

## Physiological assessment of 2 color strains of *Crassiphycus corneus* (J. Agardh) Gurgel, J.N. Norris et Fredericq (Gracilariales, Rhodophyta): Effects of temperature and irradiance

## Caracterización fisiológica de 2 linajes de color de *Crassiphycus corneus* (J. Agardh) Gurgel, J.N. Norris et Fredericq (Gracilariales, Rhodophyta): Efectos de la temperatura y la irradiancia

Jocelyn Jofre<sup>1\*</sup>, Nelso Patricio Navarro<sup>1,2,3</sup>, Estela María Plastino<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Ecofisiología y Biotecnología de Algas, Facultad de Ciencias, Universidad de Magallanes, Punta Arenas, Chile.

<sup>2</sup> Centro FONDAF de Investigación en Dinámica de Ecosistemas Marinos de Altas Latitudes, Punta Arenas, Chile.

<sup>3</sup> Red para la Investigación en Ambientes Extremos, Universidad de Magallanes, Punta Arenas, Chile.

<sup>4</sup> Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

\* Corresponding author. E-mail: [jocelyn.jofre@umag.cl](mailto:jocelyn.jofre@umag.cl)

**ABSTRACT.** *Crassiphycus corneus* (J. Agardh) Gurgel, J.N. Norris et Fredericq (Gracilariales, Rhodophyta) is a species with high-quality and high yields of polysaccharides and is therefore an important agarophyte on the west coast of the Atlantic Ocean. On the northeastern coast of Brazil, the populations of this species are mostly composed of individuals of the wild red color strain and some individuals of the green color strain, the latter being scarcely studied. This work characterizes and compares the physiological performance of the wild red strain and the green variant under different temperature and irradiance conditions in the laboratory. The results indicate that the green and red strains are similarly tolerant to low temperatures (18 °C) but intolerant to high temperatures (35 °C). Both strains exhibited the highest growth rate at 25 °C and high irradiance (500  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Under these conditions, photosynthetic rate and pigment content were similar in both color strains, but growth rates were higher in the red strain. Despite this difference, it is important to highlight that the green strain showed a growth rate of over 10%, which indicates that it could be used for cultures aiming to obtain products with added value.

**Key words:** physiology, *Crassiphycus corneus*, mariculture, photosynthesis, pigments.

**RESUMEN.** *Crassiphycus corneus* (J. Agardh) Gurgel, J.N. Norris et Fredericq (Gracilariales, Rhodophyta) es una de las especies de algas que posee alta calidad y rendimiento de polisacáridos, y es una importante agarofita de la costa oeste del océano Atlántico. En las costas del noreste brasileño, las poblaciones de esta especie están compuestas, en su mayoría, por individuos de linaje salvaje de color rojo, así como por algunos de coloración verde, de los cuales estos últimos han sido escasamente estudiados. Este trabajo caracteriza y compara el desempeño fisiológico de los linajes rojo salvaje y la variante verde de *C. corneus* en diferentes condiciones de temperatura e irradiancia en laboratorio. Los resultados indican que los linajes verdes y rojos son similarmente tolerantes a bajas temperaturas (18 °C) e intolerantes a las altas temperaturas (35 °C). La mayor tasa de crecimiento en ambos linajes fue observada a 25 °C y alta irradiancia (500  $\mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). En esas últimas condiciones, la tasa fotosintética y el contenido pigmentario fue similar en ambos linajes, pero las tasas de crecimiento fueron mayores en el linaje rojo. A pesar de esta diferencia en el crecimiento, se destaca que el linaje verde presentó tasa de crecimiento por sobre el 10%, lo cual podría permitir que sea utilizado con fines de cultivo para obtener productos con valor agregado.

**Palabras clave:** fisiología, *Crassiphycus corneus*, maricultura, fotosíntesis, pigmentos.

### INTRODUCTION

Species in the Gracilariaceae family, including those within the genera *Gracilaria* Greville, *Crassiphycus* Guiry, Gurgel, J.N. Norris et Fredericq, and *Agarophyton* Gurgel, J.N. Norris et Fredericq, are among the most commonly used algae in the production of agar (Oliveira et al. 2000, Kim et al. 2017). Globally, the production of this phycocolloid comes from species that are harvested from natural populations; however, some species in this family have been cultivated

### INTRODUCCIÓN

Algunas especies de la Familia Gracilariaceae, incluidas aquellas de los géneros *Gracilaria* Greville, *Crassiphycus* Guiry, Gurgel, J.N. Norris et Fredericq y *Agarophyton* Gurgel, J.N. Norris et Fredericq, son algunas de las algas más utilizadas para la producción de agar (Oliveira et al. 2000, Kim et al. 2017). A nivel mundial, la producción de este ficocoloide proviene de especies extraídas de bancos naturales; sin embargo, algunas especies de esta familia han sido cultivadas

on a commercial scale for several years in countries such as Chile and Indonesia (Bixler and Porse 2011). In Brazil, agar is produced mainly from species that are extracted from natural populations since, despite the efforts, there have been no promising results in cultivating these agarophytes on a commercial scale. However, extractive practices have been combined with artisanal culturing, a joint practice that has played an important role in the economy of coastal communities (Carneiro et al. 2011).

Algae are highly mutable organisms (Lobban and Harrison 1994), a feature that can affect phenotypic expressions such as growth, morphology, and color. In this context, thalli of the same species with different colors are frequent in the wild, possibly as a result of expressions of adaptation to the environment or a genotypic pigment variant (Navarro 2015). Pigment variants have been reported in several species of red macroalgae, including *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamouroux (Yokoya et al. 2003), *Palmaria palmata* (Linnaeus) Weber et Mohr (Pueschel and van der Meer 1984), *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty (De Paula et al. 1999, Aguirre-von-Wobeser et al. 2001), *Mazzaella laminarioides* (Bory) Fredericq (Navarro 2015), *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie (Plastino et al. 1999), *Crassiphycus birdiae* (Plastino et al. E.C. Oliveira) Gurgel, J.N. Norris et Fredericq (Plastino et al. 2004), *Crassiphycus caudatus* (J. Agardh) Gurgel, J.N. Norris et Fredericq (Faria and Plastino 2016), and *Crassiphycus corneus* (Ferreira et al. 2006). The study of different strains of Gracilariaceae species on the Brazilian coast has contributed to knowledge on the functional diversity of each species and to the selection of strains most suitable for culture (Ferreira et al. 2006, Ursi et al. 2013, Araújo et al. 2014).

*Crassiphycus corneus* is distributed in the western Atlantic Ocean from Bermuda, across the Gulf of Mexico, and down to Cabo Frio, Brazil (Bird et al. 1986). Given the quality and yield of its agar (Freile-Pelegrín et al. 2002), *C. corneus* together with *C. birdiae* has been used as a main source of raw material for agar production in Brazil (Plastino and Oliveira 2002). Some of its physiological aspects have been studied: growth under laboratory conditions (Navarro-Angulo and Robledo 1999), photosynthesis and pigments (Dawes et al. 1999), ultraviolet-absorbing compounds (Sinha et al. 2000), agar quality (Freile-Pelegrín et al. 2002), and reproduction (Guzmán-Urióstegui and Robledo 1999, Orduña-Rojas et al. 2002). However, none of these studies have approached intraspecific diversity. On the northeastern coast of Brazil, the *C. corneus* populations are composed of mostly individuals of the wild red color strain and some individuals of the green color strain. Since it was first discovered, the green color strain has been scarcely studied in relation to its physiological performance under different temperature and irradiance conditions.

Temperature and irradiance play a crucial role in different biological processes at different levels and determine

a escala comercial desde hace varios años en países como Chile e Indonesia (Bixler y Porse 2011). En Brasil, la producción de agar se basa principalmente en especies extraídas de bancos naturales, ya que a pesar de los esfuerzos realizados, no se han tenido resultados promisorios para cultivar estas agarófitas a escala comercial. Sin embargo, la actividad extractiva se ha conjugado con el cultivo artesanal, lo cual juega un papel importante en la economía de comunidades costeras (Carneiro et al. 2011).

