



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS
VEGETAIS - PPGRGV

LUANE PORTELA CARMO

EFEITO DE BIOESTIMULANTES DERIVADOS DE
MACROALGAS NA ATENUAÇÃO DO ESTRESSE E
PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Comanthera mucugensis* (Giul.) L.
R. Parra & Giul.

LUANE PORTELA CARMO

**EFEITO DE BIOESTIMULANTES DERIVADOS DE
MACROALGAS NA ATENUAÇÃO DO ESTRESSE E
PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Comanthera mucugensis* (Giul.) L.
R. Parra & Giul.**

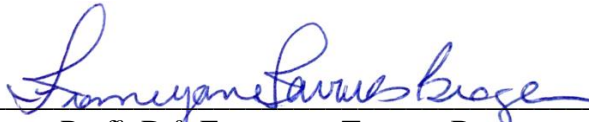
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Profa. Dra. Alone Lima-Brito

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Wallace do Nascimento Moura

Feira de Santana - BA
2023


BANCA EXAMINADORA



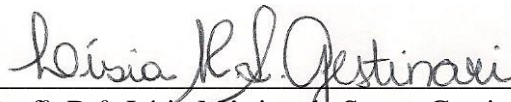
Prof^ª. Dr^ª. Franciyane Tavares Braga



Prof^ª. Dr^ª. Gabriela Torres da Silva



Prof^ª. Dr^ª. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa



Prof^ª. Dr^ª. Lísia Mônica de Souza Gestinari



Prof^ª. Dr^ª. Alone Lima Brito
Orientadora e Presidente da Banca

Ficha catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

Carmo, Luane Portela
C285e Efeito de bioestimulantes derivados de macroalgas na atenuação do estresse e propagação *in vitro* de *Comanthera mucugensis* (Giul.) L. R. Parra & Giul / Luane Portela Carmo. – 2023.
105f. : il.

Orientadora: Alone Lima-Brito
Coorientador: Carlos Wallace do Nascimento Moura
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Feira de Santana.
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2023.

1. Conservação *ex situ*. 2. *Hypnea pseudomusciformis*. 3. *Agardhiella subulata*. 4. κ -Carragenana. 5. Morfogênese *in vitro*. 6. Métodos eco-friendly. I. Lima-Brito, Alone, orient. II. Moura, Carlos Wallace do Nascimento, coorient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 582.26:582.55/.56

A todos que lutam com dignidade e perseverança pelos seus objetivos e sonhos

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso minha gratidão a Deus pelos planos que traçou em minha vida, os quais me conduziram à pesquisa e pelas descobertas que me fizeram a pesquisadora que sou hoje. Em cada etapa dessa jornada acadêmica, pude testemunhar a Sua intervenção e provisão. Que o meu trabalho possa servir como testemunho da Sua infinita sabedoria.

Aos meus orientadores Alone e Carlos, minha profunda gratidão pela orientação e suporte constantes. Sou profundamente grata a vocês por terem aceitado me orientar nesta pesquisa inédita, na qual as respostas não eram facilmente encontradas nos artigos. Durante todo o processo, demonstraram coragem e dedicação excepcionais, ajudando-me a desenvolver abordagens e métodos mais adequadas. Juntos, somos uma equipe de milhões.

À minha família, meu pilar de sustentação, agradeço por seu amor incondicional e apoio constante. Sem vocês, eu não seria nada, pois em vocês eu tenho minha principal fonte de amor e proteção. Tudo isso é por vocês, para vocês!

Aos funcionários do Horto/UEFS, agradeço pelo suporte técnico e pela gentileza com a qual sempre fui tratada. Aos colegas do LCTV pelo acolhimento, convivência e colaboração nos últimos anos. À minha família LAFICO, que é uma fonte de inspiração para mim, pelo companheirismo, atenção, amizade e ajuda.

Ao pessoal do LABIO, LAPEM e LAMIV pela generosidade de disponibilizarem seus laboratórios, equipamentos, infraestrutura e tempo, que foram essenciais para a condução das análises finais. Também agradeço a Profa. Claudete Santa-Catarina da UENF pela realização da análise das poliaminas que foram cruciais para a finalização da tese.

Agradeço à Universidade Estadual de Feira de Santana (Ahh, a UEFS...amo te odiar) pela incrível jornada de 12 anos que vivenciei como estudante. Durante esse tempo, a UEFS se tornou muito mais do que uma instituição; foi o lar de experiências transformadoras e aprendizados enriquecedores que moldaram quem sou hoje.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais por fornecer o ambiente propício e os recursos necessários para a realização deste estudo.

Agradeço de coração a todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente, ou que torceram por mim, e que Deus possa abençoar cada um de vocês!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

"A inteligência e o caráter são os objetivos da verdadeira educação"

Martin Luther King Jr.

RESUMO

Atualmente, há um crescente debate em torno da necessidade de intensificar a agricultura utilizando métodos *eco-friendly*. Nesse contexto, os bioestimulantes derivados de macroalgas surgem como uma alternativa promissora para impulsionar uma produção agrícola mais sustentável e segura. Esse bioinsumo pode ser integrado aos sistemas de cultivo *in vitro* e auxiliar na conservação dos recursos genéticos vegetais. A espécie *Comanthera mucugensis* é endêmica da Chapada Diamantina-BA e está ameaçada devido ao extrativismo, secas prolongadas e incêndios florestais. A cultura de tecidos vegetais representa uma estratégia alternativa para conservar e propagar a espécie através dos protocolos de organogênese e embriogênese somática. Os resultados da presente tese demonstraram o potencial do uso dos extratos aquoso e polissacarídico das macroalgas *Hypnea pseudomusciformis* e *Agardhiella subulata*, e da κ -carragenana na atenuação do estresse térmico em sementes de *C. mucugensis* expostas a diferentes níveis de alta temperatura. O tratamento com a κ -carragenana também foi capaz de atenuar os efeitos negativos do estresse hídrico na germinação, sobrevivência e crescimento radicular da espécie, além de aumentar a síntese de poliaminas, as quais podem estar associadas na indução de brotações via organogênese direta. Outra descoberta importante demonstrou que o picloram associado com a κ -carragenana promove a formação de calos com potencial embriogênico. O bioestimulante parece regular o metabolismo das poliaminas que participa do processos de morfogênese *in vitro*. Além disso, a utilização da κ -carragenana como agente alternativo promoveu melhores condições para o crescimento das plantas e a regeneração dos brotos via organogênese direta e indireta, em comparação com o ágar, resultando em uma redução no custo de fabricação do meio de cultura. Os resultados da presente tese contribuem para o avanço do conhecimento sobre os efeitos dos bioestimulantes derivados de macroalgas como atenuadores de estresse térmico e hídrico, e como moduladores da morfogênese *in vitro* de *C. mucugensis*. Dessa forma, foi possível melhorar o cultivo *in vitro* de forma sustentável e estabelecer protocolos aprimorados para a organogênese e calogênese.

Palavras-chave: Conservação *ex situ*; Métodos *eco-friendly*; *Hypnea pseudomusciformis*; *Agardhiella subulata*; κ -Carragenana; Morfogênese *in vitro*.

ABSTRACT

Currently, there is a growing debate around the need to intensify agriculture using eco-friendly methods. In this context, seaweed-derived biostimulants emerge as a promising alternative to boost a more sustainable and safe agricultural production. This bioinput can be integrated into *in vitro* cultivation systems and assist in the conservation of plant genetic resources. The *Comantera mucugensis* species is endemic to the Chapada Diamantina-BA and is endangered due to extractivism, prolonged droughts and forest fires. The plant tissue culture represents an effective strategy to conserve and propagate the species through organogenesis and somatic embryogenesis protocols. The results of the present thesis demonstrated the potential use of aqueous and polysaccharide extracts of the seaweed *Hypnea pseudomusciformis* and *Agardhiella subulata*, and of κ -carrageenan in attenuating heat stress in *C. mucugensis* seeds exposed to different levels of high temperature. The treatment with κ -carrageenan was also able to attenuate the negative effects of water stress on germination, survival, and root growth of the species, as well as increase the synthesis of polyamines, which may be associated in the induction of shoots via direct organogenesis. Another important finding demonstrated that picloram associated with κ -carrageenan promotes callus formation with embryogenic potential. The biostimulant seems to regulate the metabolism of polyamines that participate in the *in vitro* morphogenesis processes. In addition, the use of κ -carrageenan as an alternative agent promoted better conditions for plant growth and shoot regeneration via direct and indirect organogenesis compared to agar, resulting in a reduction in the cost of manufacturing the culture medium. The results of the present thesis contribute to the advancement of knowledge on the effects of seaweed-derived biostimulants as attenuators of heat and water stress, and as modulators of *in vitro* morphogenesis of *C. mucugensis*. Thus, it was possible to improve *in vitro* cultivation in a sustainable way and to establish optimized protocols for organogenesis and callogenesis.

Keywords: *Ex situ* conservation; Eco-friendly methods; *Hypnea pseudomusciformis*; *Agardhiella subulata*; κ -Carrageenan; *In vitro* morphogenesis.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
CAPÍTULO 1 – Effects of heat stress and seaweed-derived biostimulants on the germination of <i>Comanthera mucugensis</i> , an endemic plant of fire-prone <i>Campos rupestres</i> of Chapada Diamantina (Brazil) (<i>artigo publicado</i>)	32
Introduction	35
Material and methods	36
Results	38
Discussion	39
References	42
CAPÍTULO 2 – Water stress and κ -carrageenan stimulate <i>in vitro</i> direct organogenesis in <i>Comanthera mucugensis</i> , an endangered species from the semi-arid region of Northeastern Brazil	49
Introduction	52
Material and methods	53
Results	55
Discussion	56
References	59
CAPÍTULO 3 – Efeitos do picloram e de bioestimulantes derivados de macroalgas na formação de calos embriogênicos de <i>Comanthera mucugensis</i> , uma planta ornamental brasileira ameaçada de extinção	66
Introdução	68
Material e métodos	69
Resultados	72
Discussão	75
Referências	78
CAPÍTULO 4 - Gelation of culture medium with κ -carrageenan improves and reduces the cost of <i>in vitro</i> propagation of <i>Comanthera mucugensis</i> (Giul.) L. R. Parra & Giul (<i>artigo publicado</i>)	89
Introduction	93
Material and methods	94
Results	96

Discussion	98
References	100
CONSIDERAÇÕES GERAIS	104

INTRODUÇÃO GERAL

Há um debate crescente sobre a mudança do paradigma agrícola em direção a uma agricultura sustentável alinhada a visão da Agenda 2030 e as 17 metas globais através do uso de métodos *eco-friendly* (GENNARI; ROSERO-MONCAYO; TUBIELLO, 2019). Os bioestimulantes vegetais podem auxiliar na promoção de uma produção vegetal ecologicamente responsável, através da melhoria da qualidade das culturas sem o uso de fertilizantes e pesticidas. Assim, quando integrados aos sistemas de cultivos convencionais, são capazes de preservar os recursos naturais e atuar na conservação da biodiversidade de espécies com importância econômica e ecológica (CARMO; MOURA; LIMA-BRITO, 2021).

A espécie de flor seca [*everlasting*], *Comanthera mucugensis* (Giul.) L. R. Parra & Giul. (Eriocaulaceae), também conhecida como "sempre-viva de Mucugê", é endêmica da Chapada Diamantina-BA (GIULIETTI et al., 2005). A planta foi ostensivamente explorada na década de 70 para a Europa e sul do Brasil e, atualmente, está em perigo de extinção (BRASIL, 2022). Além do extrativismo, a falta de chuvas, secas prologadas e a maior recorrência de incêndios em áreas de ocorrência da espécie contribuem para a redução das populações e contínua perda da qualidade do hábitat (GONÇALVES et al., 2011). Essas mudanças ambientais geram uma condição de estresse hídrico e térmico sob *C. mucugensis*, ameaçando ainda mais sua sobrevivência. Apesar disso, os dados na literatura acerca dos efeitos ou métodos de mitigação do estresse são incipientes e escassos para a espécie.

A cultura de tecidos vegetais é a principal estratégia de conservação *ex situ* e propagação de *C. mucugensis* (LIMA; BRITO; SANTANA, 2021). A técnica de multiplicação *in vitro* aplica o princípio da pluripotência das células vegetais, no qual um determinado tecido pode regenerar e desenvolver um novo órgão ou indivíduo via organogênese ou embriogênese somática (FEHÉR, 2019).

A propagação *in vitro* de *C. mucugensis* é, preferencialmente, realizada via organogênese direta sem reguladores de crescimento, no entanto, possui algumas limitações como a baixa taxa de brotamentos e de enraizamento (LIMA-BRITO et al., 2011a, 2016). Recentemente, a suplementação do meio de cultura com extratos aquosos de macroalgas vermelhas foi proposta como método para aprimorar a produção de brotos (CARMO; MOURA; LIMA-BRITO, 2020). Além disso, foi observado que as plantas submetidas ao estresse podem multiplicar-se via organogênese direta (LIMA-BRITO et al., 2011b, 2015).

Os dados acerca da morfogênese via indireta são limitados e indicam a dependência da utilização de reguladores para formação de calos e a dificuldade de regeneração dos brotos (LIMA-BRITO et al., 2011a). A regeneração do tecido vegetal via embriogênese somática ainda não foi reportado na literatura para a espécie.

A espécie *C. mucugensis* está inserida em um contexto de emergência ecológica, dada as condições de estresse térmico e hídrico as quais está submetida e as limitações dos protocolos de propagação que ainda não são capazes de atingir a produção comercial e suprimir o extrativismo. As vantagens do emprego de extratos de macroalgas no cultivo de plantas pode ser a chave para superar esses desafios. Portanto, o presente estudo avaliou o potencial dos bioestimulantes derivados de macroalgas na atenuação do estresse e na propagação *in vitro* de *C. mucugensis*.

REFERÊNCIAS

BRASIL. PORTARIA MMA Nº 148, DE 7 DE JUNHO DE 2022. Ministério do Meio Ambiente, 2022.

CARMO, L. P.; MOURA, C. W. DO N.; LIMA-BRITO, A. Effects of seaweed extracts on the *in vitro* multiplication of plants. In: GUPTA, S.; STADEN, J. VAN (Eds.). **Biostimulants for Crops from Seed Germination to Plant Development**. Elsevier, 2021. p. 211-230.

CARMO, L. P.; MOURA, C. W. N.; LIMA-BRITO, A. Red macroalgae extracts affect *in vitro* growth and bud formation in *Comanthera mucugensis* (Giul.) L. R. Parra & Giul., an endemic dry flower species from the Chapada Diamantina (Brazil). **South African Journal of Botany**, v. 135, p. 29–34, 2020.

FEHÉR, A. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1–11, 2019.

GENNARI, P.; ROSERO-MONCAYO, J.; TUBIELLO, F. N. The FAO contribution to monitoring SDGs for food and agriculture. **Nature plants**, v. 5, p. 1196-1197, 2019.

GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 52–61, 2005.

GONÇALVES, C. N. et al. Recorrência dos incêndios e fitossociologia da vegetação em áreas com diferentes regimes de queima no Parque Nacional da Chapada Diamantina. **Biodiversidade Brasileira**, v. 1, p. 161–179, 2011.

LIMA-BRITO, A. et al. *In vitro* morphogenesis of *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 502–510, 2011a.

LIMA-BRITO, A. et al. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. **Ciência Rural**, v. 41, p. 1354–1361, 2011b.

LIMA-BRITO, A. et al. Plant growth regulators for *in vitro* minimal growth of *Comanthera mucugensis*. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 11, p. 11–18, 2015.

LIMA-BRITO, A. et al. Rustificação *in vitro* em diferentes ambientes e aclimatização de microplantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 47, p. 152–161, 2016.

LIMA, A. P. P. S.; BRITO, A. L.; SANTANA, J. R. F. DE. *In vitro* culture of sempre-vivas species (*Comanthera*): a review. **Rodriguésia**, v. 72, p. 1–9, 2021.

REVISÃO DA LITERATURA

1. A espécie *Comanthera mucugensis* (Giul.) L. R. Parra & Giul.

A Chapada Diamantina é uma região localizada no estado da Bahia, Brasil, conhecida por sua alta biodiversidade. Essa compreende um mosaico de diferentes ecossistemas, incluindo caatinga, savana, floresta de altitude, e uma predominância de campos rupestres constituídos por espécies endêmicas que se desenvolvem nas fendas das rochas e em solo arenoso (FUNCH et al., 2021; NEVES et al., 2016). As comunidades de plantas na região são altamente diversas e incluem várias espécies ameaçadas de extinção (BRASIL, 2022). Algumas das famílias botânicas mais notáveis encontradas na Chapada Diamantina incluem a Velloziaceae, Orchidaceae, Bromeliaceae e Eriocaulaceae (GIULIETTI et al., 2005a; JUNCÁ; FUNCH, L.; ROCHA, 2005)

A família Eriocaulaceae é composta, principalmente, por plantas herbáceas que crescem em áreas de elevadas altitudes, geralmente em solos arenosos ácidos, úmidos ou secos (COSTA; TROVÓ; SANO, 2008; GIULIETTI et al., 1996). As inflorescências de muitas espécies, a maioria pertencentes ao gênero *Comanthera*, são comercializadas como “sempre-vivas” por manterem a forma e a cor mesmo muitos anos depois de colhidas e secas, sendo utilizadas como ornamentais e na fabricação de artesanato (GIULIETTI et al., 1996).

A espécie *Comanthera mucugensis* (Giul.) L. R. Parra & Giul. é endêmica do município de Mucugê localizado na Chapada Diamantina e está em perigo de extinção (BRASIL, 2022). Também conhecida como a "sempre-viva de Mucugê", a planta é cobiçada como um artigo decorativo, tendo sido ostensivamente explorada e exportada, especialmente na década de 70, para o sul do Brasil e países como Estados Unidos, Japão e alguns da Europa (GIULIETTI et al., 2005; GIULIETTI; GIULIETTI; RUBENS, 1988).

Além do extrativismo, os danos causados pela expansão da atividade agropecuária e o uso indiscriminado do fogo contribuem para a redução das populações naturais e a contínua perda da qualidade do hábitat (CONCEIÇÃO, 2021). Outro fator que nos últimos anos tem afetado diretamente as condições microclimáticas da Chapada Diamantina é o aquecimento global, diminuindo a frequência de chuvas e prologando os períodos de seca (MENEZES; DO COUTO-SANTOS; FUNCH, 2018; RAMOS RIBEIRO et al., 2021). Essas mudanças ambientais geram uma condição de estresse hídrico e térmico sob *C. mucugensis*, ameaçando

ainda mais sua sobrevivência. Entretanto, os dados na literatura acerca dos efeitos ou métodos de mitigação do estresse abiótico para a espécie são incipientes e escassos.

A escassez das populações de "sempre-viva de Mucugê" ocasionou a valorização das suas flores, indicando que a redução na comercialização não se deu pela diminuição da demanda, mas sim da oferta. A conservação *in situ* da *Comanthera mucugensis* no Parque Nacional da Chapada Diamantina busca garantir a sua sobrevivência em seu ambiente natural. Porém, diante dos desafios ambientais e considerando a sua grande importância ecológica e econômica, faz-se necessário desenvolver métodos de atenuação dos estresses ambientais aos quais a espécie está submetida e protocolos de propagação sustentáveis. Para este fim, umas das ferramentas biotecnológicas de maior êxito é a cultura de tecidos vegetais, que engloba um conjunto de técnicas como a micropropagação e a conservação *in vitro* (LIMA; BRITO; SANTANA, 2021).

2. Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos vegetais envolve um conjunto de técnicas biotecnológicas e tem um grande impacto tanto na agricultura quanto na indústria, por fornecer plantas necessárias para atender à crescente demanda mundial. A tecnologia permite a propagação de material vegetal geneticamente homogêneo e livre de doenças (SHAHZAD et al., 2017). Essa ferramenta também é útil para a indução da variação somaclonal como fonte de variabilidade genética para a obtenção de novos genótipos (BAIRU; AREMU; VAN STADEN, 2011). Além disso, participa do processo de transformação genética de culturas melhoradas com alto potencial de rendimento e tolerantes a estresses bióticos e abióticos, bem como, da produção em larga escala de compostos secundários com propriedades medicinais ou nutricionais (HUSSAIN et al., 2012).

A técnica também oferece uma alternativa para a preservação da biodiversidade vegetal (OSENI; PANDE; NAILWAL, 2018). A conservação do germoplasma está se tornando cada vez mais essencial devido ao alto índice de desaparecimento de espécies e à crescente necessidade de salvaguardar o patrimônio genético. Os protocolos da cultura de tecidos podem clonar genótipos ameaçados e armazená-los por um longo período (LEMOS et al., 2002; SILVA et al., 2018).

Para que o cultivo *in vitro* seja bem-sucedido, é necessário controlar as condições microambientais (temperatura, iluminação, umidade e esterilidade) e fornecer suplementos

para estimular o metabolismo vegetal através de um meio de cultura (CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2006). Esse meio é uma mistura de nutrientes e reguladores de crescimento que são necessários para a multiplicação e desenvolvimento das células. Os nutrientes incluem minerais, carboidratos como sacarose, aminoácidos e vitaminas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Além desses, um agente gelificante, como o ágar, é frequentemente adicionado a fim de proporcionar uma superfície sólida para os tecidos aderirem e crescerem (CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2006).

A cultura de tecidos permite a regeneração *in vitro* de plantas inteiras a partir de uma única célula ou tecido, baseada na capacidade de pluripotência vegetal em desdiferenciar e diferenciar em células embrionárias, meristemáticas ou somáticas (FEHÉR, 2019; STEWARD et al., 1964). A clonagem de plantas, também conhecida como micropropagação, envolve diferentes etapas que incluem a seleção da planta-matriz ou explante, o estabelecimento de culturas, a multiplicação de células, a regeneração dos brotos, o enraizamento e a aclimatização (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Os novos tecidos vegetais podem ser obtidos através de duas rotas morfogênicas: a organogênese e a embriogênese somática.

A organogênese é o processo pelo qual as células se diferenciam para formar uma estrutura unipolar, um primórdio vegetativo (gemas axilares/brotos adventícios) ou raízes (rizogênese), cujo sistema vascular está ligado ao tecido parental (THORPE, 1993). Na embriogênese somática, o processo de desdiferenciação e reprogramação celular resulta no desenvolvimento de embriões somáticos (semelhantes aos embriões zigóticos) com estrutura bipolar contendo um eixo apical/raiz e sistema vascular autônomo e fechado (VON ARNOLD et al., 2002). A morfogênese pode ocorrer de forma direta, na qual as células do explante são capazes de se diferenciar e regenerar novos tecidos, sem a necessidade de um estágio intermediário; ou indireta através de um conjunto de células indiferenciadas que formam uma estrutura denominada de calo, resultado de um crescimento celular desorganizado a partir do explante (FEHÉR, 2019).

Os processos de crescimento e desenvolvimento da planta são dinâmicos e a análise histomorfológica é um passo importante no estudo da morfogênese *in vitro* (YEUNG, 1999). Compreender os estágios ontogenéticos permite a análise dos tipos celulares, suas diferenciações e a formação de novas estruturas, bem como auxilia na determinação da organogênese ou embriogênese (MOYO; AREMU; VAN STADEN, 2015). Essas

informações podem ser usadas para melhorar os protocolos de cultura de tecidos e para identificar problemas que possam surgir durante o processo de propagação clonal.

A modulação da propagação *in vitro* é um processo complexo que envolve a interação de vários fatores biológicos, bioquímicos e moleculares (THORPE, 1993). O genótipo da planta, o tipo de explante e as condições microambientais de cultivo, como luz e nutrientes, são fundamentais para orientar o crescimento celular (CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2006). Além desses, o tipo e a concentração dos reguladores de crescimento, como o 6-benzilaminopurina (BAP) e picloram, e os fitohormônios endógenos são responsáveis pela comunicação intra e intercelular que coordenam os processos de divisão, crescimento, desdiferenciação e diferenciação celular (JAMRA et al., 2022; PHILLIPS, 2004; WÓJCIK; WÓJCIKOWSKA; GAJ, 2020).

A proporção de citocininas/auxina determina o caminho morfogênético que o tecido *in vitro* seguirá. As altas e baixas proporções de citocinina em relação a auxina favoreceram a regeneração da parte aérea e da raiz, respectivamente, enquanto concentrações mais equivalentes induzem a calogênese (FEHÉR, 2019; SKOOG; MILLER, 1957). Diversas pesquisas propuseram que o metabolismo endógeno ou o tratamento exógeno de moléculas como o óxido nítrico (SUNDARARAJAN et al., 2022), poliaminas (SILVEIRA et al., 2006; TIBURCIO et al., 1993) e prolina (HARE; CRESS; VAN STADEN, 2001) participam de processos fisiológicos essenciais na morfogênese *in vitro* e na resposta ao estresse.

2.1. Morfogênese *in vitro* de *Comanthera mucugensis*

A morfogênese *in vitro* de *Comanthera mucugensis* foi estudada por diversos autores que avaliaram o efeito da composição do meio de cultura e os tipos de explantes na indução de novas microplantas (LIMA; BRITO; SANTANA, 2021; CARMO; MOURA; LIMA-BRITO, 2020; LIMA-BRITO et al., 2011a; SANTOS et al., 2008). A propagação *in vitro* é, preferencialmente, realizada via organogênese direta, utilizando o caule como explante, em meio composto pela metade das concentrações salinas de Murashige & Skoog (½MS), 7 g/L de sacarose, sem reguladores de crescimento e gelificado com ágar (LIMA-BRITO et al., 2011a). No entanto, o protocolo possui algumas limitações, como a baixa taxa de brotamento e de enraizamento.

A organogênese indireta pode ser obtida a partir de explante caulinar e foliar, em meio suplementados com BAP (ALBUQUERQUE, 2013; LIMA-BRITO et al., 2011a). Os

reguladores de crescimento são necessários para estimular a calogênese em *C. mucugensis*, sendo utilizados como explantes o caule seccionado ou a microplanta inteira, em meio suplementado com BAP (SANTOS et al., 2008), ou a folha, em meio acrescido dessa citocinina e ácido naftaleno acético (ANA) (LIMA-BRITO et al., 2011a).

Além desses, há indícios que as auxinas picloram e 2,4-D são úteis para induzir calos friáveis com possível capacidade morfogenética (GURGEL, 2017). No entanto, o protocolo ressalta que não houve regeneração do tecido vegetal a partir da massa calogênica. A embriogênese somática em *C. mucugensis* ainda não foi reportada na literatura.

A morfogênese via organogênese direta também foi observada em microplantas de *C. mucugensis* submetidas a condição de estresse causado por osmorreguladores (LIMA-BRITO et al., 2011b). Acredita-se que a obtenção de brotos em decorrência do déficit hídrico reproduz um comportamento natural da espécie na condição *ex vitro*. Além disso, foi demonstrado que a suplementação do meio de cultura com bioestimulantes derivados de macroalgas, como o extrato aquoso de *Agardhiella subulata* (C.Agardh) Kraft & M.J.Wynne, promove o aumento de brotação a partir de microplantas, sendo proposto como método ecológico e baixo-custo para aprimorar a multiplicação *in vitro* de *C. mucugensis* (CARMO; MOURA; LIMA-BRITO, 2020).

3. Bioestimulantes vegetais

O *European Biostimulant Industry Council* define os bioestimulantes vegetais como compostos e/ou microrganismos cuja função, quando aplicada às plantas ou à sua rizosfera, é estimular processos naturais para incrementar a absorção e eficiência de nutrientes, a tolerância ao estresse abiótico/biótico e a qualidade das culturas (DU JARDIN, 2015). O termo “bioestimulante” não é encontrado na legislação brasileira, sendo esse tipo de insumo classificado como “biofertilizante”.

O termo “biofertilizante” é definido como um produto contendo princípio ativo, isento de substâncias agrotóxicas, capaz de atuar direta ou indiretamente sob as culturas, elevando sua produtividade, independentemente de seu valor hormonal ou estimulante (BRASIL, 2014). No entanto, está em tramitação o Projeto de Lei nº 3668 de 2021 que regulamenta a produção de “bioinsumos” e contempla o conceito “bioestimulante”.

Atualmente, os bioestimulantes são apontados como uma das soluções mais promissoras para a produção agrícola sustentável, pois representam uma alternativa ecológica aos seus

equivalentes produtos químicos que causam impactos ambientais maléficos, como fungicidas, inseticidas e herbicidas (MUHIE, 2022). A sua utilização é considerada como uma forma de estimular um crescimento socioeconômico alinhado aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) propostos pela Agenda 2030 lançada em 2015 pela Organização das Nações Unidas (ONU) (CORSI et al., 2022), como ODS #2 (aumento da produtividade agrícola sustentável), #14 (uso sustentável dos recursos marinhos) e #15 (conservação de espécies ameaçadas).

