



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS
VEGETAIS - PPGRGV

LUANE PORTELA CARMO

**UTILIZAÇÃO DE MACROALGAS MARINHAS NO CULTIVO
IN VITRO DE PLANTAS**

**BIOENSAIOS COM *PHYSALIS PERUVIANA* L. (SOLANACEAE) E
COMANTHERA MUCUGENSIS (GIUL.) L.R.PARRA & GIUL.
(ERIOCAULACEAE)**

Feira de Santana - BA
2019

LUANE PORTELA CARMO

**UTILIZAÇÃO DE MACROALGAS MARINHAS NO CULTIVO
IN VITRO DE PLANTAS**

**BIOENSAIOS COM *PHYSALIS PERUVIANA* L. (SOLANACEAE) E
COMANTHERA MUCUGENSIS (GIUL.) L.R.PARRA & GIUL.
(ERIOCAULACEAE)**

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

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Wallace do Nascimento Moura

Feira de Santana - BA
2019

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

C285

Carmo, Luane Portela

Utilização de macroalgas marinhas no cultivo in vitro de plantas : bioensaios com *Physalis peruviana* L. (Solanaceae) e *Comanthera mucugensis* (Giul.) L. R. Parra & Giul. (Eriocaulaceae) / Luane Portela Carmo. – 2019.

95 f.: il.

Orientadora: Alone Lima-Brito.

Coorientador: Carlos Wallace do Nascimento Moura.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Feira de Santana, 2019.

1. Macroalgas marinhas – extratos. 2. Sempre-viva de Mucugê. 3. Golden Berry. 4. Cultivo *in vitro*. 5. Conservação *ex situ*. 6. *Physalis Peruviana* L. (Solanaceae). 7. *Comanthera mucugensis* (Giul.) L. R. Parra & Giul. (Eriocaulaceae). I. Lima-Brito, Alone, orient. II. Moura, Carlos Wallace do Nascimento, coorient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 582.26:582.951.4+582.55/.56

Luis Ricardo Andrade da Silva - Bibliotecário - CRB-5/1790

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr^a. Maria Nazaré Guimarães Marchi
(Instituto Federal Baiano)



Prof. Dr^a. Moema Cortizo Bellintani
(Universidade Federal da Bahia)



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

Feira de Santana – BA
2019

À minha família

AGRADECIMENTOS

A Deus por luminar o meu caminho. Minha vida tem sido marcada por realizações diárias, que às vezes não dou o devido valor, mas eu sei que a graça de Deus se faz presente em todos os momentos da minha vida.

À minha família, meu maior tesouro, minha fortaleza e meu apoio incondicional. Sem vocês eu não seria nada, pois em vocês eu tenho minha principal fonte de carinho e amor. Tudo isso é por vocês, para vocês!

À Alone Lima-Brito, minha orientadora, pelo respeito, ensinamentos, dedicação, paciência, competência, e sobretudo, pela confiança creditada em mim. Tornou-se meu espelho de profissional e mulher. Agradeço seu apoio incondicional prestado e a forma gentil, extraordinária e pertinente como acompanhou a realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador e “pai científico” Carlos Wallace do Nascimento Moura pelos ensinamentos e orientação que foram marcantes para minha formação acadêmica e pessoal. Agradeço pela companhia nos shows da vida, por embarcar em minhas loucuras e por estimular sempre ir mais longe. Muito obrigada!

A equipe do LCTV-UEFS pelo acolhimento, convivência e colaboração nos últimos dois anos.

À Isabela Souza pela participação, montagem e avaliação voluntária de muitos experimentos deste trabalho. Isa, muito obrigada por sua dedicação ímpar!

À minha família LAFICO pelo companheirismo, atenção, amizade, ajuda e por proporcionar um ambiente de trabalho agradável e harmonioso. Jamais deixarei vocês.

Aos meus amados amigos, Jade, Richard, Marcelo, Renato, Thomas, Isla, Mile, Iasmin, João, Kaio, Andreza, pelo apoio, imensa compreensão, solidariedade e palavras de incentivo. Perdão por não ter estado presente nos melhores e piores momentos nestes últimos dois anos.

Aos queridos colegas do curso pelo aprendizado e convivência maravilhosa, em particular, a Táris, pela humildade e pelas valiosas conversas.

Ao pessoal do LAPEM pela gentileza, especialmente a Gorete, pelo amparo de sempre.

Aos funcionários da Unidade Experimental Horto Florestal, pela atenção e apoio durante a realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À Universidade Estadual de Feira de Santana, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

A todos que contribuíram direta e indiretamente, ou que torceram por mim, meu profundo agradecimento e que Deus possa abençoar cada um de vocês!

Há um ditado chinês que diz que, *se dois homens vêm andando por uma estrada, cada um carregando um pão, ao se encontrarem, eles trocam os pães; cada um vai embora com um. Porém, se dois homens vêm andando por uma estrada, cada um carregando uma ideia, ao se encontrarem, trocam as ideias; cada um vai embora com duas.* Quem sabe, é esse o sentido do nosso fazer: repartir ideias, para todos terem pão...

Cortella, M.S.

RESUMO

No Brasil, as atividades ligadas à produção agrícola têm se intensificado nos últimos anos. A crescente procura por plantas com propriedades medicinais gerou grande demanda por mudas de *Physalis peruviana* L. devido o potencial nutracêutico dos frutos. Paralelamente, o setor florístico também cresce a largos passos e dentre as principais flores secas comercialmente exploradas estão as espécies do gênero *Comanthera* L. B. Sm. A exploração extrativista para o mercado levou a uma redução significativa das populações naturais de *Comanthera mucugensis* (Giul.) L.R.Parra & Giul., a “sempre-viva de Mucugê”, colocando-a sob risco de extinção. O desenvolvimento de técnicas de cultura de tecidos vegetais tem sido uma das contribuições mais significativas para o avanço do processo de multiplicação de espécies com significativo valor comercial e/ou que estejam em vias de extinção. Além da produção de plantas em larga escala, esta constitui uma opção para a conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais através da conservação *in vitro*. Embora apresente grande potencial, o cultivo *in vitro* de plantas possui um alto custo de produção associado. Como método alternativo, este trabalho estudou os efeitos da suplementação do meio nutritivo com extratos de três macroalgas marinhas, *Agardhiella subulata* (C.Agardh) Kraft & M.J.Wynne, *Hypnea pseudomusciformis* Nauer, Cassano & M.C. Oliveira e *Gracilaria* sp. no cultivo *in vitro* de *C. mucugensis* e *P. peruviana*. A utilização de extrato de *A. subulata* em altas concentrações reduz o crescimento de plantas de *P. peruviana*, bem como, a produção e a biomassa dos brotos regenerados via organogênese direta. No entanto, a suplementação em baixa concentração produz brotos mais vigorosos. O extrato também reduz o crescimento de *C. mucugensis* e induz a formação de brotos por organogênese direta, especialmente em concentrações mais altas. Já a suplementação com extrato de *Gracilaria* sp. promove a maior produção de brotos por plantas, enquanto que, o extrato de *H. pseudomusciformis* aumenta significativamente o comprimento dos brotos de sempre-viva. Este é o primeiro relato de estudos com o emprego de macroalgas brasileiras na cultura de tecidos vegetais. Os resultados obtidos contribuem para o estabelecimento de novos métodos de propagação e conservação *in vitro* de *P. peruviana* e *C. mucugensis*. Por fim, recomenda-se estudos de caracterização bioquímica e molecular das respostas fisiológicas induzidas pelos extratos de macroalgas para entender o(s) mecanismo(s) de ação por trás desses efeitos, ainda desconhecidos.

Palavras-chaves: goldenberry, sempre-viva de Mucugê, extrato de macroalgas, crescimento mínimo, multiplicação *in vitro*, conservação *ex situ*

ABSTRACT

In Brazil, activities connected to agricultural production have been intensified over the years. The increased search for plants with medical properties highly demanded for seedlings of *Physalis peruviana* L. due to its fruits nutraceutical potential. In parallel, the floristic sector is also rapidly growing, and among the main commercially explored dry flowers are the species of the genus *Comanthera* L. B. Sm. The extractive exploitation of the market led to a significant reduction of natural populations of *Comanthera mucugensis* (Giul.) L.R.Parra & Giul., the “sempre-viva of Mucugê”, placing it at risk of extinction. The development of plant tissue culture techniques has been one of the most significant contributions to the advance of the multiplication process of species with high commercial value and/or in the process of extinction. Besides the production of plants in large scale, it constitutes an option for *ex situ* conservation of vegetal genetic resources throughout *in vitro* conservation. Although it presents significant potential, *in vitro* cultivation of plants is associated to a high cost of production. As an alternative method, this work studied the effects of supplementation in nutritional medium with extracts of three marine seaweeds, *Agardhiella subulata* (C.Agardh) Kraft & M.J.Wynne, *Hypnea pseudomusciformis* Nauer, Cassano & M.C. Oliveira and *Gracilaria* sp. in the *in vitro* cultivation of *C. mucugensis* and *P. peruviana*. The use of *A. subulata* extract in high concentrations reduces the growth of *P. peruviana*, as well as the production and biomass of regenerated sprouts via direct organogenesis; however, supplementation in low concentration produces more vigorous sprouts. The extract also reduces the growth of *C. mucugensis* and induces the formation of sprouts by direct organogenesis, especially in higher concentrations. The supplementation with *Gracilaria* sp. extract promotes higher production of sprouts by plants, while *H. pseudomusciformis* extract increases the width of “sempre-viva” sprouts. This is the first report of studies using Brazilian seaweeds in plants tissue culture. The obtained results contribute to the establishment of new methods of spread and *in vitro* conservation of *P. peruviana* of *C. mucugensis*. Finally, we recommend studies of biochemical and molecular characterization of physiological responses induced by seaweeds extract in order to understand the mechanisms of action behind these effects, still unknown.

