

Otimização de culturas stock de *kelp* para aplicação em esforços de reflorestação

Inês Amorim dos Santos
Mestrado em Recursos Biológicos Aquáticos
Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
2022/2023

Orientador
Tânia Pereira, Investigadora, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (FCUP)

Coorientadores
Silvia Chemello, Investigadora, Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR)
Doutora Isabel Sousa Pinto, Investigadora, CIIMAR

Este trabalho foi suportado pelo **Ocean3R:** *"Reduce pressures, restore and regenerate the NW-Portuguese ocean and waters"* (NORTE-01-0145-FEDER-000064), apoiado pelo Programa Operacional Regional Norte de Portugal (NORTE 2020), no âmbito do Acordo de Parceria PORTUGAL 2020 e através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional. Para além do Ocean3R, também foi apoiado pelo projeto **Blueforests**: *"Seaforests for blue carbon – natural capital from nature-based solutions"* financiado pelos EEA Grants (PT-INNOVATION-0081).







Publicações Associadas à Presente Dissertação de Mestrado

Este trabalho foi apresentado nas seguintes comunicações:

- Evento Final *OCEAN3R*- 27 junho 2023, Terminal de Cruzeiros do Porto de Leixões – CIIMAR, Porto, Portugal (comunicação em forma de poster);
- Conferência *"Blue Think Conference"* - 13 setembro 2023, Terminal de Cruzeiros do Porto de Leixões – CIIMAR, Porto, Portugal (comunicação oral).

Um artigo com os resultados da tese será submetido para publicação, ao volume especial da revista *Water Research*: "Optimising kelp cultivation to scale-up habitat restoration efforts: effect of different densities on "*green gravel*" production".

À minha avó Maria e à Dona Esmeralda, grandes mulheres, a quem dedico este trabalho com eternas saudades.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (FCUP), pela oportunidade de realizar o Mestrado em Recursos Biológicos Aquáticos, e ao Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR), por me acolher tão bem.

Estou muito grata à Doutora Isabel Sousa Pinto por me receber como estudante e por me dar a oportunidade de fazer parte do Laboratório de Biodiversidade Costeira. Quero deixar um agradecimento especial à minha orientadora, Tânia Pereira, e à minha coorientadora Silvia Chemello, que foram verdadeiros pilares para mim durante esta jornada. Obrigada por me ensinarem tanto, pelo apoio constante, paciência incansável, disponibilidade e compreensão ao longo da minha dissertação. Que todos os alunos tenham a sorte de encontrar orientadores tão especiais! Agradeço a todos os membros da LBC pelo apoio e boa disposição: a presença de um ambiente de trabalho agradável é crucial e faz toda a diferença.

Quero agradecer aos meus amigos da FCUP, nomeadamente ao António Labela, Henrique e às minhas queridas amigas Cheyenne e Joana. Obrigada por todo o apoio, pelas conversas sobre tudo e nada, e por não me deixarem desanimar nos momentos difíceis.

Por último, mas não menos importante, gostaria de expressar a minha profunda gratidão à minha família. Aos meus queridos pais, irmã, avós e ao meu cunhado Tiago, por me darem apoio e amor incondicional: sou quem sou graças a vocês. Obrigada por me ensinarem tanto e por acreditarem sempre em mim, mesmo nos momentos em que eu própria duvidava. Não posso deixar de agradecer ao meu namorado Ricardo, pelo amor, compreensão e por ser o meu melhor amigo e companheiro em todos os momentos.

A todos, o meu sincero obrigada!

Resumo

As florestas de *kelp* estão entre os ecossistemas mais diversos e produtivos em mares temperados e polares em todo o mundo. Contudo, sofreram um declínio global nas últimas décadas, fruto em parte de uma exploração severa das áreas costeiras e das alterações climáticas.

Com este trabalho, pretendeu-se otimizar a preparação de culturas *stock* de *kelp* e aumentar a eficiência dos esforços de reflorestação. Este objetivo é bastante importante, na medida em que a recolha constante de material reprodutivo tem impactos na população difíceis de mensurar. Ao tornar os métodos de reflorestação mais eficientes, também possibilita que estes sejam ampliados e aplicáveis em condições reais.

Foi estudada a sazonalidade das espécies de *kelp Laminaria ochroleuca* e *Laminaria hyperborea*, ambas formadoras de florestas perenes no Norte de Portugal. Com base na proporção de indivíduos reprodutivos no campo, densidade e viabilidade dos esporos recolhidos, a melhor altura para recolher esporos para produzir culturas *stock* da *L. ochroleuca* parece ser em torno de abril, e da *L. hyperborea* em torno de março.

Foram testados métodos de desinfeção no tecido reprodutivo de *L. ochroleuca* (ultrassons e solução de iodo). Apesar de não ter sido possível avaliar a eficiência dos ultrassons e do iodo como métodos de desinfeção, não foi identificado um efeito negativo na libertação ou na viabilidade dos esporos.

Além disso, foi avaliado o impacto de diferentes níveis de stress osmótico nos esporos em cultura. Na primeira experiência, foram testados 1h e 12h ao ar a 5ºC. O tecido reprodutivo deve ser exposto ao ar a 5ºC durante 1h para maximizar a libertação e viabilidade dos esporos. Na segunda experiência, foram testados 30 minutos, 1h e 2h fora de água a 5ºC. Para maximizar a libertação e garantir maior viabilidade dos esporos, os resultados indicam que o mais recomendável será expor o tecido reprodutivo a 5ºC durante 2 horas.

Foi testada a técnica *green gravel* com duas densidades diferentes de gametófitos de *L. ochroleuca*. Os tanques com altas densidades apresentaram maior recrutamento, maior crescimento dos indivíduos cultivados e as contaminações com espécies oportunistas ocuparam uma menor área. Nos tanques com baixas densidades, observou-se menor recrutamento, menor crescimento dos indivíduos e as espécies oportunistas colonizaram uma maior área.

Por último, avaliou-se a adequação de dois tipos de fibras naturais (fio de sisal e fibra de algodão) para o cultivo de *L. ochroleuca*, sendo útil tanto para esforços de reflorestação como para produção de *kelps*. A fibra de algodão parece ser uma alternativa mais sustentável, capaz de assegurar os mesmos níveis de produtividade que o fio de polipropileno, ao contrário da fibra de sisal.

Os resultados deste trabalho fornecerão informações relevantes para a reflorestação de *kelps*, que cada vez mais têm recebido interesse de instituições. Ao melhorar a eficiência de cultivo destas macroalgas, irá simultaneamente despertar o interesse do setor empresarial envolvido na produção de *kelps*.

Palavras-chave: cultivo de *kelp*, *Laminaria ochroleuca*, *Laminaria hyperborea*, reflorestação

Abstract

Kelp forests are among the most diverse and productive ecosystems in temperate and polar seas around the world. However, they have suffered a global decline in recent decades, partly because of severe exploitation of coastal areas and climate change.

This work aimed to optimize the preparation of kelp stock cultures and increase the efficiency of reforestation efforts. This is very important, as the constant collection of reproductive material has impacts on the population that are difficult to measure so this should be done in the most efficient way possible. This will also allow for reforestation methods to be scaled up and applied in real conditions.

The seasonality of the kelp species *Laminaria ochroleuca* and *Laminaria hyperborea*, both of which form perennial forests in northern Portugal, was studied. Based on the proportion of reproductive individuals in the field, density and viability of the spores collected, the best time to collect spores to produce stock cultures of *L. ochroleuca* appears to be around April and for *L. hyperborea* around March.

Disinfection methods were tested on *L. ochroleuca* reproductive tissue, namely with ultrasound and povidone-iodine solution, to obtain sterile cultures. Although it was not possible to evaluate the efficiency of ultrasound and iodine as disinfection methods, a negative effect on spore release or viability was not identified.

Furthermore, the impact that different levels of osmotic stress have on the survival and development of spores in the culture was evaluated. In the first experiment, 1h and 12h were tested outside water at 5ºC. Reproductive tissue should be exposed to air at 5ºC for 1h to maximize spore release and viability. In the second experiment, 30 minutes, 1 hour and 2 hours were tested outside water at 5ºC. To maximize release and ensure spore viability, it is recommended to expose the reproductive tissue to 5ºC for 2 hours.

The *green gravel* technique was tested with two different gametophyte densities of *L. ochroleuca*. Tanks with high densities showed greater recruitment, greater growth of cultivated individuals and the contamination with opportunistic species occupied a smaller area. In tanks with low densities, there was less recruitment, less growth of individuals and opportunistic species colonized a larger area.

Finally, the suitability of two types of natural fibers (sisal fiber and cotton fiber) for the cultivation of *L. ochroleuca* was evaluated, being useful for both reforestation efforts and

kelp production. Cotton fiber appears to be a more sustainable alternative capable of ensuring the same levels of productivity as polypropylene yarn, unlike sisal fiber.

The results of this work provided relevant information for kelp reforestation, which is increasingly receiving interest from institutions. By improving the cultivation efficiency of these macroalgae, it will also simultaneously arouse the interest of the business sector involved in kelp production.

Keywords: kelp cultivation, *Laminaria ochroleuca*, *Laminaria hyperborea*, reforestation

Índice

1. Introdução 9

1.1 Florestas marinhas..... 9

1.2 Serviços ecossistémicos das florestas marinhas 10

1.3 Como se reproduzem os *kelps*? 11

1.4 Aplicações dos *kelps* 12

1.5 *Laminaria ochroleuca* 13

1.6 *Laminaria hyperborea* 15

1.7 Alterações climáticas e o declínio das florestas marinhas 16

1.8 Recuperação das florestas marinhas 16

1.9 Objetivos 18

2. Materiais e métodos 17

2.1 Como preparar uma cultura stock de *kelps* 19

2.2 Experiência 1: Sazonalidade da *Laminaria ochroleuca* 19

2.3 Experiência 2: Sazonalidade da *Laminaria hyperborea* 21

2.4 Experiência 3: Desinfeção do tecido reprodutivo – Solução de iodo 22

2.5 Experiência 4: Desinfeção do tecido reprodutivo − Ultrassons 23

2.6 Experiência 5: Libertação dos esporos (diferentes níveis de stress osmótico) .. 24

2.7 Experiência 6: Técnica de *green gravel* 25

2.8 Experiência 7: Teste de fibras naturais 27

3. Resultados 29

4. Discussão 40

5. Conclusão 46

6. Referências bibliográficas 48

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Total de indivíduos reprodutivos e não reprodutivos (*L. ochroleuca*)……29

Gráfico 2 - Total de indivíduos observados na costa Norte……30

Gráfico 3- Total de indivíduos reprodutivos e não reprodutivos (*L. hyperborea*)…….31

Gráfico 4- Total de indivíduos observados na praia de Vila Chã……..…….31

Gráfico 5- Densidade inicial de esporos (média ± erro padrão)..... 33

Gráfico 6 - Densidade de esporos obtida com 1h e 12h a 5ºC..... 34

Gráfico 7- Densidade de esporos obtida com diferentes tempos de dessecação……..35

Gráfico 8- Tamanho dos recrutas de *L. ochroleuca* (média ± erro padrão) consoante as diferentes densidades..... 37

Gráfico 9- Tamanho semanal dos recrutas de *L. ochroleuca* (média ± erro padrão)….37

Gráfico 10- Número de recrutas de *L. ochroleuca* (média ± erro padrão) nos diferentes tipos de fibras 39

Lista de Figuras

Figura 1- Distribuição global de florestas de *kelps* por géneros……10

Figura 2- Ciclo de vida de uma *kelp*……...12

Figura 3- *L. ochrole*uca na praia Norte (Viana do Castelo)……13

Figura 4- Morfologia de *L. ochroleuca*..... 14

Figura 5- *L. hyperborea* na praia de Mindelo 15

Figura 6- Representação esquemática da técnica "*green gravel*" 17

Figura 7- Armazenamento de gametófitos de *L. ochroleuca* num tubo t……19

Figura 8- Esporos germinados visualizados através de microscópio invertido……...19

Figura 9- Trabalho de campo na praia Norte (Silvia Chemello)……..20

Figura 10- *L. ochroleuca* na praia de Vila Chã (Silvia Chemello)……..20

Figura 11- Registo do estado reprodutivo da *L. ochroleuca* (Silvia Chemello)……20

Figura 12- *L. hyperborea* (Silvia Chemello)……...21

Figura 13- Soluções da experiência do *green gravel* 25

Figura 14- Tanques do CIIMAR utilizados para a experiência de *green gravel* 26

Figura 15- Exemplar de tanque *green gravel*……..….26

Figura 16- *Green gravel* na última semana observado sob um estereoscópio 27

Figura 17- Tubos com fio de sisal……27

Figura 18- Tubos com malha 27

Figura 19- Tubos com fio de polipropileno 27

Figura 20- Tanques do BOGA utilizados para a experiência das fibras……..28

Figura 21- Disposição dos tubos num tanque 28

Figura 22- Primeiros recrutas observados no cascalho…….. 36

Figura 23- Primeiros recrutas observados no fio de sisal e na malha 38

1. Introdução

1.1 Florestas marinhas

Os habitats marinhos rochosos de baixa profundidade das regiões temperadas e frias, nomeadamente em todo o Hemisfério Norte, são dominados pelos *kelps*. Nos trópicos, o único local onde se encontram em grande quantidade é no Mar dos Sargaços do Atlântico (Pires C., 2016). Como estas algas marinhas necessitam diretamente da disponibilidade de luz solar para realizar a sua fotossíntese, a sua distribuição é restringida pela profundidade. No Atlântico Norte e Pacífico Norte, habitam águas até cerca de 30 m. No Mediterrâneo ou nas ilhas e montes submarinos, onde se verifica intensa luminosidade, distribuem-se até aos 120 m (Assis et al., 2011).

As macroalgas castanhas fazem parte da classe Phaeophyceae e são maioritariamente marinhas (Clinton J. Dawes, 1998). Variam muito na sua forma, podendo ir desde simples filamentos até formas grandes e complexas (Fletcher, 1987). Este grupo abrange as algas de grandes dimensões e com diversas fisionomias, destacando-se as algas do género *Laminaria* como sendo as maiores e mais complexas, também conhecidas como *kelps* (Makkar et al., 2016; Wei et al., 2013).

Kelps, maioritariamente da ordem Laminariales, são grandes macroalgas castanhas capazes de formar florestas marinhas. Podem crescer e produzir rapidamente uma grande quantidade de biomassa (Mann, 1973; Krumhansl & Scheibling, 2012), criando uma estrutura tridimensional (Wernberg et al., 2005). A coloração dos *kelps* varia do verde azeitona ou castanho-esverdeado até ao castanho-escuro pelo domínio da fucoxantina (Lobban & Harrison, 1997), um carotenóide pertencente ao grupo das xantofilas. A fucoxantina é um pigmento conhecido como um metabólito secundário produzido nos cloroplastos das algas castanhas que funciona como um complexo de absorção de luz, sendo fundamental tanto para a fotossíntese como para a fotoproteção das algas.

Apesar de cada espécie ter uma coloração característica, esta pode variar de acordo com o stress, fases do ciclo de vida, habitat, condições ambientais, altura do ano e senescência (Lobban & Harrison, 1997).

Em Portugal, podem-se encontrar alguns *kelps*, nomeadamente *Laminaria hyperborea, Laminaria ochroleuca, Saccorhiza polyschides, Saccharina latissima, Undaria pinnatifida, Phyllariopsis brevipes* e *Phyllariopsis purpurascens* (Assis et al., 2011).

Relativamente às espécies de Laminaria, em latitudes mais altas, são altamente sazonais (Kain (Jones), 1989). Por este motivo, durante o inverno e a primavera, o seu crescimento é mais pronunciado, uma vez que os nutrientes estão mais disponíveis. Durante o verão, crescem lentamente e a energia destina-se para a esporogénese (Chapman & Craigie, 1977; Mann, 1973). Em latitudes mais baixas, como Norte de Portugal, as espécies de Laminaria exibem uma sazonalidade menos rigorosa (Kain (Jones), 1989). Como tal, verifica-se uma produção quase constante de tecido reprodutivo (Pereira et al., 2019).