Las algas son organismos altamente mutables (Lobban y Harrison 1994), lo que puede afectar expresiones fenotípicas como el crecimiento, la morfología y la pigmentación. En este contexto, los talos de una especie de diferentes colores son frecuentes en la naturaleza y pueden ser producto de expresiones de adecuación al ambiente o una variante genotípica pigmentar (Navarro 2015). Las variantes pigmentarias han sido reportadas en varias especies de macroalgas rojas, incluidas *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamouroux (Yokoya et al. 2003), *Palmaria palmata* (Linnaeus) Weber et Mohr (Pueschel y van der Meer 1984), *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty (De Paula et al. 1999, Aguirre-von-Wobeser et al. 2001), *Mazzaella laminarioides* (Bory) Fredericq (Navarro 2015), *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie (Plastino et al. 1999), *Crassiphycus birdiae* (Plastino et al. E.C. Oliveira) Gurgel, J.N. Norris et Fredericq (Plastino et al. 2004), *Crassiphycus caudatus* (J. Agardh) Gurgel, J.N. Norris et Fredericq (Faria y Plastino 2016) y *Crassiphycus corneus* (Ferreira et al. 2006). El estudio de diferentes linajes de especies de la familia Gracilariaceae en la costa brasileña ha contribuido al conocimiento de la diversidad funcional de cada una de las especies, así como de la selección de linajes más adecuados para el cultivo (Ferreira et al. 2006, Ursi et al. 2013, Araújo et al. 2014).

*Crassiphycus corneus* se distribuye en el océano Atlántico occidental desde las islas Bermudas, a través del golfo de México y hasta cabo Frío en Brasil (Bird et al. 1986). Debido a la calidad y el rendimiento de su agar (Freile-Pelegrín et al. 2002), *C. corneus*, al igual que *C. birdiae*, es la principal fuente utilizada para la producción de agar en Brasil (Plastino y Oliveira 2002). Algunos aspectos de su fisiología han sido estudiados: crecimiento en condiciones de laboratorio (Navarro-Angulo y Robledo 1999), fotosíntesis y pigmentos (Dawes et al. 1999), compuestos que absorben luz ultravioleta (Sinha et al. 2000), calidad de agar (Freile-Pelegrín et al. 2002) y reproducción (Guzmán-Urióstegui y Robledo 1999, Orduña-Rojas et al. 2002). Sin embargo, estos estudios no han abordado la diversidad intraespecífica. En las costas del noreste brasileño, las poblaciones de la especie están compuestas mayoritariamente por individuos de linaje salvaje de color rojo, así como por algunos de coloración verde. Desde su descubrimiento, estos últimos han sido escasamente estudiados en relación con su desempeño fisiológico bajo diferentes condiciones de temperatura e irradiancia.

La temperatura y la irradiancia juegan un rol importante en diferentes procesos biológicos a diferentes niveles y

the vertical and latitudinal distribution of algae (Lobban and Harrison 1994). Irradiance governs growth (provides energy for photosynthesis) and has photoperiodic and photomorphogenic effects (Hurd et al. 2014). Temperature, on the other hand, affects processes such as photosynthesis and respiration because of its direct influence on the speed of all enzymatic, electron transport, and solute movement reactions in algal cells and its influence on the properties of cellular components such as lipids, proteins, and carbohydrates (Davison 1991, Hurd et al. 2014). Knowing the requirements and tolerance of a given species regarding these factors is an important aspect of cultivation. In the case of color variants, the study of temperature and light requirements and tolerance levels could reveal valuable information on the presence of strains that are resistant to environmental variations. While some studies suggest that most pigment variants have lower biological adaptation than wild specimens, as variants are less robust and have lower growth and survival rates (van der Meer 1990), other studies have shown that variants and wild strains have similar physiological capabilities when exposed to the same conditions of irradiance, nutrients, temperature, etc. (Aguirre-von-Wobeser et al. 2001, Ferreira et al. 2006, Ursi et al. 2013). Given the commercial value of *C. corneus* and the importance of color strains to the study of genetics and intraspecific variability, this study aimed to characterize and compare the physiological performance of the green variant and the wild red strains of *C. corneus* under different temperature and irradiance conditions in the laboratory. The tested hypothesis was that the green strain would exhibit a similar physiological performance as specimens of the red color strain under different temperature and irradiance conditions.

## MATERIALS AND METHODS

### General culture conditions

Green variant and wild red strain tetrasporophytes of *C. corneus* from Meireles Beach (Fig. S1) (3°32' S, 41°42' W), Fortaleza, Ceará State, northeastern Brazil, were obtained from the Gracilariaceae Germplasm Bank in the Édison José de Paula Seaweed Laboratory, Institute of Biosciences, University of São Paulo, Brazil. Biological material was cultured in sterile seawater (absolute salinity of 32) enriched with 12.5% von Stosch solution (Ursi and Plastino 2001). Algae were kept in a controlled environment at  $25 \pm 1$  °C and a photoperiod of 14 h light. Photosynthetically active radiation, provided by fluorescent lamps (Osram 40W), was maintained at  $200 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Algae were kept under alternating aeration periods of 30 min. These conditions were used after having observed the results obtained for other Gracilariaceae species in our laboratory. Algae were kept under these conditions for 8 months in order to obtain enough material to start the experiments.

determinan la distribución vertical y latitudinal de las algas (Lobban y Harrison 1994). La irradiancia, por su parte, gobierna el crecimiento (provee la energía para la fotosíntesis) y tiene efectos fotoperiódicos y fotomorfogenéticos (Hurd et al. 2014). La temperatura, por otra parte, afecta procesos como la fotosíntesis y la respiración debido a que tiene injerencia sobre la velocidad de todas las reacciones enzimáticas, de transporte de electrones y de movimiento de solutos dentro de las células de las algas, e influye en las propiedades de los componentes celulares como lípidos, proteínas y carbohidratos (Davison 1991, Hurd et al. 2014). Conocer los requerimientos y la tolerancia de una especie determinada con relación a estos factores es un aspecto importante para el cultivo. En el caso de variantes de color, el estudio de requerimientos y tolerancia con respecto a la temperatura y la irradiancia puede revelar información valiosa sobre la presencia de linajes que son resistentes a las variaciones de factores ambientales. En este sentido, mientras algunos trabajos sugieren que la mayoría de las variantes pigmentarias tienen una menor adecuación biológica con relación a los ejemplares salvajes, al ser menos robustas y presentar menores tasas de crecimiento y supervivencia (van der Meer 1990), otros han mostrado que las variantes presentan capacidades fisiológicas similares a las de los linajes salvajes cuando son expuestas a las mismas condiciones de irradiancia, nutrientes, temperatura, etc. (Aguirre-von-Wobeser et al. 2001, Ferreira et al. 2006, Ursi et al. 2013). Debido al valor comercial de *C. corneus*, así como a la importancia del estudio de los linajes de color en genética y la variabilidad intraespecífica, este estudio tuvo como objetivo caracterizar y comparar el desempeño fisiológico de los linajes rojo salvaje y la variante verde de *C. corneus* bajo diferentes condiciones de temperatura e irradiancia en laboratorio. La hipótesis fue que el linaje verde exhibiría similar desempeño fisiológico al de los ejemplares del linaje rojo bajo las distintas condiciones de temperatura e irradiancia probadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Condiciones generales de cultivo

Los tetrasporófitos de la variante de color verde y los tetrasporófitos salvajes de coloración roja de *C. corneus* de playa Meireles (Fig. S1) (3°32' S, 41°42' W), Fortaleza, estado de Ceará, noreste de Brasil, fueron obtenidos del Banco de Germoplasma de Gracilariaceae del laboratorio de Algas Marinas Édison José de Paula del Instituto de Biociências de la Universidade de São Paulo, Brasil. El material biológico fue cultivado en agua de mar estéril (salinidad absoluta de 32) enriquecida con una solución de 12.5% von Stosch (Ursi y Plastino 2001). Las algas fueron mantenidas en un ambiente controlado a  $25 \pm 1$  °C y con fotoperiodo de 14 h de luz. La radiación fotosintéticamente activa fue de  $200 \mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y provista por lámparas fluorescentes

## Experimental design

Three experiments were performed considering both the green and red strains. The first aimed to observe and compare the physiological performance of both strains at 3 different temperatures (18, 25, and 35 °C; 60  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ); the second aimed to assess the growth of both strains at 25 °C under high irradiance (500  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ); and the third aimed to determine the photosynthetic rates of both strains under the conditions of the second experiment and to compare the data with the values obtained for specimens exposed to 25 °C and 200  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

### Growth at different temperatures

Eighteen 800-mL flasks containing 0.01 g (five 3-cm long apical segments per flasks) of both green and red strains were prepared (3 replicas per strain for each temperature treatment). These experimental units were cultured during 21 d at different temperatures (18, 25, and 35  $\pm$  1 °C) and 60  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , with a 14-h photoperiod; the culture medium was changed weekly. Fresh biomass was measured for each strain in each treatment at the beginning of the experiment and then weekly to calculate the daily relative growth rate (described below).