Key-words: goldenberry, sempre-viva of Mucugê, seaweeds extract, minimum growth, *in vitro* multiplication, *ex situ* conservation.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO GERAL | 13 |
| Referências | 16 |
| | |
| CAPÍTULO 1 | |
| Utilização de extrato de macroalgas marinhas no cultivo <i>in vitro</i> de plantas | 19 |
| Resumo | 20 |
| Abstract | 21 |
| Introdução | 22 |
| Componentes das macroalgas marinhas que afetam o desenvolvimento das plantas | 24 |
| Aplicações de extrato de macroalgas marinhas no cultivo <i>in vitro</i> de plantas | 28 |
| Conclusão | 31 |
| Referências | 32 |
| Tabelas | 44 |
| | |
| CAPÍTULO 2 | 46 |
| Conservação e propagação <i>in vitro</i> de <i>Physalis peruviana</i> L. em meio alternativo com extrato de <i>Agardhiella subulata</i> (C.Agardh) Kraft & M.J.Wynne | |
| Resumo | 47 |
| Abstract | 48 |
| Introdução | 49 |
| Material e Métodos | |
| Coleta, identificação e preparação do extrato de <i>Agardhiella subulata</i> | 50 |
| Determinação do conteúdo mineral e teor salinidade do extrato de <i>Agardhiella subulata</i> (AsE) | 51 |
| Coleta e identificação de <i>Physalis peruviana</i> | 51 |
| Experimento para conservação <i>in vitro</i> de <i>Physalis peruviana</i> | 51 |
| Experimento para organogênese direta de <i>Physalis peruviana</i> | 52 |
| Condições gerais de cultivo | 52 |
| Delineamento experimental e análise estatística | 52 |

Resultados

| | |
|---|----|
| Conservação <i>in vitro</i> de <i>Physalis peruviana</i> | 52 |
| Organogênese direta de <i>Physalis peruviana</i> | 53 |
| Determinação do conteúdo mineral e teor de salinidade do extrato de <i>Agardhiella subulata</i> (AsE) | 54 |
| Discussão | 55 |
| Conclusão | 56 |
| Referências | 57 |
| Tabelas | 61 |
| Figuras | 64 |

CAPÍTULO 3 67

Extratos de macroalgas vermelhas afetam o crescimento *in vitro* e a formação de brotos em “sempre-viva de Mucugê”, uma espécie endêmica da Chapada Diamantina - Brasil em risco de extinção.

| | |
|-------------------|----|
| Resumo | 69 |
| Abstract | 70 |
| Introdução | 72 |

Material e Métodos

| | |
|---|----|
| Coleta, identificação e preparação do extrato das macroalgas | 74 |
| Determinação do conteúdo mineral dos extratos das macroalgas | 75 |
| Coleta e identificação de <i>Comanthera mucugensis</i> | 75 |
| Crescimento <i>in vitro</i> de <i>Comanthera mucugensis</i> em meio suplementado com extrato de <i>Agardhiella subulata</i> (AsE) | 76 |
| Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Comanthera mucugensis</i> em meio suplementado com extrato de <i>Hypnea pseudomusciformis</i> (HpE) e <i>Gracilaria</i> sp. (GrE) | 76 |
| Condições gerais de cultivo | 77 |
| Delineamento experimental e análise estatística | 77 |

Resultados

| | |
|---|----|
| Composição mineral dos extratos de macroalgas | 77 |
| Crescimento <i>in vitro</i> de <i>Comanthera mucugensis</i> em meio suplementado com extrato de <i>Agardhiella subulata</i> (AsE) | 78 |
| Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Comanthera mucugensis</i> em meio suplementado com | 79 |

| | |
|--|----|
| extrato de <i>Hypnea pseudomusciformis</i> (HpE) e <i>Gracilaria</i> sp. (GrE) | |
| Discussão | 79 |
| Conclusão | 83 |
| Referências | 84 |
| Figuras | 89 |
| Tabelas | 90 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 95 |

INTRODUÇÃO GERAL

Há um debate crescente sobre o desenvolvimento da agricultura e a mudança de paradigma em direção à intensificação agrícola sustentável sem esgotar ainda mais o capital natural (ROCKSTROM et al., 2016; WITHERS et al., 2018). PARDEY et al. (2014) projetaram que o consumo agrícola global aumentará cerca de 69% (1,3% ao ano) até 2050. O Brasil é exemplo de nação cuja produção agrícola aumentou rapidamente nas últimas décadas devido à incorporação de novas tecnologias nas práticas agronômicas (BARRETTO et al., 2013), incluindo multiplicação *in vitro* de plantas.

Partindo do princípio da totipotência celular, novas plantas podem ser geradas a partir de tecidos vegetais como folhas, cotilédones, caules ou gemas, cultivados *in vitro* em condições controladas de assepsia, nutrição, temperatura, umidade, luminosidade e irradiação. O método minimiza os efeitos de variação de fatores ambientais, permite altas taxas de reproduzibilidade e a otimização da produção de metabólitos secundários. É considerada uma alternativa eficiente para propagação de mudas livres de patógenos em larga escala, em período de tempo e espaço físico reduzidos, independentemente da época do ano. A técnica também é um potencial recurso para conservação *ex situ* de plantas nativas raras ou quase extintas de interesse econômico (ABDIN et al., 2017; EL-SHERIF, 2018).

Embora apresente grande potencial, as técnicas de cultura de tecidos vegetais exigem mão de obra especializada, reagentes químicos de alto custo, equipamentos específicos e infraestrutura adequada, o que torna o cultivo *in vitro* muito dispendioso (DATTA; CHAKRABORTY; JANAKIRAM, 2017). Na busca por constituintes alternativos, ecológicos e econômicos, o enriquecimento do meio nutritivo com suplementos orgânicos como extratos vegetais, fontes diversas de carbono e agentes gelificantes vem sendo testados nos meios de cultura por diversos pesquisadores (AGRAWAL et al., 2010; KODYM; ZAPATA-ARIAS, 2001; SARASWATHI et al., 2016)

Recentemente, estudos apontaram excelentes resultados com o uso dos extratos de macroalgas marinhas (especialmente dos filos Rhodophyta e Ochrophyta/Phaeophyceae) no cultivo *in vitro* de plantas envolvendo processos de organogênese e embriogênese somática (ALBURQUERQUE et al., 2018; ESSERTI et al., 2017; VENKATACHALAM et al., 2017; VINOTH et al., 2019). Acredita-se que fitohormônios como auxinas, giberelinas, citocininas,

ácido abscísico, etileno, betaína além de macro e micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, polissacarídeos sulfatados e substâncias secundárias presentes nos extratos algacéos atuem no metabolismo celular das plantas regulando processos de morfogênese e crescimento (BATTACHARYYA et al., 2015; CRAIGIE, 2011; KHAN et al., 2011; WALLY et al., 2012).

Dentro do cenário agrícola, Solanaceae é uma das famílias de maior importância econômica abrangendo espécies largamente aproveitadas para fins alimentícios, farmacêuticos e ornamentais, como: berinjela, tomate, pimenta, pimentão, batata. Nos últimos anos, o gênero *Physalis* L., sobretudo *P. peruviana* L. (popularmente conhecida como “goldenberry”, “camapu”, “balãozinho” ou “joá-de-capote”) (Figura 1), ganhou destaque devido ao potencial ornamental, frutos exóticos de alto valor nutricional (PUENTE et al., 2011; RUFATO et al., 2008) e produção de fitocompostos com atividade farmacológica (MAHALAKSHMI; NIDAVANI, 2014; TOMASSINI et al., 2000). Recentemente, pesquisas foram desenvolvidas com objetivo de estabelecer protocolos para sua propagação e produção de metabólitos secundários *in vitro* (LASHIN; ELHAW, 2016; MASCARENHAS, 2018; SINGH et al., 2016).

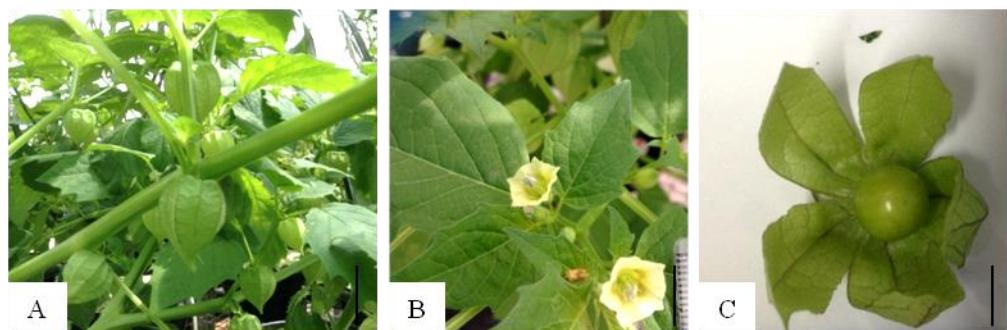


Figura 1. Aspecto geral de *Physalis peruviana*. Hábito (A), Flores (B) e Frutos (C). Barra=1cm. Fonte: MASCARENHAS, L.M.S.

A cultura de tecidos vegetais também tem sido adotada como estratégia de multiplicação e conservação de espécies ornamentais endêmicas da Chapada Diamantina-BA ameaçadas de extinção. Dentre os casos mais críticos, o extrativismo de *Comandra mucugensis* (Giul.) L.R.Parra & Giul. (Eriocaulaceae) (Figura 2) para o mercado internacional de flores secas acarretou na redução significativa das populações naturais, o que levou o IBAMA no início dos anos 1990 proibir sua colheita (COSTA; TROVÓ; SANO, 2008). Também conhecida como “sempre viva de Mucugê”, a espécie foi citada na Lista vermelha da flora do Brasil como em risco de extinção (MARTINELLI; MORAES, 2013).

