



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS
VEGETAIS**

DANIELA GOMES DE MAGALHÃES

**EXTRATO DA MACROALGA PARDA *Ascophyllum nodosum*
NO CULTIVO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE PLANTAS
ORNAMENTAIS DA CHAPADA DIAMANTINA- BA**

Feira de Santana –BA
2021

DANIELA GOMES DE MAGALHÃES

**EXTRATO DA MACROALGA PARDA *Ascophyllum nodosum*
NO CULTIVO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE PLANTAS
ORNAMENTAIS DA CHAPADA DIAMANTINA- BA**

Dissertação 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 Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Profa. Dra. Alone Lima Brito

Feira de Santana –BA

2021

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

M165 Magalhães, Daniela Gomes de
Extrato da macroalga parda *Ascophyllum Nodosum* no cultivo e
conservação *in vitro* de plantas ornamentais da Chapada Diamantina- Ba /
Daniela Gomes de Magalhães. – 2021.
49 f.: il.

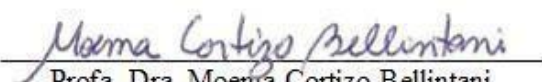
Orientadora: Alone Lima Brito.

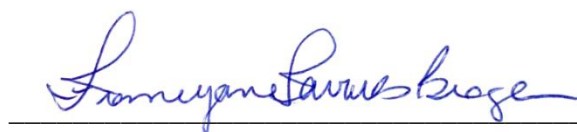
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana,
Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Feira de
Santana, 2021.


1. Plantas ornamentais. 2. Multiplicação *in vitro*. I. Título.
II. Brito, Alone Lima, orient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana.

CDU 653.9 (814.2)

BANCA EXAMINADORA


Profa. Dra. Moema Cortizo Bellintani
Universidade Federal da Bahia - UFBA


Profa. Dra. Franciane Tavares Braga
Universidade do Estado da Bahia - UNEB


Profa. Dra. Alone Lima Brito
Orientadora e Presidente da Banca
Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS

*“Eu vou cantar da sua bondade, vou contar do seu amor.
Mesmo que as estações possam assustar,
Você sempre foi e será o suficiente!
Embora a noite fique mais escura,
embora a espera pareça longa,
Você sempre foi fiel,
para me lembrar do seu amor por mim.”*

Ao meu amado Jesus!

AGRADECIMENTOS

Glorifico a Deus por todo cuidado e zelo durante toda minha vida. Por sua potente mão que me acolhe e guarda. Aquele que me amou antes da fundação dos tempos e permanece fiel à sua Palavra. Louvo e bendigo ao teu Nome!

Estendo os agradecimentos àqueles que se fizeram presentes de algum modo durante essa jornada, em especial à minha orientadora Alone Lima-Brito, exemplo de profissional e inspiração como mulher e mãe. Obrigada por ter aceitado esse desafio, por toda paciência e ensinamentos. Serei sempre grata!

Aos meus pais, Albérico e Simone, e à minha irmã Gabriela, por todo suporte, todo amor e cuidado. Meus sobrinhos Gabriel, Miguel e Mariah, que me arrancam os melhores sorrisos e me ensinam tanto.

À Luane Portela Carmo, por ter aceitado caminhar a segunda milha, por ter compartilhado seus conhecimentos, por todo auxílio e conselho.

À minha amiga Dinah Ise, presente que o mestrado me deu. Obrigada por sua amizade e companheirismo. Você é incrível!

À Isabela Coccorese, pelos ensinamentos dos primeiros dias e companheirismo durante todo esse tempo. Obrigada por ter aceitado o desafio da viagem de campo, e por todos os momentos compartilhados.

Aos colegas do LCTV-UEFS: Bárbara, Júnior, Fernanda, Iêda e Vanessa, que tornaram o ambiente agradável para o bom desenvolvimento do trabalho. E a Maurício, sempre disposto e solícito em ajudar.

Aos colegas da turma de Mestrado 2019.1, pelas trocas durante as disciplinas e pela parceria ao longo desses dois anos.

Ao Irmão Delmar (*in memoriam*) por toda gentileza prestada a mim, à Luane e Isabela em Morro do Chapéu - BA.

Ao LCTV-UFBA pela disponibilidade de materiais para realização deste trabalho.

Ao orquidófilo Gustavo Surlo, por todos os conselhos.

À comunidade Filadélfia, por ser essa grande família reunida, em especial, ao Pr. Fernando Júnior, Rute, Lucimar e Simone por todos os conselhos, paciência e orientações. Vocês são fundamentais em minha vida.

À Carol, Celiane, Danilo, Dessa, Lau, Jaqueline, Nanda e Steffany, por todos os momentos vividos, por todas as risadas e conselhos. Vocês tornam meus dias mais leves.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 (This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001).

RESUMO

Os bioestimulantes à base de macroalgas marinhas são amplamente empregados no cultivo vegetal, e o extrato da macroalga parda *Ascophyllum nodosum* (ANE) é um dos mais utilizados no comércio agrícola internacional, por apresentar diversos benefícios para as plantas. O ANE é indicado como otimizador do cultivo *in vitro*, sendo este o primeiro relato da sua aplicação em plantas ornamentais da Chapada Diamantina-BA, as quais carecem de estudos que promovam a sua propagação e conservação. Este estudo tem como objetivo avaliar a eficiência do extrato de *A. nodosum* na multiplicação e conservação *in vitro* de *Cattleya elongata*, e na propagação *in vitro* de *Comanthera mucugensis* e *Vellozia harleyi*, espécies presentes na Chapada Diamantina, com importância para o mercado ornamental e na composição fitofisionômica da região. Para a análise da conservação e multiplicação de *C. elongata* foram utilizadas cinco concentrações do extrato durante 320 dias de cultivo, sendo constatado um aumento significativo de 12x no número de brotos e 100% de explantes responsivos para brotação. Para o cultivo de *C. mucugensis* e *V. harleyi*, foram utilizadas quatro concentrações do extrato por 120 dias, obtendo-se aumento de 27% de sobrevivência de *C. mucugensis* e promoção do crescimento mínimo, bem como aumento significativo do número de raízes e comprimento radicular de *V. harleyi*. Portanto, o extrato de *A. nodosum* viabiliza a conservação e influencia a multiplicação *in vitro* de *C. elongata*, apresenta potencial uso na conservação de *C. mucugensis* e no enraizamento *in vitro* de *V. harleyi*.

PALAVRAS CHAVE: *Cattleya elongata*. *Comanthera mucugensis*. *Vellozia harleyi*. Bioestimulantes. Crescimento mínimo. Multiplicação *in vitro*.

ABSTRACT

The biostimulants based on seaweed are widely used in plant cultivation and the brown seaweed extract *Ascophyllum nodosum* (ANE) and is most used in the international agricultural trade because it has several benefits for plants. ANE is indicated as an optimizer of *in vitro* cultivation, this being the first report of its application in ornamental plants from Chapada Diamantina-BA, which need studies to promote their propagation and conservation. In this way, this study it has as objective to evaluate the efficiency of the extract of *A. nodosum* in the multiplication and conservation *in vitro* of *Cattleya elongata* and in the propagation *in vitro* of *Comanthera mucugensis* and *Vellozia harleyi*, species present in the Chapada Diamantina, with importance for the ornamental market and in the vegetation profiles composition of the region. For the analysis of the conservation and multiplication of *C. elongata* had been used five concentrations of the extract during 320 days of cultivation, being evidenced a significant increase of 12x in the number of responsive explantes shoots and 100% responsive explants for budding. For the cultivation of *C. mucugensis* and *V. harleyi* had been used four concentrations of the extract per 120 days, getting itself increase of 27% survival of *C. mucugensis* and promotion of the minimum growth, as well as significant increase of the number of roots and length to root of *V. harleyi*. Therefore, the extract of *A. nodosum* is indicated for conservation of *C. elongata* and has potential use in the conservation of *C. mucugensis* and in rooting *in vitro* of *V. harleyi*.

Keywords: *Cattleya elongata*. *Comanthera mucugensis*. *Vellozia harleyi*. Biostimulants. Minimum growth. Propagation *in vitro*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO 1: EXTRATO DE <i>Ascophyllum nodosum</i> PROMOVE CONSERVAÇÃO E MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Cattleya elongata</i>, ORQUÍDEA ENDÊMICA DA CHAPADA DIAMANTINA- BA	20
RESUMO	21
ABSTRACT	22
INTRODUÇÃO	23
MATERIAL E MÉTODOS.....	24
RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	30
CAPÍTULO 2: EXTRATO DE <i>Ascophyllum nodosum</i> NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE DUAS ESPÉCIES ORNAMENTAIS DA CHAPADA DIAMANTINA-BA	33
RESUMO	34
ABSTRACT	35
INTRODUÇÃO	36
MATERIAL E MÉTODOS.....	37
RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	46
CONSIDERAÇÕES FINAIS	50

INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, muitas regiões apresentam diversidade de recursos genéticos ainda pouco conhecida, como a Cadeia do Espinhaço, considerada um centro de riqueza taxonômica de plantas ornamentais microendêmicas e raras (RAPINI et al., 2008). Dentre as ornamentais dessa região, as famílias de monocotiledôneas Orquidaceae, Eriocaulaceae e Velloziaceae destacam-se por apresentarem espécies com alto endemismo e significativo potencial para a floricultura (CRUZ; BORBA; VAN DEN BERG, 2003; GIULIETTI; PIRANI, 1988; PEREIRA; BORBA; GIULIETTI, 2007).

Neste cenário, as orquídeas são relevantes para o mercado de flores, alcançando 8% do comércio internacional (CHUGH; GUHA; RAO, 2009). Em especial, o gênero *Cattleya* Lindl. é conhecido por possuir espécies muito vistosas e apresentar grande importância para produção de híbridos (OLIVEIRA et al., 2021). Dentre as espécies deste gênero, com ocorrência na Chapada Diamantina, localizada na Cadeia do Espinhaço, a *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Figura 1) é caracterizada por desenvolver-se em afloramentos rochosos (CRUZ et al., 2011) e possuir alto potencial para o comércio de ornamentais. Porém, a coleta extrativista da espécie pode interferir na sua população natural (OLIVEIRA et al., 2021), sendo necessário o desenvolvimento de métodos para sua propagação e conservação.



Figura 1 – *Cattleya elongata* Barb. Rodr. Fonte: Santos, F. 2019.

Além das orquídeas, a família Eriocaulaceae é encontrada predominantemente na Cadeia do Espinhaço, seu principal centro de diversidade, onde abriga mais de 60% dos seus gêneros, sendo 85% das espécies microendêmicas (COSTA; TROVÓ; SANO, 2008). Embora ocorra principalmente em áreas de solo arenoso e pedregoso da Serra Mineira e da Chapada

Diamantina- BA, a família também tem ocorrência no Cerrado e no Bioma Amazônico (GIULIETTI; PIRANI, 1988).

Destaca-se para família o gênero *Comanthera* (basiônimo- *Syngonanthus*), em que espécies microendêmicas são popularmente denominadas de “sempre vivas”, devido à conservação da inflorescência após secagem (GIULIETTI et al., 1996). A espécie *Comanthera mucugensis* (Giul.) L.R. Parra e Giul. (Figura 2), endêmica do município de Mucugê, na Chapada Diamantina (PEREIRA; BORBA; GIULIETTI, 2007), é considerada a “sempre viva” sob maior impacto do extrativismo da Bahia, com alto valor de mercado (COSTA; TROVÓ; SANO, 2008), sendo inserida na lista de espécies ameaçadas de extinção (MMA, 2008) e classificada como “em perigo” pelo Livro Vermelho da Flora do Brasil (MARTINELLI; MORAES, 2013).

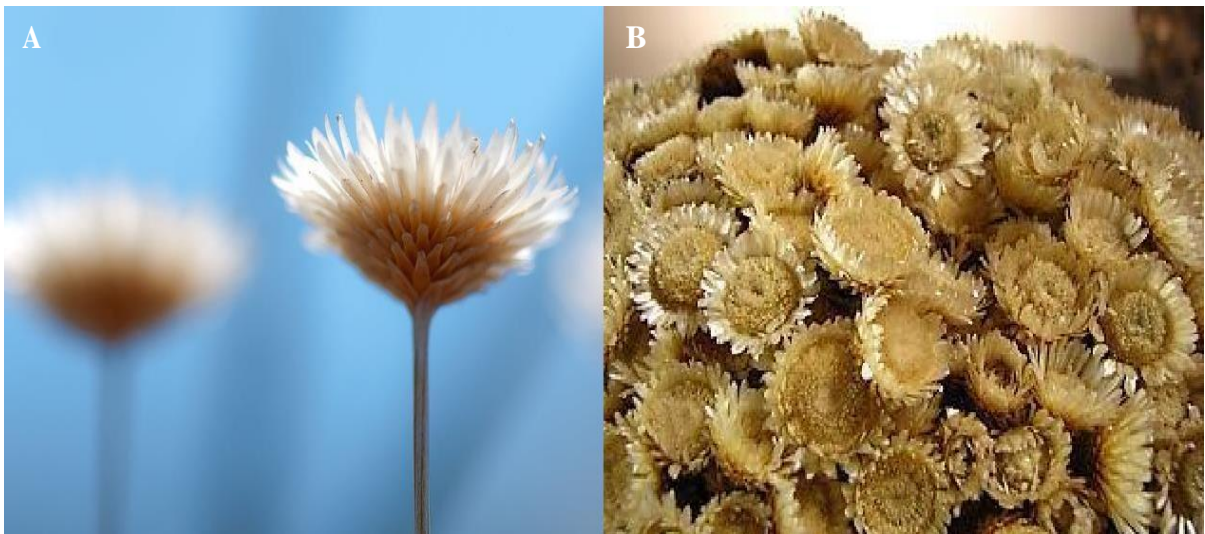


Figura 2. *Comanthera mucugensis* (Giul.) L.R. Parra e Giul. Vista inferior do capítulo (A). Buquê (B). Fonte: Pataro, L., 2010 (A), CD CHAPADA (B).

