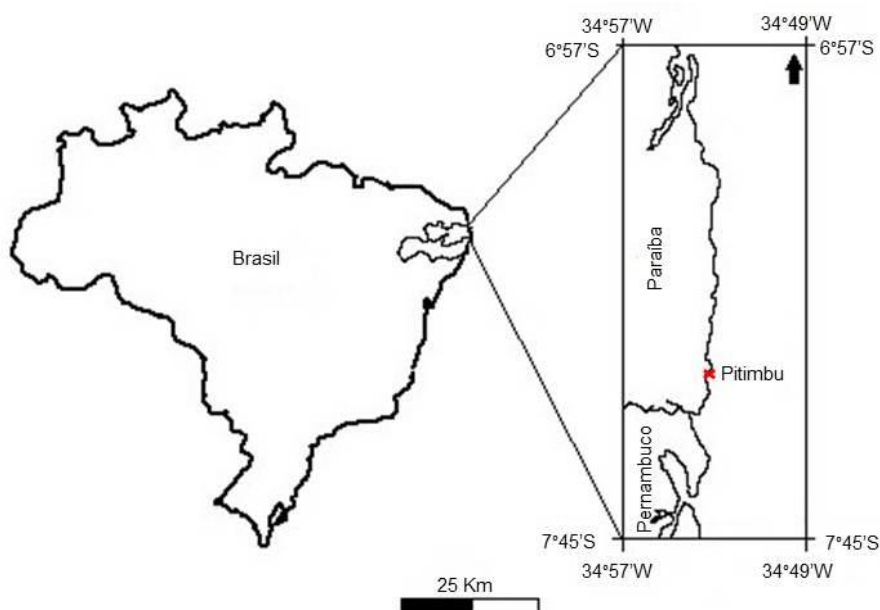


Figura 1. Localização da Praia de Pitimbu, litoral sul da Paraíba, Brasil.

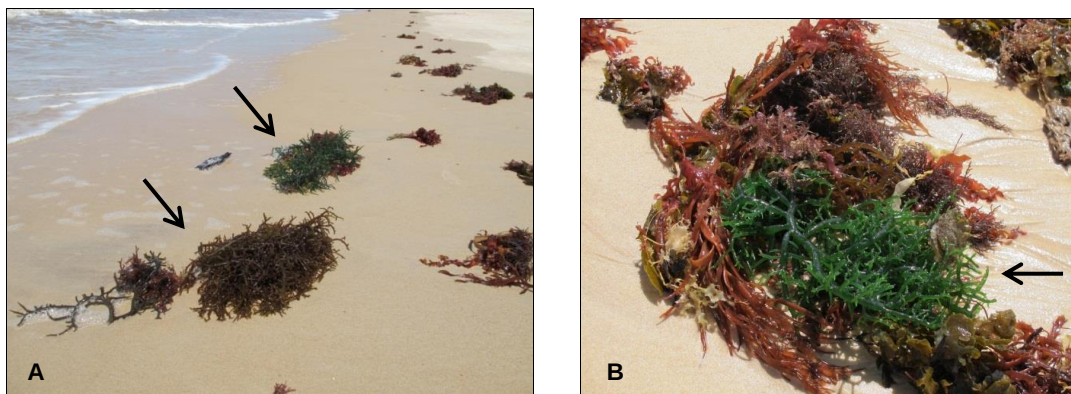


Figura 2. Espécimes arribados de *Kappaphycus alvarezii* na Praia de Pitimbu, Paraíba. A) Aspecto geral de *K. alvarezii* arribado na praia, com detalhe das variantes verde e marrom; B) Detalhe da variante verde.

Experimentos de temperatura e salinidade

Para avaliar a sobrevivência de *K. alvarezii* arribada às variações de temperatura, cinco segmentos apicais com biomassa inicial total de $35 (\pm 2)$ mg foram cultivados em Erlenmeyer com 180 ml de meio de cultura VSES/4 com adição de 1 mg.L^{-1} dióxido de germânio (GeO_2). O meio de cultura foi renovado semanalmente. Os experimentos de temperatura foram realizados em câmaras do tipo BOD (Eletrolab e Fanem), e foram testadas quatro temperaturas: 20, 24, 28 e 32°C . As condições experimentais foram: densidade de fluxo fotônico de 100 a $160 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40 W do tipo “luz do dia”, salinidade de 32 ± 1 ups e fotoperíodo de 12 horas. Os valores de temperatura testados foram selecionados com base nos dados de literatura sobre a tolerância de *K. alvarezii* a variação de temperatura (Areces, 1995; PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999; BULBOA; PAULA, 2005).

Para avaliar a sobrevivência de *K. alvarezii* a variação de salinidade, a biomassa inicial e as condições experimentais foram as mesmas descritas acima, com temperatura de $24 (\pm 1)^\circ\text{C}$. Foram testados cinco tratamentos: 15, 25, 35, 45 e 55 ups. As diferentes salinidades foram obtidas através do método de congelamento e descongelamento da água do mar (OLIVEIRA et al., 1995). As diferentes salinidades testadas foram selecionadas com base no intervalo de tolerância para a espécie *K. alvarezii* descrito na literatura (HAYASHI et al., 2011b; REIS; LOUREIRO; MESQUITA, 2011).

Os experimentos de temperatura e salinidade foram realizados em um período de 28 dias. Todos os tratamentos foram testados com três repetições simultâneas (n=3) para as variantes verde (VD), vermelho (VM) e marrom (MR).

Variação da biomassa de *Kappaphycus alvarezii*

A biomassa fresca dos segmentos apicais foi determinada semanalmente durante 28 dias de experimento, com auxílio de uma balança analítica. O excesso da água foi retirado com papel absorvente antes da pesagem. A sobrevivência e crescimento da *K. alvarezii* arribada foi analisada a partir da média da variação da biomassa fresca de cada tratamento e da taxa de crescimento diário (TC), calculada segundo Hurtado et al. (2001):

$$TC = \ln (B_f/B_i)/t \times 100,$$

onde B_f é a biomassa fresca final; B_i , a biomassa fresca inicial e t é o tempo do experimento em dias.

As algas que apresentaram contaminação e despigmentação do talo durante o experimento continuaram a ser cultivadas, com o propósito de avaliar o seu potencial de recuperação e para extrair e quantificar os conteúdos de pigmentos e proteínas.

Extração e quantificação de pigmentos

Após 28 dias, os meios dos diferentes tratamentos de temperatura e salinidade foram trocados e as algas foram mantidas nas mesmas condições de cada tratamento por mais quatro dias, que representa o período de maior produção dos pigmentos¹ após a troca de meio de cultura. Após esse período, uma alíquota de 80 (± 1) mg de massa fresca de cada amostra foi congelada em gelo seco², e mantidas em freezer a -

¹ Foi realizado um teste preliminar para estabelecer o tempo (em dias) de maior produção de pigmentos e verificou-se que o maior pico de produção das ficobiliproteínas em *K. alvarezii* foi no 4º dia após a troca de meio de cultura.

²As amostras foram congeladas em gelo seco. Testes preliminares para avaliar a influência dos métodos de congelamento de amostras de *K. alvarezii* em nitrogênio líquido e em gelo seco comprovaram que não

80°C para análises posteriores. Antes do congelamento, as amostras foram limpas das contaminantes para evitar interferência dos mesmos. Foram consideradas as amostras de todos os tratamentos, mesmo aquelas com contaminação e despigmentação do talo. As amostras com biomassa inferior a 80 mg, foi considerada uma alíquota de 30 mg que foi diluída na quantidade de solução tampão proporcional.

Para extração dos pigmentos, 80 mg de cada amostra (n=3) foi macerada em nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino, o qual foi diluído em 1 ml de solução tampão fosfato 50 mM (pH 5,5), homogeneizada e centrifugada por 20 minutos, a 14.000 g, a 4 °C. O sobrenadante, contendo as ficobiliproteínas, foi mantido no escuro a 4°C para posterior leitura em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800). O material sedimentado foi diluído com acetona 90% (1 ml) e centrifugado por 15 minutos a 12.000 g a 4 °C. O sobrenadante, contendo clorofila a, foi recolhido e mantido no escuro a 4 °C.

Os pigmentos foram quantificados por espectrofotometria, e a calibragem do aparelho para a leitura das ficobiliproteínas foi feita com solução tampão fosfato, e para a leitura de clorofila a, com acetona 90%. As concentrações da clorofila a e das ficobiliproteínas foram calculadas de acordo com Jeffrey e Humphrey (1975) e Kursar, van der Meer e Alberte (1983), respectivamente, a partir das fórmulas (Tabela 1):

Tabela 1. Fórmulas utilizadas para quantificar as ficobiliproteínas segundo Kursar, van der Meer e Alberte (1983) e clorofila a, segundo Jeffrey e Humphrey (1975).

Pigmentos	Fórmulas
Aloficocianina (AFC)	$AFC = 181,3.A_{651} - 22,3.A_{614}$
Ficocianina (FC)	$FC = 151,1.A_{614} - 99,1.A_{651}$
Ficoeritrina (FE)	$FE = 155,8.A_{498,5} - 40,0.A_{614} - 10,5.A_{651}$
Clorofila a (Cla)	$Cla = 11,85.A_{664} - 1,54.A_{647} - 0,08.A_{630}$

$A_{498,5}$; A_{614} ; A_{630} ; A_{647} e A_{651} são os valores da absorbância nos comprimentos de onda de 498,5; 614, 630, 647 e 651 nm, respectivamente.

há diferenças significativas entre os dois métodos sobre a concentração final das ficobiliproteínas, clorofila a e proteínas solúveis totais.

Extração e quantificação das proteínas solúveis totais

Para extração das proteínas solúveis totais, 80 mg de amostra de cada tratamento (n=3) foi macerada com nitrogênio líquido, até virar um pó fino, o qual foi diluído em 0,8 ml de solução tampão fosfato 0,2 M (pH 8), 5 mM de EDTA e 1 mM de DTT. Para as amostras inferior a 80 mg, foi considerada uma alíquota de 30 mg que foi diluída em uma quantidade de solução proporcional. A solução foi homogeneizada por 15 minutos a 12.000 g a 4°C. A solução de Coomassie Blue (Bio-Rad) foi adicionada ao sobrenadante, de acordo com o método de Bradford (1976), e a concentração de proteínas solúveis totais foi quantificada por espectrofotometria no comprimento de onda de 595nm. Para calcular a curva padrão foi utilizada BSA (albumina sérica bovina).

Análise estatística

Para avaliar a sobrevivência e crescimento das variantes pigmentares de *K. alvarezii* a diferentes temperaturas e salinidades foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de dois fatores, considerando $p < 0,05$. Para os resultados que apresentaram diferenças significativas, foi utilizado o teste “*a posteriori*” de Neuman-Keuls. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa STATISTICA 8.0.

RESULTADOS

Efeitos da temperatura em *Kappaphycus alvarezii*

As Tabelas 2 e 3 apresentam a média ($\pm$ desvio padrão) da variação da biomassa (mg) e a taxa de crescimento ($\% \text{ dia}^{-1}$) da *K. alvarezii* arribada coletada no período seco e no período chuvoso, respectivamente. A temperatura teve efeito significativo na taxa de crescimento da *K. alvarezii* arribada coletadas no período seco ($F=144,61$; $p < 0,05$) e no período chuvoso ($F=55,31$; $p < 0,05$). As algas coletadas no período seco apresentaram maior crescimento do que aquelas coletadas no período chuvoso, consequentemente, maior resistência e sobrevivência as variações de temperatura. As taxas de crescimento diário (TC) variaram entre 0 a 3,14 ($\pm 0,63$) %

dia⁻¹ nas algas coletadas no período seco, e de 0 a 0,39 ($\pm 0,05$) % dia⁻¹ nas algas coletadas no período chuvoso (Figura 3).

No experimento com as algas coletadas no período seco, a variante verde apresentou as maiores taxas de crescimento e sobrevivência em relação as variantes vermelha e marrom (Figura 3, tabela 2). Nos tratamentos a 20 e 24°C foram observadas as maiores taxas de crescimento das algas arribadas. A variante marrom não tolerou a condição a 32 °C e ocorreu morte de porções do talo (Figura 3, Tabela 2).

As algas coletadas no período chuvoso apresentaram taxa de crescimento menor que as algas do período seco, e a variante verde apresentou as maiores taxas de crescimento e sobrevivência em relação a variante vermelha e marrom (Figura 3, Tabela 3). As maiores TC ocorreram nas temperaturas de 20 e 24°C na variante verde, 0,39-0,31 % dia⁻¹ (Figura 3, Tabela 3). Os tratamentos a 28 e 32°C foram limitantes a sobrevivência das algas. A 28 e 32°C foi observada despigmentação do talo e morte de parte dos talos das variantes vermelha e marrom.

Apesar da despigmentação e morte de alguns talos das algas do período seco e chuvoso, não houve perda total da biomassa em nenhum dos tratamentos, o que permitiu a análise dos conteúdos de pigmentos e proteínas de todas as amostras.

Tabela 2. Média ($\pm$ desvio padrão) da variação da biomassa (mg) e taxa de crescimento (médias $\pm$ desvio padrão) das variantes pigmentares de *Kappaphycus alvarezii* coletadas em arribadas na Praia de Pitimbu (PB) no período seco e cultivadas em diferentes temperatura.

Variante Pigmentar	Temperatura (°C)	Variação da biomassa (%)					Taxa de crescimento (% dia ⁻¹)*
		Início do experimento	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	
Verde	20	305,83 ($\pm$ 3,15)	321,43 ($\pm$ 6,11)	347,23 ($\pm$ 16,04)	383,47 ($\pm$ 28,57)	434,80 ($\pm$ 31,63)	2,82 ($\pm$ 0,56)
	24	298,17 ($\pm$ 16,97)	321,67 ($\pm$ 17,50)	356,70 ($\pm$ 13,20)	401,40 ($\pm$ 11,69)	434,4 ($\pm$ 5,87)	3,14 ($\pm$ 0,63)
	28	306,73 ($\pm$ 2,91)	330,97 ($\pm$ 10,35)	360,73 ($\pm$ 5,75)	380,20 ($\pm$ 12,84)	401,57 ($\pm$ 23,5)	2,25 ($\pm$ 0,36)
	32	305,80 ($\pm$ 1,85)	333,87 ($\pm$ 3,87)	353,13 ($\pm$ 5,45)	362,57 ($\pm$ 10,70)	371,8 ($\pm$ 16,07)	1,72 ($\pm$ 0,31)
Vermelha	20	302,87 ($\pm$ 7,17)	295,67 ($\pm$ 8)**	308,97 ($\pm$ 13,61)	336,13 ($\pm$ 17,62)	359,8 ($\pm$ 29,37)	1,54 ($\pm$ 0,64)
	24	301,53 ($\pm$ 2,84)	314,60 ($\pm$ 18,36)	328,13 ($\pm$ 39,86)	354,13 ($\pm$ 56,29)	350 ($\pm$ 73,36)**	1,13 ($\pm$ 1,5)
	28	303,63 ($\pm$ 5,61)	313,77 ($\pm$ 10,28)	318,53 ($\pm$ 15,28)	319,07 ($\pm$ 19,99)	325,53 ($\pm$ 16,38)	0,66 ($\pm$ 0,29)
	32	299,17 ($\pm$ 7,10)	296,47 ($\pm$ 16,53)	307,40 ($\pm$ 21,23)	312,47 ($\pm$ 18,78)	303,33 ($\pm$ 18,99)**	0,11 ($\pm$ 0,66)
Marrom	20	304,77 ($\pm$ 3,91)	317,03 ($\pm$ 3,23)	335,70 ($\pm$ 4,26)	361,50 ($\pm$ 3,99)	379,93 ($\pm$ 15,41)	1,92 ($\pm$ 0,37)
	24	306,70 ($\pm$ 3,46)	295,07 ($\pm$ 25,45)**	306,93 ($\pm$ 5,98)	321,97 ($\pm$ 8,02)	328,17 ($\pm$ 13,28)	0,64 ($\pm$ 0,38)
	28	306,13 ($\pm$ 3,38)	313,13 ($\pm$ 6,46)	311,67 ($\pm$ 13,87)**	314,50 ($\pm$ 14,72)	312 ($\pm$ 1,83)**	0,19 ($\pm$ 0,15)
	32	306,43 ($\pm$ 3,42)	310,43 ($\pm$ 5)	311,23 ($\pm$ 8,11)	313,27 ($\pm$ 28,66)	256,1 ($\pm$ 36,99)**	***

*Após 28 dias de experimento. **Parte das algas morreram. ***Parte das algas morreram e não houve taxa de crescimento.

Tabela 3. Média ($\pm$ desvio padrão) da variação da biomassa (mg) e taxa de crescimento (médias $\pm$ desvio padrão) das variantes pigmentares de *Kappaphycus alvarezii* coletadas em arribadas na Praia de Pitimbu (PB) no período chuvoso e cultivadas em diferentes temperatura.

Variante Pigmentar	Temperatura (°C)	Variação da biomassa (%)					Taxa de crescimento (% dia ⁻¹)*
		Início do experimento	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	
Verde	20	355,27 ($\pm$ 2,63)	374,87 ($\pm$ 3,61)	373,87 ($\pm$ 2,38)**	380,43 ($\pm$ 3,81)	396,50 ($\pm$ 4,11)	0,39 ($\pm$ 0,06)
	24	354,57 ($\pm$ 2,45)	368,07 ($\pm$ 6,3)	372,83 ($\pm$ 9,75)	380,77 ($\pm$ 2,39)	386,80 ($\pm$ 9,43)	0,31 ($\pm$ 0,08)
	28	356,07 ($\pm$ 1,90)	362,13 ($\pm$ 7,59)	361,73 ($\pm$ 8,53)**	373,33 ($\pm$ 3,52)	370,9 ($\pm$ 13,13)	0,15 ($\pm$ 0,14)
	32	354,90 ($\pm$ 4,23)	327,23 ($\pm$ 5,36)**	221,2 ($\pm$ 35,32)**	152 ($\pm$ 91,85)**	146,33 ($\pm$ 85,86)**	***
Vermelha	20	351,93 ($\pm$ 1,76)	353,6 ($\pm$ 18,12)	356,9 ($\pm$ 16,84)	367,53 ($\pm$ 15,47)	372,50 ($\pm$ 5,46)	0,2 ($\pm$ 0,04)
	24	355,93 ($\pm$ 2,78)	369,8 ($\pm$ 14,13)	359,07 ($\pm$ 9,40)**	339,80 ($\pm$ 30,49)**	321,50 ($\pm$ 61,27)**	0,08 ($\pm$ 0,14)
	28	354,33 ($\pm$ 3,74)	356 ($\pm$ 12,21)	323,87 ($\pm$ 14,13)**	326,97 ($\pm$ 27,81)	312,17 ($\pm$ 29,45)**	***
	32	355,43 ($\pm$ 0,55)	335,67 ($\pm$ 37,79)**	269,83 ($\pm$ 53,19)**	219,10 ($\pm$ 15,69)**	186,90 ($\pm$ 59,65)**	***
Marrom	20	354,07 ($\pm$ 1,53)	380,93 ($\pm$ 10,51)	387,73 ($\pm$ 15,73)	388,47 ($\pm$ 26,29)	347,83 ($\pm$ 62,02)**	***
	24	352,83 ($\pm$ 2,28)	376,27 ($\pm$ 2,82)	380,17 ($\pm$ 7,52)	351,13 ($\pm$ 38,69)**	313,87 ($\pm$ 62,02)**	0,09 ($\pm$ 0,16)
	28	351,93 ($\pm$ 2,44)	369 ($\pm$ 4,85)	346,23 ($\pm$ 29,79)**	334,20 ($\pm$ 43,26)**	319,40 ($\pm$ 54,10)**	0,1 ($\pm$ 0,17)
	32	354,20 ($\pm$ 4,03)	365,57 ($\pm$ 13,14)	237,53 ($\pm$ 20,22)**	211,93 ($\pm$ 0,50)**	211,57 ($\pm$ 1,81)**	***

*Após 28 dias de experimento. **Perda de biomassa das algas. ***Parte das algas morreram e não houve taxa de crescimento.

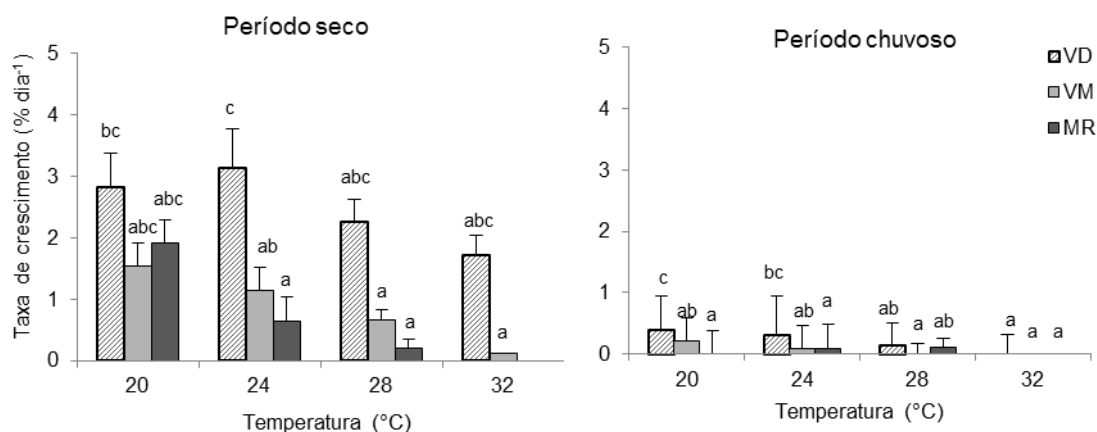


Figura 3. Taxa de crescimento (%d⁻¹) das variantes pigmentares de *Kappaphycus alvarezii* coletadas de arribadas na Praia de Pitimbu (PB) no período seco e chuvoso, submetidas a diferentes temperaturas após 28 dias. As barras representam os valores médios da TC ($\pm$ desvio padrão) (n=3). As letras distintas representam as diferenças significativas segundo o teste *a posteriori* de Neuman-Keuls ($p < 0,05$). VD = variante verde, VM = variante vermelha e MR = variante marrom.