O mercado global de bioestimulantes foi estimado em, aproximadamente, US\$ 3,14 bilhões em 2022 e deve atingir mais de US\$ 6,69 bilhões em 2029 (FORBES, 2023). A adesão pelos produtores rurais às práticas agrícolas sustentáveis e econômicas, que utilizam “bioinsumos”, é crescente no Brasil e foi, principalmente, incentivada pelo Programa Nacional de Bioinsumos criado em 2020 (DE SOUZA; CASTILHO; MACEDO, 2022; GOULET, 2021).

No entanto, a aplicação dos bioestimulantes ainda é subutilizada pois seus mecanismos de ação permanecem pouco conhecidos (DU JARDIN; XU; GEELEN, 2020). Isso se deve, principalmente, à natureza heterogênea e complexa das matérias-primas, o que torna quase impossível identificar, exatamente, o(s) componente(s) responsável(is) pela atividade biológica (KHAN et al., 2009; YAKHIN et al., 2017). Além disso, a não padronização do modo de fabricação resulta em grande variabilidade físico-química, que pode promover diferentes efeitos no crescimento vegetal de uma mesma cultura (CARMO; MOURA; LIMA-BRITO, 2021; NAIR et al., 2012). Atualmente, há um esforço crescente para compreender os estágios de ação dos bioestimulantes, utilizando técnicas de expressão gênica, sinalização e interações hormonais, bem como, a regulação dos processos metabólicos e seus efeitos integrados na planta (CRITCHLEY et al., 2023; DE SAEGGER et al., 2020; DU JARDIN; XU; GEELEN, 2020; SORRENTINO et al., 2022).

Os bioestimulantes podem ser classificados em diferentes categorias, de acordo com a sua origem ou papel no crescimento da planta (GUPTA et al., 2021). Os principais tipos incluem: (i) substâncias orgânicas e naturais (por exemplo, ácidos húmicos e fúlvicos, hidrolisados de proteína animal/ vegetal, diferentes tipos de extratos de algas, compostos derivados de fumaça, vermicomposto); (ii) compostos inorgânicos (como o alumínio, cobre, sódio, selênio e silício); e (iii) microrganismos benéficos (a exemplo dos fungos micorrízicos arbusculares, bactérias fixadoras de N₂ e rizobactérias promotoras de crescimento) (GUPTA et al., 2021).

3.1. Bioestimulantes derivados de macroalgas

Os extratos de macroalgas constituem mais de 33% do mercado total de bioestimulantes em todo o mundo (EL BOUKHARI et al., 2020). Estima-se que o comércio de cultivo de algas atingiu cerca de US\$ 16,7 bilhões em 2020 e está previsto o crescimento de US\$ 30,2 bilhões até o ano de 2025 (MARKET RESEARCH REPORT, 2020). Esses organismos marinhos, embora geneticamente e morfológicamente diversos, podem ser subdivididos com base nos pigmentos do talo em três grupos principais: as vermelhas (Rhodophyta), as pardas ou marrons (Ochrophyta-Phaeophyceae) e as verdes (Chlorophyta) (BAWEJA; SAHOO, 2015).

As algas apresentam grande variabilidade de fitocompostos, como diferentes tipos de minerais, carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas, fitormônios e vários compostos bioativos (BATTACHARYYA et al., 2015; RODRIGUES et al., 2015; STIRK et al., 2020). A variação da composição química está relacionada a diversos parâmetros ambientais, ao local e o tempo da coleta, além do tipo de macroalga (BRICEÑO-DOMÍNGUEZ et al., 2014; GOÑI et al., 2016). O processo de fabricação do bioestimulante a partir dessa matéria-prima também influencia as propriedades físico-químicas do produto final e pode promover diferentes respostas no desenvolvimento vegetal (BRICEÑO-DOMÍNGUEZ et al., 2014; CARMO; MOURA; LIMA-BRITO, 2021; HERNÁNDEZ-HERRERA et al., 2016).

Para obter um bioestimulante à base de macroalgas, o protocolo pelo qual a extração é realizada é de extrema importância para definir o perfil físico-químico e a integridade bioquímica dos bioativos (NANDA; KUMAR; HUSSAIN, 2022). Vários métodos são usados para fabricação do produto em pó ou em líquido. Dentre estes, os extratos aquosos de algas são os mais comuns e de menor custo, sendo obtidos a partir da maceração do talo seco em água aquecida e sua posterior filtração e concentração (EL BOUKHARI et al., 2020).

O processo de extração mais utilizado para a produção comercial envolve hidrólise alcalina ou ácida, em alta pressão, ou através de reações enzimáticas (BRICEÑO-DOMÍNGUEZ et al., 2014). Também podem ser aplicados métodos de extração assistida por micro-ondas, por ultrassom, de fluido supercrítico e líquido pressurizado, que provaram ser bem-sucedidos devido ao alto nível de extratibilidade. (MICHALAK; CHOJNACKA, 2015; SAMUELS; SETATI; BLANCQUAERT, 2022). Esses extratos, comercializados como “hidrolisados de algas”, são ricos em aminoácidos e oligossacarídeos livres (GONZÁLEZ et al., 2014a; NANDA; KUMAR; HUSSAIN, 2022).

Os polissacarídeos sulfatados extraídos das paredes das macroalgas, como as carragenanas, agaranas e alginatos, e seus oligossacarídeos derivados, podem estimular a germinação e o crescimento das plantas (GONZÁLEZ et al., 2013; TORRES et al., 2018; VINOOTH et al., 2021), além de possuírem propriedades antiestressantes (GONZÁLEZ et al., 2013; LIU et al., 2019). Esses bioestimulantes são denominados de extratos polissacarídicos ou “extratos enriquecidos com polissacarídeos”, e podem ser obtidos através do protocolo convencional para extração aquosa com precipitação etanólica (HERNÁNDEZ-HERRERA et al., 2016; MZIBRA et al., 2020; VINOOTH et al., 2021), ou a partir de empresas especializadas que comercializam a substância pura, como a Sigma-Aldrich (SUGANYA et al., 2016).

Os bioestimulantes derivados de macroalgas podem ser aplicados de diversas formas, inclusive no campo, na casa de vegetação, no solo e no cultivo *in vitro* de plantas. Quando aplicados no campo ou na casa de vegetação, os extratos podem ser pulverizados nas folhas ou como pré-tratamento em sementes e plantas jovens para efeito *priming* (DI STASIO et al., 2020; SHAFIE et al., 2021). O aproveitamento no solo pode melhorar a estrutura, a disponibilidade de nutrientes e a retenção de água, o que pode aumentar a atividade microbiana e melhorar o crescimento das raízes e a absorção de nutrientes (HUSSAIN; KASINADHUNI; ARIOLI, 2021).

Além dessas formas, os extratos podem ser utilizados na cultura de tecidos vegetais como suplemento orgânico para o meio de cultura. Esses bioestimulantes podem aprimorar a morfogênese *in vitro* e favorecer o desenvolvimento de raízes adventícias e a formação de brotos, levando a uma propagação mais eficiente das plantas (CARMO; MOURA; LIMA-BRITO, 2021, 2020).

3.2. Bioestimulantes derivados de macroalgas na propagação *in vitro* de plantas

A composição do meio de cultura é determinante para o início e o desenvolvimento da propagação *in vitro* de plantas. A suplementação do meio com bioestimulantes pode aprimorar as etapas da regeneração *in vitro*, via organogênese e embriogênese somática (CARMO; MOURA; LIMA-BRITO, 2021). Os extratos de macroalgas mais referenciados para este fim, foram obtidos a partir de espécies dos grupos Rhodophyta e Ochrophyta/Phaeophyceae e os principais efeitos associados foram o aumento da indução, alongamento e enraizamento dos brotos, formação e maturação de embriões somáticos, e conversão em plântulas (CARMO; MOURA; LIMA-BRITO, 2021).

É possível que os extratos de macroalgas possam enriquecer o meio como fonte de nutrientes, de aminoácidos, e de carbono devido à presença de alta quantidade de polissacarídeos (MIŠURCOVÁ; MACHŮ; ORSAVOVÁ, 2011). Por exemplo, o alto nível de proteínas, carboidratos solúveis e micronutrientes encontrados nos bioestimulantes derivados de *Caulerpa cylindracea* Sonder e *Fucus spiralis* Linnaeus foram correlacionados com o aumento do crescimento e enraizamentos dos brotos de *Nicotiana benthamiana* e *Vitis vinífera* (ESSERTI et al., 2017).

Outro estudo demonstrou que a suplementação do meio com altas concentrações (3 e 4 mg/mL) do extrato de *Agardhiella subulata* incrementou a formação de brotos de *C. mucugensis* (CARMO; MOURA; LIMA-BRITO, 2020). O aumento da propagação *in vitro* pode estar associado à resposta da planta ao estresse hídrico em decorrência da mudança do potencial osmótico do meio devido à presença de substâncias orgânicas de origem algácea. Além disso, foi observado aprimoramento das etapas de alongamento da parte aérea e do enraizamentos dos brotos com o extrato de *Hypnea pseudomusciformis* Nauer, Cassano & M.C.Oliveira em baixa concentração (1 mg/mL), quando comparados aos meios de cultivo convencionais (CARMO; MOURA; LIMA-BRITO, 2020).

Os extratos de macroalgas são reconhecidos como uma fonte natural, ecologicamente segura e econômica de reguladores de crescimento vegetais e podem ser úteis para substituir parcialmente ou totalmente os reguladores sintéticos, representando um método de aprimoramento e redução do custo da propagação *in vitro* (CARMO; MOURA; LIMA-BRITO, 2021). Esses extratos possuem citocininas, auxinas e giberelinas, que podem estimular a divisão celular e a proliferação das células vegetais (STIRK; VAN STADEN, 2014). Ressalta-se que a autoclavagem do meio com o extrato não interfere no efeito estimulatório (FINNIE; VAN STADEN, 1985).

Por exemplo, há indícios que as altas concentrações de citocininas, como 2-isopenteniladenina e zeatina, encontradas nos extratos de macroalgas vermelhas e verdes podem ser responsáveis pelo aumento da eficácia da regeneração dos brotos de *Prunus armeniaca* (Linnaeus) Huth (ALBURQUERQUE et al., 2019). A análise dos extratos de *Caulerpa scalpelliformis* (R. Brown ex Turner) C.Agardh e *Gracilaria corticata* (J.Agardh) J.Agardh revelou que a presença da benziladenina e do ácido indolbutírico estaria envolvida na indução de calos embriogênicos, bem como na conversão dos embriões somáticos em *Solanum lycopersicum* Linnaeus (VINOTH; GURUSARAVANAN; JAYABALAN, 2014).

Além disso, o bioestimulante demonstrou ser útil no aumento da biomassa vegetal e do teor de metabólitos *in vitro* de interesse medicinal, como os vitanolídeos e a plumbagina (KAKADE; ZIMARE; MALPATHAK, 2022; VINOD et al., 2022).

Alguns especialistas sugerem que a presença comprovada dos fitormônios nos extratos de macroalgas é responsável por promover a melhora do metabolismo vegetal (KHAN et al., 2011; RAYORATH et al., 2008). No entanto, outros alegam que a quantidade desses é insuficiente para causar efeitos significativos e que a ação eliciadora de uma ou mais moléculas modula as vias da síntese dos fitohormônios e dos metabólitos secundários em plantas (CARMO; MOURA; LIMA-BRITO, 2021; WALLY et al., 2013).

Nesse sentido, os polissacarídeos de macroalgas demonstraram notória atividade bioestimulante em diversas plantas, indicando ser um importante modulador metabólico (HERNÁNDEZ-HERRERA et al., 2016; MZIBRA et al., 2020; TORRES et al., 2019; VERA et al., 2011). Dentre eles, a carragenana foi associada ao aumento da síntese de indol 3-acético, giberelina A3 e *trans*-zeatina, além de enzimas antioxidantes, das moléculas de NADPH, ascorbato e glutatona, e a assimilação de nitrogênio e carbono (GONZÁLEZ et al., 2014a, 2014b; NAEEM et al., 2021; SAUCEDO et al., 2019; SAUCEDO; CONTRERAS; MOENNE, 2015; SHUKLA et al., 2016). Sua capacidade de aprimorar diversas rotas do metabolismo vegetal pode ser útil na propagação *in vitro*, como demonstrado no estudo realizado com *Brassica oleracea* var. *italica* Plenck onde observou-se aumento da formação de embriões somáticos em meio suplementado com oligo-carragenanas (LEMONNIER-LE PENHUIZIC et al., 2001).

Ainda não está claro como os extratos de macroalgas interferem na propagação *in vitro* das plantas, sendo necessárias mais pesquisas para determinar como seus bioativos modulam as vias metabólicas envolvidas na morfogênese (CARMO; MOURA; LIMA-BRITO, 2021; WALLY et al., 2013). A cultura de tecidos vegetais pode ser uma importante aliada nos estudos com foco no mecanismo de ação pois permite conduzir experimentos capazes de avaliar o efeito dos componentes principais e secundários dos extratos, em diferentes concentrações e condições de cultivo (CARMO; MOURA; LIMA-BRITO, 2021).

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M. M. S. **Micropropagação e conservação *in vitro* de “sempre vivas” nativas da Chapada Diamantina – Ba.** Dissertação. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, 2013.

- ALBURQUERQUE, N. et al. Towards the valorization of the invasive seaweeds *Caulerpa cylindracea* and *Asparagopsis taxiformis* in the Mediterranean Sea: applications for *in vitro* plant regeneration and crop protection. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, p. 1403–1413, 2019.
- BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; VAN STADEN, J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v. 63, p. 147–173, 2011.
- BATTACHARYYA, D. et al. Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 39–48, 2015.
- BAWEJA, P.; SAHOO, D. Classification of Algae. In: SAHOO, D.; SECKBACH, J. (Eds.). **The algae world**, Springer, 2015, p. 31–55.
- BRASIL. **DECRETO Nº 8.384, DE 29 DE DEZEMBRO DE 2014**. Casa Civil, 2014.
- BRASIL. **PORTARIA MMA Nº 148, DE 7 DE JUNHO DE 2022**. Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção. Ministério do Meio Ambiente, 2022.
- BRICEÑO-DOMÍNGUEZ, D. et al. Plant growth promoting activity of seaweed liquid extracts produced from *Macrocystis pyrifera* under different pH and temperature conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, p. 2203–2210, 2014.
- CARMO, L. P.; MOURA, C. W. DO N.; LIMA-BRITO, A. Effects of seaweed extracts on the *in vitro* multiplication of plants. In: GUPTA, S.; STADEN, J. V. (Eds.). **Biostimulants for Crops from Seed Germination to Plant Development**. Elsevier, 2021. p. 211–230.
- CARMO, L. P.; MOURA, C. W. N.; LIMA-BRITO, A. Red macroalgae extracts affect *in vitro* growth and bud formation in *Comanthera mucugensis* (Giul.) L. R. Parra & Giul., an endemic dry flower species from the Chapada Diamantina (Brazil). **South African Journal of Botany**, v. 135, p. 29–34, 2020.
- CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. D. A.; MEDEIROS, M. L. **Fatores inerentes à micropropagação**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006.
- CONCEIÇÃO, A. A. Quick qualitative and quantitative changes in reproductive efforts in an open cerrado community: An explorative study of fire-stimulated species. **Flora**, v. 280, p. 151855, 2021.
- CORSI, S. et al. A bibliometric analysis of the scientific literature on biostimulants. **Agronomy**, v. 12, p. 1257, 2022.
- COSTA, F. N.; TROVÓ, M.; SANO, P. T. Eriocaulaceae na Cadeia do Espinhaço: riqueza, endemismo e ameaças. **Megadiversidade**, v. v. 4, p. 117-125, 2008.
- CRITCHLEY, A. T. et al. Understanding the mode of action of AgroGain®, a biostimulant derived from the red seaweed *Kappaphycus alvarezii* in the stimulation of cotyledon expansion and growth of *Cucumis sativa* (cucumber). **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1136563, 2023.

- DE SAEGER, J. et al. Toward the molecular understanding of the action mechanism of *Ascophyllum nodosum* extracts on plants. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, p. 573–597, 2020.
- DE SOUZA, F. P.; CASTILHO, T. P. R.; MACEDO, L. O. B. An institutional framework for Bioinputs in Brazilian agriculture based on Ecological Economics. **Sustainability in Debate**, v. 13, p. 247-247, 2022.
- DI STASIO, E. et al. Osmo-priming with seaweed extracts enhances yield of salt-stressed tomato plants. **Agronomy**, v. 10, p. 1559, 2020.
- DU JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 3-14, 2015.
- DU JARDIN, P.; XU, L.; GEELEN, D. Agricultural functions and action mechanisms of Plant Biostimulants (PBs): An introduction. In: STEVENS, C. V. (Ed.). **The chemical biology of plant biostimulants**, 2020, p. 1-30.
- EL BOUKHARI, M. E. M. et al. Trends in seaweed extract based biostimulants: Manufacturing process and beneficial effect on soil-plant systems, **Plants**, v. 9, p. 359, 2020.
- ESSERTI, S. et al. Media derived from brown seaweeds *Cystoseira myriophylloides* and *Fucus spiralis* for *in vitro* plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, p. 437–446, 2017.
- FEHÉR, A. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1–11, 2019.
- FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. Effect of seaweed concentrate and applied hormones on *in vitro* cultured tomato roots. **Journal of Plant Physiology**, v. 120, p. 215–222, 1985.
- FORBES. **O mercado de bioinsumos vai para onde no Brasil?**. 2023. Disponível em: <<https://forbes.com.br/forbesagro/2023/01/o-mercado-de-bioinsumos-vai-para-onde-no-brasil/>>. Acesso em: 1 de maio de 2023.
- FUNCH, L. S. et al. Floristics, phytosociology and biogeography of capitanga vegetation in a white sand habitat in the Chapada Diamantina Mountains, Brazil. **Rodriguesia**, v. 72, p. 1-17, 2021.
- GIULIETTI, A. M. et al. Estudos em “sempre-vivas”: taxonomia com ênfase nas espécies de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 10, p. 329-377, 1996.
- GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversity and conservation of plants in Brazil. **Conservation Biology**, v. 19, p. 632-639, 2005.
- GIULIETTI, N.; GIULIETTI, A. M.; RUBENS, J. Estudos em sempre-vivas: importância econômica do extrativismo em Minas Gerais, Brasil. **Acta botanica brasilica**, v. 1, p. 179–193, 1988.
- GOÑI, O. et al. Comparative transcriptome analysis of two *Ascophyllum nodosum* extract biostimulants: Same seaweed but different. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 2980–2989, 2016.

GONZÁLEZ, A. et al. Seaweed oligosaccharides stimulate plant growth by enhancing carbon and nitrogen assimilation, basal metabolism, and cell division. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, p. 443–448, 2013.

GONZÁLEZ, A. et al. Oligo-Carrageenan kappa-induced reducing redox status and activation of TRR/TRX system increase the level of indole-3-acetic acid, gibberellin A3 and trans-Zeatin in *Eucalyptus globulus* trees. **Molecules**, v. 19, p. 12690–12698, 2014a.

GONZÁLEZ, A. et al. Oligo-carrageenan kappa increases NADPH, ascorbate and glutathione syntheses and TRR/TRX activities enhancing photosynthesis, basal metabolism, and growth in *Eucalyptus* trees. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 512, 2014b.

GOULET, F. Characterizing alignments in socio-technical transitions. Lessons from agricultural bio-inputs in Brazil. **Technology in Society**, v. 65, p. 101580, 2021.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. .; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ, 1998. p. 43–76.

GUPTA, S. et al. Categories of various plant biostimulants – mode of application and shelf-life. In: GUPTA, S.; STADEN, J. V. (Ed.). **Biostimulants for Crops from Seed Germination to Plant Development**. Elsevier, 2021. p. 1–60.

GURGEL, Z. E. D. R. **Micropropagação e conservação de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis***. Tese. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, 2017.

HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. The effects of exogenous proline and proline analogues on *in vitro* shoot organogenesis in *Arabidopsis*. **Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 203–207, 2001.

HERNÁNDEZ-HERRERA, R. M. et al. Activity of seaweed extracts and polysaccharide-enriched extracts from *Ulva lactuca* and *Padina gymnospora* as growth promoters of tomato and mung bean plants. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, p. 2549–2560, 2016.

HUSSAIN, A. et al. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. In: LEVA, A., RINALDI, L. (Eds.). **Recent Advances in Plant *in vitro* Culture**. IntechOpen, 2012. p. 1-28.

HUSSAIN, H. I.; KASINADHUNI, N.; ARIOLI, T. The effect of seaweed extract on tomato plant growth, productivity and soil. **Journal of Applied Phycology**, v. 33, p. 1305-1314, 2021.

JAMRA, G. et al. Endogenous phytonutrient, phytochemical, and phytohormone levels modulate *in vitro* callus induction and plant regeneration in finger millet (*Eleusine coracana*) genotypes. **Plant Biosystems**, v. 156, p. 700-709, 2022.

JUNCÁ, F. A.; FUNCH, L., & ROCHA, W. **Biodiversidade e Conservação da Chapada Diamantina**. Série

Biodiversidade, Ministério do Meio Ambiente, 2005. p 1-411.

KAKADE, P. S.; ZIMARE, S. B.; MALPATHAK, N. P. Effects of *Sargassum ilicifolium* seaweed extract on enhanced *in vitro* seed germination, mass propagation, and accumulation of plumbagin in *Plumbago zeylanica* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 149, p. 399-410, 2022.

KHAN, W. et al. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 28, p. 386–399, 2009.

KHAN, W. et al. Bioassay to detect *Ascophyllum nodosum* extract-induced cytokinin-like activity in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 409–414, 2011.

LEMONNIER-LE PENHUIZIC, C. et al. Carrageenan oligosaccharides enhance stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica oleracea* var. italica. **Plant Science**, v. 160, p. 1211–1220, 2001.

LEMOS, E. E. P. DE et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 1359–1364, 2002.

LIMA-BRITO, A. et al. *In vitro* morphogenesis of *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 502–510, 2011a.

LIMA-BRITO, A. et al. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. **Ciência Rural**, v. 41, p. 1354–1361, 2011b.

LIMA, A. P. P. S.; BRITO, A. L.; SANTANA, J. R. F. DE. *In vitro* culture of sempre-vivas species (*Comanthera*): a review. **Rodriguésia**, v. 72, p. 1–9, 2021.

LIU, H. et al. Polysaccharides from *Grateloupia filicina* enhance tolerance of rice seeds (*Oryza sativa* L.) under salt stress. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, p. 1197-1204, 2019

MARKET RESEARCH REPORT. **Seaweed Cultivation Market by Type (Red, Brown, Green), Method of Harvesting (Aquaculture, Wild Harvesting), Form (Liquid, Powder, Flakes, Sheets), Application (Food, Feed, Agriculture, Pharmaceuticals), and Region - Global Forecast to 2025**. Disponível em: <<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/commercial-seaweed-market-152763701.html>>. Acesso em: 1 de maio de 2023.

MENEZES, I. S.; DO COUTO-SANTOS, A. P. L.; FUNCH, L. S. The influence of El Niño and edge effects on the reproductive phenology and floral visitors of *Eschweilera tetrapetala* Mori (Lecythidaceae), an endemic species of the Atlantic forest of northeastern Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 32, p. 1–11, 2018.

MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K. Algae as production systems of bioactive compounds. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, p. 160–176, 2015.

MIŠURCOVÁ, L.; MACHŮ, L.; ORSAVOVÁ, J. Seaweed minerals as nutraceuticals. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 64, p. 371–390, 2011.

- MOYO, M.; AREMU, A. O.; VAN STADEN, J. Insights into the multifaceted application of microscopic techniques in plant tissue culture systems. **Planta**, v. 242, p. 773-790, 2015.
- MUHIE, S. H. Plant biostimulants in organic horticulture: A review. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 42, p. 1-13, 2022.
- MZIBRA, A. et al. Biostimulants derived from Moroccan seaweeds: seed germination metabolomics and growth promotion of tomato plant. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 40, p. 353-370, 2021.
- NAEEM, M. et al. Carrageenan oligomers and salicylic acid act in tandem to escalate artemisinin production by suppressing arsenic uptake and oxidative stress in *Artemisia annua* (sweet wormwood) cultivated in high arsenic soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 42706–42721, 2021.
- NAIR, P. et al. Transcriptional and metabolomic analysis of *Ascophyllum nodosum* mediated freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Genomics**, v. 13, p. 643, 2012.
- NANDA, S.; KUMAR, G.; HUSSAIN, S. Utilization of seaweed-based biostimulants in improving plant and soil health: Current updates and future prospective. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 19, p. 12839-12852, 2022.
- NEVES, S. P. S. et al. What are the most important factors determining different vegetation types in the Chapada Diamantina, Brazil?. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, p. 315-333, 2016.
- OSANI, O. M.; PANDE, V.; NAILWAL, T. K. A review on plant tissue culture, a technique for propagation and conservation of endangered plant species. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, p. 3778–3786, 2018.
- PHILLIPS, G. C. *In vitro* morphogenesis in plants-recent advances. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 40, p. 342-345, 2004.
- RAMOS RIBEIRO, R. R. et al. Integrated Assessment of Drought Impacts on Rural Areas: The Case of the Chapada Diamantina Region in Brazil. **GeoHazards**, v. 2, p. 442-453, 2021.
- RAYORATH, P. et al. Rapid bioassays to evaluate the plant growth promoting activity of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. using a model plant, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, p. 423–429, 2008.
- RODRIGUES, D. et al. Chemical composition of red, brown and green macroalgae from Buarcos bay in Central West Coast of Portugal. **Food Chemistry**, v. 183, p. 197–207, 2015.
- SAMUELS, L. J.; SETATI, M. E.; BLANCQUAERT, E. H. Towards a better understanding of the potential benefits of seaweed based biostimulants in *Vitis vinifera* L. cultivars. **Plants**, v. 11, p. 348, 2022.
- SANTOS, J. D. P. et al. Indução de calos em sempre-viva (*Syngonanthus mucugensis* Giulietti), utilizando diferentes tipos de explantes e concentrações de BAP. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 30, p. 127–131, 2008.

- SAUCEDO, S. et al. Oligo-carrageenan kappa increases glucose, trehalose and TOR-P and subsequently stimulates the expression of genes involved in photosynthesis, and basal and secondary metabolisms in *Eucalyptus globulus*. **BMC Plant Biology**, v. 19, p. 258, 2019.
- SAUCEDO, S.; CONTRERAS, R. A.; MOENNE, A. Oligo-carrageenan kappa increases C, N and S assimilation, auxin and gibberellin contents, and growth in *Pinus radiata* trees. **Journal of Forestry Research**, v. 26, p. 635–640, 2015.
- SHAFIE, F. et al. Biostimulant effects of seaweed extract and amino acids on growth, antioxidants, and nutrient content of yarrow (*Achillea millefolium* L.) in the field and greenhouse conditions. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 52, p. 964-975, 2021.
- SHAHZAD, A. et al. Plant Tissue Culture: Applications in plant improvement and conservation. In: ABDIN, M., KIRAN, U., KAMALUDDIN, A. A. (Eds.). **Plant Biotechnology: Principles and Applications**. Springer, Singapore, 2017. p 37-72.
- SHUKLA, P. S. et al. Carrageenans from red seaweeds as promoters of growth and elicitors of defense response in plants. **Frontiers in Marine Science**, v. 3, p. 81, 2016.
- SILVA, D. P. C. DA et al. *In vitro* conservation of ornamental plants. **Ornamental Horticulture**, v. 24, p. 28–33, 2018.
- SILVEIRA, V. et al. Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Plant Science**, v. 171, p. 91-98, 2006.
- SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 11, p. 118–130, 1957.
- SORRENTINO, M. et al. Integration of phenomics and metabolomics datasets reveals different mode of action of biostimulants based on protein hydrolysates in *Lactuca sativa* L. and *Solanum lycopersicum* L. under salinity. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 3333, 2022.
- STEWART, F. C. et al. Growth and development of cultured plant cells: Biochemical and morphogenetic studies with cells yield new evidence on their metabolism and totipotency. **Science**, v. 143, p. 20-27, 1964.
- STIRK, W. A. et al. Plant biostimulants from seaweed: An overview. In: GEELEN, D.; XU, L. (Eds.). **The Chemical Biology of Plant Biostimulants**. Wiley Online Library, 2022. p. 31-55.
- STIRK, W. A.; VAN STADEN, J. Plant growth regulators in seaweeds: Occurrence, regulation and functions. In: BOURGOUGNON, N. (Ed.). **Advances in botanical research - Sea Plants**. Academic Press, 2014. p. 125-159.
- SUGANYA, A. M. et al. Pharmacological importance of sulphated polysaccharide carrageenan from red seaweed *Kappaphycus alvarezii* in comparison with commercial carrageenan. **Biomedicine &**

Pharmacotherapy, v. 84, p. 1300-1312, 2016.