A família Velloziaceae é componente importante para a fitofisionomia da Cadeia do Espinhaço, local considerado como seu principal centro de diversidade (QUEIROZ, 2006), onde pode ser encontrada cerca de 70% de sua população (GIULIETTI; PIRANI, 1988). A espécie *Vellozia harleyi* Seub. (Figura 3) apresenta flores vistosas, com floração sub-anual e de período longo (NEVES, 2009), que confere atributos para aplicação no mercado de ornamentais. Porém, os relatos na literatura restringem-se à fenologia da floração (NEVES, 2009), sendo indispensável o desenvolvimento de estudos para avaliar a fisiologia e estabelecer estratégias de propagação da espécie.



Figura 3. *Vellozia harleyi* Seub. Vista superior da flor (A). Hábito (B). Fonte: Neves, S.P.S, 2009.

Nesse contexto, a cultura de tecidos apresenta-se como eficiente mecanismo tanto para a conservação *ex situ* como para a produção de plantas em escala comercial, por meio da micropropagação (ALVIM et al, 2020; DUCLERCQ et al., 2011).

A conservação *in vitro* é uma importante técnica para espécies ameaçadas, pois garante maior proteção contra alterações ambientais e mantém a integridade genética. A manutenção das plantas *in vitro* é facilitada por meio da redução do crescimento vegetal. O crescimento mínimo *in vitro* resulta da redução do metabolismo vegetal, que é obtida por meio da atuação de retardantes de crescimento, agentes osmóticos ou alterações nas condições de cultivo (AZIZ; AL-TAWEEL, 2019; SILVA et al., 2019).

Já a micropropagação é composta por quatro fases categorizadas em: estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimatização (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Na fase do estabelecimento, os explantes são desinfestados e inseridos em meios de cultura para crescimento inicial. Na multiplicação ocorre a formação de novos indivíduos em decorrência da totipotencialidade da célula do explante. Nesse processo, é comum a utilização de reguladores vegetais para potencializar a morfogênese, que pode ocorrer via embriogênese somática ou organogênese.

Na embriogênese somática, células formam embriões somáticos bipolares, com polos radicular e aéreo, semelhante aos embriões zigóticos (KUMAR; REDDY, 2011; ZIMMERMANN, 2010). Enquanto na organogênese ocorre a formação de uma estrutura unipolar, seja primórdio caulinar ou radicular (KUMAR; REDDY, 2011.; LEMOS, 2010). Essas duas vias podem ocorrer diretamente pelo explante, ou indiretamente, pela formação de uma massa celular desdiferenciada, chamada de calo, antes do estabelecimento das células

competentes (ESPINOSA-LEAL; PUENTE-GARZA; GARCÍA-LARA, 2018; XU; HUANG, 2014).

A fase de enraizamento consiste na formação de raízes nos brotos regenerados durante a fase de multiplicação, por meio de agentes promotores, comumente auxinas. Essa etapa é fundamental para a sobrevivência das microplantas durante a aclimatização, que é caracterizada pela adaptação ao ambiente *ex vitro*, a partir da regulação de fatores que podem interferir na sua sobrevivência (HEINTZE et al., 2018; RABAIOLLI et al., 2017).

A micropropagação possui grande influência no mercado agrícola, sendo responsável pelo fomento de bilhões de dólares nos continentes asiático, europeu e americano (BARRUETO CID, 2010). No setor florístico, a propagação *in vitro* é empregada como alternativa eficaz de produção, visto que o método convencional não é suficiente para suprir as demandas (KULUS, 2016), e possibilita o desenvolvimento de plantas ornamentais livres de pragas, com maior estabilidade genética e maior diversificação para fins comerciais (LIMA et al., 2012; SILVA et al., 2018).

A propagação *in vitro* é indicada como um mecanismo eficiente para a produção de mudas de espécies ornamentais da Chapada Diamantina, que possuem um significativo valor de mercado. Em estudos *in vitro* realizados com *C. elongata*, Viana (2013) sugeriu a dispensa de reguladores para a formação de brotos, o que diminui a probabilidade de variação somaclonal e redução nos custos para a produção de mudas micropropagadas. O autor também relatou a eficiência do meio alternativo contendo aditivos orgânicos como polpas de banana, tomate, mamão, e água de coco, para o cultivo *in vitro* da espécie. Oliveira et al. (2021) avaliaram o desenvolvimento *in vitro* de *C. elongata* e estabeleceram o meio MS^{1/2} como o mais favorável para o seu crescimento, porém, com baixa taxa de multiplicação *in vitro* (1,3 brotos/planta). Assim, torna-se necessário a avaliação de diferentes suplementações ao meio de cultura que favoreçam a multiplicação da espécie com maior eficiência.

Nos últimos dez anos, estudos *in vitro* sobre *C. mucugensis* relataram a atuação de agentes osmóticos, temperatura e reguladores vegetais na conservação da espécie (LIMA-BRITO et al., 2011a; LIMA-BRITO et al. 2015), bem como avaliaram sua micropropagação, por meio da análise da germinação e crescimento inicial *in vitro* (LIMA, 2020), capacidade organogênica (LIMA-BRITO et al. 2011b; ALBUQUERQUE, 2013), indução de calos com potencial embriogênico (GURGEL, 2017), rustificação e aclimatização de microplantas (LIMA-BRITO et al., 2016; PEREIRA et al., 2017). Recentemente, Lima, Lima-Brito e Santana (2021) sinalizaram a necessidade de novos estudos para aprimorar a produção de mudas *in vitro* de *C. mucugensis*.

O gênero *Vellozia* aparece em estudos *in vitro* desenvolvidos por Freitas-Neto (2009), que avaliou a micropropagação de *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult f., e Borges et al. (2020), que estimularam a produção de brotos de *Vellozia pyrantha* A. A. Conc. utilizando o fogo como ferramenta para multiplicação *in vitro*. Porém, ainda não há pesquisas que descrevem a propagação de *V. harleyi*, sendo este o primeiro estudo utilizando a técnica da cultura de tecidos para o cultivo dessa espécie.

Carmo, Moura e Lima-Brito (2020) utilizaram extrato de macroalgas marinhas para o cultivo *in vitro* de *C. mucugensis*, e obtiveram aumento na taxa proliferativa e redução do crescimento. Porém, os autores observaram queda na porcentagem de sobrevivência devido à condição de estresse osmótico ocasionada pela suplementação do meio com o extrato. Deste modo, torna-se necessário avaliar as melhores concentrações e mecanismos de atuação de diferentes extratos de macroalgas marinhas em culturas *in vitro*.

O uso de extratos de macroalgas marinhas tem destaque no cultivo *in vitro* de plantas devido aos seus diversos benefícios (CARMO; MOURA; LIMA-BRITO, 2021). O extrato da macroalga parda *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis (ANE) é indicado como de grande importância para o mercado agrícola internacional (HURTADO et al., 2009). Predominante em águas marinhas do hemisfério norte, *A. nodosum* é rica em manitol, alginato, poliuronídeos e nutrientes (BATTACHARYYA et al., 2015; KHAN et al., 2009) e é considerada a alga mais pesquisada para fins agrícolas por promover aumentos importantes na produtividade e proporcionar diferentes benefícios para os cultivos (SHUKLA et al., 2019).

Há diversos relatos na literatura que abordam a eficiência de ANE no cultivo vegetal, dentre eles: aumento da produtividade (IGNA; MARCHIORO, 2010), maior crescimento vegetal sob estresse hídrico e salino (ELANSARY et al., 2017; XU; LESKOVAR, 2015), produção de frutos e biomassa (ALI et al., 2015), maior vigor de sementes (CARVALHO et al., 2013), aumento do número de folhas, teor de proteínas e clorofila (HIDANGMAYUM; SHARMA, 2017), e potencialização do teor de antocianinas (FRIONI et al., 2018).

Apesar de ser preferencialmente utilizado em casa de vegetação, estudos indicam o extrato da macroalga *A. nodosum* como eficiente bioestimulante no cultivo *in vitro* de plantas. Em trabalhos realizados com a espécie *Arabidopsis thaliana*, o uso de ANE potencializou a síntese de fito-hormônios (WALLY et al., 2013), favorecendo o crescimento da parte aérea e radicular da espécie (RAYORATH et al. 2008). Além disso, o extrato foi reportado como indutor de brotação *in vitro* de *Capparis decídua* (Forsk) Edgew (AHLAWAT et al., 2021) e na estimulação da atividade antioxidante de *Spinacia oleracea* L. (FAN et al., 2013).

Os resultados relatados indicam que o extrato de *A. nodosum* é um eficiente bioestimulante e apresenta potencial uso no cultivo *in vitro*, sendo necessário o desenvolvimento de novas pesquisas, a fim de avaliar sua atuação em diferentes espécies vegetais, e suas atribuições fisiológicas no desenvolvimento das mudas *in vitro*. Este é o primeiro relato da aplicação desse bioestimulante em plantas ornamentais da Chapada Diamantina-BA, as quais carecem de estudos que promovam a sua propagação e conservação. Nesse contexto, esse trabalho objetivou avaliar a utilização do extrato de *A. nodosum* na conservação *in vitro* de *C. elongata* (Capítulo 1), e no cultivo *in vitro* das espécies *C. mucugensis* e *V. harley* (Capítulo 2).

REFERÊNCIAS

- AHLAWAT, J. et al. *Ascophyllum nodosum*: a Potential Substitute for Synthetic Hormones for Tissue Culture Propagation of *Capparis decidua* (Forsk) Edgew. **Regenerative Engineering and Translational Medicine**, p. 1-7, 2021.
- ALBUQUERQUE M.M.S. **Micropropagação e conservação *in vitro* de “sempre vivas” nativas da Chapada Diamantina – Ba.** 2013. 100 f. (Dissertação de mestrado)- Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2013.
- ALI, N. et al. The effect of *Ascophyllum nodosum* extract on the growth, yield and fruit quality of tomato grown under tropical conditions. **Journal of applied phycology**, v. 28, n. 2, p. 1353-1362, 2015.
- ALVIM, B.F.M. et al. *In vitro* conservation of *Amburan cearensis* (Fabaceae). **Ciência Rural**, v. 50, n. 7, 2020.
- AZIZ, R.A.; AL-TAWEEL, S.K. Effect of plant growth retardants on *Stevia (Stevia rebaudiana bertonii)* acclimatization produced *in vitro*. **Plant Archives**, v. 19, n. 1, p. 1275-1284, 2019.
- BARRETO CID, L.P. **Cultivo *in vitro* de plantas.** 1 ed. Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 303 p.
- BATTACHARYYA, D. et al. Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 39-48, 2015.
- BORGES, B. P. et al. Fire as a novel technique to stimulate adventitious shoots in the laboratory. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 143, n. 3, p. 709-713, 2020.
- CARMO, L.P.; MOURA, C. W. N.; LIMA-BRITO, A. Red macroalgae extracts affect *in vitro* growth and bud formation in *Comanthera mucugensis* (Giul.) LR Parra & Giul., an endemic dry flower species from the Chapada Diamantina (Brazil). **South African Journal of Botany**, v. 135, p. 29-34, 2020.

CARMO, L.P.; MOURA, C.W.N.; LIMA-BRITO, A. Effects of seaweed extracts on the *in vitro* multiplication of plants. In: **Biostimulants for Crops from Seed Germination to Plant Development**. Academic Press, 2021. p. 211-230.

CARVALHO, M.E.A. et al. Seaweed extract improves the vigor and provides the rapid emergence of dry bean seeds. **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science**, Dubai, v. 13, p. 1104-1107, 2013.

CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, I. U. Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. **Scientia Horticulturae**, v. 122, n. 4, p. 507-520, 2009.

COSTA F.N.; TROVÓ M.; SANO P.T. Eriocaulaceae na Cadeia do Espinhaço: riqueza, endemismos e ameaças. **Megadiversidade**, v. 4, p. 117-125, 2008.

CRUZ, D.T. et al. Genetic and morphological variability in *Cattleya elongata* Barb.Rodr.(Orchidaceae), endemic to the campo rupestre vegetation in northeastern Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, v. 294, n. 1-2, p. 87, 2011.

CRUZ, D.T.; BORBA, E.; VAN DEN BERG, C. O gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) no estado da Bahia. *Sitientibus*, **Série Ciências Biológicas**, v. 3, p. 26-34, 2003.

DUCLERCQ, J. et al. De novo shoot organogenesis: from art to science. **Trends in plants science**, v. 16, n. 11, p. 597-606, 2011.

ELANSARY, H.O. et al. Seaweed extracts enhance Salam turfgrass performance during prolonged irrigation intervals and saline shock. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 830, 2017.

ESPINOSA-LEAL, C.A.; PUENTE-GARZA, C.A.; GARCÍA-LARA, S. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. **Planta**, v. 248, n. 1, p. 1-18, 2018.

FAN, D. et al. A commercial extract of brown macroalga (*Ascophyllum nodosum*) affects yield and the nutritional quality of spinach in vitro. **Communications in soil science and plant analysis**, v. 44, n. 12, p. 1873-1884, 2013.

FREITAS-NETO, O.G. de. **Micropropagação e anatomia foliar de Canela-de-Ema (*Vellozia flavicans* Mart. Ex Schult f.-Velloziaceae) em diferentes condições ambientais**. 2009. 82 f. (Dissertação de mestrado)- Universidade de Brasília.