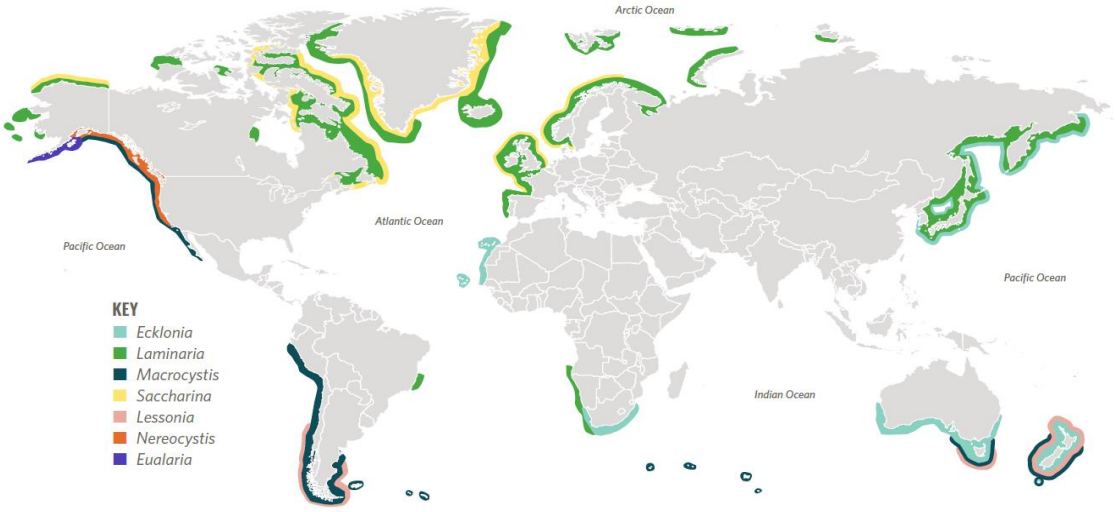


Figura 1- Distribuição global de florestas de *kelps* por géneros (Eger et al., 2022).

Quando os *kelps* estão presentes em elevadas densidades, formam as florestas marinhas (figura 1). São consideradas espécies estruturantes de um dos habitats mais ricos da Terra, formando ecossistemas ricos e produtivos (Angel & Ojeda, 2001).

1.2 Serviços ecossistémicos das florestas marinhas

As florestas de *kelps,* bem como os recifes de corais e as pradarias de ervas marinhas, são muito importantes para inúmeras espécies marinhas. Os *kelps* desempenham um papel fundamental na produção primária. As dimensões que os caracterizam também fornecem habitat, abrigo contra predadores e berçário para a biota associada, incluindo espécies de elevado valor comercial (Mann, 1973). Abalone, caranguejos, ouriços-do-mar, lagostas e peixes são algumas das espécies que dependem destas florestas (Bennett et al., 2016; Bertocci et al., 2015; Britton-Simmons et al., 2012). Além disso, conferem proteção contra stress térmico e dessecação (Jenkins et al., 1999; Raffo et al., 2014). Ao criarem um ecossistema favorável para as

espécies marinhas, os *kelps* são considerados “engenheiros” dos ecossistemas marinhos (Buschmann et al., 2007).

Os organismos que constituem as florestas de *kelps* exercem um papel ativo nos ciclos biogeoquímicos marinhos através do sequestro de carbono (Duarte et al., 2013; Smith, 1981). Ao absorver e fixar o carbono, amortecem os efeitos das alterações climáticas (Pires C., 2016). As florestas marinhas criam uma barreira eficaz contra a erosão costeira (Løvås & Tørum, 2001) e afetam a sedimentação (Ugarte et al., 2010).

São considerados indicadores úteis de qualidade ambiental. Como as macroalgas são sésseis, refletem as alterações da qualidade da água no decorrer do tempo, quer em termos de abundância como de composição (Ballesteros et al., 2007; Krause-Jensen et al., 2007), ou seja, reagem às mudanças na concentração de nutrientes e da hidromorfologia que ocorre na praia. O facto de conseguirem eliminar poluentes tóxicos confere-lhes um potencial no tratamento de águas residuais (Lodeiro et al., 2005).

Adicionalmente influenciam inúmeras áreas (pesca, saúde, alimentação e cosmética) e estimulam o turismo e identidade cultural, favorecendo atividades como mergulho e *snorkeling* para a observação da biodiversidade marinha envolvente. Os *kelps* têm sido historicamente utilizados pelas comunidades costeiras como fonte de alimentação e rendimento, desempenhando um papel significativo na cultura do país. Alguns *kelps* oferecem benefícios para a saúde humana, despertando o interesse do setor industrial em extrair os seus compostos (Buschmann et al., 2014).

1.3 Como se reproduzem os *kelps*?

Os *kelps* têm um ciclo biológico constituído por dois estágios distintos: um gametófito haploide microscópico e um esporófito diploide macroscópico. A fase gametófita é formada por poucas células e só são visíveis ao microscópio, produzindo gâmetas. Já a fase esporófita é possível observar no meio natural, produzindo esporos (Assis et al., 2011).

Na natureza, o desenvolvimento dos esporófitos ocorre durante as estações Inverno-Primavera. Já a estação reprodutiva típica dá-se entre o Verão e o Outono, resultando em inúmeros indivíduos reprodutivos. Durante o Verão, o crescimento da lâmina cessa ou diminui drasticamente e no começo do Outono, o esporófito atinge maturidade e entra em período fértil (Pereira et al., 2011). O esporófito ao estar maduro produz esporos (visíveis no centro da lâmina). O tecido reprodutivo (sori) vai-se desintegrar libertando os esporos (Chapman, 1987; Kinlan et al., 2003). Estes, após se instalarem num

substrato, desenvolvem-se em gametófitos haploides masculinos ou femininos (Pereira et al., 2011). Os gâmetas masculinos (espermatozoides) têm dois flagelos que, ao serem atraídos por uma hormona sexual, lhes possibilitam nadar no fundo do mar até aos gâmetas femininos (óvulos) e fertilizá-los. Após ocorrer a fertilização, forma-se um zigoto que se vai desenvolver num novo esporófito diploide que inicia um novo ciclo (Pereira et al., 2011) (figura 2).

Consoante a expectativa de vida do esporófito, as espécies de algas podem ser classificadas como anuais ou plurianuais (perenes) (Birkett et al., 1998; T. Pereira et al., 2011).

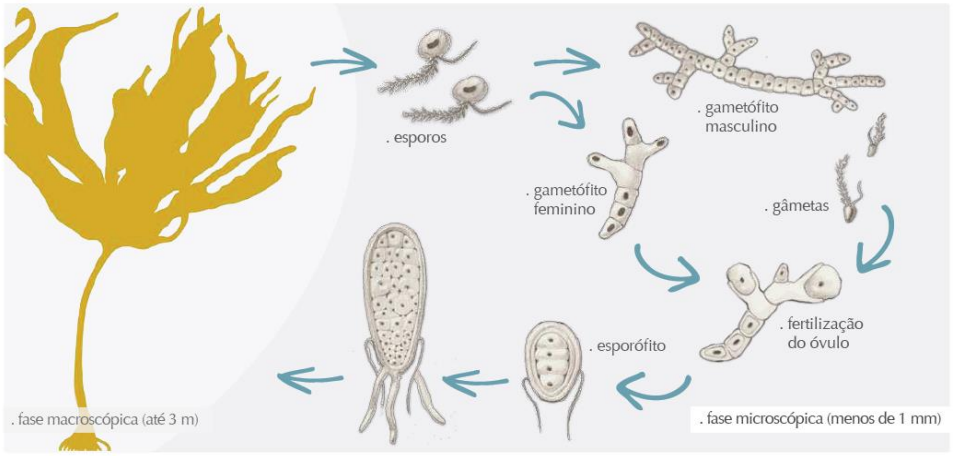


Figura 2- Ciclo de vida de uma *kelp* (Assis et al., 2011).

1.4 Aplicações dos *kelps*

Nos últimos séculos, os *kelps* foram explorados como biofertilizantes e bioestimulantes (Assis et al., 2011). Atualmente, alguns *kelps* têm importância económica por serem propícias à extração de ficocolóides na forma de alginatos (Rioux, 2010). O alginato é um polissacarídeo natural que tem sido explorado nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética, nutracêutica e têxtil (Jackson & Winant, 1983; Løvås & Tørum, 2001).

Estas algas são reconhecidas como sendo uma boa fonte de biomassa para a produção de biocombustíveis, graças ao seu rápido crescimento, alta produtividade, abundância e facilidade de cultivo (Adams et al., 2009; Vivekanand et al., 2012).

Na aquacultura, as suas aplicações podem ir desde suplementos alimentares até biofiltração de efluentes (Castro et al., 2009; Neori et al., 2004).

Os géneros com especial interesse económico são Laminaria (*L. hyperborea*, *L. digitata*), Durvillaea, Macrocystis.

As macroalgas castanhas são das mais comercializadas mundialmente e têm ganho cada vez mais reconhecimento pelas bioatividades dos compostos que apresentam e por serem um alimento com inúmeros benefícios (Rioux, 2010).

1.5 *Laminaria ochroleuca*

Laminaria ochroleuca (figura 3) foi caracterizada por *Bachelot de la Pylaie* em 1824. Apresenta uma elevada semelhança morfológica com *Laminaria hyperborea*, e como tal, assume-se uma biologia semelhante a esta (Birkett et al., 1998).

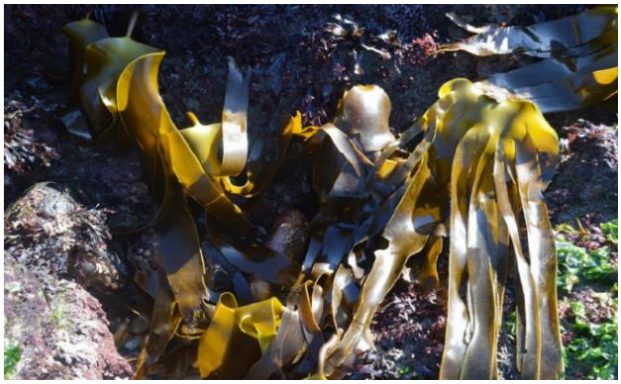


Figura 3- *L. ochroleuca* na praia Norte (Viana do Castelo) (Pires B., 2019).

Esta *kelp* apresenta uma distribuição em águas mais quentes, em oposição da maioria das Laminariales (Franco et al., 2018; Smale et al., 2015). De forma geral, a sua distribuição geográfica estende-se do Atlântico Norte (costa este das Ilhas Britânicas) até à região da África equatorial ao longo da Macaronésia, também no Mediterrâneo e na zona do Estreito de Messina. É a principal espécie perene presente na costa Ibérica (Pires. C, 2016). É uma espécie prevalente no Norte de Portugal (Pereira et al., 2017; Tuya et al., 2012). Nesta região, exibe uma sazonalidade menos rigorosa, com produção quase constante de pequenos sori (Pereira et al., 2019).

Habita poças intertidais profundas e subtidais altas até 30 m de profundidade, sendo que vários exemplares criam as florestas de *kelps* (Birkett et al., 1998). Normalmente encontra-se em fundos rochosos de zonas abrigadas ou de moderado hidrodinamismo (Assis et al., 2011). Apesar de ser mais raro, pode povoar áreas mais profundas, mas sempre dependente da luminosidade e da temperatura (Birkett et al., 1998).

L. ochroleuca é uma alga que se situa perto da costa e com uma temperatura limitante elevada e, como tal, está ambientada a concentrações de nutrientes elevadas. Em temperaturas ótimas (10-15°C) e com disponibilidade de nutrientes, consegue aproveitar os nutrientes eficazmente. Todavia, fora da faixa térmica ótima, esta *kelp* parece ser capaz de acumular nutrientes de reserva, mas não de utilizá-los para assegurar o crescimento (Bartsch et al., 2008; Birkett et al., 1998).

Apresenta uma coloração castanho-amarelado de aspeto brilhante. Apesar das semelhanças morfológicas com a *Laminaria hyperborea*, distinguem-se pela típica coloração amarelada na zona da união da lâmina com o estipe. A lâmina é dividida em várias fitas. O estipe é cilíndrico com um diâmetro significativo, não muito comprido, bastante flexível e não rugoso. Os rizoides são grandes, ramificados e juntam-se criando uma base cónica rija com uma elevada espessura (pode atingir até 18 cm de diâmetro). Esta base encontra-se sempre bem fixa a um substrato rochoso. Ainda que seja uma espécie perene, perde e renova a lâmina anualmente (figura 4) (Pires C., 2016).



Figura 4- Morfologia de *L. ochroleuca* (Assis et al., 2011).

- **Ciclo de vida**

L. ochroleuca é uma alga plurianual, ficando fértil após 2-6 anos, e pode durar até 18 anos. Uma vez que o seu metabolismo é plurianual, não carece de um ritmo tão intenso, iniciando a esporogénese após o segundo ano (Bartsch et al., 2008; Birkett et al., 1998). O seu ciclo de vida é típico dos *kelps* (Chapman, 1987; Kinlan et al., 2003). Estudos indicam que, quando as condições ambientais são desfavoráveis, os esporos desta alga podem-se manter numa fase de desenvolvimento interrompido ou lento por meses. Quando as condições se tornam favoráveis, retomam o seu crescimento (Chapman, 1987; Santelices et al., 2002).

Assim, os esporófitos parecem apresentar um padrão de crescimento anual dividido em períodos de crescimento rápido e períodos de reprodução (Buchholz & Lüning, 1999; Lüning et al., 2000; Skriptsova & Titlyanov, 2003).

1.6 *Laminaria hyperborea*

A *Laminaria hyperborea* é uma espécie perene que pode durar até 18 anos e habita o intertidal até 30 m de profundidade (Assis et al., 2011). Esta *kelp* é típica das costas rochosas das águas frias do Norte da Europa. Habita recifes rochosos no nordeste do Atlântico Nordeste, desde Svalbard até ao norte de Portugal (Assis et al., 2009; Kain & Jones, 1971; Lüning, 1980). A sua reprodução, na costa portuguesa, é restrita de fevereiro a maio (Assis et al., 2011). É capaz de sobreviver entre 0 e 20ºC. No entanto, a sua reprodução fica prejudicada em temperaturas acima de 15°C (Lüning, 1980).

As lâminas são escuras, castanhas, firmes e anualmente cresce uma nova lâmina. O seu comprimento varia consoante a idade, a localização e com a estação do ano, podendo alcançar os 2 m. O estipe da alga é cilíndrico, rugoso e muito rígido e está ligado a rizoides pequenos que a fixam ao substrato. Por norma, o estipe é mais comprido com um aumento da profundidade. É uma espécie com grande semelhança morfológica com *a L. ochroleuca*. No entanto, como o estipe da *L. hyperborea* é rugoso, possibilita a presença de epífitas (figura 5) (Assis et al., 2011).



Figura 5- *L. hyperborea* na praia de Mindelo. Presença da epífita *Palmaria Palmata* nos estipes (Pires B., 2019).

1.7 Alterações climáticas e o declínio das florestas marinhas

As alterações contínuas nos padrões climáticos estão a exercer impactos significativos nos ecossistemas marinhos. O aquecimento da temperatura do mar, a acidificação dos oceanos, o aumento quer do nível do mar como da estratificação da água do mar, o degelo e a frequência de tempestades altamente destrutivas são os principais fatores de stress (IPCC, 2023).