SUNDARARAJAN, S. et al. Growth modulation by nitric oxide donor sodium nitroprusside in *in vitro* plant tissue cultures—A review. **Biologia**, v. 77, p. 1699-1711, 2022.

THORPE, T. A. *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis: physiological and biochemical aspects. In: ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A.; VAN THANH, K. (Eds.). **Morphogenesis in plants**. Springer, 1993. p. 19–38.

TIBURCIO, A. F. et al. Polyamines and morphogenesis in monocots: experimental systems and mechanisms of action. In: ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A.; VAN THANH, K. (Eds.). **Morphogenesis in plants**. Springer, 1993. p. 113-135.

TORRES, P. et al. Effects of extracts and isolated molecules of two species of *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) on early growth of lettuce. **Algal Research**, v. 32, p. 142–149, 2018.

TORRES, P. et al. A comprehensive review of traditional uses, bioactivity potential, and chemical diversity of the genus **Gracilaria** (Gracilariales, Rhodophyta). **Algal Research**, v. 37, p. 288–306, 2019.

VERA, J. et al. Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. **Marine Drugs**, v. 9, p. 2514–2525, 2011.

VINOD, S. et al. Effect of seaweed elicitation and culture conditions on biomass and metabolite production in *in vitro* shoots of *Withania somnifera*. **South African Journal of Botany**, 2022.

VINOTH, S. et al. Biostimulant activity of sulfated polysaccharide extract from red seaweed *Halymenia dilatata* on yield of mung bean in greenhouse conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 33, p. 3309-3317, 2021.

VINOTH, S.; GURUSARAVANAN, P.; JAYABALAN, N. Optimization of somatic embryogenesis protocol in *Lycopersicon esculentum* L. using plant growth regulators and seaweed extracts. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, p. 1527–1537, 2014.

VON ARNOLD, S. et al. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233–249, 2002.

WALLY, O. S. D. et al. Regulation of phytohormone biosynthesis and accumulation in *Arabidopsis* following treatment with commercial extract from the marine macroalga *Ascophyllum nodosum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, p. 324–339, 2013.

WÓJCIK, A. M.; WÓJCIKOWSKA, B.; GAJ, M. D. Current perspectives on the auxin-mediated genetic network that controls the induction of somatic embryogenesis in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 1333, 2020..

YAKHIN, O. I. et al. Biostimulants in plant science: a global perspective. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 2049, 2017.



CAPÍTULO 1

Effects of heat stress and seaweed-derived biostimulants on the germination of *Comanthera mucugensis*, an endemic plant of fire-prone *Campos rupestres* of Chapada Diamantina (Brazil)

**Effects of heat stress and seaweed-derived biostimulants on the germination of
Comanthera mucugensis, an endemic plant of fire-prone *Campos rupestres* of Chapada
Diamantina (Brazil)**

Luane Portela Carmo^{1*}, Carlos Wallace do Nascimento Moura², Alone Lima-Brito¹

¹Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Horto Florestal, Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Transnordestina, s/n, Feira de Santana, CEP 44036-900, Bahia, Brazil

²Laboratório de Ficologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Transnordestina, s/n, Feira de Santana, CEP 44036-900, Bahia, Brazil

* Corresponding author. E-mail address: luaneportela@yahoo.com.br (LPC), wallace@uefs.br (CWNM), alone@uefs.br (ALB).

South African Journal of Botany, v. 141, pp. 49-53. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.04.017>

Resumo

Os incêndios são comuns na Chapada Diamantina e atingem grandes extensões dos *Campos rupestres*, onde existe um elevado número de espécies endêmicas, entre as quais se destaca *Comanthera mucugensis*. No entanto, o efeito das altas temperaturas nas sementes desta espécie é desconhecido (ou alternativas para mitigar o estresse térmico). O presente estudo avaliou os efeitos do estresse térmico e o efeito dos extratos aquosos e polissacarídeos das macroalgas marinhas *Agardhiella subulata* e *Hypnea pseudomusciformis*, e da κ -carragenana na germinação e no desenvolvimento pós-seminal das sementes de *C. mucugensis*. As sementes foram expostas à quatro níveis de alta temperatura: 40, 45, 50, e 55 °C. Posteriormente, foram germinadas em papel germinado umedecido com água destilada, extratos aquosos e polissacarídeos das macroalgas e κ -carragenana em diferentes concentrações: 10, 1 e 0.1 mg.ml⁻¹. As sementes de *C. mucugensis* foram tolerantes ao calor até 50 °C. A alta concentração de extratos foi eficaz na atenuação do estresse térmico nas sementes estressadas a 45 e 50 °C. Em condição de não estresse e baixo estresse térmico (40 °C), a menor concentração dos extratos e da κ -carragenana melhorou a frequência de germinação e desenvolvimento pós-seminal das sementes. Esse é o primeiro relatório sobre os efeitos do calor nas sementes das espécies Eriocaulaceae da Chapada Diamantina.

Palavras-chave: Eriocaulaceae, Sempre-vivas, Desenvolvimento pós-seminal, Extrato aquoso, Polissacarídeos, Tolerância térmica.

Abstract

Fires are common in Chapada Diamantina and reach large extensions of *Campos rupestres*, where there is a high number of endemic species, among which *Comanthera mucugensis* stands out. However, the effect of high temperatures on the seeds of this species is unknown (or alternatives to mitigate thermal stress). The present study evaluated the effects of heat stress and the effect of aqueous and polysaccharide extracts from seaweeds *Agardhiella subulata* and *Hypnea pseudomusciformis*, and κ -carrageenan on germination and post-seminal development of *C. mucugensis* seeds. The seeds were exposed to four high-temperature levels: 40, 45, 50, and 55 °C. Subsequently, they were germinated in germitest paper moistened with distilled water, aqueous and polysaccharide extracts from seaweeds and κ -carrageenan in different concentrations: 10, 1 and 0.1 mg ml⁻¹. The seeds of *C. mucugensis* were heat tolerant up to 50 °C. The high concentration of aqueous and polysaccharide extracts was efficient in mitigating the thermal stress on seeds stressed at 45 and 50 °C. In a condition of non-stress and low thermal stress (40 °C), the low concentration of extracts and κ -carrageenan improved the frequency of germination and post-seminal development of the seeds. It is the first report on the effects of heat on seeds of Eriocaulaceae species from Chapada Diamantina.

Keywords: Eriocaulaceae, Everlasting flowers, Post-seminal development, Aqueous extract, Polysaccharides, Thermal tolerance.

1. Introduction

In the region of Chapada Diamantina, located in the state of Bahia, Northeast Brazil, fires are frequent and affect large expanses of *Campos rupestres* (rupestrian fields) of the mountainous areas, where there is a high number of endemic species (Conceição and Pivello 2011). Among these, *Comanthera mucugensis* (Giul.) L. R. Parra & Giul., a species of dry/everlasting flower endemic to Eriocaulaceae known as “sempre-viva de Mucugê”, presents special interest for conservation (Giulietti et al., 1988). Coveted as a decorative item because its flower remains exuberant for a long time, this species was ostensibly exported to Europe and south of Brazil, reaching the status of endangered (Beserra et al., 2007). In addition, in recent years, a higher recurrence of fires has been observed in areas of *C. mucugensis* occurrence, aggravating the risk of extinction.

Seeds of different species diverge in their ability to respond to fire. It is necessary to consider the distinctions of sensitivities according to the heterogeneity of fires (intensity, frequency and duration) and spatial distribution of individuals (Tangney et al., 2020). Most species of *Campos rupestres* can form long-term persistent soil seed banks that can germinate in a wide range of temperatures (Garcia et al., 2020). The soil thermally isolates the buried seeds, maintaining the viability and ensuring the survival of fire and drought. However, the knowledge of the effects of heat on seeds of Eriocaulaceae is limited and restricted to the species found in the state of Minas Gerais, southeastern Brazil (Oliveira and Garcia 2005).

There is evidence that biostimulants derived from seaweeds relieve heat stress (Zhang and Ervin 2008) and improve germination (Hernández-Herrera et al., 2014, 2016). The seaweeds polysaccharides can increase the activity of several metabolites that are beneficial for germination (Hu et al., 2004; Mzibra et al., 2020). Among these, carrageenan was able to promote improvements in germination, growth, metabolite production, besides acting in the mitigation of biotic and abiotic stress in several plants (Bi et al., 2011; Singh et al., 2017; Abad et al., 2018; Saucedo et al., 2019). It has recently been demonstrated that extracts of *Agardhiella subulata* (C. Agardh) Kraft & M. J. Wynne and *Hypnea pseudomusciformis* Nauer, Cassano & M. C. Oliveira, carrageenan producing species, have improved the *in vitro* propagation of *C. mucugensis* (Carmo et al., 2020), suggesting that its stimulating effects may be helpful in various forms of cultivation.

Therefore, the objective of the present study was to evaluate the effect of heat stress on *C. mucugensis* seeds, as well as the effect of aqueous extracts, polysaccharide extracts of *A.*

subulata and *H. pseudomusciformis*, and κ -carrageenan on their germination, as a possible strategy to mitigate the adverse effects of post-fire. It is the first study that demonstrates the effect of heat on seeds of Eriocaulaceae species from Chapada Diamantina.

2. Materials and methods

2.1. Collection and identification of seaweeds

The seaweeds *Agardhiella subulata* and *Hypnea pseudomusciformis* were collected on a coastal reef at Praia da Penha - Ilha de Itaparica, Bahia State, Brazil (12°59'16.7''S / 38°37'21.3''W) in October 2019, during low tide. The species were identified based on morphological characteristics, and a specimen of each was incorporated into the reference collection of the Universidade Estadual de Feira de Santana herbarium (HUEFS 253397, 253396, respectively). The seaweeds collected were initially washed in seawater to eliminate sand particles, epiphytes, and other impurities and subsequently washed with running water to remove the excess of salt. Then, the samples were dried for 15 days at 40 °C and pulverized on Willye type mill (Tecnal®).

2.2. Preparation of aqueous extracts, polysaccharide extracts and κ -carrageenan

The aqueous extracts (AE) were prepared according to Carmo et al. (2020). Approximately 50 g (dry weight) for each sprayed seaweed was soaked in 500 mL of sterile distilled water at 50 °C for 1h. The resulting extract was filtered through four layers of muslin cloth, and the liquid phase dried at 40 °C to a constant weight.

The start processes of preparing the polysaccharide extracts (PE) and the aqueous extract was similar. After extraction in hot water and filtration of the aqueous extract, the polysaccharides were precipitated with three volumes of pure ethanol for a period of 48 h at -4 °C. The precipitated compounds were recovered by filtration through four layers of muslin cloth and the mass retained on tissue was dried at 40 °C to a constant weight. The aqueous extracts of *A. subulata* (AGA) and *H. pseudomusciformis* (HPA) and polysaccharide extracts (AGP and HPP, respectively) were stored at 4 °C.

The κ -carrageenan (KC) was obtained from Sigma-Aldrich® (cod. 22048). The AE, PE and KC were diluted in hot distilled water and autoclaved before use.

2.3. Collection and identification of *Comanthera mucugensis* seeds

Seeds of *C. mucugensis* were collected from inflorescences well developed of mature plants from Mucugê Municipal Park in Chapada Diamantina, Bahia State, Brazil (12°99'21''S and 41°34'19''W) in September 2017 and stored under refrigeration conditions at 4 °C in dark place. The species were identified by the Universidade Estadual de Feira de Santana herbarium specialists based on morphological characteristics of the reference material and deposited on collection (HUEFS 97755). The *C. mucugensis* seeds are very slight and fragile, elliptical, with a testa of reddish-brown color and about 1 mm in diameter (Cerqueira et al., 2008).

2.4. Heat stress and germination of *Comanthera mucugensis* seeds

The seeds of *C. mucugensis* were exposed to four high temperature levels: 40, 45, 50, and 55 °C, in a heating oven for 5 min on glass Petri dishes preheated to the tested temperature. After incubation in heat, the plates were cooled to room temperature.

The seeds were sown in Petri dishes on germitest paper (Germilab®) moistened with distilled water (DW), aqueous extracts (AGA and HPA), polysaccharide extracts (AGP and HPP) and κ -carrageenan (KC) in different concentrations: 10, 1 and 0.1 mg ml⁻¹. The experiment consisted of four replicates of ten seeds per treatment and seeds grown in distilled water were considered as control. The seeded plates were maintained in growth rooms under a 16 h photoperiod, a temperature of 25 ± 3 °C, and fluorescent white light at 60 μ mol m⁻²s⁻¹. After 15 days, the germination rate and post-seminal seed development were evaluated.

2.5. Post-seminal development of *Comanthera mucugensis* seed

After 15 days of sowing, the phases of post-seminal seed development were observed in all treatments. The evaluation was performed using a stereoscopic binocular microscope (Taimin®/TE 18) with a 20x magnification capacity. The criteria established for post-seminal characterization of *C. mucugensis* seeds was based on a study with other *Comanthera* species (Corredor et al., 2015). Thus, the stages of development were determined as (Fig. 1):

- Phase 0 - Seed
- Phase 1 - Start germination: embryo expansion
- Phase 2 - Development of the first leaf
- Phase 3 - Development of the primary root and the second leaf
- Phase 4 - Final germination: complete expansion of leaves and primary root

2.6. Experimental design and statistical analyses

The experimental design was randomized, and the results were examined for normality using the Shapiro-Wilk test. The differences between treatments and control were tested by Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparison test as a post hoc ($p < 0.05$). All of the analyses were performed considering a 5% level of significance, using PAST software (Hammer et al., 2001).

3. Results

3.1. Effect of heat, aqueous extracts, polysaccharide extracts and κ -carrageenan on the of *Comanthera mucugensis*

The results showed that the aqueous and polysaccharide extracts seaweed-derived and κ -carrageenan interfere in the germination of *C. mucugensis* in heat-stressed and non-stressed seeds (Table 1). The aqueous and polysaccharide extracts of *A. subulata* and *H. pseudomusciformis* in concentration 0.1 mg ml^{-1} exhibited a stimulating effect on non-stressed seeds compared to control (distilled water), increasing the germination frequency by 100%. In contrast, the high concentration of AGP (10 mg ml^{-1}) inhibited germination with the lowest rate observed (75%). The κ -carrageenan at low concentrations ($1-0.1 \text{ mg ml}^{-1}$) also promoted a significant increase in the germination of 100%.

The seeds demonstrated tolerance to heat stress at $40 \text{ }^\circ\text{C}$, with 90% germination in control. The highest rate (100%) was obtained with *A. subulata* AE at low concentrations ($1-0.1 \text{ mg ml}^{-1}$) and its polysaccharide extract at 0.1 mg ml^{-1} . In addition, the *H. pseudomusciformis* PE in low concentration ($1-0.1 \text{ mg ml}^{-1}$), increased germination by 100%, while in high concentration (10 mg ml^{-1}), it reduced to 73%. Increased germination frequency was also observed in treatments with low KC concentrations ($1-0.1 \text{ mg ml}^{-1}$).

The seeds heat-stressed at $45 \text{ }^\circ\text{C}$ reduced the germination percentage of the response to 33% in control. The treatments with low concentrations of the aqueous extracts of *A. subulata* and *H. pseudomusciformis* (1 and 0.1 mg ml^{-1} , respectively) and with high concentrations of these polysaccharide extracts and κ -carrageenan (10 mg ml^{-1}), obtained the highest germination rates, about 12-33% upper than the control. However, there was a reduction in the germinated seeds in the treatments with 10 mg ml^{-1} HPA, 0.1 mg ml^{-1} AGP and 1 mg ml^{-1} KC compared to control.

The results showed that the seeds of *C. mucugensis* are less tolerant to the heat of $50 \text{ }^\circ\text{C}$, presenting only a germinative response of 13% in the control treatment. The aqueous and

polysaccharide extracts of *A. subulata* at a concentration of 10 mg ml⁻¹ were efficient in mitigating heat stress and exhibited a germination rate of 30% and 33%, respectively. The treatments with a low concentration of HPA (0.1 mg ml⁻¹), high concentration of HPP (10 mg ml⁻¹) and KC at 10 and 0.1 mg ml⁻¹ concentrations were also able to increase germination frequency compared to control.

The heat stress at 55 °C completely inhibited germination.

3.2. Effect of heat, aqueous extracts, polysaccharide extracts and κ-carrageenan on post-seminal development of *Comanthera mucugensis*

The non-stressed seeds grown in distilled water (control) showed a diversified development pattern covering phases 2, 3 and preferably, phase 4 (Table 2). In addition, the degree of post-seminal seed development varied according to the seaweed-derived biostimulants concentration. The treatments with low concentrations (0.1 mg ml⁻¹) of *A. subulata* AE and AP, *H. pseudomusciformis* PE and κ-carrageenan accelerate the germination process, in which 100% of the seeds had completed the germination process (phase 4) at the end of 15 days. In contrast, high concentrations delayed germination, restricting the highest percentage of seeds to the early stages of development.

The 40 °C stressed seeds grown with 0.1 mg ml⁻¹ AGA, 0.1 mg ml⁻¹ AGP and 1-0.1 mg ml⁻¹ HPA showed a greater degree of post-seminal development, with increased frequency of phase 4 compared to the control. Treatments with high concentrations of seaweed-derived biostimulants (AE, PE, KC) had a retardant effect, limiting seed development, preferably in phases 2 and 3.

The post-seminal development pattern was affected by heat stress at 45 °C and 50 °C, and germinative processes of phases 3 and 4 were not observed in any of the treatments. Despite this, the low concentrations of aqueous and polysaccharide extracts and κ-carrageenan allowed the germination progress of the seed stressed at 45 °C until phase 2, differently of high concentrations and control that restricted development in phase 1. In contrast, the AE and PE of *A. subulata* concentrated in 10 mg ml⁻¹ were efficient in mitigating heat stress and promoted further development of stressed seeds at 50 °C while the other treatments maintained germination only in phase 1.

4. Discussion

Previous studies demonstrated that constant temperatures above 35 °C inhibit the germination of several species of Eriocaulaceae (Oliveira and Garcia 2005, 2011), although *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland and *Paepalanthus speciosus* Gardner were considered tolerant to heat treatments of 60-150 °C for 5 min and 35-80 °C for 30 min, respectively (Sá e Carvalho and Ribeiro 1994; Fichino et al., 2012). In the present study, *C. mucugensis* seeds were tolerant to thermal stress up to 50 °C, however, germination decreased from 45 °C and was inhibited at 55 °C.

Despite having a median heat tolerance, the dispersion of *C. mucugensis* seeds coincides with the dry season (August to December) that is marked by the increased occurrence of fires in Chapada Diamantina (Cerqueira et al., 2008). In addition, reports from the local community indicate the habit of setting fire in the fields for renewal the populations of this species, without any scientific basis (Gonçalves et al., 2011). Therefore, due to the sensitivity of the seeds to high temperatures, it is recommended the abandonment of this practice. It should also be noted that the increase in the global average temperature associated with greater restrictions in water availability can cause greater loss of viability of *C. mucugensis* seeds and, consequently, decrease in recruitment of individuals of the species, aggravating the extinction risk.

On the other hand, the results obtained suggest that the aqueous and polysaccharide extracts of seaweeds are efficient in mitigating thermal stress. In low concentrations, they increased the frequency of germination and stimulated post-seminal development in non-stressed and stressed seeds at 40 and 45 °C. In high concentrations, they provided thermal protection to the seeds subjected to high-heat stress (50 °C), exhibiting a higher frequency of germination and a greater degree of post-seminal development. This suggests that the mitigating effect of these biostimulants depends on their concentration and the severity of the stress. This fact agrees with the discussions that one or more phytocomposites present in the extracts can interact with plant cells at different metabolic levels and that the variability of their stimulating effects is also associated with the environmental conditions in which the plant is subjected (Bulgari et al., 2019). For example, it has been reported that high concentrations of *A. subulata* aqueous extract (above 1 mg ml⁻¹) acts as an osmotic agent causing the decrease of germination of *C. mucugensis* under ideal environmental conditions (Carmo et al., 2020). The data from the present study demonstrated that 10 mg ml⁻¹ of the aqueous and polysaccharide extracts from the same seaweed improved the germination of seeds subjected to heat stress at 50 °C.

The behavior of thermal protection observed at high concentrations of AGA, AGP and KC was similar to the effect of non-penetrating cryoprotective agents. Those are characterized by high molecular weight macromolecules, such as mono-, oligo- and polysaccharides, (e.g. sucrose, mannitol, sorbitol) that stabilize the plasma membrane during the removal of intracellular water in the cryopreservation process (Panis et al., 2001). This indicates that the sugars present in the aqueous and polysaccharide extracts were able to maintain the integrity of the cells in heat-stressed seeds, which allowed the advancement of post-seminal development.

Although it is not clear yet the mechanism of action of seaweed-derived biostimulants, several studies suggest that polysaccharides and phytohormones interfere with metabolic pathways associated with germination and stress. For example, it was suggested that the high sulfate content present in seaweed polysaccharides was an important factor for improving the germination and growth of *Solanum lycopersicum* L. (Mzibra et al., 2018). The data from the present study confirm that carrageenan polysaccharides (pure and extracted from *A. subulata* and *H. pseudomusciformis*) were important stress mitigators and promoted an increase in the frequency and development of *C. mucugensis* germination, similar to extract-induced effects.

Meanwhile, the heat tolerance induced by the seaweed extracts was associated with the presence of cytokinins in the extracts (Zhang and Ervin 2008). Other studies have reported the effects of extracts on increasing tolerance to heat stress with improvements associated with superoxide dismutase activity and photochemical efficiency (Zhang and Ervin 2008), as well as, cooling tolerance (Rayirath et al., 2009; Nair et al., 2012; Bradáčová et al., 2016). In addition, the seeds perceive environmental signals that affect the metabolism and the different signaling pathways of gibberellins (GA) and abscisic acid (ABA), the main hormones that regulate seed dormancy and germination through their antagonistic actions (Garcia et al., 2014). A recent analysis revealed that high concentrations of *Ulva intestinalis* L. extract activate the ABA signaling pathway during *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. germination (Ghaderiardakani et al., 2019). Despite being associated with inhibition of germination, ABA confers resistance to abiotic stressors, including heat, and can be useful in mitigating the harmful effects of heat on seeds affected by fires.

5. Conclusion

The seeds of *Comanthera mucugensis* have a heat tolerance up to 50 °C, although there is a decrease in the germination rate from 45 °C. The use of aqueous and polysaccharide

extracts of *Agardhiella subulata* at 10 mg ml⁻¹ was efficient in mitigating the effects of thermal stress at high temperature, therefore, they can be useful in the recovery of seeds deposited in the lower layers of the soil affected by fires whose temperature has not exceeded 50 °C. In non-stress or low-heat stress conditions, low concentrations (1-0.1 mg ml⁻¹) of the aqueous and polysaccharide extracts isolated from *A. subulata* and *Hypnea pseudomusciformis*, as well as and κ-carrageenan, are recommended to improve germination. It should be noted that the sensitivity of *C. mucugensis* seeds to temperatures above 50 °C should be considered in the conservation plan for natural populations in Chapada Diamantina and their management with fire should be avoided.

Conflicts of interest/Competing interests: The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors thank the workers of the Chapada Diamantina National Park for their dedication to the conservation of the “sempre-viva de Mucugê” and the Fire Department of the State of Bahia for their efforts in combating the fires in Chapada Diamantina, especially in the terrible fires of October 2020. The first author thanks to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brazil) for the financial support (Finance Code 001).

References

- Abad, L. V., Aurigue, F.B., Montefalcon, D.R. V., Manguiat, P.H., Carandang, F.F., Maborang, S.A., Hizon, M.G.S., Abella, M.E.S., 2018. Effect of radiation-modified kappa-carrageenan as plant growth promoter on peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Radiat. Phys. Chem.* 153, 239–244. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2018.10.005>
- Beserra, M.M.L., Ferreira, L.M., Gonçalves, C.N., Casella, P. L. C., Gonçalves, V., Ferreira, J.G., Coslope, L.A., 2007. Plano de manejo para o Parque Nacional da Chapada Diamantina. Instituto Chico Mendes, Brasília, Brasil.
- Bi, F., Iqbal, S., Arman, M., Ali, A., Hassan, M., 2011. Carrageenan as an elicitor of induced secondary metabolites and its effects on various growth characters of chickpea and maize plants. *J. Saudi Chem. Soc.* 15, 269–273. <https://doi.org/10.1016/J.JSCS.2010.10.003>
- Bradáčová, K., Weber, N.F., Morad-Talab, N., Asim, M., Imran, M., Weinmann, M., Neumann, G., 2016. Micronutrients (Zn/Mn), seaweed extracts, and plant growth-promoting bacteria as cold-stress protectants in maize. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 3, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0069-1>
- Bulgari, R., Franzoni, G., Ferrante, A., 2019. Biostimulants application in horticultural crops under abiotic stress

- conditions. *Agronomy* 9, 1–30. <https://doi.org/10.3390/agronomy9060306>
- Carmo, L.P., Moura, C.W.N., Lima-Brito, A., 2020. Red macroalgae extracts affect *in vitro* growth and bud formation in *Comanthera mucugensis* (Giul.) L. R. Parra & Giul., an endemic dry flower species from the Chapada Diamantina (Brazil). *South African J. Bot.* 135, 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.033>
- Cerqueira, C.O., Funch, L.S., Borba, E.L., 2008. Fenologia de *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* e *S. curralensis* Moldenke (Eriocaulaceae), nos municípios de Mucugê e Morro do Chapéu, Chapada Diamantina, BA, Brasil. *Acta Bot. Brasilica* 22, 962–969. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062008000400007>
- Conceição, A.A., Pivello, V.R., 2011. Biomassa Combustível em Campo Sujo no Entorno do Parque Nacional da Chapada Diamantina. *Biodiversidade Bras.* 2, 146–160.
- Corredor, B.A.D., Escobar, D.F.E., Scatena, V.L., 2015. Morfología de semillas y desarrollo post-seminal de especies de *Comanthera* (Eriocaulaceae). *Rev. Biol. Trop.* 63, 1127–1135. <https://doi.org/10.15517/rbt.v63i4.16956>
- Fichino, B., Fidelis, A., Schmidt, I., Pivello, V., 2012. Efeitos de altas temperaturas na germinação de sementes de capim-dourado (*Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland, Eriocaulaceae): implicações para o manejo. *Acta Bot. Brasilica* 26, 508–511. <https://doi.org/10.1590/s0102-33062012000200026>
- Garcia, Q.S., Oliveira, P.G., Duarte, D.M., 2014. Seasonal changes in germination and dormancy of buried seeds of endemic Brazilian Eriocaulaceae. *Seed Sci. Res.* 24, 113–117. <https://doi.org/10.1017/S0960258514000038>
- Garcia, Q.S., Barreto, L.C., Bicalho, E.M., 2020. Environmental factors driving seed dormancy and germination in tropical ecosystems: A perspective from campo rupestre species. *Environ. Exp. Bot.* 178, 1–28. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104164>
- Ghaderiardakani, F., Collas, E., Damiano, D.K., Tagg, K., Graham, N.S., Coates, J.C., 2019. Effects of green seaweed extract on *Arabidopsis* early development suggest roles for hormone signalling in plant responses to algal fertilisers. *Sci. Rep.* 9, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38093-2>
- Giulietti, N., Giulietti, A.M., Rubens, J., 1988. Estudos em sempre-vivas: importância econômica do extrativismo em Minas Gerais, Brasil. *Acta Bot. Bras.* 1, 179–193
- Gonçalves, C.N., Mesquita, F.W., Lima, N.R.G., Coslope, L.A., Lintomen, B.S., 2011. Recorrência dos incêndios e fitossociologia da vegetação em áreas com diferentes regimes de queima no Parque Nacional da Chapada Diamantina. *Biodiversidade Bras.* 1, 161–179.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST-Palaeontological statistics. *Palaeontol. Electron.* 4, 1–9.
- Hernández-Herrera, R.M., Santacruz-Ruvalcaba, F., Ruiz-López, M.A., Norrie, J., Hernández-Carmona, G., 2014. Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *J. Appl.*