FRIONI, T. et al. Effects of a biostimulant derived from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* on ripening dynamics and fruit quality of grapevines. **Scientia horticulturae**, v. 232, p. 97-106, 2018.

GIULIETTI, A. M.; PIRANI, J. R. Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia. In Heyer, W. R. & Vanzolini, P. E. Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns. **Academia Brasileira de Ciências**, p. 39-69, 1988.

GIULIETTI, A.M. et al. Studies in "sempre-vivas" (everlasting plants): taxonomy focusing the species from Minas Gerais, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 10, n. 2, p. 329-377, 1996.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa CNPH, 1998. p. 183-260.

GURGEL, Z.E.D.R. **Micropropagação e conservação de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis***. 2017. 93 f. (Tese de doutorado)- Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia.

HEINTZE, W. et al. *Ex vitro* acclimatization of *Hippeastrum reticulatum* (Amaryllidaceae) using different substrates. **Ciência Rural**, v. 48, n. 12, 2018.

HIDANGMAYUM, A.; SHARMA, R. Effect of different concentrations of commercial seaweed liquid extract of *Ascophyllum nodosum* as a plant bio stimulant on growth, yield and biochemical constituents of onion (*Allium cepa* L.). **J. Pharmacogn. Phytochem**, v. 6, n. 4, p. 658-663, 2017.

HURTADO, A.Q. et al. Use of Acadian marine plant extract powder from *Ascophyllum nodosum* in tissue culture of *Kappaphycus* varieties. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 6, p. 633, 2009.

IGNA, R.D.; MARCHIORO, V.S. Manejo de *Ascophyllum nodosum* na cultura do trigo. **Cultivando o Saber**, v. 3, p. 64-71, 2010.

KHAN, W. et al. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 28, n. 4, p. 386-399, 2009.

KULUS, D. Application of cryogenic technologies and somatic embryogenesis in the storage and protection of valuable genetic resources of ornamental plants. In: **Somatic embryogenesis in ornamentals and its applications**. Springer, New Delhi, 2016.

KUMAR, N.; REDDY, M.P. In vitro plant propagation: a review. **Journal of forest and environmental science**, v. 27, n. 2, p. 61-72, 2011.

LEMONS, E.E.P. Organogênese. In: BARRETO CID, L. P. **Cultivo *in vitro* de plantas**. 1 ed. Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p. 103-127 p.

LIMA C.O.C. et al. Organogênese direta de *Orthophytum mucugense*. **Ciência Rural.**, v.42, n.2, fev., 2012.

LIMA, A.P.P.S. **Micropropagação e conservação *in vitro* de ornamentais endêmicas da Chapada Diamantina– BA: Aspectos fisiológicos e morfohistológicos** . 2020. 145 f. (Tese de doutorado), Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia.

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

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

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

LIMA-BRITO, A. et al. Plant growth regulators for *in vitro* minimal growth of *Comanthera mucugensis*. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 11, n. 1, 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 Ciência Agronômica**, v. 47, p. 152-161, 2016.

MARTINELLI, G.; MORAES, M.A.(Orgs). **Livro vermelho da flora do Brasil**. 1ª ed. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013, 499 p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Instrução Normativa. Disponível em: https://www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/_arquivos/83_19092008034949.pdf. Acesso em 05 de junho de 2020

NEVES, S.P.S. **Fenologia, biologia floral e polinização de espécies de Velloziaceae Endl. em área de campo rupestre na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil**.2009. 67 f. (Dissertação de mestrado)- Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia.

OLIVEIRA, J. et al. Efficient *in vitro* plantlet development and acclimatization of *Cattleya elongata* Barb. Rodr., a Brazilian endemic and neglected species. **South African Journal of Botany**, v. 141, p. 77-82, 2021.

PEREIRA, A.C.S.; BORBA, E.L.; GIULIETTI, A.M. Genetic and morphological variability of the endangered *Syngonanthus mucugensis* Giul.(Eriocaulaceae) from the Chapada Diamantina, Brazil: implications for conservation and taxonomy. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 153, p.401-416, 2007.

PEREIRA, L.S. et al. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on survival and growth of micropropagated *Comanthera mucugensis* spp. *mucugensis* (Eriocaulaceae). **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 20, p. 1772-1780, 2017.

QUEIROZ, L.P. Angiospermas do Semiárido Brasileiro. In. QUEIROZ, L.P.; RAPINI, A.; GIULIETTI, A.M. Rumo ao Amplo Conhecimento da Biodiversidade do Semiárido Brasileiro. **Ministério da Ciência e Tecnologia**. Brasília, Brasil, 2006.

RABAIOLLI, S.M.S. et al. Agar does not affect *in vitro* rhizogenesis and *ex vitro* acclimatization of *Handroanthus chrysotrichus*. **Cerne**, v. 23, p. 185-192, 2017.

RAPINI, A. et al. A flora dos Campos Rupestre da Cadeia do Espinhaço. In: AZEVEDO, A. A.; FONSECA, R. L.; MACHADO, R. B. Cadeia do Espinhaço: Avaliação do conhecimento científico e prioridade de conservação. **Megadiversidade**, v. 4, p. 15-23, 2008.

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, n. 4, p. 423-429, 2008.

SHUKLA, P.S. et al. *Ascophyllum nodosum*-based biostimulants: sustainable applications in agriculture for the stimulation of plant growth, stress tolerance, and disease management. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 655, 2019.

SILVA, D.P.C. et al. *In vitro* conservation of ornamental plants. **Ornamental Horticulture**, v. 24, n. 1, p. 28-33, 2018.

SILVA, T. dos S. et al. Conservação *in vitro* de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) LP Queiroz sob condições de crescimento mínimo. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 43, 2019.

VIANA, C.M. **Propagação e conservação *in vitro* de *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae Juss.)**. 2013. 95 f. (Dissertação de mestrado)- Universidade Federal da Bahia.

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, n. 2, p. 324-339, 2013.

XU, C., LESKOVAR, D. L. Effects of *A. nodosum* seaweed extracts on spinach growth, physiology and nutrition value under drought stress. **Scientia Horticulturae**, v. 183, p. 39-47, 2015.

XU, L.; HUANG, H. Genetic and epigenetic controls of plant regeneration. **Current topics in developmental biology**, v. 108, p. 1-33, 2014.

ZIMMERMANN, M.J. Embriogênese somática. In: BARRETO CID, L. P. **Cultivo *in vitro* de plantas**. 1 ed. Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p. 67-101 p.

CAPÍTULO 1

**EXTRATO DE *Ascophyllum nodosum* PROMOVE CONSERVAÇÃO E
MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Cattleya elongata*, ORQUÍDEA ENDÊMICA DA
CHAPADA DIAMANTINA- BA**

RESUMO

Cattleya elongata é uma orquídea endêmica da Chapada Diamantina que possui elevado potencial ornamental. Porém, devido à coleta extrativista e a redução das populações naturais, torna-se necessário desenvolver e potencializar mecanismos para sua conservação e propagação. Nesse contexto, a cultura de tecidos vegetais pode ser uma alternativa para a produção em escala comercial e conservação *ex situ* da espécie. A suplementação do meio de cultura com bioestimulantes vegetais, como o extrato da macroalga *Ascophyllum nodosum*, apresenta-se como possível otimizador desses processos. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o uso do extrato de *A. nodosum* na conservação e multiplicação *in vitro* de *C. elongata*, sendo o primeiro estudo que avalia o efeito de *A. nodosum* na cultura *in vitro* de orquídeas. As microplantas foram cultivadas em meio MS^{1/2} suplementado com cinco concentrações do extrato (0,0; 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 g L⁻¹). Após 320 dias, foram analisados: percentual de sobrevivência, comprimento da parte aérea, número de folhas verdes e senescentes, massa seca total dos explantes, número de brotos por planta e porcentagem de plantas com brotos. O extrato induziu o crescimento mínimo da espécie, no entanto, em altas concentrações, causou um declínio na sobrevivência das plantas. Em baixas concentrações, apresentou eficiência significativa na multiplicação *in vitro*, com aumento de 12x no número de brotos e 100% de explantes responsivos para brotação. Portanto, o extrato de *A. nodosum* viabiliza a conservação *in vitro* de *C. elongata* e influencia consideravelmente a sua multiplicação *in vitro*.

Palavras-chave: Macroalga marinha. Crescimento mínimo. Organogênese. Ornamentais. *Cattleya elongata*.

ABSTRACT

Cattleya elongata is an endemic orchid from Chapada Diamantina that has huge decorative potential. Due to extractivism and reduction of natural population, it is necessary to develop and potentialize mechanisms to its conservation and propagation. Plant tissue culture could be an alternative for production in commercial scale and *ex situ* conservation of this species. The supplementation of the culture medium with vegetal bio stimulators, such as the macroalgae *Ascophyllum nodosum*, observed as the possible optimizer of those processes. Thus, this work aimed at evaluating the usage of the *A. nodosum* extract in the conservation and *in vitro* multiplication of *C. elongata*. The microplants were raised in MS $\frac{1}{2}$ medium, supplemented with five concentrations of the extract (0,0; 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 g L⁻¹). 320 days later, the survival percentage, aerial parts height, number of green and senescent leaves, total dry mass of the explants, number of sprouts per plant and percentage of plants with sprouts were analyzed. The extract led to a minimum growth of the species, however, in high concentrations, it caused a decrease in the survival of the plants. In low concentrations, it presented significant efficiency *in vitro* propagation, having approximately 12x in the number shoots and 100% responsive explants for shoots, in comparison with the control. In conclusion, the *A. nodosum* extract makes viable the *in vitro* conservation of *C. elongata* and considerably influences it's *in vitro* multiplication. This is the first study that evaluates the *A. nodosum* effects on an *in vitro* orchid culture.

Keywords: *Ascophyllum nodosum*. Minimal growth. Organogenesis. Ornamental. *Cattleya elongata*.

INTRODUÇÃO

Cattleya elongata Barb. Rodr. é endêmica e abundante na Chapada Diamantina (CONCEIÇÃO; GIULIETTI; MEIRELLES., 2007) com elevado valor ornamental. Porém, devido à constante retirada de suas populações nos locais de ocorrência (CRUZ et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2021), é indicada como ameaçada na Convention on International Trade in Endangered Species of wild Fauna and Flora (CITES, 2017), o que torna necessário o desenvolvimento de métodos para a sua multiplicação e conservação.

A cultura de tecidos é uma alternativa viável para a produção e multiplicação de plantas ameaçadas, e apresenta excelentes benefícios para a conservação *in vitro*, devido à otimização do espaço físico e maior proteção contra ações ambientais. O mecanismo da conservação *in vitro* ocorre por meio da redução do metabolismo vegetal, que pode ser obtida por alterações no ambiente ou no meio de cultura, com a adição de agentes osmóticos ou de retardantes do crescimento (AZIZ; AL-TAWEEL, 2019; KAMIŃSKA et al., 2016; SILVA et al., 2019).

O estudo conduzido por Oliveira et al. (2021) demonstrou que a propagação *in vitro* é uma alternativa para produção de mudas de *C. elongata*. Os autores inferem que a espécie se desenvolve melhor quando submetida ao meio Murashige e Skoog (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade das concentrações salinas ($MS\frac{1}{2}$). Porém, as melhores taxas de brotação obtidas foram de apenas 1,2 e 1,3 brotos/planta, sendo necessário otimizar o protocolo de multiplicação *in vitro* da espécie.

Nesse sentido, o uso de bioestimulantes derivados de macroalgas tem sido adicionado ao meio de cultura a fim de promover a propagação *in vitro* (CARMO; MOURA; LIMA-BRITO, 2020; DE ARAÚJO AMATUZZI et al., 2020). Os efeitos estimulatórios devem-se aos nutrientes, fito-hormônios, vitaminas, aminoácidos, polissacarídeos, betaína e compostos fenólicos que são constituintes comuns em algas e que promovem melhorias nos mecanismos fisiológicos das culturas vegetais (BATTACHARYYA et al., 2015). No cultivo de orquídeas, estudos demonstraram a eficiência de extratos de algas para a multiplicação *in vitro* das espécies *Cattleya labiata* Lindl. (CORBELLINI et al., 2020) e *Epidendrum secundum* Jacq. (DE ARAÚJO AMATUZZI et al., 2020) e para o crescimento *in vitro* de *Vanda tricolor* Lindl. (ADIGUNA; DWIATI; KAMSINAH, 2018).

Ascophyllum nodosum (L.) Le Jolis é uma macroalga marinha parda e um dos bioestimulantes mais utilizados no comércio agrícola internacional. O extrato de *A. nodosum* (ANE) possui a capacidade de potencializar a síntese de fito-hormônios e favorecer o aumento de proteínas (HIDANGMAYUM; SHARMA, 2017; WALLY et al., 2013). Estudos *in vitro*

indicaram a eficiência de ANE na potencialização da produção endógena de citocininas, promoção de maior tolerância ao estresse térmico e atividade antioxidante (FAN et al., 2013; RAYIRATH et al., 2009; WALLY et al. 2013). Recentemente, foi demonstrado que o extrato aumentou o crescimento *in vitro* e a produção de brotos de *Capparis decidua* (Forsk) Edgew (AHLAWAT et al., 2021). Porém, o efeito de ANE como bioestimulante está condicionado à concentração utilizada, podendo limitar as características morfológicas quando em abundância (HIDANGMAYUM; SHAMA, 2017). Portanto, é necessário avaliar o desempenho do extrato em diferentes concentrações e espécies vegetais (WALLY et al. 2013).