Estudos sobre a viabilidade da propagação e conservação *in vitro* desta espécie foram reportados nos últimos anos (GURGEL, 2017; LIMA-BRITO et al., 2011a, 2011b, 2015, 2016; PAIXÃO-SANTOS et al., 2003; PEREIRA et al., 2017; SANTOS et al., 2008; SILVA et al., 2005).



Figura 2. Campo de *Comanthera mucugensis* em Mucugê – BA (A), Flor de *C. mucugensis* (B), Buquês de *C. mucugensis* (C). Fonte: Projeto Sempre Viva

O litoral brasileiro possui uma grande diversidade de macroalgas vermelhas (Rhodophyta) (MENEZES et al., 2015). Dentre estas, *Agardhiella subulata* (C.Agardh) Kraft & M.J.Wynne, *Hypnea pseudomusciformis* Nauer, Cassano & M.C.Oliveira e *Gracilaria* sp. apresentam expressivo potencial biotecnológico (Figura 3) (FERNANDES; DE OLIVEIRA; YONESHIGUE VALENTIN, 2014). Alguns trabalhos demonstraram resultados interessantes com o uso de extrato de *Gracilaria* Grev. no cultivo *in vitro* de solanáceas (SATISH et al., 2015; SIVANANDHAN et al., 2014; VINOOTH et al., 2019; VINOOTH; GURUSARAVANAN; JAYABALAN, 2011). No entanto, não há relatos de estudos sobre o emprego de *A. subulata* e *H. pseudomusciformis* no cultivo de plantas. Desta forma, este trabalho verificou os efeitos dos extratos das três macroalgas no desenvolvimento *in vitro* de *P. peruviana* e *C. mucugensis*. Este é o primeiro trabalho que demonstra o aproveitamento de macroalgas brasileiras no cultivo *in vitro* de plantas.

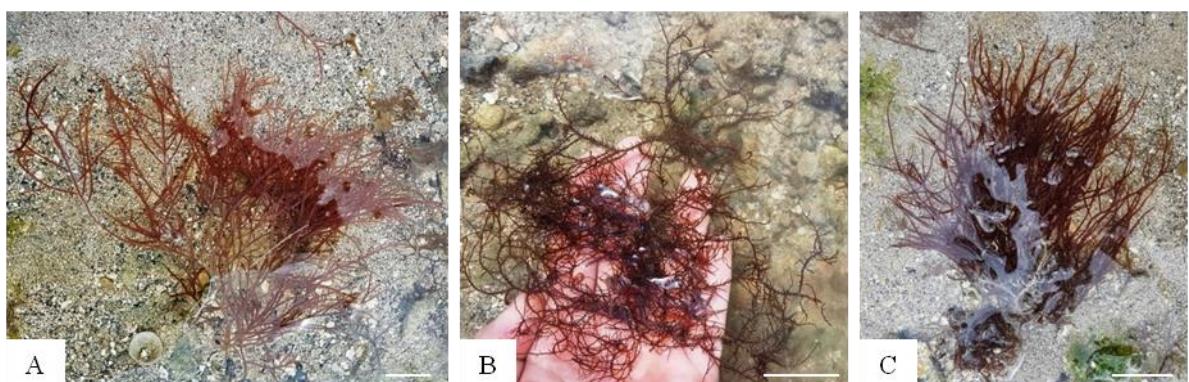


Figura 3. Aspecto geral das macroalgas marinhas *Agardhiella subulata* (C.Agardh) Kraft & M.J.Wynne (A), *Hypnea pseudomusciformis* Nauer, Cassano & M.C.Oliveira (B) e *Gracilaria* sp. (C) Barra= 1cm. Fonte: Autora.

REFERÊNCIAS

- ABDIN, M. Z. et al. **Plant Biotechnology: Principles and Applications**. Springer Singapore, 2017.
- AGRAWAL, A. et al. Cost-effective *in vitro* conservation of banana using alternatives of gelling agent (isabgol) and carbon source (market sugar). **Acta physiologiae plantarum**, v. 32, n. 4, p. 703–711, 2010.
- 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**, p. 1–11, 2018.doi:10.1007/s10811-018-1640-x
- BARRETO, A. et al. Agricultural intensification in Brazil and its effects on land-use patterns : an analysis of the 1975 – 2006 period. **Global Change Biology**, v. 19, p. 1804–1815, 2013.
- BATTACHARYYA, D. et al. Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 39–48, 2015.
- COSTA, F. N.; TROVÓ, M.; SANO, P. T. Eriocaulaceae na Cadeia do Espinhaço: riqueza, endemismo e ameaças. **Megadiversidade**, v. 4, n. 1-2, p. 117–125, 2008.
- CRAIGIE, J. S. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 371–393, 2011.
- DATTA, S. K.; CHAKRABORTY, D.; JANAKIRAM, T. Low cost tissue culture : An overview. **The Journal of Plant Science Research**, v. 33, n. 2, p. 181–199, 2017.
- EL-SHERIF, N. A. Impact of Plant Tissue Culture on Agricultural Sustainability. In: NEGM, A. M.; ABUHASHIM, M. (Eds.). **Sustainability of Agricultural Environment in Egypt: Part II. The Handbook of Environmental Chemistry**. Springer, Cham, 2018. p. 93–107.
- 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 (PCTOC)**, v. 128, n. 2, p. 437–446, 2017.
- FERNANDES, D. R. P.; DE OLIVEIRA, V. P.; YONESHIGUE VALENTIN, Y. Seaweed biotechnology in Brazil: six decades of studies on natural products and their antibiotic and other biological activities. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 5, p. 1923–1937, 2014.
- GURGEL, Z. E. D. R. **Micropropagação e conservação de Comanthera mucugensis Giul. subsp. mucugensis**. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. Universidade Estadual de Feira de Santana, 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.
- KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Low-cost alternatives for the micropropagation of banana. **Plant Cell**,

Tissue and Organ Culture, v. 66, n. 1, p. 67–71, 2001.

LASHIN, I. I.; ELHAW, M. H. Evaluation of secondary metabolites in callus and tissues of *Physalis peruviana*. **International Journal of Modern Botany**, v. 6, n. 1, p. 10–17, 2016.

LIMA-BRITO, A. et al. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p. 1354–1361, 2011a.

LIMA-BRITO, A. et al. *In vitro* morphogenesis of *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 3, p. 502–510, 2011b.

LIMA-BRITO, A. et al. Plant growth regulators for *in vitro* minimal growth of *Comanthera mucugensis*. **Plant Cell Culture & Micropagation**, 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 Ciencia Agronomica**, v. 47, n. 1, p. 152–161, 2016.

MAHALAKSHMI, A. M.; NIDAVANI, R. B. *Physalis angulata* L.: An ethanopharmacological review. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 03, 2014.

MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.

MASCARENHAS, L. M. S. **Micropropagação e análises bioquímicas e fitoquímicas de *Physalis peruviana*** L. Dissertação. Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. Universidade Estadual de Feira de Santana, 2018.

MENEZES, M. et al. Update of the Brazilian floristic list of Algae and Cyanobacteria. **Rodriguésia**, v.66, n.4, p.1047-1062. 2015.

PAIXÃO-SANTOS, J. da et al. Germinação *in vitro* de *Syngonanthus mucugensis* Giulietti. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v. 3, n. 1, 2003.

PARDEY, P. G. et al. A bounds analysis of world food futures: global agriculture through to 2050. **Australian Journal of Agricultural and Resource Economics**, v. 58, n. 4, p. 571–589, 2014.

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.

PUENTE, L. A. et al. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1733–1740, 2011.

ROCKSTROM, J. et al. Sustainable intensification of agriculture for human prosperity and global sustainability. **Ambio**, v. 46, n. 1, 2016.

RUFATO, L. et al. Aspectos técnicos da cultura da *Physalis*. **Lages: CAV/Udesc**, p. 457–463, 2008.

- 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, n. 2, p. 127–131, 2008.
- SARASWATHI, M. S. et al. Cost-effective tissue culture media for large-scale propagation of three commercial banana (*Musa* spp.) varieties. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 91, n. 1, p. 23–29, 2016.
- SATISH, L. et al. Effect of seaweed liquid extracts and plant growth regulators on *in vitro* mass propagation of brinjal (*Solanum melongena* L.) through hypocotyl and leaf disc explants. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 2, p. 993–1002, 2015.
- SILVA, J. R. S. et al. Efeito da sacarose sobre o enraizamento e desenvolvimento *in vitro* de *Syngonanthus mucugensis* Giul. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v. 5, n. 2, p. 56-59, 2005.
- SINGH, P. et al. *In vitro* regeneration of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) through nodal segment. **The Bioscan**, v. 11, n. 1, p. 41–44, 2016.
- SIVANANDHAN, G. et al. Improved production of withanolides in shoot suspension culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal by seaweed extracts. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 119, n. 1, p. 221–225, 2014.
- TOMASSINI, T. C. B. et al. Gênero *Physalis* - uma revisão sobre vitaesteróides. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 47–57, 2000.
- VENKATACHALAM, P. et al. Effect of phycochemical coated silver nanocomplexes as novel growth-stimulating compounds for plant regeneration of *Alternanthera sessilis* L. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 2, p. 1095–1106, 2017.
- VINOTH, S. et al. Influence of seaweed extracts and plant growth regulators on *in vitro* regeneration of *Lycopersicon esculentum* from leaf explant. **Journal of Applied Phycology**, 2019. doi: 10.1007/s10811-018-1703-z.
- VINOTH, S.; GURUSARAVANAN, P.; JAYABALAN, N. Effect of seaweed extracts and plant growth regulators on high-frequency *in vitro* mass propagation of *Lycopersicon esculentum* L (tomato) through double cotyledonary nodal explant. **Journal of Applied Phycology**, v. 50, n. 4, p. 677–681, 2011.
- 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, 2012.