As florestas de *kelps* diminuíram mundialmente e, em alguns casos, quase desapareceram completamente de uma região (Fujita, 2011; Johnson et al., 2011). Estudos têm relatado que a *L. ochroleuca* pode estar a propagar-se em direção aos polos face às alterações climáticas e que no futuro pode substituir outras espécies de Laminaria (Franco et al., 2015, 2017, 2018; Smale et al., 2015). O aumento da temperatura da água do mar tem prejudicado a produção local de esporos, conduzindo ao declínio destas *kelps* em baixas latitudes (Fernández, 2011; Voerman et al., 2013). A restrição de *L. ochroleuca* será ainda mais intensa pela redução da intensidade do fenómeno de *upwelling* que aconteceu ao longo da Península Ibérica nas últimas décadas (Lemos & Pires, 2004; Llope et al., 2007; Sydeman et al., 2014). Esta espécie perene, outrora espalhada por Portugal continental, tem sofrido alterações na sua distribuição e abundância. Atualmente, está restrita à região norte, sendo escassa no centro e praticamente inexistente no sul de Portugal (Assis et al., 2009; Pinho et al., 2015; Tuya et al., 2012). Esta tendência deriva de um aumento da temperatura da água do mar (Lemos & Pires, 2004). No caso da *L. hyperborea*, estudos indicam que, nas últimas décadas, o limite de distribuição de baixa latitude desta espécie também se tem deslocado em direção aos polos (Pérez-Ruzafa et al., 2003).

No futuro, prevê-se que haja um agravamento das alterações climáticas e tanto podem ocorrer mudanças ainda mais percetíveis na faixa de distribuição dos *kelps* como os povoamentos existentes podem-se limitar a habitats mais profundos (Roleda et al., 2004). Como tal, são necessários esforços de reflorestação para combater e atenuar as florestas marinhas em declínio.

1.8 Recuperação das florestas marinhas

As mudanças climáticas estão a modificar o funcionamento dos ecossistemas, levando a uma redução da biodiversidade tanto à escala local como global (Halpern et al., 2019; Vörösmarty et al., 2010). A Assembleia Geral das Nações Unidas decretou

2021-2030 como a “Década das Nações Unidas para a Recuperação dos Ecossistemas” (Waltham et al., 2020). Como tal, é inadiável a otimização e ampliação de técnicas de restauração para reabilitar os ecossistemas degradados.

Os métodos utilizados para restaurar as florestas subaquáticas baseiam-se essencialmente em semear ou transplantar *kelps*. De forma geral, semear envolve a dispersão direta de uma cultura de *kelps* e/ou crescimento da fase juvenil destas algas no oceano. O método “s*pore bags*” (ou “*mesh bags*”) é uma técnica de reflorestação na qual se utilizam sacos de malha com tecido reprodutivo viável, os quais são introduzidos no ambiente marinho para permitir a libertação natural dos esporos. Outra abordagem inclui transplantar indivíduos de áreas doadoras saudáveis para os locais escolhidos para a reflorestação (Eger et al., 2022).

“*Green gravel*” é uma nova técnica que visa restaurar florestas de *kelps*. Consiste em semear gametófitos em pequenas pedras (como granito e calcário), cultivá-los em laboratório (condições controladas) e posteriormente introduzi-los no mar (figura 6). Os juvenis destas algas desenvolvem-se tanto no cascalho como no substrato subjacente (Eger et al., 2022).

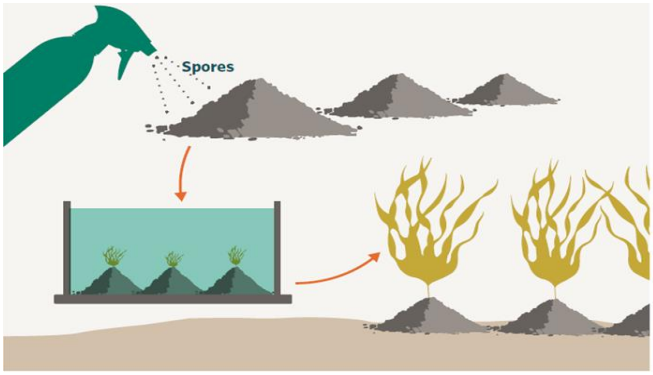


Figura 6- Representação esquemática da técnica "*green gravel*” (Eger et al., 2022)

A maioria dos métodos tradicionais de reflorestação consistem em transplantar indivíduos de um dado local para outro, levando a grandes impactos nas populações doadoras. *Green gravel* consiste na recolha de material reprodutivo para obter novos indivíduos, não comprometendo a biomassa natural. Além disso, é uma técnica de baixo custo, baixa manutenção e escalável. Consequentemente, é considerada uma técnica económica e sustentável com grande potencial de restauração (Eger et al., 2022; Fredriksen et al., 2020).

O cultivo de *kelps* em cordas de cultura é outra técnica de restauração. Consiste em semear gametófitos em fibras (nylon e polipropileno), cultivá-los em laboratório e posteriormente transferi-los para o mar. Esta técnica é considerada um método de cultivo viável por vários estudos. Todavia, o cultivo bem-sucedido foi alcançado através do uso de meios artificiais como cordas de polipropileno (Forbord et al., 2012; Peteiro et al., 2014), não sendo uma solução ecológica a longo prazo para o meio ambiente. Tanto pode ser aplicado em esforços de reflorestação como para produção de *kelps*.

1.9 Objetivos

As florestas marinhas sofreram um declínio global nas últimas décadas e continuam a diminuir em todo o mundo. Como tal, há uma necessidade urgente de aplicar métodos de reflorestação.

Os principais objetivos deste estudo foram otimizar a preparação de culturas *stock* de *kelp* e aumentar a eficiência dos esforços de reflorestação. As técnicas de reflorestação não devem prejudicar as populações naturais; devem ser economicamente viáveis, de baixa manutenção e logisticamente simples.

Foi estudada a sazonalidade das *kelps Laminaria ochroleuca* e *Laminaria hyperborea* no Norte de Portugal. Para isso, foram avaliados três fatores: proporção de indivíduos reprodutivos no campo, densidade e viabilidade dos esporos recolhidos.

Em laboratório, foram testados dois métodos de desinfeção no tecido reprodutivo de *L. ochroleuca*: solução de iodo e ultrassons. Em seguida, foi avaliado, em duas experiências, o impacto de diferentes níveis de stress osmótico nos esporos em cultura.

Foi testada a técnica *green gravel* com baixa e alta densidades de gametófitos de *L. ochroleuca*. Ainda foi avaliada a adequação de fibras alternativas (fio de sisal e fibra de algodão) como substrato para os gametófitos de *L. ochroleuca* se fixarem e desenvolverem.

Os resultados deste trabalho irão trazer avanços significativos na reflorestação de *kelps*, despertando simultaneamente o interesse do setor empresarial de cultivo destas macroalgas.

2. Materiais e métodos

2.1 Como preparar uma cultura stock de *kelps*

Para tornar os métodos de reflorestação mais eficientes, é fundamental entender em primeiro lugar a metodologia de como preparar culturas stock de *kelps*.

O primeiro passo consiste na recolha de material reprodutivo no campo. É necessário recolher tecido reprodutivo que aparenta estar saudável, maduro e sem epífitas. Chegando ao laboratório, é feita a limpeza, onde o tecido é limpo com papel e depois colocado em água do mar autoclavada. Posteriormente, é colocado a 5°C durante 1h. De seguida, para induzir a germinação, permanece uma semana a luz branca, a 40 µmol. $m^{-2}s^{-1}$. Após a qual é transferido para luz vermelha a 5 µmol. $m^{-2}s^{-1}$ para prevenir a reprodução, crescendo apenas vegetativamente. Desta forma, cada gametófito pode originar mais esporófitos, maximizando a produção a partir do material recolhido em campo (figuras 7 e 8) (Edwards & Watson, 2011).

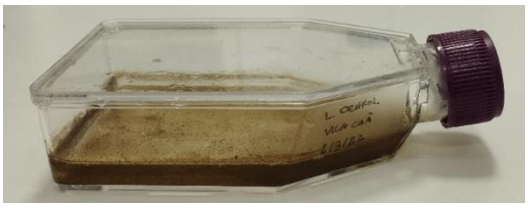


Figura 7- Armazenamento de gametófitos de *L. ochroleuca* num tubo t (cultura *stock*).

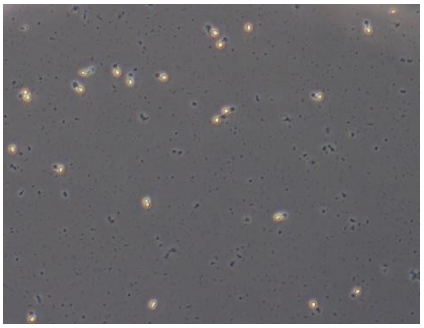


Figura 8- Esporos germinados visualizados através de microscópio invertido (ampliação: 100x).

2.2 Experiência 1: Sazonalidade da *Laminaria ochroleuca*

O trabalho de campo foi realizado em dois locais onde existe este *kelp*: praia de Vila Chã (41° 17′ 39″ N, 8° 43′ 21″ W) e na praia Norte (41° 41′ 46.77″ N, 8° 51′ 1.79″ W) (figuras 9 e 10). O tecido reprodutivo é formado em áreas mais escuras, denominadas sori, na parte distal da lâmina.

Mensalmente, desde que as condições do mar permitissem, foi feita uma recolha de sori de 15 indivíduos de *L. ochroleuca* e, no laboratório, a libertação dos esporos. Além disso, também foi avaliado o estado reprodutivo deste *kelp,* utilizando como unidade

amostragem um quadrado de 50 cm x 50 cm. Registou-se o número de indivíduos maduros e imaturos em pelo menos 5 quadrados, adicionando mais quando necessário até serem contabilizados 50 indivíduos (figura 11).

O trabalho no campo decorreu de outubro de 2022 até abril de 2023.



Figura 9- Trabalho de campo na praia Norte (Silvia Chemello).



Figura 10- *L. ochroleuca* na praia de Vila Chã (Silvia Chemello).



Figura 11- Registo do estado reprodutivo da *L. ochroleuca* (Silvia Chemello).

A área dos sori recolhidos em cada mês foi avaliada com recurso a fotografia e medida usando o programa ImageJ. Com o objetivo de encontrar a melhor altura para recolher tecido reprodutivo para produzir culturas *stock*, foram avaliados três fatores: proporção de indivíduos reprodutivos no campo, densidade e viabilidade dos esporos recolhidos.

Para a libertação de esporos, o tecido foi limpo, seco e exposto ao ar a 5ºC durante 1 hora. Após este período, foi adicionada água do mar autoclavada aos tecidos num gobelé, e ficaram a 5°C durante 2h. A solução resultante da libertação foi transferida para três placas de Petri. Permaneceram no fitoclima em condições constantes: temperatura: 15°C, intensidade luminosa: 90 $\mu mol.m^{-2}s^{-1}$. No dia seguinte e um mês depois, foram tiradas 5 fotografias de cada placa de Petri, a partir das quais a contagem

dos esporos foi feita no programa ImageJ. As contagens foram realizadas no dia seguinte, pois a mobilidade dos esporos tornou impraticável as contagens no mesmo dia.

Análise de dados e tratamento estatístico

A análise quantitativa de indivíduos reprodutivos e não reprodutivos presentes nas praias foi realizada no programa Excel.

A densidade dos esporos foi estimada contando o número de esporos em cinco campos de visão, em três placas de Petri, e dividindo pelo volume utilizado e pela área dos sori.

2.3 Experiência 2: Sazonalidade da *Laminaria hyperborea*

O trabalho de campo foi realizado no local onde existe esta espécie, na praia de Vila Chã (41° 17′ 39″ N, 8° 43′ 21″ W) (figura 12). Na costa portuguesa, a sua fase de reprodução, está normalmente compreendida entre fevereiro e maio.

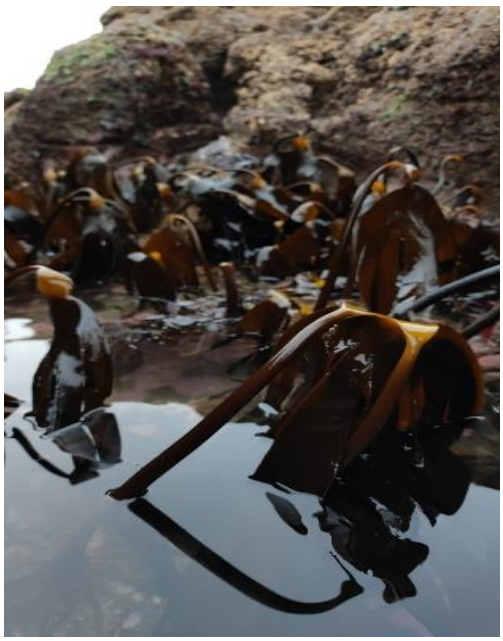


Figura 12- *L. hyperborea* (Silvia Chemello).

Foi avaliado o estado reprodutivo deste *kelp*. Além disso, mensalmente foi feita uma recolha de sori de 15 indivíduos de *L. hyperborea* e, no laboratório, a libertação dos esporos. Foram capturadas imagens dos sori recolhidos para avaliar as suas áreas, que foi medida usando o programa ImageJ. Com o intuito de encontrar a melhor altura para recolher tecido reprodutivo para produzir culturas *stock*, foram avaliados três fatores:

proporção de indivíduos reprodutivos no campo, densidade e viabilidade dos esporos recolhidos.

O protocolo utilizado para a libertação de esporos deste *kelp* foi semelhante ao da *L. ochroleuca*. No entanto, o tecido reprodutivo da *L. hyperborea* forma um gel pegajoso, muito rico em polissacarídeos. Este facto aumenta o risco de os esporos sofrerem choque osmótico e morrerem. Desta forma, foram feitas duas alterações: os sori ficaram expostos apenas meia hora a uma temperatura baixa (5°C) e, após completar este período, os sori ficaram submersos em água do mar autoclavada num gobelé, a 5°C, durante apenas 1h. A solução resultante da libertação dos esporos foi transferida para três placas de Petri. Permaneceram no fitoclima e no dia seguinte e um mês depois, foram tiradas 5 fotografias de cada placa de Petri para a contagem dos esporos, que foi feita no programa ImageJ.

Análise de dados e tratamento estatístico

A análise quantitativa de indivíduos reprodutivos e não reprodutivos presentes na praia de Vila Chã foi realizada no programa Excel.

A densidade dos esporos foi estimada contando o número de esporos em cinco campos de visão, em três placas de Petri, e dividindo pelo volume utilizado e pela área dos sori.

2.4 Experiência 3: Desinfeção do tecido reprodutivo – Solução de iodo

Das maiores dificuldades na cultura de *kelps* é a obtenção de monoculturas limpas. Como tal, nesta experiência foi testado um método de esterilização de maneira a obter culturas estéreis de *L. ochroleuca*. Foi testada a utilização de uma solução de iodo no tecido reprodutivo desta macroalga. Foi dividido em três tratamentos: controlo (sem iodo), solução de iodo a 1% e solução de iodo a 1,5%.

Na praia de Vila Chã, recolheu-se tecido reprodutivo de 36 indivíduos. No laboratório, os sori foram cortados em discos, cada um com área de 201 mm^2. Foram usadas 3 réplicas. Os sori estiveram expostos às diferentes soluções de iodo durante 10 minutos.

As soluções que resultaram da libertação dos esporos foram transferidas para 3 placas de Petri cada. No dia seguinte, uma semana e um mês depois, foram tiradas 5 fotografias de cada placa de Petri para a contagem dos esporos no programa ImageJ.

Análise de dados e tratamento estatístico

Foi realizada ANOVA (análise de variância) de dois fatores (concentração de iodo três níveis fixo e tempo três níveis aleatórios). Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. Para fazer todas as comparações pairwise entre os grupos, os resultados foram analisados usando post-hoc de Tukey.

2.5 Experiência 4: Desinfeção do tecido reprodutivo − Ultrassons

Teste 1

Foi testado a utilização dos ultrassons no tecido reprodutivo da *L. ochroleuca*. Foi dividido em três tratamentos: zero (controlo), 1 minuto e 5 minutos de exposição a ultrassons.

