



Universidade dos Açores
Departamento de Biologia

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CULTIVO *IN VITRO* DE
HALOPTERIS SCOPARIA (LINNAEUS) SAUVAGEAU
(1903), HETEROKONTOPHYTA (PHAEOPHYCEAE).

ANA SOFIA DA PONTE CARREIRO

Dissertação de Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia
Vegetal

2014

ANA SOFIA DA PONTE CARREIRO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CULTIVO *IN VITRO* DE
HALOPTERIS SCOPARIA (LINNAEUS) SAUVAGEAU (1903),
HETEROKOTONPHYTA (PAEOPHYCEAE).

Dissertação de candidatura ao grau de
Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia
Vegetal, apresentada à Universidade dos
Açores.

Orientadora – Professora Doutora Ana
Isabel de Melo Azevedo Neto
Categoria – Professora Auxiliar com
Agregação.
Afiliação – Universidade dos Açores.

Co-orientadora
Mestre Ana Rita Ferreira Patarra
Categoria – Estudante de doutoramento
3º Ciclo em Biologia
Afiliação – Universidade dos Açores

Como citar este trabalho:

Carreiro, A.S. (2014) Avaliação do Potencial *in vitro* de *Halopteris scoparia* (Linnaeus) Sauvageau (1903). Dissertação apresentada à Universidade dos Açores para obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, 64p.

Agradecimentos:

Quero agradecer a todas as pessoas que me apoiaram desde o início da minha jornada no Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, pois sem a vossa ajuda e apoio moral não teria conseguido chegar até onde cheguei.

Pretendo agradecer em primeiro lugar às minhas orientadoras Dra. Ana Isabel Neto e à Dra. Rita Patarra pela sua disponibilidade em me ajudarem em tudo o que foi necessário, contribuindo deste modo para o enriquecimento desta tese. Sem a ajuda de ambas não teria conseguido terminar esta etapa tão importante na minha vida. Agradeço sobretudo à Dra. Rita que, apesar de entrar em licença de maternidade, no final do meu percurso sempre demonstrou disponibilidade para me orientar durante as correções finais.

Agradeço à Anna Lloveras e à Dra. Rita pelo trabalho de campo e de laboratório que desenvolvemos em conjunto, na triagem e seleção do material a utilizar no cultivo e nas pesagens “caricatas” com a balança.

Quero agradecer o Professor Luís Silva pela sua disponibilidade em me auxiliar na interpretação dos resultados estatísticos com o programa SPSS.

Agradeço a todos os colegas do Grupo de Biologia Marinha pelo bom ambiente e espírito de equipa, ao darem palavras de encorajamento durante o trabalho laboratorial, e pela ajuda na recolha de água salgada para os cultivos.

Agradeço a todos os docentes do MBBV pela vossa sapiência e partilha dos conhecimentos, pois graças a essa partilha comecei a nutrir um maior interesse pela área Vegetal da Biologia.

Agradeço à minha família, pai, avós e tios, que me apoiaram durante a reta final, com palavras de encorajamento.

E finalmente quero agradecer às três pessoas mais importantes da minha vida. À minha mãe, que apesar de ter passado uma fase menos boa da sua vida, durante o decorrer deste último ano sempre me apoiou quer a nível físico quer a nível psicológico e me encorajou sempre a avançar ao longo do ano e a nunca desistir. Ao meu irmão, João Pedro, que algumas vezes foi comigo ao campo recolher água para os cultivos e proporcionou momentos de risada com a sua dificuldade em andar na costa, e finalmente ao meu

namorado. A ti Luís, agradeço a ajuda que me deste, especialmente nos momentos menos bons, pois foste o meu maior ombro amigo que me levantou sempre a moral e nunca me deixou desanimar.

Muito obrigada a todos!

Índice

Resumo	iii
Abstract	iv
Lista de Abreviaturas	v
INTRODUÇÃO	1
1. Generalidades sobre as algas	1
2. Algas castanhas (Ochrophyta, Phaeophyceae)	2
2.1. Família Stypocaulaceae	3
2.1.1. Halopteris scoparia	3
3. As Algas Marinhas do Arquipélago dos Açores	4
3.1. Breve caracterização do Arquipélago dos Açores	4
3.2. Ilha de São Miguel	4
3.3. Consumo de algas marinhas nos Açores	5
4. Cultivo de algas marinhas – fatores condicionantes	5
5. OBJETIVOS	7
6. METODOLOGIA	8
6.1. Amostragem	8
6.2. Preparação dos vouchers	9
6.3. Preparação do Material de Laboratório	9
6.4. Preparação do meio de cultivo	10
6.5. Desenvolvimento experimental.....	10
6.6. Tratamento dos dados.....	12
7. RESULTADOS:	14
7.1.Experiências Piloto.	14
7.1.1. Intensidade Luminosa (ExpP1).	14
7.1.2.Efeito de soluções de limpeza prévia (ExpP2).....	16
7.2. Teste de Hipóteses.....	18
7.2.1. Experiência 1	18
7.2.2.Experiência 2.....	23
8. Discussão	26
9. Bibliografia	29

ANEXO I - Preparação das soluções de limpeza prévia e procedimento de limpeza das algas.....	36
ANEXO II - Preparação do meio Von Stosch, das soluções stock correspondentes e da solução stock de vitaminas.....	37
ANEXO III - Experiência Piloto 1: Efeito da intensidade luminosa (IL) no crescimento de <i>H. scoparis</i>.....	39
ANEXO IV - Experiência Piloto 2: Efeito da utilização de três soluções de limpeza prévia na eliminação/redução de epífitos de <i>H. scoparia</i>.....	44
ANEXO V - Experiência de Teste de Hipóteses 1: Efeito da Intensidades Luminosas no crescimento de <i>Halopteris scoparia</i>.....	48
ANEXO VI - Experiência de Teste de Hipóteses 2: Efeito da Densidades de Cultivo no crescimento de <i>Halopteris scoparia</i>.	57
ANEXO VII - Lista de espécies epífitas/endófitas registadas.	64

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo determinar a Taxa de Crescimento da espécie *Halopteris scoparia*, sujeita a diferentes intensidades luminosas e densidades de cultivo e avaliar o seu potencial de crescimento em cultivo. Testou-se o efeito da intensidade luminosa (IL), da limpeza prévia e da densidade de cultivo (DC) no crescimento *in vitro* desta espécie. Verificou-se que a solução de limpeza mais eficaz foi a de Betadine ($63,00 \pm 53,38 \text{ d}^{-1}$) e que a IL de $70 \mu\text{molm}^{-1}$, ($5,77 \pm 11,15 \text{ d}^{-1}$) foi a mais adequada ao crescimento *in vitro*. O melhor crescimento e saúde de *H. scoparia* foi registado na DC de 2,00g ($4,70 \pm 4,22 \text{ d}^{-1}$).

H. scoparia revelou ser uma boa candidata para cultivos *in vitro*. Tendo esta espécie interesse na indústria cosmética, o seu potencial de cultivo poderá vir a ser uma mais-valia para a RAA, pelo que se recomendam estudos posteriores englobando experiências multifatoriais para investigar os múltiplos efeitos da luz, temperatura, densidade de cultivo e condições de nutrientes.

Palavras-chave: *Halopteris scoparia*, Densidade de Cultivo, intensidade luminosa, crescimento *in vitro*, limpeza prévia.

Abstract

This study aimed to determine the growth rate of the species *Halopteris scoparia*, subject to different light intensities and stocking densities and to determine its growth potential in aquaculture. We tested the effect of light intensity (IL), previous cleaning solutions and stocking density (SD) on the *in vitro* growth of this species. It was found that Betadine ($63,00 \pm 53,38 \text{ d}^{-1}$) was the most effective cleaning solution and the IL $70 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($5,77 \pm 11,15 \text{ d}^{-1}$) the most suitable light condition to the *in vitro* growth. The best growth and health of *H. scoparia* was recorded at 2.00g SD ($4,70 \pm 4,22 \text{ d}^{-1}$).

H. scoparia seems to be a good candidate for *in vitro* cultivation. Being a species of interest in the cosmetic industry, its culture potential may be important for the RAA. We therefore recommend further studies encompassing multifactorial experiments to investigate the multiple effects of light, temperature, stocking density and nutrient conditions.

Key-words: *Halopteris scoparia*, Stocking Density, Irradiance, *in vitro* propagation, pre-cleaning.

Lista de Abreviaturas

AMFA – Água do Mar Filtra de Autoclavada.

DC – Densidade de Cultivo

VSE – Meio de Cultivo von Stosch

IL – Intensidade Luminosa

TCR – Taxa de Crescimento Relativo

R – Rendimento

ExpP1 – Experiência Piloto 1

ExpP2 – Experiência Piloto 2

Exp1 – Experiência 1

Exp2 – Experiência 2

INTRODUÇÃO

1. Generalidades sobre as algas

As algas são vegetais sem raízes, ramos e folhas, que possuem clorofila *a* como o pigmento fotossintético primário e não possuem uma camada celular estéril em volta dos órgãos sexuais (Lee, 1989). Contribuem grandemente para a biodiversidade global, com um número de espécies estimado entre os 36000 a mais de 10 milhões (Graham *et al*, 2009a).

As algas variam em tamanho, desde células minúsculas (microalgas) a plantas muito grandes (macroalgas), pertencem a diversas linhagens evolutivas (Graham *et al*, 2009a) e vivem em ambientes aquáticos, mas podem ser encontradas em terra, na neve ou até mesmo no ar (Lee, 1989). São maioritariamente espécies fotossintéticas, sendo os produtores primários que sustentam a vida nos oceanos (Oliveira *et al*, 2002; Graham *et al*, 2009a).

As algas marinhas são uma importante fonte de substâncias antioxidantes naturais (Rocha *et al.*, 2007), as quais possuem várias propriedades biológicas. São igualmente ricas em polissacarídeos, sais minerais e vitaminas, sendo utilizadas na produção de alimentos e suplementos alimentares num valor global que ultrapassa alguns biliões de dólares por ano (Oliveira *et al.*, 2002).

Devido a estas particularidades as algas são recolhidas na natureza e/ou cultivadas para a extração industrial de produtos úteis ao Homem ou para uso direto ou indireto na alimentação do homem e de outras espécies em operações agrícolas e aquícolas.

Tanto nos tempos antigos como nos modernos, os seres humanos colheram perto de 500 espécies de macroalgas, para comida, forragem e extração química. Registos escritos confirmam que os humanos coletaram algas na China por mais de 2000 anos e hoje em dia os chineses colhem cerca de 74 espécies de algas vermelhas, verdes, castanhas e azuis-verdes em 36 géneros (Graham *et al.* 2009b).

Algumas macroalgas, maioritariamente dos géneros *Porphyra*, *Kappaphycus*, *Gracilaria*, *Saccharina*, *Laminaria* e *Undaria*, são cultivadas em operações de aquacultura para uso na alimentação humana ou para extração

de compostos gelificantes. Na China, centenas de milhares de pessoas estão ocupadas em cultivar e colher algas e está estimado que os chineses consomem cerca de 45,359.27 toneladas de algas frescas e secas a cada ano (Graham *et al.*, 2009b).

Com o aumento da procura de produtos derivados de algas, os *stocks* naturais deixaram de satisfazer a necessidade das populações, sendo necessário recorrer ao desenvolvimento das indústrias de cultivo. Atualmente, cerca de 90% da procura do mercado é suprimida pelas algas produzidas em cultivo (McHugh, 2003).

As algas podem também ser usadas como biorremediadores de poluentes em esgotos e nas atividades agrícola e de aquacultura (Graham *et al.*, 2009a). A produção de peixes em aquacultura numa escala intensiva, por exemplo, tem causado muitos problemas ao nível ambiental (Wu, 1995; Naylor *et al.*, 2000). As monoculturas modernas intensivas requerem grandes quantidades de água, alimentos, fertilizantes e químicos e, inevitavelmente, produzem desperdícios consideráveis que exercem enormes pressões nos habitats costeiros (Chopin & Yarish, 1999 in Chung *et al.*, 2002; Black, 2001 in Chung *et al.*, 2002). Os desperdícios produzidos consistem maioritariamente em nitrogénio, fósforo e dióxido de carbono (Chung *et al.*, 2002), produtos que são diretamente recicláveis pelas algas na sua atividade metabólica (Largo, 2005) O uso de macroalgas como agentes purificantes de águas poluídas, reduz de forma evidente o impacto ambiental de esgotos e culturas (Gao & McKinley, 1994).

2. Algas castanhas (Ochrophyta, Phaeophyceae)

As algas castanhas incluem entre 250 a 256 géneros e entre 1500 a 2000 espécies (van den Hoek *et al.*, 1995; Reviere, 2006; Graham *et al.*, 2009c), variando desde filamentos microscópicos até laminárias gigantes com vários metros de comprimento. Algumas Phaeophyceae têm elevado nível de especialização morfológica, compreendendo folhas especializadas, caules, disco basal de fixação e células transportadoras especializadas.

Segundo Reviere (2006) as Phaeophyceae possuem órgãos reprodutores particulares e são as únicas, dentro do grupo das Ochrophyta, que possuem plasmodesmos.

2.1. Família Stypocaulaceae

As algas desta família formam tufos eretos, ramos divididos penalmente e que ocorrem ao longo da parede entre dois segmentos adjacentes. A célula apical é proeminente e dá origem a divisões longitudinais e transversais aos segmentos. As partes mais antigas dos indivíduos são corticais, os propágulos são ausentes e possuem esporângios uniloculares concisos que nascem de forma axilar nos ramos laterais (Lawson & John, 1982). Segundo Gibson (2013) ainda existe muito por investigar relativamente à reprodução sexual e história de vida desta família, bem como dentro da Ordem, mas a autora concluiu que a reprodução sexuada é rara.

2.1.1. *Halopteris scoparia*

Halopteris scoparia (Linnaeus) Sauvageau (1903) (*Ochophyta*, *Phaeophyceae*, *Sphacelariales*) apresenta um tom castanho oliváceo a castanho-escuro e forma tufos eretos, entre os 3 a 13cm de comprimento, que são presos ao substrato por um disco fibroso (Guiry & Guiry, 2014). Os tufos são constituídos por filamentos ramificados de aspeto irregular alternado e penado, os ramos principais possuem organização parenquimatosa e os ramos laterais não têm corticação. Os esporângios, de forma ovoide, terminam numa célula apical (Lawson & John, 1982; Neto, 1997, Neto *et al.*, 2005).

Tem uma distribuição mundial desde a região boreal-antiboreal até aos mares tropicais, encontrando-se também na África Oeste, na Nigéria e nas águas frias e temperadas da Europa (Lawson & John, 1982).

Vários estudos revelaram que o género *Halopteris* tem uma importância para a indústria nutraceutica devido às suas propriedades antibacterianas (Taskin *et al.*, 2007), antifúngicas (Ballesteros *et al.*, 1992), antimicrobianas (Almeida, 2007), antioxidantes (López *et al.*, 2011) e substâncias com propriedades que atuam ao nível da reestruturação da pele do rosto (Gelyma, 2014).

É uma espécie perene, comum no Arquipélago dos Açores, na zona das marés e zona submersa adjacente, sendo mais abundante nesta última. Ocorre frequentemente nas poças litorais, formando densos tufos. No subtidal, a sua biomassa é superior nos meses de primavera e verão (Neto, 1997; Neto, 2000a, b). Forma muitas vezes associações com outras algas

como *Corallina*, *Jania*, *Dictyota*, *Asparagopsis*, *Hypnea* e *Pterocliadiella* (Neto, 2001).

3. As Algas Marinhas do Arquipélago dos Açores

3.1. Breve caracterização do Arquipélago dos Açores

O Arquipélago dos Açores é o resultado da atividade vulcânica associada à junção tripla das placas tectónicas Americana, Eurasiática e Africana (Madeira & Ribeiro, 1990). Encontra-se situado nas coordenadas 37°-40°N e 25°-31°W e inclui nove ilhas vulcânicas e pequenos ilhéus, que estão organizados em três grupos separados (Ocidental, Central e Oriental) Esta localização geográfica confere aos Açores um clima temperado, onde se registam temperaturas médias de 13°C no inverno e 24°C no verão. A humidade relativa média do ar é cerca de 75%. (Instituto Hidrográfico, 2014). As ilhas encontram-se alinhadas com o Rift Médio-Atlântico de forma oblíqua. Todas as ilhas são formadas por rocha vulcânica, maioritariamente basalto, e rodeadas por águas profundas. As costas são pouco protegidas, exceto algumas baías e portos (Madeira & Ribeiro, 1990; Neto, 2000a).

Os Açores são influenciados pelo sistema de circulação oceânica, predominante do Norte Atlântico, que inclui um giro que flui desde o lado norte ao lado oeste (a corrente do Golfo) e do sul para este, com um sistema de corrente ramificado. A Corrente do Golfo transporta de forma eficiente água quente de origens tropicais e equatoriais para as águas mais frias a norte. Este sistema resulta numa elevada salinidade, elevada temperatura e baixo teor em nutrientes, típico dos Açores. A Corrente do Golfo que passa relativamente perto mantém as águas do mar a uma temperatura média entre os 17°C e os 23°C (Instituto Hidrográfico, 2014).