CAPÍTULO 1

Utilização de extrato de macroalgas marinhas no cultivo *in vitro* de plantas

Use of extract seaweed the *in vitro* cultivation of plants

Utilização de extrato de macroalgas marinhas no cultivo *in vitro* de plantas

Use of extract seaweed the *in vitro* cultivation of plants

Luane Portela Carmo^{I*} Carlos Wallace do Nascimento Moura^{II} Alone Lima-Brito^{III}

-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-

6 RESUMO:

7 A cultura de tecidos vegetais é uma técnica amplamente utilizada para o melhoramento de
8 culturas, propagação clonal (micropagação), conservação *ex situ* e exploração de
9 metabólitos secundários, mas seu custo ainda é elevado. Na busca por constituintes
10 alternativos, ecológico e econômico, estudos têm testado o enriquecimento dos meios
11 nutritivos com suplementos orgânicos, como fontes diversas de carbono, agentes gelificantes
12 e extratos vegetais como os das macroalgas marinhas. A adição de extratos algáceos na
13 composição do meio nutritivo pode, em parte, suprimir a utilização de reguladores vegetais
14 sintéticos, reduzindo o custo do cultivo e a possibilidade de ocorrer variação somaclonal. Os
15 dados aqui relatados demonstram o efeito benéfico desses extratos no incremento do
16 crescimento e ganho de biomassa das plantas e que apesar do significativo potencial de
17 utilização, ainda são necessários estudos sobre o uso de algas no cultivo *in vitro*,
18 especialmente no que se refere a resposta morfogênica em plantas. Recomenda-se que
19 esforços sejam reunidos na caracterização bioquímica e molecular das respostas fisiológicas
20 observadas para permitir avanços no entendimento do mecanismo de ação das macroalgas no
21 desenvolvimento das plantas. Por fim, salienta-se que a utilização de extratos de macroalgas
22 na produção agrícola orgânica, devido ao seu potencial como biorregulador de crescimento

20

^{1*} Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, 44036-900, Feira de Santana, BA, Brasil. E-mail: luaneportela@yahoo.com.br. *Autor para correspondência.

^{II} Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Ficologia, 44036-900, Feira de Santana, BA, Brasil. Email: wallace@uefs.br.

^{III} Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Cultura de Tecidos – Unidade Experimental Horto Florestal, 44055-000, Feira de Santana, BA, Brasil. Email: alone@uefs.br.

1 vegetal, seja uma alternativa ao uso de reagentes químicos que apresentam riscos para a
2 saúde humana, além de provocar grande impacto ambiental.

3 **Palavras-chaves:** Extrato de algas, Meio de cultura alternativo, multiplicação *in vitro*,
4 Reguladores de crescimento vegetal.

5 **ABSTRACT:**

6 Plant tissue culture is a widely used technique for the plant improvement, clonal propagation
7 (micropropagation), *ex situ* conservation and exploration of secondary metabolites, yet it cost
8 is still high. In the seeking to alternative, ecological and economic constituents, many studies
9 have been testing the enrichment of nutritious media using organic suplements as a diverse
10 carbon sources, gelling agentes and algae extracts as seaweed extracts. The addition of algae
11 extracts in the nutricious media composition may, in parts, to supress the use of synthetic plant
12 regulators, reducing the cost of cultivation and the possibility of somaclonal variation. The
13 data reported here demonstrate the beneficial effects of these extracts on the growth
14 enhancement and biomass gain of the plants. Despite of the significant potential of utilization,
15 studies on the use of algae in *in vitro* cultivation are still needed, especially regarding the
16 morphogenic response in plants. More studies on biochemistry and molecular characterization
17 of the observed physiological responses are needed to enlight the mechanism of action of
18 seaweed extracts in plant development. Lastly, it is recommended the use of seaweed extracts
19 in organic agricultural production, due to its potential as biorregulator of plant growth, as
20 alternative to the use of chemical reagentes presenting risks to human health and causing
21 environmental impacts.

22 **Keywords:** Algae Extract, Alternative Culture Medium, *In vitro* multiplication, Plant growth
23 regulators.

24

25

1 INTRODUÇÃO

2 As macroalgas marinhas representam um conjunto de organismos uni (raro)-multicelulares,
3 fotossintetizantes e talófitos, que habitam desde regiões entremarés até o infralitoral dos
4 oceanos. São principalmente bentônicos e podem ser enquadrados em três grupos, com base
5 na coloração do talo: vermelha (Rhodophyta), parda ou marrom amarelada (Ochrophyta/
6 Phaeophyceae) e verde (Chlorophyta) (SAHOO & SECKBACH, 2015).

7 A despeito da sua variabilidade morfológica, bioquímica e genética, as macroalgas ocorrem
8 em uma imensa variedade de nichos ecológicos e, devido às diversas interações biológicas e
9 condições abióticas extremas enfrentadas, produzem uma grande variedade de compostos
10 biologicamente ativos a partir de diferentes rotas metabólicas como estratégia de
11 sobrevivência (STENGEL et al., 2011). Estes compostos exibem múltiplas bioatividades com
12 aplicações nos setores alimentício, cosmético, agri/horticultura, farmacêutico e bioenergético
13 (MICHALAK & CHOJNACKA, 2015; SUDHAKAR et al., 2018). Atualmente, a utilização
14 dos extratos de macroalgas vem sendo encorajada na produção agrícola orgânica devido ao
15 seu potencial como bioestimulante vegetal, como uma contrapartida ao uso excessivo de
16 fertilizantes químicos que apresentam riscos para a saúde humana, além de provocar grande
17 impacto ambiental (DMYTRYK & CHOJNACKA, 2018).

18 A aplicabilidade das macroalgas na agricultura é conhecida desde a antiguidade
19 (CHAPMAN & CHAPMAN, 1980). O alto teor de fibras presentes no talo atua como
20 condicionador de solo e auxilia na retenção da umidade. Seus extratos são frequentemente
21 comercializados como fertilizantes e bioestimulantes (CRAIGIE, 2011). Muitos desses
22 produtos encontrados no mercado agrícola são obtidos a partir das algas pardas (Ochrophyta/
23 Phaeophyceae) a exemplo de *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis, *Ecklonia maxima* (Osbeck)
24 Papenf., *Fucus* spp., *Laminaria* spp., *Sargassum* spp., e *Turbinaria* spp., além de algas

1 calcárias (Corallinales/ Rhodophyta) (CRAIGIE, 2011). Diversos benefícios foram
2 associados ao seu uso, como estimulação da germinação de sementes, melhoria do
3 crescimento de plantas, alongamento de raízes, otimização da absorção de água e nutrientes,
4 resistência a salinidade e baixas temperaturas, biocontrole e resistência a organismos
5 fitopatogênicos, além de remediação de poluentes de solos contaminados (NABTI et al.,
6 2017).

7 Alguns estudos realizados nos últimos anos demonstraram os efeitos de extratos de algas no
8 desenvolvimento *in vitro* de plantas através da cultura de tecidos vegetais (Tabelas 1 e 2).
9 Esta técnica é amplamente utilizada para o melhoramento de culturas, propagação clonal
10 (micropropagação) e exploração de metabólitos secundários (ABDIN et al., 2017). Além
11 disso, permite que espécies raras e em risco de extinção sejam resgatadas, propagadas e
12 mantidas em bancos ativos de germolasma (BAGs) por meio de conservação *in vitro* (EL-
13 SHERIF, 2018).

14 Na micropropagação, as microplantas podem ser obtidas através de dois processos distintos,
15 denominados de organogênese e embriogênese somática (THORPE, 1993). A organogênese é
16 o processo pelo qual células e tecidos vegetais diferenciam-se resultando na produção de uma
17 estrutura unipolar, um primórdio vegetativo ou raiz, cujo sistema vascular está conectado ao
18 tecido parental. Na embriogênese somática há a formação de uma estrutura bipolar contendo
19 um eixo apical/raiz, com um sistema vascular autônomo fechado. Ambos podem ocorrer
20 diretamente do explante ou indiretamente via formação de calo (THORPE, 1993). O sucesso
21 desses processos depende da fonte do explante, composição do meio nutritivo e das condições
22 de cultivo.

23 A principal desvantagem da cultura de tecidos vegetais é o custo elevado associado a
24 infraestrutura, equipamentos e reagentes químicos. Além disso, o uso de altas concentrações

1 de reguladores vegetais sintéticos podem induzir variação somaclonal (SKIRVIN et al. 1994).
2 Na busca por constituintes alternativos, ecológicos e econômicos, estudos têm testado o
3 enriquecimento dos meios nutritivos com suplementos orgânicos, como fontes diversas de
4 carbono (AL-KHATEEB, 2008; TYAGI et al., 2007), agentes gelificantes (AGRAWAL
5 & SANAYAIMA, 2010) e extratos vegetais (KITSAKI et al., 2004; WISZNIEWSKA et al.,
6 2013). Outros trabalhos revelaram excelentes resultados com o uso de extrato de macroalgas
7 (especialmente dos filos *Rhodophyta* e *Ocrophyta/ Phaeophyceae*) na indução de
8 organogênes e embriogênese somática (Tabelas 1 e 2), e produção de metabólitos secundários
9 (SIVANANDHAN et al., 2014; SHARMA et al., 2015). Também foram reportados efeitos
10 benéficos da utilização de macroalgas na aclimatização de microplantas (JONES & VAN
11 STADEN, 2001; LINDSEY et al., 1998; MAKUNGA & VAN STADEN, 2008).

12 Apesar de apresentar resultados promissores, o potencial uso de macroalgas no cultivo *in vitro*
13 de plantas ainda é pouco explorado. Considerando que desvendar novos métodos de
14 propagação é crucial para o aumento da produção de plantas de forma sustentável, este estudo
15 apresenta uma visão geral da utilização das macroalgas na cultura de tecidos vegetais com o
16 propósito de permitir o avanço do conhecimento num tema ainda pouco abordado.