Na praia Norte, recolheu-se tecido reprodutivo de 36 indivíduos. No laboratório, os sori foram limpos e cortados em discos, cada um com área de 201 mm². Foram usados 3 discos por réplica e 3 réplicas por tratamento.

Após a exposição do tecido reprodutivo de *L. ochroleuca* aos ultrassons, também foi testado o impacto da sua exposição subsequente ao ar 5ºC. A exposição dos sori a uma temperatura baixa não é inerentemente um fator de stress; o stress surge por estarem fora de água. Como tal, foi dividido em três tempos de dessecação: 30 minutos, 1 hora e 2 horas fora de água a 5ºC, de forma a estudar a densidade de esporos obtida com os diferentes tempos de dessecação e a sua viabilidade. As soluções que resultaram da libertação dos esporos foram transferidas para placas de Petri. No dia seguinte e ao fim de um mês foram tiradas 5 fotografias de cada placa de Petri. A contagem dos esporos foi feita no programa ImageJ.

Teste 2

Na praia de Vila Chã, recolheu-se tecido reprodutivo de 33 indivíduos diferentes.

A experiência dos ultrassons foi replicada, mas com alguns ajustes. Os tempos de exposição a ultrassons testado voltaram a ser zero (controlo), 1 minuto e 5 minutos.

Foram feitas duas alterações no protocolo: foi utilizado uma maior quantidade de sori (5 discos/indivíduos por réplica em vez de 3) e a libertação foi feita em menor volume de água do mar autoclavada (25 ml em vez de 50 ml).

As soluções resultantes de cada réplica foram transferidas para placas de Petri. A monitorização foi feita tirando 5 fotografias de cada placa de Petri no dia seguinte à libertação e após um mês. A contagem dos esporos foi realizada com recurso ao programa ImageJ.

Análise de dados e tratamento estatístico

Os dados foram analisados apenas para o teste 2, visto que o teste 1 não se obtiveram resultados.

As contagens após um dia e após um mês foram utilizadas para calcular mortalidade. Foi realizada uma ANOVA de dois fatores para avaliar o efeito dos ultrassons e dessecação na libertação dos esporos (ultrassons três níveis fixo e tempo de dessecação três níveis fixos). Os dados de mortalidade foram também analisados com uma ANOVA de dois fatores (ultrassons três níveis fixo e tempo de dessecação três níveis fixos). Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. Para fazer todas as comparações pairwise entre os grupos, os resultados foram analisados com o teste post-hoc de Tukey.

2.6 Experiência 5: Libertação dos esporos com diferentes níveis de stress osmótico

Na praia de Vila Chã, recolheu-se tecido reprodutivo de 15 indivíduos diferentes.

O tecido foi limpo, seco e colocado a 5ºC durante 1 hora ou 12 h. As soluções resultantes da libertação dos esporos foram transferidas para placas de Petri. No dia seguinte e um mês depois foram tiradas 5 fotografias de cada placa de Petri. A contagem dos esporos foi feita através do programa ImageJ. A experiência foi realizada com tecidos reprodutivos em dois meses.

Análise de dados e tratamento estatístico

Foi realizada uma ANOVA de dois fatores (tempo de dessecação, dois níveis fixo, e tempo, dois níveis aleatórios). Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

- Diferentes tempos de dessecação a 5°C

Foi testado o efeito de três tempos de dessecação no tecido reprodutivo de *L. ochroleuca*.

Na praia de Vila Chã, recolheu-se tecido reprodutivo de 33 indivíduos. Foram usados 3 níveis de stress osmótico: exposição durante 30 minutos, 1 hora e 2 horas ao ar a 5ºC. Foi avaliado o efeito sobre a libertação de esporos através da avaliação da densidade de esporos obtida com os diferentes tempos de dessecação.

As soluções que resultaram da libertação dos esporos foram transferidas para placas de Petri. A monitorização foi feita através de fotografias das placas de Petri. Foram assim recolhidas 5 fotos para cada placa no dia seguinte, uma semana e um mês depois. A contagem dos esporos foi realizada com recurso ao programa ImageJ.

Análise de dados e tratamento estatístico

Foi realizada uma ANOVA de dois fatores (tempo de dessecação, três níveis fixos, e tempo, três níveis aleatórios). Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. As comparações pairwise entre os grupos foram analisadas com o teste post-hoc de Tukey.

2.7 Experiência 6: Técnica de *green gravel*

Foi testada a técnica do *"green gravel"* com duas densidades de gametófitos de *L. ochroleuca*. O objetivo foi determinar a melhor solução para obter mais indivíduos, o mais rápido possível e com o mínimo de material, reduzindo assim o impacto ecológico na população dadora. Quando atingiram ≈ 1 cm de comprimento, a experiência foi dada como concluída por ser o tamanho adequado para serem colocados no mar. A experiência durou 7 semanas.

Foram utilizadas duas soluções, uma com baixa densidade de gametófitos de *L. ochroleuca* (≈ 482 gametófitos ml^{-1}) e outra com elevada densidade (≈ 653 gametófitos ml^{-1}) (figura 13).

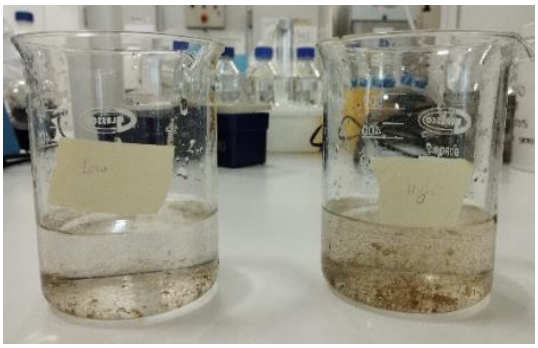


Figura 13- Soluções da experiência (esquerda- densidade baixa; direita- densidade alta).

Os tanques utilizados para esta técnica foram previamente esterilizados com lixívia e, posteriormente, com ozono. O cascalho também foi limpo com lixívia e depois com água doce corrente. Foram usados 8 tanques (50 litros cada) com pequenas pedras (granito e pedra calcária entre 3 e 5 cm de tamanho), 4 tanques para cada densidade (figuras 14 e 15).

O sistema incluía um módulo de filtro mecânico e outro de UV para uma desinfeção da água em recirculação. As soluções de gametófitos foram pulverizadas diretamente sobre as pedras (50 ml de solução para cada tanque).



Figura 14- Tanques do CIIMAR utilizados para a experiência *green gravel*.



Figura 15- Exemplar de tanque *green gravel*.

Foram mantidas condições constantes de temperatura (15°C), intensidade luminosa (100 $\mu mol.m^{-2}s^{-1}$) e fotoperíodo (12:12h luz: escuro), de modo a simular as condições ambientais encontradas na primavera (período em que se dá o pico de recrutamento no meio natural). Foram incluídas bombas de água em cada tanque para garantir a circulação da mesma. Semanalmente, foi adicionado 250 ml de PES (*Provasoli Enriches Seawater*) (Provasoli, 1968) em cada tanque para assegurar que os nutrientes não seriam um fator limitativo do crescimento. A monitorização da qualidade da água foi realizada semanalmente (pH, salinidade e oxigénio dissolvido) com uma sonda multiparamétrica portátil Hach HQ40d, antes da renovação da água. Ao longo das semanas, a média do pH foi 8,38; da salinidade foi 27,57 ‰; e do oxigénio dissolvido foi 9,77 mg/L. A renovação da água foi feita semanalmente.

A densidade e o tamanho dos recrutas foi quantificada semanalmente por amostragem fotográfica. 5 pedras de cada tanque foram selecionadas de forma aleatória e para cada pedra foram tiradas 5 fotografias sob um estereomicroscópio Leica EZ4W (figura 16). A contagem dos *kelps* foi feita com o programa ImageJ.



Figura 16- *"Green gravel"* na última semana observado sob um estereoscópio (esquerda) e a olho nu (direita).

Análise de dados e tratamento estatístico

Foi realizada uma ANOVA de dois fatores (densidade, dois níveis fixo e tempo, sete níveis aleatórios). Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. Para analisar as diferenças entre pares, os resultados foram analisados com o teste post-hoc de Tukey.

2.8 Experiência 7: Teste de fibras naturais

Foram testadas diferentes fibras naturais para cultivo de *L. ochroleuca*, de modo a avaliar a viabilidade de um substrato amigo do ambiente tanto para esforços de reflorestação como para produção de biomassa. Para isso, os gametófitos desta espécie foram semeados em fio de sisal (derivado das fibras da planta *Agave sisalana*) (figura 17); malha utilizada em cultivos de mexilhão (algodão) (figura 18) e corda de polipropileno (material sintético, controlo) (figura 19). Foi utilizada uma solução com ≈ 399 gametófitos ml^{-1}.

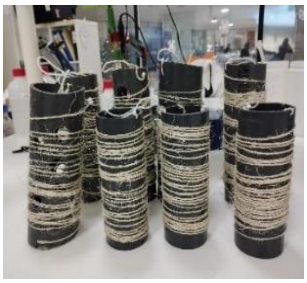


Figura 17- Tubos com fio de sisal.



Figura 18- Tubos com malha.



Figura 19- Tubos com fio de polipropileno.

As fibras foram envolvidas em tubos e a solução de gametófitos foi pulverizada diretamente sobre as diferentes fibras. Para permitir que os gametófitos se fixassem,

ficaram 1h de repouso e depois as fibras foram submersas em 6 tanques (100 litros cada). Foram utilizados 2 tanques para cada tipo de fibra e cada tanque continha 4 réplicas da mesma fibra (figuras 20 e 21).



Figura 20- Tanques do BOGA utilizados para a experiência das fibras.



Figura 21- Disposição dos tubos num tanque.

O sistema incluía um modulo de filtro mecânico e outro de UV para esterilização da água recirculada. Os tanques foram mantidos em condições constantes de temperatura (15°C), intensidade luminosa (100 $\mu mol.m^{-2}s^{-1}$) e fotoperíodo (12:12h luz: escuro), de modo a simularem as condições naturais encontradas na primavera. Os tanques foram tapados com plástico transparente para minimizar o risco de contaminação.

A monitorização da qualidade da água foi realizada semanalmente (pH, salinidade e oxigénio dissolvido). Para medir estes parâmetros, recorreu-se a uma sonda multípramétrica portátil Hach HQ40d antes da renovação de água. Ao longo das semanas, a média do pH foi 7,86; da salinidade foi 26,40 ‰; e do oxigénio dissolvido foi 8,8 mg/L. A renovação da água foi feita semanalmente.

O número de indivíduos foi quantificado semanalmente por amostragem fotográfica: 2 *spools* de cada tipo de fibra foram recolhidos, observados e fotografados (5 fotografias para cada fibra) usando um estereomicroscópio Leica EZ4WA. A contagem dos *kelps* foi feita através do programa ImageJ.
A experiência durou 10 semanas.

Análise de dados e tratamento estatístico

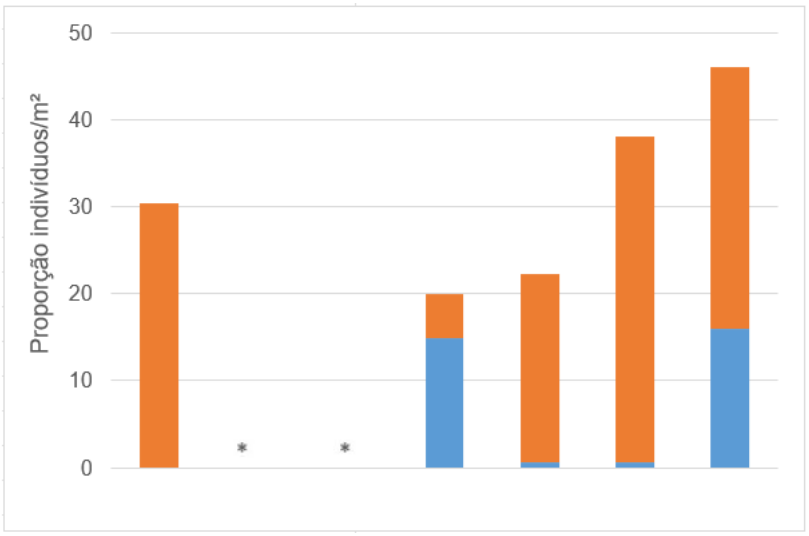
Foi realizada ANOVA de dois fatores (tipo de fibra, três níveis fixo e tempo, dez níveis aleatórios). Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. Para analisar as diferenças pairwise entre pares, os resultados foram analisados com o teste post-hoc de Tukey.

3. Resultados

Experiência 1: Sazonalidade da *Laminaria ochroleuca*

Entre outubro e abril, na praia de Vila Chã, os meses onde os indivíduos reprodutivos foram encontrados em maiores proporções foram janeiro e abril. Na praia Norte, os meses de janeiro e fevereiro apresentaram as maiores proporções de indivíduos reprodutivos (gráfico 1).

A)



B)

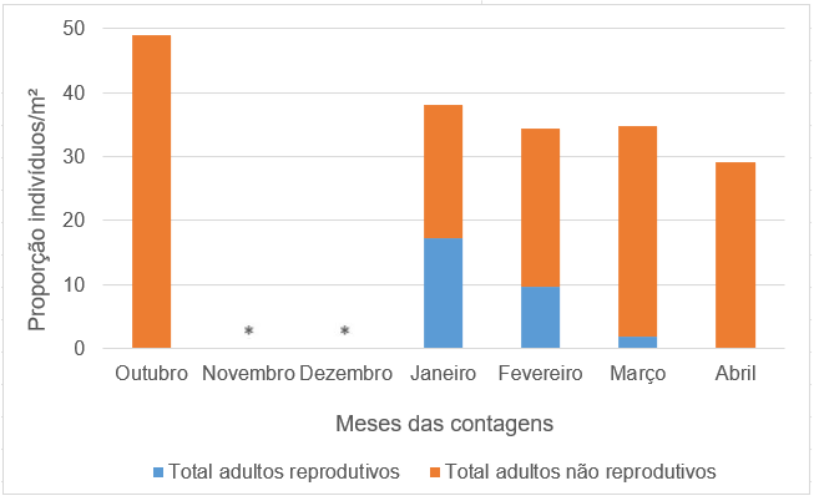


Gráfico 1 - Total de indivíduos reprodutivos e não reprodutivos:

A) Na praia de Vila Chã;

B) Na praia Norte.

* falta de dados para esse mês, devido a tempestades que impossibilitaram o trabalho de campo.

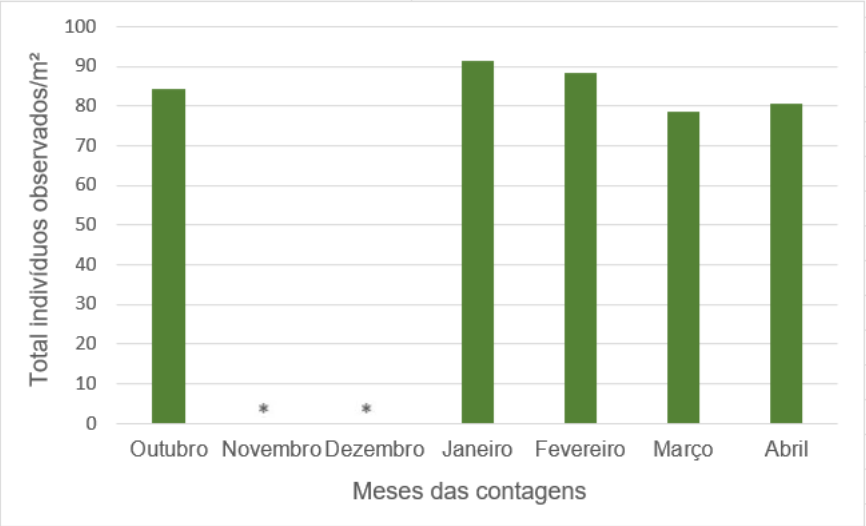


Gráfico 2 - Total de indivíduos observados na costa Norte.

* falta de dados para esse mês, devido a tempestades que impossibilitaram o trabalho de campo.