- Phycol. 26, 619–628. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0078-4>
- Hernández-herrera, R.M., Santacruz-ruvalcaba, F., 2016. Activity of seaweed extracts and polysaccharide-enriched extracts from *Ulva lactuca* and *Padina gymnospora* as growth promoters of tomato and mung bean plants. J. Appl. Phycol. 26, 619–628. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0781-4>
- Hu, X., Jiang, X., Hwang, H., Liu, S., Guan, H., 2004. Promotive effects of alginate-derived oligosaccharide on maize seed germination. J. Appl. Phycol. 16, 73–76. <https://doi.org/10.1023/B:JAPH.0000019139.35046.0c>
- Mzibra, A., Aasfar, A., El Arroussi, H., Khouloud, M., Dhiba, D., Kadmiri, I.M., Bamouh, A., 2018. Polysaccharides extracted from Moroccan seaweed: a promising source of tomato plant growth promoters. J. Appl. Phycol. 30, 2953–2962. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1421-6>
- Mzibra, A., Aasfar, A., Benhima, R., Khouloud, M., Boulif, R., Douira, A., Bamouh, A., Meftah Kadmiri, I., 2020. Biostimulants derived from Moroccan seaweeds: seed germination metabolomics and growth promotion of tomato plant. J. Plant Growth Regul. 1, 1-18. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10104-5>
- Nair, P., Kandasamy, S., Zhang, J., Ji, X., Kirby, C., Benkel, B., Hodges, M.D., Critchley, A.T., Hiltz, D., Prithviraj, B., 2012. Transcriptional and metabolomic analysis of *Ascophyllum nodosum* mediated freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. BMC Genomics 13, 1-23. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-643>
- Oliveira, P.G., Garcia, Q.S., 2005. Efeitos da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Syngonanthus elegantulus* Ruhland, *S. elegans* (Bong.) Ruhland e *S. venustus* Silveira (Eriocaulaceae). Acta Bot. Brasilica 19, 639–645. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062005000300026>
- Oliveira, P.G., Garcia, Q.S., 2011. Germination characteristics of *Syngonanthus* seeds (Eriocaulaceae) in *campos rupestres* vegetation in South-eastern Brazil. Seed Sci. Res. 21, 39–45. <https://doi.org/10.1017/S0960258510000346>
- Panis, B., Swennen, R., Engelmann, F., 2001. Cryopreservation of plant germplasm. Acta Hort. 560, 79–86. <https://doi.org/doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.560.8>
- Rayirath, P., Benkel, B., Mark Hodges, D., Allan-Wojtas, P., MacKinnon, S., Critchley, A.T., Prithviraj, B., 2009. Lipophilic components of the brown seaweed, *Ascophyllum nodosum*, enhance freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Planta 230, 135–147. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-0920-8>
- Sá e Carvalho, C.G., Ribeiro, M.C., 1994. Efeitos de choques térmicos na germinação de *Paepalanthus speciosus* Koern. (Eriocaulaceae). Acta Bot. Brasilica 8, 205–211. <https://doi.org/10.1590/s0102-33061994000200005>
- Saucedo, S., González, A., Gómez, M., Contreras, R.A., Laporte, D., Sáez, C.A., Zúñiga, G., Moenne, A., 2019. Oligo-carrageenan kappa increases glucose, trehalose and TOR-P and subsequently stimulates the expression of genes involved in photosynthesis, and basal and secondary metabolisms in *Eucalyptus*

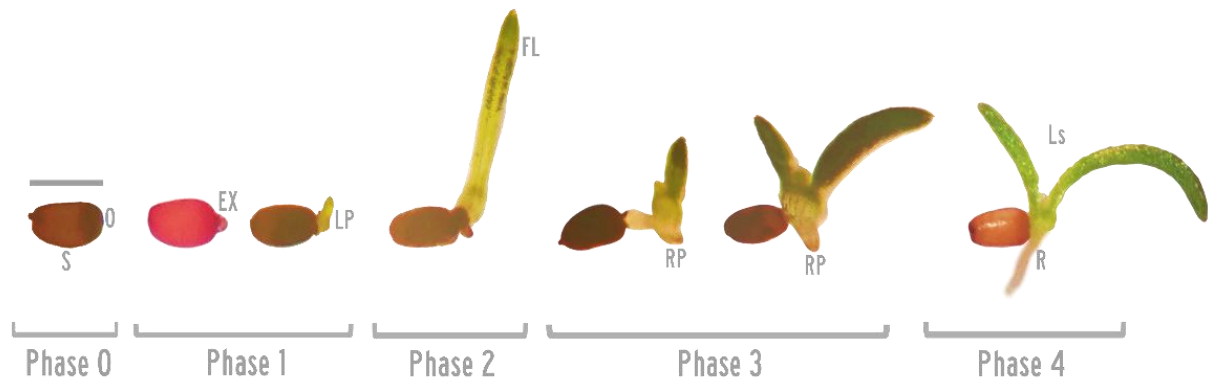
globulus. BMC Plant Biol. 19, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1858-z>

Singh, M., Khan, M.M.A., Uddin, M., Naeem, M., Qureshi, M.I., 2017. Proliferating effect of radiolytically depolymerized carrageenan on physiological attributes, plant water relation parameters, essential oil production and active constituents of *Cymbopogon flexuosus* Steud. under drought stress. PLoS One 12, 1-20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180129>

Tangney, R., Merritt, D.J., Callow, J.N., Fontaine, J.B., Miller, B.P., 2020. Seed traits determine species' responses to fire under varying soil heating scenarios. Funct. Ecol. 34, 1967–1978. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13623>

Zhang, X., Ervin, E.H., 2008. Impact of seaweed extract-based cytokinins and zeatin riboside on creeping bentgrass heat tolerance. Crop Sci. 48, 364–370. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.05.0262>

Fig. 1 Post-seminal development phases of *Comanthera mucugensis* seeds.



S= seed; O= operculum EX= embryo expansion; LP= leaf primordium; FL= first leaf; RP= root primordium; Ls= leaves; R= root. Bar = 1 mm.

Table 1. Effect of aqueous extract of *Agardhiella subulata* (AGA) and *Hypnea pseudomusciformis* (HPA), of its polysaccharide extracts (AGP and HPP, respectively) and κ -carrageenan (KC) on the germination rate (%) of *Comanthera mucugensis* seeds non-stressed and heat-stressed.

	Non-stress	40 °C	45 °C	50 °C	55 °C
DW (control)	92 ± 0	90 ± 0	33 ± 3	13 ± 0	0 ± 0
AGA 10 mg ml ⁻¹	93 ± 3	91 ± 9	40 ± 1	30 ± 1*	0 ± 0
AGA 1 mg ml ⁻¹	91 ± 5	100 ± 0*	50 ± 7*	10 ± 0	0 ± 0
AGA 0.1 mg ml ⁻¹	100 ± 0*	100 ± 0*	35 ± 5	19 ± 0	0 ± 0
HPA 10 mg ml ⁻¹	83 ± 6	90 ± 0	17 ± 1*	12 ± 5	0 ± 0
HPA 1 mg ml ⁻¹	95 ± 2	90 ± 0	29 ± 3	15 ± 5	0 ± 0
HPA 0.1 mg ml ⁻¹	100 ± 0*	94 ± 0	45 ± 7*	32 ± 0*	0 ± 0
AGP 10 mg ml ⁻¹	75 ± 5*	88 ± 0	60 ± 11*	33 ± 3*	0 ± 0
AGP 1 mg ml ⁻¹	85 ± 1	100 ± 0*	27 ± 1	19 ± 9	0 ± 0
AGP 0.1 mg ml ⁻¹	100 ± 0*	97 ± 5	19 ± 0*	9 ± 5	0 ± 0
HPP 10 mg ml ⁻¹	93 ± 4	73 ± 1*	66 ± 13*	35 ± 7*	0 ± 0
HPP 1 mg ml ⁻¹	94 ± 3	100 ± 0*	29 ± 2	16 ± 6	0 ± 0
HPP 0.1 mg ml ⁻¹	100 ± 0*	100 ± 0*	37 ± 8	3 ± 0	0 ± 0
KC 10 mg ml ⁻¹	93 ± 7	90 ± 4	46 ± 0*	29 ± 1*	0 ± 0
KC 1 mg ml ⁻¹	100 ± 0*	100 ± 0*	20 ± 1*	17 ± 0	0 ± 0
KC 0.1 mg ml ⁻¹	100 ± 0*	100 ± 0*	35 ± 7	33 ± 0*	0 ± 0

Data correspond to means ± SD. Asterisks (*) in column indicate significant difference from control (Kruskal–Wallis and Dunn's test; $p < 0.05$).

Table 2 Effect of aqueous extract of *Agardhiella subulata* (AGA) and *Hypnea pseudomusciformis* (HPA), of its polysaccharides extracts (AGP and HPP, respectively) and κ -carrageenan (KC) on post-seminal development of *Comanthera mucugensis* seeds non-stressed and heat-stressed after 15 days of sowing.

	Non-stress				40 °C				45 °C				50 °C			
	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
DW (control)	0	8	10	82	0	19	13	68	100	0	0	0	100	0	0	0
AGA 10 mg ml ⁻¹	0	100*	0	0*	0	92*	8	0*	100	0	0	0	66*	34*	0	0
AGA 1 mg ml ⁻¹	0	0	25	75	0	0	48*	52	50*	50*	0	0	100	0	0	0
AGA 0.1 mg ml ⁻¹	0	0	0	100*	0	0	3	97*	48*	52*	0	0	100	0	0	0
HPA 10 mg ml ⁻¹	0	0	25	75	0	10	90*	0*	100	0	0	0	100	0	0	0
HPA 1 mg ml ⁻¹	5	4	16	75	0	0	0	100*	100	0	0	0	100	0	0	0
HPA 0.1 mg ml ⁻¹	0	0	5	95	0	0	0	100*	97	3	0	0	100	0	0	0
AGP 10 mg ml ⁻¹	0	87*	13	0*	0	15	55*	30*	100	0	0	0	63*	37*	0	0
AGP 1 mg ml ⁻¹	0	0	0	100*	0	0	19	81	47*	53*	0	0	100	0	0	0
AGP 0.1 mg ml ⁻¹	0	0	0	100*	0	0	0	100*	75*	25*	0	0	100	0	0	0
HPP 10 mg ml ⁻¹	7	55*	38*	0*	13	69*	16	0*	100	0	0	0	100	0	0	0
HPP 1 mg ml ⁻¹	0	0	18	82	0	85*	15	0*	87	13	0	0	100	0	0	0
HPP 0.1 mg ml ⁻¹	0	0	0	100*	0	0	23	77	71*	29*	0	0	100	0	0	0
KC 10 mg ml ⁻¹	34*	46*	20	0*	23*	55*	22	0*	100	0	0	0	88	12	0	0
KC 1 mg ml ⁻¹	0	0	8	92	0	15	85*	0*	100	0	0	0	100	0	0	0
KC 0.1 mg ml ⁻¹	0	0	0	100*	0	0	30	70	67*	33*	0	0	100	0	0	0

Data indicate percentage of seeds per post-seminal phase. Asterisks (*) in column indicate significant difference from control (Kruskal–Wallis and Dunn's test; $p < 0.05$). P1= Phase 1; P2= Phase 2; P3= Phase 3; P4= Phase.

CAPÍTULO 2

Water stress and κ -carrageenan stimulate in vitro direct organogenesis in *Comanthera mucugensis*, an endangered species from the semi-arid region of Northeastern Brazil



**Water stress and κ -carrageenan stimulate *in vitro* direct organogenesis in
Comanthera mucugensis, an endangered species from the semi-arid region of
Northeastern Brazil**

O capítulo será submetido no período Plant Cell, Tissue and Organ Culture

Resumo

Comanthera mucugensis é uma planta ornamental ameaçada de extinção que encontra-se submetida a déficit hídrico, o que compromete a sobrevivência das populações naturais e induz o brotamentos vegetativos como resposta ao estresse. Uma das principais estratégias para sua conservação *ex situ* e propagação é a organogênese direta, processo que ainda necessita ser otimizado. Os polissacarídeos derivados de macroalgas podem ser utilizados para aumentar a tolerância ao estresse abiótico e como suplemento orgânico para o meio de cultura. Dessa forma, o presente estudo avaliou o efeito do estresse hídrico induzido por 30 g L⁻¹ polietilenoglicol (PEG) combinado com 0.1 mg mL⁻¹ de κ -carragenana (KC) na germinação, crescimento e na organogênese direta de *C. mucugensis*. Foi observado que a sobrevivência e os parâmetros de crescimentos foram comprometidos nas plantas cultivadas com o osmorregulador, no entanto, a suplementação com a κ -carragenana atenuou o efeito nocivo e melhorou a germinação, sobrevivência e o crescimento radicular. O tratamento com PEG aumentou a taxa de responsividade dos explantes para brotos, especialmente, quando combinado com o bioestimulante. As plantas não-estressadas apresentaram maior conteúdo de prolina quando comparadas com as cultivadas com osmorregulador. O estresse aumentou a síntese de putrescina (Put), espermidina (Spd) e de poliaminas livres totais (PAs livres totais). Os maiores níveis de Put e PAs livres totais foram observados em plantas tratadas com PEG e κ -carragenana, enquanto, o teor de Spd dobrou na condição estressante, independente da presença do polissacarídeo. Dessa forma, o estresse induzido por PEG pode ser utilizado como método de propagação *in vitro* em *C. mucugensis*. A κ -carragenana tem efeito antiestressante e é útil para aumentar a biossíntese de poliaminas, as quais estão envolvidas na organogênese e parecem ser reguladas pelo estresse.

Palavras-chave: *Eriocaulaceae*, bioestimulante, polietilenoglicol, prolina, poliaminas.

Abstract

Comanthera mucugensis is an endangered ornamental plant that is subject to water deficit, which compromises the survival of natural populations and induces vegetative shoots in response to stress. One of the main strategies for its *ex situ* conservation and propagation is direct organogenesis, a process that still needs optimization. The seaweed-derived polysaccharides can be used to increase tolerance to abiotic stress and as an organic supplement to the culture medium. Thus, the present study evaluated the effect of water stress induced by 30 g L⁻¹ polyethylene glycol (PEG) combined with 0.1 mg mL⁻¹ κ-carrageenan (KC) on germination, growth, and direct organogenesis of *C. mucugensis*. It was observed that survival and growth parameters were compromised in plants grown with the osmoregulator, however, supplementation with κ-carrageenan mitigated the harmful effect and improved germination, survival, and root growth. The PEG treatment increased the responsiveness rate of the explants to shoots, especially when combined with the biostimulant. The non-stressed plants presented higher proline content when compared to those grown with osmoregulator. The stress increased the synthesis of putrescine (Put), spermidine (Spd) and total free polyamines (total free PAs). The highest levels of Put and total free PAs were observed in plants treated with PEG and κ-carrageenan, whereas, Spd content doubled in the stressful condition, independent of the presence of the polysaccharide. Therefore, PEG-induced stress can be used as a method of *in vitro* propagation in *C. mucugensis*. The κ-carrageenan has an anti-stress effect and is useful for increasing the biosynthesis of polyamines, which are involved in organogenesis and apparently regulated by stress.

Keywords: *Eriocaulaceae*, *biostimulant*, *polyethylene glycol*, *proline*, *polyamines*.

INTRODUCTION

The Chapada Diamantina is one of the greatest centers of plant biodiversity in Brazil, containing endemic species of the Orchidaceae, Velloziaceae, Cactaceae and Eriocaulaceae families (Giulietti et al. 2005). However, the climate changes have modified the phenological characteristics of the plants in this region, compromising the reproductive cycle and the survival of the populations (Cerqueira et al. 2008; Menezes et al. 2018, 2021). The prolonged dry periods and recurring fires result in severe water deficit, which represents a risk of the Chapada Diamantina biodiversity.

The plant tissue culture is one of the main strategies used in *ex situ* conservation and propagation of endangered species in the Chapada Diamantina (Borges et al. 2020; Lima et al. 2021b). The technique has been applied to the cultivation of *Comanthera mucugensis* (Giul.) L. R. Parra & Giul. (Eriocaulaceae), an endemic and ornamental species of the region (Lima-Brito et al. 2011b; Brasil 2022). However, because of the low rate of *in vitro* propagation, efforts have been made to improve conventional direct organogenesis protocols (Lima-Brito et al. 2011b; Carmo et al. 2020).

Previous studies have demonstrated that *C. mucugensis* is sensitive to water deficit (Nepomuceno et al. 2007; Cerqueira et al. 2008; Lima-Brito et al. 2011a) and, under *in vitro* condition, vegetative shoots can be induced as a response to stress (Carmo et al. 2020). Therefore, it was suggested that water stress could be a method of *in vitro* multiplication for the species, although there are no specific studies or conclusive data on the subject.

When exposed to stressful conditions, plants accumulate several of metabolites, mainly proline (Hayat et al. 2012). This molecule is considered to be an indicator of environmental stress, and participates in various cellular processes, including bioenergetics, differentiation, growth, and apoptosis (Liang et al. 2013). In addition, polyamines, small aliphatic amines common in all plant cells, also play an important role in morphogenesis, shoot development, somatic embryogenesis, and response to biotic and abiotic stresses (Silveira et al. 2006; Gupta et al. 2013; Felipe et al. 2019).

The seaweed-derived biostimulants can mitigate the negative effects caused by abiotic stress on various plants (Battacharyya et al. 2015; Jacomassi et al. 2022) and is useful as an organic supplement to the culture medium during micropropagation (Carmo

et al. 2021a). The marine algae have phytohormones, polysaccharides, macro and micronutrients, amino acids, vitamins, and other compounds that stimulate morphogenesis in plant tissues (Carmo et al. 2021a). For example, aqueous extracts obtained from carrageenophyte red macroalgae improved the direct organogenesis of *C. mucugensis* (Carmo et al. 2020) whereas, the algal polysaccharide κ -carrageenan increased germination during heat stress in this species (Carmo et al. 2021b).

The species *C. mucugensis* has been classified as endangered by Brazilian legislation (Brazil 2022) and remains in a situation of ecological vulnerability. The understanding of their physiological characteristics under water stress is important for the development of ways to mitigate the harmful effects, as well as more efficient *in vitro* propagation protocols. Therefore, this study evaluated the effect of polyethylene glycol (PEG)-induced water stress and the biostimulant κ -carrageenan on germination, growth, and direct organogenesis of *C. mucugensis*.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

The *C. mucugensis* seeds were collected from inflorescences of mature plants from Mucugê Municipal Park in Chapada Diamantina, Bahia State, Brazil (12°99'21''S and 41°34'19''W) in October 2021 (SisGen A11E268). In laminar flow cabinet, the seeds were disinfected in 70% ethyl alcohol for 30 s, followed by immersion for 10 min in a solution of sodium hypochlorite (2.5% active chloride) (Qboa®) with an added drop of neutral detergent (Ypê®), with subsequent rinsing three times in sterile distilled water.

Germination, initial growth, and direct organogenesis

The seeds were sown on standard medium half-strength MS (Murashige and Skoog 1962) (MS^{1/2}). To simulate water stress *in vitro*, the MS^{1/2} medium was supplemented with polyethylene glycol 6000 (PEG) (Neon®) at different concentrations: 0 g L⁻¹ (no stress) and 30 g L⁻¹ (stress) and with κ -carrageenan (Sigma-Aldrich®) (0 or 0.1 mg mL⁻¹). After 30 days, the germination rate was evaluated. The survival rate, the length of the aerial part and the largest root were analyzed after 90 days. The number of responsive plants for shoots and number of shoots per plant were recorded after 180 days.

General cultivation conditions

In vitro cultures were performed in test tubes (25 x 150 mm), closed with polyvinyl chloride (PVC) film. In all media 15 g L⁻¹ sucrose (Dinâmica®) (Lima-Brito et al. 2011b) was added and gelled with 2.5 g L⁻¹ Phytigel® (Sigma-Aldrich). The pH was adjusted between 5.6-5.8 and autoclaved for 15 minutes at 121 °C and 1.0 atm of pressure. The experiments were then maintained in growth rooms under a 16 hour photoperiod, a temperature of 25 ± 3 °C, and fluorescent white light at 60 μmol m⁻²s⁻¹.

Proline content

The determination of proline content was based on the method described by Carillo and Gibon (2011). Approximately 40 mg of fresh tissue, obtained from 180-day-old plants, was macerated in liquid nitrogen, and homogenized in 1 mL of 70% ethanol. Subsequently, 500 μl of this extract was mixed with 1000 μl of the reaction solution composed of ninhydrin 1% (w/v) in acetic acid 60% (v/v) and ethanol 20% (v/v). The mixture was incubated at 95 °C for 20 min, centrifuged (1 min, 10000 rpm) and cooled to room temperature. The supernatant was used for spectrophotometer reading at 520 nm and the absorbances compared to the proline standard curve (0 to 100 μg. mL⁻¹) according to the equation of Carillo and Gibon (2011). The results were expressed in μmol.g⁻¹ FW (fresh weight).

Polyamine analysis

The polyamine (PA) determination was performed according to Santa-Catarina et al. (2006). Samples with approximately 300 mg of fresh mass (FM) of 180-day-old plants were used. These were ground in 1.6 ml of 5% (v/v) perchloric acid and, after 1 h, the samples were centrifuged for 20 min at 20,000 ×g at 4°C. Free PAs were determined directly from the supernatant. Conjugated PAs were extracted by hydrolyzing 200 μL of supernatant with 200 μL of 12 N HCl for 18 h, at 110°C. The samples were dried under nitrogen and then solubilized in 200 μL of 5% perchloric acid. Free and conjugated PAs were derived by dansyl chloride and identified by HPLC, using a 5 μm reverse-phase column (Shimadzu Shin-pack CLC ODS). The gradient was developed by mixing increasing proportions of absolute acetonitrile to 10% acetonitrile in water (pH 3.5). The gradient of absolute acetonitrile was programmed to 65% over the first 10 min, from 65 to 100% for between 10 min and 13 min, and 100% for between 13 min and 21 min, at 1 ml min⁻¹ flow at 40°C. The PA concentration was determined using a fluorescence detector at 340 nm (excitation) and 510 nm (emission). Peak areas and

retention times were measured by comparison with standard PAs: Putrescine (Put), Spermidine (Spd), Spermine (Spm), and Cadaverine (Cad), and the values expressed in $\mu\text{g g}^{-1}$ FM.

Experimental design and statistical analyses

The experimental design was randomized with two PEG concentrations and two κ -carrageenan concentrations, totaling four treatments composed of six repetitions with five samples each. The proline and polyamine content analyzes were performed in triplicate. The results were examined for normality using the Shapiro-Wilk test. The parametric data were evaluated using analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test, and the nonparametric data were analyzed using the Kruskal-Wallis H test and by the Mann-Whitney U test. All the analyses were performed considering a 5% level of significance, using PAST software (Hammer et al. 2001).

RESULTS

Germination, initial growth, and morphogenesis

The results obtained demonstrated that the germination of *C. mucugensis* decreased with the presence of 30 g L^{-1} of PEG (Table 1). In the presence of the osmoregulator, supplementation with κ -carrageenan attenuated the effects of stress and increased germination potential by 9%. After 90 days, the plants grown without stress had 100% survival, independent of the presence of the biostimulant. Under the water stress condition, this rate reduced by 30%, however, the κ -carrageenan treatment maintained plant survival at 100%. In addition, a reduction in the growth of the aerial part was also observed in the media added with PEG, however, supplementation with the polysaccharide had no effect on the analyzed variable. The root development was enhanced with the biostimulant in unstressed and stressed plants.

After 180 days, multiplication via direct organogenesis was observed (Fig 1). The PEG treatment promoted the highest rates of responsive explants for shoots, and its supplementation with 0.1 mg mL^{-1} of KC increased the response by approximately 54% compared to the treatment without stress and biostimulant (Table 1).

Proline content

The results indicated that proline content decreased in PEG and κ -carrageenan treatments after 180 days of cultivation (Fig 2), with the highest level (1.63 ± 0.12) observed in unstressed and non-biostimulated plants. The presence of the polysaccharide inhibited the accumulation of the molecule in the conditions without and with stress, and the lowest value (1.06 ± 0.04) was reported in the treatment with 30 g L^{-1} PEG + 0.1 mg mL^{-1} KC.

Polyamine analysis

The polyamine analysis demonstrated that drought stress stimulated the synthesis of putrescine, spermidine and total free PAs in 180-day-old microplants (Table 2). PEG-associated κ -carrageenan doubled the Put content and increased the level of total free PAs by approximately 1.47x, when compared to the additive-free treatment. The plants grown under stress exhibited 2x more Spd, independent of the presence of biostimulant. In the absence of the stressor, κ -carrageenan did not interfere with polyamine content. Spermine and cadaverine levels were not affected by water stress and/or biostimulant.

DISCUSSION

The supplementation of the medium with seaweed-derived biostimulants can improve the steps of *in vitro* regeneration, via organogenesis and somatic embryogenesis (Carmo et al. 2021a). For example, oligocarrageenan increased the formation of somatic embryos in *Brassica oleracea* var. *italica* Plenck (Lemonnier-Le Penhuizic et al. 2001). In the present study, the presence of the algae polysaccharide stimulated direct organogenesis and attenuated the effect of water stress on survival, germination, and rooting of the plants. Another similar study with carrageenophyte algae showed that the use of *Agardhiella subulata* extract increased the number of shoots, while *Hypnea pseudomusciformis* extract enhanced aerial elongation and rooting of shoots in *C. mucugensis* (Carmo et al. 2020).

The increase on *in vitro* shoots of *C. mucugensis* may also be associated with the plant's response to water stress as result of the change in osmotic pressure of the medium caused by the presence of organic substances (Carmo et al. 2020). PEG 6000 is one of the osmoregulators commonly used to simulate water deficit during *in vitro* cultivation (de Castro et al. 2020). Besides this, it has been reported that the combination of 30 g L^{-1} sucrose with 15 g L^{-1} sorbitol is able to induce shoots in 15% of

the 180-day-old microplants of *C. mucugensis*, and an mean of 3.18 shoots per explant (Lima-Brito et al. 2011a). However, the protocol obtained a survival rate of only 20%. In the present study, the supplementation of the medium with 15 g L⁻¹ sucrose and 30 g L⁻¹ PEG presented a 58.82% responsiveness rate in microplants with the same age, an mean of 2 shoots per explant and maintained the survival rate at 70%. These results can be improved with the addition of 0.1 mg mL⁻¹ of KC, which indicates it is an efficient protocol for direct organogenesis of *C. mucugensis*.

According to the phenology of *C. mucugensis*, the water deficit appears to favor the reproductive development (Cerqueira et al. 2008). Therefore, the formation of shoots *in vitro* as result of stress reproduces a natural behavior of the species in the *ex vitro* condition (Lima-Brito et al. 2011a). This plant occurs in litholic, quartz and acid soils, whose vegetation is composed of species resistant to water stress or with tolerance to desiccation (Oliveira et al. 2016; Lima et al. 2021a).

The mechanisms of regulation of water stress in plants adapted to environments with low water availability are still being studied, being common the accumulation of large amounts of proline in xerophytic species in the natural habitat (Wang et al. 2004). However, there are indications that this behavior may change according to the *ex situ* cultivation condition. For example, in Cactaceae species, such as *Mammillaria gracilis*, a decrease in proline was observed on *in vitro* plants treated with 150 mM and 500mM mannitol (Balén et al. 2013). Another study demonstrated that organogenic cultures of forage palm (*Opuntia ficus-indica*) reduced the content of the metabolite in the explants after one week under water stress (Radi et al. 2023).

The reduction in proline content was also observed in the present study in microplants of *C. mucugensis* grown with PEG and PEG + 0.1 mg mL⁻¹ KC. However, previously, the increase of these osmolytes was reported in lemongrass treated with oligocarrageenan during drought (Singh et al. 2017).

The proteomic analysis of *M. gracilis* indicated that the mechanisms that mediate responses to abiotic stress differ with plant tissue type and growing condition, since proline content can decrease in drought and increase in salinity (Rogić et al. 2015). In addition, positive regulation of proteins associated with energy function and protein synthesis and processing has been reported in *M. gracilis* callus submitted to mannitol and with low proline content. This indicates that the non-accumulation of proline in

plants adapted to water deficit may favor protein production, and that the molecule may have a different protective role. Therefore, proline may not be a good marker for water stress in *C. mucugensis*.

Another explanation for the reduced proline content in *C. mucugensis* plants under water stress is due to the increased content of polyamines. Both molecules compete for glutamate and arginine, which may have been diverted, in particular, to the biosynthesis of putrescine (Majumdar et al. 2016), and stimulated morphogenesis in *C. mucugensis*. Previously, it has been reported that Put and total free PAs participate on *in vitro* shoot induction and elongation in tree species (Lerin et al. 2019; Pessanha et al. 2022; Aragão et al. 2023). In the present study, there was a greater accumulation of Spd and Spm in relation to Put, independent of the cultivation condition and the presence of biostimulant, in 180-day-old *C. mucugensis* plants, which characterizes the cell differentiation phase that determines the development of shoots (Aragão et al. 2017).