3.2. Ilha de São Miguel

A ilha de São Miguel, com aproximadamente 750km², é a maior do Arquipélago dos Açores. A zona costeira, com aproximadamente 155km de comprimento, é composta maioritariamente por penhascos altos e íngremes, é de difícil acesso por terra e está sujeita a ondulação forte durante todo o ano (Neto *et al.*, 2000).

A ação das ondas é mais evidente na costa norte da ilha, sendo esta a responsável pela elevada erosão costeira que se observa naquele local (Neto, 1997).

3.3. Consumo de algas marinhas nos Açores

Nos Açores, as macroalgas marinhas são utilizadas tradicionalmente na alimentação humana. *Fucus spiralis*, uma alga castanhas conhecida como tremoço-do-mar, é utilizada como petisco; erva-patinha, a alga vermelha do género *Porphyra* é consumida em caldos como sopa, ou frita em forma de omelete e tortas. Outras algas vermelhas como a *Laurencia* e a *Osmundea*, sendo a última conhecida como erva-malagueta, são guardadas em vinagre e consumidas ao longo de todo o ano (Neto *et al.*, 2005).

4. Cultivo de algas marinhas – fatores condicionantes

São vários os fatores que condicionam o cultivo de macroalgas marinhas.

A luz é o fator mais condicionante uma vez que proporciona energia necessária ao metabolismo fotossintético (Enríquez *et al.*, 1994; Salles, 2006). Baixos níveis de irradiância limitam a fotossíntese e uma irradiância elevada causa fotoinibição (Lobban & Harrison, 1997) e favorece o epifitismo (Buschmann *et al.*, 1997).

Outro fator importante é a temperatura sendo que variações bruscas neste parâmetro afetam o crescimento em cultivo (Lobban & Harrison, 1997).

Os nutrientes, nomeadamente os macronutrientes fosfato e nitrato são fundamentais uma vez que são essenciais ao metabolismo fotossintético, podendo ser limitantes em cultivo (Lobban & Harrison, 1997).

A densidade de cultivo é igualmente muito importante em termos de produção de biomassa, já que uma concentração de biomassa muito elevada limita negativamente os outros fatores de crescimento (Pereira *et al.*, 2006). Para que um sistema de cultivo possa operar com a sua eficiência máxima a densidade da biomassa deve manter-se essencialmente constante. Para uma produção máxima, a biomassa do cultivo deve ser exposta à luz, mas de forma intermitente (McLachlan, 1991).

As algas epífitas, oportunistas em termos de ciclo de vida, são muito comuns e podem causar graves prejuízos a um determinado cultivo (Buschmann & Gomez, 1993).

5. OBJETIVOS

Este projeto surge na continuidade do estudo de Silva (2009) que avaliou o potencial do uso de algas marinhas em sistemas de aquacultura integrada multitrófica, e teve como objetivo avaliar o efeito da intensidade luminosa e densidade de cultivo no crescimento *in vitro* de *Halopteris scoparia*.

6. METODOLOGIA

A informação disponível sobre cultivo de *Halopteris scoparia* é reduzida e pouco se sabe sobre a influência dos fatores abióticos na sua produção *in vitro*. Nesse sentido houve necessidade de testar o efeito da intensidade luminosa (IL) no crescimento *in vitro* desta espécie antes de poder avançar com o teste das hipóteses em estudo. Efetuaram-se dois grupos de experiências.

Numa primeira fase, efetuaram-se duas experiências piloto. Primeiro testaram-se as IL 70, 150 e 260 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (ExpP1), e depois (ExpP2), testaram-se diferentes soluções de limpeza prévia na inibição do crescimento de epífitos (ver Anexo I), nomeadamente solução Betadine a 10%, Lixívia comercial a 2% e água do mar filtrada e autoclavada (AMFA).

A segunda fase experimental compreendeu o teste das hipóteses em estudo. Numa primeira experiência (Exp1) testaram-se as IL 30, 70 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, definidas tendo por base os resultados da ExpP1, e numa segunda experiência (Exp2) testou-se o efeito da densidade de cultivo (DC) no crescimento de *H. scoparia*, comparando as densidades: 0,075; 0,50; 1,00; 2,00 e 3,00 g.

6.1. Amostragem

Procedeu-se à recolha de *H. scoparia* em quatro locais da zona intertidal rochosa da ilha de São Miguel (37° 40' N e 25° 31' W), nomeadamente no Pontão de Santa Clara, nas Areias do Borrvalho (Livramento), no Cerco da Caloura e em Água d'Alto (Figura 1), entre novembro de 2013 e abril de 2014. A seleção dos dias de recolha respeitou o horário da baixa-mar, de acordo com as tabelas apresentadas *on-line* pelo Instituto Hidrográfico (2014), e o estado do mar, de acordo com as tabelas *on-line* disponibilizadas pelo WindGuru (2014).

As algas foram recolhidas na zona intertidal durante a baixa-mar, com o auxílio de um formão, coletando os espécimes pela base.



Figura 1. Locais onde se procedeu à recolha das algas: (A) Água d'Alto, (B) Areias do Borralho, (C) Cerco da Caloura e (D) Pontão do Farol de Santa Clara.

A recolha de água salgada, usada na preparação do meio de cultivo, decorreu na zona do Forno da Cal, na Freguesia de São Roque. Utilizou-se um densitómetro (CHINCAN, modelo ORD/FG 202/212) para medir a salinidade da água antes da sua recolha. Sempre que a salinidade era inferior a 34‰, não se efetuava a recolha.

6.2. Preparação dos vouchers

Prepararam-se vouchers para um exemplar de cada amostragem, os quais foram armazenados no Herbário Ruy Teles Palhinha (AZB) do Departamento de Biologia da Universidade dos Açores (AZB: SMG-13-76, SMG-13-91, SMG-14-02, SMG-14-09, SMG-14-10, SMG-14-62).

6.3. Preparação do Material de Laboratório

O material de vidro e de metal foi esterilizado numa estufa (VMR, modelo VENTI-Line 135), a 150°C durante duas horas. O restante material (PVC, pincéis, papel absorvente e filtro de Buckner) foi autoclavado (2 atm, 120°C, 20 min., Uniclave, modelo AJC).

6.4. Preparação do meio de cultivo

O meio de cultivo von Stosch (VSE, ver Anexo II) foi preparado de acordo com o protocolo elaborado por Guiry & Cunningham 1984 (*in* Andersen, 2005), adaptado às condições locais.

6.5. Desenvolvimento experimental

Para todas as experiências fixaram-se, como condições de cultivo, os fatores fotoperíodo em 12 horas dia/ 12 horas noite (12hD|12hN) e temperatura em 18°C. Utilizaram-se três câmaras de cultivo (Sanyo, modelo MLR-351), que foram previamente limpas com água destilada. Os cultivos foram realizados em balões Erlenmeyer de um litro, devidamente identificados com o nome da espécie, número do replicado, data de início de cada cultivo e sigla da experiência em curso. Os balões foram submetidos a arejamento suave e constante efetuado a partir da base através de tubos de aquário, ligados a pipetas Pasteur (Figura 2). Utilizaram-se 4 replicados (balões Erlenmeyer) por cada condição a testar.

As algas foram mergulhadas e lavadas com água corrente e depois lavadas em AMFA. Foram, de seguida, triadas, rejeitando-se as que apresentavam indícios de epifitismo. Recorrendo a uma lupa binocular (Leica, modelo 2500 ATC) cortaram-se, com o auxílio de um bisturi, ápices saudáveis de *H. scoparia* com o tamanho de aproximadamente 1cm.



Figura 2. Esquema de montagem dos balões Erlenmeyer.

Após esta fase inicial, o procedimento experimental variou de acordo com as experiências.

A ExpP1, para teste de IL (70, 150 e 260 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), decorreu entre 27 de Novembro e 13 de Dezembro de 2013, perfazendo um total de três semanas, sendo a primeira de aclimação. Os ápices foram distribuídos aleatoriamente por caixas de Petri (oito ápices por cada), pesados e fotografados. A pesagem foi efetuada com o auxílio de uma balança analítica (Kern, modelo ALJ220-5DNM), após se ter retirado o excesso de água de cada ápice com papel absorvente, autoclavado. As fotografias foram efetuadas com a máquina (Sony, modelo DSLR- α 230), colocando sob cada caixa de Petri uma quadrícula de papel milimétrico. Após estes procedimentos, os ápices foram colocados nos balões de cultivo, devidamente identificados, os quais foram aclimatados às condições de cultivo durante uma semana. Utilizou-se um volume inicial de VSE de 400 mL, que foi sendo progressivamente aumentado até ao volume máximo permitido pelos balões. Efetuou-se a substituição total do meio de cultivo uma vez por semana, altura em que se efetuavam igualmente pesagens e fotografias dos ápices para controle do crescimento. O crescimento dos ápices foi calculado a partir de medições efetuadas em fotografias (em cm) com o auxílio do programa Axio Vision LE v4.8.2 32-bit da Carl Zeiss.

A ExpP2, para teste do método mais eficiente de limpeza prévia das algas (Betadine a 10%, Lixívia comercial a 2% e AMFA) decorreu entre 11 de Janeiro e 3 de Fevereiro de 2014, perfazendo um total de quatro semanas. Para cada solução, mergulharam-se os ápices das algas durante 30 segundos após o que foram posteriormente lavados três vezes com AMFA. Os procedimentos foram semelhantes aos da ExpP1 mas aqui não se efetuou a pesagem dos ápices. Na determinação do número de epífitos utilizou-se o programa ImageJ v1.48 32-bit Java para contagem das presenças de epífitos sobre os ápices de *H. scoparia*. Colocou-se aleatoriamente uma grelha sobre cada fotografia com uma distância entre cada intersecção de 150 pixels². Em cada intersecção, sobre cada ápice, foi registada a ausência/presença de epífitos.

A Exp 1 para teste do efeito da intensidade luminosa no crescimento de *H. scoparia* decorreu entre 26 de fevereiro e 16 de abril de 2014 perfazendo um

total de seis semanas. Testaram-se as IL 30, 70 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os procedimentos foram semelhantes aos da ExpP1. Adicionalmente mediu-se o pH no início e no fim de cada mudança de meio de cultivo, com um medidor de pH (Hanna Instruments, modelo Waterproof Family HI98127). Registaram-se três valores de pH para cada replicado.

A Exp 2 para teste do efeito da densidade de cultivo no crescimento de *H. scoparia* decorreu entre 24 de abril e 20 de maio de 2014 perfazendo um total de sete semanas. Para uma IL constante e de 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, testaram-se as DC de 0,075; 0,50; 1,00; 2,00 e 3,00 g litro^{-1} . Os ápices, perfazendo o peso necessário para cada experiência foram colocados nos balões de cultivo devidamente identificados, os quais foram aclimatados às condições de cultivo durante uma semana. Utilizou-se um volume constante de VSE de 600 mL, efetuando-se a renovação do meio a cada três/quatro dias. A cada renovação do meio efetuou-se a medição do pH seguindo a metodologia descrita para a Exp 1. Semanalmente as algas foram pesadas seguindo-se o procedimento explicado acima para as outras experiências. Sempre que se registou crescimento, o valor foi registado e retificada a DC do cultivo para o valor inicial.

6.6. Tratamento dos dados

Os dados foram organizados em tabelas de formato Microsoft Office Excel e foram calculados as médias e os desvios-padrão do peso, comprimento, taxas de crescimento relativo (TCR) e rendimento (R) (de acordo com Abreu *et al*, 2011), segundo:

$$\text{TCR (\% dia}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Ln}(\text{PF}_f) - \text{Ln}(\text{PF}_i)}{T * 100}$$

onde PF_f é o peso fresco final, PF_i o peso fresco inicial e T o tempo decorrido em dias de cultura.

$$R = \text{PF}_f - \text{PF}_i$$

onde PF_i é o peso inicial e PF_f o peso final

Para testar as diferenças das hipóteses colocadas realizou-se o teste estatístico ANOVA, com o auxílio do programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) v17.0. Utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov (Chakravarti & Laha, 1967) para testar a normalidade das variâncias e o teste Levene (Levene, 1960) para testar a homogeneidade das variâncias. O teste de Tukey (Tukey, 1953) foi utilizado após a ANOVA para avaliar as diferenças entre as médias para as condições testadas.

7. RESULTADOS:

7.1. Experiências Piloto.

7.1.1. Intensidade Luminosa (ExpP1).

Na Experiência Piloto 1 (ExpP1), no teste do efeito de diferentes Intensidades Luminosas (IL) no crescimento de *Halopteris scoparia*, os resultados demonstraram que houve diferenças significativas no peso global das algas no final da experiência ($F= 5,696; P=0,005 < 0,05$, Tabela IIIa, Anexo III), com um máximo de peso fresco obtido na IL de $260 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Figura 3A). Obtiveram-se igualmente diferenças significativas entre as IL de 70 e $260 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($p= 0,003 < 0,05$) na segunda semana (Tabela IIIb, Anexo III).

Os resultados dos comprimentos dos ápices revelaram resultados semelhantes ao peso, com diferenças significativas a nível global ($F= 9,931$ $p=0,000 < 0,05$, Tabela IIIa, Anexo III), entre as IL de 70 e $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($p= 0,000 < 0,05$) e entre as IL de 70 e $260 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($p=0,022 < 0,05$) na primeira semana de cultivo (Tabela IIIb, Anexo III) (Figura 3B).

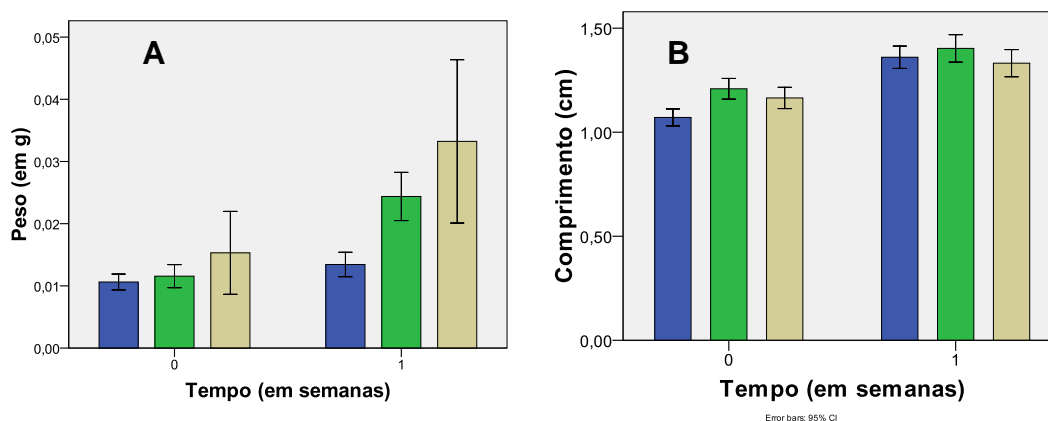


Figura 3. Efeito da Intensidade Luminosa (■) 70, (■) 150, (■) $260 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ no crescimento de *H. scoparia* a 18°C e fotoperíodo 12HD/12HN. (A) Peso (em gramas). (B) Comprimento (cm) (média \pm DP, $n=4$).

Relativamente à Taxa de Crescimento Relativo (TCR) e ao Rendimento (R) do peso de *H. scoparia*, não se verificaram diferenças significativas ($F= 2,344$; $p= 0,152 > 0,05$ e $F= 1,106$; $p= 0,372 > 0,05$) (Tabela IIIc, Anexo III). Verificou-se um valor superior na IL de $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Figura 4A). No entanto a quantidade de epífitos foi superior na IL de $260 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Figura 4B).

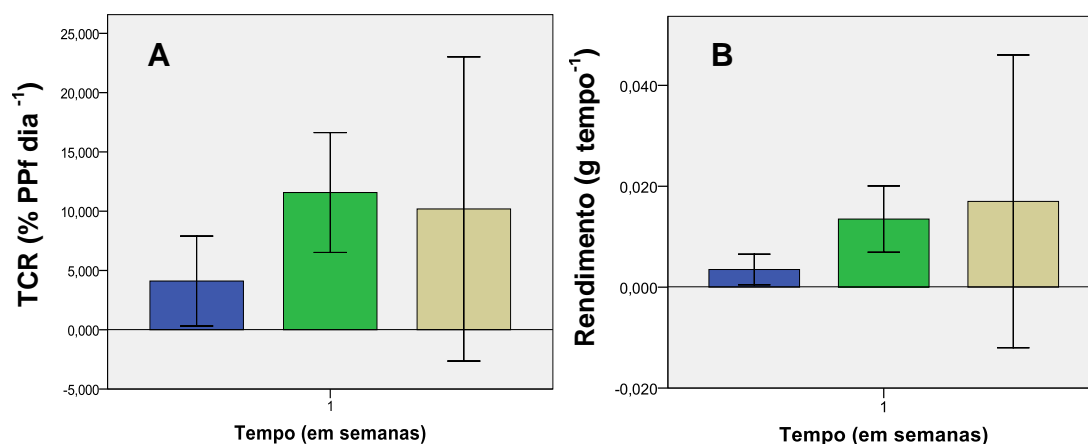


Figura 4. Efeito da Intensidade Luminosa (■) 70, (■) 150, (■) 260 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, no peso de *H. scoparia* a 18°C e fotoperíodo 12HD/12HN. (A) Taxa de Crescimento Relativo (% PPF dia⁻¹); (B) Rendimento (em grama tempo⁻¹), (média \pm DP, n=4).