17 **COMPONENTES DAS MACROALGAS MARINHAS QUE AFETAM O**
18 **DESENVOLVIMENTO DAS PLANTAS**

19 Os extratos de algas podem atuar como biofertilizantes ou biorreguladores do crescimento das
20 plantas. Os fertilizantes fornecem nutrientes necessários para o crescimento, enquanto que, os
21 reguladores vegetais estão envolvidos com os processos de divisão celular, alongamento da
22 raiz e da parte aérea, o início da floração e outras funções metabólicas, intermediadas por
23 fitohormônios (HAMED et al., 2017).

1 Os talos das macroalgas marinhas são ricos em minerais. Diversos trabalhos descreveram
2 quantidades elevadas de macroelementos (Na, K, P, Ca e Mg), microelementos (Fe, Zn, Mn,
3 Cu) e oligoelementos (KUMAR et al., 2011; RODRIGUES et al., 2015; RUPÉREZ, 2002) em
4 sua composição. A bioabsorção de minerais tem sido atribuída principalmente à composição da
5 parede celular das macroalgas. Esta é composta por microfibrilas de celulose envoltas em uma
6 matriz amorfã composta por polissacarídeos sulfatados que possuem afinidade por íons
7 metálicos (FIGUEIRA et al., 2000).

8 RATHORE et al. (2009) observaram que a aplicação de extrato de *Kappaphycus alvarezii*
9 (Doty) Doty ex P.C.Silva (Rhodophyta) melhorou a absorção de nutrientes (N, P, K e S),
10 crescimento e rendimento de soja. Resultados semelhantes também foram registrados por
11 CROUCH et al. (1990) que demonstraram o aumento significativo da quantidade de Ca, K e
12 Mg em folhas de alface com a utilização de 'Kelpak®', um produto à base de *Ecklonia*
13 *máxima* (Ochrophyta/ Paheophyceae) amplamente difundido no mercado agrícola como
14 biofertilizante. Apesar de apresentarem elevado teor nutricional, CROUCH et al. (1990)
15 sugeriram que os extratos algáceos dificilmente atuam como fertilizante, uma vez que, a
16 melhoria na absorção dos nutrientes só foi observada quando as plantas foram cultivadas em
17 condições abaixo do ideal nutricional ou sob estresse ambiental.

18 BATTACHARYYA et al. (2015) explicaram que os extratos de macroalgas marinhas podem
19 alterar as propriedades físicas, bioquímicas e biológicas do solo, modificar a arquitetura das
20 raízes para aumentar a eficiência de absorção, além de afetar a regulação de genes que
21 desempenham um papel importante na assimilação de minerais. Diversos trabalhos também
22 sugeriram que os fitohormônios presentes nos extratos algáceos são responsáveis pela
23 melhoria no crescimento e vigor das plantas (BATTACHARYYA et al., 2015; CRAIGIE,
24 2011). RAYORATH et al. (2008) e KHAN et al. (2011) demonstraram que o extrato

1 comercial de *Ascophyllum nodosum* induz efeitos semelhantes à auxina e à citocinina
2 em plantas de *Arabidopsis* Heynh.

3 STIRK & VAN STADEN (2014) relataram a ocorrência de citocininas, auxinas, giberelinas,
4 ácido abscísico e etileno em macroalgas. As citocininas ocorrem naturalmente nas formas
5 isoprenóides (isopenteniladenina (iP), *trans*-zeatina (tZ), *cis*-zeatina (cZ) e diidrozeatina
6 (DHZ)) e aromáticas (benziladenina (BA) e topolina). As auxinas comumente encontradas são
7 os ácidos indol 3-acético (AIA), indol 3-butírico (AIB), indol 3-pirúvico (AIP) e indol-3
8 acetamida (IAM). Os autores também relataram a presença de brassinosteróides, jasmonatos,
9 ácido salicílico e estrigolactonas.

10 Apesar da presença comprovada de fitohormônios, WALLY et al. (2013) alegaram que a
11 concentração destes nos extratos de macroalgas é insuficiente para causar efeitos
12 significativos no crescimento das plantas. Estes autores sugeriram que a atividade semelhante
13 à citocinina está associada a moléculas eliciadoras presentes nos extratos que possuem a
14 capacidade de modular vias da biossíntese de fitohormônios em plantas. O estudo demonstrou
15 que a aplicação do extrato de *Ascophyllum nodosum* no cultivo *in vitro* de *Arabidopsis* levou
16 ao aumento da concentração total e expressão de citocininas e ácido abscísico (ABA),
17 enquanto que, os níveis de auxina foram reduzidos. PATEL et al. (2018) também encontraram
18 perfil hormonal semelhante nas plantas de trigo tratadas com *Kappaphycus alvarezi*.

19 Os oligo-carragenanos, obtidos por despolimerização ácida de carragenanas extraídas de
20 macroalgas vermelhas, foram relacionados com o aumento do crescimento de plantas, como
21 tabaco e eucalipto (CASTRO et al., 2012; GONZÁLEZ et al., 2014). Os trabalhos
22 demonstraram que o tratamento com a fitomolécula induziu aumento na síntese de NADPH,
23 ácido ascórbico, glutationa e tiorredoxina que, por sua vez, incrementaram a atividade de
24 enzimas como rubisco, glutamina sintetase e adenosina 5' fosfatosulfato. Desta forma, estaria

1 beneficiando significativamente a fotossíntese, o metabolismo basal e o crescimento das
2 plantas. Também foi reportada a utilização de carragenana comercial na indução de
3 embriogênese em micrósporos de couve (LEMONNIER-LE PENHUIZIC et al., 2001).

4 Além da capacidade de regular o crescimento, os polissacarídeos de macroalgas podem
5 desencadear respostas de defesa em plantas aumentando a proteção contra patógenos
6 (STADNIK & FREITAS, 2014; VERA et al., 2011). PAULERT et al. (2009) demonstraram
7 que a pulverização de ulvana (extraída de macroalga *Ulva* L. - Chlorophyta) reduziu a
8 gravidade da antracnose do feijoeiro em 38% além de aumentar o peso seco das plantas em
9 20%. Segundo MERCIER et al. (2001), a carragenana também foi capaz de incrementar a
10 resposta de defesa em folhas de tabaco. VERA et al. (2011) explicaram que os
11 polissacarídeos de macroalgas marinhas podem desencadear ativação de vias de sinalização
12 para ácido salicílico, ácido jasmônico e/ou etileno em nível sistêmico. A ativação destas
13 vias conduz a uma sobreexpressão de proteínas relacionadas à patogênese, enzimas de
14 defesa, como fenilalanina amônia-liase e lipoxigenase, e enzimas envolvidas na síntese de
15 terpenos, terpenóides e/ou alcaloides, promovendo uma expressiva atividade
16 antimicrobiana.

17 Compostos bioativos presentes nos extratos de macroalgas marinhas também podem atenuar
18 o estresse abiótico em plantas (PATEL et al., 2018; VAN OOSTEN et al., 2017).
19 MANSORI et al. (2015) demonstraram que os extratos de *Ulva rígida* C. Agardh
20 (Chlorophyta) e *Fucus spiralis* L. (Ochrophyta/ Phaeophyceae) aplicados em plantas de
21 feijão, sob condições de seca, melhoraram o crescimento e aumentaram a tolerância ao
22 estresse hídrico devido a ativação do sistema enzimático antioxidante e aumento do conteúdo
23 fenólico, contribuindo para a proteção das plantas. Recentemente foi demonstrado que a
24 aplicação de extrato de *Gracilaria dura* (C.Agardh) J.Agardh (Rhodophyta)
25 confere tolerância ao estresse hídrico em plantas de trigo através do aumento do conteúdo de

1 ABA que induz o fechamento dos estômatos, reduzindo assim a perda de água (SHARMA et
2 al., 2019). Segundo HERNÁNDEZ-HERRERA et al. (2014), as macroalgas também são uma
3 excelente fonte de potássio que ajuda a regular o potencial hídrico das plantas, controlando a
4 abertura e o fechamento dos estômatos.

5 As macroalgas marinhas podem ser utilizadas para melhorar a tolerância das plantas ao frio.
6 Os resultados obtidos por NAIR et al. (2012) mostraram que o extrato de *Ascophyllum*
7 *nodosum* aumentou o conteúdo de prolina e açúcares solúveis totais em *Arabidopsis thaliana*
8 (L.) Heynh. cultivada em baixa temperatura, como estratégia de tolerância. Além disso,
9 WHAPHAM et al. (1993) sugeriram que as betaínas presentes nos extratos algáceos
10 aumentam os níveis de clorofila nas plantas. Estas moléculas são conhecidas por sua função
11 osmoprotetora e atuação na melhoria da fotossíntese em condições de estresse (WANG et al.,
12 2010).

13 Está bem estabelecido que as macroalgas marinhas são fonte de compostos bioativos
14 amplamente utilizados para melhorar a fertilidade dos solos e promover o crescimento das
15 plantas. Existe um consenso entre os pesquisadores que o efeito benéfico da aplicação do
16 extrato algáceo é resultado de muitos componentes que podem trabalhar sinergicamente em
17 diferentes concentrações e que seu mecanismo de ação ainda precisa ser melhor investigado.