### Growth at 25 °C and high irradiance

Both strains were subjected to 25 °C and a high irradiance of 500  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  under the same general laboratory conditions. Ten 800-mL flasks (5 replicates per strain) containing five 1.5-cm long apical segments each were prepared (0.06 g of each strain per flask). Fresh biomass was recorded at the beginning of the experiment and then weekly (during 21 d) to calculate RGR. At the end of the experiment, the contents of chlorophyll *a*, phycoerythrin, and phycocyanin were determined for each strain.

### Photosynthesis and respiration

For this experiment, both strains were previously cultured at 25 °C and 500  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  during 21 d (experiment 2). The light and dark bottle method (Littler and Arnold 1985, Thomas 1988) was used to measure gross and net photosynthesis ( $\mu\text{mol O}_2\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}\cdot\text{h}^{-1}$ ; FW, fresh weight) and respiration rates after algae were cultivated for a certain amount of time. The incubation bottles were prepared using 300 mg of fresh biomass, 170 mL of filtered seawater, and 2 mL of  $\text{NaHCO}_3$ . Light and dark bottles were distributed into 2 irradiance treatments: 200 and 500  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (3 replicates per treatment). Bottles with no algae were used as the control. The incubation period was 35 min at 25  $\pm$  1 °C. Before and after this incubation period, the dissolved  $\text{O}_2$  value was recorded using a portable oximeter (YSI 58

(Osram 40W). Las algas se mantuvieron con alternancias de periodos de aireación de 30 min. Estas condiciones fueron utilizadas después de haber observado resultados obtenidos para otras Gracilariales en nuestro laboratorio. En estas condiciones, las algas fueron mantenidas por 8 meses para obtener material suficiente para iniciar los experimentos.

### Diseño experimental

Tres experimentos fueron realizados considerando los linajes verde y rojo. El primero tuvo por objetivo conocer y comparar el desempeño fisiológico de ambos linajes a 3 temperaturas (18, 25 y 35 °C; 60  $\mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ); el segundo fue realizado para evaluar el crecimiento de ambos linajes a 25 °C y en una condición de alta irradiancia (500  $\mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ); y el tercero tuvo por objetivo determinar las tasas fotosintéticas de ambos linajes en las condiciones del segundo experimento y contrastar los resultados con aquellos obtenidos para ejemplares de ambos linajes en las condiciones de 25 °C y 200  $\mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

### Crecimiento a diferente temperatura

Se prepararon 18 frascos de 800 mL con aproximadamente 0.01 g de ápices (5 ápices de 3 cm de longitud por frasco) de los linajes verde y rojo (3 réplicas por linaje para cada temperatura). Estas unidades experimentales fueron cultivadas durante 21 d a diferentes temperaturas (18, 25 y 35  $\pm$  1 °C) y a 60  $\mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  con un fotoperiodo de 14 h de luz; el medio de cultivo fue cambiado semanalmente. Al inicio y semanalmente, la biomasa de cada linaje en cada tratamiento fue registrada con el fin de obtener la tasa de crecimiento diario relativo (descrita más abajo).

### Crecimiento a 25 °C y alta irradiancia

Los linajes fueron sometidos a 25 °C y alta irradiancia de 500  $\mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  bajo las mismas condiciones generales de cultivo. Para esto, se prepararon 10 matraces de 800 mL (5 réplicas por linaje) con 5 ápices de 1.5 cm de longitud en su interior (0.06 g de cada linaje por matraz). Al inicio y semanalmente (durante 21 d), la biomasa fue registrada, con el fin de calcular la tasa de crecimiento diario relativo. Finalizado el experimento, a partir de cada linaje, se determinó el contenido de clorofila *a*, ficoeritrina y ficocianina.

### Fotosíntesis y respiración

Para este experimento, los linajes fueron cultivados previamente por 21 d a 25 °C y 500  $\mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (experimento 2). El método de botellas claras y oscuras (Littler y Arnold 1985, Thomas 1988) fue usado para medir la fotosíntesis bruta y neta ( $\mu\text{mol O}_2\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}\cdot\text{h}^{-1}$ ; MF, masa fresca, peso alga en gramos) y la respiración después de

with an automatic electrode (YSI 5905). The initial O<sub>2</sub> value in each bottle was adjusted to 4 mg of O<sub>2</sub> per liter of seawater.

### Relative growth rate

Daily relative growth rate (RGR) was calculated according to the following equation:

$$\text{RGR} = [(B_f/B_i)^{1/T} - 1] \times 100\% \quad , \quad (1)$$

where B<sub>f</sub> is final biomass, B<sub>i</sub> is initial biomass, and T is time (Yong et al. 2013).

### Pigment content

Samples 300 mg in weight (FW, n = 3) were ground in liquid nitrogen in darkness. The powder was dissolved in 2 mL of phosphate buffer (0.05 M, pH 5.5) at 4 °C. The crude extracts were then centrifuged at 44,000 × g for 20 min at 4 °C, and the supernatant, which contained phycobiliproteins, was analyzed with a spectrophotometer (HP8452A). The pellet, which contained chlorophyll a, was dissolved in 90% acetone and centrifuged at 12,000 × g for 15 min. The supernatant was analyzed with a spectrophotometer. Phycocyanin (PC) and phycoerythrin (PE) concentrations were calculated according to Kursar et al. (1983):

$$\text{PC} = (151.1 \times A_{614}) - (99.1 \times A_{651}) \quad , \quad (2)$$

$$\text{PE} = (155.8 \times A_{498.5}) - (40.0 \times A_{614}) - (10.5 \times A_{651}) \quad . \quad (3)$$

Chlorophyll a (Chla) was calculated according to Ritchie (2008):

$$\text{Chla} = 11.406 \times (A_{664} - A_{750}) \quad . \quad (4)$$

### Photosynthetic rates

Photosynthetic rates were calculated using the O<sub>2</sub> concentrations in each incubation bottle according to the following equations:

$$\text{Np} = \text{GP} - \text{RE} \quad , \quad (5)$$

where Np is net photosynthesis, GP is gross photosynthesis, and RE is respiration;

$$\text{GP} = (F_c/T)/\text{FW} \quad , \quad (6)$$

where F<sub>c</sub> is the O<sub>2</sub> level in the light bottle: (O<sub>2</sub> final – O<sub>2</sub> initial) × volume;

$$\text{RE} = (F_o/T)/\text{FW} \quad , \quad (7)$$

que las algas fueran cultivadas por un periodo determinado. Las botellas de incubación fueron preparadas considerando 300 mg de MF y 170 mL de agua de mar filtrada y 2 mL de NaHCO<sub>3</sub>. Las botellas de incubación, tanto la clara como la oscura, fueron distribuidas en 2 tratamientos de irradiancia: 200 y 500 μmol foton·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (3 réplicas por tratamiento). Las botellas sin alga fueron usadas como control. El periodo de incubación fue de 35 min a 25 ± 1 °C. Antes y después del periodo de incubación, el valor de O<sub>2</sub> disuelto fue registrado utilizando un oxímetro portátil (YSI 58) acoplado a un electrodo (YSI 5905). El valor inicial del O<sub>2</sub> en cada botella fue ajustado a 4 mg de O<sub>2</sub> por cada litro de agua.

### Tasa de crecimiento diario

Para realizar el cálculo de la tasa de crecimiento diario relativo (TCR), se utilizó la fórmula:

$$\text{TCR} = [(M_f/M_i)^{1/T} - 1] \times 100\% \quad , \quad (1)$$

donde M<sub>f</sub> es la masa final, M<sub>i</sub> es la masa inicial y T es el tiempo (Yong et al. 2013).

### Composición pigmentaria

Muestras de 300 mg (MF, n = 3) fueron maceradas en nitrógeno líquido en oscuridad. El polvo fue diluido en tampón de fosfato (0.05 M, pH 5.5) a 4 °C. Posteriormente, el material fue centrifugado a 44,000 × g por 20 min a 4 °C y el sobrenadante, que contenía ficobiliproteínas, fue analizado en un espectrofotómetro (HP8452A). El gránulo, que contenía la clorofila a, fue resuspendido en acetona al 90% y centrifugado a 12,000 × g por 15 min, y el sobrenadante fue analizado espectrofotométricamente. La concentración de ficocianina (FC) y la de ficoeritrina (FE) fueron calculadas de acuerdo con Kursar et al. (1983):

$$\text{FC} = (151.1 \times A_{614}) - (99.1 \times A_{651}) \quad , \quad (2)$$

$$\text{FE} = (155.8 \times A_{498.5}) - (40.0 \times A_{614}) - (10.5 \times A_{651}) \quad . \quad (3)$$

La clorofila a (Cla) se calculó de acuerdo con Ritchie (2008):

$$\text{Cla} = 11.406 \times (A_{664} - A_{750}) \quad . \quad (4)$$

### Tasa fotosintética

Las tasas fotosintéticas fueron calculadas con base en las concentraciones de O<sub>2</sub> registradas en cada botella de incubación, de acuerdo con las siguientes fórmulas:

$$\text{Fl} = \text{FB} - \text{RE} \quad , \quad (5)$$

where  $F_0$  is the  $O_2$  concentration in the dark bottle:  $(O_2 \text{ final} - O_2 \text{ initial}) \times \text{volume}$ .