Verificou-se um maior aumento de comprimento na IL de 70 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Figura 5A) e diferenças significativas globais na TCR e R do comprimento de *H. scoparia* ($F= 8,114$, $p= 0,010 < 0,05$ e $F= 6,142$, $p= 0,021 > 0,05$, Tabela IIIc, Anexo III). Na TCR verificou-se com o teste de Tukey que haviam diferenças significativas entre as IL de 70 e de 150 e 260 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($p= 0,022 < 0,05$ e $p=0,014 < 0,05$) mas não entre 150 e 260 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($p= 0,951 > 0,05$, Tabela III d, Anexo III). No rendimento do comprimento não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre a IL de 70 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($p= 0,056 > 0,05$, Tabela III d, Anexo III), mas existiram diferenças estatisticamente significativas entre a IL de 70 e 260 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($p= 0,023 < 0,05$, Tabela III d, Anexo III). Entre as IL de 150 e 260 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ não houve diferenças estatisticamente significativas ($p= 0,843 > 0,05$) (Tabela III d, Anexo III) (Figura 5B). De referir que estas análises foram efetuadas após a verificação da normalidade e homogeneidade dos dados (Tabelas III e-f, Anexo III).

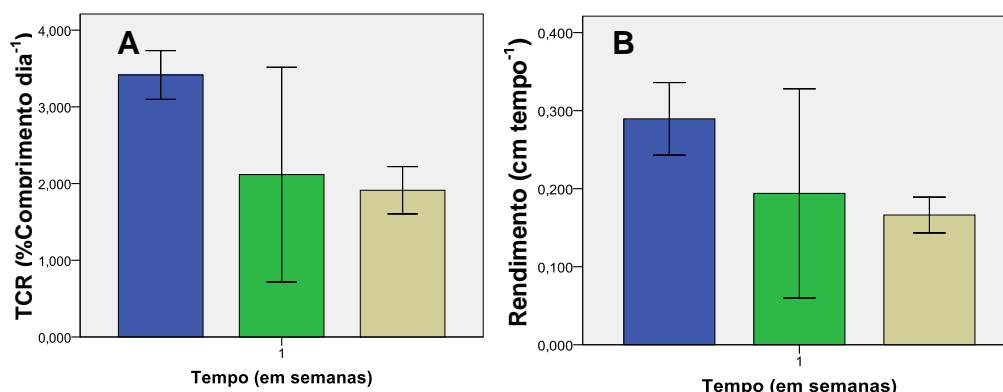


Figura 5. Efeito da Intensidade Luminosa (■) 70, (■) 150, (■) 260 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, no comprimento de *H. scoparia* a 18°C e 12HD/12HN. (A) Taxa de Crescimento Relativo (% Comprimento dia⁻¹); (B) Rendimento (em centímetros tempo⁻¹) (média \pm DP, n=2).

Identificaram-se diferentes espécies de epífitos/endófitos durante a experiência em todas as IL (Anexo VII).

7.1.2.Efeito de soluções de limpeza prévia (ExpP2)

Encontraram-se diferenças estatisticamente significativas na presença de epífitos nas três semanas de cultivo entre as várias soluções de limpeza ($F=4,685$; $p=0,040 < 0,05$) ($F= 8,225$, $p= 0,009 < 0,05$) e ($F= 34,026$, $p= 0,000 < 0,05$) (Tabela IVa, Anexo IV) (Figura 6). Estas diferenças foram significativas em todo o tempo de cultivo entre a solução de Betadine e AMFA ($p= 0,037 < 0,05$; $p= 0,007 < 0,05$ e $p= 0,000 < 0,05$, Tabela IVb, Anexo IV). Para as restantes combinações, as diferenças significativas verificaram-se entre AMFA e Lixívia somente na ultima semana ($p= 0,000 < 0,05$, Tabela IVb, Anexo IV), mas entre as soluções Betadine e Lixívia não se verificaram diferenças significativas ao longo da experiência ($p= 0,147 > 0,05$; $p= 0,249 > 0,05$ e $p= 0,498 > 0,05$, Tabela IVb, Anexo IV). De referir que estas análises foram efetuadas após a verificação da normalidade e homogeneidade dos dados (Tabela IVc-d, Anexo IV).

Uma vez que na solução de Betadine ($63,00 \pm 53,38 \text{ d}^{-1}$) o número de presenças de epífitos/endófitos foi menor que nas soluções de Lixívia ($108,00 \pm 77,11 \text{ d}^{-1}$) e AMFA ($272,00 \pm 277,22 \text{ d}^{-1}$), escolheu-se a solução de Betadine como solução de limpeza prévia para os ensaios posteriores.

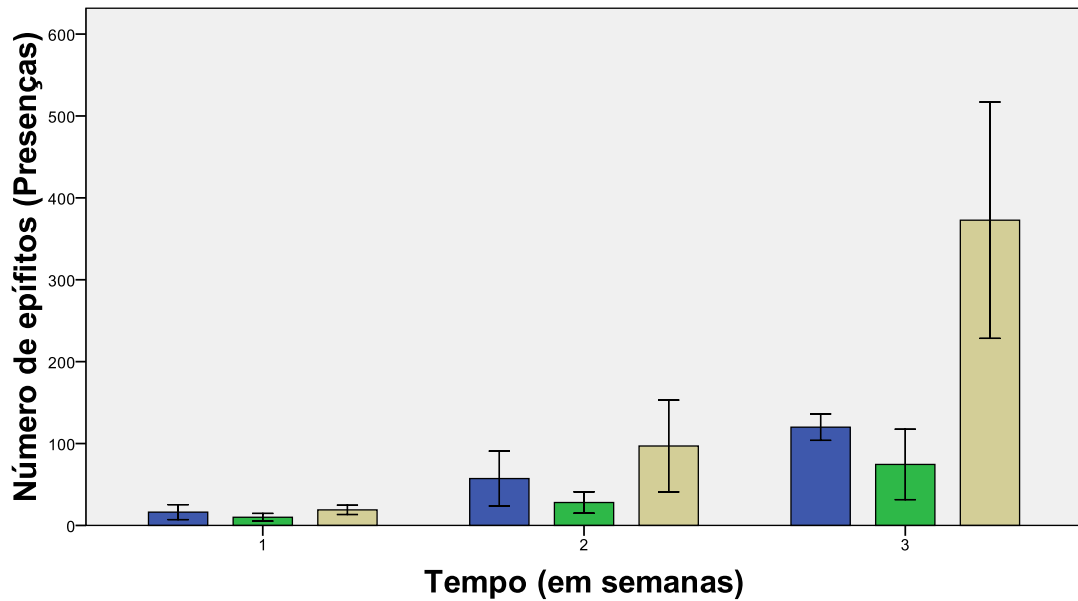


Figura 6. Presença total de epífitos/endófitos registada entre as soluções de limpeza, AMFA (■) Betadine (■) e Lixívia (■) (média±DP, n=4).

No crescimento em comprimento de *H. scoparia*, após verificação da normalidade dos dados (Tabela IVe, Anexo IV), não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre as três soluções de limpeza prévia para as três semanas de cultivo (Tabelas IVf, Anexo IV; Figura 7).

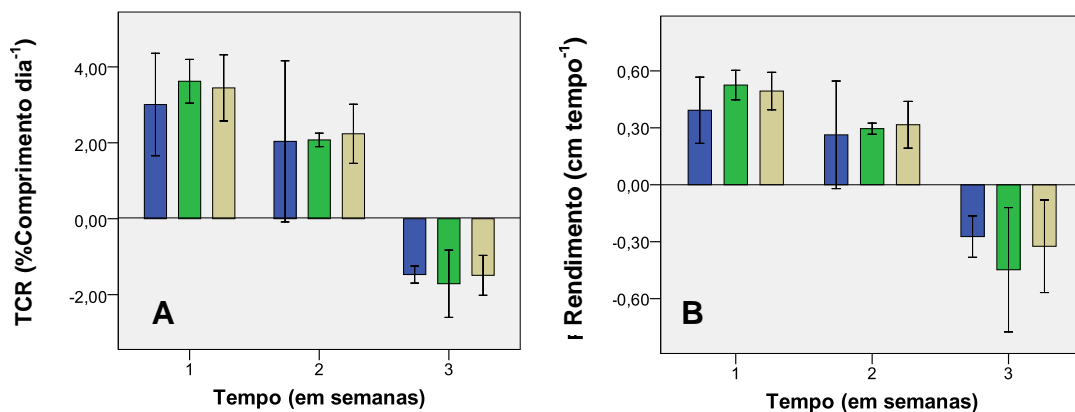


Figura 7. Efeito das soluções de limpeza prévia (■) Betadine, (■) Lixívia comercial e (■) AMFA no crescimento de *H. scoparia* cultivada a 18°C, Intensidade Luminosa de 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 12D/12N . (A) Taxa de Crescimento Relativo (% Comprimento dia⁻¹); (B) Rendimento (em centímetros tempo⁻¹) (média ± DP, n=4).

7.2. Teste de Hipóteses.

7.2.1. Experiência 1

No geral, os resultados da Exp1 demonstraram que houve um aumento no peso dos ápices de *H. scoparia* para todas as IL, excepto na semana 6 em que diminuiu nas IL de 30 e 70 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Figura 8A).

No que se refere ao comprimento, houve um aumento inicial, seguido de uma certa estabilidade (semanas 3 a 5) após o que se verificou novo aumento sobretudo nas IL de 30 e 70 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (figura 8B).

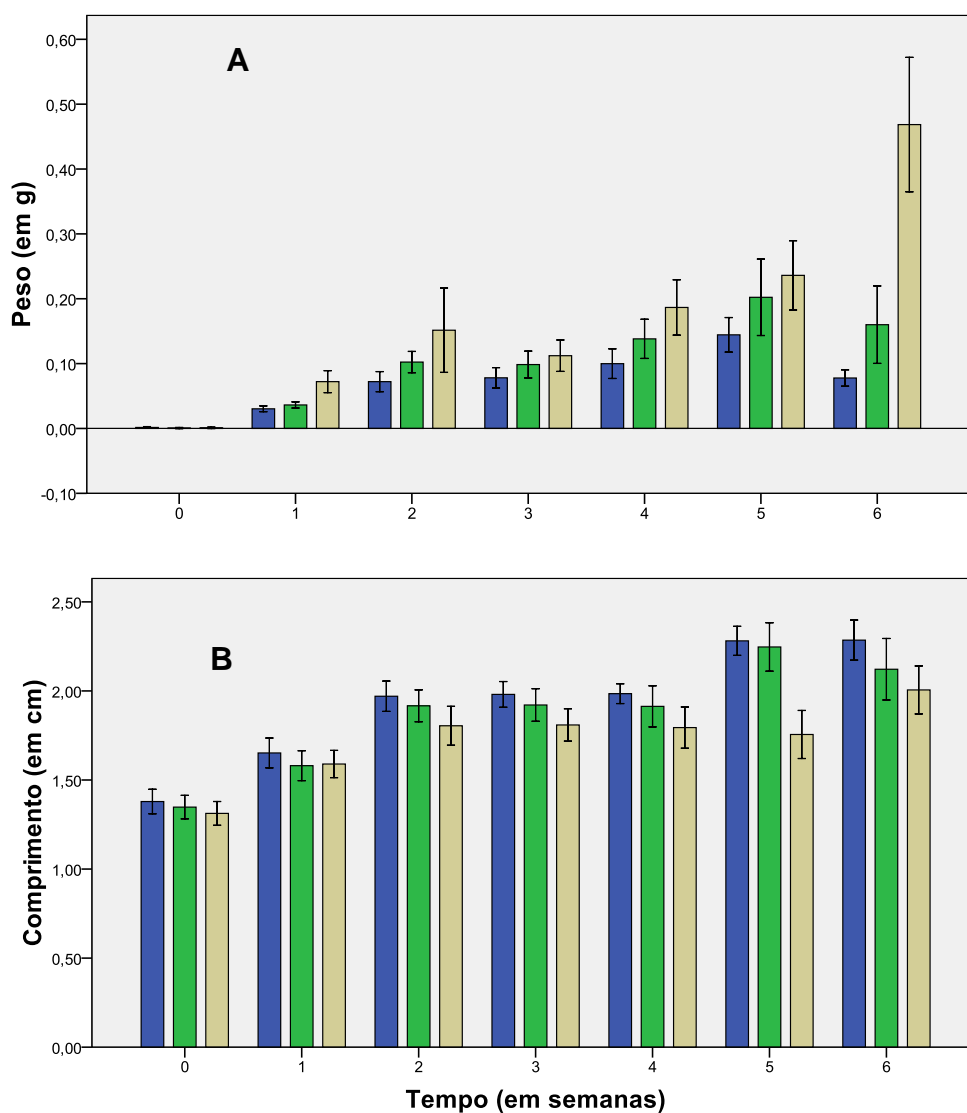


Figura 8 Efeito da Intensidades Luminosas (■) 30, (■) 70, (■) 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, no crescimento de *H. scoparia* a 18°C e fotoperíodo 12HD/12HN. (A) Peso (em gramas). (B) Comprimento (em centímetros) (média \pm DP, n=4).

O incremento semanal do pH foi gradual e no final os valores mantinham-se dentro dos 8,1 (Figura 9).

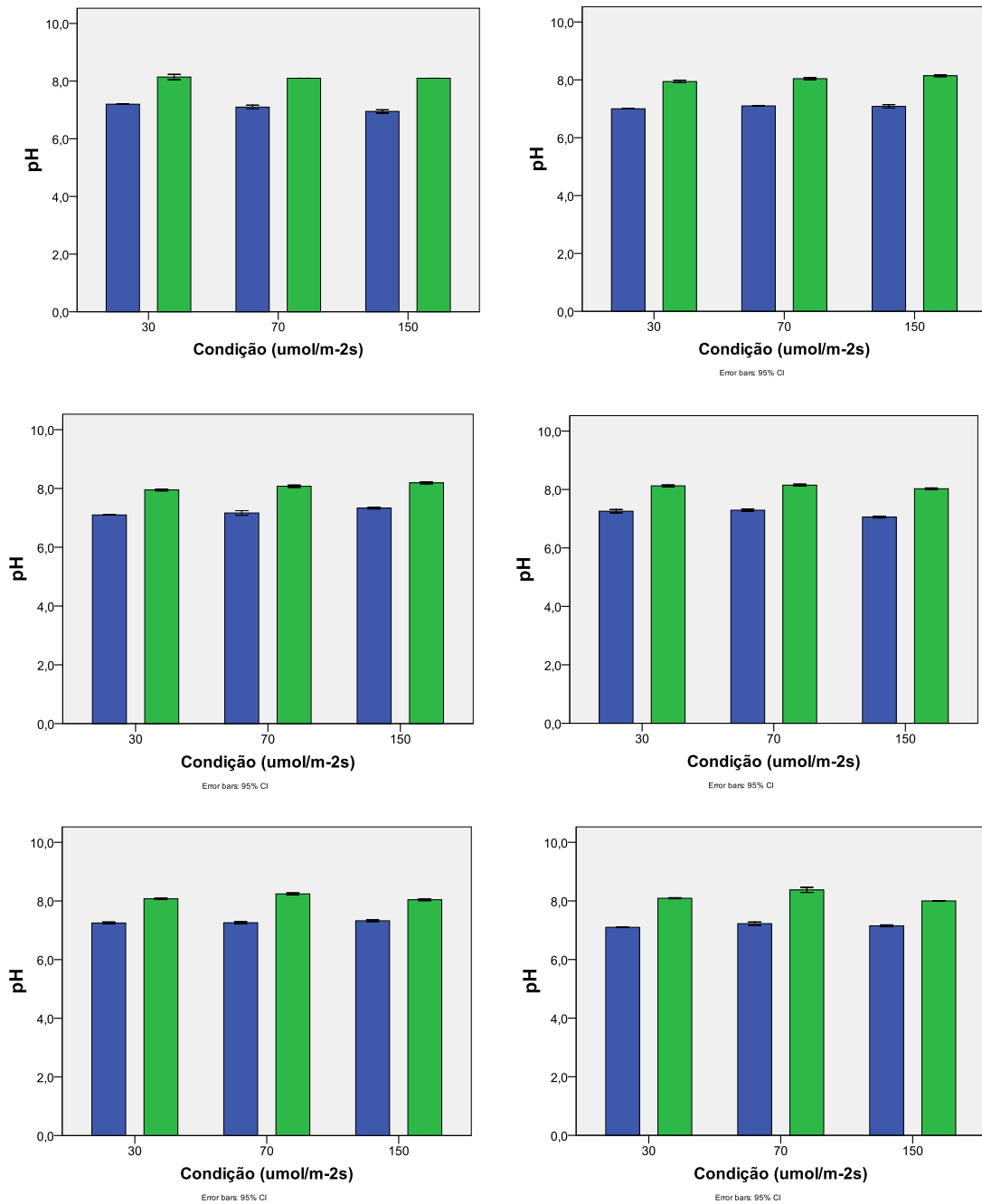


Figura 9. Variação dos valores do pH nas diferentes Intensidades Luminosas antes (■) e após (■) a mudança do meio durante as seis semanas de cultivo de *H. scoparia* cultivada a 18°C e 12D/12N (média ± DP, n=4).