Em relação à praia de Vila Chã, a densidade de esporos em janeiro, após a libertação, foi 280,1 esporos cm^{-2} de sorus e um mês depois contaram-se 511,6 esporos cm^{-2} de sorus. Em abril, a densidade de esporos após a libertação foi 274 esporos cm^{-2} de sorus e um mês depois, a densidade foi 856,5 esporos cm^{-2} de sorus.

Relativamente à praia Norte, a densidade de esporos em janeiro foi 1573,4 esporos cm^{-2} de sorus e, um mês depois, 822,3 cm^{-2} de sorus. Em fevereiro, os sori já estavam num estado avançado de maturação, estando o tecido reprodutivo já a desintegrar-se. Como tal, não foi apanhado tecido reprodutivo, pois não se ia conseguir aplicar as metodologias de limpeza num tecido tão frágil, inviabilizando as contagens numa cultura limpa.

Experiência 2: Sazonalidade da *Laminaria hyperborea*

Na praia de Vila Chã, entre fevereiro e maio, os meses em que os indivíduos reprodutivos foram encontrados em maiores proporções foram fevereiro e março (gráfico 3).

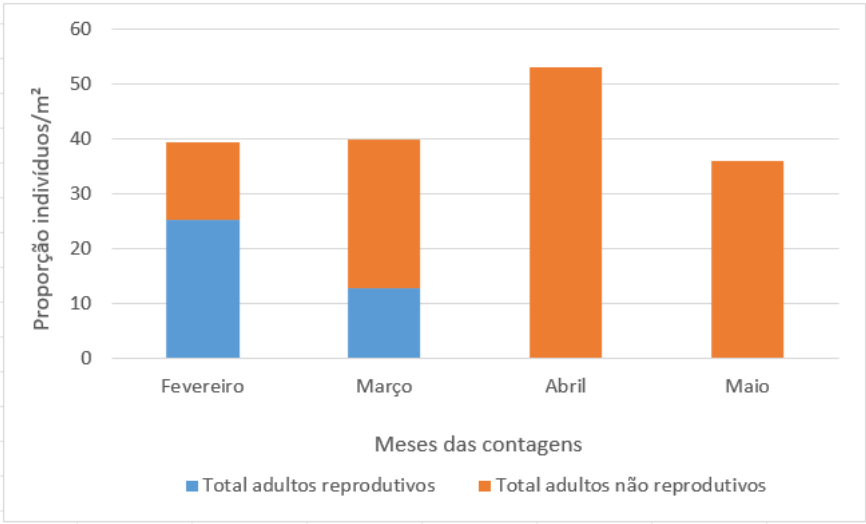


Gráfico 3- Total de indivíduos reprodutivos e não reprodutivos na praia de Vila Chã.

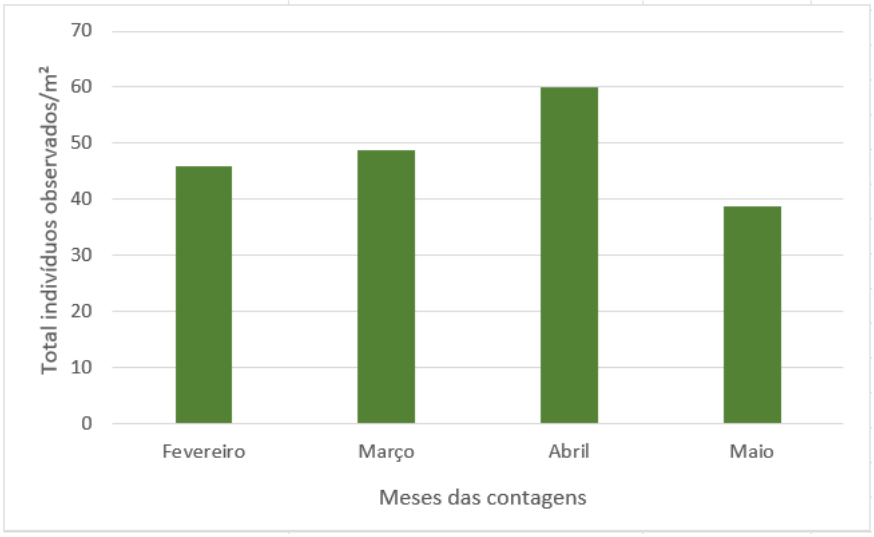


Gráfico 4 - Total de indivíduos observados na praia de Vila Chã.

Em fevereiro, a densidade de esporos após a libertação foi 149,7 esporos cm^{-2} de sorus e, um mês depois, 258,2 esporos cm^{-2} de sorus. Em março, a densidade inicial de esporos foi 199,6 esporos cm^{-2} de sorus e um mês depois, observaram-se 593,1 esporos cm^{-2} de sorus.

Experiência 3: Desinfeção do tecido reprodutivo – Solução de iodo

Não foram observadas quaisquer espécies contaminantes, pelo que não foi possível avaliar a eficiência dos ultrassons como método de esterilização.

A análise da densidade de esporos usando a ANOVA de dois fatores: concentração de Iodo ([Iodo]: controlo, iodo a 1% e iodo a 1,5%) e tempo de amostragem (tempo: após a libertação, 1 semana e 1 mês depois) mostrou que não houve diferenças significativas da interação de [Iodo] e do tempo sobre a densidade de esporos ([Iodo] x tempo: $F(4,18)=1,73$; $p=0,19$) nem da concentração de iodo ([iodo]: $F(2,4)= 6,31$; $p= 0,06$) ou do tempo (tempo: $F(2,4)= 0,871$; $p= 0,49$) sobre a densidade de esporos.

Experiência 4: Desinfeção do tecido reprodutivo – Ultrassons

Não foram observadas quaisquer espécies contaminantes, pelo que não foi possível avaliar a eficiência dos ultrassons como método de esterilização.

A análise da libertação de esporos usando a ANOVA de dois fatores: ultrassons (ultrassons: 0, 1 e 5 minutos) e tempo de dessecação (dessecação: 30 minutos, 1 hora e 2 horas a 5ºC) mostrou que houve um efeito significativo da interação dos ultrassons e do tempo de dessecação sobre a libertação dos esporos (ultrassons x dessecação: $F(8)=5,04$; $p=0,002$). O post-hoc de Tukey, resumido no gráfico 5, identificou as diferenças significativas resultantes da interação entre os fatores.

O maior número de esporos foi obtido quando o tecido reprodutivo esteve exposto a 1 minuto de ultrassons, seguido de 1h fora de água a 5ºC, com um valor médio de 454,5 ± 68,97 esporos/ml (gráfico 5).

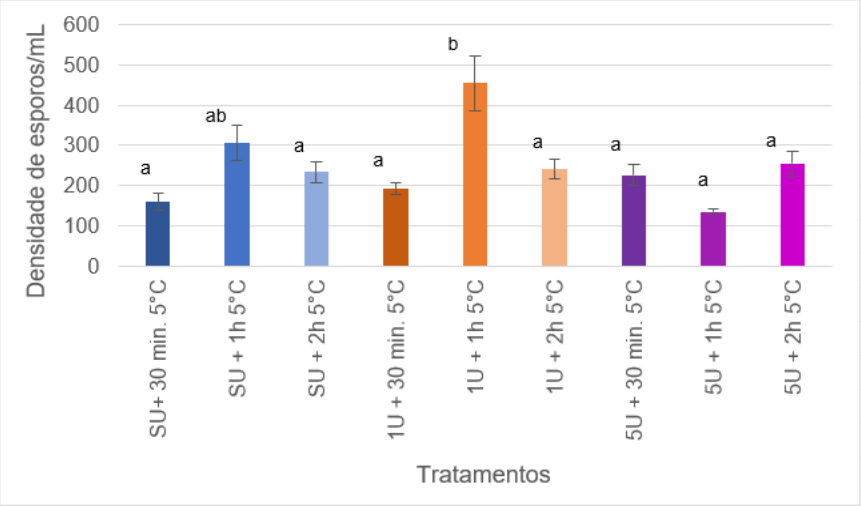


Gráfico 5- Densidade inicial de esporos (média ± erro padrão). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas. SU- sem exposição aos ultrassons; 1U- 1 minuto de ultrassons; 5U- 5 minutos de ultrassons.

A análise da viabilidade, através da taxa de mortalidade, dos esporos usando a ANOVA de dois fatores: ultrassons (ultrassons: 0,1 e 5 minutos) e tempo de dessecação (dessecação: 30 minutos, 1 hora e 2 horas a 5ºC), indicou que não houve diferenças significativas da interação dos ultrassons e do tempo de dessecação (ultrassons x dessecação: F(8)=5,23; p=0,072) nem dos ultrassons (ultrassons: F(2)=2,67; p=0,10) ou do tempo de dessecação (dessecação: F(2)=2,85; p=0,08) sobre a viabilidade dos esporos.

Experiência 5: Libertação dos esporos com diferentes níveis de stress osmótico

- Teste 1

A análise da densidade de esporos usando a ANOVA de dois fatores: tempo de dessecação (dessecação: 1h e 12h a 5º C) e tempo de amostragem (tempo: após a libertação e 1 mês depois) mostrou que houve um efeito significativo da interação do tempo de dessecação e do tempo de amostragem sobre a densidade de esporos (dessecação x tempo: F(1,8)= 15,78; p= 0,004).

O número de esporos após 1h de exposição ao ar a 5ºC foi maior quando comparado com a libertação após exposição ao ar a 5ºC durante 12 horas. A libertação após 1h atingiu um valor médio de 41,6 ± 8,47 esporos cm^{-2} de sorus na libertação inicial e 76 ± 6,98 esporos cm^{-2} de sorus um mês depois da libertação. A libertação após 12h resultou

inicialmente em 30 ± 4,42 esporos cm^{-2} de sorus e 6,8 ± 0,33 esporos cm^{-2} de sorus um mês após a libertação (gráfico 6).

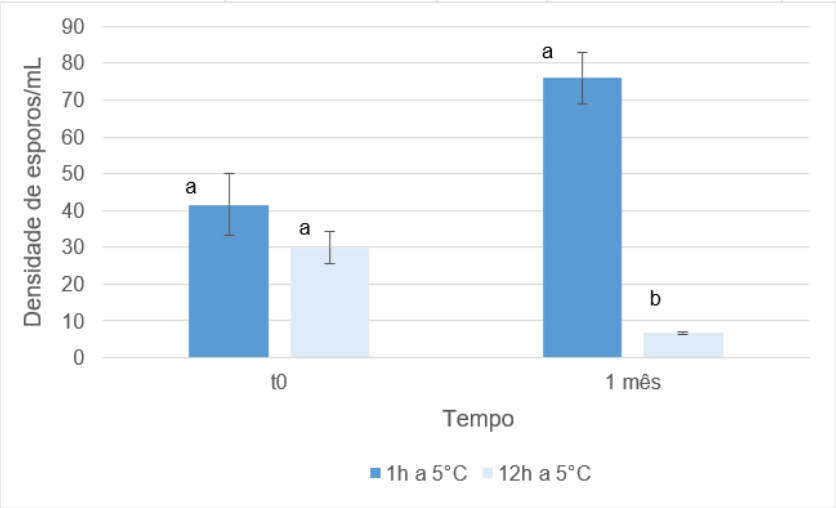


Gráfico 6 - Densidade de esporos (média ± erro padrão) obtida com 1h e 12h a 5ºC. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas.

- Teste 2

A análise da densidade de esporos usando a ANOVA de dois fatores: tempo de dessecação (dessecação: 1h e 12h a 5º C) e tempo de amostragem (tempo: após a libertação e 1 mês depois) mostrou que não houve efeito significativo da interação dos fatores sobre a densidade de esporos (dessecação x tempo: $F(1,8)= 4,98$; $p= 0,06$). Para além disso, indicou que não houveram efeitos significativos do tempo de dessecação (dessecação: $F(1,1)= 0,090$; $p=0,81$) nem do tempo de amostragem (tempo: $F(1,1)= 2,52$; $p=0,36$) sobre a densidade de esporos.

- Diferentes tempos de dessecação a 5°C

O tecido reprodutivo que esteve exposto ao ar a 5ºC por 30 minutos libertou 103,2 ± 4,93 esporos cm-² de sorus. O material reprodutivo que esteve exposto ao ar a 5ºC por 1 hora resultou em 65,2 ± 5,26 esporos cm-² de sorus após a libertação. O tecido reprodutivo que esteve exposto ao ar a 5ºC por 2 horas originou 148,8 ± 11,27 esporos cm-² de sorus após a libertação.

A análise da densidade de esporos usando a ANOVA de dois fatores: tempo de dessecação (dessecação: 30 minutos, 1 hora e 2 horas a 5º C) e tempo de amostragem (tempo: após a libertação, 1 semana e 1 mês depois) mostrou que não houveram diferenças significativas da interação dos dois fatores sobre a densidade de esporos (tempo de dessecação x tempo: $F(4,18)= 3,06$; $p= 0,05$). O fator tempo também não

resultou em diferenças significativas na densidade de esporos (tempo: F(2,4)= 4,45; p= 0,10). No entanto, foi observado efeito significativo do tempo de dessecação: (dessecação: F(2,4)= 10,36; p= 0,03) sobre a densidade de esporos. O post-hoc de Tukey, resumido no gráfico 7, identificou as diferenças significativas resultantes da interação entre os fatores.

A maior densidade de esporos foi obtida quando o tecido reprodutivo esteve 2 horas fora de água a 5ºC, com um valor médio de 196 ± 16,29 esporos cm^{-2} de sorus. Nos sorus que estiveram fora de água a 5ºC durante 30 minutos, observou-se 109,87 ± 13,01 esporos cm^{-2} de sorus. A menor densidade de esporos foi obtida quando o tecido reprodutivo esteve 1 hora fora de água a 5ºC, com um valor médio de 100,40 ± 11,05 esporos cm^{-2} de sorus.

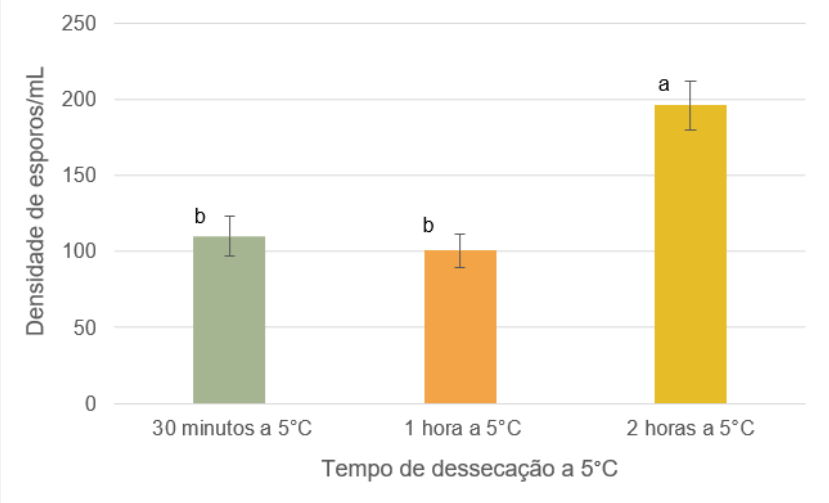


Gráfico 7- Densidade de esporos (média ± erro padrão) obtida com os tempos de dessecação a 5°C. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas.

Experiência 6: Técnica de *green gravel*

A experiência durou durante 7 semanas. Os primeiros recrutas foram observados na segunda semana (figura 22).

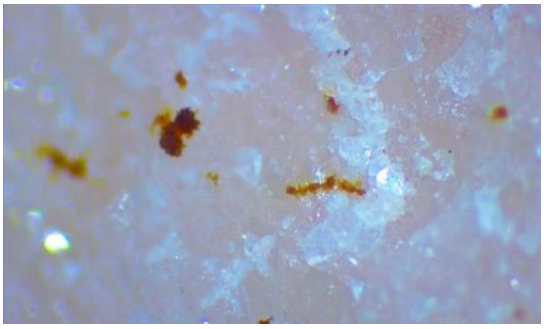


Figura 22- Primeiros recrutas observados no cascalho.