18 **APLICAÇÕES DE EXTRATO DE MACROALGAS MARINHAS NO CULTIVO *IN*
19 *VITRO* DE PLANTAS**

20 O primeiro estudo com o emprego de extrato de macroalgas no cultivo *in vitro* de plantas foi
21 reportado por FINNIE & VAN STADEN (1985) com a utilização do 'Kelpak®' na cultura de
22 raízes de tomate. Foi observado um excelente crescimento radicular e constatado que o
23 processo de esterilização do meio por autoclavagem não causou a perda do efeito
24 estimulatório do concentrado da macroalga. O mesmo produto foi usado por KOWALSKI et

1 al. (1999) no estabelecimento *in vitro* de batata. Os resultados demonstraram que a
2 incorporação do extrato no meio nutritivo diminuiu o comprimento e a biomassa seca das
3 plantas, no entanto, este tratamento induziu a redução da perda de água durante o processo de
4 aclimatização das mesmas, favorecendo seu estabelecimento *ex vitro*. Já a utilização de
5 polissacarídeos de *Ulva lactuca* L. (Chlorophyta) e *Padina gymnospora* (Kütz.)
6 Sonder (Ochrophyta/ Phaeophyceae) promoveram o aumento do crescimento *in vitro* de
7 plantas de tomate e feijão (HERNÁNDEZ-HERRERA et al., 2016).

8 Foram reportados estudos com a utilização de extratos de macroalgas marinhas na
9 regeneração de plantas por organogênese (Tabela 1). Os trabalhos utilizaram principalmente
10 representantes de Rhodophyta e Ochrophyta/ Phaeophyceae, dos quais, o gênero *Gracilaria*
11 Grev. (Rhodophyta) foi o mais referenciado. Neste sentido, foi demonstrado o efeito do
12 extrato de *Gracilaria edulis* (S.G.Gmel.) P.C.Silva (= *Hydropuntia edulis* (S.G.Gmel.) Gurgel
13 & Fredericq) na indução de brotos em tomate diretamente do segmento nodal (VINOTH et
14 al., 2011) e a partir de calo organogênico derivado de folhas (VINOTH et al., 2019). A
15 presença do extrato não foi significativa para o aumento da produção de brotos, no entanto,
16 promoveu o incremento do crescimento da parte aérea e raiz dos mesmos. Estas pesquisas
17 relacionaram os mesmos efeitos para o extrato de *Sargassum wightii* Grev. ex J.Agardh
18 (=*Sargassum bacciferum* [Turner] C.Agardh) (Ochrophyta/ Phaeophyceae).
19 MUTHUKRISHNAN et al., (2015), SATISH et al. (2015) e RENCY et al. (2017) também
20 concluíram que a suplementação com extrato de macroalgas no meio nutritivo não é
21 significativo para promover a multiplicação das plantas, mas é benéfico para o ganho de
22 biomassa dos brotos, em baixas concentrações. A utilização de concentrações altas passa a
23 exibir comportamento inibitório.

24 A suplementação do meio nutritivo com extrato de *G. edulis* promoveu aumento da biomassa
25 de brotos de *Withania somnifera* L., bem como, a produção de vitanolídeos, compostos

1 *esteroides com função medicinal* (SIVANANDHAN et al., 2014). *De forma similar, o*
2 *aumento da produção de metabolitos secundários induzido por extrato de macroalgas foi*
3 *registrado por SHARMA et al. (2015) em *Picrorhiza kurroa* Royle ex Benth., uma erva*
4 *medicinal ameaçada de extinção. Os autores demonstraram que *Kappaphycus alvarezii**
5 *incrementou o acúmulo de picrosídeo I-II, além disso, o efeito estimulatório para a*
6 *produção de brotos foi semelhante ao efeito induzido por reguladores vegetais sintéticos,*
7 *portanto, considerado como meio alternativo de baixo custo para a multiplicação destas*
8 *plantas. ALBURQUERQUE et al. (2018) demonstraram que o uso de extrato aquoso a 10%*
9 *de *Caulerpa cylindracea* Sond. (Chlorophyta) e *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trevis.*
10 *(Rhodophyta) aumenta a porcentagem de regeneração dos explantes, bem como, o número de*
11 *brotos produzidos a partir de hipocótiledes de damasco. A utilização das algas pardas e*
12 **Cystoseira myriophylloides* Sauv. (= *Cystoseira humilis* var. *myriophylloides* [Sauv.]*
13 *J.H.Price & D.M.John), *Laminaria digitata* (Huds.) J.V.Lamour. e *Fucus spiralis* melhorou*
14 *significativamente a taxa de regeneração de *Nicotiana benthamiana*, no entanto, os extratos*
15 *inibiram drasticamente o crescimento de plantas como videira, ameixa e damasco (ESSERTI*
16 *et al., 2017). VENKATACHALAM et al. (2017) estudaram os efeitos do nanocomplexo de*
17 *prata revestido com extrato de *Gracilaria foliifera* (Forssk.) Børgesen e seu impacto na*
18 *regeneração direta de *Alternanthera sessilis* (L.) R.Br. ex DC. Os resultados mostraram que a*
19 *formulação é capaz de regenerar 100% dos explantes e aumentar em duas vezes a produção de*
20 *brotos. Os efeitos observados são superiores aos registrados com meio suplementado com*
21 *reguladores de crescimento vegetais sintéticos, portanto, apontado como um excelente meio*
22 *alternativo para multiplicação de *A. sessilis*.*

23 Os estudos sobre os efeitos de extratos de macroalgas na embriogênese somática ainda são
24 incipientes (Tabela 2). Dentre estes, foi reportado que os extratos de *Caulerpa scalpelliformis*
25 (R.Brown ex Turner) C.Agardh (Chlorophyta) e *Gracilaria corticata* (J.Agardh) J.Agardh

1 (Rhodophyta) influenciaram significativamente o desenvolvimento, maturação e germinação
2 do embrião obtidos a partir de calos previamente estabelecidos de tomate (VINOTH et al.,
3 2014). Os resultados mostraram que a maturação e germinação de embriões somáticos podem
4 ser duas vezes maiores nos meios contendo extratos das macroalgas em relação ao meio
5 suplementado apenas com reguladores vegetais sintéticos. SATISH et al. (2016) estudaram os
6 efeitos de *Padina boergesenii* Allender & Kraft (Ochrophyta/ Paheophyceae) e *Gracilaria*
7 *edulis* (Rhodophyta) em plantas de milho. Embora ambas as macroalgas tenham apresentado
8 efeito estimulador para formação de calos embriogênicos, os melhores resultados foram
9 registrados para *G. edulis*. A maior taxa de regeneração, bem como, número e comprimento
10 médio de brotos também foi registrado em meios fortificados com extrato da rodofícea. Os
11 autores ainda concluíram que em altas concentrações de extratos ocorre necrose nos tecidos
12 vegetais. Recentemente foi demonstrada a eficiência do uso de extrato de *Ulva lactuca*
13 (Chlorophyta) revestido com nanopartícula de prata na embriogênese somática e regeneração
14 de *Gloriosa superba* L. O protocolo estabelecido por MAHENDRAN et al. (2017) aumentou
15 significativamente a taxa de produção de embriões, maturação e regeneração com a adição
16 das fitomóleculas combinadas com reguladores vegetais.

17 CONCLUSÃO

18 Os dados aqui apresentados demonstram o efeito benéfico de extratos das macroalgas
19 marinhas no desenvolvimento das plantas. Apesar do significativo potencial da utilização, é
20 necessário ampliar os estudos sobre suas aplicações no cultivo *in vitro*, especialmente no que
21 se refere a resposta morfogênica das plantas. Os principais efeitos dos extratos são
22 relacionados com o incremento do crescimento e ganho de biomassa. Estes resultados
23 dependem das concentrações utilizadas na composição do meio nutritivo pode, em parte,
24 suprimir a utilização de reguladores vegetais sintéticos, reduzindo o custo do cultivo e a
25 possibilidade de ocorrer variação somaclonal. Recomenda-se que esforços sejam reunidos na

1 caracterização bioquímica e molecular das respostas fisiológicas observadas para permitir
2 avanços no entendimento do mecanismo de ação das macroalgas no desenvolvimento das
3 plantas.

4 **AGRADECIMENTO**

5 A primeira autora agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
6 – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 pelo apoio no presente trabalho.

7 **DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE**

8 Não existe conflito de interesse

9 **CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES**

10 Os autores contribuíram igualmente para o manuscrito.

11 **REFERÊNCIAS**

12 ABDIN, M. Z. et al. **Plant Biotechnology: Principles and Applications**. Springer
13 Singapore, 2017.

14 AGRAWAL, A.; SANAYAIMA, R. Cost-effective *in vitro* conservation of banana using
15 alternatives of gelling agent (isabgol) and carbon source (market sugar). **Acta physiologae**
16 **plantarum**, v. 32, n. 4, p. 703-711, 2010. Available from: <<https://doi.org/10.1007/s11738-009-0450-9>>. Accessed: Mar. 18, 2018. doi: 10.1007/s11738-009-0450-9.

18 ALBURQUERQUE, N. et al. Towards the valorization of the invasive seaweeds *Caulerpa*
19 *cylindracea* and *Asparagopsis taxiformis* in the Mediterranean Sea: applications for *in vitro*
20 plant regeneration and crop protection. **Journal of Applied Phycology**, p. 1–11, 2018.
21 Available from:<<https://doi.org/10.1007/s10811-018-1640-x>>. Accessed: Jan. 6, 2019. doi:
22 10.1007/s10811-018-1640-x.