Após a verificação da normalidade dos dados (Tabela Va, Anexo V) registaram-se diferenças estatisticamente significativas na TCR e rendimento

do peso global para a primeira ($F= 37,424$; $p= 0,000 <0,05$), segunda ($F= 4,706$; $p= 0,040 <0,05$) e sexta ($F= 23,308$; $p= 0,000 <0,05$) semanas (Tabela Vb, Anexo V).

Para a TCR do peso essas diferenças registaram-se na primeira e sexta semanas para as IL de 30 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($p= 0,000 <0,05$ e $p= 0,000 <0,05$; Tabela Vc, Anexo V). Entre a IL de 70 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ encontraram-se diferenças estatisticamente significativas na primeira semana ($p= 0,000 <0,05$; Tabela Vc, Anexo V). As diferenças entre a IL de 70 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ registaram-se na primeira e sexta semana ($p= 0,000 <0,05$ e $p= 0,002 <0,05$; Tabela Vc, Anexo V) (Figura 10).

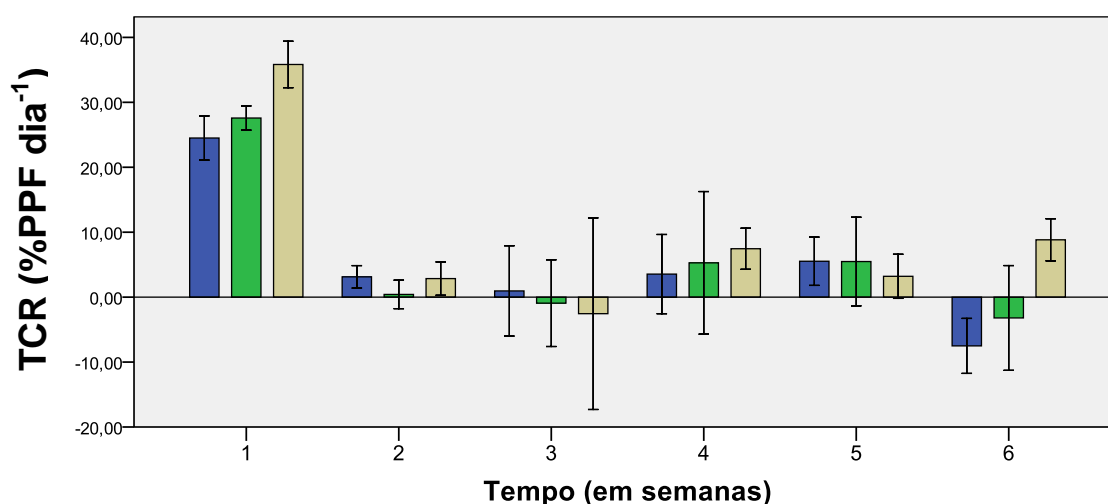


Figura 10. Efeito da Intensidade Luminosa (■) 30, (■) 70 e (■) 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ na Taxa de Crescimento Relativa (%PPF dia^{-1}) de *H. scoparia* cultivada a 18°C e fotoperíodo 12D/12N (unidades, média \pm DP, $n=4$).

Para o rendimento global do peso essas diferenças registaram-se na sexta semana ($F= 48,111$ $p= 0,000 <0,05$; Tabela Vb, Anexo V). Estas diferenças surgiram entre as IL de 30 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($p= 0,000 <0,05$) e entre as IL de 70 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($p= 0,000 <0,05$; Tabela Vc, Anexo V) (Figura 11).

As IL de 30 e 70 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ apresentaram um perfil semelhante até à última semana de cultivo, mas não se verificaram diferenças significativas entre si durante o cultivo (Tabela Vc, Anexo V).

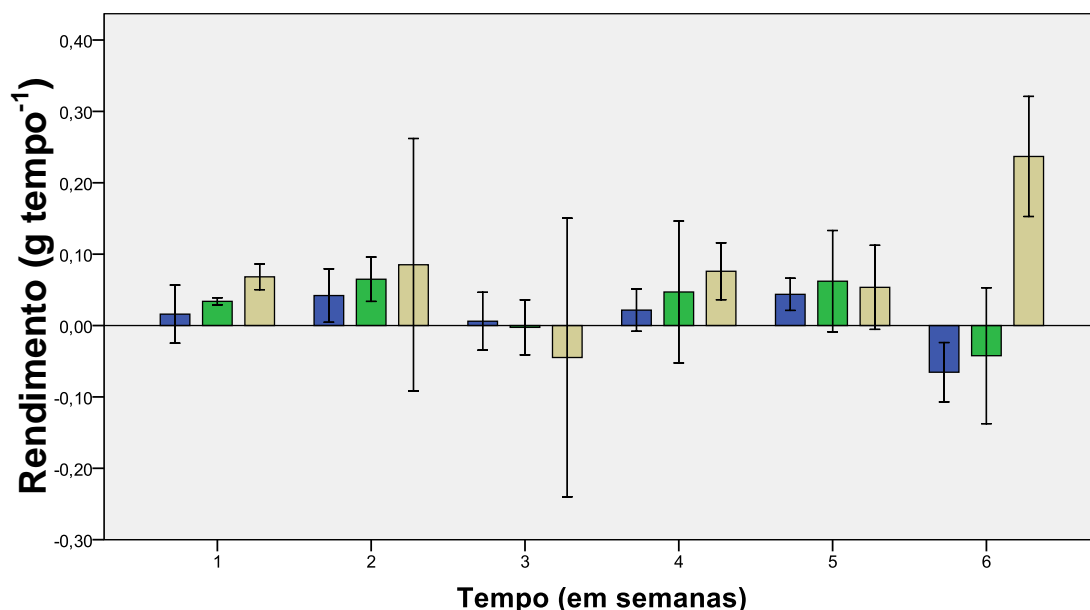


Figura 11. Efeito da Intensidade Luminosa (■) 30, (■) 70 e (■) 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, no comprimento de *H. scoparia* a 18°C e 12HD/12HN. Rendimento (em centímetros tempo⁻¹) (média \pm DP, n= 4).

Após verificação da normalidade dos dados (Tabela Vd, Anexo V) verificou-se que o crescimento em comprimento mais elevado de *H. scoparia* ocorreu na segunda semana (Figura 12A), tendo-se registado diferenças estatisticamente significativas na TCR global na sexta semana ($F= 4,885$; $p= 0,041 < 0,05$; Tabela Ve, Anexo V) e rendimento do comprimento na terceira, quinta e sexta semanas ($F= 10,368$, $p= 0,006 < 0,05$; $F= 6,478$, $p= 0,021$ e $F= 5,573$; $p= 0,030$, Tabela Vd, Anexo V) para as várias IL.

Para a TCR do comprimento registaram-se diferenças estatisticamente significativas entre as intensidades de 30 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($p= 0,038 < 0,05$; Tabela Vf, Anexo V). Outras diferenças significativas registaram-se no rendimento na terceira semana entre a IL de 30 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($p= 0,006 < 0,05$, Tabela Vf, Anexo V) e nas terceira, quinta e sexta semanas entre as IL de 70 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($p= 0,037 < 0,05$; $p= 0,027 < 0,05$ e $p= 0,027 < 0,05$, respectivamente; Tabela Vf, Anexo V).

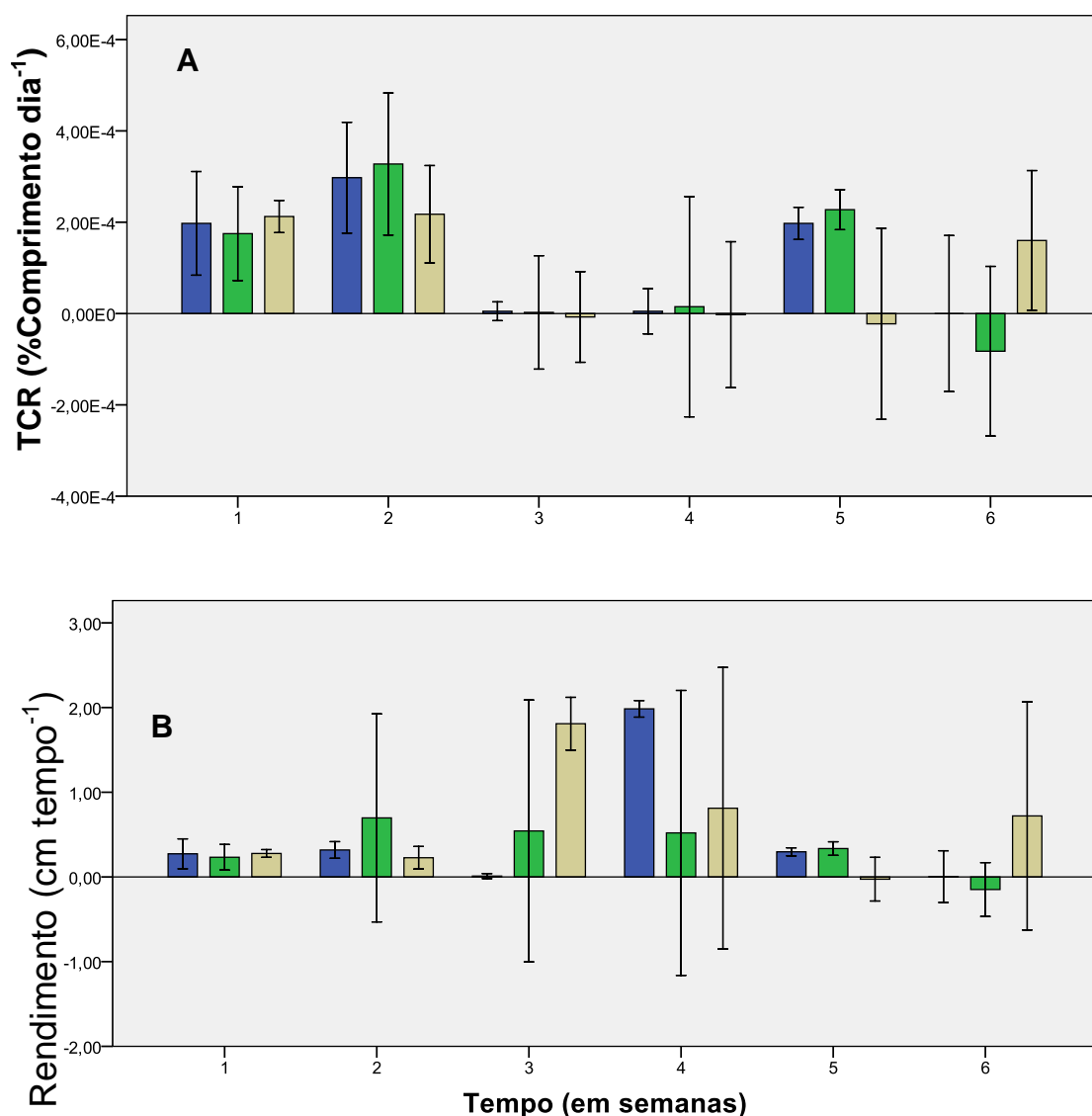


Figura 12. Efeito da Intensidade Luminosa (■) 30, (■) 70 e (■) 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, no comprimento de *H. scoparia* a 18°C e fotoperíodo 12HD/12HN. (A) Taxa de Crescimento Relativo (% Comprimento dia⁻¹). (B) Rendimento (em centímetros tempo⁻¹) (média \pm DP, n=4).

Uma vez que a melhor quantidade de biomassa e comprimento foram registados nas IL de 70 ($5,77 \pm 11,15 \text{ d}^{-1}$) e 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($9,27 \pm 13,23 \text{ d}^{-1}$), optou-se por utilizar a IL de 70 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para as experiências posteriores uma vez que se registou menor proliferação de epífitos em relação à IL de 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

7.2.2.Experiência 2.

Registaram-se diferenças estatisticamente significativas nos valores globais da TCR na terceira semana ($F= 3,425$, $p= 0,035 <0,05$; Tabela VIa, Anexo VI) e Rendimento do peso na primeira e segunda semana ($F= 41,192$, $p= 0,000 <0,05$ e $F= 12,661$, $p= 0,000 <0,05$, respetivamente; Tabela VIa, Anexo VI) entre as Densidade de Cultivo (DC) (Figura 13), após verificação da normalidade e homogeneidade dos dados (Tabelas VIb-c, Anexo VI). A comparação entre cada par de densidades revelou que, para a Taxa de Crescimento Relativo, as diferenças encontradas só eram significativas entre as DC de 0,075g e 3,00g ($p= 0,022 <0,05$, Tabela VIId, Anexo VI). Para o Rendimento, as diferenças encontradas eram significativas na primeira semana entre as DC de 0,075 e 0,5, 1,0, 2,0 e 3,0g ($p= 0,000 <0,05$; Tabela VIId, Anexo VI) e entre 0,5 e 2,0 e 3,0g ($p= 0,010$ e $p= 0,003 <0,05$; Tabela VIId, Anexo VI). Na segunda semana as diferenças encontravam-se entre as DC de 0,075 e 2,0 e 3,0g ($p= 0,002 <0,05$ e $p= 0,000 <0,05$; Tabela VIId, Anexo VI), entre as DC de 0,5 e 2,0 e 3,0g ($p= 0,017 <0,05$ e $p= 0,001 <0,05$; Tabela VIId, Anexo VI) e entre 1,0 e 3,0g ($p= 0,019 <0,05$; Tabela VIId, Anexo VI).

A maior produção de biomassa verificou-se na DC de 0,075g ($5,62\pm 3,46$ d^{-1}) seguida pelas DC de 2,00g ($4,46\pm 4,22$ d^{-1}) e 3,00g ($2,90\pm 5,69$ d^{-1}) (Figura 13).

Decidiu-se deste modo que a DC de 2,00g seria a mais apropriada para estudos futuros uma vez que os ápices utilizados nesta DC apresentavam melhor aspecto em relação aos utilizados na DC de 3,00g, o desvio padrão obtido na DC de 2,00g foi inferior ao obtido na DC de 3,00g (Figura 13B) e ocorreu menor proliferação de epífitos/endófitos em relação à DC de 0,075g.



Figura 13. Efeito da Densidades de Cultivo no crescimento de *H. scoparia* cultivada a 18°C, IL 70 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 12D/12N. (A) Taxa de Crescimento Relativo (%PPF dia⁻¹). (B)Rendimento (g por tempo⁻¹) (média \pm DP, n=4).

O aumento semanal do pH ocorreu de forma gradual, e manteve-se dentro dos valores de 8,1 (Figura 14).

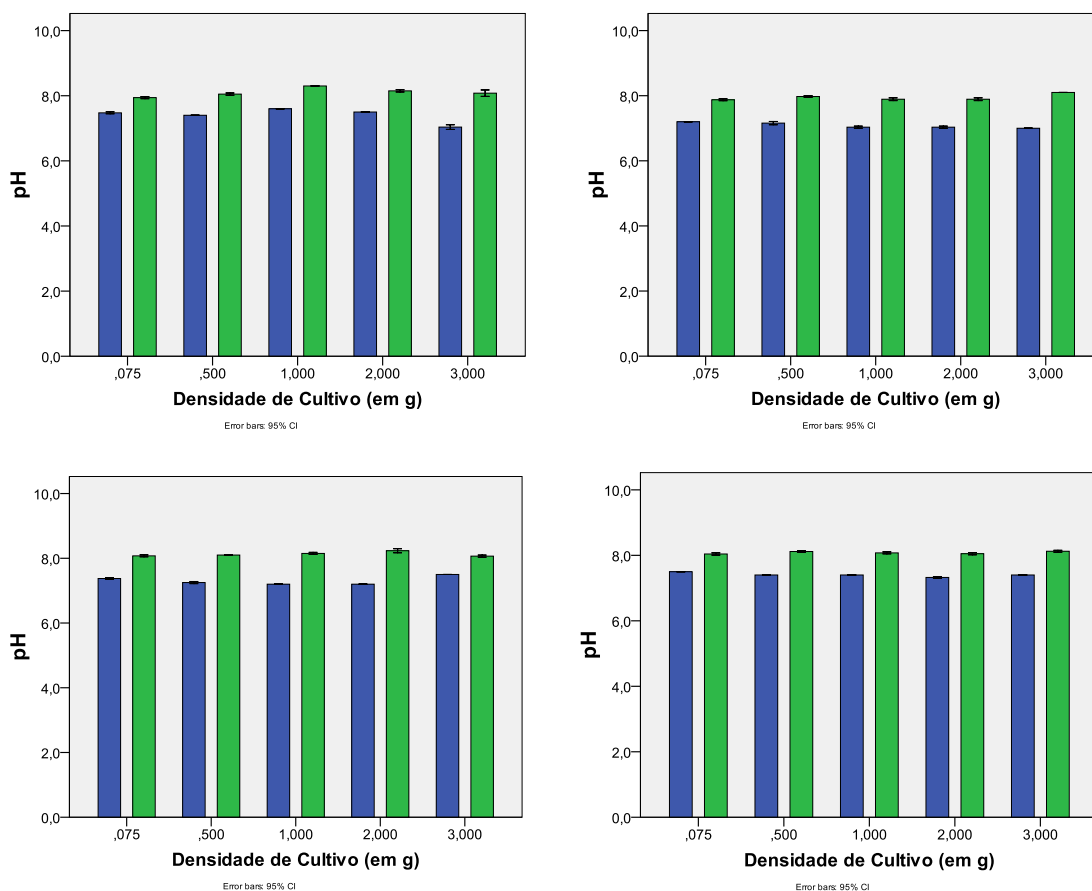


Figura 14. Variação dos valores do pH nas diferentes Densidade de Cultivo antes (■) e após (■) a mudança do meio de *H. scoparia* cultivada a 18°C, IL 70 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 12D/12N (média \pm DP, n=4).