Em todos os tratamentos foram observados a despigmentação do talo e o desenvolvimento de uma espécie filamentosa pertencente ao gênero *Acrochaetium* Nägeli in Nägeli & Cramer (Rhodophyta), que crescia nos talos e, em alguns casos, provocava necrose e morte de porções dos talos (Figura 4). Estas contaminações foram observadas a partir da segunda semana de experimento e ocorreu com maior frequência nas variantes de cor vermelha e marrom nas temperaturas de 24, 28 e 32°C. As algas coletadas no período chuvoso apresentaram maior frequência de contaminação e doenças que aquelas coletadas no período seco.



Figura 4. Efeitos da temperatura no aspecto geral dos talos de *K. alvarezii*. A) Variante vermelha (VM) cultivada a 28°C na terceira semana de experimento, com detalhe da endófito *Acrochaetium* (seta); B) Variante marrom (MR) cultivada a 24°C na segunda semana de experimento, com detalhe da despigmentação; C) Variante verde (VD) cultivada a 32°C na segunda semana do experimento, com detalhe da endófito *Acrochaetium* presente na região medular do talo (seta); D) Variante marrom a cultivada 32°C na primeira semana de experimento. Todas as ilustrações são das algas coletadas no período chuvoso. Escala = 1cm.

A temperatura influenciou as concentrações de clorofila *a* das algas do período seco ($F=191$; $p<0,05$) e do período chuvoso ($F=181,2$; $p<0,05$) (Figura 5). As maiores concentrações de clorofila *a* foram observadas nas variantes verde e marrons.

A variação da temperatura não alterou as concentrações de aloficocianina nas algas do período seco ($F=1,29$; $p>0,05$) e do período chuvoso ($F=1,62$; $p>0,05$) (Figura 6). Em relação às concentrações de ficocianina, a temperatura influenciou o conteúdo nas algas do período chuvoso ($F=16,03$; $p<0,05$), mas não afetou a concentração nas algas do período seco ($F=0,94$; $p>0,05$). Quanto à ficoeritrina, a temperatura afetou apenas a concentração nas algas do período seco ($F=200,22$; $p<0,05$), e não influenciou nas algas no período chuvoso ($F=2,03$, $p>0,05$) (Figura 6).

A concentração de proteínas solúveis totais das algas do período chuvoso variou em função da temperatura ($F=165,14$; $p<0,05$), e a concentração de proteínas das algas do período seco não variou significativamente ($F=1,47$; $p>0,05$) (Figura 7). A concentração de proteínas das algas do período seco foi maior do que das algas do período chuvoso.

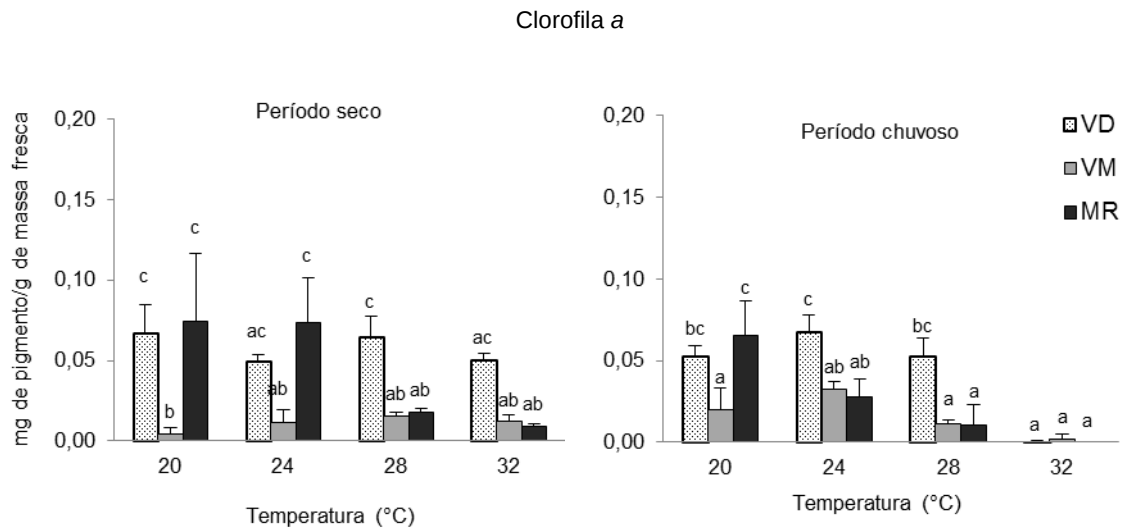


Figura 5. Concentração de clorofila a (mg de pigmento/g de massa fresca) de *K. alvarezii* cultivada em diferentes temperaturas após 32 dias. Os valores indicam a média das concentrações ($\pm$ desvio padrão) ($n=3$). As letras distintas indicam as diferenças significativas de acordo com o teste *a posteriori* de Neuman-Keuls ($p<0,05$). VD = variante verde, VM = variante vermelha e MR = variante marrom.

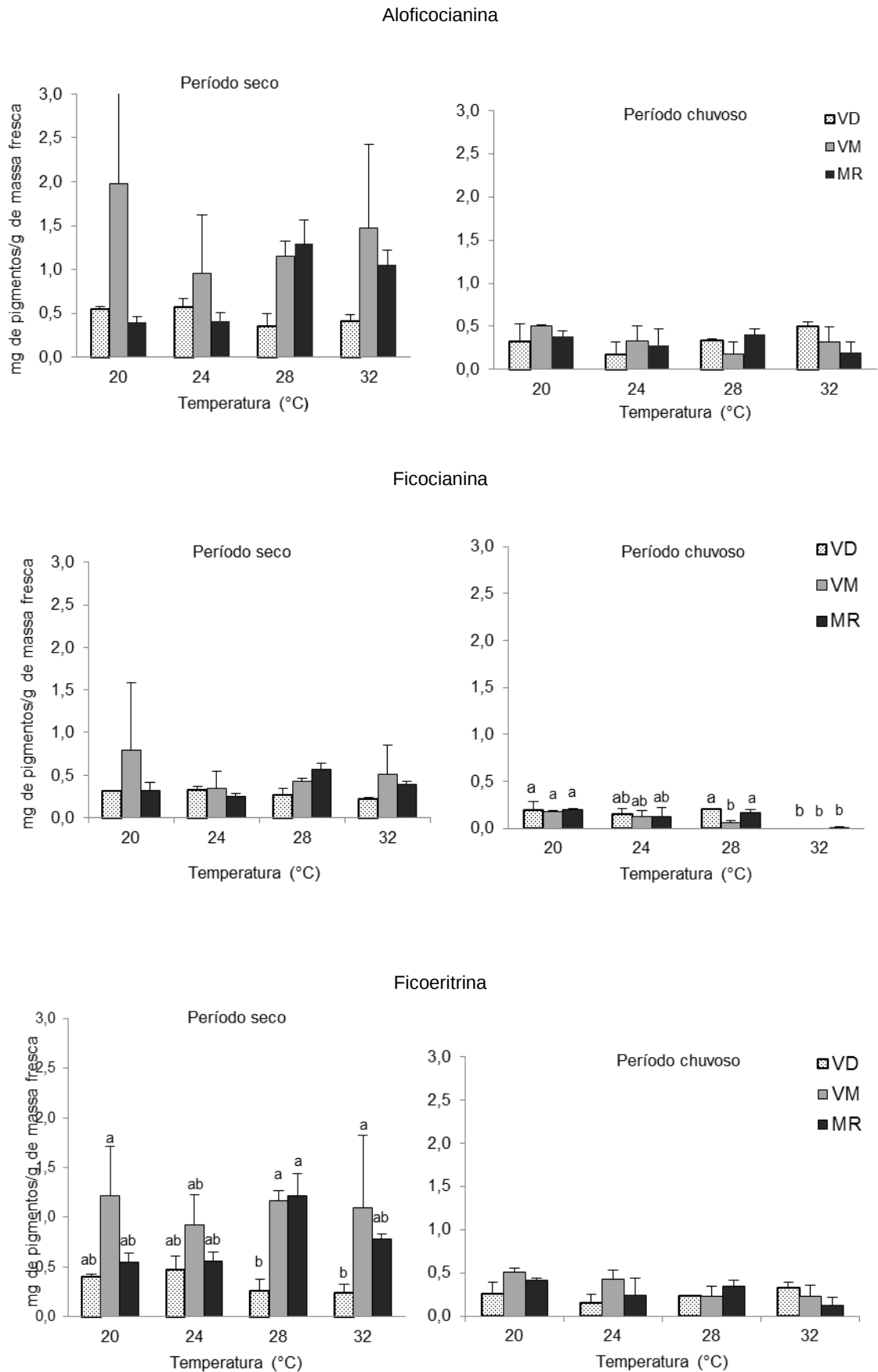


Figura 6. Concentração de alofococianina, ficocianina e ficoeritrina (mg de pigmento/g de massa fresca) de *K. alvarezii* cultivada em diferentes temperaturas após 32 dias. Os valores indicam a média das concentrações ($\pm$ desvio padrão) (n=3). As letras distintas indicam as diferenças significativas de acordo

com o teste *a posteriori* de Neuman-Keuls ($p < 0,05$). VD = variante verde, VM = variante vermelha e MR = variante marrom.

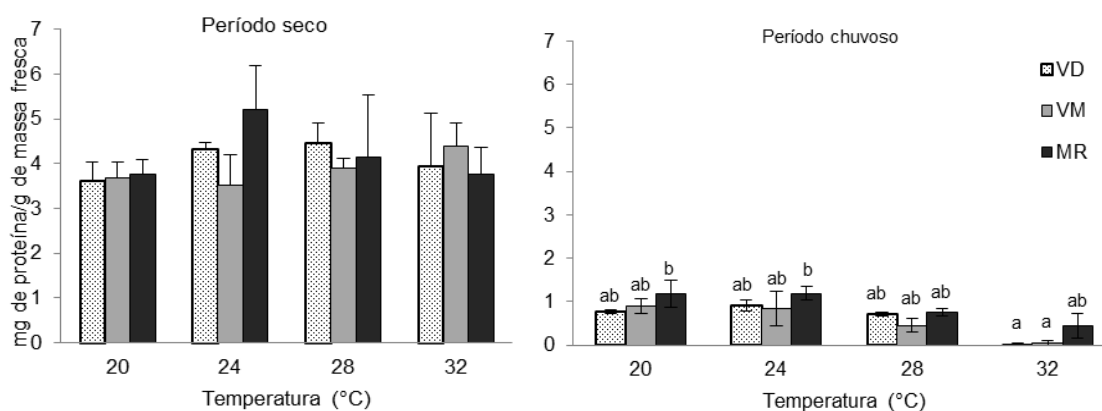


Figura 7. Concentração de proteínas solúveis totais (mg de proteína/g de massa fresca) de *K. alvarezii* cultivada em diferentes temperaturas após 32 dias. Os valores indicam a média das concentrações ($\pm$ desvio padrão) ($n=3$). As letras distintas indicam as diferenças significativas de acordo com o teste *a posteriori* de Neuman-Keuls ($p < 0,05$). VD = variante verde, VM = variante vermelha e MR = variante marrom.

Efeitos da salinidade em *Kappaphycus alvarezii*

As Tabelas 4 e 5 apresentam a média a variação da biomassa (mg) e a taxa de crescimento ($\% \text{ dia}^{-1}$) da *K. alvarezii* arribada coletada no período seco e no período chuvoso, respectivamente, e submetidas a diferentes salinidades. A variação da salinidade influenciou o crescimento da *K. alvarezii* arribada coletadas no período seco ($F=145,96$; $p < 0,05$) e no período chuvoso ($F=307,47$; $p < 0,05$) (Figura 8).

As algas arribadas do período seco e chuvoso apresentaram respostas diferentes em função da variação da salinidade. As taxas de crescimento diário (TC) variaram entre 0 a $3,49 (\pm 0,52) \% \text{ dia}^{-1}$ nas algas coletadas no período seco, e de 0 a $1,97 (\pm 0,31) \% \text{ dia}^{-1}$ nas algas coletadas no período chuvoso (Figura 8, Tabelas 4 e 5).

Nos tratamentos com as algas arribadas do período seco, a variante de cor verde foi a que apresentou maior capacidade de sobrevivência e crescimento as variações de salinidade. A 15 ups de salinidade, apenas a variante verde apresentou crescimento, mesmo que baixo. As variantes vermelha e marrom não resistiram a condição hiposalina (15 ups) e ocorreu a despigmentação do talo e morte de parte dos talos. Ao final da segunda semana e ao longo do período experimento, foram

observadas a despigmentação e perda de turgescência de porções dos talos no tratamento de 15 ups. Estes estresses foram mais frequentes nas variantes vermelha e marrom, e ocorreram necroses, despigmentação e morte de alguns talos, mas aquelas algas que sobreviveram estavam despigmentadas e enfraquecidas (Figura 9).

Nas salinidades de 25 e 35 ups, foram observadas as maiores taxas de crescimento da *K. alvarezii* arribada em todas as variantes de cor (Figura 8, Tabela 4). Na salinidade de 45 ups, apenas a variante verde cresceu, embora na quarta semana de experimento tenha ocorrido uma diminuição deste crescimento. A 45 ups ocorreu despigmentação e morte de parte dos talos das variantes vermelha e marrom. Em condição hipersalina (55 ups), apenas a variante verde cresceu, as variantes vermelha e marrom não toleraram e houve perda de biomassa. A 55 ups, as algas despigmentaram e enrijeceram nos primeiros dias de experimentos, e este estresse continuou ao longo do experimento.

Nos tratamentos a 25 e 35 ups de salinidade com a variante vermelha ocorreu uma diminuição da biomassa na primeira e segunda semana de experimento (dias 7 e 14), somente a partir deste período do experimento que foi observado o crescimento efetivo destes talos.

Nos experimentos com as algas arribadas do período chuvoso, as melhores condições de crescimento foram a 15 e 25 ups de salinidade (Figura 8, Tabela 5). A 15 ups de salinidade, as algas do período chuvoso não despigmentaram, nem perderam a turgescência como ocorreu com as algas do período seco. A 35 ups, apenas a variante de cor marrom apresentou taxa de crescimento, apesar de ter sido muito baixa. As variantes de verde e vermelha ocorreu contaminação pela *Acrochaetium*, despigmentação e perda de biomassa. A 45 e 55 ups de salinidade todas as variantes de cor também tiveram perda de biomassa. Na primeira semana do tratamento a 55 ups de salinidade, os talos despigmentaram e enrijeceram, e continuou ao longo do experimento com perda de biomassa (Figura 8).

Tabela 4. Variação da biomassa (%) e taxa de crescimento (médias $\pm$ desvio padrão) das variantes pigmentares de *Kappaphycus alvarezii* coletadas em arribadas na Praia de Pitimbu (PB) no período seco e cultivadas em diferentes salinidades.

Variante Pigmentar	salinidade (ups)	Início do experimento	Variação da biomassa (%)				Taxa de crescimento (% dia ⁻¹)*
			7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	
Verde	15	297,8 ($\pm$ 11,25)	302,53 ($\pm$ 8,83)**	305,43 ($\pm$ 6,80)	316,76 ($\pm$ 5,09)	316,4 ($\pm$ 9,94)**	0,63 ($\pm$ 0,13)
	25	305,63 ($\pm$ 2,94)	333,70 ($\pm$ 6,24)	379,86 ($\pm$ 19,18)	446,76 ($\pm$ 30,17)	473,2 ($\pm$ 36,28)	3,37 ($\pm$ 0,57)
	35	300,66 ($\pm$ 12,72)	329,21 ($\pm$ 7,81)	388 ($\pm$ 11,62)	452,6 ($\pm$ 14,50)	466,5 ($\pm$ 20,90)	3,49 ($\pm$ 0,52)
	45	305,66 ($\pm$ 5,41)	330,73 ($\pm$ 5,43)	385,3 ($\pm$ 13,57)	411,73 ($\pm$ 21,81)	373,83 ($\pm$ 42,13)**	1,70 ($\pm$ 0,78)
	55	306,03 ($\pm$ 13,26)	307,33 ($\pm$ 13,84)	310 ($\pm$ 14,59)	314,5 ($\pm$ 13,96)	315,43 ($\pm$ 15,53)	0,30 ($\pm$ 0,86)
Vermelha	15	299,06 ($\pm$ 5,98)	275,46 ($\pm$ 16,92)	247,66 ($\pm$ 5,66)**	242,3 ($\pm$ 9,09)**	228,03 ($\pm$ 10,31)**	***
	25	304,9 ($\pm$ 6,15)	316,96 ($\pm$ 23,77)	361,96 ($\pm$ 22,22)	402,2 ($\pm$ 24,08)	426,86 ($\pm$ 26,85)	2,74 ($\pm$ 0,62)
	35	297,16 ($\pm$ 4,10)	280,66 ($\pm$ 19,37)**	301,8 ($\pm$ 42,62)	344,06 ($\pm$ 58,15)	363,76 ($\pm$ 60,27)	1,67 ($\pm$ 1,47)
	45	302,1 ($\pm$ 1,01)	277,53 ($\pm$ 40,60)	282,76 ($\pm$ 50,52)	303,06 ($\pm$ 56,61)	289,76 ($\pm$ 48,81)**	***
	55	303,03 ($\pm$ 4,78)	287,26 ($\pm$ 6,09)	287,3 ($\pm$ 6,54)	287,73 ($\pm$ 3,37)	286,56 ($\pm$ 3,31)**	***
Marrom	15	303,66 (4,13)	275,40 ($\pm$ 8,19)**	256,2 ($\pm$ 12,52)**	250,26 ($\pm$ 29,85)**	237,93 ($\pm$ 35,60)**	***
	25	294,93 ($\pm$ 11,41)	320,26 ($\pm$ 28,15)	349,73 ($\pm$ 40,72)	380,83 ($\pm$ 62,54)	400,73 ($\pm$ 64,82)	2,58 ($\pm$ 1,52)
	35	304,56 ($\pm$ 6,44)	309,10 ($\pm$ 5,69)	340,66 ($\pm$ 12,79)	380,06 ($\pm$ 16,19)	400,76 ($\pm$ 38,36)	2,29 ($\pm$ 0,85)
	45	309,73 ($\pm$ 0,86)	282,33 ($\pm$ 32,60)**	290,76 ($\pm$ 34,72)	301,56 ($\pm$ 34,29)	296,53 ($\pm$ 21,91)**	***
	55	304,36 ($\pm$ 6,03)	286,16 ($\pm$ 10,97)**	285,86 ($\pm$ 10,08)**	290,83 ($\pm$ 7,81)	288,43 ($\pm$ 8,75)**	***

*Após 28 dias de experimento. **Perda de biomassa das algas. ***Parte das algas morreram e não houve taxa de crescimento.

Tabela 5. Variação da biomassa (%) e taxa de crescimento (médias $\pm$ desvio padrão) das variantes pigmentares de *Kappaphycus alvarezii* coletadas em arribadas na Praia de Pitimbu (PB) no período chuvoso e cultivadas em diferentes salinidades.

Variante	salinidade	Variação da biomassa (%)					Taxa de crescimento
Pigmentar	(ups)	Início do experimento	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	(% dia ⁻¹)*
Verde	15	337,66 ($\pm$ 4,53)	475,83 ($\pm$ 12,01)	497,63 ($\pm$ 32,52)	553,8 ($\pm$ 42,75)	587,93 ($\pm$ 51,36)	1,97 ($\pm$ 0,31)
	25	354,1 ($\pm$ 5,54)	373,46 ($\pm$ 13,52)	390,36 ($\pm$ 13,36)	421,53 ($\pm$ 12,48)	459,96 ($\pm$ 21,28)	0,93 ($\pm$ 0,12)
	35	347,4 ($\pm$ 4,50)	343,93 ($\pm$ 7,57)**	344,4 ($\pm$ 2,85)	356,9 ($\pm$ 10,13)	334,93 ($\pm$ 46,76)**	***
	45	353,63 ($\pm$ 2,90)	333,8 ($\pm$ 21,08)**	329,33 ($\pm$ 16,13)**	337,06 ($\pm$ 21,12)	306,86 ($\pm$ 33,53)**	***
	55	352,5 ($\pm$ 3,48)	303,83 ($\pm$ 10,32)**	311,73 ($\pm$ 10,50)	318,86 ($\pm$ 7,83)	328,06 ($\pm$ 5,80)	***
Vermelha	15	352,6 ($\pm$ 3,14)	468,33 ($\pm$ 17,22)	503,53 ($\pm$ 30,32)	530,4 ($\pm$ 39,54)	580,03 ($\pm$ 43,58)	1,77 ($\pm$ 0,28)
	25	345,8 ($\pm$ 5,36)	364,96 ($\pm$ 12,33)	376,93 ($\pm$ 13,37)	406,03 ($\pm$ 14,77)	450,63 ($\pm$ 16,39)	0,94 ($\pm$ 0,10)
	35	351,4 ($\pm$ 1,77)	353 ($\pm$ 4,95)	356,83 ($\pm$ 11,10)	351,36 ($\pm$ 12,40)**	333,73 ($\pm$ 9,32)**	***
	45	352,5 ($\pm$ 6,14)	330,73 ($\pm$ 10,64)**	331,7 ($\pm$ 9,56)	328,43 ($\pm$ 9,55)**	315,4 ($\pm$ 37,34)**	***
	55	353,35 ($\pm$ 7,54)	310,8 ($\pm$ 16,08)**	312,8 ($\pm$ 14,38)	315,73 ($\pm$ 11,83)	332,13 ($\pm$ 10,84)	***
Marrom	15	355,96 ($\pm$ 9,41)	468,26 ($\pm$ 48,95)	509,93 ($\pm$ 54,98)	548,83 ($\pm$ 73,72)	566,13 ($\pm$ 10,48)	1,62 ($\pm$ 0,66)
	25	355,16 ($\pm$ 2,02)	385,3 ($\pm$ 8,11)	401,96 ($\pm$ 7,31)	434,26 ($\pm$ 12,34)	467,16 ($\pm$ 19,79)	0,98 ($\pm$ 0,14)
	35	351,63 ($\pm$ 6,20)	351,43 ($\pm$ 6,65)**	365,5 ($\pm$ 7,05)	358,9 ($\pm$ 23,93)**	360,16 ($\pm$ 34,59)	0,07 ($\pm$ 0,33)
	45	355,8 ($\pm$ 2,22)	347,2 ($\pm$ 3,10)**	342,76 ($\pm$ 2,27)**	330,23 ($\pm$ 9,07)**	302,73 ($\pm$ 16,86)**	***
	55	342,86 ($\pm$ 19,18)	314,1 ($\pm$ 21,61)**	312,1 ($\pm$ 18)**	315,93 ($\pm$ 23,49)	329,9 ($\pm$ 23,84)	***

*Após 28 dias de experimento. **Perda de biomassa. ***Parte das algas morreram e não houve taxa de crescimento.