A análise da abundância de recrutas utilizando a ANOVA de dois fatores: densidade (densidade: alta e baixa) e tempo de amostragem (tempo: sete níveis) mostrou que não houve efeito significativo da interação dos fatores sobre a abundância de recrutas (densidade x tempo: $F(5,36)=1,34$; $p= 0,272$). Além disso, não houveram efeitos significativos da densidade (densidade: $F(5,5)=1,20$; $p= 0,06$) nem do tempo (tempo: $F(5,5)= 1,34$; $p= 0,38$) sobre a abundância de recrutas.

A análise do crescimento dos recrutas usando a ANOVA de dois fatores: densidade (densidade: alta e baixa) e tempo de amostragem (tempo: sete níveis) indicou que não houve efeito significativo da interação dos fatores sobre o tamanho dos recrutas (densidade x tempo: $F(5,468)=0,60$; $p= 0,70$).

Apenas houveram efeitos significativos da densidade (densidade: $F(1,5)= 120,89$; $p< 0,001$) e do tempo (tempo: $F(5,5)= 21,44$; $p= 0,002$). O post-hoc de Tukey mostrou que existiram diferenças significativas no tamanho dos recrutas apenas entre a segunda e as restantes semanas ($p<0,001$) (gráfico 9). O tamanho dos recrutas nos tanques com alta densidade foi superior em comparação com os tanques com baixa densidade, com tamanho médio de 0,89 ± 0,02 cm e 0,66 ± 0,02 cm, respetivamente (gráfico 8).

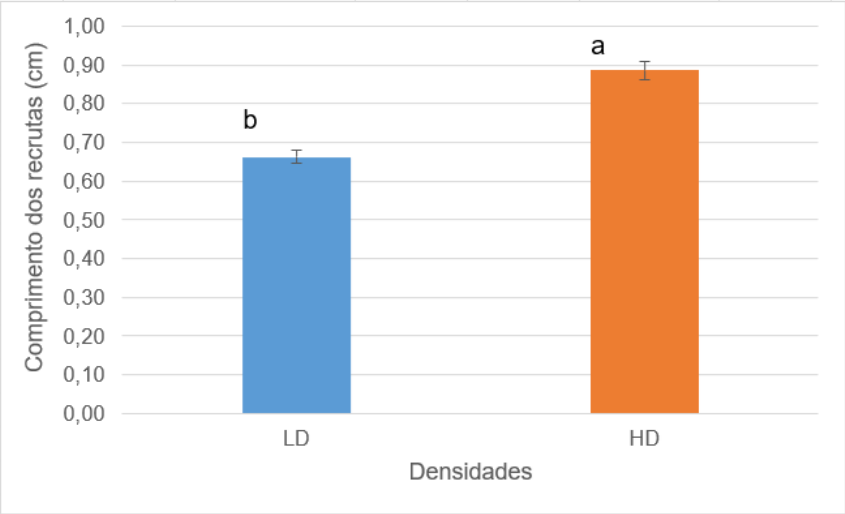


Gráfico 8- Tamanho dos recrutas de *L. ochroleuca* (média ± erro padrão) consoante as diferentes densidades. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas. LD- baixa densidade; HD- alta densidade

Relativamente ao tamanho semanal dos recrutas, na segunda semana, estes atingiram um tamanho médio de 0,55 ± 0,02 cm. Nas restantes semanas, o tamanho dos recrutas não oscilou muito, com um tamanho médio de 0,82 ± 0,03 cm (gráfico 9).

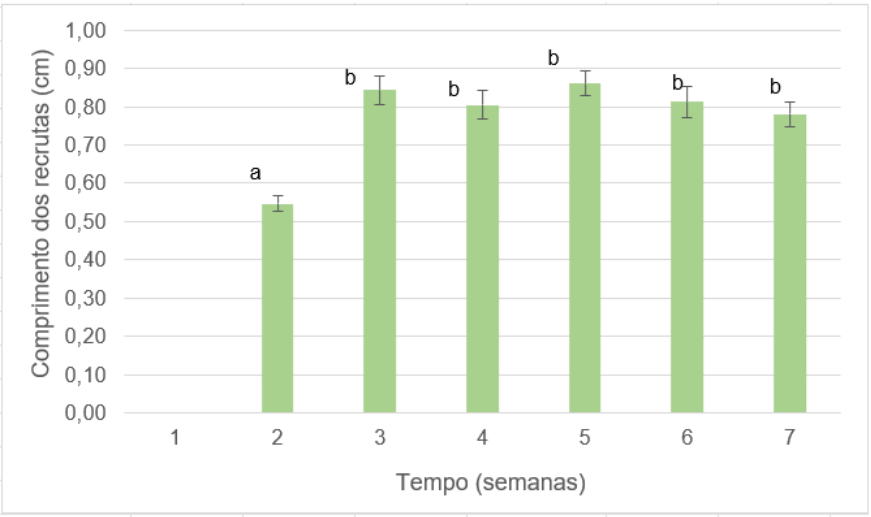


Gráfico 9- Tamanho semanal dos recrutas de *L. ochroleuca* (média ± erro padrão). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas.

Experiência 7: Teste de fibras naturais

A experiência durou 10 semanas. Os primeiros recrutas foram observados na terceira semana (figura 23).

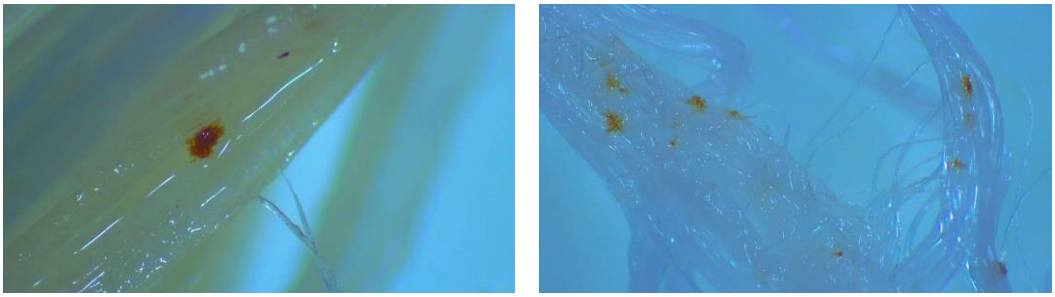


Figura 23- Primeiros recrutas observados no fio de sisal (esquerda) e na malha (direita).

A análise do número de indivíduos utilizando a ANOVA de dois fatores: tipo de fibra (fibra: fio de polipropileno, malha e fio de sisal) e tempo de amostragem (tempo: dez níveis) mostrou que não houveram diferenças significativas da interação entre os fatores nem entre os diferentes níveis do fator tempo sobre o número de recrutas (fibra x tempo: $F(14,24)=0,74$; $p=0,72$; tempo: $F(7,14)=2,15$; $p=0,11$). Houve apenas efeito significativo do tipo de fibra (fibra: $F(2,14)= 8,32$; $p= 0,004$) sobre o número de recrutas. O post-hoc de Tukey indicou que existiram diferenças significativas no número de recrutas entre o fio de sisal e o fio de polipropileno ($p=0,006$). Não se verificaram diferenças significativas entre o fio de polipropileno e a malha de algodão ($p=0,077$) e entre a malha e o fio de sisal ($p=0,489$).

O maior número de recrutas foi observado nos fios de polipropileno quando comparado com as outras fibras, com um número médio de 317,50 ± 90,12 indivíduos. Entre as outras fibras, da malha resultou um número médio de 152 ± 24,05 indivíduos e do fio de sisal 35,13 ± 6,54 indivíduos (gráfico 10).

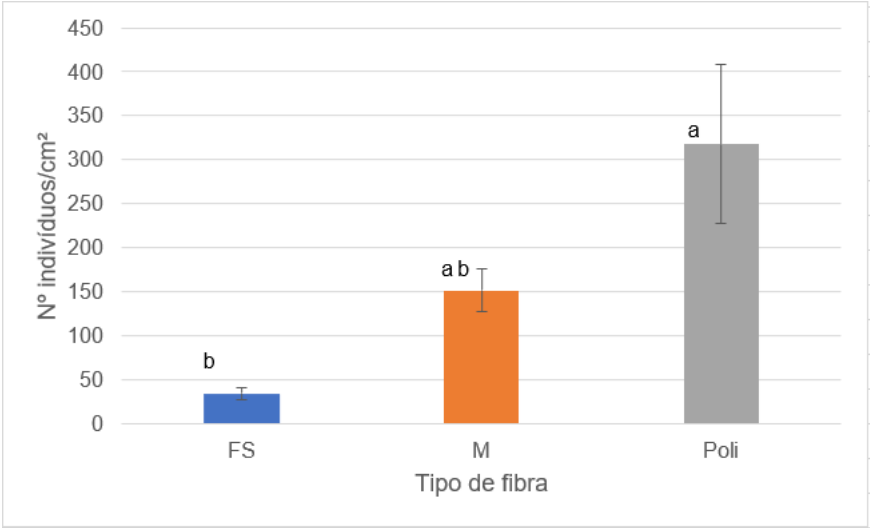


Gráfico 10- Número de recrutas de *L. ochroleuca* (média ± erro padrão) nos diferentes tipos de fibras. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas. FS- fio de sisal; M- malha; Poli- fio de polipropileno

4. Discussão

Experiência 1: Sazonalidade da *Laminaria ochroleuca*

O estudo de duas praias, Vila do Conde e Viana do Castelo, permitiu recolher informações sobre a sazonalidade de *L. ochroleuca* na costa Norte de Portugal. Os resultados deste estudo sugerem que a maior proporção de indivíduos reprodutivos no litoral norte pode ser observada nos meses de janeiro, fevereiro e abril.

O tecido reprodutivo nem sempre tem a maturidade necessária ou os seus esporos uma viabilidade que permita a preparação de culturas *stock*. Como tal, foi estudado o mês com maior número de esporos viáveis de forma a otimizar as culturas stock de *kelp*. Em laboratório, fez-se a libertação dos esporos para estudar a densidade destes no tecido e a sua viabilidade em cultura. Após a libertação, o maior número de esporos foi obtido com o tecido reprodutivo de janeiro, recolhido na praia Norte. Contudo, ao final de um mês, o maior número de esporos viáveis provinha do material reprodutivo recolhido em abril, em Vila Chã.

Com base na proporção de indivíduos reprodutivos no campo e a densidade e viabilidade dos esporos recolhidos, a melhor altura para recolher tecido reprodutivo para produzir culturas stock desta espécie parece ser próximo de abril. Estes resultados são úteis para tentar aumentar a eficiência da recolha de material reprodutivo, evitando a recolha em vão de material com esporos pouco densos ou com baixa viabilidade. No entanto, é necessário ter em consideração as variações interanuais climáticas na costa portuguesa, nomeadamente precipitação, temperaturas médias e eventos climáticos extremos. Assim, as variações meteorológicas interanuais podem alterar a sazonalidade do crescimento e da reprodução da espécie. Consequentemente, a altura em que os esporos estão mais viáveis pode não ser consistente de um ano para o outro.

Portanto, seria necessário estender este estudo por vários anos para obter dados com maior exatidão.

Experiência 2: Sazonalidade da *Laminaria hyperborea*

O estudo realizado na praia de Vila Chã, possibilitou a recolha de dados sobre a sazonalidade de *L. hyperborea* do intertidal na costa Norte portuguesa. A maior proporção de indivíduos reprodutivos foi observada em fevereiro e março.

Em laboratório, fez-se a libertação dos esporos para estudar a densidade dos mesmos no tecido, assim como a viabilidade destes na cultura. Após a libertação, o maior número de esporos foi obtido com o tecido reprodutivo recolhido em março. Ao fim de um mês em cultura, os esporos de março demonstraram ter uma maior viabilidade que os da cultura iniciada em fevereiro.

De acordo com a proporção de indivíduos reprodutivos no campo e a densidade e viabilidade dos esporos recolhidos, o melhor mês para recolher tecido reprodutivo para produzir culturas stock de *L. hyperborea* parece ser em março. Contudo, as variações interanuais climáticas que ocorrem na costa portuguesa podem condicionar o crescimento e a reprodução da *L. hyperborea*. Como tal, o mês em que os esporos estão mais viáveis pode não ser o mesmo de um ano para outro.

Deste modo, para obter dados com maior exatidão, seria importante prolongar este estudo por vários anos.

Experiência 3: Desinfeção do tecido reprodutivo – Solução de iodo

Os banhos de iodo têm sido adotados para esterilizar tecido reprodutivo de *kelp*. O iodo atua como um antisséptico capaz de eliminar bactérias nos tecidos reprodutivos. Flavin et al., (2013) e Gibor et al., (1981) estudaram métodos de esterilização em várias espécies de macroalgas castanhas e vermelhas e concluíram que os melhores resultados podiam ser alcançados pela imersão do tecido em uma solução de iodo a 1% por 5 minutos. Estipes de *Saccharina latissima* também foram esterilizados com solução de iodo a 1% (Lee, 1985). Outros estudos utilizaram uma abordagem diferente, lavando o tecido reprodutivo com água do mar filtrada contendo iodo comercial a 0,5% por 10 segundos para remover epífitas (Gutierrez et al., 2006; Varela et al., 2018).

No entanto, no presente estudo não foi possível avaliar a eficiência do iodo como método de esterilização, uma vez que não foram observadas quaisquer espécies contaminantes em nenhum dos tratamentos, incluindo no controlo. Ainda assim, foi avaliado o impacto do tratamento com iodo no número de esporos em cultura. A contagem inicial de esporos nos tratamentos testados (controlo, iodo a 1% e iodo a 1,5%) foi realizada no dia seguinte à libertação, pois a mobilidade dos esporos tornou impraticável as contagens no mesmo dia. Visto que as contagens em imagem obtidas ao microscópio não permitem uma avaliação tridimensional, a precisão da contagem

inicial de esporos pode ter sido um pouco comprometida devido a esporos em suspensão.

A ANOVA indicou que não houve diferença significativa entre as soluções de iodo e o controlo. Desta forma, apesar de não ter sido possível determinar o efeito do iodo para limpar o tecido reprodutivo, não foi identificado um efeito negativo na libertação ou no desenvolvimento dos esporos. Assim, com o objetivo de obter culturas stock de *kelp* estéreis, poderá valer a pena repetir a experiência de modo a aprofundar a sua eficácia na limpeza do material reprodutivo.

Experiência 4: Desinfeção do tecido reprodutivo – Ultrassons

O banho de ultrassom produz ondas sonoras de alta frequência no líquido do tanque. Estas ondas sonoras criam pequenas bolhas no líquido (cavitação) que, ao colapsarem, transformam as ondas sonoras em energia mecânica. Este fenómeno possibilita a limpeza de amostras ou materiais imersos no banho de uma forma simples, rápida e económica (García-Vaquero et al., 2018).

O objetivo deste estudo era avaliar a eficiência dos ultrassons como método de esterilização. No entanto, uma vez que não foram observadas espécies contaminantes em nenhum dos tratamentos, incluindo no controlo, tal não foi possível. Foi analisado o impacto dos ultrassons e diferentes tempos de dessecação, na libertação e na viabilidade dos esporos. Relativamente à libertação dos esporos, os resultados da ANOVA indicaram um efeito significativo da exposição aos ultrassons e dos tempos de dessecação sobre o número de esporos libertados. O maior número de esporos foi obtido quando o tecido reprodutivo foi exposto a 1 minuto de ultrassons seguido de 1h fora de água a 5ºC. Tanto os ultrassons como os tempos de dessecação não demonstraram ter um efeito significativo na viabilidade dos esporos. Portanto, embora não tenha sido possível determinar o impacto dos ultrassons como método de esterilização, não foi identificado um efeito negativo na libertação e viabilidade dos esporos. Assim seria interessante repetir a experiência para avaliar a sua eficácia como método de esterilização, visando a obtenção de culturas stock de *kelp* estéreis.