8. Discussão

Este foi o primeiro trabalho de cultivo *in vitro* com *Halopteris scoparia* nos Açores. A mesma espécie, mas com exemplares provenientes da costa continental portuguesa, tinha sido anteriormente trabalhada em cultura por Silva (2009) que obteve resultados distintos do do presente estudo. A principal diferença foi ao nível da concentração de epífitos. Silva (2009) no seu trabalho com a mesma espécie referiu que a cultura se manteve pura e sem presença de epífitos. Contudo, no presente estudo a concentração de epífitos foi muito elevada e provavelmente a responsável pelas diferenças significativas observadas no crescimento em peso entre as diferentes intensidades luminosas na Experiência Piloto 1 (ExpP1), com uma taxa de epífitos muito elevada nas maiores intensidades luminosas. A proliferação de epífitos é reportada na literatura para muitos trabalhos de cultivo e está relacionada com a intensidade luminosa (Buschmann *et al.*, 1997), temperaturas altas e baixa densidade de algas (Westermeier *et al.*, 1993, Friedlander & Levy, 1995). Os táxones de epífitos registados no presente estudo (ver Anexo VII) foram similares aos reportados por Westermeier *et al.* (1993) para o cultivo de *Gelidium chilensis* (Montagne) e aos encontrados por Lloveras (2014) numa experiência paralela à do presente estudo com a espécie *Pterocladia capillacea* (S.G.Gmelin) Santelices & Hommersand (1997).. Para contornar o problema, à semelhança de outros autores (Seone-Camba, 1997; Sousa-Pinto *et al.*, 1999) optou-se por submeter as algas a uma limpeza prévia, tendo a solução de Betadine revelado ser o método mais eficiente. Curiosamente, este resultado contraria o de Weinberger *et al.* (1997) que concluiu que uma elevada concentração de Iodopovidona (Betadine) provocava o branqueamento dos ápices. Apesar de eficiente, a Betanide não eliminou por completo o crescimento de epífitos, como foi observado na terceira semana de cultivo na ExpP2 (cf. Figura 7).

De entre os epífitos encontrados, os taxa mais frequentes foram as Diatomáceas, seguidas de *Anotrichium tenue* e *Bangia sp.* (ver Tabela do Anexo VII), resultado diferente do reportado por Wilmotte *et al.* (1988) que indicou serem as Bangiophyceae os principais epífitos de *Halopteris scoparia*.

No presente estudo (Exp1) a IL de 70 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ revelou ser a mais adequada para o cultivo *in vitro* de *H. scoparia* pois foi aquela em se observou bom crescimento, menor quantidade de epífitos e melhor aspecto dos ápices algais. Silva (2009), contudo, reportou ser a IL de 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aquela em que obteve melhores resultados de crescimento.

Para além da luz outros fatores importantes no cultivo de macroalgas são a temperatura (Novaczeck, 1989) e a densidade de cultivo (DC) (Pereira *et al.*, 2006), esta ultima contribuindo ainda para a redução de epífitos (Kuschel and Buschmann, 1991). No presente estudo a temperatura foi um fator fixo, não se podendo concluir sobre os seus efeitos no crescimento de *H. scoparia*. Contudo, a experiência com a DC, fator muito importante em culturas unialgais como foi a deste estudo (Pereira *et al.*, 2006), revelou um melhor crescimento e robustez de *H. scoparia* nas DC de 0,075g, 2,00g e 3,00g, sendo a de 2,00g a que apresentou uma melhor relação entre a taxa de crescimento relativo e o rendimento. Também a este nível os resultados não são coincidentes com os de Silva (2009) que obteve melhores resultados na DC de 0,1g pf L⁻¹.

Os valores do pH nas duas últimas experiências mantiveram-se dentro dos 8,1. Estes resultados são importantes uma vez que valores de pH inferiores a 6,0 provocam um desequilíbrio entre o Dióxido de Carbono (CO₂) e o ião Hidrogenocarbonato (HCO₃⁻), fazendo com que o CO₂ aumente e o HCO₃⁻ diminua, e ocorra a volatilização do ião amónio (NH₄⁺) (Lobban & Harrison, 1997; Hargreaves, 1998; Carvalho, 2010). A elevada alcalinidade do meio faz com que os metais vestigiais, como o ferro, formem hidróxidos de metais pouco solúveis (Bidwell & McLachlan, 1985), diminuindo desta forma a biodisponibilidade de nutrientes essenciais, necessários à manutenção a longo prazo e à produtividade das algas (Craigie & Shacklock, 1989).

Apesar dos problemas com o elevado nível de epifitismo, *Halopteris scoparia* revelou ser uma boa candidata para cultivos *in vitro*. Apresentou boas taxas de crescimento numa variada gama de IL, desde que se tivesse controlo nos epífitos e na densidade do cultivo. As grandes diferenças observadas em relação ao trabalho de Silva (2009) para a mesma espécie sugerem a necessidade de estudos posteriores envolvendo um desenho multifatorial que permita investigar os múltiplos efeitos da luz, temperatura, densidade de cultivo, condições de nutrientes e temperatura. Isto é tão mais necessário

quando se sabe que esta espécie tem interesse na indústria cosmética (www.gelyma.com), pelo que o seu potencial de cultivo poderá vir a ser uma mais-valia para a RAA.

9. Bibliografia

Abreu, M.H., Pereira, R., Buschmann, A.H., Sousa-Pinto, I. & Yarish, C., (2009) **Nitrogen uptake responses of *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss under combined and single addition of nitrate and ammonium** *J. Exp Mar Biol Ecol*, 407:190-199.

Almeida, A.R., (2007) *Guia de Campo das Algas do Intertidal da Praia da Vigia*. Universidade do Algarve, Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente.

Anderson, R.A., (2005) *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press, pp 518.

Ballesteros, E., Martin, D. & Uriz, M.J., (1992) **Biological Activity of Extracts from Some Mediterranean Macrophytes** *Botanica Marina* Vol. 35, pp. 481 - 485.

Bidwell, R.G.S. & McLachlan, J. (1985), **Carbon nutrition of seaweeds: photosynthesis, photorespiration and respiration.** *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 86:15-46.

Buschmann, A.H. & Gómez, P., (1993) **Interaction mechanisms between *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta) and epiphytes**, In: Chapman A.R.O., Brown M-Y., Lahaye, M. (eds), Fourteenth International Seaweed Symposium, Developments in Hydrobiology 85, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Reprinted from *Hydrobiologia* 260/262: 345:352.

Buschmann, A.H., Brigatine, F. & Retamales, C.A. (1997) **Intertidal cultivation of *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta) in southern Chile: long term invertebrate abundance patterns**, *Aquaculture* 156: 269-278.

Carvalho, M.C., Hayashizaki, K.I. & Ogawa, H. (2010) **Effect of pH on the carbon stable isotope fractionation in photosynthesis by the kelp *Undaria pinnatifida***. *Coastal Marine Science* 34(1): 135-139.

Chakravarti, I.M. & Laha, R. (1967), *Handbook of Methods of Applied Statistics, Volume I*, John Wiley and Sons, pp. 392-394,.

Chung, I.K., Kang, Y.H., Yarish, C., Kraemer, P. & Lee, A.J. (2002), **Application of seaweed cultivation to the bioremediation of nutrient-rich effluent**. *Algae*, 17(3): 1-10.

Craigie, J.S. & Shacklock, P.F. (1989), **Culture of Irish moss**. In Bogen, A. D. (Ed.) *Cold-Water Aquaculture in Atlantic Canada*. Canadian Institute for Research on Regional Development, University of Moncton, Moncton, NB, pp. 241-270.

Enríquez, S., Agustí, S. & Duarte C.M., (1994) **Light absorption by marine macrophytes** *Oecologia*, 98:121-129.

Friedlander, M & Levy, I. (1995) **Cultivation of *Gracilaria* in outdoor tanks and ponds**. *J. of Appl. Phycol*, 7: 315-32.

Gao, K., & McKinley, R., (1994) **Use of macroalgae for marine biomass production and CO₂ remediation: A review**. *J. of Appl. Phycol*, 6: 45-60.

Gelyma (2014) - Principes actifs marins de qualité pour la cosmétique www.gelyma.com. Acedido entre Julho e Agosto de 2014.

Gibson, M. (2013) **Reproduction in the Sphacelariales: sex is a rare occurrence**. *Botanica Serbica*, 37 (1): 21-30.

Graham, L.E., Graham, J.M. & Wilcox, L.W. (2009a) **Algae, Chapter One: Introduction to the algae**, 2nd Ed. Pearson Education Inc., Pearson Benjamin Cummings, 1301 Sansome St, San Francisco, CA 94111.

Graham, L.E., Graham, J.M. & Wilcox, L.W. (2009b), **Algae, Chapter Four: Technological Applications of the Algae**, 2nd Ed. Pearson Education Inc., Pearson Benjamin Cummings, 1301 Sansome St, San Francisco, CA 94111. Pp 67.-77.

Graham, L.E., Graham, J.M. & Wilcox, L.W. (2009c) **Algae, Chapter Fourteen: Photosynthetic Stramenopiles III Xanthophyceans, Phaeophyceans, and their Close Relatives** 2nd Ed. Pearson Education Inc., Pearson Benjamin Cummings, 1301 Sansome St, San Francisco, CA 94111.

Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2014). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on outubro.

Hargreaves, J.A. (1998) **Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds**. *Aquaculture* 166: 181-212.

Instituto Hidrográfico (2014) Previsão de Marés. <http://www.hidrografico.pt/previsao-mares.php>. Acedido entre Novembro 2013 e Abril 2014.

Kuschel, F.A. & Buschmann, A.H. (1991) **Abundance, effects and management of epiphytism in intertidal cultures Gracilaria (Rhodophyta) in southern Chile**. *Aquaculture* 92: 7-19.

Largo, D.B. (2005) **Mighty seaweeds in integrated multi-trophic aquaculture (IMTA): A biofiltration system for mitigating inorganic waste and carbon dioxide in philipine context**. University of San Carlos, Cebu City.

Lawson, G.W. & John, D.M. (1982) **The Marine Algae and Coastal Environment of Tropical West Africa**, Strauss & Cramer GmbH, 6945 Hirschberg 2, Germany, pp 455.

Lee, R.E. (1989) ***Phycology*** 2nd Ed. Press Syndicate of the University of Cambridge, The Pitt Building, Trumpington Street, Cambridge CB2 1RP, 40 West 20th Street, New York, NY 10011-4211, USA,.

Levene, H. (1960) **Robust tests for equality of variances.** In ***Contributions to Probability and Statistics*** (I. Olkin, ed.) 278–292. Stanford Univ. Press, Palo Alto, CA. MR0120709.

Lloveras A.A. (2014) The influence of light and stocking density on the growth and yield of *Pterocladia capillacea* (S.G.Gmelin) Santelices & Hommersand on in vitro cultures. Master thesis, Universitat de Barcelona, 25pp.

Lobban, C.S. & Harrison, P.J. (1997) ***Seaweed ecology and physiology***, ix, 366p. Cambridge University Press.

López, A., Milagros, R., Riviero, A. & Tangil, M.S. (2011) **The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts,** *Food Chemistry* 125: 1104–1109.

Madeira, J. & Ribeiro, A. (1990) **Geodynamic models for the azores triple junction: A contribution from tectonics.** *Tectonophysics*(184): 405-415.

McHugh, D.J. (2003) **A guide to the seaweed industry.** *Fisheries Technical Paper* FAO, 441.

McLachlan, J.L., (1991) **General principles of on-shore cultivation of seaweeds: effects of light on production.** *Hydrobiologia* 221: 125-135.

Naylor, R.L., Goldberg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C.M., Clay, J., Folke, C., Luchenco, J., Mooney, H. & Troell, M. (2000) **Effects of aquaculture on world fish supplies.** *Nature*, 405.

Neto, A.I. (1997) **Studies on algal communities of São Miguel island.** *PhD thesis* Department of Biology. University dos Azores: pp: 349.

Neto, A.I. (2000a) **Ecology and dynamics of two intertidal algal communities on the littoral of the island of São Miguel (Azores).** *Hydrobiologia*, 432: 135-147.

Neto, A.I. (2000b) **Observations on the biology and ecology of selected macroalgae from the littoral of São Miguel (Azores).** *Botanica Marina*, 43: 483-498.

Neto, A.I. (2001) **Macroalgal species diversity and biomass of subtidal communities of São Miguel (Azores).** *Helgoland Marine Research*, 55(2): 101-111. DOI 10.1007/s101520100074.

Neto, A.I., Tittley, L. & Farnham, W.F. (2000) **Structure and zonation of algal communities in the bay of São Vicente (São Miguel, Azores).** *Arquipélago. Life and Marine Sciences Supplements*, II(Part A): 63-69.

Neto A.I., Tittley I. & Raposeiro P. (2005) *Flora Marinha do Litoral dos Açores [Rocky Shore Marine Flora of the Azores]*. 156pp. ISBN 972-99884-0-4. Secretaria Regional do Ambiente e do Mar, Açores, 1500 exemplares, <http://hdl.handle.net/10400.3/1677>.

Novaczek, I, Breeman, M A, Van den Hoek, C: **Thermal tolerance of *Stypocaulon scoparium* (Phaeophyta, Sphacelariales) from eastern and western shores of the North Atlantic Ocean.** *Helgoländer Meeresunter*, 43: 183-193, (1989).

Oliveira, E.C., Horta, P.A., Amancio, C.E. & Sant'Anna, C.L. (2002) ***Algas e Angiospérmicas Marinhas Bênticas do Litoral Brasileiros: Diversidade, Exploração e Conservação.*** Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Rua do Matão, Trav. 14, N. 321. Cidade Universitária. 05508-900 S. Paulo, SP.

Pereira, R., Yarish, C. & Sousa-Pinto, I. (2006) **The influence of stocking density, light and temperature on the growth, production and nutrient removal capacity of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta)** *Aquaculture* 252 66–78.

Reviere, B. (2006) **Biologia e Filogenia das Algas, Capítulo 10: *Divisão Ochorophyta***, Artmed Editora S. A., Jerônimo de Ornelas, 670 – Santana, 90040 – 340 – Porto Alegre RS, São Paulo, Brasil.

Rocha, F.D., Pereira, R.C., Kaplan, M.A.C. & Teixeira, V.L. (2007) **Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(4): 631-639.

Salles, J. P. (2006) **Potencial de cultivo de *Gracilaria cornea* (Rhodophyta) em módulos submersos afastados da costa**, *Dissertação de Pós-Graduação em Aquicultura*, Universidade Federal de Santa Catarina, 33pp.

Seone-Camba, J.A. (1997) ***Gelidium sesquipedale* (Clem) Thuret Cultivation in Galicia (Spain)** *Lagasalia* 19(1-2): 179-186.

Silva, B.L. (2009) **Estudos do cultivo de algas vermelhas e castanhas em laboratório para aplicação em sistemas de Aquicultura Integrada Multitrófica** *Dissertação de Mestrado em Ciências do Mar – Recursos Marinhos* Universidade do Porto, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar.

Sousa-Pinto, I., Murano, E., Coelho, S., Felga, A. & Pereira, R. (1999) **The effect of light on growth and agar content of *Gelidium pulchellum* (Gelidiaceae, Rhodophyta) in culture** *Hydrobiologia* 398/399: 329-338.

Taskin, E., Ozturk, M., Taskin, E. & Kurt, O. (2007) **Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey)** *African J. of Biotech.* Vol. 6 (24), pp. 2746-2751.