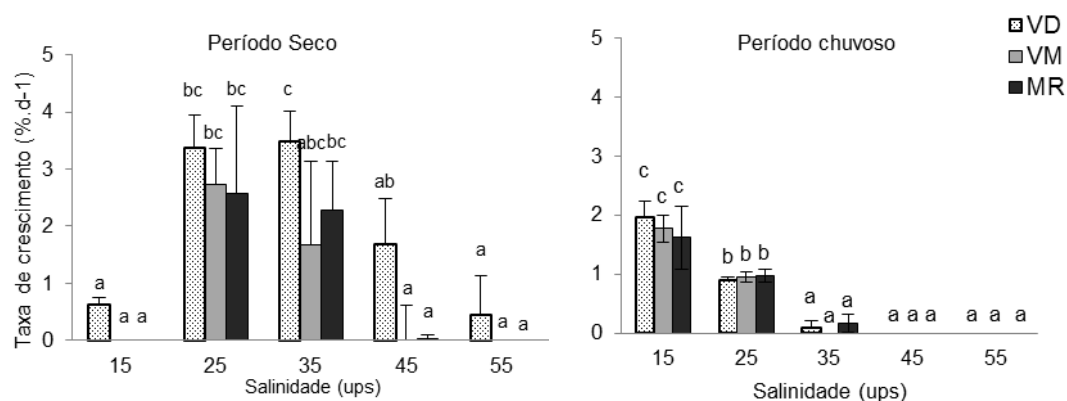


Figura 8. Taxa de crescimento (% d⁻¹) das variantes pigmentares de *K. alvarezii* coletadas na estação seca e chuvosa, submetidas a diferentes salinidades após 28 dias. As barras representam os valores médios da TC ($\pm$ desvio padrão) (n=3). As letras distintas representam diferenças significativas segundo o teste *a posteriori* de Neuman-Keuls ($p < 0,05$). VD = variante verde, VM = variante vermelha e MR = variante marrom.

Durante os experimentos de salinidade também foram observadas a despigmentação e contaminação de porções dos talos de *K. alvarezii* pela endófito *Acrochaetium*, que provocou a necrose e morte de parte das algas. Nas algas arribadas do período seco, a contaminação foi mais frequente nas salinidades de 15, 45 e 55 ups, e nas algas do período chuvoso esta contaminação ocorreu em todos os tratamentos e em maior proporção que nas algas do período seco (Figura 9). Mesmo com os casos de despigmentação do talo e morte de parte das algas durante o experimento de salinidade, não houve perda total da biomassa em nenhum dos tratamentos, o que permitiu a análise dos conteúdos de pigmentos e proteínas de todas as amostras.



Figura 9. Aspecto geral dos talos de *K. alvarezii* cultivados em diferentes salinidades. A) Variante marrom a 15 ups na segunda semana de experimento, com detalhe do talo claro; B) Variante vermelha a 55 ups na terceira semana do experimento, com detalhe do talo claro e ocorrência da endófito *Acrochaetium* (seta); C) Variante vermelha a 35 ups na segunda semana de experimento com detalhe da despigmentação do talo e ocorrência da endófito *Acrochaetium* (seta); D) Variante marrom a 45 ups na terceira semana de experimento com detalhe de despigmentação de porções do talo e ocorrência da endófito *Acrochaetium* (seta). A) Alga da estação seca, B,C e D) Alga da estação chuvosa. Escala = 1cm.

A variação da salinidade influenciou nas concentrações da clorofila *a* nas algas do período seco ($F=50,42$; $p<0,05$) e chuvoso ($F=919,69$; $p<0,05$) (Figura 10), e nas concentrações da aloficocianina ($F=37,25$; $p>0,05$), ficocianina ($F=40,44$; $p<0,05$) e ficoeritrina ($F=35,90$; $p<0,05$) nas algas do período seco. A salinidade não interferiu no conteúdo de aloficocianina ($F=171,49$; $p>0,05$), ficocianina ($F=1,58$; $p>0,05$) e ficoeritrina ($F=0,90$; $p>0,05$) nas algas do período chuvoso (Figura 11).

A salinidade não interferiu nas concentrações de proteínas solúveis totais das algas do período seco ($F=1,1$; $p>0,05$) e do período chuvoso ($F=1,68$; $p>0,05$) (Figura 12).

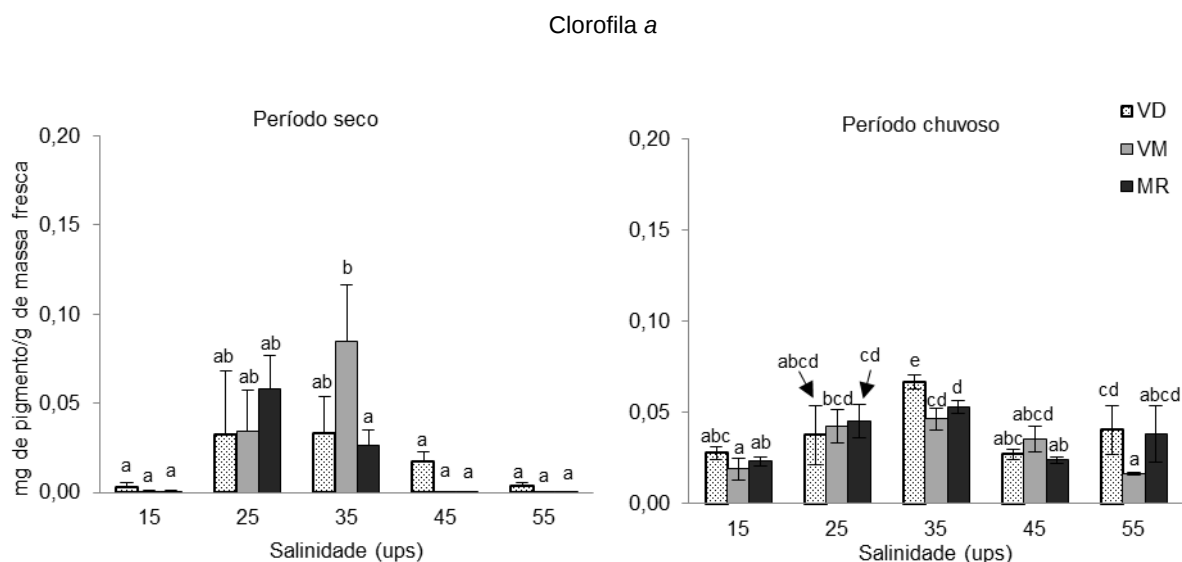


Figura 10. Concentração de clorofila *a* (mg de pigmento/g de massa fresca) de *K. alvarezii* cultivada em diferentes salinidades após 32 dias. Os valores indicam a média das concentrações ($\pm$ desvio padrão) ($n=3$). As letras distintas indicam as diferenças significativas de acordo com o teste *a posteriori* de Neuman-Keuls ($p<0,05$). VD = variante verde, VM = variante vermelha e MR = variante marrom.

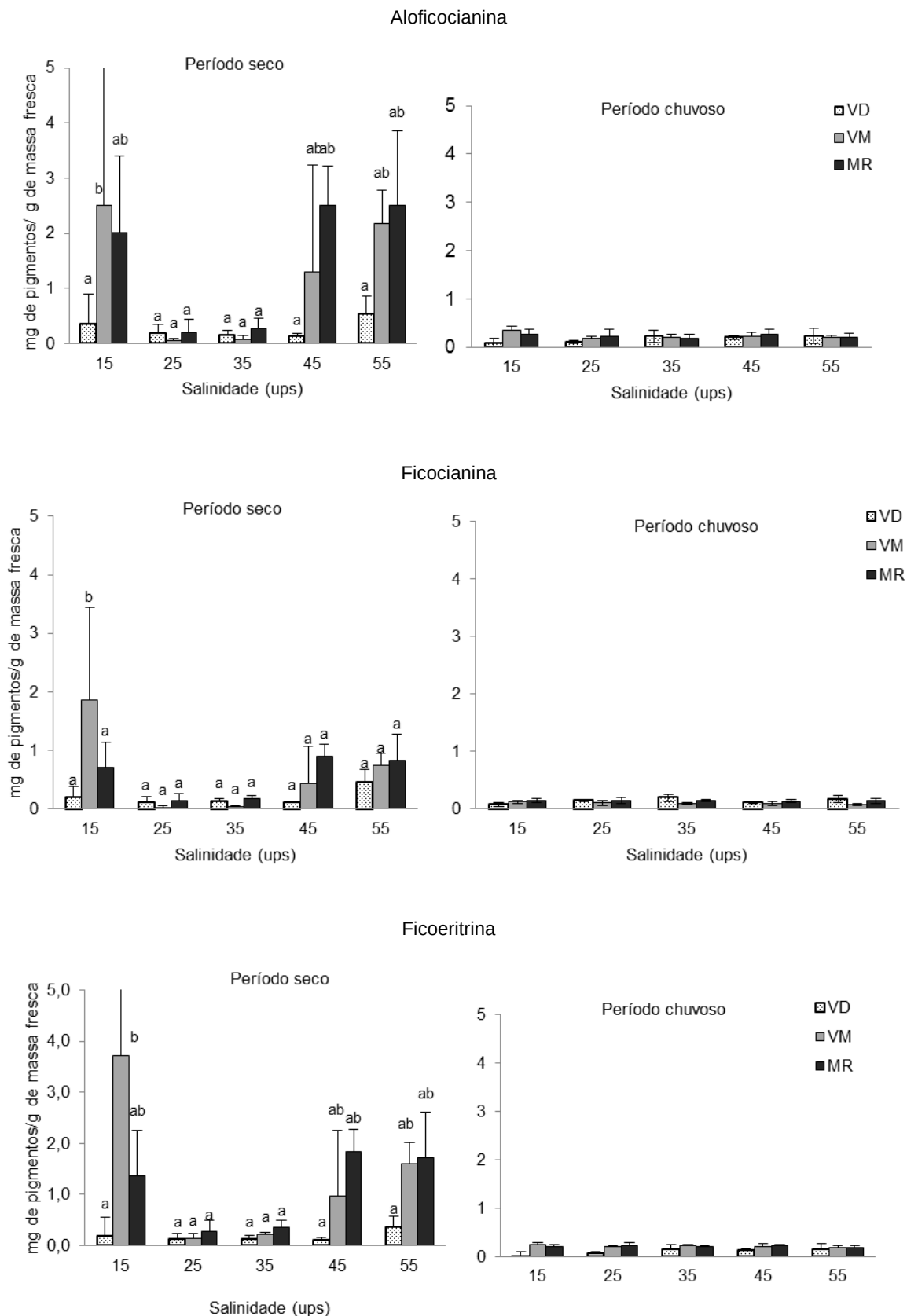


Figura 11. Concentração de alofococianina, ficocianina e ficoeritrina (mg de pigmento/g de massa fresca) de dos três variantes de *K. alvarezii* cultivadas em diferentes salinidades após 32 dias. Os valores indicam a média das concentrações ($\pm$ desvio padrão) ($n=3$). As letras distintas indicam as diferenças significativas de acordo com o teste *a posteriori* de Neuman-Keuls ($p<0,05$). VD = variante verde, VM = variante vermelha e MR = variante marrom.

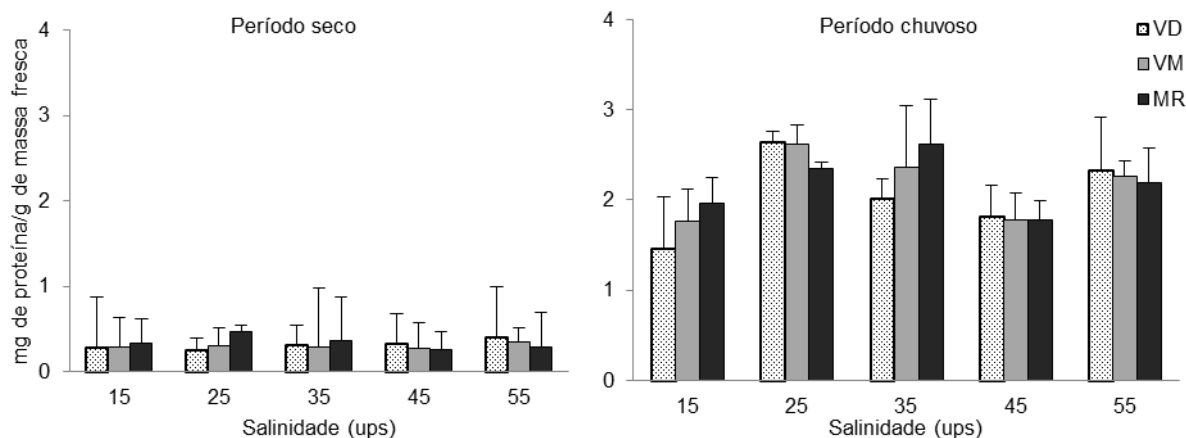


Figura 12. Concentração de proteínas solúveis totais (mg de proteína/g de massa fresca) de *K. alvarezii* cultivada em diferentes salinidades após 32 dias. Os valores indicam a média das concentrações ($\pm$ desvio padrão) (n=3). VD = variante verde, VM = variante vermelha e MR = variante marrom.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A temperatura e salinidade influenciaram de forma significativa o crescimento e sobrevivência da *K. alvarezii* arribada coletadas nos períodos seco e chuvoso no litoral da Paraíba. O conteúdo de clorofila *a*, de ficoeritrina, de ficocianina (algas do período chuvoso) e de proteínas (algas do período chuvoso) também variaram em função da temperatura e salinidade testadas.

Em relação à temperatura, os resultados indicaram uma tendência de diminuição do crescimento e da sobrevivência das algas arribadas com o aumento de temperatura. Considerando as algas coletadas no período seco, as maiores taxas de crescimento ($3,13-2,82\% \text{ dia}^{-1}$) ocorreram a 20 e 28°C, corroborando com os resultados observados em laboratório (PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999; AGUIRRE-von-WOBESER; FIGUEROA; CABELLO-PASSINI, 2001; PAULA; ERBERT; PEREIRA, 2001; BULBOA; PAULA, 2005; BULBOA; PAULA; CHOW, 2008) e em campo (ARECES 1995; ASK; AZANZA, 2002; PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999; 2002; HAYASHI; PAULA; CHOW, 2007; GÓES; REIS, 2012). No entanto, as algas coletadas durante o período chuvoso apresentaram respostas fisiológicas distintas, destacando as TC mais baixas ($0,39-0,08\% \text{ dia}^{-1}$). Embora não haja diferenças significativas nas TC das algas cultivadas em temperaturas de 20, 24 e 28 °C, as algas cultivadas na temperatura de 20 °C apresentaram uma condição fisiológica melhor,

com um crescimento saudável provavelmente em virtude da menor quantidade de alga endófito contaminante *Acrochaetium*, que provocava necrose e morte de porções dos talos.

Com exceção da variante verde coletada no período seco, as temperaturas de 28 e 32 °C foram limitantes a sobrevivência e crescimento da *K. alvarezii* arribada, principalmente as algas coletadas no período chuvoso. As algas não cresciam e sobreviveram com sinais injúrias como a despigmentação do talo, necrose, e em alguns casos, com a morte das células que resultou na perda da biomassa como ocorreu com as variantes vermelha e marrom. Segundo Bulboa e Paula (2005), a temperatura representa um fator fundamental que controla o desenvolvimento de *K. alvarezii*. Provavelmente, as altas temperaturas testadas como 28 e 32 °C afetaram as reações químicas nas algas arribadas prejudicando o seu desenvolvimento e sobrevivência. Segundo Necchi (2004) as altas temperaturas influenciam as reações químicas da fotossíntese e, conseqüentemente, interfere no desenvolvimento da alga. Além disso, o calor excessivo pode aumentar a taxa de respiração, e em temperaturas extremas, pode ainda iniciar um processo de inibição e danificar o aparelho fotossintetizante (DAVISSON, 1991).

O desenvolvimento da rodófito endófito *Acrochaetium* também prejudicou a sobrevivência e crescimento das algas arribadas de *K. alvarezii*, e algumas vezes causou a morte. Estas contaminações foram mais frequentes em todas as algas do período chuvoso sugerindo que tais algas estivessem mais susceptíveis a contaminantes. Possivelmente, este fato pode explicar as baixas taxas de crescimento e sobrevivência das algas do período chuvoso, pois com os talos debilitados e contaminados pela endófito, o desenvolvimento destas algas foi prejudicado. Nas algas do período seco, o desenvolvimento de *Acrochaetium* e despigmentação do talo também foram observados, mas em menor frequência, ocorrendo principalmente nas temperaturas de 28 e 32 °C. Quanto às variantes pigmentares, a variante verde foi mais resistente à contaminação.

É provável que os talos de *K. alvarezii* já estivessem contaminados desde a sua coleta no campo, e as condições de cultivo em laboratório testadas tenham se tornado propícias ao desenvolvimento de *Acrochaetium*, que cresceu da região interna para a externa nos talos de *K. alvarezii*. É importante mencionar ainda que, antes de iniciar os experimentos, foi realizada uma seleção dos ápices sob estereomicroscópio, descartando qualquer material com contaminação. Além disso, as algas utilizadas no presente estudo são algas arribadas, e mesmo com uma seleção criteriosa dos talos, não há como garantir a seleção de indivíduos desprovidos de contaminantes.

Diversas doenças associadas às espécies de *Kappaphycus* tem sido relatadas como o “ice-ice”, onde parte do talo da alga fica branca devido a ataques por bactérias e fungos (LARGO et al., 1998, 1999; HAYASHI et al., 2010), e infecções causadas por algas vermelhas filamentosas, como *Polysiphonia* sp. e *Neosiphonia savateri* (Harriot) M. S. Kim et I. K. Lee, que provocam rupturas da camada cortical, permitindo infecções por bactérias e fungos (HURTADO et al. 2006; VAIRAPPAN; CHUNG; HURTADO, 2008). Hayashi et al. (2010) e Ask et al. (2003) sugerem que o desenvolvimento destas epífitas/endófitas pode estar associado a sazonalidades de fatores ambientais que provocam estresse das algas cultivadas. Estes problemas associados a doenças em *Kappaphycus* são responsáveis pela diminuição significativa da produção e da qualidade da carragenana de grandes algicultores mundiais (LARGO et al., 1998; HURTADO et al., 2006; VAIRAPPAN; CHUNG; HURTADO, 2008; HAYASHI et al., 2010; LOUREIRO; REIS; CRITCHLEY, 2010; REDDY; GUPTA; JHA, 2010).

A temperatura influenciou a concentração de clorofila *a* nas algas do período seco e chuvoso, sobretudo a concentração da variante pigmentar marrom. Embora não tenha sido observado um padrão deste efeito, há uma tendência de diminuição do conteúdo de clorofila *a* na temperatura de 32 °C. As concentrações de ficocianina, aloficocianina, ficoeritrina e proteínas solúveis totais foram maiores nas algas do período seco. As baixas concentrações dos pigmentos nas temperaturas extremas e, principalmente, nas algas coletadas no período chuvoso, é resultado do processo de despigmentação e necrose dos talos, corroborando o fato do estado de estresse fisiológico destas algas, principalmente das algas coletadas durante o período chuvoso.

A concentração de proteínas solúveis totais nas algas arribadas do período seco foi três vezes maior que nas algas do período chuvoso. E o conteúdo de proteínas das algas do período chuvoso diminuiu ainda em função do aumento da temperatura. Provavelmente, a redução do conteúdo de proteínas está relacionada ao estado fisiológico das algas, a despigmentação do talo e necrose dos talos, ou a uma estratégia de consumo de nitrogênio para a manutenção da alga nesta condição de estresse, uma vez que as proteínas solúveis totais podem ser a principal fonte de armazenamento de nitrogênio das algas (RIBEIRO et al., 2012). Além disso, em condição de temperatura elevada, as proteínas podem ter sofrido um processo de desnaturação.