Furthermore, polyamines perform precise functions in water stress tolerance, since Put accumulation is a key factor in mediating mitigating events, while Spd and Spm appear have an important role in growth recovery (Peremarti et al. 2009). In *Medicago truncatula*, the increase in putrescine and spermidine content was related to the improvement of physiological parameters in plants under water deficit (Duque et al. 2016), similar to the results of the present study. The contribution of spermine and cadaverine to stress response, such as cold, salt and drought, has been discussed in the literature (Jancewicz et al. 2016; Sánchez-Rodríguez et al. 2016), however, the current data suggest that these amines are not affected by water stress in *C. mucugensis*. The same was observed in *Arabidopsis* (Alcázar et al. 2010) and *Datura stramonium* (Peremarti et al. 2009).

The exogenous treatment of plants with polysaccharides appears to favor the biosynthesis of polyamines. In experiments with the grass *Agrostis stolonifera*, an increase in Put, Spd and Spm was demonstrated in leaves treated with chitosan, which would have contributed to salinity tolerance (Geng et al. 2020). The same polysaccharide promoted the accumulation of putrescine and spermidine, and was associated with improved drought resistance in white clover (*Trifolium repens*) (Li et al. 2017). Another study reported that banana treatment with λ -carrageenan stimulated the expression of the adenosylmethionine synthase gene (SAM-S), responsible for the

synthesis of one of the precursors of aliphatic amines, S-adenosylmethionine (Thye et al. 2022). The present results suggest that κ -carrageenan is useful in increasing the biosynthesis of putrescine and total free PAs under water stress condition, improving direct organogenesis, and attenuating the effects of water stress in *C. mucugensis*.

CONCLUSION

The results of this study demonstrate that PEG-induced water stress associated with κ -carrageenan favors direct organogenesis in *C. mucugensis* and can be used as a method of *in vitro* propagation. κ -carrageenan has an anti-stress effect and is useful in increasing the biosynthesis of putrescine and total free PAs in osmoregulator-grown plants. In addition, polyamines are involved in organogenesis and appear to be regulated by the presence of the stress agent. The proline may not be a good biomarker for water stress for *C. mucugensis*. Transcriptomic and enomic studies are suggested for a better understanding of the physiological events observed here.

REFERENCES

- Alcázar R, Planas J, Saxena T, et al (2010) Putrescine accumulation confers drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants over-expressing the homologous Arginine decarboxylase 2 gene. *Plant Physiol Biochem* 48:547-552. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.02.002>
- Aragão VPM, Reis RS, Silveira V, Santa-Catarina C (2017) Putrescine promotes changes in the endogenous polyamine levels and proteomic profiles to regulate organogenesis in *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 130, 495-505. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1239-y>
- Aragão VPM, Sousa KR de, Oliveira T dos R de, et al (2023) The inhibition of putrescine synthesis affects the *in vitro* shoot development of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) by altering endogenous polyamine metabolism and the proteomic profile. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 152:377-392. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02414-1>
- Balen B, Tkalec M, Rogić T, et al (2013) Effects of iso-osmotic NaCl and mannitol on growth, proline content, and antioxidant defense in *Mammillaria gracilis* Pfeiff. *in vitro*-grown cultures. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 49:421–432. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9523-y>
- Battacharyya D, Babgohari MZ, Rathor P, Prithiviraj B (2015) Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Sci Hortic* 196:39–48. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.012>
- Borges BP dos S, Lima APPS, Lima-Brito A, et al (2020) Fire as a novel technique to stimulate adventitious shoots in the laboratory. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 143:709–713. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01933-z>

- Brasil (2022) PORTARIA MMA Nº 148, 7 DE JUNHO DE 2022. Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção. Ministério do Meio Ambiente.
- Carillo P, Gibon Y (2011) Extraction and determination of proline. PrometheusWiki. <https://www.researchgate.net/publication/211353600>
- Carmo LP, Moura CW do N, Lima-Brito A (2021a) Effects of seaweed extracts on the *in vitro* multiplication of plants. In: Gupta S, Staden J van (Eds.) Biostimulants for Crops from Seed Germination to Plant Development, 1st. Elsevier, pp 211–230. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823048-0.00016-2>
- Carmo LP, Moura CW do N, Lima-Brito A (2021b) Effects of heat stress and seaweed-derived biostimulants on the germination of *Comanthera mucugensis*, an endemic plant of fire-prone *Campos rupestres* of Chapada Diamantina (Brazil). South African J Bot 141:49–53. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.04.017>
- Carmo LP, Moura CWN, Lima-Brito A (2020) Red macroalgae extracts affect *in vitro* growth and bud formation in *Comanthera mucugensis* (Giul.) L. R. Parra & Giul., an endemic dry flower species from the Chapada Diamantina (Brazil). South African J Bot 135:29–34. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.033>
- Cerqueira CO, Funch LS, Borba EL (2008) Fenologia de *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* e *S. curralensis* Moldenke (Eriocaulaceae), nos municípios de Mucugê e Morro do Chapéu, Chapada Diamantina, BA, Brasil. Acta Bot Brasilica 22:962–969. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062008000400007>
- de Castro KM, Batista DS, Silva TD, et al (2020) Water deficit modulates growth, morphology, and the essential oil profile in *Lippia alba* L. (Verbenaceae) grown *in vitro*. Plant Cell Tissue Organ Cult 141:55-65. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01766-w>
- Duque AS, López-Gómez M, Kráčmarová J, et al (2016) Genetic engineering of polyamine metabolism changes *Medicago truncatula* responses to water deficit. Plant Cell Tissue Organ Cult 127:681-690. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1107-1>
- Felipe SHS, Batista DS, Vital CE, et al (2019) Salinity-induced modifications on growth, physiology and 20-hydroxyecdysone levels in Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.)Pedersen]. Plant Physiol Biochem 140:43-54. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.05.002>
- Geng W, Li Z, Hassan MJ, Peng Y (2020) Chitosan regulates metabolic balance, polyamine accumulation, and Na⁺ transport contributing to salt tolerance in creeping bentgrass. BMC Plant Biol 20:1-15. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02720-w>
- Giulietti AM, Harley RM, QUEIROZ LP DE, et al (2005) Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. Megadiversidade 1:52–61. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001015>

- Gupta K, Dey A, Gupta B (2013) Plant polyamines in abiotic stress responses. *Acta Physiol Plant.* 35:2015-2036. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1239-4>
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST-Palaeontological statistics. *Palaeontol electron* 4:1-9.
- Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, et al (2012) Role of proline under changing environments. *Plant Signal Behav* 7:1456–1466. <https://doi.org/10.4161/psb.21949>
- Jacomassi LM, Viveiros J de O, Oliveira MP, et al (2022) A seaweed extract-based biostimulant mitigates drought stress in sugarcane. *Front Plant Sci* 13:1-15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.865291>
- Jancewicz AL, Gibbs NM, Masson PH (2016) Cadaverine's functional role in plant development and environmental response. *Front. Plant Sci* 7:1-8 <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00870>
- Lemonnier-Le Penhuizic C, Chatelet C, Kloareg B, Potin P (2001) Carrageenan oligosaccharides enhance stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica oleracea* var. *italica*. *Plant Sci* 160:1211–1220. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00372-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00372-7)
- Lerin J, Aragão VPM, Reis RS, et al (2019) Proteomic profile and polyamine contents are modulated by light source to promote *in vitro* shoot development in *Cariniana legalis* (Martius) O. Kuntze (Lecythidaceae). *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 137:329–342. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01574-x>
- Li Z, Zhang Y, Zhang X, et al (2017) Metabolic pathways regulated by chitosan contributing to drought resistance in white clover. *J Proteome Res* 16:3039-3052. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00334>
- Liang X, Zhang L, Natarajan SK, Becker DF (2013) Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants Redox Signal* 19:998-1011. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5074>
- Lima-Brito A, Albuquerque MMS, Alvim BFM, et al (2011a) Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. *Ciência Rural* 41:1354–1361. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011000800010>
- Lima-Brito A, Resende SV, Lima CO de C, et al (2011b) *In vitro* morphogenesis of *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. *Ciência e Agrotecnologia* 35:502–510. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000300010>
- Lima APPS, Bastos FDJO, Lima-Brito A, et al (2021a) Modulation of culture medium on the *ex situ* conservation of *Neoregelia mucugensis* Leme (Bromeliaceae). *Rev Caatinga* 34:763–771. <https://doi.org/10.1590/1983-21252021v34n403rc>
- Lima APPS, Brito AL, Santana JRF de (2021b) *In vitro* culture of sempre-vivas species (*Comanthera*): a review. *Rodriguésia* 72:1–9. <https://doi.org/10.1590/2175-7860202172016>
- Majumdar R, Barchi B, Turlapati SA, et al (2016) Glutamate, ornithine, arginine, proline, and polyamine

- metabolic interactions: The pathway is regulated at the post-transcriptional level. *Front Plant Sci* 7:1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00078>
- Menezes IS, do Couto-Santos APL, Funch LS (2018) The influence of El Niño and edge effects on the reproductive phenology and floral visitors of *Eschweilera tetrapetala* Mori (Lecythidaceae), an endemic species of the Atlantic forest of northeastern Brazil. *Acta Bot Brasilica* 32:1–11. <https://doi.org/10.1590/0102-33062017abb0083>
- Menezes IS, Souza D, Rocha B, Funch RR (2021) Identification of priority areas for *Eschweilera tetrapetala* (Lecythidaceae) conservation in response to climate change. *Rodriguésia* 72:1–15. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860202172073>
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nepomuceno CF, Fonseca PT, Silva T dos S, et al (2007) Efeito do potencial osmótico na germinação e crescimento *in vitro* de *Syngonanthus mucugensis* Giulietti visando à conservação *in vitro*. *Ornam Hortic* 13:1249–1253. <https://doi.org/10.14295/oh.v13i0.1657>
- Oliveira RS, Abrahão A, Pereira C, et al (2016) Ecophysiology of *campos rupestres* plants. In: Fernandes G (Ed.) *Ecology and Conservation of Mountaintop Grasslands in Brazil*. Springer, pp 227–272. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-29808-511>
- Peremarti A, Bassie L, Christou P, Capell T (2009) Spermine facilitates recovery from drought but does not confer drought tolerance in transgenic rice plants expressing *Datura stramonium* S-adenosylmethionine decarboxylase. *Plant Mol Biol* 70:253–264. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9470-5>
- Pessanha L dos S, Aragão VPM, de Oliveira T dos R, et al (2022) Benzyladenine affects polyamine contents and proteomic profiles during *in vitro* shoot development and *ex vitro* rooting in *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. (Fabaceae). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 151:75–92. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02332-2>
- Radi H, Bouchiha F, El Maataoui S, et al (2023) Morphological and physio-biochemical responses of cactus pear (*Opuntia ficus indica* (L.) Mill.) organogenic cultures to salt and drought stresses induced *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 1:1–14. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02454-1>
- Rogić T, Horvatić A, Tkalec M, et al (2015) Proteomic analysis of *Mammillaria gracilis* Pfeiff. *in vitro*-grown cultures exposed to iso-osmotic NaCl and mannitol. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 122:127–146. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0756-9>
- Sánchez-Rodríguez E, Romero L, Ruiz JM (2016) Accumulation on free polyamines enhanced antioxidant response in fruit of grafting tomato plants under water stress. *J Plant Physiol* 190:72–78. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.10.010>

- Santa-Catarina C, Silveira V, Balbuena TS, et al (2006) IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*. *Plant Growth Regul* 49:237–247. <https://doi.org/10.1007/s10725-006-9129-z>
- Silveira V, Santa-Catarina C, Tun NN, et al (2006) Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Plant Sci* 171:91-98. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.02.015>
- Singh M, Khan MMA, Uddin M, et al (2017) Proliferating effect of radiolytically depolymerized carrageenan on physiological attributes, plant water relation parameters, essential oil production and active constituents of *Cymbopogon flexuosus* Steud. under drought stress. *PLoS One* 12:e0180129. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180129>
- Thye KL, Wan Abdullah WMAN, Balia Yusof ZN, et al (2022) λ -Carrageenan promotes plant growth in banana via enhancement of cellular metabolism, nutrient uptake, and cellular homeostasis. *Sci Rep* 12:1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21909-7>
- Wang S, Wan C, Wang Y, et al (2004) The characteristics of Na⁺, K⁺ and free proline distribution in several drought-resistant plants of the Alxa Desert, China. *J Arid Environ* 56:525-539. [https://doi.org/10.1016/S0140-1963\(03\)00063-6](https://doi.org/10.1016/S0140-1963(03)00063-6)

Table 1. Effect of water stress induced with 30 g L⁻¹ of polyethylene glycol (PEG) and of κ-carrageenan (KC) on survival, germination, growth parameters and direct organogenesis of *Comanthera mucugensis*.

Stress	Biostimulant	Germination (%)	Survival (%)	Part area length (cm)	Largest root length (cm)	Number of explants with shoots (%)	Number of shoots per explant
No stress	0 mg mL ⁻¹	95 ± 3.2 ^A	100 ± 0 ^A	1.3 ± 0.3 ^A	1.3 ± 0 ^B	31.25 ± 7.6 ^{cd}	2 ± 1 ^b
	0.1 mg mL ⁻¹ KC	96 ± 1.5 ^A	100 ± 0 ^A	1.5 ± 0.4 ^A	2.1 ± 0.5 ^A	47.36 ± 9.7 ^{bc}	2 ± 0.5 ^b
Stress	0 mg mL ⁻¹	81 ± 4.7 ^C	70 ± 3.8 ^C	0.7 ± 0.3 ^B	0.6 ± 0.4 ^D	58.82 ± 11 ^b	2 ± 0.5 ^b
	0.1 mg mL ⁻¹ KC	90 ± 1.2 ^B	100 ± 0 ^A	0.6 ± 0.2 ^B	1.7 ± 0.6 ^C	85.71 ± 11.6 ^a	3.5 ± 0.5 ^a

Data correspond to means ± SD.

Uppercase letters do not differ by the Tukey test and lowercase letters do not differ by the Mann-Whitney U test ($p \leq 0.05$).

Table 2. Effect of water stress induced with 30 g L⁻¹ of polyethylene glycol (PEG) and of κ-carrageenan (KC) on polyamines (PAs) content of *Comanthera mucugensis*. Put= Putrescine. Spd= Spermidine. Spm= Spermine. Cad= Cadaverine.

Stress	Biostimulant	Put	Spd	Spm	Cad	Total free PAs
No stress	0 mg mL ⁻¹	4.73 ± 0.62 ^C	14.5 ± 3 ^B	19.02 ± 1.28 ^A	5.69 ± 0.93 ^A	43.94 ± 1.84 ^C
	0.1 mg mL ⁻¹ KC	5.77 ± 0.04 ^C	17.51 ± 0.7 ^B	16.97 ± 2.58 ^A	3.74 ± 0.38 ^A	44 ± 2.23 ^C
Stress	0 mg mL ⁻¹	7.94 ± 0.07 ^B	29.64 ± 1.05 ^A	14.43 ± 2.63 ^A	4.83 ± 0.18 ^A	56.84 ± 2.58 ^B
	0.1 mg mL ⁻¹ KC	9.66 ± 0.14 ^A	33.76 ± 0.99 ^A	16.45 ± 4.36 ^A	4.85 ± 1.6 ^A	64.72 ± 4.67 ^A

Values expressed in μg g⁻¹ FM.

Data correspond to means ± SD.

Equal letters in the same column do not differ by Tukey's test ($p \leq 0.05$).

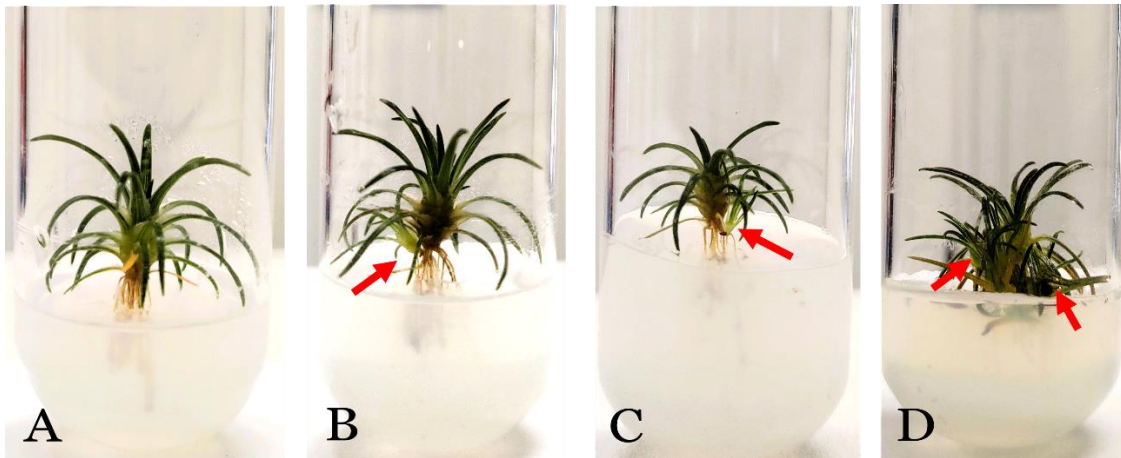


Fig. 1 General aspect of *Comanthera mucugensis* plants grown under water stress and biostimulant after 180 days. **A** Unstressed and not biostimulated; **B** Biostimulated with 0.1 mg mL^{-1} of κ -carrageenan (KC) ; **C** Stressed with 30 g L^{-1} of polyethylene glycol (PEG) and not biostimulated; **D** Stressed (30 g L^{-1} PEG) and biostimulated (0.1 mg mL^{-1} KC). Arrows indicate buds.

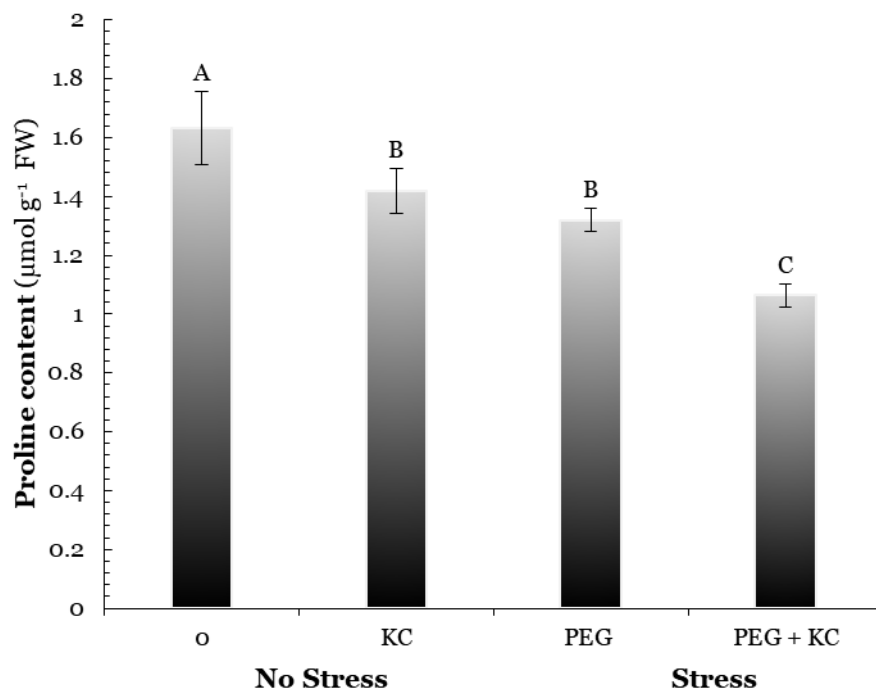
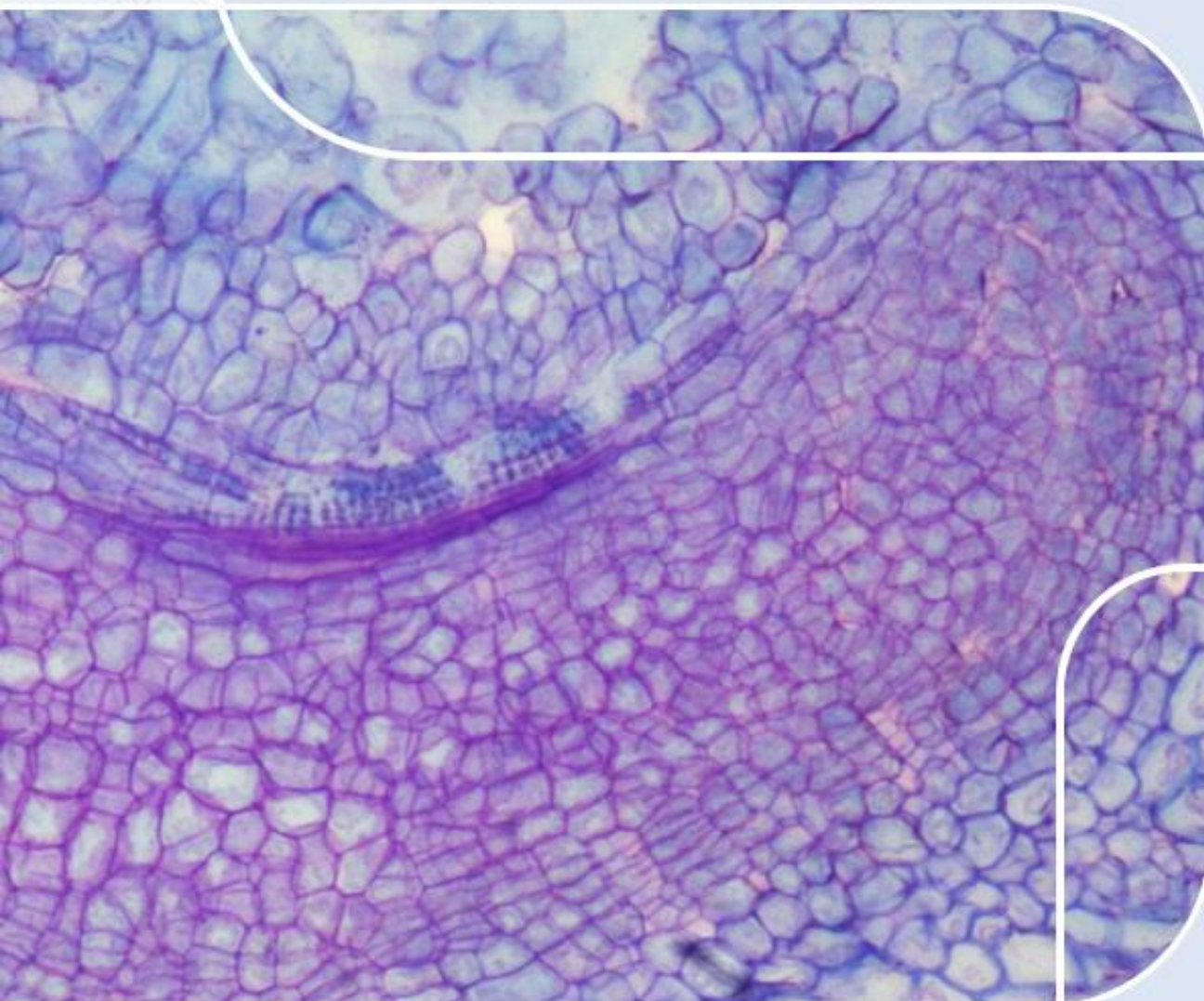


Fig. 2 Effect of water stress induced with 30 g L^{-1} of polyethylene glycol (PEG) and of biostimulation with 0.1 mg mL^{-1} of κ -carrageenan (KC) on proline content in *Comanthera mucugensis*. Data correspond to means \pm SD. Equal letters do not differ by Tukey's test ($p \leq 0.05$).

CAPÍTULO 3

Efeitos do picloram e de bioestimulantes derivados de macroalgas na formação de calos embriogênicos de *Comanthera mucugensis*, uma planta ornamental brasileira ameaçada de extinção



Efeitos do picloram e de bioestimulantes derivados de macroalgas na calogênese de *Comanthera mucugensis*, uma planta ornamental brasileira ameaçada de extinção

Este capítulo será submetido ao periódico Journal of Applied Phycology

Resumo

A cultura de tecidos é o principal método de propagação de *Comanthera mucugensis*, uma planta ornamental ameaçada de extinção. No entanto, os dados estão restritos à organogênese direta e as informações sobre a multiplicação via calogênese são limitadas. Portanto, este estudo avaliou o efeito do picloram (PIC) na formação de calos, utilizando microplantas de *C. mucugensis* como explante. Além disso, a suplementação do meio de cultura com o extrato aquoso (AE) e extrato polissacarídico (PE) obtidos de *Hypnea pseudomusciformis*, bem como a κ -carragenana comercial (KC) foi testado como método de otimização do protocolo de calogênese para a espécie. Os resultados demonstraram que o PIC foi capaz de induzir a formação de calos, sendo a concentração 4.14 μM a mais eficaz. A associação da auxina com 1 mg mL^{-1} de κ -carragenana (KC) aumentou a taxa de indução de calos, seguido do tratamento com 4.14 μM PIC + 1 mg mL^{-1} PE. A suplementação do meio com AE inibiu a calogênese. A κ -carragenana afetou o metabolismo das poliaminas (PA), aumentando a biossíntese de putrescina, espermidina e PAs totais livres e inibindo o acúmulo de espermina. Os calos obtidos nos meios com 4.14 μM PIC e 4.14 μM PIC + 1 mg mL^{-1} KC apresentaram proembriões formados a partir de células com características meristemáticas provenientes do interior do caule da microplanta. Esses resultados contribuem para o avanço do conhecimento sobre os efeitos dos bioestimulantes derivados de macroalgas na morfogênese *in vitro* de *C. mucugensis* e estabelecem um protocolo para indução de calos com potencial embriogênico para a espécie.

Palavras-chave: Eriocaulaceae, Chapada Diamantina, carragenana, extrato de macroalgas, poliaminas.

INTRODUÇÃO

Comanthera mucugensis (Giul.) L. R. Parra & Giul. (Eriocaulaceae) é uma espécie ornamental endêmica da Chapada Diamantina-BA e está ameaçada de extinção devido ao intenso extrativismo para o mercado florístico e destruição do habitat natural (Giulietti et al. 1988; Brasil 2022). Até o momento, não foi possível estabelecer o cultivo *ex situ* da espécie, sendo a propagação *in vitro* o principal método para produção de mudas (Lima et al. 2021).

A propagação *in vitro* ocorre a partir de duas rotas morfogenéticas: organogênese ou embriogênese somática, as quais podem ocorrer diretamente do explante ou indiretamente via calogênese (Sugiyama 2015). O calo é resultado da proliferação celular desorganizada e desdiferenciada, do qual originam-se brotos ou embriões somáticos (Fehér 2019).

A calogênese de *C. mucugensis* está restrita aos estudos baseados em meios com a citocinina 6-benzylaminopurine (BAP) combinada com a auxina 1-naphthaleneacetic acid (NAA), e a utilização de explantes como folha, caule, e microplanta cultivados em fotoperíodo alternado (Santos et al. 2008; Lima-Brito et al. 2011). As principais vantagens desse método são a alta taxa de produção de brotos a partir dos calos e a possibilidade de obtenção de novos genótipos resultantes da variação somaclonal (Bairu et al. 2011). No entanto, a baixa responsividade dos explantes para calogênese e a difícil regeneração dos brotos limitam esse tipo de propagação em *C. mucugensis*.

Há indícios que o picloram (ácido 4-amino-3,5,6, triclóro-picolínico) pode ser útil para induzir calos com potencial morfogenético em *C. mucugensis* (dados não publicados). Essa auxina também foi associada ao desenvolvimento de embriões somáticos em outras espécies de plantas (Polesi et al. 2022). Apesar disso, até o momento, não foram encontrados estudos publicados sobre embriogênese somática para as espécies do gênero *Comanthera*.

Diversos estudos sugeriram a suplementação do meio de cultura com bioestimulantes derivados de macroalgas pois são uma fonte alternativa de fitocompostos, como nutrientes, fitormônios, aminoácidos, vitaminas e metabólitos secundários, benéficos a plantas e, portanto, considerados importantes aliados na propagação via direta e indireta (Carmo et al. 2021a). Por exemplo, em *Brassica oleracea* var. *italica* Plenck, as oligo-carragenanas foram capazes de melhorar a embriogênese somática (Lemonnier-Le Penhuizic et al. 2001). Além disso, os extratos aquosos das algas carragenófitas *Agardhiella subulata* (C. Agardh) Kraft & M.J. Wynne e *Hypnea pseudomusciformis* Nauer, Cassano & M.C. Oliveira estimularam a organogênese direta em *C. mucugensis* (Carmo et al. 2020), embora seus efeitos não tenham sido investigados na calogênese.