Tukey, J.W. (1953) **The problem of multiple comparisons**. Unpublished manuscript. *In The Collected Works of John W. Tukey VIII. Multiple Comparisons: 1948–1983* 1–300. Chapman and Hall, New York.

van den Hoek, C., Mann, D.G. & Jahns, H.M. (1995) ***Algae: An introduction to phycology***, Cambridge University Press, United Kingdom.

Weinberger, F., Hope, H.G. & Friedlander, M. (1997) **Bacterial induction and inhibition of a fast necrotic response in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta)** *J. of Appl. Phycol.* **9**: 277–285.

Westermeier, R., Gómez, I. & Riviera, P. (1993) **Suspended Farming of *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta, Gigartinales) at Cariquilda River, Maullín, Chile**. *Aquaculture*, 113 (1993) 215-229.

Wilmotte, A, Goffart, A, Demoulin, V. (1988) **Studies of Marine Epiphytic Algae, Calvi, Corsica. I. Determination of Minimal Sampling Areas for Microscopic Algal Epiphytes** *Br. phycol.* 3 1988, 23:251-258

WindGuru (2014) http://www.windguru.cz/pt/index.php?sc=289&sty=m_menu.
Acedido entre Novembro 2013 e Abril 2014.

Wu, R.S.S. (1995) **The environmental impact of marine fish culture: Towards a sustainable future**. *Marine pollution bulletin*, 31(4-12): 159-166.

ANEXO I - Preparação das soluções de limpeza prévia e procedimento de limpeza das algas.

Preparação das soluções de limpeza prévia de macroalgas (Betadine a 10%, Lixívia comercial a 2% e água do mar filtrada e autoclavada (AMFA)), Tabela la.

Tabela la. Procedimento da preparação das soluções de limpeza.

Solução de limpeza	Preparação
AMFA	Filtrou-se com filtro... a água do mar com filtro Buckner para frasco de vidro apropriado o qual foi de seguida submetido a autoclavagem.
Betadine 10%	Diluiu-se 200mL de Betadine em 1800mL de AMFA. Agitou-se e armazenou-se de refrigerada a ...°C..
Lixívia Comercial 2%	Diluiu-se cerca de 2,75mL de lixívia comercial em 1997,5mL de AMFA. Agitou-se vigorosamente e guardou-se refrigerada a ...°C.

ANEXO II - Preparação do meio Von Stosch, das soluções stock correspondentes e da solução stock de vitaminas.

Preparação do meio von Stosch de acordo com Guiry & Cunningham 1984 (*in* Andersen, 2005) (Tabela IIa) e das soluções *stock* (Tabela IIb-c).

Tabela IIa. Procedimento da preparação do meio von Stosch adaptado às condições locais.

	Para cada 2000ml de meio
1	Filtrou-se 1940 mL água mar (utilizou-se a sigla NW, <i>natural sea water</i>) através de filtro de 1,2 µm.
2	Corrigiu-se a salinidade para 34‰ com a adição de água destilada: 36‰ – 120mL; 38‰ – 150mL ; 40‰ – 220mL.
3	Juntou-se 2,88 ml de 1N HCl e 0,24 g de NaHCO ₃ .
4	Corrigiu-se o volume da garrafa para 1880 mL;
5	Autoclavou-se as garrafas. Após saírem da autoclave e arrefecerem um pouco, guardou-se as garrafas 24 h no frigorífico, para não precipitar;
6	Introduziu-se assepticamente 20 ml de cada solução stock* (nas garrafas autoclavadas, pela ordem da Tabela IIa.
7	Guardou-se o meio de cultivo refrigerado.

Tabela IIb. Preparação das soluções Stock de 1 a 5.

	Reagente	Stock Solution (g·L⁻¹ dH₂O)	Stock Solution (500ml)
1	Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O	10,75	5,375
2	NaNO ₃	42,52	21,26
3	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,28	0,14
4	MnCl ₂ · 4H ₂ O	1,96	0,98
5	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	3,72	1,86
6	solução stock de vitaminas	** Tabela IIb	** Tabela IIb

Tabela IIc. Preparação da solução stock de vitaminas.

	950 ml
1	Em 950 ml água H ₂ O destilada adicionou-se 1 mL de Biotina, 1mL de Vitamina B12, e 200 mg de tiamina.
2	Filtrou-se assepticamente através de um filtro de 0,2 µm.
3	Distribuiu-se aproximadamente 70ml de solução stock por frascos de plástico estéreis e congelou-se a -5°C.

Com o auxílio de uma pipeta de 25mL, introduziram-se assepticamente 20mL de cada solução stock pela ordem apresentada na Tabela IIa.

ANEXO III - Experiência Piloto 1: Efeito da intensidade luminosa (IL) no crescimento de *H. scoparis*.

Tabela IIIa. Tabela ANOVA (com um fator) para teste das diferenças significativas no peso global e comprimento global das algas na ExpP1 para as três IL (dados brutos).

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Peso_Semana1	Between Groups	,000	2	,000	1,582	,211
	Within Groups	,012	93	,000		
	Total	,012	95			
Peso_Semana2	Between Groups	,006	2	,003	5,696	,005
	Within Groups	,050	95	,001		
	Total	,056	97			
Comprimento_Semana1	Between Groups	,339	2	,170	9,931	,000
	Within Groups	1,588	93	,017		
	Total	1,927	95			
Comprimento_Semana2	Between Groups	,084	2	,042	1,381	,256
	Within Groups	2,878	95	,030		
	Total	2,962	97			

Tabela IIIb. Teste de Tukey para averiguação das diferenças significativas entre as três intensidades luminosas.

Dependent Variable	(J)	(I) IL	IL	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		Interpretação dos resultados
							Lower Bound	Upper Bound	
Peso_Semana 1	70	150	150	-,00067	,00280	,969	-,0074	,0060	Não existem diferenças entre as três intensidades luminosas.
			260	-,00455	,00276	,232	-,0111	,0020	
	150	70	70	,00067	,00280	,969	-,0060	,0074	
			260	-,00387	,00278	,349	-,0105	,0028	
	260	70	70	,00455	,00276	,232	-,0020	,0111	
150			,00387	,00278	,349	-,0028	,0105		
Peso_Semana 2	70	150	150	-,01004	,00579	,198	-,0238	,0038	Existem diferenças entre a IL de 70 e 260 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Não existem diferenças entre as IL de 70 e 150 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ e entre 150 e 260 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$.
			260	-,01898*	,00562	,003	-,0324	-,0056	
	150	70	70	,01004	,00579	,198	-,0038	,0238	
			260	-,00893	,00567	,261	-,0224	,0046	
	260	70	70	,01898*	,00562	,003	,0056	,0324	
150			,00893	,00567	,261	-,0046	,0224		
Comprimento_Semana1	70	150	150	-,14551*	,03293	,000	-,2239	-,0671	Existem diferenças entre as IL de 70 e de 150 e 260 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Não existem diferenças entre as IL de 150 e 260 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$.
			260	-,08785*	,03242	,022	-,1651	-,0106	
	150	70	70	,14551*	,03293	,000	,0671	,2239	
			260	,05766	,03268	,187	-,0202	,1355	
	260	70	70	,08785*	,03242	,022	,0106	,1651	
150			-,05766	,03268	,187	-,1355	,0202		
Comprimento_Semana2	70	150	150	-,04356	,04386	,583	-,1480	,0609	Não existem diferenças entre as três intensidades luminosas.
			260	,02746	,04257	,796	-,0739	,1288	
	150	70	70	,04356	,04386	,583	-,0609	,1480	
			260	,07101	,04293	,228	-,0312	,1732	
	260	70	70	-,02746	,04257	,796	-,1288	,0739	
150			-,07101	,04293	,228	-,1732	,0312		

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Tabela IIIc. Tabela ANOVA (com um fator) para teste das diferenças significativas na Taxa de Crescimento Relativo (TCR) e Rendimento (R) do peso e comprimento dos ápices.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TCR_P	Between Groups	126,156	2	63,078	2,344	,152
	Within Groups	242,229	9	26,914		
	Total	368,385	11			
R_P	Between Groups	,007	2	,004	1,106	,372
	Within Groups	,030	9	,003		
	Total	,038	11			
TCR_C	Between Groups	,158	2	,079	8,114	,010
	Within Groups	,087	9	,010		
	Total	,245	11			
R_C	Between Groups	,132	2	,066	6,148	,021
	Within Groups	,096	9	,011		
	Total	,228	11			

Tabela III d. Teste de Tukey para averiguação de diferenças significativas na Taxa de Crescimento Relativo (TCR) e Rendimento (R) do peso e comprimento das algas na ExpP1.

Dependent Variable (I) IL (J) IL	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		Interpretação dos Resultados	
				Lower Bound	Upper Bound		
TCR_C	70 150	,231*	,06966720	,022	,037	,426	Existem diferenças entre as IL de 70 e de 150 e 260 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Não existem diferenças entre as IL de 150 e 260 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$.
	260	,253*	,06966720	,014	,058	,447	
	150 70	-,232*	,06966720	,022	-,426	-,037	
	260	,021	,06966720	,951	-,1737	,216	
	260 70	-,253*	,06966720	,014	-,447	-,058	
	150	-,021	,06966720	,951	-,216	,173	
R_C	70 150	,197	,07314571	,056	-,006	,4027	Existem diferenças entre as IL de 70 e de 260 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Não existem diferenças entre as IL de 70 e de 150 e 260 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ nem entre 150 e 260 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$.
	260	,240*	,07314571	,023	,036	,444	
	150 70	-,199	,07314571	,056	-,403	,005	
	260	,041	,07314571	,843	-,163	,245	
	260 70	-,240*	,07314571	,023	-,444	-,036	
	150	-,041	,07314571	,843	-,245	,163	

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Tabela III e. Teste de Normalidade para as variáveis Taxa de Crescimento e Rendimento do peso e comprimento da alga, efetuado previamente à ANOVA.

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
TCR_Peso	,125	12	,200*	,977	12	,968
R_Peso	,151	12	,200*	,969	12	,901
TCR_Cm	,242	12	,051	,838	12	,026
R_Cm	,258	12	,026	,865	12	,056

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Tabela IIIf. Teste de Levene para a Homogeneidade das Variâncias da Taxa de Crescimento e Rendimento do peso e comprimento da alga, efetuado previamente à ANOVA.

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
TCR_Peso	1,407	2	9	,294
R_Peso	2,802	2	9	,113
TCR_Cm	3,864	2	9	,061
R_Cm	3,560	2	9	,073

ANEXO IV - Experiência Piloto 2: Efeito da utilização de três soluções de limpeza prévia na eliminação/redução de epífitos de *H. scoparia*.

Tabela IVa. Tabela ANOVA (com um fator) para teste das diferenças significativas na presença de epífitos entre as três soluções de limpeza prévia.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Semana_1	Between Groups	16884,500	2	8442,250	4,685	,040
	Within Groups	16217,750	9	1801,972		
	Total	33102,250	11			
Semana _2	Between Groups	959204,167	2	479602,083	8,255	,009
	Within Groups	522894,500	9	58099,389		
	Total	1482098,667	11			
Semana _3	Between Groups	2,063E7	2	1,031E7	34,026	,000
	Within Groups	2727712,750	9	303079,194		
	Total	2,335E7	11			

Tabela IVb. Teste Tukey para averiguação das diferenças significativas na presença de epífitos entre as três soluções de limpeza prévia.

Dependent Variable	(I) Tratamento	(J) Tratamento	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		Resultados da interpretação
						Lower Bound	Upper Bound	
Presence1	Lixívia	Betadine	62,750	30,016	,147	-21,06	146,56	A Lixívia não apresentou diferenças significativas com a Betadine nem com AMFA. A Betadine apresentou diferenças significativas com a AMFA.
		AMFA	-26,750	30,016	,659	-110,56	57,06	
	Betadine	Lixívia	-62,750	30,016	,147	-146,56	21,06	
		AMFA	-89,500*	30,016	,037	-173,31	-5,69	
	AMFA	Lixívia	26,750	30,016	,659	-57,06	110,56	
		Betadine	89,500*	30,016	,037	5,69	173,31	
Presence2	Lixívia	Betadine	293,750	170,440	,249	-182,12	769,62	A Lixívia não apresentou diferenças significativas com as soluções de Betadine e AMFA. Surgiram diferenças significativas entre a Betadine e a AMFA. Não houve diferenças entre Betadine e Lixívia e entre Lixívia e AMFA.
		AMFA	-396,250	170,440	,103	-872,12	79,62	
	Betadine	Lixívia	-293,750	170,440	,249	-769,62	182,12	
		AMFA	-690,000*	170,440	,007	-1165,87	-214,13	
	AMFA	Lixívia	396,250	170,440	,103	-79,62	872,12	
		Betadine	690,000*	170,440	,007	214,13	1165,87	
Presence3	Lixívia	Betadine	456,250	389,281	,498	-630,62	1543,12	Surgiram diferenças significativas entre AMFA e as soluções de Betadine e Lixívia. Não houve diferenças significativas entre Betadine e Lixívia.
		AMFA	-2524,750*	389,281	,000	-3611,62	-1437,88	
	Betadine	Lixívia	-456,250	389,281	,498	-1543,12	630,62	
		AMFA	-2981,000*	389,281	,000	-4067,87	-1894,13	
	AMFA	Lixívia	2524,750*	389,281	,000	1437,88	3611,62	
		Betadine	2981,000*	389,281	,000	1894,13	4067,87	

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Tabela IVc. Teste de Normalidade para a presença de epífitos nas três soluções de limpeza nas três semanas de cultivo, efetuado previamente à ANOVA .

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Presence_1	,156	12	,200*	,937	12	,456
Presence_2	,144	12	,200*	,900	12	,160
Presence_3	,310	12	,002	,827	12	,019

Tabela IVd. Teste de Levene da homogeneidade de variâncias relativamente à presença de epífitos nas três soluções de limpeza nas três semanas de cultivo, efetuado previamente à ANOVA.

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Semana_1	,325	2	9	,731
Semana_2	1,854	2	9	,212
Semana_3	3,208	2	9	,089

Tabela IVe Teste de Normalidade para as variáveis Taxa de Crescimento e Rendimento do comprimento da alga, efetuado previamente à ANOVA.

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
TCR1_L	,177	12	,200*	,909	12	,207
TCR2_L	,324	12	,001	,726	12	,002
TCR3_L	,244	12	,048	,899	12	,154
R1_L	,237	12	,062	,902	12	,167
R2_L	,339	12	,000	,688	12	,001
R3_L	,179	12	,200*	,906	12	,192

Tabela IVf. Tabela ANOVA (com um fator) para teste das diferenças significativas entre a TCR e R do comprimento de *H. scoparia*.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TCR1_L	Between Groups	,797	2	,399	1,039	,393
	Within Groups	3,454	9	,384		
	Total	4,251	11			
TCR2_L	Between Groups	,090	2	,045	,067	,936
	Within Groups	6,091	9	,677		
	Total	6,181	11			
TCR3_L	Between Groups	,143	2	,072	,490	,628
	Within Groups	1,318	9	,146		
	Total	1,461	11			
R1_L	Between Groups	,038	2	,019	3,153	,092
	Within Groups	,055	9	,006		
	Total	,093	11			
R2_L	Between Groups	,006	2	,003	,227	,802
	Within Groups	,114	9	,013		
	Total	,120	11			
R3_L	Between Groups	,065	2	,032	1,373	,302
	Within Groups	,212	9	,024		
	Total	,276	11			

ANEXO V - Experiência de Teste de Hipóteses 1: Efeito da Intensidades Luminosas no crescimento de *Halopteris scoparia*.

Tabela Va. Teste de Normalidade para as variáveis Taxa de Crescimento e Rendimento do peso da alga, efetuado previamente à ANOVA.

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
TCR1_P	,198	8	,200*	,942	8	,633
TCR2_P	,147	8	,200*	,983	8	,977
TCR3_P	,172	8	,200*	,915	8	,390
TCR4_P	,149	8	,200*	,923	8	,457
TCR5_P	,191	8	,200*	,967	8	,876
TCR6_P	,187	8	,200*	,891	8	,241
R1_P	,422	8	,000	,589	8	,000
R2_P	,125	8	,200*	,953	8	,743
R3_P	,182	8	,200*	,911	8	,363
R4_P	,193	8	,200*	,968	8	,879
R5_P	,226	8	,200*	,924	8	,467
R6_P	,168	8	,200*	,957	8	,782

Tabela Vb. Tabela ANOVA (com um fator) para teste das diferenças significativas na Taxa de Crescimento Relativo (TCR) e rendimento do peso das algas na Exp1.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TCR1_P	Between Groups	274,331	2	137,165	37,424	,000
	Within Groups	32,987	9	3,665		
	Total	307,317	11			
TCR2_P	Between Groups	17,808	2	8,904	4,706	,040
	Within Groups	17,028	9	1,892		
	Total	34,835	11			
TCR3_P	Between Groups	24,617	2	12,308	,301	,747
	Within Groups	367,981	9	40,887		
	Total	392,598	11			
TCR4_P	Between Groups	30,668	2	15,334	,694	,524
	Within Groups	198,809	9	22,090		
	Total	229,477	11			
TCR5_P	Between Groups	14,080	2	7,040	,743	,503
	Within Groups	85,288	9	9,476		
	Total	99,368	11			
TCR6_P	Between Groups	573,637	2	286,819	23,308	,000
	Within Groups	110,750	9	12,306		
	Total	684,387	11			
R1_P	Between Groups	,059	2	,029	3,377	,081
	Within Groups	,078	9	,009		
	Total	,137	11			
R2_P	Between Groups	,004	2	,002	,421	,669
	Within Groups	,040	9	,004		
	Total	,044	11			
R3_P	Between Groups	,006	2	,003	,546	,598
	Within Groups	,049	9	,005		
	Total	,055	11			
R4_P	Between Groups	,006	2	,003	1,823	,216
	Within Groups	,015	9	,002		
	Total	,021	11			
R5_P	Between Groups	,375	2	,187	,339	,721
	Within Groups	4,973	9	,553		
	Total	5,347	11			
R6_P	Between Groups	,226	2	,113	48,111	,000
	Within Groups	,021	9	,002		
	Total	,248	11			

Tabela Vc. Teste de Tukey para averiguação das diferenças significativas no peso dos ápices entre as três IL.