### Statistical analysis

The RGRs recorded in experiments 1 and 2 were analyzed with a repeated measures one-way analysis of variance (ANOVA). A two-way ANOVA (strain and irradiance) was used to determine differences between photosynthetic rates. In all cases, the Newman–Keuls test (95% confidence level) was used *a posteriori* to establish statistical differences. Before performing ANOVA, normality was tested using the Kolmogorov–Smirnov test, whereas the homogeneity and homoscedasticity of variances were tested using the Cochran test. Pigment concentration was analyzed considering the means using Student's *t*-test. All statistical analyses were performed using Statistica 7 (Statsoft Inc; Tulsa, Oklahoma, USA).

## RESULTS

### Growth at different temperatures

Both the green and red strains of *C. corneus* were not tolerant to 35 °C, exhibiting necrosis and death in the first week of culture (Fig. 1). Both strains, on the other hand, were tolerant to 18 °C and showed similar RGRs (Table 1). Detailed analysis of RGRs (weeks 1–3) showed variations through time (Fig. 1). In the first 7 d green specimens exhibited higher RGR (8%) than red specimens (4%); however, this difference disappeared as the experiment continued. Higher RGRs were observed for both strains at 25 °C. At this temperature, no differences in the RGR of both strains were observed throughout the experiment (Fig. 1, Table 1).

### Growth at 25 °C and high irradiance

The red strain showed higher growth rates than the green strain when they were cultured at 25 °C and 500  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $P < 0.05$ , Fig. 2). Detailed analysis of RGRs (weeks 1–3) showed progressive decrease in RGR in both strains over time. Differences between both strains were observed in the second and third week, with the red strain showing the highest growth rate (Fig. 2). At the end of the experiment, no differences were observed in the chlorophyll *a* and phycobiliprotein concentrations between the green and red strains (Table 2).

### Photosynthetic rates

Green and wild red strains showed no differences in photosynthetic rates between the irradiance treatments (Fig. 3, Table 1).

donde  $F_l$  es la fotosíntesis líquida,  $F_B$  es la fotosíntesis bruta y  $RE$  es la respiración;

$$F_B = (F_c/T)/MF \quad , \quad (6)$$

donde  $F_c$  es el nivel de  $O_2$  en la botella clara:  $(O_2 \text{ final} - O_2 \text{ inicial}) \times \text{volumen}$ ;

$$RE = (F_o/T)/MF \quad , \quad (7)$$

donde  $F_o$  es la concentración  $O_2$  en la botella oscura:  $(O_2 \text{ final} - O_2 \text{ inicial}) \times \text{volumen}$ .

### Análisis estadístico

Las TCR registradas en los experimentos 1 y 2 fueron analizadas usando un análisis de varianza (ANDEVA) de mediciones repetidas de un factor. El ANDEVA de 2 factores (linaje e irradiancia) fue utilizado para determinar diferencias entre las tasas fotosintéticas. Para todos los casos, la prueba *a posteriori* de Newman–Keuls (95% nivel de confianza) fue utilizada para determinar las principales diferencias. Previo al ANDEVA, la normalidad de datos fue verificada usando la prueba de Kolmogorov–Smirnov, mientras que la homogeneidad y la homoscedasticidad de varianza fueron verificadas usando la prueba de Cochran. La concentración pigmentaria fue analizada considerando las medias con la prueba de *t* de Student. Los análisis fueron realizados con Statistica 7 (Statsoft Inc; Tulsa, Oklahoma, EUA).

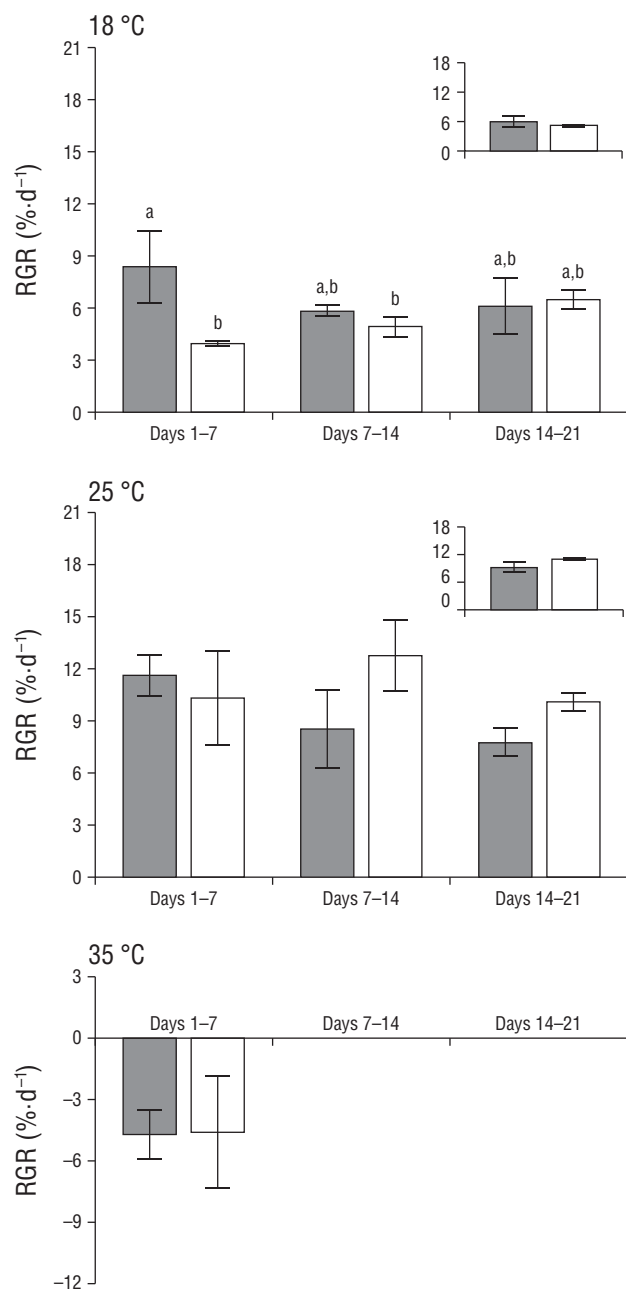
## RESULTADOS

### Crecimiento a diferente temperatura

Los ápices de ambos linajes de *C. corneus* fueron intolerantes a 35 °C y presentaron necrosis y muerte en la primera semana de cultivo (Fig. 1). Ambos linajes, por otra parte, fueron tolerantes a 18 °C y mostraron TCR similares (Tabla 1). Un análisis detallado de las TCR (semanas 1 a 3) mostró variación a lo largo del tiempo (Fig. 1). En los primeros 7 d, los ejemplares verdes (8%) crecieron significativamente más que los rojos (4%); no obstante, esa diferencia desapareció conforme continuó el experimento. Mayores TCR para ambos linajes fueron observadas a 25 °C. No se observaron diferencias entre las TCR de ambos linajes en el tiempo (Fig.1, Tabla 1).

### Crecimiento a 25 °C y a mayor irradiancia

Los ápices del linaje rojo presentaron mayor crecimiento que el linaje verde cuando fueron cultivados a 25 °C y 500  $\mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $P < 0.05$ , Fig. 2). Un análisis detallado de las TCR (semanas 1 a 3) mostró una disminución



**Figure 1.** Daily relative growth rates (RGR, percent fresh weight per day) for red (white bars) and green (gray bars) strains of *Crassiphycus corneus* cultured under 3 temperature treatments (18, 25, and 35 °C) at 60  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  for 21 d. Insert shows total RGR during the experimental period in each treatment. Data are expressed as mean values ( $\pm$  standard deviation of the mean,  $n = 3$ ). Different letters indicate differences at  $P < 0.05$ .

**Figura 1.** Tasa de crecimiento diario relativo (RGR, porcentaje de masa fresca por día) de los linajes rojo (barras blancas) y verde (barras grises) de *Crassiphycus corneus* cultivada bajo 3 tratamientos de temperatura (18, 25 y 35 °C) a 60  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  durante 21 d. El gráfico inserto muestra la RGR total durante el periodo completo de experimentación en cada tratamiento. Datos expresados como valores medios ( $\pm$  desviación estándar,  $n = 3$ ). Las letras diferentes indican diferencias con  $P < 0.05$ .

progresiva de la TCR en ambos linajes a través del tiempo. Se observaron diferencias entre ambos linajes en la segunda y la tercera semana de cultivo, con mayor crecimiento en el linaje rojo (Fig. 2). Al finalizar el experimento, la concentración de clorofila *a*, así como la de ficobiliproteínas, fue similar en ambos linajes (Tabla 2).