A modulação da morfogênese *in vitro* é um processo complexo que envolve a interação de vários fatores bioquímicos e moleculares, incluindo o metabolismo das poliaminas (PA) (Santa-Catarina et al. 2007). Nas plantas, as aminas mais comuns são a putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm). Essas possuem uma via biossintética comum a partir da descarboxilação de ornitina ou arginina para formação de Put, que é aminopropilado para produção de Spd e Spm (Kusano et al. 2008). A amina cadaverina (Cad) pode ser encontrada em algumas espécies e se origina da descarboxilação da lisina pela ação da lisina descarboxilase (Tomar et al. 2013). As mudanças no perfil de poliaminas endógenas, especialmente no conteúdo de Spm, podem ser importantes para a aquisição de competência embriogênica e maturação somática do embrião em calos embriogênicos (Reis et al. 2016)

A análise histológica também é um passo importante nos estudos morfogênicos *in vitro* pois fornece informações sobre a ontogênese e os processos de diferenciação celular. O desenvolvimento do embrião somático pode ser iniciado tanto a partir de células somáticas diferenciadas quanto de células-tronco semelhantes a periciclos, e pode seguir a via direta ou indireta (Yumbla-Orbes et al. 2017). O processo pode ter origem unicelular pela indução de células totipotentes únicas (semelhantes ao zigoto) ou multicelular pela organização de células pluripotentes (Fehér 2019).

Devido às limitações da propagação indireta de *C. mucugensis*, este estudo avaliou a eficácia do picloram na indução de calos com potencial embriogênico e a aplicação de bioestimulantes derivados de macroalgas como método de otimização do protocolo de calogênese para a espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

As plantas-matrizes de *C. mucugensis* foram obtidas da Coleção de Plantas Ornamentais da Chapada Diamantina, mantida no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) da Universidade Estadual de Feira de Santana (SisGen A11E268).

Dessa forma, as microplantas de *C. mucugensis*, com aproximadamente 1-2 cm de comprimento, previamente obtidas por organogênese direta em meio livre de reguladores de crescimento, foram usadas como explantes para indução de calos neste estudo.

Preparação dos bioestimulantes derivados de macroalgas

Os extratos testados foram derivados da macroalga vermelha *Hypnea*

pseudomusciformis, uma espécie produtora de carragenana. Essa foi coletada na Praia da Penha - Ilha de Itaparica, Estado da Bahia, Brasil, em outubro de 2019, e lavada em água corrente para remover partículas de areia, epífitas e excesso de sal. Em seguida, a amostra foi seca por 7 dias a 40 °C e pulverizada em um moinho do tipo Willye (Tecnal[®]) (Carmo et al. 2020). O material pulverizado foi armazenado em sacos hermeticamente fechados em um local seco.

Os extratos aquosos (AE) e os extratos de polissacarídeos (PE) foram preparados de acordo com Carmo et al. (2021b). O AE foi obtido a partir da imersão de 50 gramas de pó de alga em 500 mL de água destilada estéril a uma temperatura de 50 °C durante 1 hora. O extrato resultante foi submetido a uma filtração através de quatro camadas de tecido de musselina, seguida pela desidratação da fase líquida a 40 °C em estufa até alcançar um peso constante.

Os procedimentos iniciais de preparação de PE e AE foram idênticos. Após a extração em água quente e a filtração do extrato aquoso, os polissacarídeos foram precipitados com três volumes de etanol puro, mantendo-se por 48 horas a -4 °C. Os componentes precipitados foram recuperados por meio de filtração através de quatro camadas de tecido de musselina, e o material retido no tecido foi desidratado a 40 °C em estufa até atingir um massa constante.

A κ -carragenana (KC) foi obtida da Sigma-Aldrich[®] (cod. 22048). Os bioestimulantes AE, PE e KC foram armazenados a 4 °C até o uso.

Efeito do picloram na indução de calos

Para a indução de calos, as microplantas de *C. mucugensis* (~ 1-2 cm) foram inoculadas em meio Murashige e Skoog (Murashige e Skoog 1962) com metade da concentração salina (MS^{1/2}) e diferentes concentrações (0; 2; 4.14; 8.28; 16.56 e 33.12 μ M) de ácido 4-amino-3,5,6, triclóro-picolínico (picloram). Após a transferência para o meio de cultura, os explantes foram mantidos no escuro na temperatura de 25 \pm 3 °C. Após 90 dias, a taxa de explantes responsivos para calo foi registrada.

Efeito de bioestimulantes derivados de macroalgas na indução de calos

As microplantas de *C. mucugensis* (~ 1-2 cm) foram cultivadas em meio MS^{1/2} na ausência ou com 4.14 μ M de picloram, ambas combinadas com os bioestimulantes AE, PE, KC nas concentrações de 0.1 ou 1 mg mL⁻¹. Os meios isentos de bioestimulantes, com e sem

4.14 μM de picloram, foram considerados como controles. As culturas foram mantidas no escuro na temperatura de 25 ± 3 °C. Após 90 dias, a taxa de explantes responsivos e a massa seca do calo foram registrados.

Condições gerais de cultivo

As culturas *in vitro* foram realizadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm), fechados com filme policloreto de vinil (PVC). Em todos os meios foram adicionados 15 g L⁻¹ de sacarose (Lima-Brito et al. 2011) e gelificados com 2.5 g L⁻¹ Phytigel[®] (Sigma-Aldrich). Em seguida, o pH foi ajustado entre 5.6 e 5.8 e autoclavado por 15 minutos a 121 °C e 1.0 atm de pressão.

Análise de poliaminas

Foram analisados os calos obtidos em meio com 4.14 μM PIC e 4.14 μM PIC + 1 mg mL⁻¹ KC, ambos com 90 dias de idade. A determinação das poliaminas (PAs) foi realizada de acordo com Santa-Catarina et al. (2006). Foram utilizadas amostras com aproximadamente 300 mg de massa fresca (FM) de calos com 180 dias de idade. Essas foram trituradas em 1.6 mL de ácido perclórico a 5% (v/v) e, após 1 hora, foram centrifugadas por 20 minutos a 20,000 $\times g$ a 4°C. As PAs livres foram determinadas diretamente do sobrenadante. As PAs conjugadas foram extraídas por hidrólise a partir de 200 μL do sobrenadante com 200 μL de HCl 12 N por 18 h, a 110°C. As amostras foram secas sob nitrogênio e, em seguida, solubilizadas em 200 μL de ácido perclórico a 5%. As PAs livres e conjugadas foram derivatizadas com cloreto de dansila e identificadas por HPLC, usando uma coluna de fase reversa de 5 μm (Shimadzu Shin-pack CLC ODS). O gradiente foi desenvolvido pela mistura de proporções crescentes de acetonitrila absoluta a 10% de acetonitrila em água (pH 3.5). O gradiente de acetonitrila absoluta foi programado para 65% nos primeiros 10 minutos, de 65 a 100% entre 10 e 13 minutos, e 100% entre 13 e 21 minutos, com fluxo de 1 mL min⁻¹ a 40 °C. A concentração de PA foi determinada usando um detector de fluorescência a 340 nm (excitação) e 510 nm (emissão). As áreas de pico e os tempos de retenção foram medidos por comparação com PAs padrões: Putrescina (Put), Espermidina (Spd), Espermina (Spm) e Cadaverina (Cad), e os valores expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ FM.

Desenho experimental e análises estatísticas

O experimento com picloram consistiu em seis tratamentos (concentrações do regulador) compostos por seis repetições e cinco explantes por tratamento. Para analisar o

efeito dos bioestimulantes, foram conduzidos experimentos com e sem picloram, os quais foram constituídos de sete tratamentos distintos: o controle (sem suplementação) e os bioestimulantes AE-HP, PE-HP, KC, cada um em duas concentrações distintas. Cada tratamento foi repetido seis vezes, com cinco explantes em cada repetição. A análise de poliaminas foi realizada em triplicata. O delineamento experimental para todos os experimentos foi inteiramente casualizado. Todos os resultados foram examinados quanto à normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk, seguido pela análise de variância (ANOVA) com o teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas considerando um nível de significância de 5%, usando o software PAST (Hammer et al. 2001).

Análise morfohistológica

A caracterização morfológica dos calos foi realizada com auxílio do estereomicroscópio Leica® EZ4. Para análise histológica, foram utilizados calos obtidos dos tratamentos com 4.14 μM PIC e 4.14 μM PIC + 1 mg mL^{-1} KC nos períodos de 30, 60 e 90 dias de cultivo *in vitro*, além daqueles oriundos do meio isento de regulador e acrescido de 1 mg mL^{-1} KC com 90 dias de idade. A amostra fresca foi submetida à desidratação em série ascendente de álcool (30, 50, 70, 90 e 100%) por 2h em cada concentração. Após a desidratação, o material foi infiltrado em solução de historesina-etanol (1: 1) por 12 horas, seguida de inclusão em historesina pura (Leica Microsystems®) por 24h. As amostras foram emblocadas em resina, seccionadas longitudinalmente em micrótomo rotativo (Leica® RM2125 RTS), com 6-8 μm , e coradas com Azul de Toluidina (1,0%) (O'Brien et al. 1964). Os cortes histológicos foram montados em lâminas e observados com água em microscópio ótico Olympus BX45 (Olympus®, Tokyo, Japan) equipado com uma câmera digital Q-Imaging MicroPublisher 5.0 RTV (Q-Imaging®, Surrey, Canada).

RESULTADOS

Efeito do picloram na indução de calos

Os resultados demonstraram efeito significativo do picloram para calogênese de *C. mucugensis*, uma vez que, não houve formação de calos na ausência do regulador e uma resposta incipiente foi observada na presença de 2 μM (Fig 1). As concentrações 4.14 e 8.28 μM apresentaram as maiores taxas de explantes responsivos. O aumento da concentração de picloram no meio inibiu a calogênese. Não foi observada oxidação dos explantes durante os 90 dias de cultivo *in vitro*.

Efeito de bioestimulantes derivados de macroalgas na indução de calos

Nos tratamentos isentos de picloram, a formação de calos apenas foi observada no meio de cultura suplementado com 1 mg mL^{-1} de κ -carragenana (Tabela. 1). Na presença de $4.14 \text{ }\mu\text{M}$ do regulador, a suplementação do meio com 1 mg mL^{-1} KC estimulou a calogênese e apresentou a maior taxa de explantes responsivos, seguido do tratamento com 1 mg mL^{-1} do extrato polissacarídico de *H. pseudomusciformis*, quando comparado com a média obtida no tratamento apenas com picloram (Tabela 1).

A suplementação com 1 mg mL^{-1} do extrato aquoso *H. pseudomusciformis* inibiu a formação de calo, mesmo na presença do picloram (Tabela 1). A inibição foi atenuada com a redução da concentração para 0.1 mg mL^{-1} , embora ainda tenha apresentado a menor taxa de explantes responsivos. Os meios com $4.14 \text{ }\mu\text{M}$ PIC acrescidos com 0.1 mg mL^{-1} de PE-HP ou de KC não aprimoraram a calogênese em comparação com tratamento utilizando apenas regulador.

Além disso, os calos obtidos nos meios com $4.14 \text{ }\mu\text{M}$ PIC e $4.14 \text{ }\mu\text{M}$ PIC + 1 mg mL^{-1} KC apresentaram os maiores valores de massa seca (Tabela 2). Os tratamentos com o extrato aquoso e o polissacarídico de *H. pseudomusciformis*, ambos combinados com picloram, bem como, com 1 mg mL^{-1} KC isento do regulador, apresentaram redução na variável analisada.

Análise de poliaminas

O conteúdo de poliaminas foi afetado pela presença da κ -carragenana (Fig. 2). Foi observado que os calos com 90 dias de idade obtidos em meio com $4.14 \text{ }\mu\text{M}$ PIC + 1 mg mL^{-1} KC apresentaram os maiores níveis de Put e Spd, em comparação ao tratamento apenas com picloram. O maior acúmulo de Spm foi encontrado no meio com $4.14 \text{ }\mu\text{M}$ PIC sem o polissacarídico. O teor de Cad não diferiu entre os tratamentos. Além disso, a suplementação com o bioestimulante resultou no maior acúmulo de PAs totais e da razão Put/(Spd+Spm) devido à maior biossíntese de Put e inibição da Spm.

Dentre as poliaminas, o tratamento apenas com o picloram resultou em um maior acúmulo de Spm ($33.63 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$), seguido de Spd ($21.95 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$), Put ($12.7 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$) e Cad ($6.02 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$). A suplementação do meio com κ -carragenana estimulou a síntese de Spd ($31.33 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$), manteve a proporção entre Put ($21.67 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$) e Spm ($21.66 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$) e um menor teor de Cad ($5.43 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$).

Análise morfohistológica

As características morfológicas dos calos formados em meios acrescidos de picloram são semelhantes as obtidas nos tratamentos suplementados com os bioestimulantes. A formação dos calos iniciou-se na região basal do caule, expandindo-se em torno do eixo central do explante (Fig. 3A-C). Inicialmente, apresentaram textura friável e uma coloração esbranquiçada translúcida, constituído por estruturas globulares que se desprendiam facilmente do explante. Ao final de 90 dias de cultivo, foram observadas algumas regiões amareladas nos calos (Fig 4C). Não foi registrada oxidação dos explantes durante os experimentos.

As observações histológicas realizadas após 30 dias de cultivo mostraram que o desenvolvimento caloso, nos tratamentos com 4.14 μM PIC e 4.14 μM PIC + 1 mg mL^{-1} KC, é composto por células não meristemáticas, grandes, vacuoladas e desorganizadas e por áreas de proliferação formadas a partir de intensas divisões celulares na região interna do caule do explante, próxima a região dos feixes vasculares e gemas axilares (Fig. 4A). A zona de proliferação era composta por células com características meristemáticas, incluindo tamanho pequeno, forma isodiamétrica, núcleos grandes e nucléolos (Fig. 4B-C).

Nos calos com 60 dias de idade, as células meristemáticas foram encontradas, principalmente, na superfície dos calos, apresentando dois padrões de organização celular: 1- células frouxamente conectadas e dispersas (Fig. 5A); e 2- células fortemente conectadas com intensa divisão, formando clusters embriogênicos (Fig. 5B). Além disso, observou-se células não meristemáticas com espaços intercelulares e sistema celular desorganizado. A sequência de eventos histológicos nesse mesmo período demonstrou a evolução da organização celular (Fig. 5C-D) e a formação de estruturas globulares delimitadas por células seriadas semelhante ao proembrião, sendo comum nos tratamentos com 4.14 μM PIC e 4.14 μM PIC + 1 mg mL^{-1} KC (Fig. 5E).

Os cortes obtidos de calos com 90 dias de idade induzidos pelos tratamentos com 4.14 μM PIC e 4.14 μM PIC + 1 mg mL^{-1} KC evidenciaram o alongamento dos proembriões (Fig. 6A). Além disso, verificou-se a histodiferenciação inicial de elementos de vasos nos proembriões, típico de protoxilema, com deposição helicoidal de polissacarídeo na parede celular (Fig. 6B-D). Os calos formados a partir do tratamento com 1 mg mL^{-1} KC e isento de regulador, com 90 dias de idade, não apresentaram células meristemáticas.

DISCUSSÃO

Diversos estudos atestaram a eficiência do picloram para indução de calos organogênicos e embriogênicos em muitas espécies de plantas (Hagen et al. 1990; Polesi et al. 2022; de Mello et al. 2023). Quando comparado com outras auxinas, essa possui desempenho igual ou superior na indução de calogênese, e tende a ser mais eficaz em baixas quantidades em plantas herbáceas (Colins et al. 1978; Vinoth et al. 2014a). Por exemplo, na cultura de *Lilium martago* Linnaeus, foram testadas as concentrações entre 0.5–25 μM PIC e o tratamento com 5 μM foi o mais efetivo na formação de calos embriogênicos (Magdalena and Bach 2005). No presente estudo, a presença de 4.14 μM PIC foi o mais indicado, uma vez que, com o uso acima de 8.28 μM houve inibição da calogênese e oxidação dos explantes. Além disso, a utilização da microplanta de *C. mucugensis* como explante foi vantajosa, pois não foi necessário seccionar o tecido vegetal, o que ocasionaria injúria e a produção de fenóis, resultando, possivelmente, em maior oxidação e inviabilidade dos calos.

O picloram foi relacionado à sinalização de fitohormônios, como auxina e ácido abscísico (ABA), e como componente gerador de estresse, sendo esses importantes fatores relacionados à aquisição da competência embriogênica (Chen et al. 2019). Em *Lycopersicon esculentum* Mill., a combinação desse regulador com os extratos das macroalgas *Caulerpa scalpelliformis* (R. Brown ex Turner) C. Agardh e *Gracilaria corticata* (J. Agardh) J. Agardh melhorou a indução e o desenvolvimento dos embriões somáticos (Vinoth et al. 2014a). Além disso, foi sugerido que a presença comprovada de ácido indol-3-butírico (AIB) nesses compostos algáceos influenciou, positivamente, a embriogênese somática.

Foi comprovado que os extratos de macroalgas são compostos por substâncias de crescimento que possuem atividade semelhante a auxina e a citocinina, e que também são capazes de aumentar os níveis endógenos de ABA nas plantas (Stirk and Van Staden 1996; Yokoya et al. 2010; Wally et al. 2013). Já os polissacarídeos derivados, como oligo-carragenanas, podem atenuar o estresse abiótico, principalmente, através da regulação de enzimas antioxidantes (Singh et al. 2017; Thye et al. 2022), além de induzir a síntese de ácido indol-3-acético (IAA) e da giberelina GA_3 (Saucedo et al. 2015). É plausível que bioestimulantes derivados de macroalgas podem contribuir, significativamente, para melhoria das etapas da embriogênese somática, porém não há evidências de que são unicamente capazes de induzir a competência embriogênica nas células vegetais, sendo necessário a combinação com reguladores de crescimento.

No presente estudo, a suplementação do meio com polissacarídeos de macroalgas e picloram aprimorou a calogênese em *C. mucugensis*, enquanto, com o extrato aquoso a inibiu. Anteriormente, a carragenana obtida do extrato polissacarídico de *H. pseudomusciformis* e a isolada comercialmente mitigaram o estresse térmico e melhoraram a germinação de *C. mucugensis* (Carmo et al. 2021b).

Os fitocompostos presentes nos extratos de macroalgas podem interagir com as células vegetais em diferentes rotas metabólicas e a variabilidade dos seus efeitos estimulantes também estão associados com a concentração e o tipo de cultivo (Bulgari et al. 2019; Carmo et al. 2021a). Dessa forma, o extrato aquoso e polissacarídico, ainda que obtidos da mesma macroalga, podem promover efeitos diferenciados pois o processo de extração restringe e altera as concentrações de determinados compostos. Além disso, alguns estudos sugerem que a despolimerização das moléculas é importante para torná-las bioativas (Saucedo et al. 2015; Singh et al. 2017). No entanto, foi reportado que a utilização da λ -carragenana não despolimerizada aumentou o crescimento de bananeiras cultivadas em casa de vegetação (Thye et al. 2022). Os resultados dos experimentos realizados com *C. mucugensis* indicam que os compostos algáceos não despolimerizados são eficientes para promover a melhoria do cultivo *in vitro* (Carmo et al. 2020, 2021b), embora tais efeitos possam ser aprimorados com a degradação dos polímeros em estudos futuros.

Na cultura de tecido vegetais, uma das principais vantagens sugeridas ao uso de bioestimulantes derivados de macroalgas é a possibilidade de otimizar os efeitos dos reguladores de crescimento e em parte, suprimi-los total ou parcialmente, com consequente diminuição dos custos da cultura (Carmo et al. 2021a). Na embriogênese somática de *Gloriosa superba* Linnaeus, a combinação dos hormônios sintéticos com 20% do extrato de *Ulva lactuca* Linnaeus aumentou a taxa de indução de calos embriogênicos em 32%, duplicou o número de embriões maduros e elevou em 31,5% a taxa de embriões germinados (Mahendran et al. 2018). No presente estudo, a taxa de explantes responsivos para calos foi aprimorada em meios suplementados com carragenana e extrato polissacarídico de *H. pseudomusciformis*, ambos na concentração de 1 mg mL^{-1} e na presença de $4.14 \mu\text{M PIC}$.

Os bioestimulantes derivados de macroalgas podem afetar a síntese hormonal nas plantas e ter um papel importante na sinalização de moléculas envolvidas na embriogênese somática (Wally et al. 2013; Vinoth et al. 2014b), como as poliaminas que são consideradas marcadores da morfogênese *in vitro* (Santa-Catarina et al. 2007). A amina putrescina foi

associada ao estímulo da divisão celular, especialmente, atuando como um sinalizador para promover a transição da fase G1 para a fase S durante a replicação do DNA (Vuosku et al. 2012; Weiger and Hermann 2014). Por outro lado, a espermidina e a espermina parecem estar mais envolvidas na maturação celular. Elas são geralmente encontradas em maiores quantidades em células mais maduras ou diferenciadas, em comparação com células em estado proliferativo ativo (Vuosku et al. 2012; Weiger and Hermann 2014). O papel da cadeverina na morfogênese *in vitro* ainda é discutido na literatura, porém, os dados apontam que essa possui função semelhante a putrescina e também estaria envolvida na diferenciação durante o crescimento da planta (Tomar et al. 2013).

Anteriormente, foi reportado que a λ -carragenana estimulou a expressão do gene adenosylmethionine synthase (SAM-S), responsável pela síntese de um dos precursores das aminas alifáticas, o S-adenosylmethionine (Thye et al. 2022). No presente estudo, verificou-se que a presença da κ -carragenana foi responsável pelo aumento dos níveis de Put, Spd, PAs totais livres e a razão Put/(Spd+Spm), e, redução do teor de Spm nos calos com 90 dias de idade, promovendo, assim a divisão celular, e conseqüentemente, uma maior resposta de indução para calos. Além disso, a maior concentração de Spd em relação a Put observada pode indicar a diminuição do crescimento proliferativo e preparação para diferenciação celular. Outro estudo reportou que as oligo-carragenanas atuam como moléculas sinalizadoras e aumentam a indução da embriogênese de micrósporos em *Brassica oleracea* var. *italica*, porém, não possuem efeito na maturação dos embriões (Lemonnier-Le Penhuizic et al. 2001). Portanto, é possível que o cultivo dos calos em meio suplementado com o polissacarídeo dificulte a evolução morfogenética dos embriões, porém, pode ser útil para induzir a proliferação celular e manter a competência embriogênica das células.

O desenvolvimento do embrião somático pode ser iniciado a partir de células-tronco semelhantes a periciclo que retêm a capacidade de divisão celular durante a formação da raiz, como relatada para *Eustoma grandiflorum* (Yumbra-Orbes et al. 2017), e pode progredir por via direta ou indireta (Fehér 2019). Durante a embriogênese somática indireta, ocorre a reorganização das células com características meristemáticas na superfície do calo devido à atividade de proteínas transportadoras da família PIN que acumulam auxinas em células periféricas (Fehér 2019). Os resultados histológicos do presente estudo demonstraram que as células com características meristemáticas foram formadas no interior do caule da microplanta (Fig. 4A), seguido do agrupamento destas células, e desenvolvimento de massas

proembriogênicas (Fig. 5). Nesse contexto, a origem dos proembriões foi interpretada como multicelular.

No entanto, para promover uma melhor compreensão da fidelidade e da qualidade da evolução da embriogênese somática em *C. mucugensis*, é necessário realizar a sua comparação com perfil histológico dos embriões zigóticos, além de completar o processo de maturação e germinação dos embriões somáticos. A ausência de informações na literatura sobre a embriologia para o gênero *Comanthera* limitou as interpretações sobre o desenvolvimento embrionário no presente estudo. Apesar disso, as poucas informações sobre a embriogênese zigótica para outras espécies da família Eriocaulaceae reportam que a multiplicação celular embrionária é do tipo asteroide e os embriões são indiferenciados, campanulados e não apresentam suspensor (Scatena and Bouman 2001; Coan et al. 2012).

CONCLUSÃO

Os resultados presentes contribuem para o avanço dos estudos sobre a calogênese em *C. mucugensis* e estabelecem o protocolo para indução de calos com potencial embriogênico. A utilização de 4.14 μM de picloram em associação com 1 mg mL⁻¹ de κ -carragenana é indicado como o melhor tratamento para indução de calos. O polissacarídeo afeta o metabolismo das poliaminas, aumentando a biossíntese de Put, Spd e PAs totais livres e inibindo o acúmulo de Spm. Os calos são formados por células com características meristemáticas originadas no interior do caule da microplanta, que organizam-se formando proembriões localizados na superfície da massa calosa. Novos estudos são necessários para uma melhor compreensão da embriogênese somática em *C. mucugensis* e para obtenção do protocolo de regeneração dos brotos via indireta.

REFERÊNCIAS

- Bairu MW, Aremu AO, Van Staden J (2011) Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul* 63:147–173. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9554-x>
- Brasil (2022) PORTARIA MMA Nº 148, DE 7 DE JUNHO DE 2022. Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção. Ministério do Meio Ambiente.
- Bulgari R, Franzoni G, Ferrante A (2019) Biostimulants application in horticultural crops under abiotic stress conditions. *Agronomy* 9:1–30. <https://doi.org/10.3390/agronomy9060306>
- Carmo LP, Moura CW do N, Lima-Brito A (2021a) Effects of seaweed extracts on the *in vitro* multiplication of plants. In: Gupta S, Staden J van (Eds.) *Biostimulants for Crops from Seed Germination to Plant*

- Development, 1st. Elsevier, pp 211–230. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823048-0.00016-2>
- Carmo LP, Moura CW do N, Lima-Brito A (2021b) Effects of heat stress and seaweed-derived biostimulants on the germination of *Comanthera mucugensis*, an endemic plant of fire-prone *Campos rupestres* of Chapada Diamantina (Brazil). *South African J Bot* 141:49–53. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.04.017>
- Carmo LP, Moura CWN, Lima-Brito A (2020) Red macroalgae extracts affect *in vitro* growth and bud formation in *Comanthera mucugensis* (Giul.) L. R. Parra & Giul., an endemic dry flower species from the Chapada Diamantina (Brazil). *South African J Bot* 135:29–34. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.033>
- Chen M, Zhang J, Zhou Y, et al (2019) Transcriptome analysis of *Lilium Oriental* × *Trumpet* hybrid roots reveals auxin-related genes and stress-related genes involved in picloram-induced somatic embryogenesis induction. *J Horticult Sci Biotechnol* 94:317–330. <https://doi.org/10.1080/14620316.2018.1500086>
- Coan AI, Stützel T, Scatena VL (2012) Comparative embryology and taxonomic considerations in Eriocaulaceae (Poales). *Feddes Repert* 121:268–284. <https://doi.org/10.1002/fedr.201000016>
- Colins GB, Vian WE, Phillips GC (1978) Use of 4-Amino-3,5,6-trichloropicolinic acid as an auxin source in plant tissue cultures. *Crop Sci* 18:286–288. <https://doi.org/10.2135/cropsci1978.0011183x001800020023x>
- de Mello T, Correia LNF, Hegedus CEN, et al (2023) Cell reprogramming via direct somatic embryogenesis in an Atlantic Forest species vulnerable to extinction: *Euterpe edulis* stem segments induced with picloram. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 154:131–140. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02521-7>
- Fehér A (2019) Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? *Front Plant Sci* 10:1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
- Giulietti N, Giulietti AM, Rubens J (1988) Estudos em sempre-vivas: importância econômica do extrativismo em Minas Gerais, Brasil. *Acta Bot Brasilica* 1:179–193. <https://doi.org/10.1590/S0102-33061987000300018>
- Hagen SR, LeTourneau D, Muneta P, Brown J (1990) Initiation and culture of potato tuber callus tissue with picloram. *Plant Growth Regul* 9:341–345. <https://doi.org/10.1007/BF00024919>
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST-Palaeontological statistics. *Palaeontol electron* 4:1-9
- Magdalena K, Bach A (2005) Morphogenesis of *Lilium martagon* L. explants in callus culture. *Acta Biol Cracov Ser Bot* 47:65–73. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.10.005>
- Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y (2008) Polyamines: Essential factors for growth and survival. *Planta* 228:367–381. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0772-7>
- Lemonnier-Le Penhuizic C, Chatelet C, Kloareg B, Potin P (2001) Carrageenan oligosaccharides enhance stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica oleracea* var. italica. *Plant Sci* 160:1211–1220.