Dependent Variable	(I) IL	(J) IL	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		Resultado da Interpretação
						Lower Bound	Upper Bound	
TCR1_P	30,00	70,00	-3,07750	1,35373	,111	-6,8571	,7021	Existem diferenças significativas entre 30 e 150 µmol e entre 70 e 150 µmol. Não existem diferenças entre 30 e 70 µmol.
		150,00	-11,32500	1,35373	,000	-15,1046	-7,5454	
	70,00	30,00	3,07750	1,35373	,111	-,7021	6,8571	
		150,00	-8,24750	1,35373	,000	-12,0271	-4,4679	
	150,00	30,00	11,32500	1,35373	,000	7,5454	15,1046	
		70,00	8,24750	1,35373	,000	4,4679	12,0271	
TCR2_P	30,00	70,00	2,70750	,97262	,051	-,0081	5,4231	Não existem diferenças entre as três intensidades luminosas.
		150,00	,26750	,97262	,959	-2,4481	2,9831	
	70,00	30,00	-2,70750	,97262	,051	-5,4231	,0081	
		150,00	-2,44000	,97262	,078	-5,1556	,2756	
	150,00	30,00	-,26750	,97262	,959	-2,9831	2,4481	
		70,00	2,44000	,97262	,078	-,2756	5,1556	
TCR3_P	30,00	70,00	1,88500	4,52144	,910	-10,7389	14,5089	Não existem diferenças entre as três intensidades luminosas
		150,00	3,50500	4,52144	,727	-9,1189	16,1289	
	70,00	30,00	-1,88500	4,52144	,910	-14,5089	10,7389	
		150,00	1,62000	4,52144	,932	-11,0039	14,2439	
	150,00	30,00	-3,50500	4,52144	,727	-16,1289	9,1189	
		70,00	-1,62000	4,52144	,932	-14,2439	11,0039	
TCR4_P	30,00	70,00	-1,73250	3,32339	,863	-11,0114	7,5464	Não existem diferenças entre as três intensidades luminosas
		150,00	-3,90750	3,32339	,496	-13,1864	5,3714	
	70,00	30,00	1,73250	3,32339	,863	-7,5464	11,0114	
		150,00	-2,17500	3,32339	,795	-11,4539	7,1039	
	150,00	30,00	3,90750	3,32339	,496	-5,3714	13,1864	
		70,00	2,17500	3,32339	,795	-7,1039	11,4539	
TCR5_P	30,00	70,00	,04500	2,17675	1,000	-6,0325	6,1225	Não existem diferenças entre as três intensidades luminosas
		150,00	2,32000	2,17675	,557	-3,7575	8,3975	
	70,00	30,00	-,04500	2,17675	1,000	-6,1225	6,0325	
		150,00	2,27500	2,17675	,569	-3,8025	8,3525	
	150,00	30,00	-2,32000	2,17675	,557	-8,3975	3,7575	
		70,00	-2,27500	2,17675	,569	-8,3525	3,8025	

**Continuação da Tabela anterior.

Dependent Variable	(I) IL	(J) IL	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		Resultado da Interpretação
						Lower Bound	Upper Bound	
TCR6_P	30,00	70,00	-4,3050	2,48047	,245	-11,230	2,620	Existem diferenças significativas entre 30 e 150 µmol e entre 70 e 150 µmol. Não existem diferenças entre 30 e 70 µmol.
		150,00	-16,3375	2,48047	,000	-23,263	-9,412	
	70,00	30,00	4,3050	2,48047	,245	-2,620	11,230	
		150,00	-12,0325	2,48047	,002	-18,958	-5,107	
	150,00	30,00	16,3375	2,48047	,000	9,412	23,263	
		70,00	12,0325	2,48047	,002	5,107	18,958	
R1_P	30,00	70,00	-,09419	,06583013	,367	-,2779	,0896	Não existem diferenças entre as três intensidades luminosas
		150,00	-,17077	,06583013	,068	-,3545	,0130	
	70,00	30,00	,09419	,06583013	,367	-,0896	,2779	
		150,00	-,07658	,06583013	,502	-,2603	,1072	
	150,00	30,00	,17077	,06583013	,068	-,0130	,3545	
		70,00	,07658	,06583013	,502	-,1072	,2603	
R2_P	30,00	70,00	-,02285	,04706	,880	-,1543	,1086	Não existem diferenças entre as três intensidades luminosas
		150,00	-,04315	,04706	,644	-,1746	,0883	
	70,00	30,00	,02285	,04706	,880	-,1086	,1543	
		150,00	-,02030	,04706	,904	-,1517	,1111	
	150,00	30,00	,04315	,04706	,644	-,0883	,1746	
		70,00	,02030	,04706	,904	-,1111	,1517	
R3_P	30,00	70,00	,00863	,05210	,985	-,1368	,1541	Não existem diferenças entre as três intensidades luminosas
		150,00	,05085	,05210	,609	-,0946	,1963	
	70,00	30,00	-,00863	,05210	,985	-,1541	,1368	
		150,00	,04222	,05210	,706	-,1032	,1877	
	150,00	30,00	-,05085	,05210	,609	-,1963	,0946	
		70,00	-,04222	,05210	,706	-,1877	,1032	
R4_P	30,00	70,00	-,02538	,02851	,660	-,1050	,0542	Não existem diferenças entre as três intensidades luminosas
		150,00	-,05441	,02851	,192	-,1340	,0252	
	70,00	30,00	,02538	,02851	,660	-,0542	,1050	
		150,00	-,02903	,02851	,585	-,1086	,0506	
	150,00	30,00	,05441	,02851	,192	-,0252	,1340	
		70,00	,02903	,02851	,585	-,0506	,1086	

**

** Continuação da Tabela anterior.

Dependent Variable	(I) IL	(J) IL	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		Resultado da Interpretação
						Lower Bound	Lower Bound	
R5_P	30,00	70,00	-,01818	,52560807	,999	-1,4857	1,4493	Não existem diferenças entre as três intensidades luminosas
		150,00	,36544	,52560807	,772	-1,1021	1,8329	
	70,00	30,00	,01818	,52560807	,999	-1,4493	1,4857	
		150,00	,38361	,52560807	,753	-1,0839	1,8511	
	150,00	30,00	-,36544	,52560807	,772	-1,8329	1,1021	
		70,00	-,38361	,52560807	,753	-1,8511	1,0839	
R6_P	30,00	70,00	-,02315	,03430	,783	-,1189	,0726	Existem diferenças significativas entre 30 e 150 µmol e entre 70 e 150 µmol. Não existem diferenças entre 30 e 70 µmol.
		150,00	-,30230*	,03430	,000	-,3981	-,2065	
	70,00	30,00	,02315	,03430	,783	-,0726	,1189	
		150,00	-,27915*	,03430	,000	-,3749	-,1834	
	150,00	30,00	,30230*	,03430	,000	,2065	,3981	
		70,00	,27915*	,03430	,000	,1834	,3749	

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Tabela Vd. Teste de Levene da Homogeneidade de variâncias para as variáveis Taxa de Crescimento e Rendimento do comprimento da alga, efetuado previamente à ANOVA.

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
TCR_C1	3,340	2	9	,082
TCR_C2	1,114	2	9	,370
TCR_C3	2,412	2	9	,145
TCR_C4	2,545	2	9	,133
TCR_C5	58,800	2	9	,000
TCR_C6	,157	2	9	,857
R_C1	3,986	2	9	,058
R_C2	7,044	2	9	,014
R_C3	7,109	2	9	,014
R_C4	8,060	2	9	,010
R_C5	63,706	2	9	,000
R_C6	4,741	2	9	,039

Tabela Ve. Tabela ANOVA (com um fator) para teste das diferenças significativas na Taxa de Crescimento Relativo (TCR) e rendimento do comprimento das algas na Exp1.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TCR_C1	Between Groups	,000	2	,000	1,371	,308
	Within Groups	,000	8	,000		
	Total	,000	10			
TCR_C2	Between Groups	,000	2	,000	2,296	,163
	Within Groups	,000	8	,000		
	Total	,000	10			
TCR_C3	Between Groups	,000	2	,000	,008	,992
	Within Groups	,000	8	,000		
	Total	,000	10			
TCR_C4	Between Groups	,000	2	,000	,224	,805
	Within Groups	,001	8	,000		
	Total	,001	10			
TCR_C5	Between Groups	6,889	2	3,444	1,685	,245
	Within Groups	16,355	8	2,044		
	Total	23,244	10			
TCR_C6	Between Groups	,000	2	,000	4,885	,041
	Within Groups	,000	8	,000		
	Total	,000	10			
R_C1	Between Groups	,014	2	,007	1,548	,270
	Within Groups	,036	8	,005		
	Total	,051	10			
R_C2	Between Groups	,250	2	,125	1,717	,240
	Within Groups	,583	8	,073		
	Total	,833	10			
R_C3	Between Groups	2,981	2	1,491	10,368	,006
	Within Groups	1,150	8	,144		
	Total	4,131	10			
R_C4	Between Groups	1,199	2	,599	1,563	,267
	Within Groups	3,068	8	,384		
	Total	4,267	10			
R_C5	Between Groups	,907	2	,453	6,478	,021
	Within Groups	,560	8	,070		
	Total	1,467	10			
R_C6	Between Groups	2,215	2	1,108	5,573	,030
	Within Groups	1,590	8	,199		
	Total	3,805	10			

Tabela Vf. Teste de Tukey para averiguação das diferenças significativas no comprimento dos ápices entre as três IL.

Dependent Variable	(I) IL	(J) IL	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
TCR_C1	30	70	,00005500	,00003476	,307	-,0000443	,0001543
		150	,00001750	,00003476	,872	-,0000818	,0001168
	70	30	-,00005500	,00003476	,307	-,0001543	,0000443
		150	-,00003750	,00003219	,504	-,0001295	,0000545
	150	30	-,00001750	,00003476	,872	-,0001168	,0000818
		70	,00003750	,00003219	,504	-,0000545	,0001295
TCR_C2	30	70	-,00006750	,00005583	,481	-,0002270	,0000920
		150	,00004250	,00005583	,736	-,0001170	,0002020
	70	30	,00006750	,00005583	,481	-,0000920	,0002270
		150	,00011000	,00005169	,145	-,0000377	,0002577
	150	30	-,00004250	,00005583	,736	-,0002020	,0001170
		70	-,00011000	,00005169	,145	-,0002577	,0000377
TCR_C3	30	70	-,00001465	,00550900	1,000	-,0157563	,0157270
		150	,00056938	,00550900	,994	-,0151723	,0163110
	70	30	,00001465	,00550900	1,000	-,0157270	,0157563
		150	,00058403	,00510034	,993	-,0139899	,0151580
	150	30	-,00056938	,00550900	,994	-,0163110	,0151723
		70	-,00058403	,00510034	,993	-,0151580	,0139899
TCR_C4	30	70	-,00489548	,00740494	,792	-,0260547	,0162637
		150	-,00340474	,00740494	,892	-,0245639	,0177545
	70	30	,00489548	,00740494	,792	-,0162637	,0260547
		150	,00149074	,00685564	,974	-,0180989	,0210804
	150	30	,00340474	,00740494	,892	-,0177545	,0245639
		70	-,00149074	,00685564	,974	-,0210804	,0180989
TCR_C5	30	70	-,07249992	1,09204944	,998	-3,1929704	3,0479705
		150	-1,68544486	1,09204944	,323	-4,8059153	1,4350256
	70	30	,07249992	1,09204944	,998	-3,0479705	3,1929704
		150	-1,61294494	1,01104132	,302	-4,5019392	1,2760493
	150	30	1,68544486	1,09204944	,323	-1,4350256	4,8059153
		70	1,61294494	1,01104132	,302	-1,2760493	4,5019392

**

**Continuação da Tabela anterior.

TCR_C6	30	70	,00006917	,00008588	,710	-,0001762	,0003146
		150	-,00017333	,00008588	,170	-,0004187	,0000721
	70	30	-,00006917	,00008588	,710	-,0003146	,0001762
		150	-,00024250 ⁺	,00007951	,038	-,0004697	-,0000153
	150	30	,00017333	,00008588	,170	-,0000721	,0004187
		70	,00024250 ⁺	,00007951	,038	,0000153	,0004697
R_C1	30	70	,09041667	,05154449	,245	-,0568688	,2377022
		150	,04572917	,05154449	,663	-,1015563	,1930147
	70	30	-,09041667	,05154449	,245	-,2377022	,0568688
		150	-,04468750	,04772093	,634	-,1810474	,0916724
	150	30	-,04572917	,05154449	,663	-,1930147	,1015563
		70	,04468750	,04772093	,634	-,0916724	,1810474
R_C2	30	70	-,22086200	,20613232	,556	-,8098736	,3681496
		150	,12956930	,20613232	,809	-,4594423	,7185809
	70	30	,22086200	,20613232	,556	-,3681496	,8098736
		150	,35043129	,19084145	,219	-,1948875	,8957501
	150	30	-,12956930	,20613232	,809	-,7185809	,4594423
		70	-,35043129	,19084145	,219	-,8957501	,1948875
R_C3	30	70	-,45147327	,28959819	,316	-1,2789840	,3760374
		150	-1,27481425 ⁺	,28959819	,006	-2,1023249	-,4473036
	70	30	,45147327	,28959819	,316	-,3760374	1,2789840
		150	-,82334098 ⁺	,26811582	,037	-1,5894670	-,0572149
	150	30	1,27481425 ⁺	,28959819	,006	,4473036	2,1023249
		70	,82334098 ⁺	,26811582	,037	,0572149	1,5894670
R_C4	30	70	,78197214	,47298955	,280	-,5695691	2,1335134
		150	,69001785	,47298955	,359	-,6615234	2,0415591
	70	30	-,78197214	,47298955	,280	-2,1335134	,5695691
		150	-,09195428	,43790323	,976	-1,3432384	1,1593298
	150	30	-,69001785	,47298955	,359	-2,0415591	,6615234
		70	,09195428	,43790323	,976	-1,1593298	1,3432384

**

** Continuação da Tabela anterior.

R_C5	30	70	-,04056983	,20205702	,978	-,6179365	,5367969
		150	,57275344	,20205702	,052	-,0046132	1,1501201
	70	30	,04056983	,20205702	,978	-,5367969	,6179365
		150	,61332327*	,18706845	,027	,0787856	1,1478609
	150	30	-,57275344	,20205702	,052	-1,1501201	,0046132
		70	-,61332327*	,18706845	,027	-1,1478609	-,0787856
R_C6	30	70	,31685997	,34048686	,638	-,6560623	1,2897822
		150	-,71484399	,34048686	,151	-1,6877662	,2580782
	70	30	-,31685997	,34048686	,638	-1,2897822	,6560623
		150	-1,03170396*	,31522958	,027	-1,9324549	-,1309530
	150	30	,71484399	,34048686	,151	-,2580782	1,6877662
		70	1,03170396*	,31522958	,027	,1309530	1,9324549

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ANEXO VI - Experiência de Teste de Hipóteses 2: Efeito da Densidades de Cultivo no crescimento de *Halopteris scoparia*.

Tabela VIa. Tabela ANOVA para verificação de diferenças significativas na TCR e R do peso global das algas na Exp2.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TCR_0	Between Groups	30,875	4	7,719	,690	,610
	Within Groups	167,775	15	11,185		
	Total	198,650	19			
TCR_1	Between Groups	67,006	4	16,751	1,692	,204
	Within Groups	148,503	15	9,900		
	Total	215,509	19			
TCR_2	Between Groups	106,653	4	26,663	2,700	,071
	Within Groups	148,110	15	9,874		
	Total	254,763	19			
TCR_3	Between Groups	226,736	4	56,684	3,425	,035
	Within Groups	248,272	15	16,551		
	Total	475,007	19			
R_0	Between Groups	,321	4	,080	,617	,657
	Within Groups	1,952	15	,130		
	Total	2,273	19			
R_1	Between Groups	4,390	4	1,097	41,192	,000
	Within Groups	,400	15	,027		
	Total	4,790	19			
R_2	Between Groups	3,830	4	,958	12,661	,000
	Within Groups	1,135	15	,076		
	Total	4,965	19			
R_3	Between Groups	1,638	4	,410	2,816	,063
	Within Groups	2,182	15	,145		
	Total	3,821	19			

Tabela VIb. Teste de Normalidade para as variáveis Taxa de Crescimento e Rendimento do peso da alga, efetuado previamente à ANOVA.