### Tasa fotosintética

Los ápices de la variante verde y del linaje salvaje de coloración roja no presentaron diferencias en la tasa fotosintética bajo las irradiancias probadas (Fig. 3, Tabla 1).

### DISCUSIÓN

Los linajes verde y rojo de *C. corneus* no presentaron diferencias en el contenido pigmentario ni en la tasa fotosintética en las condiciones probadas. Sin embargo, las TCR fueron disímiles a lo largo del periodo estudiado, principalmente a 25 °C y alta irradiancia. Estos resultados permiten rechazar, parcialmente, nuestra hipótesis debido a la semejanza en el desempeño fisiológico en muchas de las condiciones probadas.

Las tasas fotosintéticas de ambos linajes fueron similares en las irradiancias probadas (200 y 500  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Estos resultados concuerdan con lo observado en los morfotipos rojo y verde de *K. alvarezii*, para los cuales las curvas de fotosíntesis-irradiancia fueron similares (Aguirre-von-Wobeser et al. 2001). La semejanza en las tasas fotosintéticas podría reflejar la concentración pigmentaria de ambos linajes. De hecho, los linajes verde y rojo de *C. corneus* (el presente estudio), *C. birdiae* (Costa y Plastino 2011) y *K. alvarezii* (Aguirre-von-Wobeser et al. 2001) presentaron similar contenido de clorofila *a*. En el caso de los morfotipos rojo y verde de *K. alvarezii*, tampoco se observaron diferencias en el contenido de FE, pero sí un alto contenido de alofococianina y FC en el morfotipo verde (Aguirre-von-Wobeser et al. 2001). La diferencia en el contenido de ficobiliproteínas, según Aguirre-von-Wobeser et al. (2001), podría ser la razón por la cual el morfotipo verde no presenta la típica coloración roja de los representantes del filo Rhodophyta. Por otra parte, Doty et al. (1987), mencionaron que la pigmentación verde en los morfotipos de *K. alvarezii* es el resultado de niveles bajos de FE. Por otro lado, Guimarães et al. (2003) y Costa y Plastino (2011) observaron una baja concentración de FE en individuos verdes de *G. domingensis* y *C. birdiae*, lo cual podría conferirles una baja viabilidad, que finalmente podría reflejar la escasa presencia de esta variante en el campo. En este sentido, van der Meer (1990) sugiere que la mayoría de las variantes pigmentarias en *Gracilaria tikvahiae* tienen una menor adecuación biológica con relación a los ejemplares salvajes, ya que las variantes pigmentarias son menos robustas y tienen menores tasas de crecimiento y menor supervivencia. Esto parece concordar con lo observado en

**Table 1.** Analysis of variance (ANOVA) and significance for the main effects and interactions between factors for daily Relative Growth Rate (RGR, in experiments 1 and 2) and for photosynthesis (experiment 3) for the green and red strains of *Crassiphycus corneus*. The repeated measures ANOVA was used to analyze the RGR over time in experiments 1 and 2, and the one-way ANOVA was used to determine differences between strains during the entire period (1–21 d). Two-way ANOVA was used to determine differences between the photosynthesis values (experiment 3). Bold values indicate differences at  $P < 0.05$ .

**Tabla 1.** Análisis de Varianza (ANDEVA) y significancia para los principales efectos y la interacción de factores para la tasa de relativa de crecimiento diario (RGR, en experimentos 1 y 2) y para los valores de fotosíntesis (experimento 3) de los linajes verde y rojo de *Crassiphycus corneus*. Para analizar la RGR en el tiempo en los experimentos 1 y 2, se utilizó un ANDEVA de medidas repetidas, y para determinar diferencias entre linajes durante el periodo total (1–21 d), se utilizó un ANDEVA de un factor. Para determinar las diferencias entre los valores de fotosíntesis (experimento 3), se utilizó un ANDEVA de 2 factores. Los valores en fuente negrilla corresponden a diferencias significativas con  $P < 0.05$ .

Experiment and variable	Source of variation	d.f.	F-value	P-value
Growth (experiment 1)				
RGR (18 °C)	Strain (A)	1	24.770	<b>0.007</b>
	Time (B)	2	0.880	0.451
	A × B	2	5.440	<b>0.003</b>
RGR (18 °C, 1–21 d)	Strain	1	1.180	0.338
RGR (25°C)	Strain (A)	1	5.370	0.081
	Time (B)	2	2.060	0.189
	A × B	2	3.420	0.084
RGR (25 °C, 1–21 d)	Strain	1	5.330	0.082
Growth (experiment 2)				
RGR (25 °C)	Strain (A)	1	12.640	<b>0.007</b>
	Time (B)	2	103.960	<b>&gt;0.001</b>
	A × B	2	3.650	<b>0.049</b>
RGR (25 °C, 1–21 d)	Strain	1	5.330	0.082
Photosynthesis under different irradiances (experiment 3)				
	Irradiance (A)	1	1.735	0.224
	Strain (B)	1	0.941	0.361
	A × B	1	3.245	0.109

## DISCUSSION

Green and red strains of *C. corneus* showed no differences in pigment content or in photosynthetic rates under the tested conditions. However, RGRs were different throughout the study, generally at 25 °C and under high irradiance. These results allow us to partially reject our hypothesis because

*C. corneus*, mas solo para las condiciones de 25 °C y alta irradiancia (500  $\mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Importante de resaltar es la tolerancia a 18 °C, principalmente del linaje verde, el cual alcanzó una TCR del 8% en los primeros 7 d de cultivo. Según Dawes et al. (1999), *C. corneus* presenta baja tolerancia a temperaturas por debajo de 15 °C, ya que las temperaturas bajas promueven una baja tasa fotosintética.



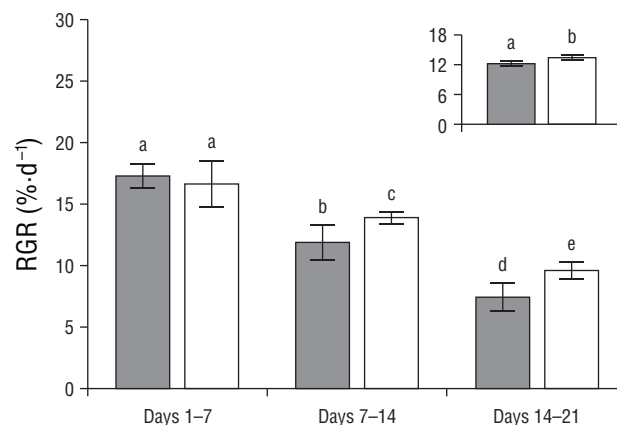
physiological performance was similar under many of the tested conditions.

Photosynthetic rates in both the green and red strains were similar under the tested irradiances (200 and 500  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). These results are in agreement with those reported for red and green morphotypes of *K. alvarezii*, for which the photosynthesis–irradiance curves were similar (Aguirre-von-Wobeser et al. 2001). Similarity in photosynthetic rates could be related to the pigment concentration in both strains. In fact, red and green strains of *C. corneus* (this study), *C. birdiae* (Costa and Plastino 2011), and *K. alvarezii* (Aguirre-von-Wobeser et al. 2001) showed similar chlorophyll *a* contents. In the case of the red and green morphotypes of *K. alvarezii*, no differences were observed in PE content, but high allophycocyanin and PC contents were observed for the green morphotype (Aguirre-von-Wobeser et al. 2001). According to Aguirre-von-Wobeser et al. (2001), differences in phycobiliprotein contents could explain the absence of the typical red color of Rhodophyta in the green morphotype. On the other hand, Doty et al. (1987) suggested that the green color in *K. alvarezii* morphotypes is the result of its low PE concentration. Guimarães et al. (2003) and Costa and Plastino (2011) observed low PE contents in green strains of *G. domingensis* and *C. birdiae*, which could give them low viability, explaining the scarce presence of these strains in the wild. Likewise, van der Meer (1990) suggested that most color variants of *Gracilaria tikvahiae* have lower biological adaptation compared to wild specimens since color variants are less robust and have lower growth and survival rates. This seems to be in agreement with the results obtained for *C. corneus*, but only when cultured under high irradiance (500  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) at 25 °C. The tolerance to 18 °C should be noted, especially so for the green strain, which reached an RGR of 8% in the first 7 d of culture. According to Dawes et al. (1999), *C. corneus* is not tolerant to temperatures below 15 °C, because low temperatures promote low photosynthetic rates.