Em relação a variação da salinidade, as algas arribadas do período seco e chuvoso tiveram respostas fisiológicas diferentes. As algas arribadas coletadas na estação seca tiveram maior sobrevivência e taxa de crescimento ($3,37 - 3,49 \text{ \% dia}^{-1}$) nas salinidades de 25 e 35 ups. Do mesmo modo que nos experimentos de temperatura, a variante verde foi a

mais resistente a variação de salinidade. Em condições hiposalina (15 ups) e hipersalina (55 ups), a variante verde foi a única que sobreviveu, cresceu pouco, mantendo praticamente uma biomassa similar a biomassa inicial do experimento. As variantes pigmentares vermelha e marrom não suportaram as condições de hipo e hipersalinidade, ocorrendo a despigmentação do talo, necrose e morte de parte dos talos. As algas que sobreviveram estavam com sinais de despigmentação e necroses. As algas arribadas coletadas na estação chuvosa apresentaram uma maior sobrevivência e taxas de crescimento ($1,97 - 1,62\% \text{ dia}^{-1}$) nas salinidades de 15 e 25 ups. Nas demais salinidades de 35, 45 e 55 ups, as algas cresceram pouco ou não toleraram tais condições e parte dos talos morreu. Segundo Lobban & Harrison (1994) a salinidade representa um importante fator ambiental sobre o desenvolvimento das algas, que para manter a pressão osmótica interna normal, mudam as condições de turgescência, resultando na diminuição da taxa de divisão celular, e consequentemente, prejudicando o crescimento da alga.

O intervalo ótimo de salinidade (25-35 ups) observado nas algas coletadas no período seco está de acordo com Hayashi et al. (2011b) e Reis, Loureiro e Mesquita (2011) que observaram em laboratório, um melhor desenvolvimento de *K. alvarezii* em intervalo de salinidade similar. Em cultivos no mar, as maiores produções ocorreram em ambientes com salinidades que variaram de 29 a 35 ups (ARECES, 1995; PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999; 2002; HURTADO et al. 2001; BULBOA; PAULA, 2005; HAYASHI et al, 2010).

No experimento de salinidade também ocorreu contaminação das algas pela endófito *Acrochaetium* e a despigmentação de porções dos talos, sugerindo possíveis infecções que resultaram em necrose e morte das células, interferindo na sobrevivência e desenvolvimento da *K. alvarezii* arribada. Estas contaminações ocorreram em maior frequência nas condições de maior estresse, 15, 45 e 55 ups nas algas coletadas no período seco, e em 45 e 55 ups nas algas coletadas no período chuvoso, sugerindo que a *Acrochaetium* pode ser uma alga oportunista.

As maiores concentrações de clorofila *a* em *K. alvarezii* ocorreram a 25 e 35 ups nas algas coletadas em ambas as estações do ano, o que coincide com o intervalo ótimo de crescimento das algas, embora as algas do período chuvoso tenham tido melhor desenvolvimento a 15 e 25 ups. Em condições extremas de hipo (15 ups) e hipersalinidade (55 ups) ocorreu uma diminuição abrupta do conteúdo de clorofila *a*.

Este padrão do conteúdo da clorofila *a*, crescimento da alga e intervalo ótimo de salinidade entre 25 e 35 corrobora com aqueles observados para outras rodofíceas por Ursi, Guimarães e Plastino (2008) para *Gracilaria birdiae* Oliveira e Plastino. Esta relação não

ficou tão clara nas algas do período chuvoso, possivelmente, a contaminação pela endófita tenha prejudicado os processos de crescimento e de fotossíntese da alga (HAYASHI et al., 2010).

A concentração dos pigmentos (aloficocianina, ficoeritrina e ficocianina) e de proteínas na *K. alvarezii* arribada no experimento de salinidade variou em função do período de coleta das algas. As algas do período seco apresentaram uma concentração alta de pigmentos e baixa de proteínas, enquanto que as algas do período chuvoso apresentaram uma concentração baixa de pigmentos e alta de proteínas. Estes resultados podem estar relacionados às condições fisiológicas diferentes destas algas, indicados através da capacidade de sobrevivência e crescimento ao longo do experimento. A concentração de aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina variaram em função da salinidade apenas nas algas do período seco, e foram mais altas nas salinidades de 15, 45 e 55, intervalo que coincidiu com os menores valores de clorofila *a*.

O conteúdo de aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina foi significativamente baixo nas algas do período chuvoso e não variaram em função da salinidade. Provavelmente, este resultado esteja ligado ao estado fisiológico de injúrias (branqueamento, contaminação e necroses) dos talos que foi mais frequentes nas algas do período chuvoso. Estes efeitos também foram descritos em diversos relatos de perda da produção nas fazendas de *Kappaphycus* (LARGO et al., 1998, 1999; HURTADO et al., 2006; VAIRAPPAN; CHUNG; HURTADO, 2008; HAYASHI et al., 2010; LOUREIRO; REIS; CRITCHLEY, 2010; REDDY; GUPTA; JHA, 2010).

A salinidade não afetou as concentrações de proteínas solúveis totais das algas coletadas em ambas as estações do ano. Todavia, o conteúdo de proteínas solúveis totais nas algas do período chuvoso foi três vezes maior que nas algas da estação seca. É provável que as algas da estação chuvosa tenham armazenado o nitrogênio na forma de proteínas solúveis totais (MARTINS; CHOW; YOKOYA, 2009; RIBEIRO et al., 2012) pois as taxas de crescimento foram menores e este nutriente foi estocado.

Ao longo do estudo, foi observado que as variantes pigmentares de *K. alvarezii* coletadas em diferentes estações do ano (seca x chuvosa) responderam de forma distinta às variações de temperatura e salinidade. Estas respostas diferentes, as quais estão ajustadas às condições ambientais no momento da coleta, consistem em uma plasticidade fenotípica do indivíduo dentro do seu limite genômico, e é denominada de aclimação (URSI, 2005; HAYASHI et al., 2011b).

As diferenças fisiológicas entre as variantes pigmentares de *K. alvarezii* também foram confirmadas no presente estudo, e está de acordo com outras pesquisas já realizadas para a mesma espécie (PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999; HAYASHI; PAULA; CHOW, 2007; HAYASHI et al., 2011b; SCHMIDT; MARASCHIN; BOUZON, 2010; REIS; LOUREIRO; MESQUITA, 2011). Estas diferenças fisiológicas que resultam em diferentes respostas às flutuações de fatores ambientais é um importante aspecto a ser considerado nos estudos de risco de invasão e monitoramento ambiental, como a análise da capacidade de sobrevivência e desenvolvimento da *K. alvarezii* as sazonalidades locais.

Portanto, os resultados indicam que a temperatura e salinidade são fatores limitantes e controladores da sobrevivência e desenvolvimento de *K. alvarezii* arribada no litoral da Paraíba, e que a capacidade de sobrevivência e crescimento das algas pode variar de acordo com a estação do ano e o tipo de variante pigmentar. A *K. alvarezii* arribada também está propensa a contaminantes como a alga endófito *Acrochaetium* e outros agentes de infecções que provocam doenças e prejudicam a sobrevivência destas algas. Deste modo, os resultados de laboratório sugerem que há um menor risco de estabelecimento da *K. alvarezii* no período chuvoso, ou quando as algas estão submetidas a altas temperaturas, como em poças de marés ou atiradas a praia. Nestas condições, a sobrevivência e o crescimento de *K. alvarezii* arribada foram muito reduzidos. Portanto, as variações de temperatura e salinidade são fatores limitantes para a sobrevivência e dispersão de *K. alvarezii* arribada na Praia de Pitimbu (PB) para outras áreas do litoral brasileiro.

CAPÍTULO 3

Avaliação e monitoramento do potencial de invasão de *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) no litoral da Paraíba, nordeste do Brasil

Colaborador: George E. C. de Miranda¹& Pablo Riul²

¹*Departamento de Sistemática e Ecologia / Universidade Federal da Paraíba*

²*Departamento de Engenharia e Meio Ambiente / Universidade Federal da Paraíba*

ABSTRACT

The red alga *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. C. Silva was introduced in the tropical region of Brazil, on the coast of Paraíba, in the early 2000s and since then it has been cultivated on an artisanal scale by local fishermen. The consequences of this introduction and the invasive potential of the species for the region are unknown so far. Thus, the present study evaluated the risk of invasion of *K. alvarezii* through the occurrence of reproductive structures, the attachment of their thalli in the natural substrates, moving the native biodiversity. Eight monitoring areas were established on the coast of Paraíba State, extending until Pernambuco State: five areas for monitoring drifting specimens and three areas for monitoring areas near the cultivation raft in order to registry the occurrence of thalli fixed to natural substrates. We also evaluated the potential of this alga to colonize the artificial substrates installed near the cultivation rafts by detached thallus fragments or by producing reproductive structures. Drifting thalli of *K. alvarezii* were observed concentrated in area of beach near the site of the cultivation. The wind direction, air temperature, precipitation and cultivation handling influenced the dispersion around these algae cultivation. Until now, neither fixed or attached thalli nor was reproductive structures detected in *K. alvarezii*. Also there was no recruitment of these elements installed on artificial substrates. Therefore, the results indicate that invasive potential of this species is low for the region. However, it is important to keep the environmental monitoring actions in the cultivation area.

Keywords: Bioinvasion, exotic seaweed, *Kappaphycus alvarezii*, mariculture, monitoring.

RESUMO

A alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* Doty ex P. C. Silva foi introduzida na costa da Paraíba, região nordeste do Brasil, no início da década de 2000 e tem sido cultivada desde então em escala artesanal por pescadores locais. As consequências desta introdução e o potencial de invasão da espécie na região são desconhecidos até o momento. Assim, o presente trabalho avaliou o risco de invasão de *K. alvarezii* pela produção de estruturas reprodutivas ou por fixação de seus talos nos substratos naturais, deslocando a biodiversidade nativa. Oito áreas de monitoramento foram estabelecidas no litoral da Paraíba, estendendo-se até Pernambuco, sendo cinco áreas para o monitoramento dos espécimes arribados e três para o monitoramento de áreas próximas às balsas de cultivo, a fim de localizar a ocorrência de talos fixos aos substratos naturais. Avaliou-se também o potencial dessas algas de colonizarem os substratos artificiais instalados próximos às balsas de cultivo por meio de fragmentos soltos ou por produção de estruturas reprodutivas. Foram observados talos de *K. alvarezii* arribadas, concentrados em uma faixa da praia próxima ao local das balsas de cultivo. A direção dos ventos, temperatura do ar, precipitação e o manuseio do cultivo influenciaram a dispersão destas algas nos arredores do cultivo. Até o momento, não foi observado talos fixos ou presos aos substratos naturais e/ou artificiais, e também não foram detectadas estruturas reprodutivas em *K. alvarezii* e nem houve recrutamento dessas estruturas nos substratos artificiais instalados. Portanto, os resultados indicam que o potencial de invasão desta espécie é baixo para a região. Todavia, é importante dar continuidade às ações de monitoramento ambiental na área de cultivo.

Palavras chaves: Bioinvasão, *Kappaphycus alvarezii*, macroalga marinha exótica, maricultura, monitoramento.

INTRODUÇÃO

A introdução de espécies aquáticas exóticas e suas implicações é um tema contemporâneo, que tem sido exaustivamente discutido nas últimas décadas, principalmente no que diz respeito às algas (CASTRO, 1999; OLIVEIRA; PAULA, 2003; SCHAFFELKE; SMITH; HEWITT, 2006; ANDERSON, 2007; PICKERING; SKELTON; SULU, 2007; VALENTINE; MAGIEROWSKI; JOHNSON, 2007; SCHAFFELKE; HEWITT, 2007; WILLIAMS; SMITH, 2007; OLIVEIRA; SILVA; AMANCIO, 2009; SILVA; AMANCIO; OLIVEIRA, 2010). Muitas teorias já foram postuladas para explicar os casos de invasão e suas implicações ecológicas, mas são eventos difíceis de serem previstos, e a perda da biodiversidade nativa é o principal dano ambiental relatado na literatura (PAULA; PEREIRA; OSTINI, 1998; PAULA; PEREIRA; OHNO, 2002; OLIVEIRA; PAULA 2003; CONKLIN; SMITH, 2005; ANDERSON, 2007; SCHAFFELKE; HEWITT, 2007; WILLIAMS; SMITH, 2007; CHANDRASEKARAN et al., 2008; OLIVEIRA; SILVA; AMANCIO, 2009; SILVA; AMANCIO; OLIVEIRA, 2010). Esta imprevisibilidade do potencial invasivo, em contraposição aos benefícios socioeconômicos, tem gerado grande polêmica no meio científico e órgãos ambientais competentes (OLIVEIRA; PAULA, 2003; OLIVEIRA; SILVA; AMANCIO, 2009).

Dentre as algas introduzidas intencionalmente destaca-se a rodofícea *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex. P. C. Silva, que tem sido intensivamente introduzida nos ecossistemas tropicais e subtropicais do mundo com propósitos de maricultura (ARECES, 1995; ASK et al., 2003; CHANDRASEKARAN et al., 2008; OLIVEIRA; SILVA; AMANCIO, 2009; HAYASHI et al., 2010; PELLIZZARI; REIS, 2011). Esta alga possui relevante importância econômica por ser a principal matéria-prima de *kappa*-carragenana (PAULA; PEREIRA; OSTINI, 1998; PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999; 2002; ASK; AZANZA, 2002).

Após quatro décadas de inúmeras introduções bem sucedidas com *K. alvarezii*, sendo 19 em países tropicais (ASK et al., 2003), poucos casos de invasão foram comprovados (HAYASHI et al., 2010; BINDU; LEVINE, 2011). O caso mais bem documentado refere-se à invasão de espécies de *Eucheuma/Kappaphycus* no litoral do Havaí (RODGERS; COX, 1999; CONKLIN; SMITH, 2005; CONKLIN; KURIHARA; SHERWOOD, 2009). Segundo Zuccarello et al. (2006) as algas que se estabeleceram nas comunidades recifais do Havaí representavam uma linhagem geneticamente diferente das demais, o que explica o caráter invasivo da alga. Também já foi comprovado outro caso de bioinvasão e danos ambientais ocorrido na Índia (BAGLA, 2008; CHANDRASEKARAN et al., 2008; KAMALAKANNAN et al., 2010) e na Venezuela (BARRIOS, 2005; BARRIOS;

BOLAÑOS; LOPEZ, 2007). Halling et al. (2013) relatam a presença de fragmentos de *K. alvarezii* de origem asiática crescendo sobre recifes de corais em Zanzibar.

No Brasil, após 18 anos de estudos, já está comprovada a viabilidade ambiental e comercial da introdução de *K. alvarezii*, indicando baixo risco de invasão ambiental (PAULA; PEREIRA; OSTINI, 1998; PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999, 2002; BULBOA; PAULA, 2005; BULBOA; PAULA; CHOW, 2008; CASTELAR; REIS; BASTOS, 2009; CASTELAR et al., 2009; OLIVEIRA; SILVA; AMANCIO, 2009; HAYASHI et al., 2011; PELLIZZARI; REIS, 2011). No entanto, estes resultados foram obtidos para a região sul e sudeste do país e podem não ser aplicáveis para a costa nordeste, que apresentam características ambientais tropicais, diferentes da costa sul e sudeste que constituem região temperada quente do Brasil (HORTA et al., 2001).

Na costa nordeste do Brasil há registros de introdução de *K. alvarezii* nos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte (LUCENA et al., 2007; OLIVEIRA; SILVA; AMANCIO, 2009). Na Paraíba, a introdução ocorreu no início da década de 2000, no município de Pitimbu onde esta espécie tem sido cultivada desde então por pescadores locais. O cultivo é desenvolvido em escala artesanal, sem controle de produção e de ações de monitoramento ambiental e não há qualquer conhecimento dos efeitos desta introdução. Por esta razão o presente trabalho visa: (i) avaliar e monitorar a dispersão de *K. alvarezii* por propagação vegetativa e por produção de estruturas de reprodução, ou ainda por recrutamento de propágulos nos substratos artificiais instalados próximos às balsas de cultivo; (ii) analisar a dispersão da espécie exótica fora do sistema de cultivo e; (iii) verificar a ocorrência de estruturas de reprodução nos fragmentos de *K. alvarezii* que são encontrados arribados na praia.

MATERIAIS E MÉTODOS

O cultivo de *Kappaphycus alvarezii* está localizado no município de Pitimbu, litoral sul do Estado da Paraíba, nordeste do Brasil (Figura 1). A região caracteriza-se por um clima quente e úmido, com médias anuais da temperatura do ar entre 22 – 31 °C, umidade relativa do ar de 80% e forte influência dos ventos alísios de sudeste (CARVALHO, 1982). A sazonalidade dos fatores ambientais caracteriza a região em duas estações do ano: (i) estação chuvosa, de março a agosto e (ii) estação seca, de setembro a abril. A região

apresenta substratos consolidados, constituídos por formações recifais areníticas e coralíneas, nódulos de algas calcárias, e substratos não consolidados arenosos (CARVALHO, 1982; LUCENA et al., 2007).

As algas são cultivadas em sistema de “tie-tie”, onde os talos são amarrados em cordas de polietileno e mantidos em balsas flutuantes, estruturas semelhantes às aquelas utilizadas nos cultivos do Rio de Janeiro (GÓES; REIS, 2011). Cada balsa é constituída por quatro módulos (5x3m) perfazendo uma dimensão de 20x3m. Atualmente são mantidas 2 a 3 balsas localizadas a 1,5 km da linha de praia. A região onde estão instaladas as balsas caracteriza-se por substrato arenoso e alguns pontos com nódulos de algas calcárias, e profundidade local de, aproximadamente, 2 a 3 metros na maré baixa 0.0m.

Neste estudo foram selecionadas oito áreas de monitoramento localizadas no litoral da Paraíba, estendendo até Pernambuco (Figura 1). A Tabela 1 apresenta as coordenadas geográficas e qual tipo de monitoramento foi realizado em cada área. As cinco primeiras áreas (A₁ - A₅) corresponderam às estações de monitoramento das algas arribadas, situadas na linha de praia, e três áreas (A₆ - A₈) estabelecidas para monitorar a presença de *K. alvarezii* no mar.

Tabela 1. Coordenadas geográficas e descrição do tipo de monitoramento em cada área de monitoramento.

Áreas	Coordenada geográfica	Local	Tipo de monitoramento
A ₁	07°04'47.01"S–34°49'47.69"L	Praia do Bessa, PB	Monitoramento das algas arribadas
A ₂	07°17'58"S–34°47'54"L	Praia do Coqueirinho, PB	
A ₃	07°28'32.28"S–34°48'24.87"L	Praia de Pitimbu, PB	
A ₄	07°30'35.9"S–34°48'33.78"L	Praia Azul, PB	
A ₅	07°32'42.16"S–34°49'25.53"L	Praia de Acaú, PB	
A ₆	07°28'06.66"S–34°48'01.02"L	Recifes de Pitimbu (Farol), PB	Monitoramento no mar
A ₇	07°30'10.5"S–34°47'53.5"L	Área do cultivo de <i>K. alvarezii</i> , PB	Monitoramento no mar Avaliação com substrato artificial (esporos/gametas)
A ₈	07°36'48.6"S–34°47'14.7"L	Recife de Ponta de Pedras, PE	Monitoramento no mar

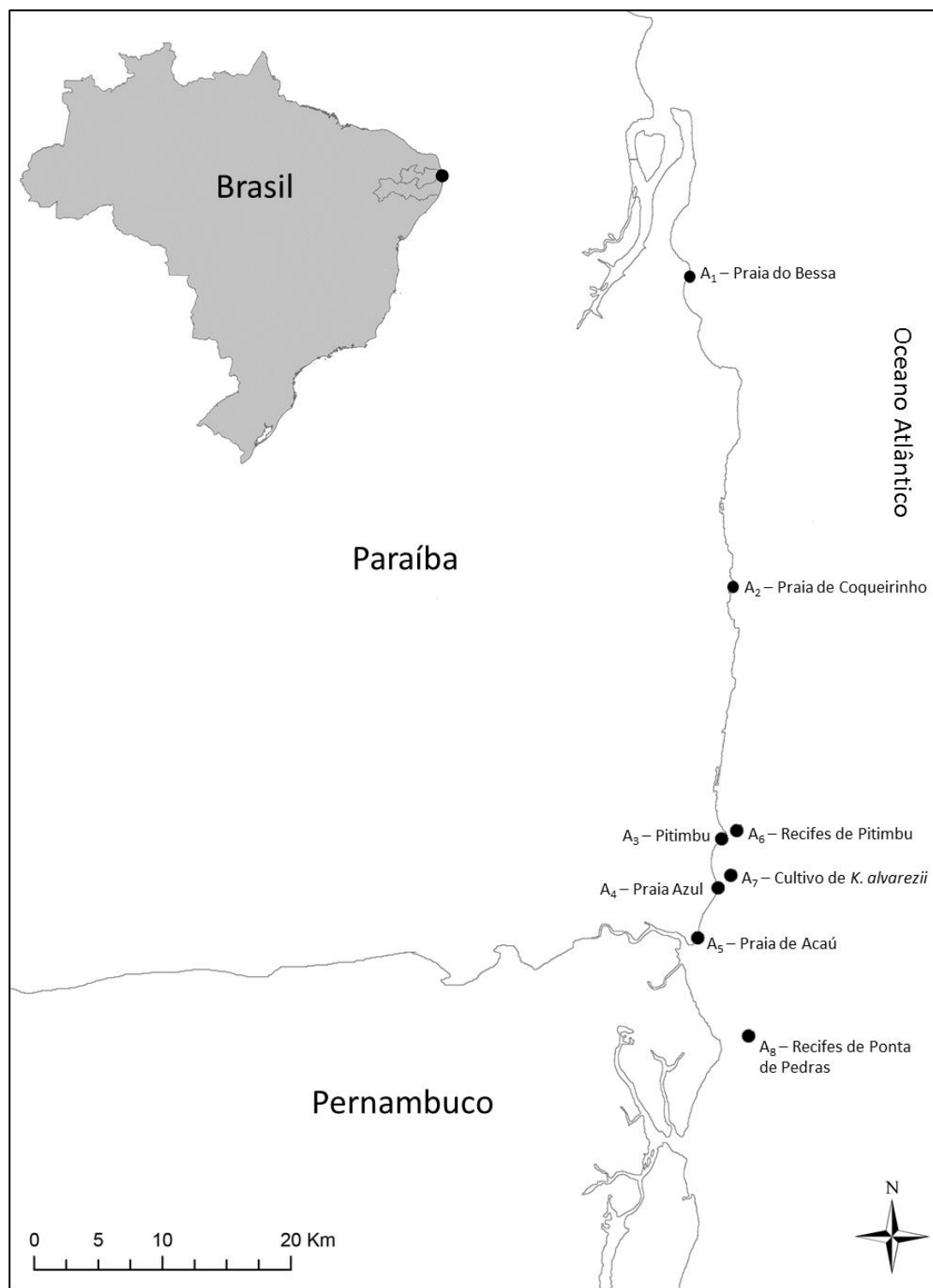


Figura 1. Localização das áreas de monitoramento no litoral da Paraíba, estendendo até Pernambuco.