A partir da necessidade de conservar e propagar a orquídea *C. elongata* e o potencial uso de ANE no cultivo vegetal, esta pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito do extrato na conservação e multiplicação *in vitro* dessa espécie. Esse é o primeiro relato dos efeitos de ANE no cultivo *in vitro* de orquídeas.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo do extrato *Ascophyllum nodosum*

Inicialmente, o extrato comercial Acadian[®] da macroalga parda *A. nodosum* foi submetido à secagem em estufa (60°C) por 24h, e macerado com auxílio de almofariz e pistilo. O extrato seco foi pesado em balança de precisão e diluído em água aquecida antes da sua adição ao meio de cultura.

Cultivo *in vitro* de *Cattleya elongata*

As microplantas de *C. elongata*, utilizadas como explantes, foram pré-estabelecidas de sementes germinadas em meio MS^{1/2} acrescido de 6 g L⁻¹ de ágar, 15 g L⁻¹ de sacarose e 2 g L⁻¹ de carvão ativado. Após 120 dias de cultivo, as microplantas com 0,5 ± 0,1 cm de comprimento foram transferidas para tubos contendo 15 mL de meio MS^{1/2} acrescido de 6 g L⁻¹ de ágar e 15 g L⁻¹ de sacarose, suplementado com cinco concentrações de ANE (0,0; 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 g L⁻¹).

Após 320 dias, as plantas foram submetidas à avaliação da porcentagem de sobrevivência, comprimento da parte aérea (cm), números de folhas verdes e senescentes e massa seca total (mg). Também foram analisados o número de brotos por planta e a porcentagem de plantas com brotos.

Condições de cultivo

O cultivo foi conduzido em sala de crescimento com fotoperíodo de 14 h/luz, temperatura de $25 \pm 3^\circ \text{C}$ e radiação fotossintética ativa de $60 \mu\text{m.m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Após ajuste do pH para 5,7, o meio foi autoclavado por 15 min a 121°C .

Delineamento e Análise Estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições de quatro amostras por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o software R (R CORE TEAM, 2018), e as médias foram analisadas por regressão ou comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 320 dias, observou-se que a utilização de $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de ANE promoveu 100% de sobrevivência das microplantas *in vitro*, semelhante ao controle. Porém, os dados demonstraram que houve uma redução linear decrescente da sobrevivência em resposta ao aumento da concentração do extrato no meio de cultura (Figura 1).

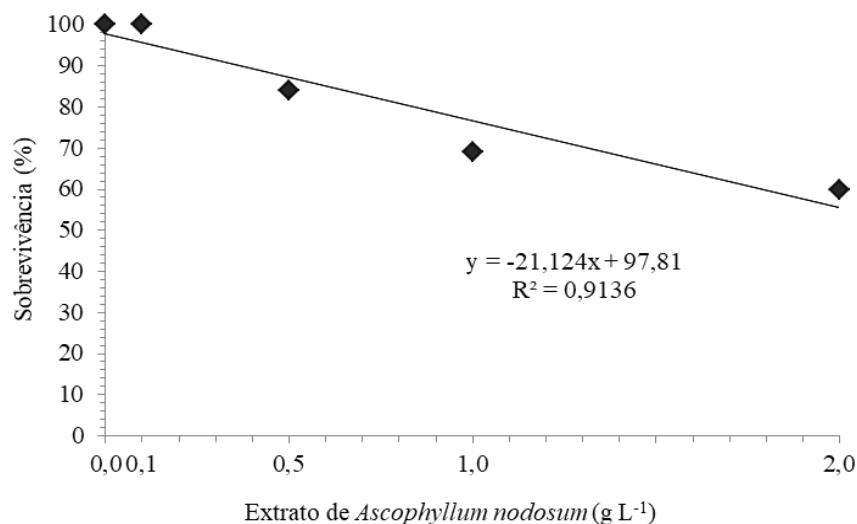


Figura 1 - Porcentagem de sobrevivência de microplantas de *Cattleya elongata*, aos 320 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações do extrato de *Ascophyllum nodosum*.

O aumento da concentração de ANE afetou proporcionalmente o declínio da sobrevivência *in vitro* de *C. elongata*. Essa queda da sobrevivência em resposta ao aumento da concentração foi demonstrada na aplicação de manitol, polietilenoglicol (PEG) e ácido abscísico na conservação *in vitro* de *Vanilla planifolia* Jacks. (BELLO-BELLO; GARCÍA-GARCÍA; IGLESIAS-ANDREU, 2015), resultados semelhantes também foram obtidos por Ramírez-Mosqueda et al. (2019), que indicaram que altas concentrações do osmorregulador

PEG causam redução da sobrevivência *in vitro* de *Laelia anceps* Lindl. por promover maior estresse osmótico.

A suplementação do meio com ANE também influenciou todas as variáveis de crescimento *in vitro* de *C. elongata*. O extrato promoveu redução do comprimento da parte aérea e da massa seca total, agindo como retardante do crescimento *in vitro* de *C. elongata* (Figura 2), o que sugere o seu potencial uso para a conservação *in vitro* de plantas.

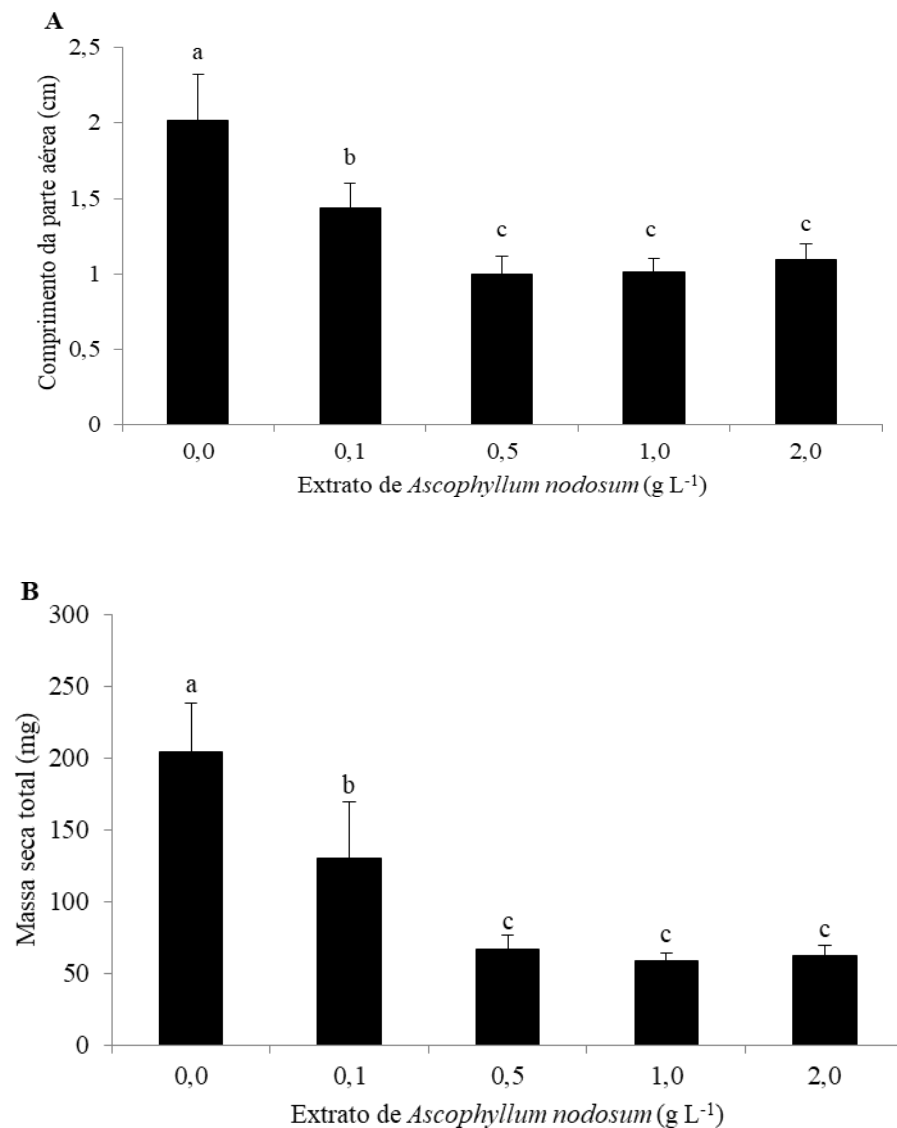


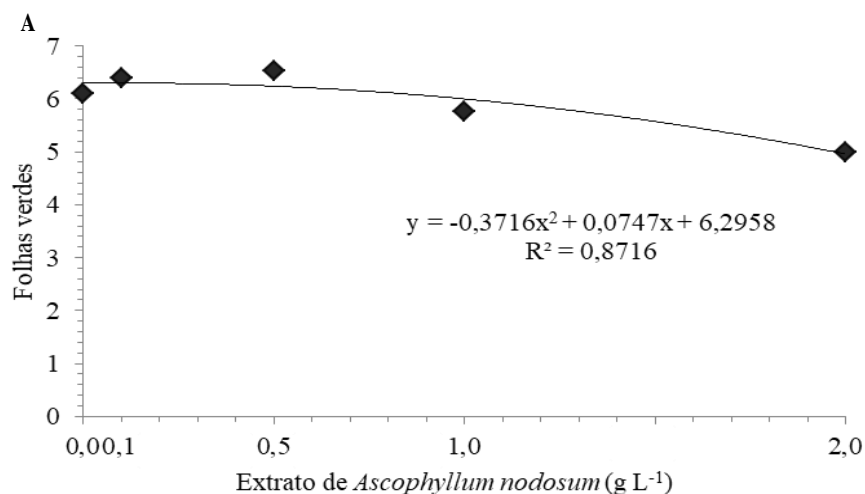
Figura 2 - Efeito do extrato de *Ascophyllum nodosum* no comprimento da parte aérea (A) e massa seca de *Cattleya elongata* (B), após 320 dias de cultivo *in vitro*. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

A redução do potencial osmótico do meio, decorrente do aumento da concentração de soluto, limitou a expansão celular dos tecidos vegetais, e, como consequência, houve a redução do crescimento e declínio da sobrevivência de *C. elongata*. Resultado semelhante foi

reportado por Carmo, Moura, Lima-Brito (2020) que demonstraram a diminuição da sobrevivência e do crescimento *in vitro* de *Comanthera mucugensis* (Giul.) L. R. Parra & Giul. em meio suplementado com altas concentrações do extrato da macroalga *Agardhiella subulata* (C. Agardh) Kraft & M. J. Wynne. Isso reforça a hipótese de que o extrato, em altas concentrações, apresenta função de agente osmótico no meio, induzindo um efeito inibitório sobre o crescimento das plantas.

A atuação da macroalga *A. nodosum* na conservação *in vitro* de *C. elongata* está diretamente relacionada à concentração do extrato no meio de cultivo. Isso ocorre porque essa orquídea é adaptada a solos com poucos nutrientes (OLIVEIRA et al., 2021), e a composição do extrato tem abundante teor nutricional, carboidratos e proteínas (SHARMA et al., 2013; SUBRAMANIAN et al., 2011), o que pode promover estresse osmótico e salino para a planta, quando em alta concentração, e limitar suas características morfológicas CARMO; MOURA; LIMA-BRITO, 2020; HIDANGMAYUM; SHAMA, 2017). A redução do potencial osmótico do meio, decorrente do aumento da concentração de soluto, limitou a expansão celular dos tecidos vegetais, e, como consequência, houve a redução do crescimento e declínio da sobrevivência de *C. elongata*.

A suplementação com baixas concentrações de ANE favoreceu o desenvolvimento foliar. Os dados obtidos para números de folhas verdes e senescentes apresentaram comportamento quadrático em função da concentração do extrato. Foi apresentado uma tendência decrescente após ponto de máxima de 6,3 folhas verdes com uso de 0,1 g L⁻¹ de ANE, e uma redução da senescência foliar, obtendo o ponto mínimo de 2,2 folhas senescentes, na dosagem de 0,62 g L⁻¹ do extrato (Figura 3).



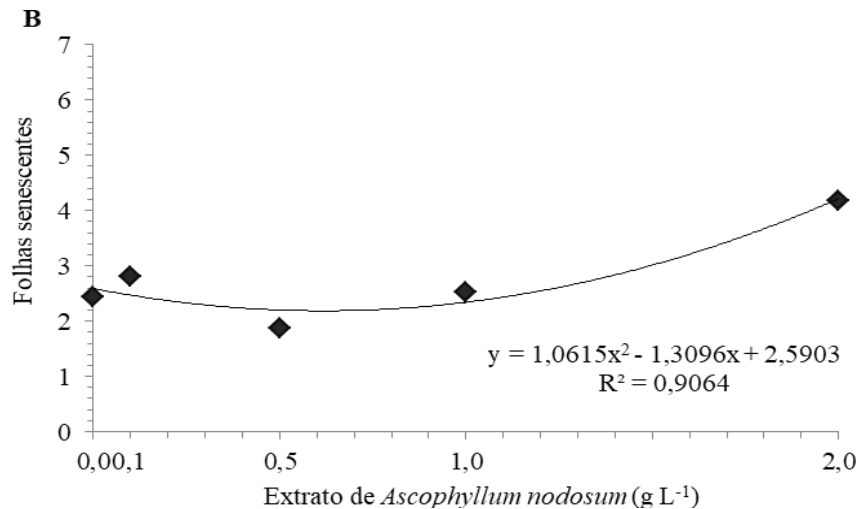


Figura 3 - Influência de diferentes concentrações do extrato de *Ascophyllum nodosum* no número de folhas verdes (A) e no número de folhas senescentes de *Cattleya elongata* (B), aos 320 dias de cultivo *in vitro*.