[https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00372-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00372-7)

- Lima-Brito A, Resende SV, Lima CO de C, et al (2011b) *In vitro* morphogenesis of *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. *Ciência e Agrotecnologia* 35:502–510. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000300010>
- Lima APPS, Brito AL, Santana JRF de (2021b) *In vitro* culture of sempre-vivas species (*Comanthera*): a review. *Rodriguésia* 72:1–9. <https://doi.org/10.1590/2175-7860202172016>
- Mahendran D, Kishor PBK, Geetha N, Venkatachalam P (2018) Phycomolecule-coated silver nanoparticles and seaweed extracts induced high-frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from *Gloriosa superba* L. *J Appl Phycol* 30:1425–1436. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1293-1>
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59:368–373. <https://doi.org/10.1007/BF01248568>
- Polesi LG, Fraga HP de F, Goeten D, et al (2022) Morphohistological and biochemical features of the *Guadua chacoensis* (Bambusoideae; Poaceae) somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 148:479–499. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11240-021-02199-9>
- Reis RS, Vale E de M, Heringer AS, et al (2016) Putrescine induces somatic embryo development and proteomic changes in embryogenic callus of sugarcane. *J Proteomics* 130:170–179. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.09.029>
- Santa-Catarina C, Silveira V, Scherer GFE, Floh EIS (2007) Polyamine and nitric oxide levels relate with morphogenetic evolution in somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 90:93–101. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9259-7>
- Santos JDP, Dornelles ALC, Pereira FD, Oliveira LM (2008) Indução de calos em sempre-viva (*Syngonanthus mucugensis* Giulietti), utilizando diferentes tipos de explantes e concentrações de BAP. *Acta Sci - Biol Sci* 30:127–131. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v30i2.3624>
- Saucedo S, Contreras RA, Moenne A (2015) Oligo-carrageenan kappa increases C, N and S assimilation, auxin and gibberellin contents, and growth in *Pinus radiata* trees. *J For Res* 26:635–640. <https://doi.org/10.1007/s11676-015-0061-9>
- Scatena VL, Bouman F (2001) Embryology and seed development of *Paepalanthus* sect. *Actinocephalus* (Koern.) Ruhland (Eriocaulaceae). *Plant Biol* 3:341–350. <https://doi.org/10.1055/s-2001-16467>
- Singh M, Khan MMA, Uddin M, et al (2017) Proliferating effect of radiolytically depolymerized carrageenan on physiological attributes, plant water relation parameters, essential oil production and active constituents of

- Cymbopogon flexuosus* Steud. under drought stress. PLoS One 12:1-20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180129>
- Stirk WA, Van Staden J (1996) Comparison of cytokinin- and auxin-like activity in some commercially used seaweed extracts. J Appl Phycol 8:503-508. <https://doi.org/10.1007/BF02186328>
- Sugiyama, M. (2015). Historical review of research on plant cell dedifferentiation. J. Plant Res 128:349–359. <https://doi:10.1007/s10265-015-0706-y>
- Thye KL, Wan Abdullah WMAN, Balia Yusof ZN, et al (2022) λ -Carrageenan promotes plant growth in banana via enhancement of cellular metabolism, nutrient uptake, and cellular homeostasis. Sci Rep 12:1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21909-7>
- Tomar PC, Lakra N, Mishra SN (2013) Cadaverine: A lysine catabolite involved in plant growth and development. Plant Signal Behav 8:1–15. <https://doi.org/10.4161/psb.25850>
- Vinoth S, Gurusaravanan P, Jayabalan N (2014a) Optimization of somatic embryogenesis protocol in *Lycopersicon esculentum* L. using plant growth regulators and seaweed extracts. J Appl Phycol 26:1527–1537. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0151-z>
- Vinoth S, Gurusaravanan P, Jayabalan N (2014b) Optimization of somatic embryogenesis protocol in *Lycopersicon esculentum* L. using plant growth regulators and seaweed extracts. J Appl Phycol 26:1527–1537. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0151-z>
- Vuosku J, Suorsa M, Ruottinen M, et al (2012) Polyamine metabolism during exponential growth transition in Scots pine embryogenic cell culture. Tree Physiol 32:1274-1287. <https://doi.org/10.1093/treephys/tps088>
- Wally OSD, Critchley AT, Hiltz D, et al (2013) Regulation of phytohormone biosynthesis and accumulation in *Arabidopsis* following treatment with commercial extract from the marine macroalga *Ascophyllum nodosum*. J Plant Growth Regul 32:324–339. <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9301-9>
- Weiger TM, Hermann A (2014) Cell proliferation, potassium channels, polyamines and their interactions: A mini review. Amino Acids 46:681-688. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1536-7>
- Yokoya NS, Stirk WA, Van Staden J, et al (2010) Endogenous cytokinins, auxins, and abscisic acid in red algae from Brazil. J Phycol 46:1198–1205. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00898.x>
- Yumbla-Orbes M, da Cruz ACF, Pinheiro MVM, et al (2017) Somatic embryogenesis and de novo shoot organogenesis can be alternatively induced by reactivating pericycle cells in *Lisianthus* (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.) root explants. Vitro Cell Dev Biol – Plant 53:209-218. <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9800-2>

Tabela 1. Efeito de extratos aquosos (AE-HP) e polissacarídicos (PE-HP) de macroalgas e κ -carragenana (KC) combinados com picloram (PIC) na taxa de resposta de calos de explantes (%) de *Comanthera mucugensis*.

Biostimulants	Responsive explants rate (%)	
	0 μM PIC	4.14 μM PIC
0	0 \pm 0 ^b	37.5 \pm 0.9 ^c
1 mg mL⁻¹ AE-HP	0 \pm 0 ^b	0 \pm 0 ^e
1 mg mL⁻¹ PE-HP	0 \pm 0 ^b	56.6 \pm 1.8 ^b
1 mg mL⁻¹ KC	35.5 \pm 3 ^a	73 \pm 5.1 ^a
0.1 mg mL⁻¹ AE-HP	0 \pm 0 ^b	4 \pm 1 ^e
0.1 mg mL⁻¹ PE-HP	0 \pm 0 ^b	28.1 \pm 5.6 ^d
0.1 mg mL⁻¹ KC	0 \pm 0 ^b	25.9 \pm 4.3 ^d

Data correspond to means \pm SD.

Equal letters in the same column do not differ by Tukey's test ($p \leq 0.05$).

Tabela 2. Efeito de extrato aquoso (AE-HP) e polissacarídico (PE-HP) de *Hypnea pseudomusciformis* e κ -carragenana (KC) combinados com picloram (PIC) na massa seca dos calos de *Comanthera mucugensis*.

Picloram	Bioestimulantes	Massa seca (mg)
0	1 mg mL⁻¹ KC	33 \pm 0.4 ^c
4.14 μM	0	57 \pm 0.1 ^a
	1 mg mL⁻¹ PE-HP	47 \pm 0.3 ^b
	1 mg mL⁻¹ KC	55 \pm 0.3 ^a
	0.1 mg mL⁻¹ AE-HP	10 \pm 0 ^d
	0.1 mg mL⁻¹ PE-HP	30 \pm 0.2 ^c
	0.1 mg mL⁻¹ KC	32 \pm 0.1 ^c

Os dados correspondem às médias \pm desvio padrão.

Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

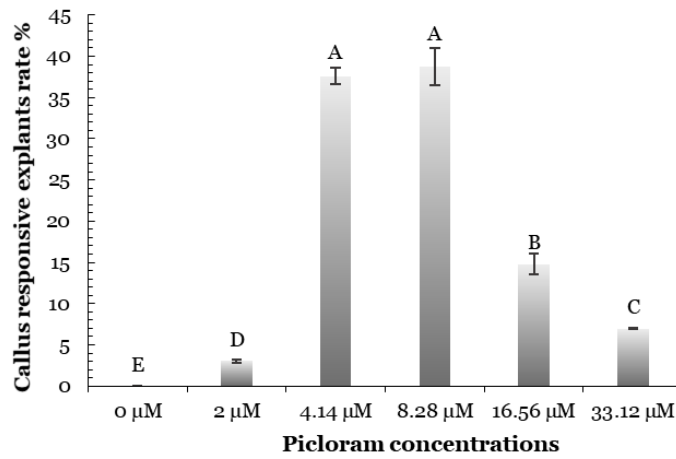


Fig. 1 Efeito de diferentes concentrações de picloram na taxa de explantes responsivos para calos (%) em *Comanthera mucugensis*. Os dados correspondem às médias \pm desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

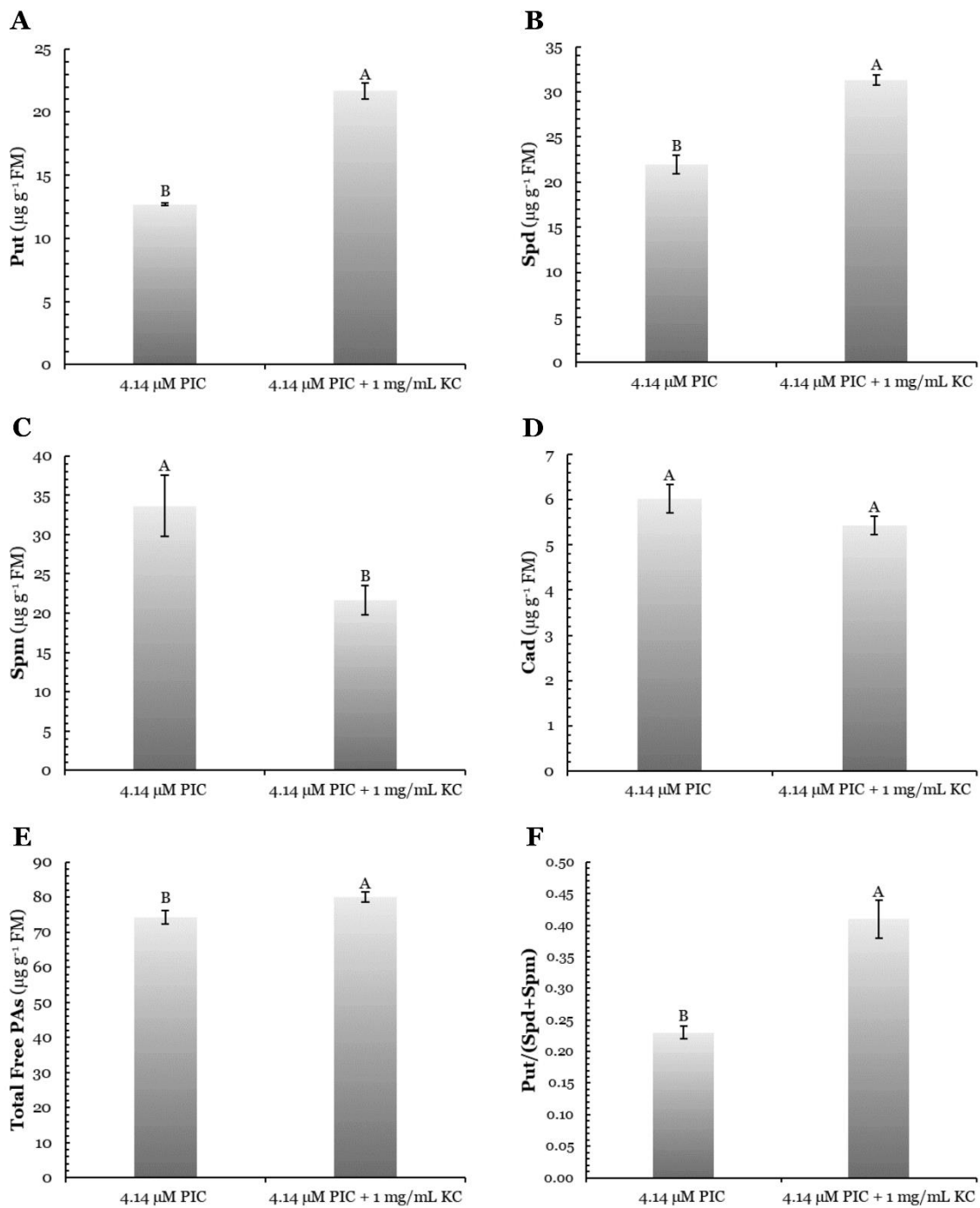


Fig. 2 Efeito do picloram (PIC) combinando com κ -carragenana (KC) no conteúdo de poliaminas (PA) em calos de *Comanthera mucugensis*. **A** Putrescina (Put); **B** Espermidina (Spd); **C** Espermina (Spm); **D** Cadaverina (Cad); **E** PAs livres totais; **F** Razão [Put/(Spd+Spm)]. Os dados correspondem às médias \pm desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

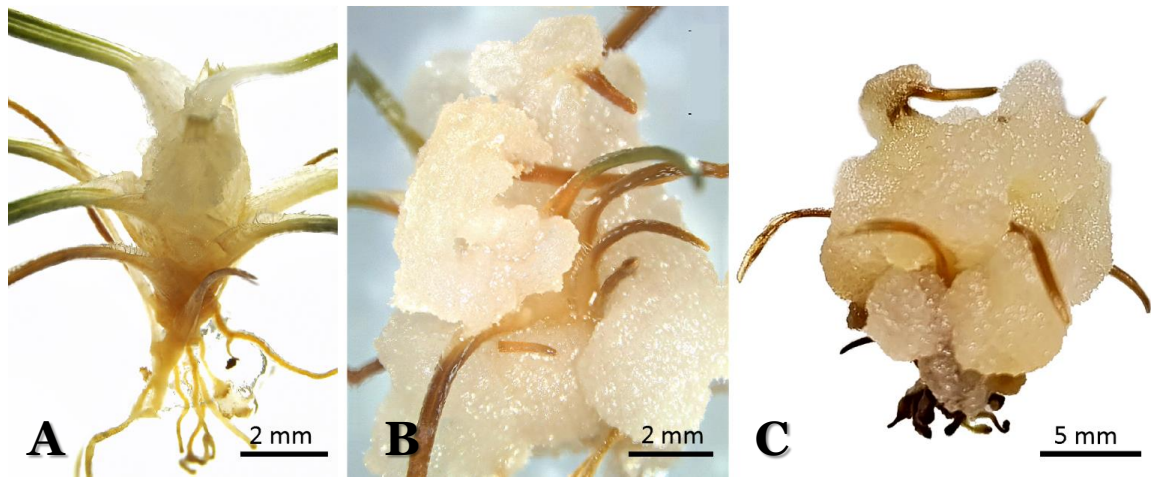


Fig. 3 Aspectos morfológicos e crescimento dos calos de *Comanthera mucugensis* a partir do explante (microplanta). **A** Após 30 dias de cultivo; **B** 60 dias de cultivo; **C** 90 dias de cultivo.

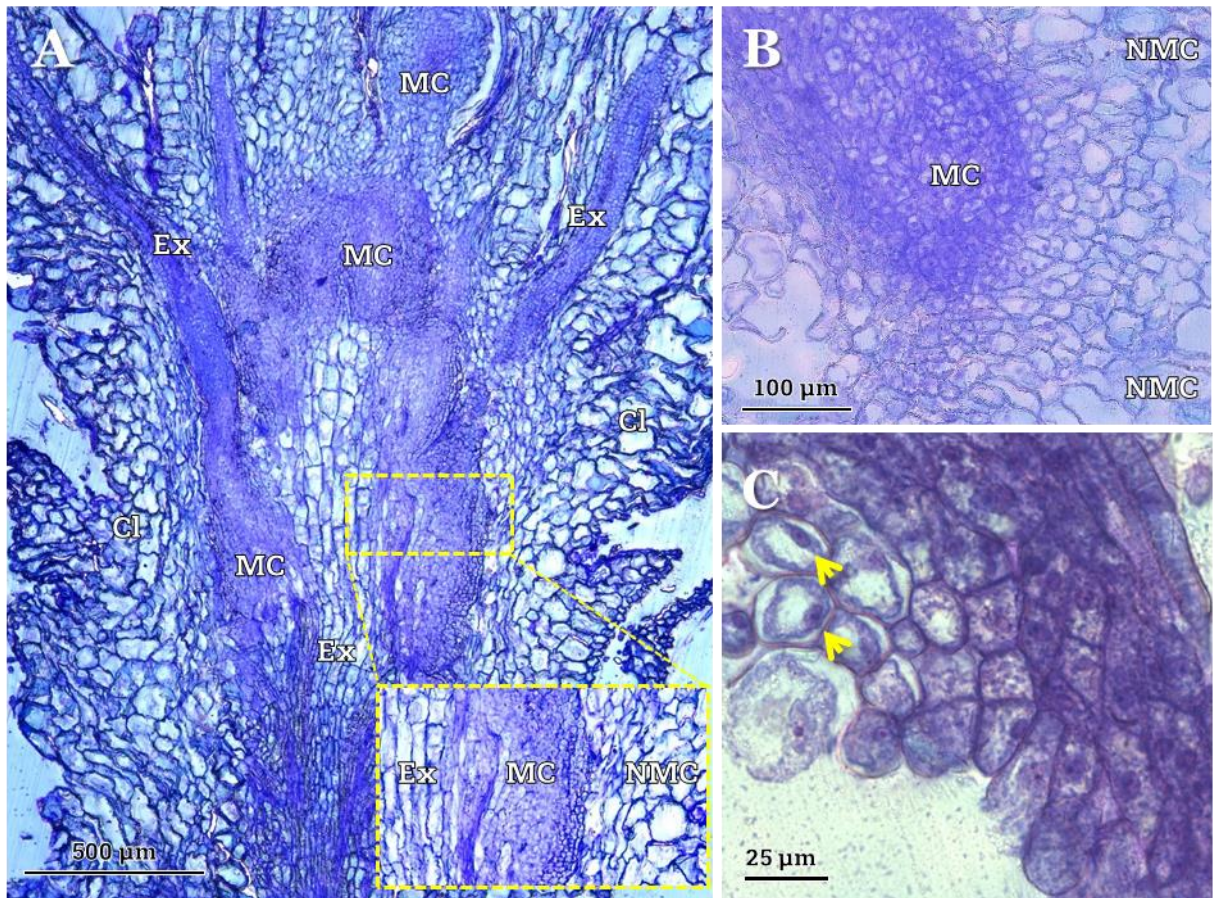


Fig. 4 Desenvolvimento da calogênese de *Comanthera mucugensis*. **A** Início da formação do calo após 30 dias de cultivo. Destaca-se a área de proliferação celular que se origina a partir da região interna do caule da microplanta; **B-C** Agrupamento de células meristemáticas. Células do explante (Ex). Células do calo (Cl). Células meristemáticas (MC). Células não-meristemáticas (NMC). Seta indica núcleo da célula meristemática com nucléolo proeminente.

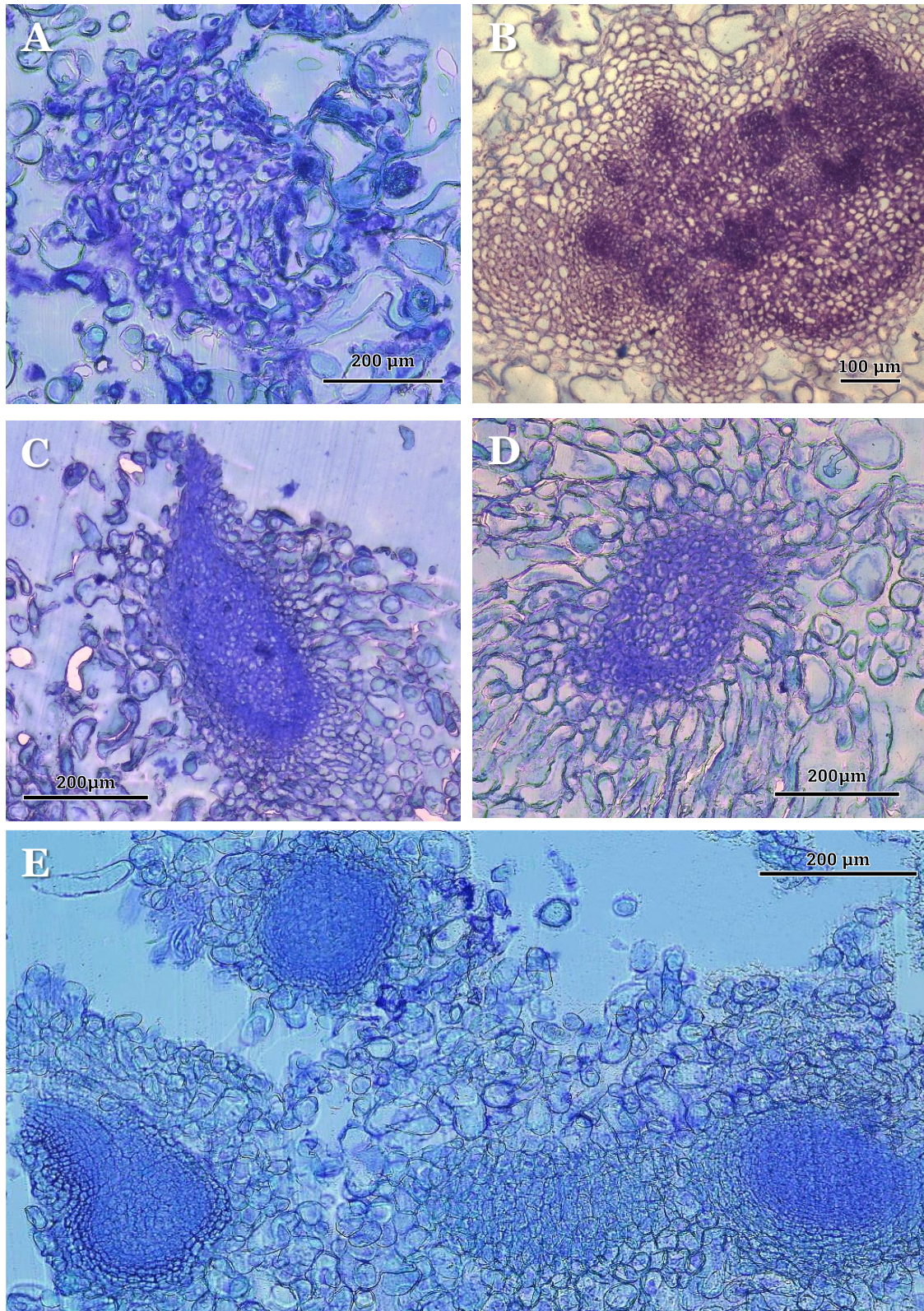


Fig. 5 Padrões de organização celular nos calos de *Comanthera mucugensis* após 60 dias de cultivo. **A** Células frouxamente conectadas e dispersas; **B** Células fortemente conectadas com intensa divisão, formando clusters embriogênicos; **C-E** Agrupamento das células meristemáticas formando estruturas globulares (proembriões).

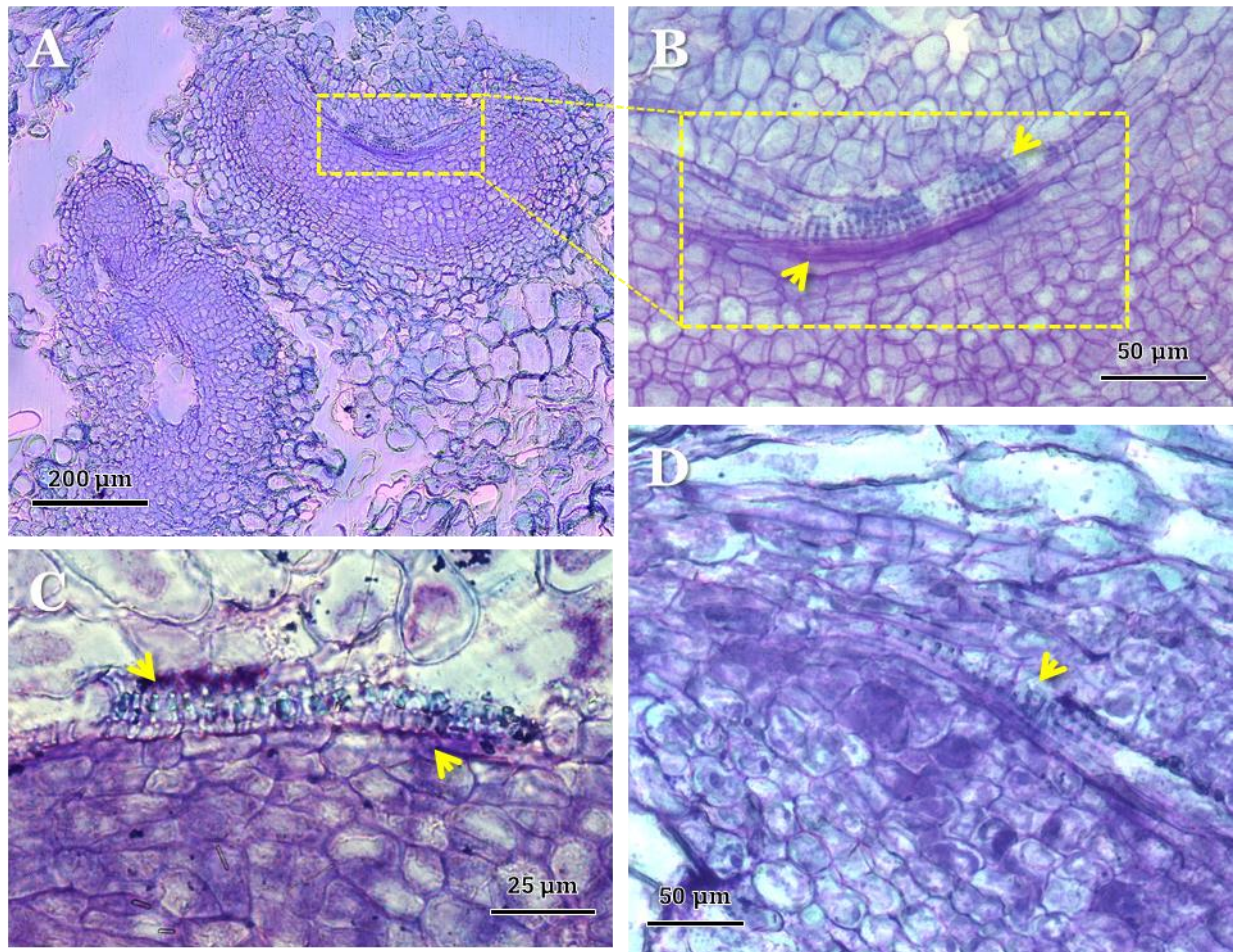


Fig. 6 Diferenciação das células proembrionárias localizadas na superfície do calo após 90 dias de cultivo. **A** Alongamento dos proembriões. **B-D** Formação dos elementos de vasos, típico de protoxilema, com deposição helicoidal de polissacarídeo na parede celular indicado por seta.



CAPÍTULO 4

Gelation of culture medium with κ -carrageenan improves and reduces the cost of *in vitro* propagation of *Comanthera mucugensis*

(Giul.) L. R. Parra & Giul

Gelation of Culture Medium with K-Carrageenan Improves and Reduces the Cost of *in vitro* Propagation of *Comanthera mucugensis* (Giul.) L. R. Parra & Giul

Luane Portela Carmo^{1*}

<https://orcid.org/0000-0002-2435-9814>

Carlos Wallace do Nascimento Moura²

<https://orcid.org/0000-0001-6904-6603>

Alone Lima-Brito¹

<https://orcid.org/0000-0003-4560-3182>

¹Universidade Estadual de Feira de Santana, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Horto Florestal, Feira de Santana, Bahia, Brasil; ²Universidade Estadual de Feira de Santana, Laboratório de Ficologia, Feira de Santana, Bahia, Brasil.

Editor-in-Chief: Bill Jorge Costa

Associate Editor: Marcos Pileggi

Received: 02-Mar-2023; Accepted: 04-May-2023

*Correspondence: luaneportela@yahoo.com.br; Tel.: +55-75-3625-2300 (L.P.C.); wallace@uefs.br; Tel: +55-75- 3161-8019 (C.W.N.M.).

Brazilian Archives of Biology and Technology. v.66. doi: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2023230191>

Resumo

A multiplicação *in vitro* é o principal método para produção de mudas de *Comanthera mucugensis*, uma planta ornamental ameaçada de extinção. A técnica consiste no cultivo de tecidos vegetais, sob condições assépticas, em ambiente controlado e uso de meio de cultura adequado. As características físicas do meio são, principalmente, determinadas pela presença de um agente gelificante. O ágar é a substância mais utilizado no cultivo *in vitro* de *C. mucugensis*, porém, é um dos componentes de maior custo para fabricação do meio. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da κ -carragenana como agente gelificante alternativo na propagação de *C. mucugensis*. As sementes e os explantes caulinares foram cultivados em meios gelificados com ágar ou κ -carragenana, ambos na concentração de 7 g L⁻¹. Os resultados demonstraram que as plantas estabelecidas em meio com κ -carragenana apresentam maior comprimento e induziram a formação de brotos. A organogênese direta também foi aprimorada com o uso desse gelificante. Em comparação, o ágar apresentou a menor taxa de regeneração direta e o menor número de brotos. Além disso, a gelificação com a κ -carragenana foi eficiente em promover alta frequência de calogênese, bem como, a maior regeneração dos calos e número de brotos por calo. O enraizamento não foi afetado pelo tipo

de gelificante. A substituição do ágar pela κ -carragenana pode significar uma redução de 23.9% no custo de fabricação do meio de cultura para propagação *in vitro* de *C. mucugensis*.