Similar photosynthetic rates between the green and red strains of *C. corneus* could suggest similar growth rate patterns. In fact, in the first 7 d of culture at 25 °C under 60  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Fig. 1) and under 500  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Fig. 2), no differences in RGR were observed between the color strains. Nevertheless, longer culture periods promoted differences between both strains, with the green strain showing the lowest RGRs mainly under high irradiance. A similar pattern was reported for color variants of *G. tikvahiae* (van der Meer 1990), *C. birdiae* (Plastino et al. 2002), and *K. alvarezii* (Hurtado-Ponce 1995). However, *K. alvarezii* (Aguirre-von-Wobeser et al. 2001, Hayashi 2007) and *C. birdiae* (Ursi et al. 2013) cultures carried out in the field showed similar growth rates between the green variant and red specimens. In the case of *C. corneus*, the red and green strains cultured for 5 weeks showed similar growth rates when they were exposed to different nutrient concentrations and irradiances of 90 and 180  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

La ausencia de diferencias en la tasa fotosintética entre los linajes verde y rojo de *C. corneus* podría indicar un mismo patrón en la tasa de crecimiento. De hecho, en los primeros 7 d de cultivo a 25 °C a 60  $\mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Fig. 1) y a 500  $\mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Fig. 2), no se observaron diferencias entre los linajes. No obstante, el mayor tiempo en cultivo promovió diferencias entre ambos linajes, ya que la variante verde presentó las menores tasas de crecimiento, principalmente a alta irradiancia. Una tendencia similar fue observada en variantes de pigmentos de *G. tikvahiae* (van der Meer 1990), *C. birdiae* (Plastino et al. 2002) y *K. alvarezii* (Hurtado-Ponce 1995). Sin embargo, los cultivos de *K. alvarezii* (Aguirre-von-Wobeser et al. 2001, Hayashi 2007) y *C. birdiae* (Ursi et al. 2013) realizados en campo mostraron que las tasas de crecimiento fueron similares entre la variante verde y los ejemplares rojos. En el caso de *C. corneus*, los linajes verde y rojo cultivados por 5 semanas con diferentes concentraciones de nutrientes y bajo irradiancias de 90 y 180  $\mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  mostraron tasas de crecimiento similares (Ferreira et al. 2006). Un patrón similar fue observado en linajes de *M. laminarioides* cultivados a baja irradiancia en laboratorio (Navarro 2015).

Las TCR más altas para *C. corneus* fueron observadas a 25 °C bajo 500  $\mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Según McLachlan y Bird



**Figure 2.** Daily relative growth rate (RGR, percent fresh weight per day) for red (white bars) and green (gray bars) strains of *Crassiphycus corneus* cultivated under 500  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  during 21 d at 25 °C. Insert shows total RGR during the experimental period. Data are expressed as mean values ( $\pm$  standard deviation of the mean,  $n = 5$ ). Different letters indicate differences at  $P < 0.05$ .

**Figura 2.** Tasa de crecimiento diario relativo (RGR, porcentaje de masa fresca por día) de los linajes rojo (barras blancas) y verde (barras grises) de *Crassiphycus corneus* cultivada a 500  $\mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  durante 21 d a 25 °C. El gráfico inserto muestra la RGR total durante el periodo completo de experimentación. Datos expresados como valores medios ( $\pm$  desviación estándar,  $n = 5$ ). Las letras diferentes indican diferencias con  $P < 0.05$ .

**Table 2.** Pigment content ( $\text{mg}\cdot\text{g FW}^{-1}$ ; FW, fresh weight) in the red and green strains of *Crassiphycus corneus* cultivated under  $500 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  at  $25^\circ\text{C}$ . Data are expressed as mean values ( $\pm$  standard deviation of the mean,  $n = 3$ ). Student's *t*-test was used to compare the means.

**Tabla 2.** Contenido pigmentario ( $\text{mg}\cdot\text{g FW}^{-1}$ ; FW, masa fresca) en los linajes verde y rojo de *Crassiphycus corneus* cultivada en condiciones de  $500 \mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ . Datos expresados como valores medios ( $\pm$  desviación estándar,  $n = 3$ ). La prueba de *t* de Student fue aplicada para comparar las medias.

	Strain		d.f.	<i>t</i>	<i>P</i>
	Red	Green			
Chlorophyll <i>a</i>	0.092 (0.024)	0.089 (0.013)	4	-0.1325	0.9001
Phycocerythrin	0.204 (0.071)	0.274 (0.028)	4	1.5832	0.1885
Phycocyanin	0.105 (0.012)	0.136 (0.006)	4	2.1144	0.1020

(Ferreira et al. 2006). A similar pattern was observed for *M. laminarioides* color strains cultured under low irradiance in the laboratory (Navarro 2015).

The highest RGRs in *C. corneus* were observed at  $25^\circ\text{C}$  and  $500 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . According to McLachlan and Bird (1986), maximum growth potential for warm-water species like *C. corneus* is achieved at  $25$  to  $30^\circ\text{C}$ . These authors also suggest that temperatures above  $30^\circ\text{C}$  are lethal, which is consistent with our results for both color strains. Our results also concur with the average seawater temperatures in the geographic range of this species, which vary between  $23$  and  $28^\circ\text{C}$  (Orduña-Rojas et al. 2002).

Growth in *C. corneus* also seems to depend on photon flux density, since RGR values for both strains did not exceed  $13\%$  at  $60 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Fig. 1) but reached over  $18\%$  at a higher photon flux density ( $500 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) in the first 7 d of culture (Fig. 2). These differences remained until day 21 of the experiment, as RGRs did not exceed  $11\%$  at  $60 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  but were greater than  $12\%$  at  $500 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . A direct correlation between photon flux density ( $90$  and  $180 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) and RGR was also reported for *C. corneus* by Ferreira et al. (2006). However, samples from natural populations have shown a saturation irradiance of  $120 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Orduña-Rojas et al. 2002).

During the growth experiments, both strains of *C. corneus* showed a progressive decrease in RGR (Fig. 2). This decrease could be related to the increase in biomass in the same seawater volume and to the ensuing competition for nutrients and light ("shadow effect"). Ferreira et al. (2006) suggested that *C. corneus* can adapt to low nutrient concentrations, which are common in tropical oligotrophic waters. The decrease in RGR could then be related to high algal density. High algal density can decrease photosynthetic activity and consequently affect growth (Figueroa et al. 2008).

Regardless of the observed differences in RGR between both strains, the high growth rates reached by the green strain (over  $10\%$ ) when cultured at  $25^\circ\text{C}$  and under high irradiance

(1986), el potencial de crecimiento máximo para especies de aguas cálidas como *C. corneus* se da entre los  $25$  y  $30^\circ\text{C}$ . Además, estos autores sugieren que las temperaturas superiores a  $30^\circ\text{C}$  son letales, lo cual concuerda con lo observado en este trabajo para ambos linajes. También, los resultados se encuentran en concordancia con las temperaturas promedio del agua de mar en el ámbito de distribución de esta especie, que varían entre  $23$  y  $28^\circ\text{C}$  (Orduña-Rojas et al. 2002).

El crecimiento de *C. corneus* también parece depender del flujo fotónico, ya que, en ambos linajes, las TCR no superaron el  $13\%$  a  $60 \mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Fig. 1), pero fueron superiores al  $18\%$  a mayor flujo fotónico ( $500 \mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) en los primeros 7 d de cultivo (Fig. 2). Esas diferencias se mantuvieron hasta los 21 d de cultivo, pues las TCR no superaron el  $11\%$  a  $60 \mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , pero fueron superiores al  $12\%$  a  $500 \mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Ferreira et al. (2006) también reportaron una directa correlación entre el flujo fotónico ( $90$  y  $180 \mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y la TCR en *C. corneus*. Sin embargo, una irradiancia de saturación de  $120 \mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  fue obtenida para ejemplares recolectados de poblaciones naturales (Orduña-Rojas et al. 2002).

Durante los experimentos de crecimiento, se observó una disminución progresiva de la TCR para ambos linajes de *C. corneus* (Fig. 2). Esta caída se podría deber al aumento de biomasa en un mismo volumen de agua y a la subsecuente competencia por nutrientes y luz ("efecto sombra"). Ferreira et al. (2006) sugirieron que *C. corneus* se adapta a bajas concentraciones de nutrientes, las cuales son comunes en aguas oligotróficas tropicales. De esta manera, la disminución en la TCR podría estar relacionada a la alta densidad de algas. Una alta densidad de algas puede provocar una disminución en la actividad fotosintética y, finalmente, afectar el crecimiento (Figueroa et al. 2008).