O melhor desenvolvimento foliar de *C. elongata*, observado com a suplementação do meio com ANE, corroboram estudos realizados com outras orquídeas *in vitro*, nos quais utilizou-se suplementos orgânicos ao meio de cultura. Araújo et al. (2006) obtiveram 8,36 folhas verdes/plântula, a partir da adição de 100 mL⁻¹ de água de coco no cultivo *in vitro* de plântulas híbridas *Cattleya loddgesii* 'Grande' x *Cattleya loddgesii* 'Alba'. Do mesmo modo, o acréscimo de 50 mg L⁻¹ do extrato da macroalga vermelha *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C. Silva no meio de cultivo, favoreceu o desenvolvimento foliar e radicular em *E. secundum*, uma orquídea nativa da Mata Atlântica (DE ARAÚJO AMATUZZI et al. 2020).

O extrato de *A. nodosum*, em baixa concentração (0,1 g L⁻¹), apresenta potencial uso para a conservação *in vitro* de *C. elongata*, visto que não interfere na sobrevivência *in vitro*, reduz o crescimento da parte aérea e promove maior número de folhas verdes, podendo ser aplicado como alternativa ao uso de osmorreguladores e inibidores de crescimento de alto custo. A avaliação da conservação *in vitro* de *C. elongata* foi aos 320 dias de cultivo e a suplementação com 0,1 g L⁻¹ de ANE promoveu 100% de sobrevivência.

O ANE influenciou significativamente a multiplicação *in vitro* de *C. elongata*, com o aumento de 0,6 brotos/planta (controle) para 7,3 brotos/planta (0,1 g L⁻¹ do extrato), o que representa um aumento significativo de, aproximadamente, 12x na taxa de multiplicação *in vitro* da espécie (Figura 4A). A concentração de 0,1 g L⁻¹ do extrato promoveu a maior média para número de brotos por planta, não diferindo apenas do tratamento com 0,5 g L⁻¹. Resultado similar foi obtido quanto à porcentagem de explantes com brotos, em que os tratamentos com 0,1 e 0,5 g L⁻¹ de ANE obtiveram 100% e 73%, respectivamente, diferindo do controle (30%) e da maior concentração utilizada (25%) (Figura 4B).

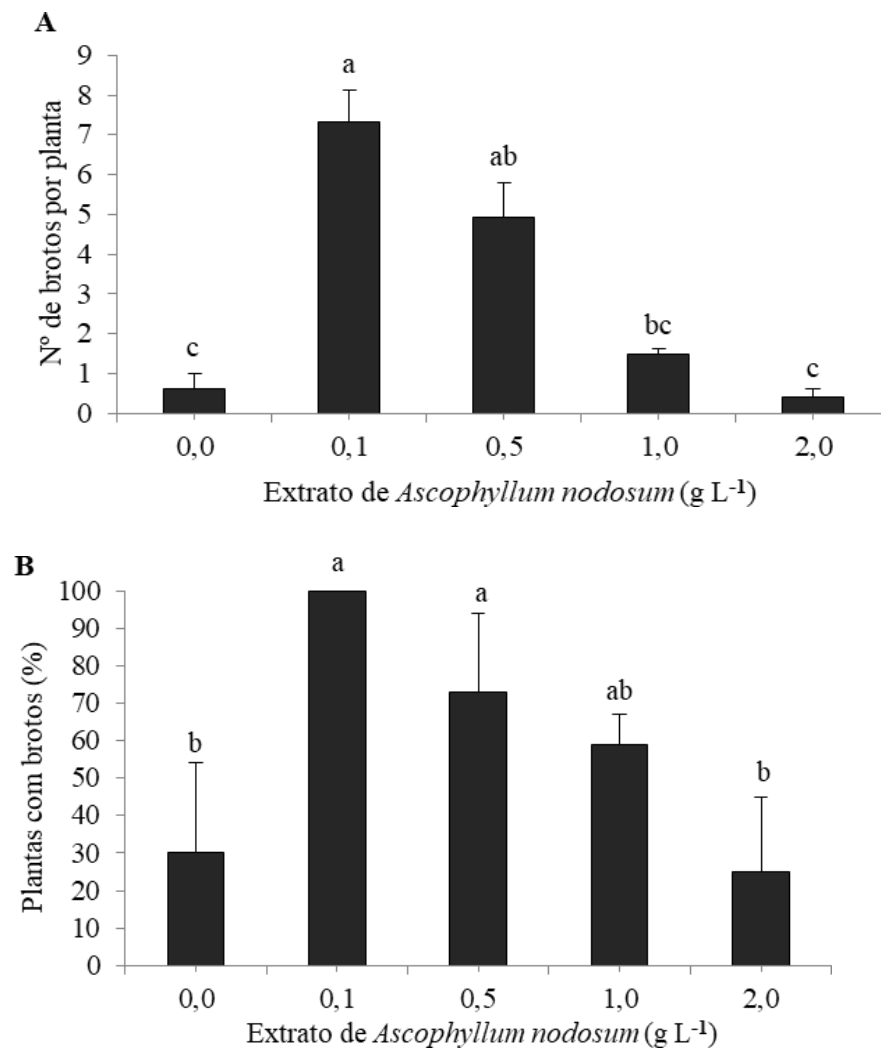


Figura 4 - Número de brotos por planta (A) e porcentagem de plantas com brotos de *Cattleya elongata* (B), aos 320 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações do extrato de *Ascophyllum nodosum*. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

Tratamentos suplementados com 0,1 e 0,5 g L⁻¹ do extrato obtiveram média de 7,3 e 4,9 brotos/planta, respectivamente. Esses resultados representam um aumento de até 560% de brotos, quando comparados aos números apresentados por Oliveira et al. (2021), que, após 270 dias de cultivo, obtiveram apenas 1,3 brotos/planta em meio Vacin e Went (VACIN; WENT, 1949), o que confirma a hipótese de que o extrato de *A. nodosum* aumenta consideravelmente a produção *in vitro* de mudas de *C. elongata* (Figura 5).

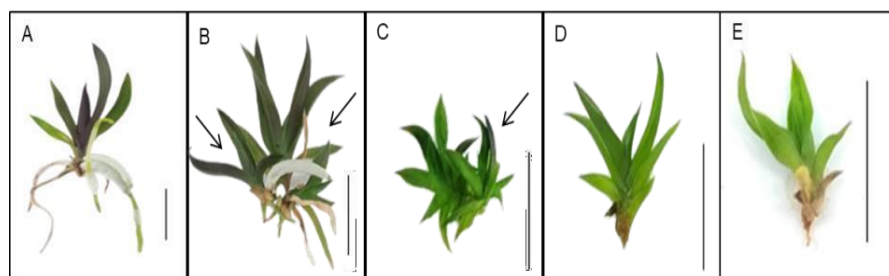


Figura 5 - Cultivo *in vitro* de *Cattleya elongata* em diferentes concentrações do extrato de *Ascophyllum nodosum*: Controle (A); 0,1 g L⁻¹ (B); 0,5 g L⁻¹ (C); 1,0 g L⁻¹ (D); 2,0 g L⁻¹ (E). Bar: 01 cm. Setas indicam brotações *in vitro*.

Estudos anteriores também reportaram que o uso de algas favorece a multiplicação *in vitro* de orquídeas. Por exemplo, Corbellini et al. (2020) evidenciaram que o extrato da microalga *Messastrum gracile* (Reinsch) T.S. Garcia é um substituto alternativo orgânico ao regulador sintético 6-benzilaminopurina (BAP) no cultivo *in vitro* de *C. labiata*. Além disso, De Araújo Amatuzzi et al. (2020) conseguiram dobrar a produção de brotos de *E. secundum* utilizando o extrato da macroalga vermelha *K. alvarezii*.

Há evidências que o extrato de ANE possui a capacidade de aumentar a concentração total de citocininas, em particular, dos tipos *trans*- e *cis*- zeatina, nas plantas (KHAN et al., 2011; SHUKLA et al., 2019; WALLY et al., 2013). Desse modo, o aumento de brotações de *C. elongata* pode estar associado à estimulação da síntese endógena de citocininas, responsáveis pela produção de gemas axilares.

CONCLUSÃO

O extrato de *Ascophyllum nodosum* atua como retardante de crescimento, favorecendo a conservação *in vitro* de *Cattleya elongata*, e estimula o aumento da taxa de multiplicação *in vitro* da espécie.

REFERÊNCIAS

- ADIGUNA, E.; DWIATI, M.; KAMSINAH, K. Penambahan Ekstrak Alga Sargassum duplicatum Bory pada Medium Kultur In Vitro terhadap Pertumbuhan seedling Anggrek Vanda tricolor Lindl. **Majalah Ilmiah Biologi BIOSFERA: A Scientific Journal**, v. 35, n. 1, p. 49-53, 2018.
- AHLAWAT, J. et al. *Ascophyllum nodosum*: a Potential Substitute for Synthetic Hormones for Tissue Culture Propagation of *Capparis decidua* (Forsk) Edgew. **Regenerative Engineering and Translational Medicine**, p. 1-7, 2021.
- ARAÚJO, A.G. et al. Água de coco e polpa de banana no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea. **Revista Ceres**, v. 53, n. 310, p. 608-613, 2006.
- AZIZ, R.A.; AL-TAWEEL, S.K. Effect of plant growth retardants on Stevia (*Stevia rebaudiana bertonii*) acclimatization produced *in vitro*. **Plant Archives**, v. 19, n. 1, p. 1275-1284, 2019.
- BATTACHARYYA, D. et al. Extratos de algas marinhas como bioestimulantes em horticultura. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 39-48, 2015.

BELLO-BELLO, J.J.; GARCÍA-GARCÍA, G.G.; IGLESIAS-ANDREU, L. Conservación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) bajo condiciones de lento crecimiento *in vitro*. **Revista fitotecnica mexicana**, v. 38, n. 2, p. 165-171, 2015.

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

CITES, Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. Apêndices II, 2017. Disponível em: <https://cites.org/eng/app/appendices.php>. Acesso em: 19 jun., 2020.

CONCEIÇÃO, A.A.; GIULIETTI, A.M.; MEIRELLES, S.T. Ilhas de vegetação em afloramentos de quartzito-arenito no Morro do Pai Inácio, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 2, p. 335-347, 2007.

CORBELLINI, J.R. et al. Effect of microalgae *Messastrum gracile* and *Chlorella vulgaris* on the *in vitro* propagation of orchid *Cattleya labiata*. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, n. 6, p. 4013-4027, 2020.

CRUZ, D.T. da. et al. Genetic and morphological variability in *Cattleya elongata* Barb. Rodr.(Orchidaceae), endemic to the campo rupestre vegetation in northeastern Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, v. 294, n. 1-2, p. 87, 2011.

DE ARAÚJO AMATUZZI, J.C. et al. Improved *in vitro* development of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) by using aqueous extract of the seaweed *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 42, n. 8, p. 1-9, 2020.

FAN, D. et al. A commercial extract of brown macroalga (*Ascophyllum nodosum*) affects yield and the nutritional quality of spinach *in vitro*. **Communications in soil science and plant analysis**, v. 44, n. 12, p. 1873-1884, 2013.

HIDANGMAYUM, A.; SHARMA, R. Effect of different concentrations of commercial seaweed liquid extract of *Ascophyllum nodosum* as a plant bio stimulant on growth, yield and biochemical constituents of onion (*Allium cepa* L.). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, n. 4, p. 658-663, 2017.

KAMIŃSKA, M. et al. Effect of light conditions and ABA on cold storage and post-storage propagation of *Taraxacum pieninicum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 127, n. 1, p.25-34, 2016.

KHAN, W. et al. Bioassay to detect *Ascophyllum nodosum* extract-induced cytokinin- like activity in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 409-414, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.6 p. 473-479. 1962.

OLIVEIRA, J. et al. Efficient *in vitro* plantlet development and acclimatization of *Cattleya elongata* Barb. Rodr., a Brazilian endemic and neglected species. **South African Journal of Botany**, v. 141, p. 77-82, 2021.

R CORE TEAM (2018). R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RAMÍREZ-MOSQUEDA, M. A. et al. In vitro conservation and regeneration of *Laelia anceps* Lindl. **South African Journal of Botany**, v. 121, p. 219-223, 2019.

RAYIRATH, P. et al. Lipophilic components of the brown seaweed, *Ascophyllum nodosum*, enhance freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v. 230, n. 1, p. 135-147, 2009.

SHARMA, H.S.S. et al. Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. **Journal of applied phycology**, v. 26, n. 1, p. 465-490, 2013.

SHUKLA, P.S. et al. *Ascophyllum nodosum*-based biostimulants: sustainable applications in agriculture for the stimulation of plant growth, stress tolerance, and disease management. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 655, 2019.

SILVA, T. dos S. et al. Conservação *in vitro* de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) LP Queiroz sob condições de crescimento mínimo. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 43, 2019.

SUBRAMANIAN, S. et al. Extracts of the marine brown macroalga, *Ascophyllum nodosum*, induce jasmonic acid dependent systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and *Sclerotinia sclerotiorum*. **European journal of plant pathology**, v. 131, n. 2, p. 237-248, 2011.

VACIN, E.F.; WENT, F.W. Some pH changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, v. 110, n. 4, p. 605-613, 1949.

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, n. 2, p. 324-339, 2013.