Experiência 5: Libertação dos esporos com diferentes níveis de stress osmótico

Como pré-tratamento, é comum submeter o tecido reprodutivo a um período de dessecação (choque osmótico) para induzir a libertação dos esporos. Os resultados de

Alsuwaiyan et al., (2019) indicam que, dos diferentes tempos de dessecação testados (1h, 3h e 12h), 12h de dessecação mostrou ser o mais eficiente para a libertação dos esporos. Da mesma forma, Izquierdo et al., (2002) e Augyte et al., (2018) mencionam submeter o material reprodutivo ao choque osmótico 5ºC durante a noite (cerca de 12h).

Foi avaliado o impacto que o tempo de dessecação (1h e 12 horas fora de água a 5ºC) tem na eficiência da libertação e na sobrevivência dos esporos na cultura. Os esporos foram contabilizados no dia seguinte à libertação, uma vez que a mobilidade destes impossibilitou as contagens no mesmo dia. Foram realizados dois testes com tecidos reprodutivos diferentes, de modo a assegurar uma maior representabilidade dos resultados.

No primeiro teste, os resultados da ANOVA indicam um efeito significativo do tempo de dessecação na libertação e na sobrevivência dos esporos. Em contraste, no segundo teste, a ANOVA indicou que não houve diferença significativa do tempo de dessecação, ou seja, não foi identificado um efeito negativo na sobrevivência dos esporos.

Assim, parece obter-se maior libertação e viabilidade de esporos quando o tecido reprodutivo é exposto a 5ºC durante 1h. Contudo, poderá ser benéfico realizar mais estudos para complementar estes dados.

- <u>Diferentes tempos de dessecação a 5°C</u>

A dessecação (choque osmótico) tem sido adotada para induzir a libertação de esporos (Rolin et al., 2017).

Neste estudo, as contagens de esporos para os tempos de dessecação testados (30 minutos, 1 hora e 2 horas a 5ºC) foram realizadas no dia seguinte à libertação, pois a mobilidade dos esporos impossibilitou as contagens no mesmo dia. A ANOVA indicou um efeito significativo do tempo de dessecação na densidade dos esporos, ou seja, tiveram um impacto no número de esporos. Os resultados mostraram que o maior número foi obtido ao expor o tecido reprodutivo a 5ºC por 2 horas.
Assim, com base nos resultados deste estudo, para maximizar a libertação dos esporos sem afetar a sua viabilidade, é recomendável expor o tecido reprodutivo a 5ºC durante 2 horas. No entanto, poderá ser interessante realizar mais estudos para complementar estes dados.

Experiência 6: Técnica de *green gravel*

Green gravel é uma técnica de baixa manutenção, baixo custo, escalável e que não requer trabalhadores de campo altamente qualificados (Eger et al., 2022; Fredriksen et al., 2020).

Neste estudo, testou-se a técnica *green gravel* com duas densidades diferentes de gametófitos de *L. ochroleuca*. O objetivo desta experiência foi encontrar a solução mais eficiente para obter o maior número de indivíduos, o mais rapidamente possível e com o mínimo de material reprodutivo utilizado, para não causar sobre-exploração dos indivíduos adultos das populações locais. Como observação inicial, os melhores resultados foram alcançados nos tanques com altas densidades, uma vez que se verificou maior recrutamento e maior crescimento dos indivíduos cultivados. Consequentemente, as contaminações com espécies oportunistas ocuparam uma menor área, em comparação com os tanques com baixa densidade. Nestes tanques, observou-se menor recrutamento e menor crescimento dos indivíduos, o que permitiu que espécies oportunistas colonizassem uma maior área.

Um estudo anterior, sobre a otimização dos protocolos de cultivo de *green gravel*, mostrou que uma possível solução para diminuir a contaminação seria manter níveis baixos de luz (40 μmol $m^{-2}s^{-1}$) até o recrutamento ser visível a olho nu e, posteriormente, aumentar a exposição da luz para a intensidade normalmente utilizada para a produção de *kelps* (130 μmol $m^{-2}s^{-1}$) (Chemello et al., 2023).

Deste modo, seria interessante semear os cascalhos com baixa densidade de gametófitos e com baixa intensidade luminosa até se verificar os primeiros recrutamentos (normalmente 14 dias após o semeio). Após esta fase, a intensidade luminosa seria aumentada para promover o crescimento dos indivíduos. Assim, não só o material reprodutivo utilizado era reduzido, tornando a técnica ainda mais ecológica, como o potencial de colonização por espécies oportunistas poderia também ser minimizado. Seria, no entanto, necessário verificar a eficácia desta abordagem em fases mais avançadas da técnica de *green gravel*, incluindo também uma monitorização *pos-deployment*, para verificar se a densidade de gametófitos utilizada seria adequada para assegurar um número suficiente de indivíduos para maximizar as possibilidades de sucesso dos esforços de reflorestação.

Experiência 7: Teste de fibras naturais

No setor da aquacultura, os *kelp* são cultivados em *seed-lines*. Contudo, esta técnica também pode ser explorada com o objetivo de restauração. As cordas de cultivo normalmente utilizadas são de nylon ou polipropileno, mas há uma tendência crescente para a procura de materiais mais amigos do ambiente como, por exemplo, o algodão (Eger et al., 2022).

Neste estudo, avaliou-se a adequação de dois tipos de fibras naturais (malha de algodão e fio de sisal, derivado das fibras da planta *Agave sisalana*) para o cultivo de *L. ochroleuca*. O fio de polipropileno foi usado como controlo, uma vez que já é amplamente utilizado na produção de *kelps* (Edwards & Watson, 2011). Os melhores resultados foram obtidos para a fibra de algodão e para a de polipropileno, indicando que o algodão é uma boa alternativa sustentável.
Com o decorrer da experiência, verificou-se uma diminuição do número de *kelps* em todas as fibras testadas. Os tanques de cultivo não foram enriquecidos com meio PES (solução de nutrientes e vitaminas) para simular as condições ambientais do mar, o que possivelmente limitou o desenvolvimento dos recrutas. Assim, com base nos resultados deste estudo, as fibras de sisal, não oferecem a mesma produtividade e eficiência para o cultivo de *L. ochroleuca* que o fio de polipropileno. No entanto, a fibra de algodão parece ser uma alternativa mais sustentável capaz de assegurar os mesmos níveis de produtividade. Seria interessante repetir a experiência sem limitação de nutrientes, de modo a avaliar as opções na preparação das *seed lines* para serem colocadas no mar, assim como a capacidade dos indivíduos se permanecerem fixos na fibra.

Os fios de algodão e polipropileno apresentam características distintas, com vantagens e desvantagens. O fio de algodão é biodegradável; não requer tratamento prévio para melhorar a fixação dos *kelps*. No entanto, como é biodegradável, tem pouca durabilidade. Como tal, para esforços de reflorestação, o fio de algodão é uma opção sustentável, enquanto para o cultivo de *kelps*, a pouca durabilidade representa uma significativa desvantagem. Por outro lado, o fio de polipropileno, como é um material sintético, possui maior durabilidade. No entanto, não é biodegradável; exige tratamento prévio para melhorar a fixação dos *kelps* (é normalmente esfregado com uma lixa para abrir a fibra e depois aquecido para aumentar a superfície disponível). Para esforços de reflorestação, o fio de polipropileno não é a melhor escolha, uma vez que não é biodegradável, enquanto no cultivo de *kelps*, a sua durabilidade torna-o uma fibra adequada, embora o seu impacto ambiental deva ser considerado.

5. Conclusão

Atualmente, além de ações de conservação, é essencial implementar técnicas de reflorestação para combater e mitigar o declínio das florestas marinhas.

Foi estudada a sazonalidade das espécies de *kelp Laminaria ochroleuca* e *Laminaria hyperborea*, ambas formadoras de florestas perenes no Norte de Portugal. Com base na proporção de indivíduos reprodutivos no campo, densidade e viabilidade dos esporos recolhidos, a melhor altura para recolher esporos para produzir culturas *stock* da *L. ochroleuca* parece ser em torno de abril. Relativamente à *L. hyperborea*, considerando a proporção de tecido reprodutivo em campo, densidade e viabilidade dos esporos recolhidos, o melhor mês para recolher esporos para produzir culturas *stock* desta espécie parece ser em torno de março. Contudo, as variações meteorológicas interanuais na costa portuguesa podem alterar a sazonalidade do crescimento e a reprodução destas espécies. Consequentemente, a altura em que os esporos estão mais viáveis pode não ser consistente de um ano para o outro. Portanto, seria necessário estender este estudo por vários anos para obter dados com maior exatidão.

Das maiores dificuldades na cultura de *kelps* é a obtenção de monoculturas limpas. Apesar de não ter sido possível determinar o efeito do iodo como método de esterilização, uma vez que não foram observadas espécies contaminantes no controlo, não foi identificado um efeito negativo na libertação ou no desenvolvimento dos esporos. Assim, com o objetivo de obter culturas *stock* de *kelp* estéreis, poderá ser interessante repetir a experiência de forma a explorar o iodo como solução para limpeza do material reprodutivo.

Da mesma forma, o teste de limpeza dos tecidos com ultrassons também não permitiu avaliar a eficiência como método de esterilização, uma vez que, mais uma vez, não foram detetadas espécies contaminantes. Ao fim de um mês, os ultrassons e os tempos de dessecação não demonstraram ter um efeito negativo na viabilidade dos esporos. Assim, seria interessante repetir a experiência para avaliar a sua eficácia como método de esterilização, visando a obtenção de culturas *stock* de *kelp* estéreis.

O tecido reprodutivo deve ser exposto ao ar a 5ºC durante 1h para maximizar a libertação e viabilidade dos esporos. Contudo, poderá ser benéfico realizar mais estudos para complementar estes dados.

Dentro dos diferentes tempos de dessecação testados (30 minutos, 1 hora e 2 horas a 5ºC), para maximizar a libertação e garantir a viabilidade dos esporos, é mais recomendável expor o tecido reprodutivo a 5ºC durante 2 horas.

Na técnica *green gravel*, os tanques com altas densidades tanto apresentaram maior recrutamento como maior crescimento dos indivíduos cultivados. Consequentemente, as contaminações com espécies oportunistas ocuparam uma menor área. Em contraste com estes resultados, nos tanques com baixas densidades, observou-se menor recrutamento e menor crescimento dos indivíduos, o que permitiu que espécies oportunistas colonizassem uma maior área. Seria interessante semear o cascalho com baixa densidade de gametófitos de *L. ochroleuca* e manter uma baixa intensidade luminosa até que os primeiros recrutas sejam visíveis a olho nu. Posteriormente, a intensidade luminosa poderia ser aumentada para promover o crescimento dos indivíduos. Esta opção poderia não apenas reduzir o material reprodutivo utilizado, como teria o potencial de diminuir a colonização por espécies oportunistas. No entanto, seria necessário verificar a eficácia desta abordagem após o *deployment* do *green gravel* para certificar que o procedimento utilizado produziria indivíduos suficientes para assegurar o sucesso do esforço de reflorestação.

As fibras de sisal não oferecem a mesma produtividade e eficiência para o cultivo de *L. ochroleuca* que o fio de polipropileno. No entanto, a fibra de algodão parece ser uma alternativa mais sustentável capaz de assegurar os mesmos níveis de produtividade. Seria interessante repetir a experiência sem limitação de nutrientes, de modo a avaliar as opções na preparação das *seed lines* para serem colocadas no mar, assim como avaliar a capacidade de fixação nas duas opções após *deployment*.

O presente estudo pretendeu otimizar a preparação de culturas *stock* de *kelp* e aumentar a eficiência dos esforços de reflorestação. Como mencionado anteriormente, as técnicas de reflorestação não devem prejudicar as populações naturais; devem ser economicamente viáveis, de baixa manutenção e logisticamente simples, para serem utilizadas com maior frequência e em larga escala. Serão cada vez mais cruciais à medida que as florestas marinhas continuam a diminuir em todo o mundo. Para maximizar o sucesso dos esforços de reflorestação, seria uma boa prática associá-los a áreas protegidas.

Em suma, os resultados obtidos permitem aprimorar a eficiência dos métodos de cultivo e reflorestação de *L. ochroleuca*, contribuindo para um *scale-up* previsto no âmbito da Década das Nações Unidas para a Restauração dos Ecossistemas (2021-2030).

6. Referências bibliográficas

Adams, J. M., Gallagher, J. A., & Donnison, I. S. (2009). Fermentation study on saccharina latissima for bioethanol production considering variable pre-treatments. *Journal of Applied Phycology*, *21*(5).

Alsuwaiyan, N. A., Mohring, M. B., Cambridge, M., Coleman, M. A., Kendrick, G. A., & Wernberg, T. (2019). A review of protocols for the experimental release of kelp (Laminariales) zoospores. In *Ecology and Evolution* (Vol. 9, Issue 14).

Angel, A., & Ojeda, F. P. (2001). Structure and trophic organization of subtidal fish assemblages on the northern Chilean coast: The effect of habitat complexity. *Marine Ecology Progress Series*, *217*.

Assis, J., Tavares, D., Tavares, J., Cunha, A., Alberto, F., & Serrão, E. A. (2009). Findkelp, a GIS-based community participation project to assess portuguese kelp conservation status. *Journal of Coastal Research*, *SPEC. ISSUE 56*.

Assis, J., Tavares, J. T., Serrão, E. a, Alberto, F., Ferreira, C., Tavares, D., Paulos, L., & Tempera, F. (2011). *Florestas marinhas: As espécies de algas castanhas gigantes de Portugal*. 32.

Augyte, S., Lewis, L., Lin, S., Neefus, C. D., & Yarish, C. (2018). Speciation in the exposed intertidal zone: the case of Saccharina angustissima comb. nov. & stat. nov. (Laminariales, Phaeophyceae). *Phycologia*, *57*(1).

Ballesteros, E., Torras, X., Pinedo, S., García, M., Mangialajo, L., & de Torres, M. (2007). A new methodology based on littoral community cartography dominated by macroalgae for the implementation of the European Water Framework Directive. *Marine Pollution Bulletin*, *55*(1–6), 172–180.

Bartsch, I., Wiencke, C., Bischof, K., Buchholz, C. M., Buck, B. H., Eggert, A., Feuerpfeil, P., Hanelt, D., Jacobsen, S., Karez, R., Karsten, U., Molis, M., Roleda, M. Y., Schubert, H., Schumann, R., Valentin, K., Weinberger, F., & Wiese, J. (2008). The genus Laminaria sensu lato: Recent insights and developments. In *European Journal of Phycology* (Vol. 43, Issue 1).

Bennett, S., Wernberg, T., Connell, S. D., Hobday, A. J., Johnson, C. R., & Poloczanska, E. S. (2016). The “Great Southern Reef”: Social, ecological and economic value of Australia’s neglected kelp forests. *Marine and Freshwater Research*, *67*(1).

Bertocci, I., Araújo, R., Oliveira, P., & Sousa-Pinto, I. (2015). Potential effects of kelp species on local fisheries. In *Journal of Applied Ecology* (Vol. 52, Issue 5).

Birkett, D. A., Maggs, C. A., Dring, M. J., & Boaden, P. J. S. (1998). *Infralittoral reeef biotopes with kelp species: An overview of dynamic and sensitivity characteristics for conservation management of marine SACs*.

Britton-Simmons, K. H., Rhoades, A. L., Pacunski, R. E., Galloway, A. W. E., Lowe, A. T., Sosik, E. A., Dethier, M. N., & Duggins, D. O. (2012). Habitat and bathymetry influence the landscape-scale distribution and abundance of drift macrophytes and associated invertebrates. *Limnology and Oceanography*, *57*(1).

Buchholz, C., & Lüning, K. (1999). Isolated, distal blade discs of the brown alga Laminaria digitata form sorus, but not discs, near to the meristematic transition zone. *Journal of Applied Phycology*, *11*(6).