Avaliação e monitoramento da biomassa de *K. alvarezii* arribada às praias

O monitoramento das algas arribadas foi realizado a cada dois meses no período de janeiro de 2011 a janeiro de 2012. As áreas de monitoramento da biomassa arribada (A_1 - A_5) (Figura 1) foram divididas em três setores de 500 x 2m ($n=3$), os quais foram percorridos durante as marés baixas de sizígia, e a biomassa de *K. alvarezii* encontrada em cada setor foi coletada. As algas foram transportadas para o Laboratório de Algas Marinhas da Universidade Federal da Paraíba (LAM/DSE/UFPB) em caixas térmicas e pesadas para quantificação da biomassa úmida. Em seguida, as algas foram analisadas com auxílio de lupa, quanto à presença de estruturas reprodutivas.

Os *vouchers* do material coletado foram depositados nos Herbário Lauro Pires Xavier da Universidade Federal da Paraíba (JPB 44450) e no Herbário Maria Eneyda P. Kauffmann Fidalgo, do Instituto de Botânica, em São Paulo (SP 400964).

Para auxiliar na análise da dispersão das algas arribadas foram coletados dados da velocidade e direção do vento no período de 2011 a 2012 através do Banco de Dados da Rede do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). A estação meteorológica do INMET onde os dados foram coletados localiza-se no município de João Pessoa, a 36 km do município de Pitimbu.

Avaliação e monitoramento de biomassa de *K. alvarezii* no mar

O monitoramento de *K. alvarezii* no mar foi realizado em agosto de 2012 (período chuvoso) e dezembro de 2012 (período seco) através de mergulho em apneia durante a maré baixa de sizígia. Em cada área de monitoramento no mar: A_6 (Formação recifal de Pitimbu), A_7 (Área do cultivo de *K. alvarezii*) e A_8 (Formação recifal de Ponta de Pedras, PE) foram sorteados três pontos, considerando um ângulo de 0-359° e distância de 0-100m. Para cada ponto sorteado ($n=3$) foram lançados cinco transectos de 50x1m ($n=5$) de forma aleatória e verificada a presença de *K. alvarezii*. Em casos de dúvida na identificação da alga, o material foi coletado e levado para o Laboratório de Algas Marinhas (LAM/DSE/UFPB) para certificação.

Avaliação do potencial de estabelecimento de *K. alvarezii* via produção de estruturas reprodutivas e recrutamento de propágulos nos substratos artificiais

A avaliação de estabelecimento de *K. alvarezii* via estruturas reprodutivas foi realizada na área de monitoramento A₇ (Área do cultivo de *K. alvarezii*) através da instalação e acompanhamento de substratos artificiais no período de janeiro a novembro de 2012. Estes substratos artificiais são compostos de argamassa, areia de praia e água, com formato irregular e anfractuosidades na superfície, semelhante a um nódulo de alga calcária.

A cada dois meses, no período de janeiro a setembro de 2012, foram instalados 10 substratos, totalizando 50 substratos ao final do estudo. Estes substratos foram instalados no fundo, há cerca de 2 metros de profundidade, próximos às balsas de cultivo. Todos os substratos foram identificados quanto ao mês de sua implantação e o acompanhamento da presença ou ausência de *K. alvarezii* foi realizado bimensalmente através da observação direta e por fotografia. Ao final do experimento, todos os substratos foram retirados do mar e levados para o Laboratório de Algas Marinhas (LAM/DSE/UFPB).

Em laboratório, os substratos foram averiguados quanto à presença de *K. alvarezii* com auxílio de estereomicroscópio e lupa de mão e mantidos em aquários por 30 dias. Os substratos foram mantidos em água do mar filtrada enriquecida com 25% da solução de nutrientes de Von Stosch (VSES/4), preparada segundo Edwards (1970) e modificada por Yokoya (2000) e dióxido de germânio (GeO₂) na concentração de 1 mg.L⁻¹ para inibir o crescimento de diatomáceas. O meio de cultura foi trocado em um intervalo de 15 dias. As condições de cultura foram: temperatura 23±3 °C, salinidade 32±1 ups, densidade de fluxo fotônico de 70 a 100 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40 W do tipo “luz do dia”, aeração e fotoperíodo de 12 h.

RESULTADOS

Avaliação e monitoramento da biomassa de *K. alvarezii* arribada à praia

A Tabela 2 apresenta os valores médios mensais da velocidade e direção do vento. O vento Sudeste/Leste foi predominante na maior parte do ano, e os ventos mais fortes ocorreram no período de junho a setembro de 2011 e 2012 e março 2012.

A Tabela 3 apresenta os valores médios de biomassa de *K. alvarezii* arribada coletada por área e mês de monitoramento. *K. alvarezii* arribada foi observada apenas nas áreas A₃ (Pitimbu) A₄ (Praia Azul) e A₅ (Praia de Acaú) (Figura 2). A distância aproximada entre as áreas de monitoramento está representada na Figura 2. A maior parte da biomassa foi coletada nas áreas A₃ (Pitimbu) e A₄ (Praia Azul), região localizada a noroeste das balsas de cultivo. Estas algas foram observadas junto com outras algas arribadas ao longo da linha de praia e em redes de pesca (Figura 3).

A biomassa de *K. alvarezii* arribada variou ao longo do ano. As algas foram observadas apenas no período de janeiro a maio de 2011 e janeiro de 2012 (Tabela 3).

Tabela 2. Parâmetros ambientais da região de Pitimbu no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012 (Dados da rede do INMET).

Período	Direção mais frequente do vento	Velocidade do ar (m/s)
Janeiro/2011	Sudeste / Leste	4,6
Fevereiro/2011	Sudeste / Leste	5,3
Março/2011	Sudeste / Leste	3,6
Abril/2011	Sudeste/ Sul	4,6
Maio/2011	Sul / Sudeste	6,3
Junho/2011	Sudeste / Sul	6
Julho/2011	Sudeste / Sul	6,6
Agosto/2011	Sudeste / Sul	6,3
Setembro/2011	Sudeste / Sul	5,8
Outubro/2011	Sudeste/ Leste	5,3
Novembro/2011	Sudeste/Leste	3,8
Dezembro/2011	Sudeste / Leste	5
Janeiro/2012	Sudeste / Leste	4,5
Fevereiro/2012	Sudeste	5
Março/2012	Sudeste/Sul	7,3
Abril/2012	Sudeste	4,3
Maio/2012	Sudeste/ Leste	4,6
Junho/2012	Sudeste / Sul	5
Julho/2012	Sudeste / Sul	5,5
Agosto/2012	Sudeste / Sul	6,3
Setembro/2012	Sudeste	6
Outubro/2012	Sudeste	5
Novembro/2012	Sudeste/Leste	4,6
Dezembro/2012	Sudeste / Leste	5

Tabela 3. Biomassa úmida (g.m^{-2}) de *Kappaphycus alvarezii* arribada por área e mês de monitoramento na costa da Paraíba.

Áreas de monitoramento	Período seco		Período chuvoso			Período seco	
	Jan/11	Mar/11	Mai/11	Jul/11	Set/11	Nov/11	Jan/12
Praia do Bessa (A_1)	0	0	0	0	0	0	0
Praia de Coqueirinho (A_2)	0	0	0	0	0	0	0
Praia de Pitimbu (A_3)	30	68	908	0	0	0	540
Praia Azul (A_4)	2,3	162	2.310	0	0	0	491
Praia de Acaú (A_5)	1	284	0	0	0	0	0

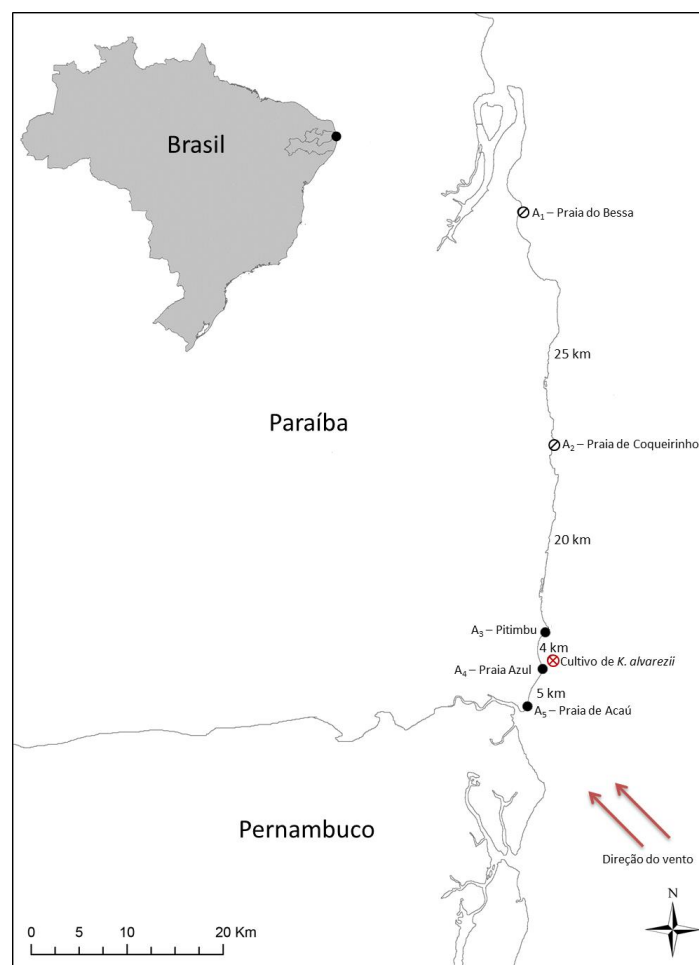


Figura 2. Áreas de monitoramento ao longo do litoral da Paraíba com a presença e ausência de biomassa de *K. alvarezii* arribada (g.m^{-2}). O símbolo $\bigcirc$ significa ausência de *K. alvarezii* arribada, o símbolo $\bullet$ significa a presença de *K. alvarezii* arribada e o símbolo $\otimes$ representa a região do cultivo de *K. alvarezii*. As setas vermelhas indica a direção predominante dos ventos.

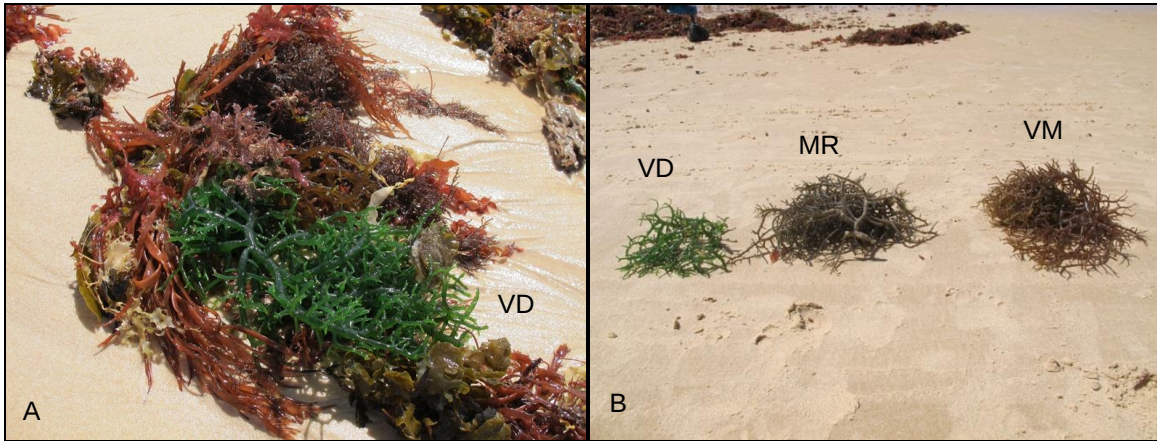


Figura 3. A) Detalhe de variante pigmentar verde (VD) junto com outras algas arribadas; B) As três variantes pigmentares: verde (VD), marrom (MR) e vermelha (VM) coletadas em rede de pesca na praia de Pitimbu, Paraíba.

Avaliação e monitoramento de *K. alvarezii* no mar

Não foi observado nenhum talo de *K. alvarezii* fixo ou enroscado em substrato natural nas três áreas de monitoramento analisadas: A₆ (Recifes de Pitimbu), A₇ (Cultivo de *K. alvarezii*) e A₈ (Recifes de Ponta de Pedras). Este resultado se repetiu no monitoramento em agosto de 2012 (período chuvoso) e dezembro de 2012 (seco e chuvoso).

Avaliação do potencial de estabelecimento de *K. alvarezii* via produção de estruturas reprodutivas e recrutamento de propágulos nos substratos artificiais

Não foi observada qualquer estrutura reprodutiva nas algas arribadas, nem houve recrutamento de propágulos e tampouco desenvolvimento de *K. alvarezii* nos substratos artificiais instalados, seja por meio de esporos, gametas ou propagação vegetativa (Figura 5). Na análise em laboratório não foi observado nenhum talo de *K. alvarezii* desenvolvendo sobre os substratos artificiais.

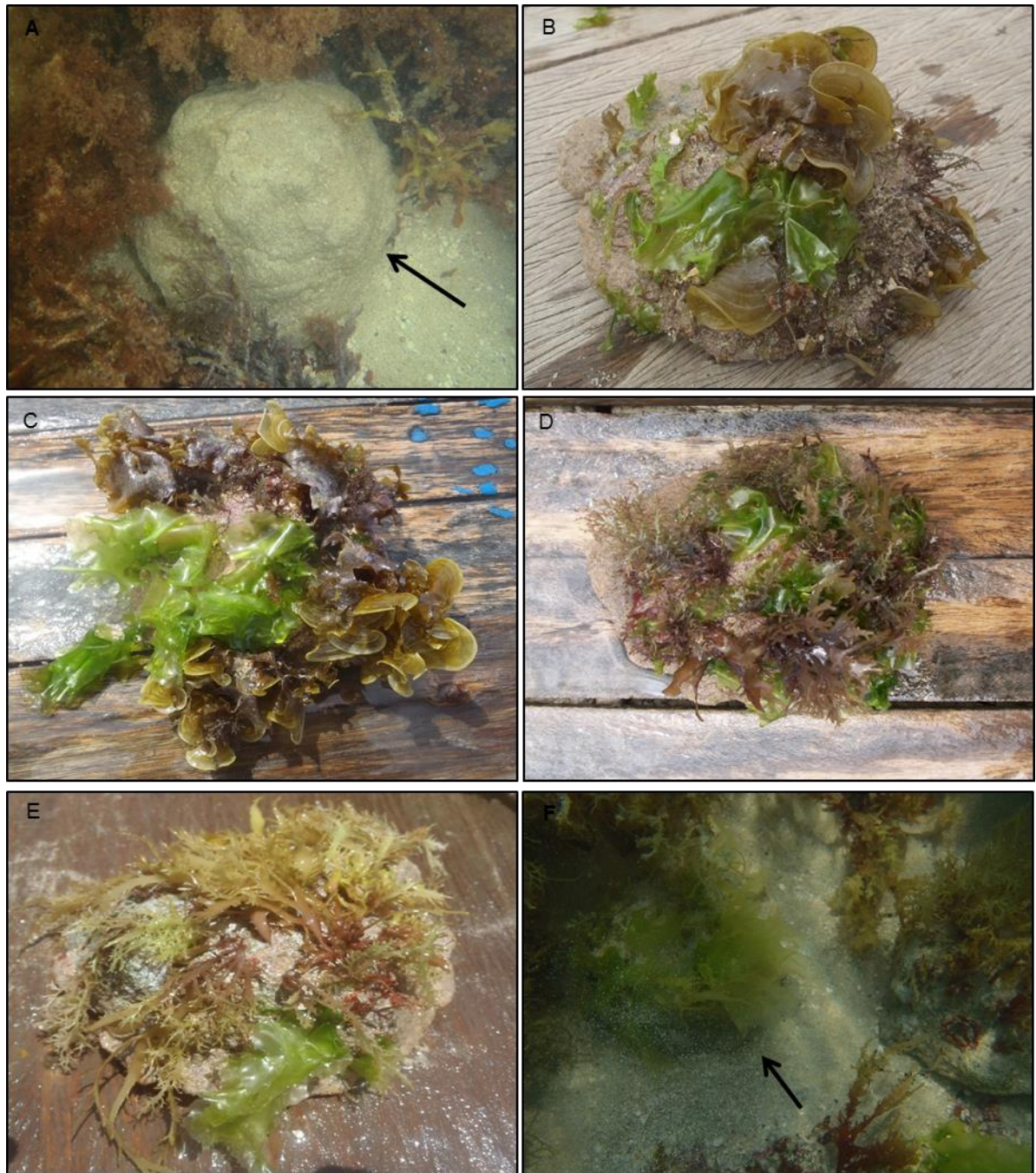


Figura 4. Substratos artificiais utilizados para análise de estabelecimento de *K. alvarezii* por esporos, gametas ou propagação vegetativa. A) Detalhe do substrato no mar logo após a implantação; B) Substrato após dois meses de implantação; C) substrato após quatro meses de implantação; D) Substratos após oito meses de implantação, E) Substrato com 11 meses de implantação, e F) Substrato no mar após quatro meses de implantação (seta indica o substrato).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O monitoramento comprovou a dispersão de *K. alvarezii* arribados ao longo da linha de praia, no entanto, não foi observado nenhum talo fixo ou enroscado em substrato natural que indicasse um estabelecimento no ambiente. Os fragmentos de *K. alvarezii* arribado estiveram restritos a um trecho de 9 km, entre as praias de Pitimbu e Azul, sugerindo uma dispersão pontual, concentrada na região próxima onde estão instaladas as balsas de cultivo. A direção do vento foi um fator ambiental importante na dispersão destas algas. No litoral da Paraíba predominam os ventos sudeste, o que explica a maior concentração de algas a noroeste da balsa de cultivo, embora nos primeiros meses do ano também ocorram ventos lestes com uma maior frequência, o que esclarece a dispersão dos talos a sudoeste das balsas de cultivo, evidenciada com a coleta de *K. alvarezii* na praia de Acaú no mês de março.

Acreditava-se que a velocidade do vento tivesse uma relação direta com o aumento da biomassa de *K. alvarezii* arribada, uma vez que o aumento do vento gera maior hidrodinamismo e pequenas ondas que poderiam quebrar os talos de *K. alvarezii* nas estruturas de cultivo. No entanto, foi observado o oposto, uma diminuição da biomassa arribada durante os meses de ventos mais fortes (maior velocidade). Este resultado está de acordo com Castelar et al. (2009) que também não observaram relação entre a velocidade do vento e a biomassa arribada de *K. alvarezii* no litoral do Rio de Janeiro. O procedimento de manejo das balsas de cultivo de Pitimbu, sobretudo no período chuvoso, representou um importante fator a ser considerado no processo de dispersão de *K. alvarezii*. No início da estação chuvosa, entre maio e junho, quando ocorre um aumento da velocidade dos ventos e do hidrodinamismo local, os maricultores modificam o processo de manejo; já não fazem apenas limpeza das algas e reparos da estrutura das balsas, mas retiraram grande parte das algas, deixando apenas pequenas mudas, com o propósito de manter o cultivo e evitar a perda total de biomassa em virtude da agitação do mar (Comunicação pessoal do Sr. Marivaldo Bastos, maricultor local). Provavelmente, este seja o fator que explica a ausência de *K. alvarezii* arribada no período de julho a novembro. No cultivo de Pitimbu não são utilizadas redes de contenção, como ocorre no litoral de Santa Catarina e do Rio de Janeiro para evitar a perda de algas (CASTELAR; REIS; BASTOS, 2009; CASTELAR et al., 2009; HAYASHI et al., 2011; GÓES; REIS, 2012); todavia, esse procedimento de manejo tem se mostrado eficaz para evitar a perda de biomassa no período de fortes ventos.

Nos meses de outubro e novembro inicia-se o processo de replantio e aumento do número de balsas pelos maricultores, e é por esta razão que as algas arribadas foram

observadas a partir de janeiro de 2012, tempo suficiente para que ocorra o crescimento das mudas e quebra de parte dos talos. A grande quantidade de biomassa arribada observada em maio/2011, final da estação seca e início da chuvosa, pode indicar o auge da produção de *K. alvarezii* nas balsas de cultivo. As condições ambientais da estação seca (verão), o aumento da radiação solar e diminuição da turbidez da água, parecem ser favoráveis ao crescimento da *K. alvarezii* neste período, e por isso, aumento significativo da biomassa. No presente estudo não foi possível acompanhar as taxas de crescimento de *K. alvarezii* no sistema de cultivo, mas diversos trabalhos comprovam o melhor desenvolvimento no verão, com temperatura mais elevada, aumento radiação solar (ARECES, 1995; PAULA; PEREIRA; OHNO, 2002; AGUIRRE-von-WOBESER; FIGUEROA; CABELLO, 2001; BULBOA; PAULA, 2005; HAYASHI et al., 2011).