CAPÍTULO 2

**EXTRATO DE *Ascophyllum nodosum* NO CULTIVO *IN VITRO* DE DUAS ESPÉCIES
ORNAMENTAIS DA CHAPADA DIAMANTINA-BA**

RESUMO

A cultura de tecidos vegetais é indicada como eficiente mecanismo de produção de plantas sujeitas ao extrativismo e de crescimento lento, como as plantas ornamentais da Chapada Diamantina-BA, as quais carecem de pesquisas que promovam a sua propagação e conservação. Diversos trabalhos apontam que a suplementação do meio de cultura com bioestimulantes derivados de macroalgas pode aprimorar o cultivo *in vitro* de plantas. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do extrato de *A. nodosum* no cultivo *in vitro* de *C. mucugensis* e *V. harleyi*. Para isso, foram analisados o efeito de quatro concentrações do extrato (0,0; 0,1; 0,5 e 1,0 g L⁻¹) em meio MS½, no cultivo de microplantas estabelecidas *in vitro*. Após 120 dias, foram avaliados a porcentagem de sobrevivência e o crescimento das plantas. O extrato aumentou em 27% a sobrevivência de *C. mucugensis* e promoveu a redução do crescimento, quando em alta concentração (1,0 g L⁻¹). Em *V. harleyi*, o extrato incrementou significativamente o crescimento radicular, o número de folhas verdes e a massa seca total. Conclui-se que o extrato de *A. nodosum* apresenta potencial uso para conservação *in vitro* de *C. mucugensis* e promove o enraizamento *in vitro* de *V. harleyi*.

PALAVRAS CHAVE: Bioestimulante. *Comanthera mucugensis*. *Vellozia harleyi*. Enraizamento. Crescimento *in vitro*.

ABSTRACT

Plant tissue culture is indicated as an efficient mechanism for the production of plants subject to extractivism and slow growth, such as ornamental plants from Chapada Diamantina- BA, which need studies to promote their propagation and conservation. Several studies indicate that the supplementation of the culture medium with biostimulants derived from seaweed can improve the *in vitro* cultivation of plants. This study aims to evaluate the effect of *A. nodosum* (ANE) extract on *in vitro* cultivation of *Comanthera mucugensis* and *Vellozia harleyi*. For this, the effects of the four effects of the extract (0.0, 0.1, 0.5 and 1.0 g L⁻¹) in MS ½ medium, in the cultivation of established microplants *in vitro*. After 120 days, the percentage of survival and plant growth parameters were recorded. The extract increased by 27% the survival of *C. mucugensis* and promoted the reduction of growth, when in high concentration (1.0 g L⁻¹). In *V. harleyi*, the extract significantly increased root growth, number of green leaves and total dry matter. It is concluded that the *A. nodosum* extract has potential use for *in vitro* conservation of *C. mucugensis* and promotes the rooting of *V. harleyi*.

Keywords: Biostimulant. *Comanthera mucugensis*. *Vellozia harleyi*. Rooting. Growth *in vitro*.

INTRODUÇÃO

A Chapada Diamantina-Ba, porção norte da Cadeia do Espinhaço, apresenta características fitofisionômicas e microclimáticas particulares, o que promove elevado índice de endemismo de plantas (CRUZ et al., 2011; RAPINI et al., 2008).

Dentre as espécies encontradas na região, *Comanthera mucugensis* (Giul.) L. R. Parra & Giul (Eriocaulaceae), conhecida como sempre-viva de Mucugê, tem destaque no mercado de flores secas e encontra-se ameaçada devido à exploração exclusivamente extrativista e o alto grau de endemismo (LIMA-BRITO et al., 2016; PEREIRA et al., 2017).

As espécies da família Velloziaceae também apresentam grande importância para a manutenção e descrição fisionômica da Chapada Diamantina, porém, estão suscetíveis à perda de habitat para a pecuária (CONCEIÇÃO; GIULIETTI; MEIRELLES, 2007; KOLBEK; ALVES, 2008). Há poucos relatos na literatura acerca dessas espécies, como a *Vellozia harleyi* L.B.Sm. & Ayensu, o que torna necessário o desenvolvimento de pesquisas que estabeleçam métodos para a propagação e conservação desses recursos genéticos vegetais.

A técnica da cultura de tecidos vem sendo descrita na literatura como eficiente mecanismo de produção de plantas sujeitas ao extrativismo e de crescimento lento (ESPINOSA-LEAL; PUENTE-GARZA; GARCÍA-LARA, 2018; KULUS, 2016), porém, ainda não há relatos sobre a propagação de *V. harleyi*, sendo este o primeiro estudo de cultivo *in vitro* da espécie. Enquanto para *C. mucugensis*, Lima, Lima-Brito e Santana (2021) elencaram os estudos *in vitro* realizados com a espécie e concluíram que a técnica é eficiente para a propagação e conservação *ex situ*, entretanto, sugeriram que novas pesquisas sejam realizadas no intuito de otimizar os protocolos estabelecidos.

Diversos estudos apontam que a suplementação do meio de cultura com bioestimulantes derivados de macroalgas pode aprimorar o cultivo *in vitro* de plantas (CARMO; MOURA; LIMA-BRITO, 2020; DE ARAÚJO AMATUZZI et al., 2020). Esses bioestimulantes favorecem diferentes respostas dependendo da concentração, do sistema de cultivo e da espécie (CARMO; MOURA; LIMA-BRITO et al., 2021), e são indicados na potencialização do crescimento e desenvolvimento vegetal, como alternativa ao uso dos reagentes analíticos convencionais (AHLAWAT et al., 2021).

O extrato obtido da macroalga parda *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis é amplamente comercializado como promotor de crescimento para diversas espécies vegetais (DI STASIO et al., 2018; HIDANGMAYUM; SHARMA, 2017; MATTNER; MILINKOVIC; ARIOLI, 2018; POPESCU; POPESCU, 2014), e, em estudos *in vitro*, identificaram sua atuação na

síntese e na atividade semelhante ao dos fito-hormônios (KHAN et al., 2011; WALLY et al. 2013), no aumento do crescimento e promoção de brotos *in vitro* (AHLAWAT et al., 2021), atividade antioxidante (FAN et al., 2013) e promoção de maior tolerância térmica (RAYIRATH et al., 2009). Porém, ainda não foram investigados os efeitos desse extrato em plantas da Chapada Diamantina.

Diante da necessidade de aprimorar e viabilizar a produção das plantas ornamentais da Chapada Diamantina e avaliar a potencial aplicação do extrato de *A. nodosum* (ANE) nas culturas *in vitro*, o presente estudo investigou os efeitos de ANE no cultivo *in vitro* das espécies *C. mucugensis* e *V. harleyi*.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo do extrato *Ascophyllum nodosum* (ANE)

O extrato comercial de *Ascophyllum nodosum* (Acadian[®]) foi submetido à secagem em estufa a 60 °C, até a obtenção do peso constante. Posteriormente, o extrato seco foi macerado com auxílio de almofariz e pistilo. Para montagem do experimento, o extrato seco foi previamente diluído em água destilada aquecida, a fim de facilitar sua solubilização no meio de cultura.

Cultivo *in vitro* de *Comanthera mucugensis*

As sementes de *C. mucugensis* coletadas no Parque Municipal de Mucugê-Bahia (12°59'83"S; 42°20'91"W) foram utilizadas para o estabelecimento *in vitro*, sendo desinfestadas e cultivadas em meio de cultura Murashige e Skoog (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração salinas (MS^{1/2}), seguindo o protocolo de Lima-Brito et al. (2011b). Após 60 dias, as microplantas com 0,5 a 0,7 cm foram transferidas individualmente para tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 15 mL de meio MS^{1/2}, suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e quatro concentrações de ANE (0;0; 0,1; 0,5; e 1,0 g L⁻¹).

Após 120 dias de cultivo, foi realizada a avaliação das seguintes variáveis: porcentagem de sobrevivência, comprimento da parte aérea (cm), número de folhas verdes e senescentes, comprimento da maior raiz (cm), número de raízes, massa seca total (mg), porcentagem de plantas com brotos e número de brotos por planta.

Cultivo *in vitro* de *Vellozia harleyi*

As sementes de *V. harleyi*, coletadas no município de Lençóis-Bahia (12°33'47"S; 41°23'24"W) foram utilizadas para o estabelecimento *in vitro* da cultura. As sementes foram

desinfestadas e cultivadas em meio MS^{1/2}. Após 60 dias, as microplantas com 0,7 a 1,0 cm foram transferidas individualmente para tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 15 mL de MS^{1/2}, 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar (BORGES et al., 2020) e diferentes concentrações de ANE: 0 (controle); 0,1; 0,5 e 1,0 g L⁻¹.

Após 120 dias de cultivo, foi avaliado a porcentagem de sobrevivência, comprimento da parte aérea (cm), número de folhas verdes e senescentes, comprimento da maior raiz (cm), número de raízes e massa seca total (mg).

Condições gerais de cultivo

O cultivo foi conduzido em sala de crescimento com fotoperíodo de 14h/luz, temperatura de 25 ± 3 °C e radiação fotossintética ativa de 60 μm.m⁻².s⁻¹. Os meios de cultura tiveram o pH ajustado para 5,7 e em seguida foram autoclavados por 15 min a 121 °C.

Delineamento experimental e Análise Estatística

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, composto por seis repetições de cinco amostras por tratamento para *C. mucugensis*, e cinco repetições de quatro amostras para *V. harleyi*.

Os dados foram submetidos às análises de normalidade e homogeneidade, pelos testes Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente, seguida pela análise de variância (ANOVA), e as médias foram analisadas por regressão ou comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software R (R CORE TEAM, 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cultivo *in vitro* de *Comanthera mucugensis*

O uso do extrato de *Ascophyllum nodosum* influenciou significativamente a porcentagem de sobrevivência e comprimento da parte aérea em plantas de *C. mucugensis* (Tabela 1). A suplementação do meio com o extrato na concentração 0,1 g L⁻¹ aumentou em 27% a porcentagem de sobrevivência das plantas em comparação com o controle. A concentração mais elevada de ANE (1,0 g L⁻¹) reduziu o crescimento da parte aérea, quando comparada ao controle, não diferindo das demais concentrações utilizadas.

Tabela 1. Porcentagem de sobrevivência (S%) e variáveis de crescimento de *Comanthera mucugensis*, após 120 dias de cultivo *in vitro*, em meios de cultura MS^{1/2} suplementados com extrato de *Ascophyllum nodosum* (ANE).

ANE	S%	Parte aérea (cm)	Folhas verdes	Folhas senescentes	Número de raiz	Comprimento da maior raiz (cm)	Massa seca total (mg)	Plantas com brotos (%)
Ausência	46b	2,33a	25,47a	5,73a	3,55a	2,33a	41a	25a
0,1 g L ⁻¹	73a	2,03ab	24,24a	6,78a	3,47a	2,40a	34a	54a
0,5 g L ⁻¹	66ab	2,03ab	22,32a	7,76a	3,4a	1,89a	33a	51a
1,0 g L ⁻¹	70ab	1,91b	22,40a	7,11a	3,38a	2,35a	29a	29a
C.V. (%)	25,6	12	10,6	23,9	30	28,01	22,5	64,5

Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

De acordo com Shukla et al. (2019), o uso de ANE favorece o crescimento vegetal devido ao aumento da absorção de nutrientes disponibilizados. Entretanto, no presente estudo, foi verificado que menores concentrações do extrato não interferem no crescimento *in vitro*, porém, as concentrações mais elevadas reduziram o crescimento da parte aérea de *C. mucugensis*. Isso ocorre porque o extrato pode apresentar um efeito inibitório sobre o crescimento, resultante da diminuição do potencial osmótico do meio de cultura, uma vez que o ANE é rico em macro e micronutrientes e polissacarídeos (CARMO; MOURA; LIMA-BRITO, 2020).

O desempenho do extrato de *A. nodosum* no cultivo *in vitro* de *C. mucugensis* é promissor para a conservação *in vitro* da espécie, visto que a suplementação do meio com o extrato induziu o crescimento mínimo da parte aérea e significativo aumento da porcentagem de sobrevivência, sem afetar o desenvolvimento foliar e radicular. Os dados obtidos demonstraram que não houve diferenças significativas entre os tratamentos testados para as variáveis número de folhas verdes e senescentes, número de raízes, comprimento da maior raiz e massa seca total (Tabela 1).

A redução do crescimento *in vitro* de *C. mucugensis* foi inicialmente demonstrada em estudos desenvolvidos por Lima-Brito et al. (2011a; 2015) que relataram menor crescimento da espécie em meios suplementados com os retardantes de crescimento ancimidol e paclobutrazol, e alta concentração de sacarose como agente osmótico no meio de cultivo. Posteriormente, Carmo, Moura e Lima-Brito (2020) observaram a diminuição do crescimento *in vitro* de *C. mucugensis* em meio suplementado com altas concentrações do extrato da macroalga vermelha *Agardhiella subulata* (C.Agardh) Kraft & M.J.Wynne, porém houve baixa porcentagem de sobrevivência das plantas.

A diferença da atuação dos extratos de *A. nodosum* e *A. subulata* no cultivo *in vitro* de *C. mucugensis* está relacionada à influência do tipo de macroalga na composição química e propriedades físico-químicas dos extratos. As concentrações de minerais, polissacarídeos, proteínas e fito-hormônios diferem entre os grupos de macroalgas e resulta em extratos com diferentes perfis e concentrações (CARMO; MOURA; LIMA-BRITO, 2021). Dessa forma, os extratos de macroalgas distintas, em mesma concentração, podem promover diferentes efeitos no crescimento das plantas.

Na cultura de tecidos, esses extratos podem ser considerados importantes aliados para conservação *in vitro* de plantas, pois são menos custosos em comparação aos agentes osmóticos e retardantes de crescimento comumente utilizados no cultivo *in vitro*, resultando em um meio de cultura menos dispendioso e mais acessível.

A suplementação com o extrato de *A. nodosum* não teve efeito positivo na multiplicação *in vitro* de *C. mucugensis*, pois não promoveu aumento na porcentagem de plantas com brotos (Tabela 1), e causou um declínio significativo no número de brotações (Figura 1). Entretanto, estudo conduzido com *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae) em meio suplementado com 0,1 g L⁻¹ de ANE, resultou em 100% de explantes com brotos (Capítulo 1). De forma similar, no cultivo *in vitro* de *Capparis decidua* (Forsk) Edgew foi obtido aumento de 93% de brotações em meio suplementado com *A. nodosum* (AHLAWAT et al., 2021). Isso indica que cada cultura responde diferentemente à presença de ANE, sendo necessária a análise de sua atuação em diferentes espécies *in vitro*.