Independientemente de las diferencias observadas en las TCR entre ambos linajes, es destacable que el linaje verde presentó altas tasas de crecimiento (sobre el  $10\%$ ) cuando fue cultivado a  $25^\circ\text{C}$  y alta irradiancia ( $500 \mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Estos datos, sin embargo, deben considerarse con precaución

(500  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) are noteworthy. This result, however, should be taken with caution because algae are subject to many other biotic and abiotic factors in their natural environment, all which can act synergistically or antagonistically. Information on the minimum and optimal requirements for temperature, irradiance, and nutrients is thus needed to determine the best culturing conditions for each *C. corneus* strain. This should be obtained by means of factorial experiments. Furthermore, more complete studies on the properties of the green color strain of *C. corneus* could create new research fields exploring new biotechnological alternatives with the aim to obtain natural products with added value. On that matter, an unusual galactan with high antioxidant activity was reported in green specimens of *Gigartina skottsbergii* collected from natural populations in the southern region of Chile (Barahona et al. 2012). Also, in the case of *C. birdiae*, similarities between the green and red strains were observed not only in growth but also in agar yield and quality, indicating a potential use in mariculture (Ursi et al. 2013).

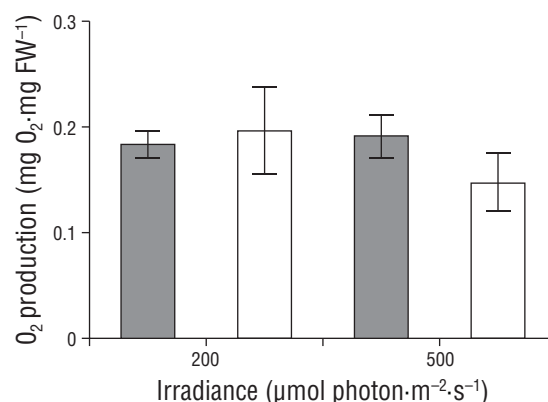
Finally, it is important to highlight that the study of color strains has contributed to the selection of models for the elucidation of physiological and biochemical processes in algae (Kursar et al. 1983, Zhang and van der Meer 1987, Santelices et al. 1996). In addition, population studies are needed to determine the frequency of strains (or the presence of others) and determine whether they have established in natural populations. Physiological studies should be conducted to understand strain performance in natural and stressful conditions, such as those predicted to arise with climate change (Navarro 2015).

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by CAPES-001, CNPq 300148/93-3 and FAPESP 2010/50.175-3 (Brazil). The authors acknowledge Rosário Petti for laboratory assistance.

#### REFERENCES

- Aguirre-von-Wobeser E, Figueroa FL, Cabello-Pasini A. 2001. Photosynthesis and growth of red and green morphotypes of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta) from the Philippines. *Mar Biol.* 138:679–686. <https://doi.org/10.1007/s002270000506>
- Araújo FO, Ursi S, Plastino EM. 2014. Intraspecific variation in *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta): growth, pigment content, and photosynthesis. *J Appl Phycol.* 26(2):849–858. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0184-3>
- Barahona T, Encinas MV, Mansilla A, Matsuhira B, Zuñiga EA. 2012. A sulfated galactan with antioxidant capacity from the green variant of tetrasporic *Gigartina skottsbergii* (Gigartinales, Rhodophyta). *Carbohydr Res.* 347(1):114–120. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.11.014>
- Bird CJ, de Oliveira EC, McLachlan J. 1986. *Gracilaria cornea*, the correct name for the western Atlantic alga hitherto known as *G. debilis* (Rhodophyta, Gigartinales). *Can J Bot.* 64(9):2045–2051. <https://doi.org/10.1139/b86-267>



**Figure 3.** Production of O<sub>2</sub> (mg O<sub>2</sub>·mg FW<sup>-1</sup>; FW, fresh weight) by red (white bars) and green (gray bars) strains of *Crassiphycus corneus* cultivated under 2 irradiance treatments (200 and 500  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) at 25 °C. Data are expressed as mean values ( $\pm$  standard error of the mean,  $n = 3$ ).

**Figura 3.** Producción de O<sub>2</sub> (mg O<sub>2</sub>·mg FW<sup>-1</sup>; FW, masa fresca) de los linajes rojo (barras blancas) y verde (barras grises) de *Crassiphycus corneus* cultivada en 2 tratamientos de irradiancia (200 y 500  $\mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) a 25 °C. Datos expresados como valores medios ( $\pm$  error estándar,  $n = 3$ ).

debido a que, en el ambiente, las algas son sometidas a muchos otros factores bióticos y abióticos que pueden actuar de manera sinérgica o antagónica. Es por ello que existe la necesidad de conocer los requerimientos mínimos y óptimos de temperatura, irradiancia y nutrientes para determinar las mejores condiciones de cultivo para cada uno de los linajes de *C. corneus*. Esto debe realizarse a través de experimentos factoriales. Por otra parte, los estudios conclusivos de las propiedades de la variante verde de *C. corneus* podrían abrir un nuevo campo de investigación relacionado a las nuevas alternativas biotecnológicas con miras a la obtención de productos naturales con valor agregado. En este sentido, un galactano inusual y con alta actividad antioxidante fue detectado en individuos verdes de *Gigartina skottsbergii* recolectada en praderas naturales de la región austral de Chile (Barahona et al. 2012). También, para el caso de *C. birdiae*, no sólo el crecimiento, sino que también el rendimiento y la calidad del agar fueron similares entre los linajes verdes y rojos, lo cual mostró un potencial uso en la maricultura (Ursi et al. 2013).

Finalmente, es importante resaltar que el estudio de linajes de pigmentos ha contribuido a la selección de modelos utilizados en la elucidación de procesos fisiológicos y bioquímicos de algas (Kursar et al. 1983, Zhang y van der Meer 1987, Santelices et al. 1996). Adicionalmente, los estudios poblacionales son necesarios para determinar la frecuencia de los linajes (o la existencia de otros), así como para determinar si están establecidos en las poblaciones naturales. A su vez, los estudios fisiológicos deben ser conducidos hacia el conocimiento del desempeño de linajes en condiciones naturales y estresantes, como aquellas pronosticadas debido al cambio climático (Navarro 2015).

- Bixler HJ, Porse H. 2011. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *J Appl Phycol.* 23(3):321–335. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9529-3>
- Carneiro MAA, Marinho-Soriano E, Plastino EM. 2011. Phenology of an agarophyte *Gracilaria birdiae* Plastino and E. C. Oliveira (Gracilariales, Rhodophyta) in Northeastern Brazil. *Rev Bras Farmacogn.* 21(2):317–322. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2011005000067>
- Costa VL, Plastino EM. 2011. Color inheritance and pigment characterization of red (wild-type), greenish-brown, and green strains of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). *J Appl Phycol.* 23(3):599–605. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9642-3>
- Davison IR. 1991. Environmental effects on algal photosynthesis: Temperature. *J Phycol.* 27(1):2–8. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1991.00002.x>
- Dawes CJ, Orduña-Rojas J, Robledo D. 1999. Response of the tropical red seaweed *Gracilaria cornea* to temperature, salinity and irradiance. *J Appl Phycol.* 10(5):419–425. <https://doi.org/10.1023/A:1008021613399>
- De Paula EJ, Pereira RTL, Ohno M. 1999. Strain selection in *Kappaphycus alvarezii* var. *alvarezii* (Solieriaceae, Rhodophyta) using tetraspore progeny. *J Appl Phycol.* 11:111–121. <https://doi.org/10.1023/A:1008085614360>
- Doty MS, Caddy JF, Santelices B. 1987. The production and use of Eucheuma. In: Doty MS, Caddy JF, Santelices B (eds.), Case studies of seven commercial seaweed resources. FAO Fisheries Technical Paper. Rome (Italy): Food and Agriculture Organization of the United Nations. p. 124–164. Paper No.: 281.
- Faria AVF, Plastino EM. 2016. Physiological assessment of the mariculture potential of a *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta) variant. *J Appl Phycol.* 28(4):2445–2452. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0761-8>
- Ferreira LB, Barufi JB, Plastino EM. 2006. Growth of red and green strains of the tropical agarophyte *Gracilaria cornea* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) in laboratory. *Rev Bras Bot.* 29(1):187–192. <https://doi.org/10.1590/s0100-84042006000100017>
- Figueroa FL, Bueno A, Korbee N, Santos R, Mata L, Schuenhoff A. 2008. Accumulation of mycosporine-like amino acids in *Asparagopsis armata* grown in tanks with fishpond effluents of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *J World Aquacult Soc.* 39(5):692–699. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2008.00199.x>
- Freile-Pelegrín Y, Robledo D, Pedersén M, Bruno E, Rönnqvist J. 2002. Effect of dark and salinity treatment in the yield and quality of agar from *Gracilaria cornea* (Rhodophyceae) = Efecto del tratamiento de oscuridad y salinidad en el rendimiento y calidad del agar de *Gracilaria cornea* (Rhodophyceae). *Cienc Mar.* 28(3):289–296. <https://doi.org/10.7773/cm.v28i3.223>
- Guzmán-Urrióstegui A, Robledo D. 1999. Factors affecting sporulation of *Gracilaria cornea* (Gracilariales, Rhodophyta) carposporophytes from Yucatan, Mexico. *Hydrobiologia.* 398/399:285–290. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-4449-0\\_33](https://doi.org/10.1007/978-94-011-4449-0_33)
- Guimarães M, Plastino EM, Destombe C. 2003. Green mutant frequency in natural populations of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. *Eur J Phycol.* 38(2):165–169. <https://doi.org/10.1080/0967026031000085878>
- Hayashi L. 2007. Contribuição a maricultura da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) para a produção de carragenana = Contribution to the mariculture of the red algae *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae)