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
TCR_0	,111	20	,200	,942	20	,257
TCR_1	,166	20	,150	,908	20	,059
TCR_2	,095	20	,200	,977	20	,886
TCR_3	,117	20	,200	,963	20	,605
R_0	,134	20	,200	,974	20	,845
R_1	,117	20	,200	,976	20	,865
R_2	,136	20	,200	,943	20	,272
R_3	,207	20	,025	,947	20	,324

Tabela VIc. Teste de Levene para a homogeneidade das variâncias Taxa de Crescimento e Rendimento do peso da alga, efetuado previamente à ANOVA.

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
TCR_0	,357	4	15	,835
TCR_1	1,467	4	15	,261
TCR_2	,407	4	15	,801
TCR_3	,578	4	15	,683
R_0	2,150	4	15	,125
R_1	3,941	4	15	,022
R_2	1,790	4	15	,183
R_3	1,732	4	15	,195

Tabela Vld. Teste de Tukey para verificação das maiores diferenças significativas d na TCR e R do peso das algas para as várias DC de cultivo.

Dependent (I) Variable	(J) DC	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		Resultado da interpretação	
					Lower Bound	Upper Bound		
TCR_0	0,075	0,5	3,69237750	2,365	,542	-3,6100931	10,9948481	Não existem diferenças significativas no tempo zero de cultivo entre as cinco densidades de cultivo.
		1	2,91486000	2,365	,733	-4,3876106	10,2173306	
		2	2,60721250	2,365	,803	-4,6952581	9,9096831	
		3	2,15541750	2,365	,888	-5,1470531	9,4578881	
	0,5	0,075	-3,69237750	2,365	,542	-10,9948481	3,6100931	
		1	-,77751750	2,365	,997	-8,0799881	6,5249531	
		2	-1,08516500	2,365	,990	-8,3876356	6,2173056	
		3	-1,53696000	2,365	,964	-8,8394306	5,7655106	
	1	0,075	-2,91486000	2,365	,733	-10,2173306	4,3876106	
		0,5	,77751750	2,365	,997	-6,5249531	8,0799881	
		2	-,30764750	2,365	1,000	-7,6101181	6,9948231	
		3	-,75944250	2,365	,997	-8,0619131	6,5430281	
	2	0,075	-2,60721250	2,365	,803	-9,9096831	4,6952581	
		0,5	1,08516500	2,365	,990	-6,2173056	8,3876356	
		1	,30764750	2,365	1,000	-6,9948231	7,6101181	
		3	-,45179500	2,365	1,000	-7,7542656	6,8506756	
3	0,075	-2,15541750	2,365	,888	-9,4578881	5,1470531		
	0,5	1,53696000	2,365	,964	-5,7655106	8,8394306		
	1	,75944250	2,365	,997	-6,5430281	8,0619131		
	2	,45179500	2,365	1,000	-6,8506756	7,7542656		

**

**Continuação da Tabela anterior

Dependent Variable	(I) DC	(J) DC	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		Resultado da interpretação
						Lower Bound	Upper Bound	
TCR_1	0,075	0,5	,63807750	2,225	,998	-6,2321856	7,5083406	Não existem diferenças significativas no tempo um de cultivo entre as cinco densidades de cultivo.
		1	1,49535750	2,225	,959	-5,3749056	8,3656206	
		2	3,92182750	2,225	,429	-2,9484356	10,7920906	
		3	4,65508250	2,225	,273	-2,2151806	11,5253456	
	0,5	0,075	-,63807750	2,225	,998	-7,5083406	6,2321856	
		1	,85728000	2,225	,995	-6,0129831	7,7275431	
		2	3,28375000	2,225	,592	-3,5865131	10,1540131	
		3	4,01700500	2,225	,406	-2,8532581	10,8872681	
	1	0,075	-1,49535750	2,225	,959	-8,3656206	5,3749056	
		0,5	-,85728000	2,225	,995	-7,7275431	6,0129831	
		2	2,42647000	2,225	,809	-4,4437931	9,2967331	
		3	3,15972500	2,225	,625	-3,7105381	10,0299881	
	2	0,075	-3,92182750	2,225	,429	-10,7920906	2,9484356	
		0,5	-3,28375000	2,225	,592	-10,1540131	3,5865131	
		1	-2,42647000	2,225	,809	-9,2967331	4,4437931	
		3	,73325500	2,225	,997	-6,1370081	7,6035181	
	3	0,075	-4,65508250	2,225	,273	-11,5253456	2,2151806	
		0,5	-4,01700500	2,225	,406	-10,8872681	2,8532581	
1		-3,15972500	2,225	,625	-10,0299881	3,7105381		
2		-,73325500	2,225	,997	-7,6035181	6,1370081		
TCR_2	0,075	0,5	1,84411500	2,222	,917	-8,7052783	5,0170483	Não existem diferenças significativas no tempo dois de cultivo entre as cinco densidades de cultivo.
		1	-3,35386500	2,222	,572	-10,2150283	3,5072983	
		2	-5,72139750	2,222	,126	-12,5825608	1,1397658	
		3	-6,10028500	2,222	,093	-12,9614483	,7608783	
	0,5	0,075	1,84411500	2,222	,917	-5,0170483	8,7052783	
		1	-1,50975000	2,222	,958	-8,3709133	5,3514133	
		2	-3,87728250	2,222	,438	-10,7384458	2,9838808	
		3	-4,25617000	2,222	,351	-11,1173333	2,6049933	
	1	0,075	3,35386500	2,222	,572	-3,5072983	10,2150283	
		0,5	1,50975000	2,222	,958	-5,3514133	8,3709133	
		2	-2,36753250	2,222	,821	-9,2286958	4,4936308	
		3	-2,74642000	2,222	,732	-9,6075833	4,1147433	
	2	0,075	5,72139750	2,222	,126	-1,1397658	12,5825608	
		0,5	3,87728250	2,222	,438	-2,9838808	10,7384458	
		1	2,36753250	2,222	,821	-4,4936308	9,2286958	
		3	-,37888750	2,222	1,000	-7,2400508	6,4822758	
	3	0,075	6,10028500	2,222	,093	-,7608783	12,9614483	
		0,5	4,25617000	2,222	,351	-2,6049933	11,1173333	
1		2,74642000	2,222	,732	-4,1147433	9,6075833		
2		,37888750	2,222	1,000	-6,4822758	7,2400508		

**

**Continuação da Tabela anterior

Dependent Variable	(I) DC	(J) DC	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		Resultado da interpretação	
						Lower Bound	Upper Bound		
TCR_3	0,075	0,5	4,60648250	2,877	,519	-4,2767234	13,4896884	Existem diferenças significativas entre a densidade de 0,075 e 3,00g na terceira semana de cultivo.	
		1	2,90220500	2,877	,847	-5,9810009	11,7854109		
		2	2,88892750	2,877	,849	-5,9942784	11,7721334		
		3	10,15942500	2,877	,022	1,2762191	19,0426309		
	0,5	0,075	-4,60648250	2,877	,519	-13,4896884	4,2767234		
		1	-1,70427750	2,877	,974	-10,5874834	7,1789284		
		2	-1,71755500	2,877	,973	-10,6007609	7,1656509		
	1	0,075	-2,90220500	2,877	,847	-11,7854109	5,9810009		
		0,5	1,70427750	2,877	,974	-7,1789284	10,5874834		
		2	-,01327750	2,877	1,000	-8,8964834	8,8699284		
	2	0,075	3	7,25722000	2,877	,344	-3,3302634		14,4361484
			0,5	-2,88892750	2,877	,849	-11,7721334		5,9942784
		0,5	1	1,71755500	2,877	,973	-7,1656509		10,6007609
			2	-,01327750	2,877	1,000	-8,8699284		8,8964834
	3	0,075	3	7,27049750	2,877	,136	-1,6127084		16,1537034
			0,5	-1,01594250E1	2,8770	,022	-19,0426309		-1,2762191
0,5		1	-5,55294250	2,877	,344	-14,4361484	3,3302634		
		2	-7,25722000	2,877	,137	-16,1404259	1,6259859		
R_0	0,075	0,5	-,00572750	,255	1,000	-,7933227	,7818677	Não existem diferenças significativas no tempo zero de cultivo para o Rendimento entre as cinco densidades de cultivo.	
		1	-,09295250	,255	,996	-,8805477	,6946427		
		2	-,22246000	,255	,903	-1,0100552	,5651352		
		3	-,32492500	,255	,710	-1,1125202	,4626702		
	0,5	0,075	,00572750	,255	1,000	-,7818677	,7933227		
		1	-,08722500	,255	,997	-,8748202	,7003702		
		2	-,21673250	,255	,911	-1,0043277	,5708627		
	1	0,075	3	-,31919750	,255	,723	-1,1067927		,4683977
			0,5	,09295250	,255	,996	-,6946427		,8805477
		0,5	1	,08722500	,255	,997	-,7003702		,8748202
			2	-,12950750	,255	,985	-,9171027		,6580877
	2	0,075	3	-,23197250	,255	,889	-1,0195677		,5556227
			0,5	,22246000	,255	,903	-,5651352		1,0100552
		0,5	1	,21673250	,255	,911	-,5708627		1,0043277
			2	,12950750	,255	,985	-,6580877		,9171027
	3	0,075	3	-,10246500	,255	,994	-,8900602		,6851302
0,5			,32492500	,255	,710	-,4626702	1,1125202		
0,5		1	,31919750	,255	,723	-,4683977	1,1067927		
		2	,23197250	,255	,889	-,5556227	1,0195677		
2	0,075	3	,10246500	,255	,994	-,6851302	,8900602		

**

**Continuação da Tabela anterior

Dependent Variable	(I) DC	(J) DC	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		Resultado da interpretação	
						Lower Bound	Upper Bound		
R_1	0,075	0,5	-,77695750	,115	,000	-1,1333616	-,4205534	Existe diferenças entre todas as densidades.	
		1	-,99875750	,115	,000	-1,3551616	-,6423534		
		2	-1,23194000	,115	,000	-1,5883441	-,8755359		
		3	-1,29978250	,115	,000	-1,6561866	-,9433784		
	0,5	0,075	,77695750	,115	,000	,4205534	1,1333616	Existem diferenças entre 0,5g e as densidades de 0,075, 2,0 e 3,0g. Não existem diferenças entre 0,5 e 1,0g	
		1	-,22180000	,115	,348	-,5782041	,1346041		
		2	-,45498250	,115	,010	-,8113866	-,0985784		
	1	0,075	,99875750	,1155	,000	,6423534	1,3551616	Existem diferenças entre 1,0g e a densidade de 0,075g. Não existem diferenças entre 1,0g e 0,5, 2,0 e 3,0g.	
		0,5	,22180000	,115	,348	-,1346041	,5782041		
		2	-,23318250	,115	,303	-,5895866	,1232216		
	2	0,075	1,23194000	,115	,000	,8755359	1,5883441	Existem diferenças entre 2,0g e as densidades de 0,075 e 0,5g. Não existem diferenças entre 2,0 e 1,0 e 3,0g.	
		0,5	,45498250	,115	,010	,0985784	,8113866		
		1	,23318250	,115	,303	-,1232216	,5895866		
	3	0,075	1,29978250	,115	,000	,9433784	1,6561866	Existem diferenças entre 3,0g e a densidade de 0,075g. Não existem diferenças entre 0,5, 1,0 e 2,0g.	
		0,5	,52282500	,115	,003	,1664209	,8792291		
		1	,30102500	,115	,119	-,0553791	,6574291		
R_2	0,075	0,5	-,19463500	,194	,851	-,7951439	,4058739	Existem diferenças entre 0,075g e as densidades de 2,0 e 3,0g. Não existem diferenças entre 0,075 e 0,5 e 1,0g.	
		1	-,48062000	,194	,150	-1,0811289	,1198889		
		2	-,90599250	,194	,002	-1,5065014	-,3054836		
		3	-1,18033500	,194	,000	-1,7808439	-,5798261		
	0,5	0,075	,19463500	,194	,851	-,4058739	,7951439	Existem diferenças entre 0,5g e as densidades de 2,0 e 3,0g. Não existem diferenças entre 0,5 e 0,075 e 1,0g.	
		1	-,28598500	,194	,595	-,8864939	,3145239		
		2	-,71135750	,194	,017	-1,3118664	-,1108486		
	1	0,075	,48062000	,194	,150	-,1198889	1,0811289	Existem diferenças entre 1,0g e a densidade de 3,0g. Não existem diferenças entre 1,0 e 0,075, 0,5 e 2,0g.	
		0,5	,28598500	,194	,595	-,3145239	,8864939		
		2	-,42537250	,194	,237	-1,0258814	,1751364		
	2	0,075	,90599250	,194	,002	,3054836	1,5065014	Existem diferenças entre 2,0g e as densidades de 0,075 e 0,5g. Não existem diferenças entre 2,0 e 1,0 e 3,0g.	
		0,5	,71135750	,194	,017	,1108486	1,3118664		
		1	,42537250	,194	,237	-,1751364	1,0258814		
	3	0,075	1,18033500	,194	,000	,5798261	1,7808439	Existem diferenças entre 3,0g e as densidades de 0,075, 0,5 e 1,0g. Não existem diferenças entre 3,0 e 2,0g.	
		0,5	,98570000	,194	,001	,3851911	1,5862089		
		1	,69971500	,194	,019	,0992061	1,3002239		
			2	,27434250	,194	,631	-,3261664	,8748514	

**

**Continuação da Tabela anterior

Dependent Variable	(I) DC	(J) DC	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		Resultado da interpretação
						Lower Bound	Upper Bound	
R_3	0,075	0,5	,02143500	,270	1,000	-,8113914	,8542614	Não existem diferenças significativas no tempo três de cultivo para o Rendimento entre as cinco densidades de cultivo.
		1	-,12644250	,270	,989	-,9592689	,7063839	
		2	-,24168250	,270	,894	-1,0745089	,5911439	
		3	,58861250	,270	,238	-,2442139	1,4214389	
	0,5	0,075	-,02143500	,270	1,000	-,8542614	,8113914	
		1	-,14787750	,270	,980	-,9807039	,6849489	
		2	-,26311750	,270	,862	-1,0959439	,5697089	
		3	,56717750	,270	,269	-,2656489	1,4000039	
	1	0,075	,12644250	,270	,989	-,7063839	,9592689	
		0,5	,14787750	,270	,980	-,6849489	,9807039	
		2	-,11524000	,270	,992	-,9480664	,7175864	
		3	,71505500	,270	,110	-,1177714	1,5478814	
	2	0,075	,24168250	,270	,894	-,5911439	1,0745089	
		0,5	,26311750	,270	,862	-,5697089	1,0959439	
		1	,11524000	,270	,992	-,7175864	,9480664	
		3	,83029500	,270	,051	-,0025314	1,6631214	
	3	0,075	-,58861250	,270	,238	-1,4214389	,2442139	
		0,5	-,56717750	,270	,269	-1,4000039	,2656489	
		1	-,71505500	,270	,110	-1,5478814	,1177714	
		2	-,83029500	,270	,051	-1,6631214	,0025314	

ANEXO VII - Lista de espécies epífitas/endófitas registradas.

Espécie	Família	Tipo de Alga	Exp_P1	Exp_P2	Exp1
<i>Anotrichium tenue</i>	WRANGELIACEAE	Rhodophyta		•	•
<i>Bangia</i> sp.	BANGIACEAE	Rhodophyta	•	•	•
<i>Batchantillarum</i> sp.				•	
<i>Ceramium rubrum</i>	CERAMIACEAE	Rhodophyta		•	
<i>Cladophora</i> sp.	CLADOPHORACEAE	Chlorophyceae	•	•	•
<i>Diatomáceas</i>		Bacillariophyta	•	•	•
<i>Epicladia</i> sp.	ULVACEAE	Chlorophyceae		•	•
<i>Feldmania irregularis</i>	ACINETOSPORACEAE	Ochrophyta		•	•
<i>Hincksia rallsiae</i>	ACINETOSPORACEAE	Ochrophyta			•
Filamentosa vermelha não identificada		Rhodophyta		•	
<i>Ulva (Enteromorpha) compressa</i>	ULVACEAE	Chlorophyceae	•		
<i>Ulva rigida</i>	ULVACEAE	Chlorophyceae	•		
<i>Ulva</i> filamentosa tipo <i>compressa</i>	ULVACEAE	Chlorophyceae			•