O uso de ANE promoveu uma redução linear decrescente no número de brotos, em resposta ao aumento da concentração do extrato no meio de cultura (Figura 1). Em contraste, no cultivo *in vitro* de *C. elongata* (capítulo 1) foi obtido um aumento de até 12x no número de brotos, com a suplementação do meio com ANE, sendo esse aumento atribuído à atuação do extrato na síntese de citocininas.

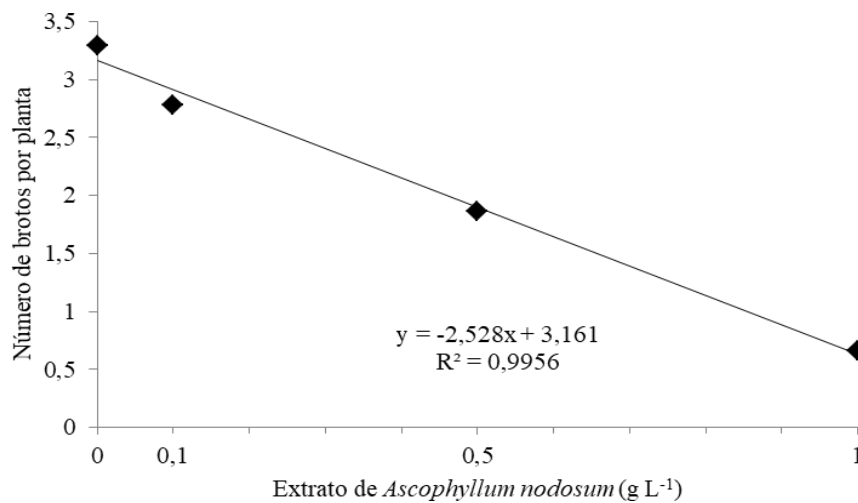


Figura 1. Número de brotos de *Comanthera mucugensis*, em meios suplementados com diferentes concentrações do extrato de *Ascophyllum nodosum*, após 120 dias de cultivo.

Os resultados obtidos com ANE no cultivo de *C. mucugensis*, neste estudo, diferem dos obtidos por Carmo, Moura e Lima-Brito (2020), com o uso de 3 g L⁻¹ do extrato de *A. subulata* no cultivo da mesma espécie. Os autores observaram um aumento significativo no número de brotações em relação ao controle, com uma média de 8,3 brotos por explante.

A eficiência dos extratos de algas marinhas como bioestimulante *in vitro* foi relatada por Vinhoto, Gurusaravanan e Jayabalan (2013) no desenvolvimento de embriões somáticos de *Lycopersicon esculentum* L. Ademais, Ahlawat et al. (2021) obtiveram 100% de brotações e média de 8 brotos/planta no cultivo *in vitro* de *C. decidua* em meio suplementado com 100 µl de ANE, acrescido de 1 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) e 1 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA), o que sugere a realização de novos estudos para investigar a combinação entre o extrato de *A. nodosum* e reguladores de crescimento, no aprimoramento da propagação *in vitro* de *C. mucugensis*.

Cultivo *in vitro* de *Vellozia harleyi*

Os altos índices de sobrevivência obtidos para *V. harleyi*, variando de 90% a 100%, demonstram a eficiência do cultivo *in vitro* para a espécie. No controle e no tratamento com a menor concentração de ANE observou-se 100% de sobrevivência, com um declínio desse percentual com o aumento da concentração do extrato, representada por uma regressão linear decrescente significativa (Figura 2).

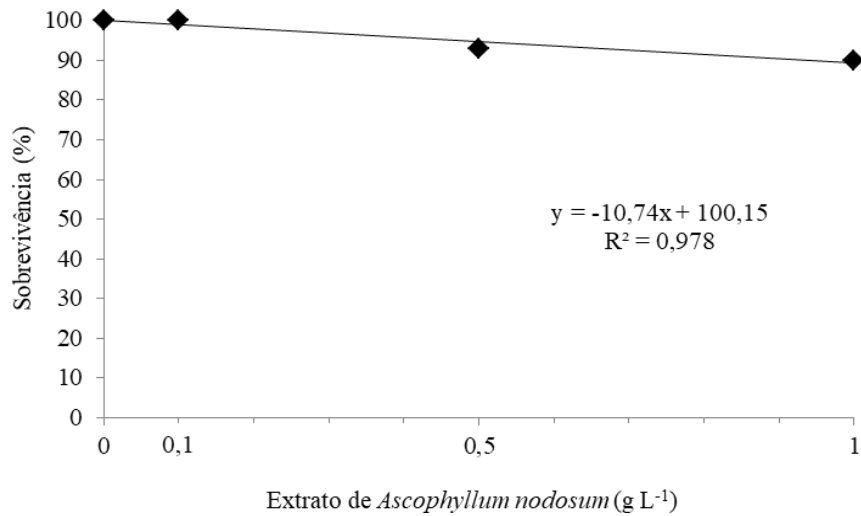


Figura 2. Porcentagem de sobrevivência *in vitro* de *Vellozia harleyi*, aos 120 dias de cultivo, em diferentes concentrações do extrato de *Ascophyllum nodosum*.

Resultados similares foram obtidos na suplementação do meio de cultivo de *C. elongata*, após aumento da concentração de ANE (Capítulo 1), em que foi observado 100% de sobrevivência na menor concentração do extrato (0,1 g L⁻¹); porém, em concentração mais elevada (2,0 g L⁻¹), a porcentagem de sobrevivência foi reduzida para 60%. A composição do extrato de *A. nodosum* é rica em manitol, macro e micronutrientes, alginato e vitaminas (BATTACHARYYA et al., 2015; KHAN et al., 2009), e, devido ao aumento da concentração, pode ter ocasionado maior estresse osmótico e salino para a planta.

O extrato da macroalga influenciou significativamente o número de folhas verdes (Figura 3). A equação quadrática é a mais representativa para a avaliação desta variável, indicando que o extrato promove um efeito estimulador até alcançar o ponto de máxima, e reduz sua eficiência após aumento da concentração. Foi estimado o ponto máximo de 14,7 folhas verdes com 0,39 g L⁻¹ de ANE.

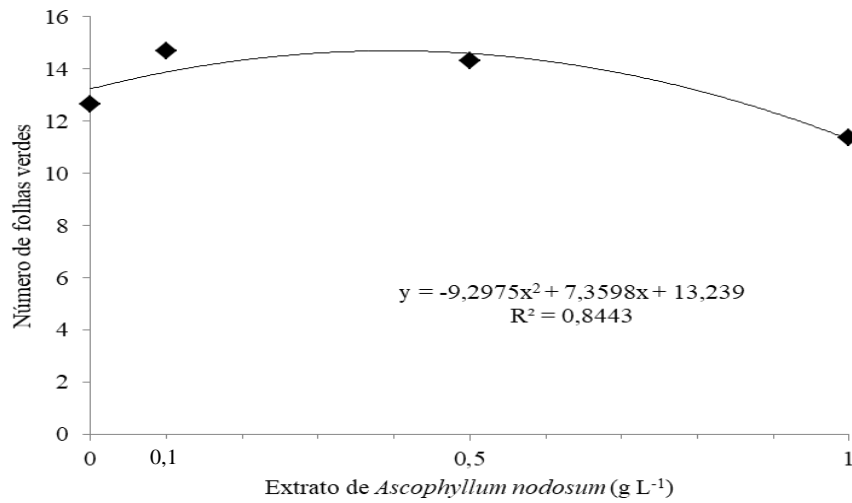
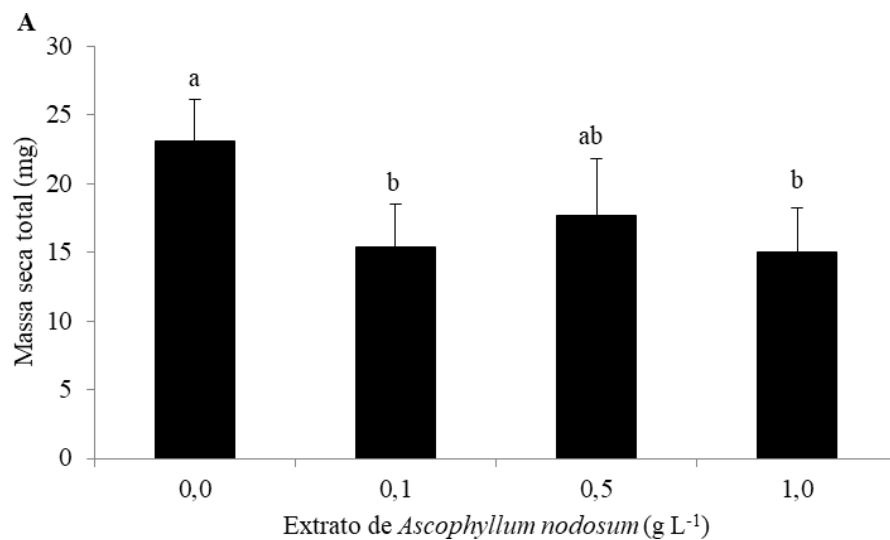


Figura 3. Efeito do extrato da macroalga parda *Ascophyllum nodosum* no número de folhas verdes de *Vellozia harleyi* cultivadas *in vitro*.

Para massa seca total, o controle foi significativamente superior que a menor e maior concentração (0,1 g L⁻¹ e 1,0 g L⁻¹), sem diferir para o meio suplementado com 0,5 g L⁻¹. A suplementação do meio de cultura com ANE não influenciou o comprimento da parte aérea *in vitro* e número de folhas senescentes de *V. harleyi* (Figura 4).



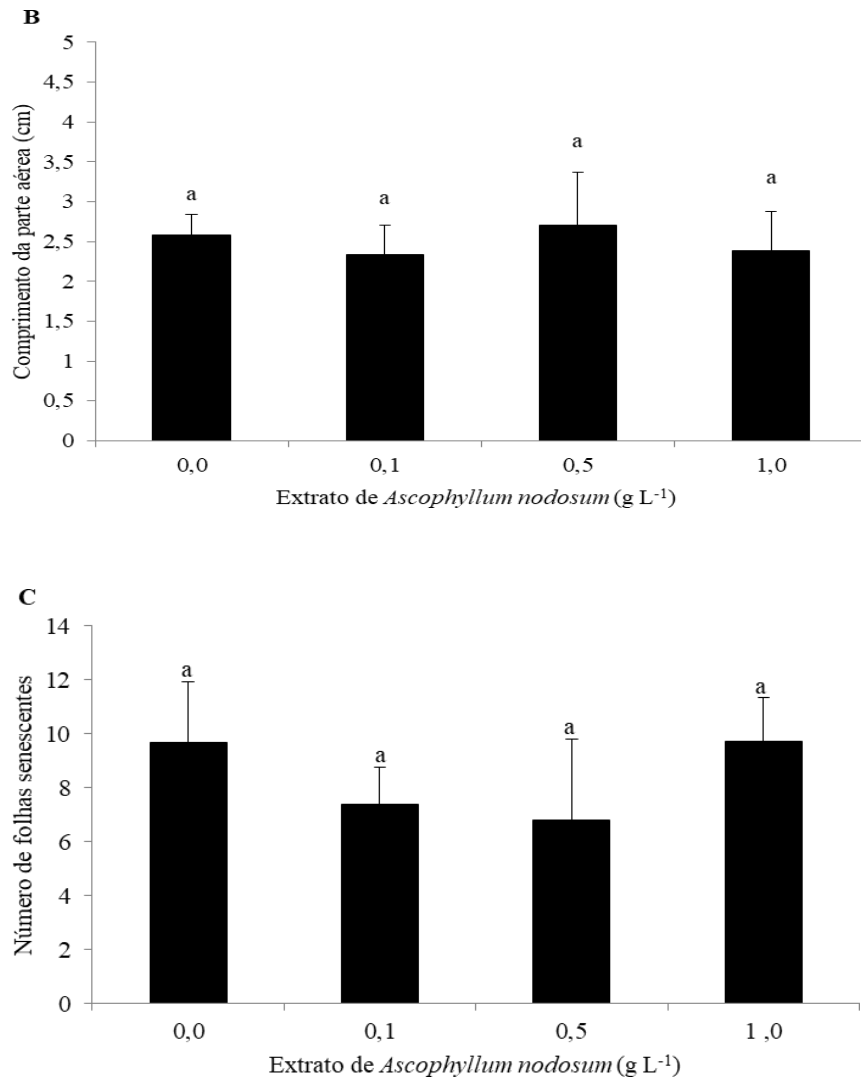


Figura 4. Massa seca total (A), crescimento aéreo (B) e número de folhas senescentes (C) de *Vellozia harleyi*, após 120 dias de cultivo, sob influência do extrato de *Ascophyllum nodosum*. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

A aplicação de ANE no meio de cultivo proporciona o aumento da síntese endógena de citocininas ou apresenta resposta fisiológica semelhante ao fito-hormônio (KHAN et al., 2011; WALLY et al., 2013), que, dentre diversas outras funções, atua no retardo da senescência foliar (WALLY et al., 2013), o que pode ter possibilitado melhor resposta na quantificação de folhas verdes no cultivo *in vitro* de *V. harleyi*.

O aumento do número de folhas verdes é vantajoso para a produção *in vitro*, visto que favorece a retirada de explantes foliares e pode aumentar a porcentagem de brotação por meio das gemas axilares localizadas na base da folha, as quais são constituídas por células meristemáticas e podem dar origem a novos brotos (COSTA, NEPOMUCENO, SANTANA, 2010).