Palavras-chave: germinação; organogênese; calogênese; ágar.

Abstract

In vitro multiplication is the main method for seedling production of *Comanthera mucugensis*, an endangered ornamental plant. The technique consists of cultivating plant tissues under aseptic conditions, controlled environment, and using appropriate culture medium. The physical characteristics of the medium are mainly determined by the presence of a gelling agent. Agar is the most used substance on the *in vitro* cultivation of *C. mucugensis*, however, it is one of the most costly components to manufacture the medium. The objective of the present study was to evaluate the effect of κ -carrageenan as an alternative gelling agent in the propagation of *C. mucugensis*. The seeds and stem explants were cultured on medium gelled with agar or κ -carrageenan, both at 7 g L⁻¹ concentration. The results indicated that the plants established in medium with κ -carrageenan presented an increase in length and induced formation of shoots. Direct organogenesis was also improved with the use of this gelling agent. In comparison, agar culture presented the lowest rate of direct regeneration and the lowest number of shoots. In addition, gelation with κ -carrageenan was efficient in increasing the frequency of callogenesis, as well as, the highest callus regeneration and number of shoots per callus. Rooting was not affected by the type of gelling agent. The substitution of agar for κ -carrageenan can represent a reduction of 23.2% in the cost of manufacturing the culture medium for *in vitro* propagation of *C. mucugensis*.

Keywords: germination; organogenesis; callogenesis; agar.

INTRODUCTION

Comanthera mucugensis (Giul.) L. R. Parra & Giul. (Eriocaulaceae) is a species of "everlasting flowers" endemic to the Chapada Diamantina - Bahia, with high commercial value for ornamental use. This plant has been overexploited since the 1970s, causing the reduction of natural populations and consequent decrease in production for national and international trade [1]. Currently, the species is considered to be at high risk of extinction in the wild [2]. The growth of *C. mucugensis* occurs under restricted environmental conditions, which makes it difficult to establish *ex situ* cultures and makes plant tissue culture the main technique for cultivation and propagation of the species [3]. However, this is a very expensive method of *ex situ* conservation and many germplasm collections can have low genetic variability [4].

The *in vitro* propagation of plants is a complex process composed of different steps, such as: initial establishment of the culture, regeneration of plant tissue via organogenesis or somatic embryogenesis (both can occur directly from the explant or indirectly via callus formation), elongation and rooting of the obtained shoots [5]. In addition, it involves several variables, such as the control of environmental conditions (asepsis, luminosity, photoperiod and temperature) and the composition of the culture medium (nutrients, carbon source, vitamins, regulators and gelling agent) [5-7].

The control of the chemical and physical characteristics of the culture medium is determinant for the success of *in vitro* cultivation and is influenced by the type of gelling agent [8-9]. The gelation confers consistency and support to the plants, regulates the absorption of water and other substances, and can influence morphogenesis at different stages of *in vitro* propagation [9]. Traditionally, agar is the most popular gelling agent used in media preparation [5], being employed in the *in vitro* propagation of *C. mucugensis* [10]. However, it is a high-cost substance and can represent up to 90% of the cost for manufacturing the culture medium [11].

Over the years, several types of gelling agents have been developed and incorporated into *in vitro* culture protocols, including with superior results compared to agar [12-14]. For example, gelation with κ -carrageenan, a polysaccharide also obtained from red macroalgae composed of galactose and ester sulfate subunits, has been reported in studies involving direct and indirect organogenesis, and somatic embryogenesis in several plant species [9,15,16]. It has, however, not yet been tested in the propagation of *C. mucugensis*.

The gelling of the culture medium for *C. mucugensis* cultivation is restricted to the use of agar, and there are no data in the literature about the effects of other reagents. Therefore, this study investigated the viability of using κ -carrageenan as an alternative gelling agent in the germination, organogenesis and *in vitro* rooting of *C. mucugensis*.

MATERIAL AND METHODS

Germination and initial growth

The *C. mucugensis* seeds were collected from inflorescences of mature plants from Mucugê Municipal Park in Chapada Diamantina, Bahia State, Brazil (12°99'21''S and 41°34'19''W) in October 2021. In laminar flow cabinet, the seeds were disinfected in 70% ethyl alcohol for 30 s, followed by immersion for 10 min in a solution of sodium hypochlorite – NaOCl (2.5% active chloride) with an added drop of neutral detergent (Ypê®), with subsequent rinsing three times in sterile distilled water. These were sown on standard medium for the species [10]: half-strength MS (Murashige & Skoog 1962) (MS½) and 15 g L⁻¹ sucrose. The media were gelled with 7 g L⁻¹ of agar (Himedia®, type I) or κ -carrageenan (PhytoTechnology Laboratories®).

After 30 days, the germination rate was evaluated. In addition, the full lengths, number of responsive plants for shoots and number of shoots per plant were recorded after 90 days of cultivation.

Multiplication via direct organogenesis

The *C. mucugensis* stem with approx. 0.5 cm length, previously obtained from microplants cultivated on agar-gelified and plant regulator-free medium, were used as explants for induction of new shoots. The explants were inoculated on regulator-free MS½ gelled with 7 g L⁻¹ of agar (Himedia®, type I) or κ -carrageenan (PhytoTechnology Laboratories®).

After 30 days, the responsive explant rate and the number of shoots per explant were registered.

Multiplication via indirect organogenesis

The *C. mucugensis* stem with approx. 0.5 cm length, previously obtained from microplants cultivated on agar-gelified and plant regulator-free medium, were used as explants for induction of callus. The explants were inoculated on MS½ supplemented with

4.44 μM of 6-benzylaminopurine (BAP) [10] and gelled with 7 g/L of agar (Himedia[®], type I) or κ -carrageenan (PhytoTechnology Laboratories[®]).

After 30 days, the responsive explant rate was evaluated. Then, these were transferred to regulatory-free medium, and the regeneration rate and the number of shoots per callus were estimated after 30 days.

Rooting of shoots

The last stage of *in vitro* propagation consisted of rooting. The explants used were shoots obtained in the process of direct organogenesis after 120 days of cultivation. The selected shoots were standardized, presenting a height between 1.5 and 2 cm, and had their roots removed. Afterwards, they were inoculated with in MS $\frac{1}{2}$ gelled with 7 g L⁻¹ of agar (Himedia[®], type I) or κ -carrageenan (PhytoTechnology Laboratories[®]).

After 120 days, the rooting rate, the length of largest root and number of roots were evaluated.

General cultivation conditions

All media were supplemented with 15 g L⁻¹ sucrose [10]. *In vitro* cultures were performed in test tubes (25 x 150 mm), closed with polyvinyl chloride (PVC) film. The pH was adjusted between 5.6-5.8 and autoclaved for 15 minutes at 121 °C and 1.0 atm of pressure. The experiments were then maintained in growth rooms under a 16 hour photoperiod, temperature of 25 ± 3 °C, and fluorescent white light at 60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. All *in vitro* experiments were performed in the Plant Tissue Culture Laboratory of the Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

Experimental design and statistical analyses

The experimental design was randomized and each experiment consisted of ten repetitions with five samples per treatment (gelling agent type). The results were examined for normality using the Shapiro-Wilk test followed by analysis of variance (ANOVA) with Tukey test or Mann–Whitney *U* test. All of the analyses were performed considering a 5% level of significance, using PAST software [17].

Cost Analysis

To analyze the cost of gelling agents in the production of the medium, agar and κ -carrageenan were compared using products with the same amount of powder. In this case, the

gelling agents were quoted in the 5Kg version. The product values were consulted in the official online stores of each manufacturer on the same day to avoid price variations. Both products were quoted in US dollars. To obtain the real cost value, all decimal places of the numbers were considered in the calculations.

RESULTS

The *in vitro* cultivation of *C. mucugensis* can be performed in gelled medium with agar or κ -carrageenan at a concentration of 7 g L^{-1} . The gel structure formed by κ -carrageenan is firm and clarified, allowing better observation of plant root development compared to agar that has an opaque appearance (Figure 1A). No hyperhydricity of the plants occurred on the media solidified with these gelling agents. Furthermore, the results obtained showed that the germination rate of the medium gelled with agar and κ -carrageenan did not differ from each other, indicating that the type of gelling agent does not alter the germination potential of *C. mucugensis* seeds (Table 1). However, gelation with κ -carrageenan stimulated greater growth (3.5 ± 0.9) (Figure 1B) and induced shoots in 90-day-old microplants, contributing to the increased success of *in vitro* propagation.

Table 1. Germination rate after 30 days and growth and multiplication parameters of *Comanthera mucugensis* after 90 days on gelled media with agar or κ -carrageenan.

Gelling agent	Germination rate (%)	Full length (cm)	Shoot responsive plant rate (%)	Number of shoots per plant
Agar	100 ± 0^A	1.7 ± 0.7^B	0 ± 0^B	0 ± 0^B
κ -Carrageenan	95 ± 0^A	3.5 ± 0.9^A	33.5 ± 9.5^A	1.5 ± 0.5^A

Data correspond to means \pm SD.

Equal letters in the same column do not differ by Tukey's test ($p < 0.05$).

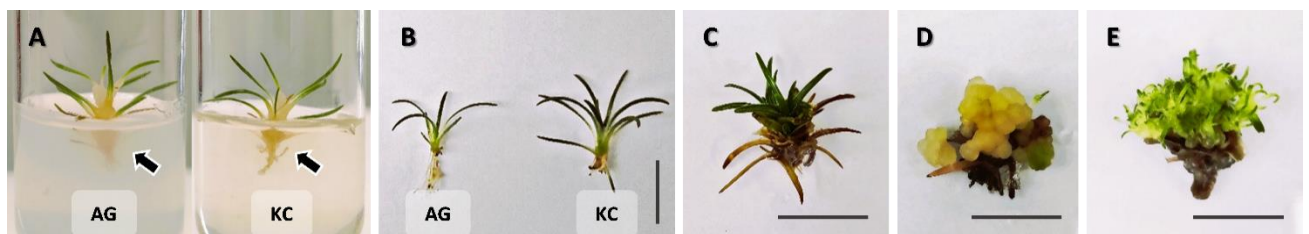


Figure 1. *In vitro* propagation of *Comanthera mucugensis* on gelled medium with agar or κ -carrageenan. (a) General aspect of the culture medium. (b) Initial growth; (c) Direct organogenesis from a stem explants; (d) Callogenesis from stem explants in the presence of

BAP; (e) Regeneration of shoots via indirect organogenesis. AG = agar; KC = κ -carrageenan. Bar= 1 cm.

In addition, it was observed that multiplication via direct organogenesis of *C. mucugensis* was influenced by the type of gelling agent (Table 2). The explants grown on medium with κ -carrageenan showed the highest rate of responsive explants, being 30% greater compared to agar (Figure 1C). The use of traditional gelation promoted the mean of 2.3 ± 1.2 shoots per explant, while, the alternative gelling agent doubled the production (4.5 ± 1.8).

Table 2. Evaluation of multiplication via direct organogenesis of *Comanthera mucugensis* on gelled medium with agar or κ -carrageenan.

Gelling agent	Responsive explant rate (%)	Number of shoots per explant
Agar	50 ± 12.45^B	2.3 ± 1.2^b
κ -Carrageenan	80 ± 16.32^A	4.5 ± 1.8^a

Data correspond to means \pm SD.

Equal uppercase letters in the same column do not differ by Tukey's test ($p < 0.05$).

Equal lowercase letters in the same column do not differ by Mann–Whitney U test ($p < 0.05$).

Cultivation of stem explants in medium supplemented with $4.44 \mu\text{M}$ BAP induced callogenesis, independently of the type of gelling agent. However, indirect multiplication of *C. mucugensis* was improved by gelling the medium with κ -carrageenan (Table 3). It promoted the highest callus proliferation rate (51.6 ± 11), about 20% more than agar. The callus presented an organogenic aspect, friable texture and with a coloration that varied between green and brown, with few necroses (Figure 1D). The regeneration of shoots occurred via indirect organogenesis on medium without growth regulator (Figure 1E). Gelling the medium with κ -carrageenan increased the rate of regeneration and shoot numbers per callus by 21.5% and 7.3%, respectively, compared to the results obtained using agar (Table 3).

Table 3. Evaluation of multiplication via callogenesis and indirect organogenesis of *Comanthera mucugensis* on gelled medium with agar or κ -Carrageenan.

Gelling agent	Callus responsive explant rate (%)	Regeneration rate (%)	Number of shoots per callus
Agar	30.7 ± 7.3^B	32 ± 8.8^B	14 ± 7^b
κ -Carrageenan	51.6 ± 11^A	53.5 ± 8.5^A	21.3 ± 9.1^a

Data correspond to means \pm SD. Equal uppercase letters in the same column do not differ by Tukey's test ($p < 0.05$). Equal lowercase letters in the same column do not differ by Mann–Whitney U test ($p < 0.05$).

After 120 days of culture of the microplants, it was observed that the type of medium gelling did not promote significant difference in the induction and growth of roots of *C. mucugensis* shoots (Table 4).

Table 4. Evaluation of the rooting of *Comanthera mucugensis* on gelled medium with agar or κ -Carrageenan.

Gelling agent	Rooting rate (%)	Length of largest root (mm)	Number of roots
Agar	29.1 \pm 6 ^A	5.5 \pm 0 ^A	3 \pm 1 ^A
κ -Carrageenan	31.5 \pm 4 ^A	5 \pm 0 ^A	4 \pm 1.5 ^A

Data correspond to means \pm SD.

Equal letters in the same column do not differ by Tukey's test ($p < 0.05$).

The analysis of the prices of these gelling agents showed that agar has the highest acquisition value and, therefore, the most expensive for the gelation of the medium (Table 5). Its use represents a value of approximately \$1.39 for manufacturing one liter of culture medium. The substitution of agar for κ -carrageenan means an approximate reduction of 23.2% in the cost of gelling the culture medium for *C. mucugensis*.

Table 5. κ -Carrageenan and agar values and cost of gelling the culture medium for *Comanthera mucugensis*.

Gelling agent	Price per 5 Kg	Value per g	Value per 7g
κ -Carrageenan	\$ 765.29 ¹	0.153058	1.071406
Agar type I	\$ 996.50 ²	0.1993	1.3951

¹ Price consulted in January 30, 2023. Product ID: C257-5KG (<https://phytotechlab.com/carrageenan.html>)

² Price consulted in January 30, 2023. Product ID GRM666-5KG2 (<https://www.himediastore.com/agar-agar-type-i-10191>)

DISCUSSION

The agar is the most frequently used gelling agent for plant tissue culture media. The substance is a sulfated hydrocolloid extracted from red seaweed composed of agarose and agaropectin, which possesses desirable characteristics of high gel clarity, stability and resistance to metabolism during *in vitro* cultivation [18]. However, besides being a costly reagent, the high demand for micropropagation has resulted in the overexploitation of certain species of agarophyte seaweeds (such as the genera *Gelidium* and *Pterocladia*) and in a threat to the conservation of the natural resource [19]. Other substances have been proposed

as alternatives to agar, such as gelatin gum, commercialized under the names Gelrite and Phytigel [13], and κ -carrageenan [9].

The κ -carrageenan, besides being a gelling agent, is considered as a plant biostimulant and has been associated with growth improvement, propagation and stress mitigation in several plants [20,21]. Previous studies have shown that polymers of this polysaccharide were able to enhance key physiological and/or biochemical processes in plants, including photosynthesis, cell division, nitrogen, carbon and sulfur assimilation, and NADPH synthesis [22–24]. In addition, it has the ability to attenuate heat stress in seeds of *C. mucugensis* [25]. In the present study, its application as a substrate in the *in vitro* cultivation of this species was responsible for promoting the greatest length and formation of shoots in microplants.

Another study conducted on tobacco (*Nicotiana tabacum*) demonstrated that gelling with κ -carrageenan was efficient in enhancing callus growth and regeneration compared to other gelling agents [9]. The use of this sulfated polysaccharide has also been reported in the solidification of the media that make up the callus induction protocols in agave [26] and *Dendrocalamus hamiltonii* [27], in apple embryogenesis [15] and in potato, gladiolus, and tulip propagation [16, 28, 29].

The gelling with κ -carrageenan is also advantageous for culture media that need to be supplemented with antibiotics. It was reported that high concentrations of the antibiotic kanamycin inhibited the *in vitro* regeneration of tobacco and gladiolus, however, the medium gelled with κ -carrageenan attenuated the effects of the substance, allowing an increase in the regeneration rate of the explants [16]. Regarding the physicochemical properties, its use does not alter the pH of the medium after adjustment and autoclaving [30], although the gel strength is low compared to agar [9]. The gelation with κ -carrageenan, at a concentration of 7 g L⁻¹, permitted the formation of a firm gel structure capable of supporting the microplants and explants of *C. mucugensis*.

The *in vitro* organogenesis of *C. mucugensis* was studied by Lima-Brito [10] which demonstrated regeneration of stem explants directly in medium without growth regulator and indirectly in medium supplemented with BAP. The experiments were performed on agar-gelled media, in which a direct regeneration rate of 58.75% was observed after 60 days of culture. In the present study, 80% of explants grown on κ -carrageenan medium regenerated in only 30 days (Figure 1B). The gelling agent may have altered the gel matrix potential of medium and, possibly, interfered with *in vitro* morphogenesis [31].

The previous studies demonstrated that callus induction in *C. mucugensis* can occur from whole plants and nodal segments in media supplemented with 1.78 and 3.55 μ M of BAP [32]

and from leaf explants cultured with 4.44 μM BAP [10]. These experiments used agar as the gelling agent. The present results suggest that optimization of the indirect organogenesis protocol can be obtained by cultivating the stem explants in medium gelled with κ -carrageenan and supplemented with 4.44 μM BAP. Despite the great potential for callogenesis of the species, callus regeneration is little discussed in the literature.

Rooting is one of the limiting steps for the propagation of "evergreens" due to the low response of plants to the formation of roots *in vitro*. Previous investigations showed that the use of auxin is not efficient for inducing root growth of *C. mucugensis* [3], which contributes to the low success of *ex vitro* cultivation. In the present study, the type of medium gelling did not promote a significant difference in the induction and root characteristics of the shoots. Therefore, the importance of new methods to improve *C. mucugensis* rooting is highlighted.

The reduction in the cost of micropropagation of plants through the partial and total substitution of agar has been reported in several studies and has generated promising results [14,33–35]. The main low-cost alternatives are: corn starch, sago, cassava starch and isabgol. The present results showed that the use of κ -carrageenan as a gelling agent is favorable and represents a 23.2% reduction in the production cost of the culture medium for *C. mucugensis*. It is a very exploited substance in the manufacture of food and cosmetics and is widely available in the market in several brands, however, quality and purity must be considered.

CONCLUSION

The present study demonstrated that gelling the culture medium with 7 g L⁻¹ of κ -carrageenan is a viable alternative for germination, organogenesis and callogenesis of *C. mucugensis*. In addition, its use as a substitute for agar reduces the cost of manufacturing the medium. *In vitro* rooting was not affected by the type of gelling agent, indicating the need for new protocols to improve rhizogenesis in *C. mucugensis*.

Funding: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil - Finance code 001.

Acknowledgments: The authors thank the State University of Feira de Santana, the Graduate Program in Plant Genetic Resources and the Laboratory of Plant Tissue Culture of the HortoFlorestal/UEFS for the technical, financial and material assistance to conduct this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Giulietti N, Giulietti AM, Rubens J. [Studies on evergreens: economic importance of extractivism in Minas Gerais, Brazil]. *Acta Bot Brasilica*. 1988;1:179–93.

2. Brasil. portaria MMA nº 148, de 7 de junho de 2022. [National list of endangered species]. Ministério do Meio Ambiente; 2022.
3. Lima APPS, Brito AL, Santana JRF. *In vitro* culture of sempre-vivas species (*Comanthera*): A review. *Rodriguesia*. 2021;72(1):1–9.
4. Carvalho JMFC, Silva MDA, Medeiros ML. [Factors inherent to micropropagation]. Campina Grande: Embrapa Algodão; 2006. 28 p.
5. Ichi T, Koda T, Asai I, Hatanaka A, Sekiya J. Effects of gelling agents on *in vitro* culture of plant tissues. *Agric Biol Chem*. 1986;50(9):2397–9.
6. Ozudogru EA, Kaya E, Kirdok E, Issever-Ozturk S. *In vitro* propagation from young and mature explants of thyme (*Thymus vulgaris* and *T. longicaulis*) resulting in genetically stable shoots. *Vitr Cell Dev Biol - Plant*. 2011;47(1):309-20.
7. Akdemir H, Kaya E, Ozden Y. *In vitro* proliferation and minimum growth storage of fraser photinia: Influences of different medium, sugar combinations and culture vessels. *Sci Hortic*. 2010;126(2):268-75.
8. Scholten HJ, Pierik RLM. Agar as a gelling agent: Chemical and physical analysis. *Plant Cell Rep*. 1998;17(1) 230-35.
9. Ichi T, Koda T, Asai I, Hatanaka A, Sekiya J. Effects of gelling agents on *in vitro* culture of plant tissues. *Agric Biol Chem*. 1986;50(9):2397–9.
10. Lima-Brito A, Resende SV, Lima CO C, Alvim BFM, Carneiro CE, Santana JRF. *In vitro* morphogenesis of *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. *Ciênc. agrotec*. 2011;35(3):502–10.
11. Agrawal A, Sanayaima R. Cost-effective *in vitro* conservation of banana using alternatives of gelling agent (isabgol) and carbon source (market sugar). *Acta Physiol. Plant*. 2010;703–11.
12. Babbar SB, Jain R, Walia N. Guar gum as a gelling agent for plant tissue culture media. *Vitr Cell Dev Biol - Plant*. 2005;41(1):258–61.
13. Mohamed GM, Amer AM, Osman NH, Sedikc MZ, Hussein MH. Effects of different gelling agents on the different stages of rice regeneration in two rice cultivars. *Saudi J Biol Sci*. 2021;28(10):5738–44.
14. Souza ICC, Carmo LP, Lima-Brito A. Cost reduction in the micropropagation of *Solanum lycopersicum* L. var. *cerasiforme*. *Colloq Agrar*. 2021;17(3):12–20.
15. Daigny G, Paul H, Sangwan RS, Sangwan-Norreel BS. Factors influencing secondary somatic embryogenesis in *Malus × domestica* Borkh. (cv 'Gloster 69'). *Plant Cell Rep*. 1996;16:153–7.
16. Chauvin JE, Marhadour S, Cohat J, Le Nard M. Effects of gelling agents on *in vitro* regeneration and kanamycin efficiency as a selective agent in plant transformation procedures. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 1999;58(1):213–7.

17. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST-Palaeontological statistics. 2001.
18. Henderson WE, Kinnersley AM. Corn starch as an alternative gelling agent for plant tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1988;1:17-22.
19. Aggarwal S, Nirmala C. Utilization of coir fibers as an eco-friendly substitute for costly gelling agents for *in vitro* orchid seed germination. *Sci Hortic.* 2012;133(1):89–92.
20. Vera J, Castro J, Gonzalez A, Moenne A, Vera J, Castro J, et al. Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. *Mar Drugs.* 2011;9(12):2514–25.
21. Shukla PS, Borza T, Critchley AT, Prithiviraj B. Carrageenans from red seaweeds as promoters of growth and elicitors of defense response in plants. *Front Mar Sci.* 2016;3:81.
22. Castro J, Vera J, González A, Moenne A. Oligo-carrageenans stimulate growth by enhancing photosynthesis, basal metabolism, and cell cycle in tobacco plants (var. Burley). *J Plant Growth Regul.* 2012;31(2):173–85.
23. González A, Contreras RA, Moenne A. Oligo-carrageenans enhance growth and contents of cellulose, essential oils and polyphenolic compounds in *Eucalyptus globulus* trees. *Molecules.* 2013;18(8):8740–51.
24. Saucedo S, Contreras RA, Moenne A. Oligo-carrageenan kappa increases C, N and S assimilation, auxin and gibberellin contents, and growth in *Pinus radiata* trees. *J For Res.* 2015;26(3):635–40.
25. Carmo LP, Moura CWN, Lima-Brito A. Effects of heat stress and seaweed-derived biostimulants on the germination of *Comanthera mucugensis*, an endemic plant of fire-prone Campos rupestres of Chapada Diamantina (Brazil). *South African J Bot.* 2021;141:49–53.
26. Gao J, Yang F, Zhang S, Li J, Chen H, Liu Q, et al. Expression of a hevein-like gene in transgenic *Agave* hybrid No. 11648 enhances tolerance against zebra stripe disease. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2014;119(3):579–85.
27. Zhang N, Fang W, Shi Y, Liu Q, Yang H, Gui R, et al. Somatic embryogenesis and organogenesis in *Dendrocalamus hamiltonii*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2010;103(3):325–32.
28. Beaujean A, Sangwan RS, Lecardonnel A, Sangwan-Norreel BS. *Agrobacterium*-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: An efficient protocol of transformation. *J Exp Bot.* 1998;49(326):1589–95.
29. Chauvin JE, Label A, Kermarrec MP. *In vitro* chromosome-doubling in tulip (*Tulipa gesneriana* L.). *J Hortic Sci Biotechnol.* 2005;80(6):693–8.
30. Owen HR, Wengerd D, Miller AR. Culture medium pH is influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal, and medium storage method. *Plant Cell Rep.* 1991;10(1):583–6.

31. Owens LD, Wozniak CA. Measurement and effects of gel matrix potential and expressibility on production of morphogenic callus by cultured sugarbeet leaf discs. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1991;26(2):127–33.
32. Santos JDP, Dornelles ALC, Pereira FD, Oliveira LM. [Callus induction in evergreen (*Syngonanthus mucugensis* Giulietti), using different types of explants and BAP concentrations]. *Acta Sci - Biol Sci.* 2008;30(2):127–31.
33. Datta SK, Chakraborty D, Janakiram T. Low cost tissue culture: An overview. *J Plant Sci Res.* 2017;33(2):181–99.
34. Kodym A, Zapata-Arias FJ. Low-cost alternatives for the micropropagation of banana. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2001;66(1):67–71.
35. Saraswathi MS, Uma S, Kannan G, Selvasumathi M, Mustaffa MM, Backiyarani S. Cost-effective tissue culture media for large-scale propagation of three commercial banana (*Musa* spp.) varieties. *J Hortic Sci Biotechnol.* 2016;91(1):23–9.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A agricultura sustentável é um paradigma emergente que busca conciliar a produção agrícola com a conservação dos recursos naturais. Os métodos *eco-friendly* podem ser a chave para superar esse desafio. No entanto, é crucial que essas tecnologias verdes sejam disponibilizadas de maneira justa e equitativa, de baixo custo e fácil acesso a fim de fortalecer a agricultura sustentável nas regiões com baixo desenvolvimento socioeconômico. O cultivo *in vitro* de plantas é uma das técnicas de propagação vegetal mais custosa e que, apesar dos benefícios, representa um desafio para pequenos produtores em relação à manutenção desse tipo de tecnologia.

A presente tese demonstrou que a utilização de bioestimulantes derivados de macroalgas do litoral baiano pode ser considerada um método *eco-friendly* para impulsionar a produção *in vitro* de plantas. Essa abordagem não apenas contribui para a conservação das espécies do semiárido nordestino ameaçadas de extinção, como a *Comanthera mucugensis*, mas também pode promover o desenvolvimento socioeconômico inclusivo nessas regiões.

O estudo demonstrou o potencial do uso de extratos de macroalgas e da κ -carragenana na redução do estresse térmico em sementes de sempre-viva expostas a altas temperaturas. A incorporação dos bioestimulantes nos protocolos de organogênese e calogênese mostraram-se altamente eficazes e possibilitaram uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na morfogênese *in vitro* de *C. mucugensis*, como o brotamento em resposta ao estresse hídrico e o metabolismo das poliaminas durante a organogênese direta e calogênese. Os resultados obtidos também foram significativos para o entendimento do potencial dos extratos e polissacarídeos das macroalgas como atenuadores de estresse abiótico. Portanto, considera-se que este estudo traz importantes contribuições para a consolidação da aplicação dos bioestimulantes derivados de macroalgas na cultura de tecidos como um método sustentável, justo e de fácil acesso, aliando o avanço tecnológico à conservação da biodiversidade e dos recursos naturais regionais.

Por fim, os conhecimentos gerados a partir dos estudos *in vitro* podem fornecer subsídios para possíveis aplicações no cultivo em campo de *C. mucugensis*, especialmente no que diz respeito às respostas fisiológicas e às estratégias de mitigação do estresse relacionadas às alterações climáticas resultantes do aquecimento global. No entanto, a extrapolação direta desses resultados para o uso em campo requer uma avaliação mais abrangente e criteriosa.