A partir das ações de monitoramento no mar, não foi detectado nenhum talo de *K. alvarezii* crescendo fixo ou enroscado nos substratos naturais, incluindo as formações recifais de Pitimbu (A₆) e de Ponta de Pedras (A₈). Nesta última área, há relatos de introdução de *K. alvarezii* com propósitos de maricultura em 2003, mas foi retirada no mesmo ano, por inviabilidade da produção (Comunicação pessoal do Sr. Marivaldo Bastos, maricultor local). Este resultado corrobora com aqueles observados para a região sul e sudeste do Brasil (PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999, 2002; CASTELAR; REIS; BASTOS, 2009; CASTELAR et al., 2009; HAYASHI et al., 2011) e em outras regiões do mundo (DOTY; ALVAREZ, 1975; DOTY, 1985). Segundo Doty (1985) as algas que se desprendem das balsas de cultivo não conseguem sobreviver e fatores ambientais como a herbivoria, baixa incidência luminosa tornam-se limitantes ao desenvolvimento da espécie (PAULA; PEREIRA; OHNO, 2002; CASTELAR et al., 2009; HAYASHI et al., 2011). No presente estudo, a herbivoria e o epifitismo nas algas arribadas foram os sinais mais frequentes como fatores limitantes.

Na Venezuela, Barrios (2005) relata a ocorrência de diversos fragmentos de *K. alvarezii* fora do sistema de cultivo, e alerta para o risco de invasão da espécie exótica no ambiente recifal por meio de propagação vegetativa. Em 2007, Barrios, Bolaños e Lopez, detectaram *K. alvarezii* crescendo sobre recifes coralíneos. Deste então, as algas foram eliminadas do ambiente (OLIVEIRA; SILVA; AMANCIO, 2009). Halling et al. (2013) relatam o crescimento de *K. alvarezii* introduzido crescendo em pradarias de angiospermas e recifes de corais. Fatos como este destaca a importância do planejamento e das ações de monitoramento ambiental nas áreas sob influência do cultivo, que se realizadas de maneira adequada, podem detectar e evitar alterações indesejáveis em tempo hábil, e trazer benefícios socioeconômicos, especialmente para as comunidades de pescadores

(PICKERING; SKELTON; SULU, 2007; BINDU; LEVINE, 2011; BIXLER; PORSE, 2011). Mas, quando estas ações são negligenciadas, os benefícios podem ser anulados pelos riscos de invasão e prejuízos ambientais (SCHAFFELKE; HEWITT, 2007; CHANDRASEKARAN et al., 2008; CASTELAR; REIS; BASTOS, 2009). Por esta razão, que ressaltamos a importância das ações de monitoramento ambiental no litoral da Paraíba, até o momento não foi detectado qualquer sinal de estabelecimento de *K. alvarezii* no ambiente.

A ausência de estruturas reprodutivas na *K. alvarezii* arribada e o não recrutamento e/ou desenvolvimento nos substratos artificiais sugere o baixo risco de invasão desta espécie via estrutura reprodutiva no litoral da Paraíba. Este resultado está de acordo com aquele observado na literatura que afirma que a *K. alvarezii* permanecem inférteis em condições de maricultura, raramente é observada a reprodução sexuada em cultivos, ocorrendo apenas em seu ambiente natural (DOTY; ALVAREZ, 1975; DOTY, 1985; ARECES, 1995; PICKERING; SKELTON; SULU, 2007). Castelar et al. (2009) e Hayashi et al. (2011) também comprovaram a ausência de estruturas reprodutivas nos cultivos da regiões sudeste e sul do Brasil, respectivamente.

Embora, existam relatos da liberação e germinação de estruturas reprodutivas de *K. alvarezii* em sistemas de maricultura e em condições laboratoriais, as taxas de sobrevivência são muito baixas (PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999; BULBOA; PAULA; CHOW, 2008). Segundo Bulboa, Paula e Chow (2008), a baixa viabilidade dos esporos de *K. alvarezii* está relacionada ao processo meiótico deletério que ocorre no desenvolvimento do mesmo, como resultado da propagação clonal ou da sua origem híbrida, e assim, o potencial reprodutivo é reduzido por ocorrer a má formação dos esporos (PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999). No entanto, mesmo com a baixa viabilidade destas células reprodutivas, deve-se considerar que a introdução representa a entrada de uma nova linhagem no ambiente, e que pode tornar-se invasiva (BULBOA; PAULA; CHOW, 2008) e, portanto, recomenda-se o monitoramento sistemático da ocorrência e recrutamento de estruturas reprodutivas de *K. alvarezii* nas áreas sobre influência do cultivo, conforme destacou Castelar, Reis e Bastos (2009).

Portanto, os resultados do presente trabalho indicam que até o momento não há qualquer sinal de invasão de *K. alvarezii* no litoral da Paraíba e sugerem baixo potencial de estabelecimento desta espécie para região seja através de propagação vegetativa e/ou por produção de esporos/gametas. No entanto, não descartamos a necessidade e importância de ações efetivas e sistemáticas de monitoramento ambiental nas áreas próximas, sobre influência do cultivo de *K. alvarezii*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Diferentes abordagens desenvolvidas no presente estudo sugerem o baixo potencial de estabelecimento de *K. alvarezii* no litoral da Paraíba. A identificação molecular confirmou que a linhagem introduzida na costa paraibana é semelhante às aquelas cultivadas em diversas regiões do mundo, as quais apresentam baixo caráter invasor.
- A presença da alga vermelha filamentosa, *Acrochaetium* crescendo endofiticamente nos talos de *K. alvarezii* analisados prejudicaram a sobrevivência e crescimento da espécie. Diante disso, recomenda-se uma avaliação mais criteriosa das algas que estão sendo cultivadas com o propósito de identificar e erradicar possíveis talos de *K. alvarezii* contaminados por *Achrochaetium* na balsa de cultivo em Pitimbu. Casos de contaminação e doenças nas espécies de *Kappaphycus* são conhecidos na literatura e são responsáveis por grandes perdas de produção de algas.
- Após cerca de uma década da introdução de *K. alvarezii* no litoral da Paraíba e em plena atividade de cultivo, embora artesanal, até o momento não foram detectadas algas férteis ou crescendo em substrato natural, indicando que *K. alvarezii* não cresce fora das balsas de cultivo no litoral da Paraíba, sugerindo o baixo potencial de invasão da espécie. No entanto, previsões e implicações ecológicas da introdução de uma espécie exótica são incertas, e por isso, destacamos a importância e necessidade das ações de monitoramento ambiental contínua.
- Consideramos que a algicultura representa uma alternativa de incremento de renda para a população que reside na costa nordeste, e neste contexto existem diversos projetos que foram desenvolvidos no estado da Paraíba. Estes abordaram questões técnicas, ambientais e sociais da produção de algas, com a participação da Universidade Federal da Paraíba, órgãos governamentais federal, estadual e municipal, Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e associações comunitárias. No entanto, nenhuma das espécies nativas testadas, até o momento, mostrou viabilidade de produção em escala comercial para o litoral da Paraíba. Neste cenário, a macroalga *K. alvarezii*, que já é realidade para a região, representa uma alternativa para a produção de algas em escala familiar.
- Contudo, é fundamental o desenvolvimento de diversas pesquisas que avalie diretamente as algas em condição de cultivo, como: taxa de crescimento *in situ*,

rendimento e qualidade da carragenana, avaliação de propagação por esporos ou vegetativa dentro das balsas de cultivo, investigações de doenças e contaminantes, dentre outras; mas que ainda não foram realizadas devido a não contemplação da concessão de licenças de pesquisas, que impede o desenvolvimento das atividades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAN, J.T. et al. Structural Analysis of Carrageenan from Farmed Varieties of Philippine Seaweed. **Botanica Marina** 46: 179–192. 2003.

AGUIRRE-von-WOBESER, E.; FIGUEROA, F.L.; CABELLO-PASINI, A. Photosynthesis and growth of red and green morphotypes of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta) from the Philippines. **Marine Biology** 138: 679–686. 2001.

ANDERSON, L.W.J. Control of invasive seaweeds. **Botanica Marina** 50: 418–437. 2007

ANDERSON, M. et al. Different patterns of carotenoid composition and photosynthesis acclimation in two tropical red algae. **Marine Biology** 149: 653–665. 2006.

ARECES, A.J. Cultivo comercial de carragenofitas del género *Kappaphycus alvarezii* Doty. In: ALVEAL, K.; FERRARIO, M.E.; OLIVEIRA, E.C. & SAR, E. (Eds.). **Manual de métodos fitológicos**. Universidad de Concepción, Chile. p. 529–549. 1995.

ASK, E.I. et al. Three decades of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta) introduction to non-endemic locations. In: CHAPMAN, A.R.; ANDERSON, O.R.J.; VREELAND, V.J. & DAVISON, I.R. (Eds.). **Proceedings of the 17th International Seaweed Symposium**. Cape Town 2001. Oxford, Oxford University Press. p. 49–57. 2003.

ASK, E.I.; AZANZA, R.V. Advances in cultivation technology of commercial eucheumatoid species: a review with suggestions for future research. **Aquaculture** 206: 257–277. 2002.

AZANZA, R.V.; ALIAZA, T.T. *In Vitro* Carpospore Release and Germination in *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty from Tawi-Tawi, Philippines. **Botanica Marina** 42: 281–284. 1999.

BAGLA, P. Seaweed Invader Elicits Angst in India. **Science** 320: 1271. 2008.

BARRIOS, J.; BOLAÑOS, J.; LOPEZ, R. Blanqueamiento de arrecifes coralinos por la invasión de *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta) en Isla Cubagua, Estado Nueva Esparta, Venezuela. **Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela** 46: 147–152. 2007.

BARRIOS, J.E. Dispersión del alga exótica *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales: Rhodophyta) en la región nororiental de Venezuela. **Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela** 44: 29–34. 2005.

BARROS-BARRETO, M.B.B. et al. *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta) cultivated in Brazil: is it only one species? **Journal of Applied Phycology** DOI 10.1007/s10811-012-9952-8. 2012.

BINDU, M.S.; LEVINE, I.A. The commercial red seaweed *Kappaphycus alvarezii* – an overview on farming and environment. **Journal of Applied Phycology** 23: 789–796. 2011.

BIXLER, H.J; PORSE H. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. **Journal of Applied Phycology** 23: 321–335. 2011.

BRADFORD, M. M. 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. 1976.

BULBOA, C.R.; PAULA, E.J. Introduction of non-native species of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) in subtropical waters: comparative analyses of growth rates of *Kappaphycus alvarezii* and *Kappaphycus striatum* *in vitro* and in the sea in southeastern Brazil. **Phycological Research** 53: 183–188. 2005.

BULBOA, C.R.; PAULA, E.J.; CHOW, F. Germination and survival of tetraspores of *Kappaphycus alvarezii* (Solieriaceae, Rhodophyta) introduced in subtropical waters of Brazil. **Phycological Research** 56: 39–45. 2008.

CARVALHO, M.G.R.F. **Estado da Paraíba: Classificação geomorfológica**. Editora Universitária/UFPB. João Pessoa. 72 p.1982.

CASTELAR, B. et al. Invasive potential of *Kappaphycus alvarezii* off the south coast of Rio de Janeiro state, Brazil: a contribution to environmentally secure cultivation in the tropics. **Botanica Marina** 52: 283–289. 2009.

CASTELAR, B.M.; REIS, R.P.; BASTOS, M. Contribuição ao protocolo de monitoramento ambiental da maricultura de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. C. Silva (Areschougaceae - Rhodophyta) na Baía de Sepetiba, RJ, Brasil. **Acta Botânica Brasílica** 23: 613–617. 2009.

CASTRO, A.J.L. macroalgas exóticas y su presencia en mares venezolanos. **Acta Científica Venezolana**, 50: 11–14. 1999.

CASTRO, B.M.; MIRANDA, L.B. Physical oceanography of the western Atlantic continental shelf located between 4° N and 34° S. In: ROBINSON, A.R.; BRINK, K.H. (eds.) **The Sea**. John Wiley & Sons, New York. p. 209–251. 1998.

CHANDRASEKARAN, S. et al. Bioinvasion of *Kappaphycus alvarezii* on corals in the Gulf of Mannar, India. **Current Science** 94: 1167–1172. 2008.

CONKLIN, E.J.; SMITH, J.E. Abundance and spread of the invasive red algae, *Kappaphycus* spp., in Kane'ohe Bay, Hawaii and an experimental assessment of management options. **Biological Invasions** 7: 1029–1039. 2005.

CONKLIN, K.Y.; KURIHARA, A.; SHERWOOD, A.R. A molecular method for identification of the morphologically plastic invasive algal genera *Eucheuma* and *Kappaphycus* (Rhodophyta, Gigartinales) in Hawaii. **Journal of Applied Phycology** 21: 691–699. 2009.

DAVISON, I.R. Environmental effects on algal photosynthesis: temperature. **Journal of Phycology** 27: 2–8. 1991.

DOTY, M.S. *Eucheuma alvarezii* sp. nov. (Gigartinales, Rhodophyta) from Malaysia. In: ABBOTT, I.A. & NORRIS, J.N. (eds.) **Taxonomy of economic seaweeds: with reference to some Pacific and Caribbean species**. California Sea Grant College Program, La Jolla, California, p. 37–45. 1985.

DOTY, M.S.; ALVAREZ, V.B. Status, problems, advances and economics of *Eucheuma* farms. **Marine Technology Society Journal** 9: 30–35. 1975.

EDWARDS P. Illustrated guide to the seaweeds and seagrasses in the vicinity of Porto Aransas, Texas. **Contributions in Marine Science** 15: 1–228. 1970.

FAO. **The State of world fisheries and aquaculture**. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Rome. 230p. 2012

FREDERICQ, S.; FRESHWATER, D.W.; HOMMERSAND, M.H. Observations on the phylogenetic systematics and biogeography of the *Solieriaceae* (Gigartinales, Rhodophyta) inferred from *rbcL* sequences and morphological evidence. **Hydrobiologia** 398/399: 25–38. 1999.

GÓES, H.G.; REIS, R.P. An initial comparison of tubular netting versus tie-tie methods of cultivation for *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) on the south coast of Rio de Janeiro State, Brazil. **Journal of Applied Phycology** 23: 607–613. 2011.

GÓES, H.G.; REIS, R.P. Temporal variation of the growth, carrageenan yield and quality of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) cultivated at Sepetiba bay, Southeastern Brazilian coast. **Journal of Applied Phycology** 24: 173–180. 2012.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series** 41: 95–98. 1999.

HALLING, C. et al. Introduction of Asian strains and low genetic variation in farmed seaweeds: indications for new management practices. **Journal of Applied Phycology** 25: 89–95. 2013.

HAYASHI, L. et al. *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Areschougiaceae) cultivated in subtropical waters in Southern Brazil. **Journal of Applied Phycology** 23: 337–343. 2011a.

HAYASHI, L. et al. A review of *Kappaphycus* farming: prospects and constraints (including climate change). In: ALVARO, I.; RACHEL, E. & SECKBACH, J. (Orgs.). **Role of seaweeds in globally changing environments: role of seaweeds in globally changing environments**. 1ed. Berlin: Springer, v. 15, p. 255–283. 2010.

HAYASHI, L. et al. Effects of salinity on the growth rate, carrageenan yield, and cellular structure of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) cultured *in vitro*. **Journal of Applied Phycology** 23: 439–447. 2011b.

- HAYASHI, L.; PAULA, E. J.; CHOW, F. Growth rate and carrageenan analyses in four strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) farmed in the subtropical waters of São Paulo State, Brazil. **Journal of Applied Phycology** 19: 393–399. 2007.
- HORTA, P.A. et al. Considerações sobre a distribuição e origem da flora de macroalgas marinhas brasileiras. **Hoehnea** 28: 243–265. 2001.
- HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics** 17: 754–755. 2001.
- HURTADO, A.Q. et al. Investigation of the application of Acadian Marine Plant Extract Powder (AMPEP) to enhance the growth, phenolic content, free radical scavenging, and iron chelating activities of *Kappaphycus* Doty (Solieriaceae, Gigartinales, Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology** 24: 601–611. 2012.
- HURTADO, A.Q. et al. Occurrence of Polysiphonia epiphytes in *Kappaphycus* farms at Calaguas Is. Camarines Norte, Philippines. **Journal of Applied Phycology** 18: 301–306. 2006.
- HURTADO, A.Q. et al. The seasonality and economic feasibility of cultivating *Kappaphycus* in Panagatan Cays, Caluya, Antique, Philippines. **Aquaculture** 199: 295–310. 2001.
- JEFFREY, S.W.; HUMPHREY, G.F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. **Biochemie und Physiologie der Pflanzen** 167: 191–194. 1975.
- KAMALAKANNAN, B. et al. Turbinaria sp. as victims to *Kappaphycus alvarezii* in reefs of Gulf of Mannar, India. **Coral Reefs** 29: 1077. 2010.
- KURSAR, T.A.; VAN DER MEER, J.; ALBERTE, R.S. Light-harvesting system of red alga *Gracilaria tikvahiae* I. biochemical analyses of pigment mutations. **Plant Physiology** 73: 353–360. 1983.
- LARGO, D.B. et al. Immunofluorescent detection of ice-ice disease-promoting bacterial strain *Vibrio* sp. P11 of the farmed macroalga, *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta). **Journal of Marine Biotechnology** 6: 178–182. 1998.
- LARGO, D.B. et al. Time-dependent attachment mechanism of bacterial pathogen during ice-ice infection in *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology** 11: 129–136. 1999.
- LIDEMAN et al. Effect of temperature and light on the photosynthesis as measured by chlorophyll fluorescence of cultured *Eucheuma denticulatum* and *Kappaphycus* sp. (Sumba strain) from Indonesia. **Journal of Applied Phycology** 25: 399–406. 2013.
- LLUISMA, A.O.; RAGEN, M.A. Relationships among *Eucheuma denticulatum*, *Eucheuma isiforme* and *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta) based on nuclear ssu-rRNA gene sequences. **Journal of Applied Phycology** 7: 471–477. 1995.

LOBBAN C.S.; HARRISON, P.J. **Seaweed ecology and physiology**. Cambridge University Press, Cambridge. 366p. 1994.

LOUREIRO, R.R. et al. Extract powder from the brown alga *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis (AMPEP): a “vaccine-like” effect on *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C. Silva. **Journal of Applied Phycology** 24: 427–432. 2012.

LOUREIRO, R.R.; REIS, R.P.; CRITCHLEY, A.T. In vitro cultivation of three *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Areschougaceae) variants (green, red and brown) exposed to a commercial extract of the brown alga *Ascophyllum nodosum* (Fucaceae, Ochrophyta). **Journal of Applied Phycology** 22: 101–104. 2010.

LUCENA, L.A.F. et al. Levantamento da flora do infralitoral no município de Pitimbu, litoral sul do Estado da Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências** 5: 585–587. 2007.

MACEDO, S.J.; MUNIZ, K.; MONTES, M.J.F. Hidrologia da região costeira e plataforma continental de Pernambuco. In: LEÇA, E.E. et al. **Oceanografia um cenário tropical**. Recife – PE, p. 255–286. 2004.

MARTINS, A.P.; CHOW, F.; YOKOYA, N.Y. Ensaio *in vitro* da enzima nitrato redutase e efeito da disponibilidade de nitrato e fosfato em variantes pigmentares de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). **Revista Brasileira de Botânica** 32: 635–645. 2009.

NECCHI, O. Photosynthetic responses to temperature in tropical lotic macroalgae. **Phycological Research** 52: 140–148. 2004.

OLIVEIRA, E.C. et al. Metodologias para o cultivo axênicos de macroalgas marinas in vitro. In: ALVEAL, K. et al. (eds.) **Manual de Métodos Ficológicos**. Universidad de Concepción, Chile, p. 429–455. 1995.

OLIVEIRA, E.C.; PAULA, E.J. Exotic seaweeds: friends or foes? In: CHAPMAN, A.R.; ANDERSON, O.R.J.; VREELAND, V.J. & DAVISON, I.R. (Eds.). **Proceedings of the 17th International Seaweed Symposium**. Cape Town 2001. Oxford, Oxford University Press. p. 87–93. 2003.

OLIVEIRA, E.C.; SILVA, B.N.T.; AMANCIO, C.E. Fitobentos (Macroalgas). In: LOPES, R. M.; POMBO, V.B. & CUNHA, D.R. (eds.). **Informes sobre as espécies exóticas invasoras marinhas no Brasil**. Ministério do Meio Ambiente. Série Biodiversidade, V. 33. p. 107–145. 2009.

OLIVERIA, E.C.; ALVEAL, K.; ANDERSON, R.J. Mariculture of the agar-producing gracilarioid red algae. **Reviews in Fisheries Science** 8: 345–377. 2000.

PAULA, E.J.; PEREIRA R.T.L.; OSTINI, S. Introdução de espécies exóticas de *Euclima* e *Kappaphycus* (Gigartinales, Rhodophyta) para fins de maricultura no litoral brasileiro: abordagem teórica e experimental. In: PAULA, E.J.; CORDEIRO-MARINO, M.; SANTOS, D.P.; PLASTINO, E.M. & YOKOYA, N.S. (eds.). **IV Congresso Latino Americano de**

Ficologia, II Reunião Ibero-Americana de Ficologia e VII Reunião Brasileira de Ficologia. Caxambu 1996. EXATA Ed. v.II. p. 341–357. 1998.

PAULA, E.J.; PEREIRA, R.T.L.; OHNO, M. Growth rate of carragenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) introduced in subtropical Waters of São Paulo State, Brazil. **Phycological Research** 50: 1–9. 2002.

PAULA, E.J.; PEREIRA, R.T.L.; OHNO, M. Strain selection in *Kappaphycus alvarezii* var. *alvarezii* (Soliericeae, Rhodophyta) using tetraspores progeny. **Journal of Applied Phycology** 11: 111–121. 1999.

PAULA, E.J.; OLIVEIRA, E.C. Macroalgas exóticas no Brasil com ênfase à introdução de espécies visando à maricultura. In: SILVA, J.S.V. & SOUZA, R.C.L. (Orgs.). **Água de lastro e bioinvasão.** São Paulo: Interciência, p. 99–112. 2004.