A aplicação de ANE apresentou resultados promissores para o enraizamento *in vitro* de *V. harleyi*. O extrato influenciou significativamente o número de raízes, promovendo uma curva polinomial com ponto máximo de 6,8 raízes na concentração de 0,44 g L⁻¹ (Figura 5A).

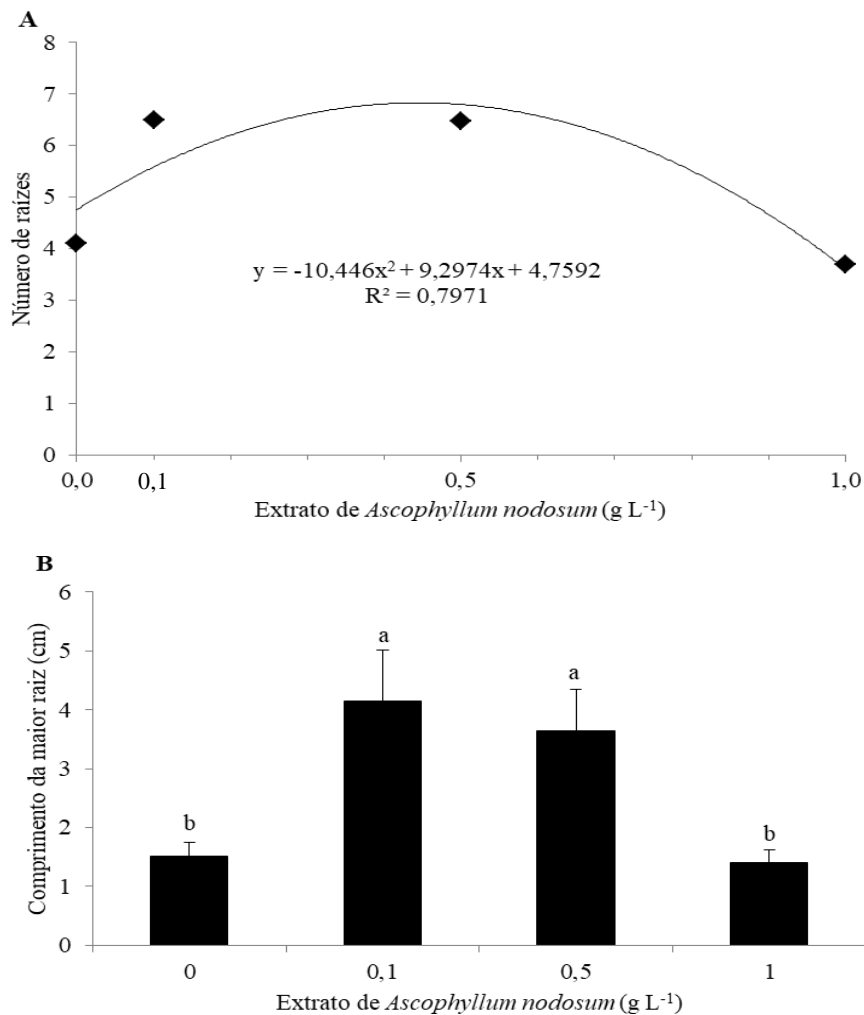


Figura 5. Atuação do extrato da macroalga parda *Ascophyllum nodosum* no número de raízes (A) e crescimento radicular (B), no cultivo *in vitro* de *Vellozia harleyi*. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

A suplementação com 0,44 g L⁻¹ de ANE é a mais indicada para o enraizamento de *V. harleyi*, enquanto concentrações mais elevadas promovem a diminuição do número de raízes. Esse resultado foi similar ao obtido com uso de 20% do extrato líquido de *Sargassum wightii* Greville, que aumentou 63% o número de raízes de *Triticum aestivum var. Pusa Gold*, quando comparado ao controle, apresentando uma queda com o aumento da concentração (KUMAR; SAHOO, 2011).

O maior número de raízes, observado em baixa concentração do extrato, pode estar relacionado ao desempenho da auxina no desenvolvimento de raízes adventícias (MARTINS et al. 2015). Além disso, as moléculas de carboidratos regulam a porcentagem de raiz

(PAWLICKI; WELANDER, 1995), e Shukla et al. (2019) indicam que o extrato de *A. nodosum* atua na expressão de genes relacionados ao metabolismo de carboidratos e fornece compostos bioativos energéticos para as plantas. Entretanto, altas concentrações de ANE podem ocasionar maior estresse para a planta e não estimular o desenvolvimento radicular.

O extrato favoreceu o crescimento de raízes nos meios de cultura suplementados com 0,1 e 0,5 g L⁻¹ de ANE, diferindo consideravelmente das demais concentrações (Figura 4B), com um aumento médio de 2,6x em relação ao controle. Estes resultados são semelhante aos estudos com aplicação da macroalga em *Arabidopsis thaliana* (RAYORATH et al., 2007), morango (MATTNER; MILINKOVIC; ARIOLI, 2018), alfafa (KHAN et al., 2012) e pinheiro (MACDONALD et al., 2012).

A promoção do crescimento radicular de *V. harleyi* com a suplementação de ANE pode estar associada, segundo Rayorath et al. (2007), à influência do extrato no aumento da produção das auxinas e controle da mobilização da molécula para a zona de crescimento radicular.

Este é o primeiro trabalho que relata o cultivo *in vitro* de *V. harleyi*, e os resultados obtidos indicam que esta técnica tem potencial de utilização para a produção dessa espécie. Observou-se que o uso de ANE é recomendado como bioestimulante alternativo para o enraizamento da espécie, visto que tem baixo custo quando comparado às auxinas sintéticas de alto custo comumente utilizados para a indução de enraizamento *in vitro*.

CONCLUSÃO

Os efeitos do extrato de *Ascophyllum nodosum*, no cultivo *in vitro*, diferem entre as espécies de plantas, sendo observados, de modo geral, efeitos estimulatórios com a utilização de concentrações baixas e efeitos inibitórios em concentrações altas.

O extrato de *A. nodosum* favorece a sobrevivência *in vitro* de *Comanthera mucugensis* e tende a reduzir seu crescimento, sendo, portanto, indicado como potencial uso para protocolo de conservação *in vitro* da espécie.

Baixas concentrações do extrato de *A. nodosum* aprimoram o enraizamento em *Vellozia harleyi*, apresentando potencial uso como enraizador alternativo *in vitro*.

REFERÊNCIAS

AHLAWAT, J. et al. *Ascophyllum nodosum*: a Potential Substitute for Synthetic Hormones for Tissue Culture Propagation of *Capparis decidua* (Forsk) Edgew. **Regenerative Engineering and Translational Medicine**, p. 1-7, 2021.

BATTACHARYYA, D. et al. Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 39-48, 2015.

BORGES, B. P. et al. Fire as a novel technique to stimulate adventitious shoots in the laboratory. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 143, n. 3, p. 709-713, 2020.

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.

CARMO, L.P.; MOURA, C.W.N.; LIMA-BRITO, A. Effects of seaweed extracts on the *in vitro* multiplication of plants. In: **Biostimulants for Crops from Seed Germination to Plant Development**. Academic Press, 2021. p. 211-230.

CONCEIÇÃO, A.A.; GIULIETTI, A.M.; MEIRELLES, S.T. Ilhas de vegetação em afloramentos de quartzito-arenito no Morro do Pai Inácio, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 2, p. 335-347, 2007.

COSTA, G.M.; NEPOMUCENO, C.F.; SANTANA, J.R.F. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, v.40, n.5, p. 1090-1096, 2010.

CRUZ, D.T. et al. Genetic and morphological variability in *Cattleya elongata* Barb. Rodr.(Orchidaceae), endemic to the campo rupestre vegetation in northeastern Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, v. 294, n. 1, p. 87-98, 2011.

DE ARAÚJO AMATUZZI, J.C. et al. Improved *in vitro* development of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) by using aqueous extract of the seaweed *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 42, n. 8, p. 1-9, 2020.

DI STASIO, E. et al. *Ascophyllum nodosum*-based algal extracts act as enhancers of growth, fruit quality, and adaptation to stress in salinized tomato plants. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 4, p. 2675-2686, 2018.

ESPINOSA-LEAL., C.A.; PUENTE-GARZA, C.A.; GARCÍA-LARA, S. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. **Planta**, v. 248, n. 1, p. 1-18, 2018.

FAN, D. et al. A commercial extract of brown macroalga (*Ascophyllum nodosum*) affects yield and the nutritional quality of spinach *in vitro*. **Communications in soil science and plant analysis**, v. 44, n. 12, p. 1873-1884, 2013.

HIDANGMAYUM, A.; SHARMA, R. Effect of different concentrations of commercial seaweed liquid extract of *Ascophyllum nodosum* as a plant biostimulant on growth, yield and biochemical constituents of onion (*Allium cepa* L.). **J. Pharmacogn. Phytochem**, v. 6, n. 4, p. 658-663, 2017.

KHAN, W. et al. Bioassay to detect *Ascophyllum nodosum* extract-induced cytokinin- like activity in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 409-414, 2011.

KHAN, W. et al. Commercial extract of *Ascophyllum nodosum* improves root colonization of alfalfa by its bacterial symbiont *Sinorhizobium meliloti*. **Communications in soil science and plant analysis**, v. 43, n. 18, p. 2425-2436, 2012.

KHAN, W. et al. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 28, n. 4, p. 386-399, 2009.

KOLBEK, J.I.R.I.; ALVES, R.J.V. Impacts of cattle, fire and wind in Rocky Savannas, Southeastern Brazil. **Acta Universitatis Carolina e Environmentalica**, v. 22, p. 111-130, 2008.

KULUS, D. Application of cryogenic technologies and somatic embryogenesis in the storage and protection of valuable genetic resources of ornamental plants. In: **Somatic embryogenesis in ornamentals and its applications**. Springer, New Delhi, 2016.

KUMAR, G.; SAHOO, D. Effect of seaweed liquid extract on growth and yield of *Triticum aestivum* var. Pusa Gold. **Journal of applied phycology**, v. 23, n. 2, p. 251-255, 2011.

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

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

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

LIMA-BRITO, A. et al. Plant growth regulators for *in vitro* minimal growth of *Comanthera mucugensis*. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 11, n. 1, 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 Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 152-161, 2016.

MACDONALD, J.E. et al. Root growth of containerized lodgepole pine seedlings in response to *Ascophyllum nodosum* extract application during nursery culture. **Canadian journal of plant science**, v. 92, n. 6, p. 1207-1212, 2012.

MAGALHÃES, D.G. **Extrato de *Ascophyllum nodosum* na conservação e cultivo *in vitro* de ornamentais da Chapada Diamantina- Bahia**. (Dissertação de Mestrado)- Universidade Estadual de Feira de Santana-Ba, 2021.

MARTINS, J.P.R. et al. Effects of salts and sucrose concentrations on *in vitro* propagation of *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae). **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 1, p. 85, 2015.

MATTNER, S.W.; MILINKOVIC, M.; ARIOLI, T. Increased growth response of strawberry roots to a commercial extract from *Durvillaea potatorum* and *Ascophyllum nodosum*. **Journal of applied phycology**, v. 30, n. 5, p. 2943-2951, 2018.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.6 p. 473-479. 1962.

PAWLICKI, N.; WELANDER, M. Influence of carbohydrate source, auxin concentration and time of exposure on adventitious rooting of the apple rootstock Jork 9. **Plant Science**, v. 106, n. 2, p. 167-176, 1995.

PEREIRA, L.S. et al. Effect of arbuscular mycorrhizal fungion survival and growth of micropropagated *Comanthera mucugensis* spp. mucugensis (Eriocaulaceae). **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 20, p. 1772-1780, 2017.

POPESCU, G.C.; POPESCU, M. Effect of the brown alga *Ascophyllum nodosum* as biofertilizer on vegetative growth in grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Current Trends in Natural Sciences**, v. 3, n. 6, p. 61-67, 2014.

R CORE TEAM (2018). R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RAPINI, A. et al. A flora dos Campos Rupestre da Cadeia do Espinhaço. In: AZEVEDO, A. A.; FONSECA, R. L.; MACHADO, R. B. Cadeia do Espinhaço: Avaliação do conhecimento científico e prioridade de conservação. **Megadiversidade**, v. 4, p. 15-23, 2008.

RAYIRATH, P. et al. Lipophilic components of the brown seaweed, *Ascophyllum nodosum*, enhance freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v. 230, n. 1, p. 135-147, 2009.

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, n. 4, p. 423-429, 2007.

SHUKLA, P.S. et al. *Ascophyllum nodosum*-based biostimulants: sustainable applications in agriculture for the stimulation of plant growth, stress tolerance, and disease management. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 655, 2019.

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, n. 3, p. 1527-1537, 2013.

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, n. 2, p. 324-339, 2013.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o extrato de *Ascophyllum nodosum* apresenta ações específicas para as três espécies ornamentais avaliadas, sendo necessário o desenvolvimento de novas pesquisas a fim de analisar os mecanismos fisiológicos de atuação do extrato, bem como ampliar sua utilização para outras espécies da Chapada Diamantina-BA.

De modo geral, a concentração do extrato é fator determinante para a sua eficiência, apresentando uso promissor quando em baixa concentração. A adição de *A. nodosum* no meio nutritivo das ornamentais favorece a conservação e multiplicação *in vitro* de *Cattleya elongata*, apresenta potencial uso para a conservação *in vitro* de *Comanthera mucugensis*, e atua como agente promotor do enraizamento de *Vellozia harleyi*.

O extrato é indicado como suplementação alternativa ao uso de reguladores vegetais de alto custo, possibilitando maior economia na produção comercial das mudas e na manutenção de bancos de germoplasma de espécies ornamentais.