Buschmann, A., Graham, M., & Vasquez, J. (2007). *Global Ecology of the Giant Kelp Macrocystis*. 39–88.

Buschmann, A. H., Prescott, S., Potin, P., Faugeron, S., Vasquez, J. A., Camus, C., et al. (2014). “The status of kelp exploitation and marine agronomy, with emphasis on Macrocystis pyrifera, in Chile,” in Advances in Botanical Research, ed. N. Bourgougnon (Elsevier), 161–188.

Castro, N. M., Valdez, M. C., Álvarez, A. M., Ramírez, R. N. A., Rodríguez, I. S., Contreras, H. H., & García, L. S. (2009). The kelp Macrocystis pyrifera as nutritional supplement for goats. *Revista Cientifica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, *19*(1).

Chapman, A. R. O. (1987). Population and Community Ecology of Seaweeds. *Advances in Marine Biology*, *23*(C).

Chapman, A. R. O., & Craigie, J. S. (1977). Seasonal growth in Laminaria longicruris: Relations with dissolved inorganic nutrients and internal reserves of nitrogen. *Marine Biology*, *40*(3).

Chemello, S., Pinto, I. S., & Pereira, T. R. (2023). Optimising Kelp Cultivation to Scale up Habitat Restoration Efforts: Effect of Light Intensity on “Green Gravel” Production. *Hydrobiology*, *2*(2).

Clinton J. Dawes. (1998). *Marine Botany, 2nd Edition*. 496.Duarte, C. M., Losada, I. J., Hendriks, I. E., Mazarrasa, I., & Marbà, N. (2013). The role of coastal plant communities for climate change mitigation and adaptation. *Nature Climate Change*, *3*(11), 961–968.

Edwards, M., & Watson, L. (2011). Aquaculture Explained: Cultivating Laminaria digitata. *Aquaculture Explained*, *26*(26).

Eger, A. M., Layton, C., McHugh, T. A., Gleason, M., & Eddy, N. (2022). Kelp Restoration Guidebook: Lessons Learned from Kelp Projects Around the World. In *The Nature Conservancy, Arlington, VA, USA*.

Fernández, C. (2011). The retreat of large brown seaweeds on the north coast of Spain: The case of Saccorhiza polyschides. *European Journal of Phycology*, *46*(4).

Flavin, K., Flavin, N., & Flahive, B. (2013). *Kelp Farming Manual: a Guide to the Processes, Techniques, and Equipment for Farming Kelp in New England Waters*. Ocean Approved LLC.

Fletcher, R. L. (1987). *Seaweeds of the British Isles: pt. 1. Fletcher, R. L. Fucophyceae (Phaeophyceae) - British Phycological Society - Google Livros*.

Forbord, S., Skjermo, J., Arff, J., Handå, A., Reitan, K. I., Bjerregaard, R., & Lüning, K. (2012). Development of Saccharina latissima (Phaeophyceae) kelp hatcheries with year-round production of zoospores and juvenile sporophytes on culture ropes for kelp aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, *24*(3).

Franco, J. N., Tuya, F., Bertocci, I., Rodríguez, L., Martínez, B., Sousa-Pinto, I., & Arenas, F. (2018). The 'golden kelp' Laminaria ochroleuca under global change: Integrating multiple eco-physiological responses with species distribution models. *Journal of Ecology*, *106*(1).

Franco, J. N., Wernberg, T., Bertocci, I., Duarte, P., Jacinto, D., Vasco-Rodrigues, N., & Tuya, F. (2015). Herbivory drives kelp recruits into "hiding" in a warm ocean climate. *Marine Ecology Progress Series*, *536*, 1–9.

Franco, J. N., Wernberg, T., Bertocci, I., Jacinto, D., Maranhão, P., Pereira, T., Martinez, B., Arenas, F., Sousa-Pinto, I., & Tuya, F. (2017). Modulation of different kelp life stages by herbivory: compensatory growth versus population decimation. *Marine Biology*, *164*(8).

Fredriksen, S., Filbee-Dexter, K., Norderhaug, K. M., Steen, H., Bodvin, T., Coleman, M. A., Moy, F., & Wernberg, T. (2020). Green gravel: a novel restoration tool to combat kelp forest decline. *Scientific Reports*, *10*(1).

Fujita, D. (2011). Management of kelp ecosystem in Japan. *Cahiers de Biologie Marine*, *52*, 499–505.

García-Vaquero, M., Gaurav, R., Brijesh, K. T., & Torres, S. (2018). *Ultrasonic extraction*.

Gibor, A., Polne, M., Biniaminov, M., & Neushul, M. (1981). Exploratory studies of vegetative propagation of marine algae: procedure for obtaining axenic tissues. *International Seaweed Symposium (Xth)*.

Gutierrez, A., Correa, T., Muñoz, V., Santibañez, A., Marcos, R., Cáceres, C., & Buschmann, A. H. (2006). Farming of the giant kelp macrocystis pyrifera in southern Chile for development of novel food products. *Journal of Applied Phycology*, *18*(3–5).

Halpern, B. S., Frazier, M., Afflerbach, J., Lowndes, J. S., Micheli, F., O'Hara, C., Scarborough, C., & Selkoe, K. A. (2019). Recent pace of change in human impact on the world's ocean. *Scientific Reports 2019 9:1*, *9*(1), 1–8.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). (2023). Climate Change 2022 – Impacts, Adaptation and Vulnerability. *Climate Change 2022 – Impacts, Adaptation and Vulnerability*.

Izquierdo, J. L., Pérez-Ruzafa, I. M., & Gallardo, T. (2002). Effect of temperature and photon fluence rate on gametophytes and young sporophytes of Laminaria ochroleuca Pylaie. *Helgoland Marine Research*, *55*(4).

Jackson, G. A., & Winant, C. D. (1983). Effect of a kelp forest on coastal currents. *Continental Shelf Research*, *2*(1).

Jenkins, S. R., Norton, T. A., & Hawkins, S. J. (1999). Interactions between canopy forming algae in the eulittoral zone of sheltered rocky shores on the Isle of Man. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *79*(2), 341–349.

Johnson, C. R., Banks, S. C., Barrett, N. S., Cazassus, F., Dunstan, P. K., Edgar, G. J., Frusher, S. D., Gardner, C., Haddon, M., Helidoniotis, F., Hill, K. L., Holbrook, N. J., Hosie, G. W., Last, P. R., Ling, S. D., Melbourne-Thomas, J., Miller, K., Pecl, G. T.,

Richardson, A. J., … Taw, N. (2011). Climate change cascades: Shifts in oceanography, species' ranges, and subtidal marine community dynamics in eastern Tasmania. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *400*(1–2), 17–32.

Kain, J. M., & Jones, M. S. (1971). The biology of Laminaria hyperborea. VI. Some Norwegian populations. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *51*(2), 387–408.

Kain (Jones), J. M. (1989). The seasons in the subtidal. *British Phycological Journal*, *24*(3), 203–215.

Kinlan, B. P., Graham, M. H., Sala, E., & Dayton, P. K. (2003). Arrested development of giant kelp (Macrocystis pyrifera, Phaeophyceae) embryonic sporophytes: A mechanism for delayed recruitment in perennial kelps? *Journal of Phycology*, *39*(1).

Krause-Jensen, D., Carstensen, J., & Dahl, K. (2007). Total and opportunistic algal cover in relation to environmental variables. *Marine Pollution Bulletin*, *55*(1–6).

Krumhansl, K. A., and Scheibling, R. E. (2012). Production and fate of kelp detritus. *Marine Ecology Progress Series, 467, 281-302.*

Lee, T. F. (1985). Aposporous Gametophyte Formation in Stipe Explants from Laminaria Saccharina (Phaeophyta). *Botanica Marina*, *28*(5).

Lemos, R. T., & Pires, H. O. (2004). The upwelling regime off the west Portuguese coast, 1941-2000. *International Journal of Climatology*, *24*(4).

Llope, M., Anadón, R., Sostres, J. Á., & Viesca, L. (2007). Nutrients dynamics in the southern Bay of Biscay (1993-2003): Winter supply, stoichiometry, long-term trends, and their effects on the phytoplankton community. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, *112*(7).

Lobban, C. S., & Harrison, P. J. (1997). *Seaweed Ecology and Physiology - Christopher S. Lobban, Paul J. Harrison - Google Livros*.

Lodeiro, P., Cordero, B., Barriada, J. L., Herrero, R., & Sastre De Vicente, M. E. (2005). Biosorption of cadmium by biomass of brown marine macroalgae. *Bioresource Technology*, *96*(16).

Løvås, S. M., & Tørum, A. (2001). Effect of the kelp Laminaria hyperborea upon sand dune erosion and water particle velocities. *Coastal Engineering*, *44*(1).

Lüning, K. (1980). Critical levels of light and temperature regulating the gametogenesis of three Laminaria species (PHAEOPHYCEAE). *Journal of Phycology*, *16*(1).

Lüning, K., Wagner, A., & Buchholz, C. (2000). Evidence for inhibitors of sporangium formation in Laminaria digitata (Phaeophyceae) during the season of rapid growth. *Journal of Phycology*, *36*(6), 1129–1134.

Makkar, H. P. S., Tran, G., Heuzé, V., Giger-Reverdin, S., Lessire, M., Lebas, F., & Ankers, P. (2016). Seaweeds for livestock diets: A review. *Animal Feed Science and Technology*, *212*, 1–17.

Mann, K. H. (1973). Seaweeds: Their productivity and strategy for growth. *Science*, *182*(4116), 975–981.

Neori, A., Chopin, T., Troell, M., Buschmann, A. H., Kraemer, G. P., Halling, C., Shpigel, M., & Yarish, C. (2004). Integrated aquaculture: Rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture*, *231*(1–4).

Pereira, T., Engelen, A., Pearson, G., & et al. (2011). *Temperature effects on the microscopic haploid stage development of L. ochroleuca and S. polyschides, kelps with contrasting life histories.*

Pereira, T. R., Azevedo, I. C., Oliveira, P., Silva, D. M., & Sousa-Pinto, I. (2019). Life history traits of Laminaria ochroleuca in Portugal: The range-center of its geographical distribution. *Aquatic Botany*, *152*.

Pereira, T. R., Engelen, A. H., Pearson, G. A., Valero, M., & Serrão, E. A. (2017). Population dynamics of temperate kelp forests near their low-latitude limit. *Aquatic Botany*, *139*.

Pérez-Ruzafa, I., Izquierdo, J., Araujo, R., Sousa-Pinto, I., Pereira, L., & Bárbara, I. (2003). *Mapas de distribución de algas marinas de la Península Ibérica e Islas Baleares. XVII. Laminaria rodriguezii Bornet y adiciones a los mapas de L. hyperborea (Gunner.) Foslie, L. ochroleuca Bach. Pyl. y L. saccharina (L.) Lamour. (Laminariales, Fucophyceae). Bot Complut*. Botanica Complutensis.

Peteiro, C., Sánchez, N., Dueñas-Liaño, C., & Martínez, B. (2014). Open-sea cultivation by transplanting young fronds of the kelp Saccharina latissima. *Journal of Applied Phycology*, *26*(1).

Pinho, D. A., Bertocci, I. A., Arenas, F. A., Franco A, J. N., Jacinto, D. B., Castro B, J. J., Vieira, R. A., Sousa-Pinto, I. A., Wernberg, T. C., & Tuya, F. D. (2015). *Spatial and temporal variation of kelp forests and associated macroalgal assemblages along the Portuguese coast*. 113–122.

Pires, B. (2019). *Macroalgas em região fronteira: Viana do Castelo*.

Pires, C. (2016). *Identificação e Análise do Potencial Antifúngico dos Polissacarídeos das Algas Saccharina latissima e Laminaria ochroleuca*.

Provasoli, L. (1968). Media and prospects for the cultivation of marine algae. *Japanese Society of Plant Physiology*, 63–75.

Raffo, M. P., Russo, V. Lo, & Schwindt, E. (2014). Introduced and native species on rocky shore macroalgal assemblages: Zonation patterns, composition and diversity. *Aquatic Botany*, *112*, 57–65.

Rioux, L. (2010). Caractérisation strucurale et évaluation de l`activité biologique de polysaccharides extraits de saccharina longicruris. *These Ph.D., Université Laval Québec*.

Roleda, M. Y., Hanelt, D., Kräbs, G., & Wiencke, C. (2004). Morphology, growth, photosynthesis and pigments in Laminaria ochroleuca (Laminariales, Phaeophyta) under ultraviolet radiation. *Phycologia*, *43*(5).

Santelices, B., Aedo, D., & Hoffmann, A. (2002). Banks of microscopic forms and survival to darkness of propagules and microscopic stages of macroalgae. *Revista Chilena de História Natural*, *75*(3).

Skriptsova, A. V., & Titlyanov, E. A. (2003). Effect of the meristem on sporification of Laminaria cichorioides. *Russian Journal of Marine Biology*, *29*(6).

Smale, D. A., Wernberg, T., Yunnie, A. L. E., & Vance, T. (2015). The rise of Laminaria ochroleuca in the Western English Channel (UK) and comparisons with its competitor and assemblage dominant Laminaria hyperborea. *Marine Ecology*, *36*(4).

Smith, S. V. (1981). Marine macrophytes as a global carbon sink. *Science*, *211*(4484).

Sydeman, W. J., García-Reyes, M., Schoeman, D. S., Rykaczewski, R. R., Thompson, S. A., Black, B. A., & Bograd, S. J. (2014). Climate change and wind intensification in coastal upwelling ecosystems. *Science*, *345*(6192).

Tuya, F., Cacabelos, E., Duarte, P., Jacinto, D., Castro, J. J., Silva, T., Bertocci, I., Franco, J. N., Arenas, F., Coca, J., & Wernberg, T. (2012). Patterns of landscape and assemblage structure along a latitudinal gradient in ocean climate. *Marine Ecology Progress Series*, *466*, 9–19.

Ugarte, R. A., Craigie, J. S., & Critchley, A. T. (2010). *Fucoid Flora of the Rocky Intertidal of the Canadian Maritimes: Implications for the Future with Rapid Climate Change*. 69–90.

Varela, D. A., Hernríquez, L. A., Fernández, P. A., Leal, P., Hernández-González, M. C., Figueroa, F. L., & Buschmann, A. H. (2018). Photosynthesis and nitrogen uptake of the giant kelp Macrocystis pyrifera (Ochrophyta) grown close to salmon farms. *Marine Environmental Research*, *135*.

Vivekanand, V., Eijsink, V. G. H., & Horn, S. J. (2012). Biogas production from the brown seaweed Saccharina latissima: Thermal pretreatment and codigestion with wheat straw. *Journal of Applied Phycology*, *24*(5).

Voerman, S. E., Llera, E., & Rico, J. M. (2013). Climate driven changes in subtidal kelp forest communities in NW Spain. *Marine Environmental Research*, *90*, 119–127.

Vörösmarty, C. J., McIntyre, P. B., Gessner, M. O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., Glidden, S., Bunn, S. E., Sullivan, C. A., Liermann, C. R., & Davies, P. M. (2010). Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature*, *467*(7315).

Waltham, N. J., Elliott, M., Lee, S. Y., Lovelock, C., Duarte, C. M., Buelow, C., Simenstad, C., Nagelkerken, I., Claassens, L., Wen, C. K. C., Barletta, M., Connolly, R. M., Gillies, C., Mitsch, W. J., Ogburn, M. B., Purandare, J., Possingham, H., & Sheaves, M. (2020). UN Decade on Ecosystem Restoration 2021–2030—What Chance for Success in Restoring Coastal Ecosystems? *Frontiers in Marine Science*, *7*.

Wei, N., Quarterman, J., & Jin, Y. S. (2013). Marine macroalgae: an untapped resource for producing fuels and chemicals. *Trends in Biotechnology*, *31*(2), 70–77.

Wernberg, T., Kendrick, G. A., and Toohey, B. D. (2005). Modification of the physical environment by an Ecklonia radiata (Laminariales) canopy and implications for associated foliose algae.