PAULA, E.P.; ERBERT, C.; PEREIRA, R.T.L. Growth rate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) *in vitro*. **Phycological Research** 49: 155–161. 2001.

PELLIZZARI, F.; REIS, R.P. Seaweed cultivation on the Southern and Southeastern Brazilian Coast. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 21: 305–312. 2011.

PICKERING, T.D. Advances in seaweed aquaculture among Pacific Island countries. **Journal of Applied Phycology** 18: 227–234. 2006.

PICKERING, T.D.; SKELTON, P.; SULU, J.R. Intentional introductions of commercially harvested alien seaweeds. **Botanica Marina** 50: 338–350. 2007.

REDDY, C.R.K.; GUPTA, V.; JHA, B. Developments in biotechnology of red algae. In: SECKBACH, J. & CHAPMAN, D.J. (eds.). **Red Algae in the Genomic Age.** Springer Dordrecht Heidelberg London, New York. p. 307–344. 2010.

REIS, R.P.; BASTOS, M.; GÓES, H.G. Cultivo de *Kappaphycus alvarezii* no litoral do Rio de Janeiro: subsídios ao monitoramento ambiental da produção em escala industrial. **Panorama da Aqüicultura** 17: 42–47. 2007.

REIS, R.P.; LOUREIRO, R.R.; MESQUITA, F.S. Does salinity affect growth and carrageenan yield of *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales/Rhodophyta)? **Aquaculture Research** 42: 1231–1234. 2011.

RIBEIRO, A.L.N.L. et al. Effects of nitrogen and phosphorus availabilities on growth, pigment, and protein contents in *Hypnea cervicornis* J. Agardh (Gigartinales, Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology** DOI 10.1007/s10811-012-9938-6. 2012.

- RODGERS, S.K.; COX, E.F. Rate of spread of introduced rhodophytes *Kappaphycus alvarezii*, *Kappaphycus striatum*, and *Gracilaria salicornia* and their current distributions in Kane'ohe Bay, O'ahu, Hawaii. **Pacific Science** 53: 232–241. 1999.
- SASSI, R.; OLIVEIRA, R.B. **Projeto Estuário do Rio Paraíba do Norte**. Relatório técnico Final. NEPREMAR/UFPB. Paraíba, 123p. 1983.
- SCHAFFELKE, B.; HEWITT, C.L. Impacts of introduced seaweeds. **Botanica Marina** 50: 397–417. 2007
- SCHAFFELKE, B; SMITH, J.E.; HEWITT, C.L. Introduced macroalgae: growing concern. **Journal of Applied Phycology** 18: 529–541. 2006.
- SCHMIDT, E.C.; MARASCHIN, M.M.; BOUZON, Z.L. Effects of UVB radiation on the carragenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales): changes in Itrastructure, growth, and photosynthetic pigments. **Hydrobiologia** 649: 171–182. 2010.
- SILVA, B.N.T.; AMANCIO, C.E.; OLIVEIRA, E.C. Exotic marine macroalgae on the Brazilian coast: a revision. **Oecologia Australis** 14: 403–414. 2010.
- TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution** 4: 1–9. 2011.
- TAN, J. et al. Assessment of four molecular markers as potential dna barcodes for red algae *Kappaphycus* Doty and *Eucheuma* J. Agardh (Solieriaceae, Rhodophyta). **PLoS ONE** 7: 1–15. 2012.
- TAN, J.; LIM, P.E.; PHANG, S.M. Phylogenetic relationship of *Kappaphycus* Doty and *Eucheuma* J. Agardh (Solieriaceae, Rhodophyta) in Malaysia. **Journal of Applied Phycology** 25: 13–29. 2013.
- URSI, S. **Diversidade intraespecífica em *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): crescimento, fotossíntese, pigmentos, polissacarídeos e genes da ficoeritrina de linhagens selvagens e variantes**. Tese de doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 121p. 2005.
- URSI, S.; GUIMARÃES, M.; PLASTINO, E. M. Deleterious effect of TRIS buffer on growth rates and pigment content of *Gracilaria birdiae* Plastino & E.C. Oliveira (Gracilariales, Rhodophyta). **Acta Botanica Brasilica** 22: 891–896. 2008.
- VALENTINE, J.P.; MAGIEROWSKI, R.H.; Johnson, C.R. Mechanisms of invasion: establishment, spread and persistence of introduced seaweed populations. **Botanica Marina** 50: 351–360. 2007.
- WILLIAMS, S.L.; SMITH, J.E. A global review of the distribution, taxonomy and impacts of introduced seaweeds. **Annual Review of Ecology and Systematics** 38: 327–59. 2007.

YOKOYA, N.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** 48: 133–142. 2000.

ZHAO, S.; HE, P. Molecular identification based on ITS sequences for *Kappaphycus* and *Eucheuma* cultivated in China. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology** 29: 1287–1296. 2011.

ZUCCARELLO, G.C. et al. A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationships. **Molecular Ecology** 8: 1443–1447. 1999.

ZUCCARELLO, G.C. et al. Systematics and genetic variation in commercial *Kappaphycus* and *Eucheuma* (Solieriaceae, Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology** 18: 643–651. 2006.



Molecular identification of the exotic lineage of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) cultivated in the tropical region of Brazil

PATRÍCIA G. ARAÚJO¹, GEORGE E. C. MIRANDA², MARIA B. BARROS-BARRETO³ & MUTUE T. FUJII^{4*}

¹Post-Graduate Program in Oceanography, Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901 Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil.

²Departamento de Sistemática e Ecologia, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, 58059-900 João Pessoa, PB, Brazil.

³Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Prof. Rodolpho Rocco 211, CCS, bloco A, subsolo, sala 99, 21941-902 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

⁴Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Instituto de Botânica, Av. Miguel Estéfano, 3687, 04301-902 São Paulo, SP, Brazil.

*Corresponding author: mutue.fujii@pq.cnpq.br. Phone: + 55 11 50676123. Fax: + 55 11 50733678

Abstract

Kappa carrageenan is an important phycocolloid extracted from the red seaweed *Kappaphycus alvarezii*. This species has been introduced into several regions, most recently in Brazil. The remote invasive potential of this seaweed in both south and southeast waters of Brazil (subtropical regions) has been established, but introduction in the northeastern tropical area is contested due to the absence of biological information. An unknown exotic lineage of *K. alvarezii* has been illegally introduced and cultivated in an area characterized by the presence of coral reefs in Paraíba, the northeastern Brazilian coast, since the beginning of the last decade. This work focuses on the molecular identification of these samples in comparison with sequences of other strains of *K. alvarezii* and congeners available in Genbank. Maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) analyses showed strong similarities between *K. alvarezii* cultivated in the tropical waters in Brazil and those lineages cultivated in Hawaii, Venezuela, Malaysia and Tanzania that have never shown invasive behavior. However, more detailed investigations and use of environmental monitoring are recommended before commercial cultivation of this species can be authorized in tropical region of Brazil.

Key words: bioinvasive potential, carrageenophyte, *cox2-3* spacer, cultivation

Introduction

Seaweed farming has an important role in the development of sustainable mariculture and represents an alternative livelihood for fishers (Ask & Azanza 2002, Oliveira & Paula 2003, Bindu & Levine 2011, Bixler & Porse 2011). The worldwide production of economically important macroalgae has increased significantly in recent decades, from 3.8 million tons in 1990 to 19 million tons in 2010; however, in 2008, the total value of farmed algae was ca. of US\$ 4.4 billion, and its value increased to US\$ 5.7 billion in 2010 (FAO 2012). Among these seaweeds, the genera *Kappaphycus* M.S. Doty in Abbott (1988: 171) and *Eucheuma* J. Agardh (1847: 16) (Rhodophyta, Solieriaceae), which are also known as eucheumatoid algae, have been cultivated worldwide as the primary source of carrageenan (Doty 1985, Areces 1995, Ask *et al.* 2003, Hayashi *et al.* 2010). *Kappaphycus alvarezii* (M.S. Doty 1985: 37) M.S. Doty ex P.C. Silva in Silva *et al.* (1996: 333) is the most cultivated seaweed in the world (Ask & Azanza 2002, Aguilar *et al.* 2003, Hayashi *et al.* 2007a, 2010, Bindu & Levine 2011, Bixler & Porse 2011). The cultivation of *K. alvarezii* began in the 1970s in the Philippines, and currently it has been introduced to more than 20 countries for mariculture purposes (Doty & Alvarez 1975, Doty 1985, Areces 1995, Ask & Azanza 2002, Ask *et al.* 2003).

In Brazil, *Kappaphycus alvarezii* was introduced in 1995 when it was brought to São Paulo, southeast region, from the Usa Marine Biological Institute, Kochi University, Japan. All programs involved in the evaluation of the economic feasibility and the environmental risks of introducing *K. alvarezii* for the mariculture were authorized by the Governmental Agency *Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis* (IBAMA) (Paula *et al.* 1999). Experimental studies have focused on the introduction of the species and the resulting environmental risks in southeast and south Brazil (Paula *et al.* 1999, 2002, Bulboa & Paula 2005, Bulboa *et al.* 2008, Castelar *et al.* 2009, Góes & Reis 2011, 2012, Hayashi *et al.* 2011). Thus, following 18 years of research, the results showed favorable characteristics for commercial cultivation such as productivity and remote potential invasion (Paula *et al.* 1999, 2002, Bulboa & Paula 2005, Bulboa *et al.* 2008, Hayashi *et al.* 2007a, b, 2010, 2011, Castelar *et al.* 2009, Góes & Reis 2011, 2012). Based on these results, the cultivation of *K. alvarezii* in limited area of southeast Brazil was authorized by IBAMA through the Normative Instruction 185/2008. Currently, commercial scale production of *K. alvarezii* occurs only along the coast of Rio de Janeiro, a subtropical region of Brazil (Castelar *et al.* 2009, Góes & Reis 2011, 2012).

In the northeastern Brazilian coast, some seaweed species harvested from the native population are exploited commercially by fishing communities (Oliveira & Miranda 1998, Bezerra & Marinho-Soriano 2010). The seaweed species of greatest interest are *Gracilaria birdiae* E.M. Plastino & E.C. Oliveira (2002: 390) and *Hydropuntia caudata* (J. Agardh 1852: 598) C.F.D. Gurgel & S. Fredericq (2004: 155), and consequently, the natural populations of these species are reduced to a few individuals who have lost the ability to recover (Miranda *et al.* 2012).

In the state of Paraíba, the cultivation initiatives of *Gracilaria birdiae* and *Hydropuntia caudata* have been developed since 1983 (Oliveira & Miranda 1998). However, native seaweed production has not been economically attractive due to low growth rates of the algae and the difficulty to find seedlings. In the early 2000s, *K. alvarezii* was irregularly introduced for mariculture purposes in this area only once, and since then the seaweeds are been cultivated illegally at small scale by local fishermen (Lucena *et al.* 2007). The introduction started up with approximately 100 kg of the seaweeds without quarantine procedure and environmental monitoring (pers. comm. Marivaldo Bastos, local fisherman). The exact origin of this material is unknown.

It is known that the introduction of exotic species can cause serious environmental damage, including the loss of native biodiversity (Schaffelke *et al.* 2006, Anderson 2007, Pickering *et al.* 2007). *Kappaphycus* species such as *K. alvarezii* and *K. striatum* (F. Schmitz 1895: 151, 152) M.S. Doty ex P.C. Silva in Silva *et al.* (1996: 334) and *Eucheuma* spp. have been reported in bioinvasion events in Hawaii (Smith *et al.* 2002, Conklin & Smith 2005), India (Bagla 2008, Chandrasekaran *et al.* 2008, Kamalakannan *et al.* 2010) and Venezuela (Barrios 2005, Barrios *et al.* 2007). In addition, recently Halling *et al.* (2013) observed *K. alvarezii*, which was introduced from Asia for mariculture purposes, growing on coral reefs in Zanzibar.

The taxonomy of eucheumatoid species is difficult due to strong morphological plasticity, causing the misapplication of commercial and scientific names (Doty 1985, 1988). Zuccarello *et al.* (2006), Conklin *et al.* (2009) and Tan *et al.* (2012) have highlighted the need for more detailed studies to confirm the identity of target seaweeds and to access genotype information before seaweed strains can be used for mariculture purposes. Molecular approaches have been widely used to certify the identification of strains with high commercial value and low bioinvasion potential. Molecular markers such as the mitochondrial-encoded *cox1* gene, a portion of the nuclear 28S rRNA gene (LSU), the small subunit rRNA gene (SSU), the Universal Plastid Amplicon (UPA) and the large subunit of the chloroplast-encoded gene (*rbcL*) are more suitable for identification and phylogenetic analysis (Lluisma & Ragen 1995, Fredericq *et al.* 1999, Conklin *et al.* 2009, Tan *et al.* 2012), whereas for inter- and intra-specific analysis, the mitochondrial segments of the *cox2-3* spacer, the plastidial *rbcL-rbcS* spacer, and the nuclear-encoded ribosomal internal transcribed spacer (ITS) are more efficient due to the higher rate of change (Zuccarello *et al.* 2006, Conklin *et al.* 2009, Zhao & He 2011, Tan *et al.* 2012, 2013, Halling *et al.* 2013).

The northeastern region of Brazil is a priority area for conservation worldwide due to the presence of coral reefs. However, the demand for production of *Kappaphycus alvarezii* in Paraíba has superseded the need for environmental monitoring actions and conservation. Therefore, it is necessary to determine the biological and ecological aspects of this species to evaluate the environmental risks of its introduction into the tropical region. The present study aimed to identify the lineage of *K. alvarezii* introduced into the northeastern coast of Brazil using molecular markers, and comparing its sequences with others cultivated worldwide.

Materials and methods

Kappaphycus alvarezii samples were collected in October 2010 in Pitimbu beach, Paraíba, the tropical region of Brazil (07° 30' 10.5" S, 34°47' 53.5" W) (Fig. 1), as floating seaweeds, which were produced by cultivation in the same region. Nine drift individuals were collected along the beach near the raft cultivation: three individuals of each pigment variant: red, green, and brown. The voucher specimens were deposited in the Herbarium of the Instituto de Botânica, São Paulo, Brazil (SP 400964).



FIGURE 1. Map showing Paraíba State, northeastern Brazilian coast and *Kappaphycus alvarezii* collection site (arrow).

Molecular analyses: DNA was extracted from approximately 40 mg of dried samples processed in the Precellys homogenizer using the DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, EUA). Polymerase chain reaction (PCR) was performed using the mitochondrial *cox2-3* spacer. The primer sequence was the same as that used by Zuccarello *et al.* (1999), and the products were analyzed by electrophoresis in 0.7% agarose to confirm the product size. The PCR products were purified with MicroSpin™ S-300 HR columns (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, USA). Sequencing was performed with the BigDye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit (Applied Biosystems, NJ, USA) on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The primers used for sequencing were the same as the used for PCR amplification.

Phylogenetic analyses: all sequences were aligned using BioEdit 7.1.3.0 (Hall 1999) and deposited in the NCBI Genbank, and *Kappaphycus* and *Eucheuma* sequences from other sites were selected for comparison with the sequences from this study (Table 1).

TABLE 1. Samples used in molecular analysis.

Genbank accession n°	Species name	Locality	Reference
KC122263	<i>Kappaphycus alvarezii</i> (IBT 708)	Paraíba, Brazil	This study
KC122262	<i>K. alvarezii</i> (IBT 713)	Paraíba, Brazil	This study
KC122264	<i>K. alvarezii</i> (IBT 729)	Paraíba, Brazil	This study
JQ713902	<i>K. alvarezii</i>	Tanzania	Halling <i>et al.</i> (2013)
FJ554862	<i>K. alvarezii</i>	Hawaii	Conklin <i>et al.</i> (2009)
AY687436	<i>K. alvarezii</i>	Zanzibar	Zuccarello <i>et al.</i> (2006)
AY687432	<i>K. alvarezii</i>	Hawaii	Zuccarello <i>et al.</i> (2006)
AY687433	<i>K. alvarezii</i>	Hawaii	Zuccarello <i>et al.</i> (2006)
AY687427	<i>K. alvarezii</i>	Venezuela	Zuccarello <i>et al.</i> (2006)
AY687430	<i>K. alvarezii</i>	Madagascar	Zuccarello <i>et al.</i> (2006)
JN234759	<i>K. alvarezii</i>	Malaysia	Unpublished
JN234760	<i>K. alvarezii</i>	Malaysia	Unpublished
JN234761	<i>K. alvarezii</i>	Malaysia	Unpublished
FJ554860	<i>K. striatum</i>	Hawaii	Conklin <i>et al.</i> (2009)
AY687431	<i>K. striatum</i>	Indonesia	Zuccarello <i>et al.</i> (2006)
AY687435	<i>K. striatum</i>	Indonesia	Zuccarello <i>et al.</i> (2006)
AY687434	<i>K. striatum</i>	Philippines	Zuccarello <i>et al.</i> (2006)
JN234763	<i>K. striatum</i>	Malaysia	Unpublished
JN234764	<i>K. striatum</i>	Malaysia	Unpublished
AY687426	<i>K. cottonii</i>	Philippines	Zuccarello <i>et al.</i> (2006)
FJ554861	<i>Kappaphycus</i> sp.	Hawaii	Conklin <i>et al.</i> (2009)
JQ713903	<i>Eucheuma denticulatum</i> (N.L. Burman 1768: 28) F.S. Collins & Hervey (1917: 106, 108)	Tanzania	Halling <i>et al.</i> (2013)
FJ554859	<i>E. denticulatum</i>	Hawaii	Conklin <i>et al.</i> (2009)
FJ561733	<i>E. denticulatum</i>	Hawaii	Conklin <i>et al.</i> (2009)
JN234756	<i>E. denticulatum</i>	Malaysia	Unpublished
AY687437	<i>E. denticulatum</i>	Indonesia	Zuccarello <i>et al.</i> (2006)
AY687425	<i>Eucheuma</i> sp.	Hawaii	Zuccarello <i>et al.</i> (2006)
AY687424	<i>Eucheuma</i> sp.	Tanzania	Zuccarello <i>et al.</i> (2006)
AY687423	<i>E. platycladum</i> (F. Schmitz 1895: 139, 152-153)	Tanzania	Zuccarello <i>et al.</i> (2006)
AY687422	<i>E. platycladum</i>	Kenya	Zuccarello <i>et al.</i> (2006)
AY687428	<i>E. denticulatum</i>	Madagascar	Zuccarello <i>et al.</i> (2006)
AY687421	<i>E. isiforme</i> (C. Agardh 1822: 271) J. Agardh (1847: 16)	Florida	Zuccarello <i>et al.</i> (2006)
AY687420	<i>E. isiforme</i>	Florida	Zuccarello <i>et al.</i> (2006)
AY687417	<i>Betaphycus philippinensis</i>	Philippines	Zuccarello <i>et al.</i> (2006)

Phylogenetic relationships were inferred with the Maximum likelihood (ML) method using MEGA 5.05 (Tamura *et al.* 2011). Gaps or missing data were treated as complete deletions, and bootstrap was performed with 1,000 replicates. MrBayes v.3.0 beta 4 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) was used to calculate the Bayesian inference (BI). The evolution model was selected based on an ML ratio test with MEGA 5.05 using the Akaike Information Criterion (AIC) and Bayesian Information Criterion (BIC). The evolution model used

was the general-time-reversible model of nucleotide substitution with invariant sites and gamma distributed rates for variable sites (GTR+I+G) (Tamura *et al.* 2011). BI analysis was performed using the Markov chain Monte Carlo method, sampling one tree every 10 generations for 1,000,000 generations, starting with a random tree. *Betaphycus philippinensis* M.S. Doty (1995: 237) was used as an outgroup sample.

Results

The final sequences including the *cox2-3* spacer contained 398–399 nucleotides. The phylogenetic tree topologies of the Maximum likelihood (ML) and the Bayesian inference (BI) methods were not identical; however, in both analyses *Kappaphycus* and *Eucheuma* samples formed distinct clusters (Fig. 2).

The *Kappaphycus* samples were included in distinct clades with *K. cottonii* (A. Weber-van Bosse 1913: 115) M.S. Doty ex P.C. Silva in Silva *et al.* (1996: 333) from the Philippines the most distinct. Other samples formed three main clades: *K. alvarezii* (A1 and A2), *Kappaphycus* spp. from Hawaii (B) and *K. striatum* (C), with high support (ML = 99%) (Fig. 2).