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio recibió financiamiento a través de CAPES-001, CNPq 300148/93-3 y FAPESP 2010/50.175-3 (Brasil). Agradecemos al Sr. Rosário Petti por su colaboración en el laboratorio.

- for carrageenan production [dissertation]. [São Paulo (Brasil)]: Universidade de São Paulo. 100 p. <https://doi.org/10.11606/t.41.2007.tde-29062007-221653>
- Hurd CL, Harrison PJ, Bischof K, Lobban CS. 2014. Seaweed Ecology and Physiology. 2nd ed. Cambridge (UK): Cambridge University Press. 551 p. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139192637>
- Hurtado-Ponce AQ. 1995. Carrageenan properties and proximate composition of three morphotypes of *Kappaphycus alvarezii* Doty (Gigartinales, Rhodophyta) grown at two depths. *Bot Mar.* 38(1–6):215–219. <https://doi.org/10.1515/botm.1995.38.1-6.215>
- Kim JK, Harish C, Hwang EK, Park M, Kim Y. 2017. Seaweed aquaculture: cultivation technologies, challenges and its ecosystem services. *Algae.* 32(1):1–13. <https://doi.org/10.4490/algae.2017.32.3.3>
- Kursar TA, van der Meer J, Alberte RS. 1983. Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*: I. Biochemical analyses of pigment mutations. *Plant Physiol.* 73(2):353–360. <https://doi.org/10.1104/pp.73.2.353>
- Littler MM, Arnold KE. 1985. Electrodes and chemicals. In: Littler MM, Littler DS (eds.), Handbook of Phycological Methods—Ecological Field Methods: Macroalgae. New York: Cambridge University Press. p. 349–375.
- Lobban CS, Harrison PJ. 1994. Seaweed Ecology and Physiology. Cambridge: Cambridge University Press. 366 p. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511626210>
- McLachlan J, Bird CJ. 1986. *Gracilaria* (Gigartinales, Rhodophyta) and productivity. *Aquat Bot.* 26:27–49. [https://doi.org/10.1016/0304-3770\(86\)90004-5](https://doi.org/10.1016/0304-3770(86)90004-5)
- Navarro-Angulo L, Robledo D. 1999. Effects of nitrogen source, N:P ratio and N-pulse concentration and frequency on the growth of *Gracilaria cornea* (Gracilariales, Rhodophyta) in culture. *Hydrobiologia.* 398/399:315–320. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-4449-0\\_37](https://doi.org/10.1007/978-94-011-4449-0_37)
- Navarro NP. 2015. Presencia de variante verde de *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta) en la Región de Magallanes, Chile = Presence of green color variant of *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta) in Magallanes region, Chile. *Rev Biol Mar Oceanogr.* 50(supl. 1):193–198. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572015000200006>
- Oliveira EC, Alveal K, Anderson RJ. 2000. Mariculture of the agar-producing Gracilarioid red algae. *Rev Fish Sci.* 8(4):345–377. <https://doi.org/10.1080/10408340308951116>
- Orduña-Rojas J, Robledo D, Dawes CJ. 2002. Studies on the Tropical Agarophyte *Gracilaria cornea* J. Agardh (Rhodophyta, Gracilariales) from Yucatán, México. I. Seasonal Physiological and Biochemical Responses. *Bot Mar.* 45(5):453–458. <https://doi.org/10.1515/bot.2002.046>
- Pueschel CM, van der Meer JP. 1984. Ultrastructural characterization of a pigment mutant of the red alga *Palmaria palmata*. *Can J Bot.* 62(6):1101–1107. <https://doi.org/10.1139/b84-153>

- Plastino EM, Guimarães M, Matioli SR, Oliveira EC. 1999. Codominant inheritance of polymorphic color variants of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *Genet Mol Biol.* 22(1):105–108.  
<https://doi.org/10.1590/s1415-47571999000100020>
- Plastino EM, Oliveira EC. 2002. *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta), a new species from the tropical South American Atlantic with a terete frond and deep spermatangial conceptacles. *Phycologia.* 41(4):389–396.  
<https://doi.org/10.2216/i0031-8884-41-4-389.1>
- Plastino EM, Ursi S, Fujii MT. 2004. Color inheritance, pigment characterization, and growth of a rare light green strain of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycological Research.* 52(1):45–52.  
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2003.00324.x>
- Ritchie RJ. 2008. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls *a*, *b*, *c*, and *d* and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica.* 46(1):115–126.  
<https://doi.org/10.1007/s11099-008-0019-7>
- Santelices B, Correa JA, Meneses I, Aedo D, Varela D. 1996. Sporeling coalescence and intraclonal variation in *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *J Phycol.* 32(2):313–322.  
<https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1996.00313.x>
- Sinha RP, Klisch M, Gröniger A, Häder DP. 2000. Mycosporine-like amino acids in the marine red alga *Gracilaria cornea*: Effects of UV and heat. *Environ Exp Bot.* 43(1):33–43.  
[https://doi.org/10.1016/s0098-8472\(99\)00043-x](https://doi.org/10.1016/s0098-8472(99)00043-x)
- Thomas MLH. 1988. Photosynthesis and respiration of aquatic macro-flora using the light and dark bottle oxygen method and dissolved oxygen analyzer. In: Lobban CS, Chapman DJ, Kremer BP (eds.), *Experimental Phycology: A Laboratory Manual.* Cambridge: Cambridge University Press. p. 64–77.
- Ursi S, Costa VL, Hayashi L, Pereira RTL, Paula EJ, Plastino EM. 2013. Intraspecific variation in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): growth, and agar yield and quality of color strains under aquaculture. *Bot Mar.* 56(3):241–248.  
<https://doi.org/10.1515/bot-2012-0219>
- Ursi S, Plastino EM. 2001. Crescimento in vitro de linhagens de coloração vermelha e verde clara de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) em dois meios de cultura: análise de diferentes estádios reprodutivos. *Rev Bras Bot.* 24(4):587–594.  
<https://doi.org/10.1590/s0100-84042001000500014>
- Van der Meer JP. 1990. Genetics. In: Cole KM, Sheath R (eds.), *Biology of the Red Algae.* Cambridge: Cambridge University Press. p. 103–122.
- Yokoya NS, Plastino EM, Artel R. 2003. Physiological responses and pigment characterization of two colour strains of the carrageenophyte *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). In: Chapman ARO, Anderson RJ, Vreeland VJ, Davison IR (eds.), *Proceedings of the 17th International Seaweed Symposium; 2001 Jan 28 to Feb 2; Cape Town, South Africa.* New York: Oxford University Press. p. 425–433.
- Yong YS, Yong WTL, Anton A. 2013. Analysis of formulae for determination of seaweed growth rate. *J App Phycol.* 25(6):1831–1834.  
<https://doi.org/10.1007/s10811-013-0022-7>
- Zhang X, JP van der Meer. 1987. A study on heterosis in diploid gametophytes of the marine red alga *Gracilaria tikvahiae*. *Bot Mar.* 30:309–314.  
<https://doi.org/10.1515/botm.1987.30.4.309>

Received December 2019,  
 accepted May 2020.

SUPPLEMENTARY MATERIAL



**Figure S1.** Red and green strains of *Crassiphycus corneus* sharing the same ecological niche. Photograph taken on the coast of the Paracurú municipality (Ceará, Brazil), a site near Meireles Beach.

**Figura S1.** Linajes rojo y verde de *Crassiphycus corneus* que están compartiendo nicho ecológico. Fotografía tomada en la costa del municipio de Paracurú (Ceará, Brasil), localidad próxima a playa Meireles.