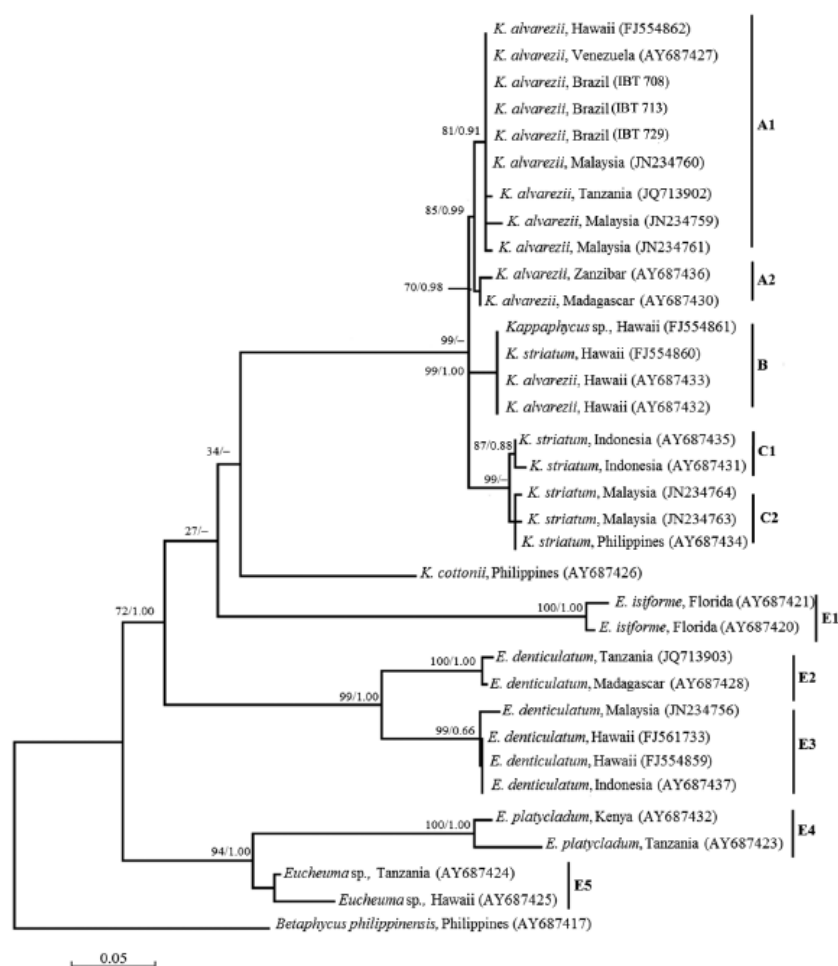


FIGURE 2. Maximum likelihood analyses of the *cox2-3* spacer sequences based on GTR+I+G model for *Kappaphycus alvarezii* samples from northeastern Brazilian coast and sequences from Genbank accessions. The scale bar indicates substitutions per site.

The sequences of *Kappaphycus alvarezii* from northeastern Brazil grouped with those samples cultivated in Hawaii, Venezuela, Tanzania and Malaysia, forming subclade A1 with moderate support (ML = 81%, BI = 0.91). The sequence from Zanzibar and Madagascar grouped as subclade A2 with moderate support (ML = 70%, BI = 0.98).

The *Kappaphycus* spp. from Hawaii formed distinct clade (B) with high support (ML = 99%, BI = 1.00), confirming the phylogenetic relationship reported by Zuccarello *et al.* (2006) and Conklin *et al.* (2009). *Kappaphycus striatum* was divided in two clades (C1 and C2) with high support (ML = 99%). The clade C1 included species from Indonesia, and clade C2 those from Malaysia and the Philippines.

Additionally, the species of *Eucheuma* were distributed into five clades, forming distinct groups according to the species.

Discussion

Our results showed that the northeastern Brazilian specimens of *Kappaphycus alvarezii* is part of the worldwide cultivated subclade A strain, as predicted by Zuccarello *et al.* (2006) and Conklin *et al.* (2009). These strains have been considered having low invasion potential, since they are biologically limited because they were not found to produce viable spores, while it could reproduce by vegetative fragmentation (Zuccarello *et al.* 2006, Conklin *et al.* 2009). In southeast region of Brazil, Paula *et al.* (1999) observed tetraspore production from *K. alvarezii* in laboratory experiments only once. Although tetraspores of *K. alvarezii* germinated, they had low survival rates, suggesting that the strain studied is almost sterile (Bulboa & Paula 2005, Bulboa *et al.* 2008). According to Paula *et al.* (1999) the high mortality of tetraspore progeny of *K. alvarezii* cultivated in southeastern Brazil could be a consequence of their hybrid origin or clonal propagation, which may cause a reduced reproductive potential and abortive spore formation.

Previous studies demonstrated that *K. alvarezii* has remote invasion potential in southern and southeastern Brazil (Paula *et al.* 1999, 2002, Bulboa & Paula 2005, Bulboa *et al.* 2008, Castelar *et al.* 2009, Hayashi *et al.* 2011). Reproductive structures in cultivated *K. alvarezii* are rare (Doty 1985, Areces 1995, Castelar *et al.* 2009, Hayashi *et al.* 2011), and even the spores produced in the laboratory are not all viable (Bulboa *et al.* 2008). Moreover, in the field, the drift algae fragments are most likely affected by herbivory or are killed by environmental factors such as temperature and water transparency (Bulboa & Paula 2005, Castelar *et al.* 2009, Hayashi *et al.* 2011). However, these results are not applicable for northeastern Brazilian coast, which has different environmental conditions, such as water temperature, transparency and nutrients (Castelar *et al.* 2009), as well as a reef formation. Therefore, further studies are desirable to evaluate the potential risk of invasion according to local environmental conditions and to highlight the need for monitoring programs in these regions.

Furthermore, our samples had a close relationship with those cultivated lineages from Hawaii, Venezuela, Malaysia, and Tanzania (A1), suggesting the similarity of these strains. This information can support the identification of the origin for *K. alvarezii* strains introduced and cultivated in northeastern Brazil. Moreover, the accurate identification of this strain will help us to support the future management and monitoring program, including ecological studies as well as improving the seaweed farming.

The phylogenetic analysis indicated that the subclades A1 and A2 corresponded to the cultivated species of *Kappaphycus* (Zuccarello *et al.* 2006, Conklin *et al.* 2009, Zhao & He 2011, Halling *et al.* 2013, Tan *et al.* 2012, 2013) where our samples were assembled. The clade B was formed by a different *Kappaphycus* species. Some authors dispute the identification inconsistency of this material; however, this clade represents a single wild seaweed haplotype from Hawaii and expresses invasive characteristics only in Hawaii (Conklin & Smith 2005, Zuccarello *et al.* 2006, Conklin *et al.* 2009). *Kappaphycus cottonii* was shown to be a highly divergent sister taxon to the all other *Kappaphycus* samples, and more studies are needed to investigate the taxonomy of this species (Zuccarello *et al.* 2006, Tan *et al.* 2013).

The mitochondrial *cox2-3* spacer was effective for the identification and comparison of our strain of *K. alvarezii* with other available strains of this species as predicted in previous studies, which highlighted the usefulness of this marker for the phylogenetic analysis of *Kappaphycus* and *Eucheuma* (Zuccarello *et al.* 1999, 2006, Conklin *et al.* 2009, Halling *et al.* 2013, Tan *et al.* 2012, 2013). This effectiveness is due to the relatively short length of the sequences, contributing for simpler amplification and sequencing which provides better resolution and more variation within the *cox2-3* spacer region (Zuccarello *et al.* 1999, 2006, Conklin *et al.* 2009, Tan *et al.* 2012). However, Tan *et al.* (2012) considered *cox2-3* spacer to be more appropriate to DNA barcode in these two genera. Zhao & He (2011) demonstrated the efficacy of the ITS marker to determine inter- and intra-specific analyses, arguing that such a marker has more accurate molecular protocol for the classification of eucheumatoid algae as compared to others, despite few *Kappaphycus* and *Eucheuma* have been sequenced with ITS marker up to date.

This study represents the first investigation towards the knowledge on *Kappaphycus alvarezii* cultivated in the northeastern Brazilian coast. The results obtained in the present study confirmed the identification and similarity of the northeastern Brazilian strain with those cultivated worldwide, which have never shown invasive behavior. However, more detailed investigations and use of environmental monitoring are recommended before commercial cultivation of this species can be authorized in tropical region of Brazil.

Acknowledgements

This study was partially supported by the Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The first author thanks the Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) for a Doctoral Fellowship and housing allowances at the Instituto de Botânica, São Paulo, during the development of the part of a Doctoral thesis. M.T. Fujii thanks CNPq for a Research Productivity Fellowship (Proc. 301438/2009-9). Beneficiary of the financial support from CAPES – Brazil. We are grateful to the anonymous reviewers and associate editor of Phytotaxa, SBL, whose suggestions improved significantly this manuscript.

References

- Abbott, I.A. (1988) *Taxonomy of economic seaweeds with special reference to Pacific and Caribbean species*. California Sea Grant College Program, La Jolla, California, 237 pp.
- Agardh, C.A. (1822) *Species algarum rite cognitae, cum synonymis, differentiis specificis et descriptionibus succinctis. Volumen primum pars posterior*. Ex officina Berlingiana, Lund, 229 pp.
- Agardh, J.G. (1847) Nyaalgerfrån Mexico. Öfversigt af Kongl. [Svenska] Vetenskaps-Akademiens Förhandlingar 4: 5–17.
- Agardh, J.G. (1852) *Species genera et ordines algarum, seu descriptiones succinctae specierum, generum et ordinum, quibus algarum regnum constituitur. Volumis secundi: Algas florideas complectens. Part 2, fasc. 2*. C.W.K. Gleerup, Lund, 142 pp.
- Aguilan, J.T., Broom, J.E., Hemmingson, J.A., Dayrit, F.M., Montañó, M.N.E., Dancel, M.C.A., Niñonuevo, M.R. & Furneaux, R.H. (2003) Structural analysis of carrageenan from farmed varieties of Philippine seaweed. *Botanica Marina* 46: 179–192.
<http://dx.doi.org/10.1515/BOT.2003.018>
- Anderson, L.W.J. (2007) Control of invasive seaweeds. *Botanica Marina* 50: 418–437.
- Areces, A.J. (1995) Cultivo comercial de carragenofitas del género *Kappaphycus alvarezii* Doty. In: Alveal, K., Ferrario, M.E., Oliveira, E.C. & Sar, E. (eds.) *Manual de Métodos Ficológicos*. Universidad de Concepción, Concepcion, pp. 529–549.
- Ask, E.I. & Azanza, R.V. (2002) Advances in cultivation technology of commercial eucheumatoid species: a review with suggestions for future research. *Aquaculture* 206: 257–277.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00724-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00724-4)
- Ask, E.I., Batibasaga, A., Zertuche-Gonzalez, J.A. & San, D. (2003) Three decades of *Kappaphycus alvarezii*

- (Rhodophyta) introduction to non-endemic locations. In: Chapman, A.R., Anderson, O.R.J., Vreeland, V.J. & Davison, I.R. (eds.) *Proceedings of the 17th International Seaweed Symposium. Cape Town 2001*. Oxford University Press, Oxford, pp. 49–57.
- Bagla, P. (2008) Seaweed Invader Elicits Angst in India. *Science* 320: 1271.
- Barrios, J.E. (2005) Dispersión del alga exótica *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales: Rhodophyta) en la región nororiental de Venezuela. *Boletín del Instituto Oceanográfico del Venezuela* 44: 29–34.
- Barrios, J., Bolaños, J. & Lopez, R. (2007) Blanqueamiento de arrecifes coralinos por la invasión de *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta) en Isla Cubagua, Estado Nueva Esparta, Venezuela. *Boletín del Instituto Oceanográfico del Venezuela* 46: 147–152.
- Bezerra, A.F. & Marinho-Soriano, E. (2010) Cultivation of the red seaweed *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) in tropical waters of northeast Brazil. *Biomass & Bioenergy* 34: 1813–1817.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.07.016>
- Bindu, M.S. & Levine, I.A. (2011) The commercial red seaweed *Kappaphycus alvarezii* – an overview on farming and environment. *Journal of Applied Phycology* 23: 789–796.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10811-010-9570-2>
- Bixler, H.J. & Porse, H. (2011) A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *Journal of Applied Phycology* 23: 321–335.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10811-010-9529-3>
- Bulboa, C.R. & Paula, E.J. (2005) Introduction of non-native species of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) in subtropical waters: comparative analyses of growth rates of *Kappaphycus alvarezii* and *Kappaphycus striatum* in vitro and in the sea in southeastern Brazil. *Phycological Research* 53: 183–188.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-183.2005.00385.x>
- Bulboa, C.R., Paula, E.J. & Chow, F. (2008) Germination and survival of tetraspores of *Kappaphycus alvarezii* (Solieriaceae, Rhodophyta) introduced in subtropical waters of Brazil. *Phycological Research* 56: 39–45.
- Burman, N.L. (1768) *Flora indica: cui accedit series zoophytorum indicorum, nec non prodromus florae capensis*. Apud Cornelium Haek & Johannem Schreuderum, Leiden & Amsterdam, 242 pp.
- Castelar, B., Reis, R.P., Moura, A.L. & Kirk, R. (2009) Invasive potential of *Kappaphycus alvarezii* off the south coast of Rio de Janeiro State, Brazil: a contribution to environmentally secure cultivation in the tropics. *Botanica Marina* 52: 283–289.
- Chandrasekaran, S., Nagendran, N.A., Pandiaraja, D., Krishnankutty, N. & Kamalakannan, B. (2008) Bioinvasion of *Kappaphycus alvarezii* on corals in the Gulf of Mannar, India. *Current Science* 94: 1167–1172.
- Collins, F.S. & Hervey, A.B. (1917) The algae of Bermuda. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences* 53: 1–195.
- Conklin, E.J. & Smith, J.E. (2005) Abundance and spread of the invasive red algae, *Kappaphycus* spp., in Kane'ohe Bay, Hawaii and an experimental assessment of management options. *Biological Invasions* 7: 1029–1039.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10530-004-3125-x>
- Conklin, K.Y., Kurihara, A. & Sherwood, A.R. (2009) A molecular method for identification of the morphologically plastic invasive algal genera *Eucheuma* and *Kappaphycus* (Rhodophyta, Gigartinales) in Hawaii. *Journal of Applied Phycology* 21: 691–699.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10811-009-9404-2>
- Doty, M.S. (1985) *Eucheuma alvarezii* sp. nov. (Gigartinales, Rhodophyta) from Malaysia. In: Abbott, I.A. & Norris, J.N. (eds.) *Taxonomy of economic seaweeds: with reference to some Pacific and Caribbean species*. California Sea Grant College Program, La Jolla, California, pp. 37–45.
- Doty, M.S. (1988) Prodrum ad Systematica Eucheumatoideorum: A tribe of commercial seaweeds related to *Eucheuma* (Solieriaceae, Gigartinales). In: Abbott, I.A. (ed.) *Taxonomy of economic seaweeds with special reference to Pacific and Caribbean species*. California Sea Grant College Program, La Jolla, California, pp. 159–207.
- Doty, M.S. (1995) *Betaphycus philippinensis* gen. et sp. nov. and related species (Solieriaceae, Gigartinales). In: Abbott, I.A. (ed.) *Taxonomy of Economic Seaweeds*. California Sea Grant College Program, La Jolla, California, pp. 237–245.
- Doty, M.S. & Alvarez, V.B. (1975) Status, problems, advances and economics of *Eucheuma* farms. *Marine Technology Society Journal* 9: 30–35.
- FAO (2012) *The State of world fisheries and aquaculture*. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Rome, 230 pp.
- Fredericq, S., Freshwater, D.W. & Hommersand, M.H. (1999) Observations on the phylogenetic systematics and biogeography of the Solieriaceae (Gigartinales, Rhodophyta) inferred from *rbcL* sequences and morphological evidence. *Hydrobiologia* 398/399: 25–38.
- Góes, H.G. & Reis, R.P. (2011) An initial comparison of tubular netting versus tie-tie methods of cultivation for *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) on the south coast of Rio de Janeiro State, Brazil. *Journal of Applied Phycology* 23: 607–613.
- Góes, H.G. & Reis, R.P. (2012) Temporal variation of the growth, carrageenan yield and quality of *Kappaphycus*

- alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) cultivated at Sepetiba Bay, Southeastern Brazilian coast. *Journal of Applied Phycology* 24: 173–180.
- 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: 138–159.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Halling, C., Wikström, S.A., Lilliesköld-Sjö, G., Mörk, E., Lundsör, E. & Zuccarello, G.C. (2013) Introduction of Asian strains and low genetic variation in farmed seaweeds: indications for new management practices. *Journal of Applied Phycology* 25: 89–95.
- Hayashi, L., Hurtado, A.Q., Msuya, F.E., Bleicher-Lhonneur, G. & Critchley, A.T. (2010) A review of *Kappaphycus* farming: prospects and constraints. In: Israel, A., Einav, R. & Seckbach, J. (eds.) *Seaweeds and their role in globally changing environments*. Springer, Berlin, pp. 255–283.
- Hayashi, L., Oliveira, E.C., Bleicher-Lhonneur, G., Boulenger, P., Pereira, R.T.L., von Seckendorff, R., Shimoda, V.T., Leflamand, A., Vallée, P. & Critchley, A.T. (2007a) The effects of selected cultivation conditions on the carrageenan characteristics of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. *Journal of Applied Phycology* 19: 505–511.
- Hayashi, L., Paula, E.J. & Chow, F. (2007b) Growth rate and carrageenan analyses in four strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) farmed in the subtropical waters of São Paulo State, Brazil. *Journal of Applied Phycology* 19: 393–399.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10811-006-9135-6>
- Hayashi, L., Santos, A.A., Faria, G.S.M., Nunes, B.G., Souza, M.S., Fonseca, A.L.D., Barreto, P.L.M., Oliveira, E.C. & Bouzon, Z.L. (2011) *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Areschougaceae) cultivated in subtropical waters in Southern Brazil. *Journal of Applied Phycology* 23: 337–343.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Kamalakaran, B., Jeevamani, J.J.J., Nagendran, N.A., Pandiaraja, D., Kutty, N.K. & Chandrasekaran, S. (2010) *Turbinaria* sp. as victims to *Kappaphycus alvarezii* in reefs of Gulf of Mannar, India. *Coral Reefs* 29: 1077.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00338-010-0684-4>
- Lluisma, A.O. & Ragen, M.A. (1995) Relationships among *Eucheuma denticulatum*, *Eucheuma isiforme* and *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta) based on nuclear *ssu-rRNA* gene sequences. *Journal of Applied Phycology* 7: 471–477.
<http://dx.doi.org/10.1007/BF00003931>
- Lucena, L.A.F., Kanagawa, A.I., Martins, G.J.M., Targino, C.H., Miranda, G.E.C. & Horta, P.A. (2007) Levantamento da flora do infralitoral no município de Pitimbu, litoral sul do Estado da Paraíba, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências* 5: 585–587.
- Miranda, G.E.C., Yokoya, N.S. & Fujii, M.T. (2012) Effects of temperature, salinity and irradiance on carposporeling development of *Hidropuntia caudata* (Gracilariales, Rhodophyta). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22: 818–824.
- Oliveira, E.C. & Miranda, G.E. (1998) Aspectos sociais e econômicos da exploração de algas marinhas no Brasil. In: Paula, E.J., M. Cordeiro-Marino, D.P. Santos, E.M. Plastino, M.T. Fujii & N.S. Yokoya (eds.) *Anais do Congresso Latino Americano, II Reunião Ibero-Americana e VII Reunião Brasileira de Ficologia*. Sociedade. Ficológica da América Latina e Caribe, São Paulo, pp. 149–156.
- Oliveira, E.C. & Paula, E.J. (2003) Exotic seaweeds: friends or foes? In: Chapman, A.R., Anderson, O.R.J., Vreeland, V.J. & Davison, I.R. (eds.) *Proceedings of the 17th International Seaweed Symposium, Cape Town 2001*. Oxford University Press, Oxford, pp. 87–93.
- Paula, E.J., Pereira, R.T.L. & Ohno M. (1999) Strain selection in *Kappaphycus alvarezii* var. *alvarezii* (Solieriaceae, Rhodophyta) using tetrasporesprogeny. *Journal of Applied Phycology* 11: 111–121.
- Paula, E.J., Pereira, R.T.L. & Ohno, M. (2002) Growth rate of carragenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) introduced in subtropical waters of São Paulo State, Brazil. *Phycological Research* 50: 1–9.
- Pickering, T.D., Skelton, P. & Sulu, R.J. (2007) International introductions of commercially harvested alien seaweeds. *Botanica Marina* 50: 338–350.
- Plastino, E.M. & Oliveira, E.C. (2002) *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta), a new species from the tropical South American Atlantic with a terete frond and deep spermatangial conceptacles. *Phycologia* 41: 389–396.
<http://dx.doi.org/10.2216/i0031-8884-41-4-389.1>
- Schaffelke, B., Smith, J.E. & Hewitt, C.L. (2006) Introduced macroalgae – a growing concern. *Journal of Applied Phycology* 18: 529–541.
- Schmitz, F. (1895) Marine Florideen von Deutsch-Ostafrika. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 21: 137–177.
- Silva, P.C., Basson, P.W. & Moe, R.L. (1996) Catalogue of the benthic marine algae of the Indian Ocean. *University of*

- Smith, J.E., Hunter, C.L. & Smith, C.M. (2002) Distribution and reproductive characteristics of nonindigenous and invasive marine algae in the Hawaiian Islands. *Pacific Science* 56: 299–315.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 4: 1–9.
<http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Tan, J., Lim, P.E. & Phang, S.M. (2013) Phylogenetic relationship of *Kappaphycus* Doty and *Eucheuma* J. Agardh (Solieriaceae, Rhodophyta) in Malaysia. *Journal of Applied Phycology* 25: 13–29.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10811-012-9833-1>
- Tan, J., Lim, P.E., Phang, S.-M., Hong, D.D., Sunarpi, H. & Hurtado, A.Q. (2012) Assessment of four molecular markers as potential dna barcodes for red algae *Kappaphycus* Doty and *Eucheuma* J. Agardh (Solieriaceae, Rhodophyta) *PLoS ONE* 7: 1–15.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0052905>
- Weber-van Bosse, A. (1913) Marine algae. Rhodophyceae, of the "Sealark" Expedition, collected by Mr. J. Stanley Gardiner, M.A. *Transactions of the Linnean Society of London, Second Series, Botany* 8: 105–142.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.1913.tb00282.x>
- Zhao, S. & He, P. (2011) Molecular identification based on ITS sequences for *Kappaphycus* and *Eucheuma* cultivated in China. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 29: 1287–1296.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00343-011-1032-4>
- Zuccarello, G.C., Burger, G., West, J.A. & King, R.J. (1999) A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationships. *Molecular Ecology* 8: 1443–1447.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294x.1999.00710.x>
- Zuccarello, G.C., Critchley, A.T., Smith, J.E., Sieber, V., Lhonneur, G.B. & West, J.A. (2006) Systematics and genetic variation in commercial *Kappaphycus* and *Eucheuma* (Solieriaceae, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 18: 643–651.