- 1 AL-KHATEEB, A. A. Regulation of *in vitro* bud formation of date palm (*Phoenix dactylifera*
2 L.) cv. Khanezi by different carbon sources. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6550–
3 6555, 2008. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.070>>. Accessed: Feb.
4 22, 2019. doi: 10.1016/j.biortech.2007.11.070.
- 5 BATTACHARYYA, D. et al. Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. **Scientia
6 Horticulturae**, v. 196, p. 39–48, 2015. Available from:
7 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.012>>. Accessed: Mar. 10, 2018. doi:
8 10.1016/j.scienta.2015.09.012.
- 9 CASTRO, J. et al. Oligo-carrageenans stimulate growth by enhancing photosynthesis, basal
10 metabolism, and cell cycle in tobacco plants (var. Burley). **Journal of Plant Growth
11 Regulation**, v. 31, n. 2, p. 173–185, 2012. Available from: <<https://doi.org/10.1007/s00344-011-9229-5>>. Accessed: Feb. 26, 2018. doi: 10.1007/s00344-011-9229-5.
- 13 CHAPMAN, V. J.; CHAPMAN, D. J. **Seaweeds and their Uses**. Springer Netherlands, 1980.
- 14 CRAIGIE, J. S. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. **Journal of Applied
15 Phycology**, v. 23, n. 3, p. 371–393, 2011. Available from: <<https://doi.org/10.1007/s10811-010-9560-4>>. Accessed: July. 14, 2018. doi: 10.1007/s10811-010-9560-4.
- 17 CROUCH, I. J. et al. Effect of seaweed concentrate on the growth and mineral nutrition of
18 nutrient-stressed lettuce. **Journal of Applied Phycology**, v. 2, n. 3, p. 269–272, 1990.
19 Available from: <<https://doi.org/10.1007/BF02179784>>. Accessed: Feb. 23, 2018. doi:
20 10.1007/BF02179784.
- 21 DMYTRYK A.; CHOJNACKA K. Algae as fertilizers, biostimulants, and regulators of plant
22 growth. In: CHOJNACKA K.; WIECZOREK P.; SCHROEDER G.; MICHALAK I. **Algae
23 Biomass: Characteristics and applications**. Springer, Cham, 2018. p. 115-122.

- 1 EL-SHERIF, N. A. Impact of Plant Tissue Culture on Agricultural Sustainability. In: NEGM,
2 A. M.; ABUHASHIM, M. **Sustainability of Agricultural Environment in Egypt: Part II.**
3 **The Handbook of Environmental Chemistry**. Springer, Cham, 2018. p. 93–107.
- 4 ESSERTI, S. et al. Media derived from brown seaweeds *Cystoseira myriophylloides* and
5 *Fucus spiralis* for *in vitro* plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128,
6 n. 2, p. 437–446, 2017. Available from: <<https://doi.org/10.1007/s11240-016-1121-3>>. Accessed: July. 14, 2018. doi:10.1007/s11240-016-1121-3.
- 8 FIGUEIRA, M. M. et al. Biosorption of metals in brown seaweed biomass. **Water Research**,
9 v. 34, n. 1, p. 196–204, 2000. Available from: <[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00120-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00120-7)>. Accessed: Feb. 23, 2018. doi:10.1016/S0043-1354(99)00120-7.
- 11 FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. Effect of seaweed concentrate and applied hormones on *in*
12 *vitro* cultured tomato roots. **Journal of Plant Physiology**, v. 120, n. 3, p. 215–222, 1985.
13 Available from: <[https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(85\)80108-5](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(85)80108-5)>. Accessed: Jan. 22, 2018.
14 doi:10.1016/S0176-1617(85)80108-5.
- 15 GONZÁLEZ, A. et al. Oligo-carrageenan kappa increases NADPH, ascorbate and glutathione
16 syntheses and TRR/TRX activities enhancing photosynthesis, basal metabolism, and growth
17 in Eucalyptus trees. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 512, 2014. Available from:
18 <<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00512>>. Accessed: Feb. 26, 2019. doi:
19 10.3389/fpls.2014.00512.
- 20 HAMED, S. M. et al. Role of marine macroalgae in plant protection & improvement for
21 sustainable agriculture technology. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied**
22 **Sciences**, v. 7, n. 1, p. 104–110, 2017. Available from:
23 <<https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2017.08.002>>. Accessed: Feb. 3, 2018. doi:
24 10.1016/j.bjbas.2017.08.002.

- 1 HERNÁNDEZ-HERRERA, R. M. et al. Activity of seaweed extracts and polysaccharide-
2 enriched extracts from *Ulva lactuca* and *Padina gymnospora* as growth promoters of tomato
3 and mung bean plants. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 4, p. 2549–2560, 2016.
4 Available from: <<https://doi.org/10.1007/s10811-015-0781-4>>. Accessed: June. 21, 2018.
5 doi: 10.1007/s10811-015-0781-4.
- 6 HERNÁNDEZ-HERRERA, R. M. et al. Effect of liquid seaweed extracts on growth of
7 tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 1, p.
8 619–628, 2014. Available from: <<https://doi.org/10.1007/s10811-013-0078-4>>. Accessed:
9 June. 13, 2018. doi: 10.1007/s10811-013-0078-4.
- 10 JONES, N. B.; VAN STADEN, J. Improved somatic embryo production from embryogenic
11 tissue of *Pinus patula*. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 37, n. 5, p.
12 543–549, 2001. Available from: <<https://doi.org/10.1007/s11627-001-0094-y>>. Accessed:
13 June. 10, 2018. doi: 10.1007/s11627-001-0094-y.
- 14 KHAN, W. et al. Bioassay to detect *Ascophyllum nodosum* extract-induced cytokinin-like
15 activity in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 409–414,
16 2011. Available from: <<https://doi.org/10.1007/s10811-010-9583-x>>. Accessed: Apr. 20,
17 2018. doi: 10.1007/s10811-010-9583-x.
- 18 KITSAKI, C. K. et al. *In vitro* germination, protocorm formation and plantlet development of
19 mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae). **Plant Cell
20 Reports**, v. 23, n. 5, p. 284–290, 2004. Available from: <<https://doi.org/10.1007/s00299-004-0841-8>>. Accessed: Nov. 26, 2018. doi: 10.1007/s00299-004-0841-8.
- 22 KOWALSKI, B. et al. The effect of a seaweed concentrate on the *in vitro* growth and
23 acclimatization of potato plantlets. **Potato Research**, v. 42, p. 131–139, 1999. Available
24 from: <<https://doi.org/10.1007/BF02358403>>. Accessed: Jan. 17, 2018. doi:

- 1 10.1007/BF02358403.
- 2 KUMAR, M. et al. Minerals, PUFAs and antioxidant properties of some tropical seaweeds
3 from Saurashtra coast of India. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 5, p. 797–810, 2011.
4 Available from: <<https://doi.org/10.1007/s10811-010-9578-7>>. Accessed: Aug. 9, 2018.
5 doi: 10.1007/s10811-010-9578-7.
- 6 LEMONNIER-LE PENHUIZIC, C. et al. Carrageenan oligosaccharides enhance stress-
7 induced microspore embryogenesis in *Brassica oleracea* var. *italica*. **Plant Science**, v. 160, n.
8 6, p. 1211–1220, 2001. Available from: <[https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00372-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00372-7)>.
9 Accessed: Feb. 10, 2018. doi: 10.1016/S0168-9452(01)00372-7.
- 10 LINDSEY, K. L. et al. Effect of a seaweed concentrate on acclimatization of *in vitro* grown
11 plantlets of *Kniphofia pauciflora* and *Scilla krausii*. **South African Journal of Botany**, v. 64,
12 n. 4, p. 262–264, 1998. Available from: <[https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30892-9](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30892-9)>.
13 Accessed: Apr. 20, 2018. doi: 10.1016/S0254-6299(15)30892-9.
- 14 MAHENDRAN, D. et al. Phycomolecule-coated silver nanoparticles and seaweed extracts
15 induced high-frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from *Gloriosa*
16 *superba* L. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 2, p. 1425–1436, 2018. Available from:
17 <<https://doi.org/10.1007/s10811-017-1293-1>>. Accessed: Jan. 13, 2019. doi:
18 10.1007/s10811-017-1293-1.
- 19 MAKUNGA, N. P.; VAN STADEN, J. An efficient system for the production of clonal
20 plantlets of the medicinally important aromatic plant: *Salvia africana-lutea* L. **Plant Cell,**
21 **Tissue and Organ Culture**, v. 92, n. 1, p. 63–72, 2008. Available from:
22 <<https://doi.org/10.1007/s11240-007-9305-5>>. Accessed: June 13, 2018. doi:
23 10.1007/s11240-007-9305-5.

- 1 MANSORI, M. et al. Seaweed extract effect on water deficit and antioxidative mechanisms in
2 bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 4, p. 1689–
3 1698, 2015. Available from: <<https://doi.org/10.1007/s10811-014-0455-7>>. Accessed: Feb.
4 24, 2018. doi: 10.1007/s10811-014-0455-7M.
- 5 MERCIER, L. et al. The algal polysaccharide carrageenans can act as an elicitor of plant
6 defence. **New Phytologist**, v. 149, n. 1, p. 43–51, 1 jan. 2001. Available from:
7 <<https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00011.x>>. Accessed: Feb. 24, 2018. doi:
8 10.1046/j.1469-8137.2001.00011.x.
- 9 MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K. Algae as production systems of bioactive
10 compounds. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, n. 2, p. 160-176, 2015. Available from:
11 <<https://doi.org/10.1002/elsc.201400191>>. Accessed: Oct. 15, 2018. doi:
12 10.1002/elsc.201400191.
- 13 MUTHUKRISHNAN, S. et al. An efficient *in vitro* regeneration and *ex vitro* rooting of
14 *Ceropagia thwaitesii*: An endemic species from Western Ghats. **International Journal of**
15 **Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 30, n. 2, 2015. Available from:
16 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4101143/>>. Accessed: June 20, 2018. doi:
17 10.1007/s12298-014-0236-4.
- 18 NABTI, E. et al. Impact of seaweeds on agricultural crop production as biofertilizer.
19 **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 14, n. 5, p. 1119–
20 1134, 2017. Available from: <<https://doi.org/10.1007/s13762-016-1202-1>>. Accessed: Oct.
21 15, 2018. doi: 10.1007/s13762-016-1202-1.
- 22 NAIR, P. et al. Transcriptional and metabolomic analysis of *Ascophyllum nodosum* mediated
23 freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 643, 2012.
24 Available from: <<https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-643>>. Accessed: Dec. 10, 2018. doi:

- 1 10.1186/1471-2164-13-643.
- 2 PATEL, K. et al. *Kappaphycus alvarezii* sap mitigates abiotic-induced stress in *Triticum*
3 *durum* by modulating metabolic coordination and improves growth and yield. **Journal of**
4 **Applied Phycology**, v. 30, n. 4, p. 2659–2673, 2018. Available from:
5 <<https://doi.org/10.1007/s10811-018-1423-4>>. Accessed: Jan. 23, 2018. doi: 10.1007/s10811-
6 018-1423-4.
- 7 PAULERT, R. et al. Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green
8 seaweed *Ulva fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus*
9 *vulgaris* L.). **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 116, n. 6, p. 263–270, 2009.
10 Available from: <<https://doi.org/10.1007/BF03356321>>. Accessed: June 10, 2018. doi:
11 10.1007/BF03356321.
- 12 RATHORE, S. S. et al. Effect of seaweed extract on the growth, yield and nutrient uptake of
13 soybean (*Glycine max*) under rainfed conditions. **South African Journal of Botany**, v. 75, n.
14 2, p. 351–355, 2009. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2008.10.009>>. Accessed:
15 Dec. 5, 2017. doi: 10.1016/j.sajb.2008.10.009.
- 16 RAYORATH, P. et al. Rapid bioassays to evaluate the plant growth promoting activity of
17 *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. using a model plant, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.
18 **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 4, p. 423–429, 2008. Available from:
19 <<https://doi.org/10.1007/s10811-007-9280-6>>. Accessed: Feb. 24, 2017. doi:
20 10.1007/s10811-007-9280-6.
- 21 RENCY, A. S. et al. *In vitro* propagation and genetic fidelity analysis of alginatel-
22 encapsulated *Bacopa monnieri* shoot tips using *Gracilaria salicornia* extracts. **Journal of**
23 **Applied Phycology**, v. 29, n. 1, p. 481–494, 2017. Available from:
24 <<https://doi.org/10.1007/s10811-016-0918-0>>. Accessed: Oct. 17, 2018. doi: 10.1007/s10811-

- 1 016-0918-0.
- 2 RODRIGUES, D. et al. Chemical composition of red, brown and green macroalgae from
3 Buarcos bay in Central West Coast of Portugal. **Food Chemistry**, 2015. Available from:
4 <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.057>>. Accessed: Aug. 7, 2018. doi:
5 10.1016/j.foodchem.2015.03.057.
- 6 RUPÉREZ, P. Mineral content of edible marine seaweeds. **Food Chemistry**, v. 79, n. 1, p.
7 23–26, 2002. Available from: <[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00171-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00171-1)>. Accessed:
8 Aug. 7, 2018. doi: 10.1016/S0308-8146(02)00171-1.
- 9 SAHOO, D.; SECKBACH, J. (Eds.). **The algae world**. Netherlands: Springer, 2015
- 10 SATISH, L. et al. Effect of seaweed liquid extracts and plant growth regulators on *in vitro*
11 mass propagation of brinjal (*Solanum melongena* L.) through hypocotyl and leaf disc
12 explants. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 2, p. 993–1002, 2015. Available from:
13 <<https://doi.org/10.1007/s10811-014-0375-6>>. Accessed: June 21, 2018. doi:
14 10.1007/s10811-014-0375-6.
- 15 SATISH, L. et al. Somatic embryogenesis and regeneration using *Gracilaria edulis* and
16 *Padina boergesenii* seaweed liquid extracts and genetic fidelity in finger millet (*Eleusine*
17 *coracana*). **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 3, p. 2083–2098, 2016. Available from:
18 <<https://doi.org/10.1007/s10811-015-0696-0>>. Accessed: June 21, 2018. doi:
19 10.1007/s10811-015-0696-0.
- 20 SHARMA, N. et al. Seaweed extract as a novel elicitor and medium for mass propagation and
21 picroside-I production in an endangered medicinal herb *Picrorhiza kurroa*. **Plant Cell, Tissue**
22 **and Organ Culture**, v. 122, n. 1, p. 57–65, 2015. Available from:
23 <<https://doi.org/10.1007/s11240-015-0749-8>>. Accessed: June 21, 2018. doi:

- 1 10.1007/s11240-015-0749-8.
- 2 SHARMA, S. et al. *Gracilaria dura* extract confers drought tolerance in wheat by modulating
3 abscisic acid homeostasis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 136, p. 143–154, 2019.
- 4 Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.01.015>>. Accessed: Mar. 1, 2018. doi:
5 10.1016/j.plaphy.2019.01.015.
- 6 SIVANANDHAN, G. et al. Improved production of withanolides in shoot suspension culture
7 of *Withania somnifera* (L.) Dunal by seaweed extracts. **Plant Cell, Tissue and Organ
8 Culture**, v. 119, n. 1, p. 221–225, 2014. Available from: <<https://doi.org/10.1007/s11240-014-0521-5>>. Accessed: Aug. 9, 2018. doi: 10.1007/s11240-014-0521-5.
- 10 STADNIK, M. J.; FREITAS, M. B. D. Algal polysaccharides as source of plant resistance
11 inducers. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 2, p. 111–118, 2014. Available from:
12 <<http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762014000200001>>. Accessed: Feb. 24, 2018. doi:
13 10.1590/S1982-56762014000200001.
- 14 STENGEL, D. B. et al. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability
15 and implications for commercial application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 5, p. 483–
16 501, 2011. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.016>>. Accessed:
17 Mar. 1, 2018. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.05.016.
- 18 SKIRVIN, R. M. et al. Sources and frequency of somaclonal variation. **HortScience**, v. 29, n.
19 11, p. 1232-1237, 1994. Available from: <<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.29.11.1232>>. Accessed: Mar. 1, 2019. doi: 10.21273/HORTSCI.29.11.1232.
- 21 STIRK, W. A.; VAN STADEN, J. Plant growth regulators in seaweeds: Occurrence,
22 regulation and functions. In: **Advances in botanical research - Sea plants**. London:
23 Academic Press, 2014. v. 71, p. 125–159.

- 1 SUDHAKAR, K. et al. An overview of marine macroalgae as bioresource. **Renewable and**
2 **Sustainable Energy Reviews**, v. 91, p. 165–179, 2018. Available from:
3 <<https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.100>>. Accessed: Dec. 7, 2018. doi:
4 10.1016/j.rser.2018.03.100.
- 5 THORPE, T. A. *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis: physiological and
6 biochemical aspects. In: ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A.; VAN THANH, K. (Eds.).
7 **Morphogenesis in plants**. New York: Plenum Press, 1993. p. 19–38. Available from:
8 <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1265-7_2>. Accessed: Feb. 20, 2018. doi: 10.1007/978-
9 1-4899-1265-7_2.
- 10 TYAGI, R. K. et al. Low-cost media for *in vitro* conservation of turmeric (*Curcuma longa* L.)
11 and genetic stability assessment using RAPD markers. ***In vitro* Cellular & Developmental**
12 **Biology - Plant**, v. 43, n. 1, p. 51–58, 2007. Available from: <<https://doi.org/10.1007/s11627-006-9000-y>>. Accessed: Feb. 8, 2018. doi: 10.1007/s11627-006-9000-y.
- 14 VAN OOSTEN, M. J. et al. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic
15 stress in crop plants. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 4, n. 1, p. 5,
16 2017. Available from: <<https://doi.org/10.1186/s40538-017-0089-5>>. Accessed: Feb. 24,
17 2018. doi: 10.1186/s40538-017-0089-5.
- 18 VENKATACHALAM, P. et al. Effect of phycochemical coated silver nanocomplexes as
19 novel growth-stimulating compounds for plant regeneration of *Alternanthera sessilis* L.
20 **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 2, p. 1095–1106, 2017. Available from:
21 <<https://doi.org/10.1007/s10811-016-0977-2>>. Accessed: Oct. 2, 2018. doi: 10.1007/s10811-
22 016-0977-2.
- 23 VERA, J. et al. Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense
24 responses and protection against pathogens in plants. **Marine Drugs**, v. 9, n. 12, p. 2514–

- 1 2525, 2011. Available from: <<https://doi.org/10.3390/md9122514>>. Accessed: Feb. 24, 2018.
- 2 doi: 10.3390/md9122514.
- 3 VINOTH, S. et al. Influence of seaweed extracts and plant growth regulators on *in vitro*
4 regeneration of *Lycopersicon esculentum* from leaf explant. **Journal of Applied Phycology**,
5 2019. Available from: <<https://doi.org/10.1007/s10811-018-1703-z>>. Accessed: Feb. 20,
6 2019. doi:10.1007/s10811-018-1703-z.
- 7 VINOTH, S. et al. Effect of seaweed extracts and plant growth regulators on high-frequency
8 *in vitro* mass propagation of *Lycopersicon esculentum* L (tomato) through double
9 cotyledonary nodal explant. **Journal of Applied Phycology**, v. 50, n. 4, p. 677–681, 2011.
10 Available from: <<https://doi.org/10.1007/s10811-011-9717-9>>. Accessed: Dec. 3, 2017.
11 doi:10.1007/s10811-011-9717-9.
- 12 VINOTH, S. et al. Optimization of somatic embryogenesis protocol in *Lycopersicon*
13 *esculentum* L. using plant growth regulators and seaweed extracts. **Journal of Applied**
14 **Phycology**, v. 26, n. 3, p. 1527–1537, 2014. Available from: <<https://doi.org/10.1007/s10811-013-0151-z>>. Accessed: Sept. 27, 2018. doi:10.1007/s10811-013-0151-z.
- 16 WALLY, O. S. D. et al. Regulation of phytohormone biosynthesis and accumulation in
17 *Arabidopsis* following treatment with commercial extract from the marine macroalga
18 *Ascophyllum nodosum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 2, p. 324–339, 2013.
19 Available from: <<https://doi.org/10.1007/s00344-012-9301-9>>. Accessed: Feb. 24, 2018.
20 doi:10.1007/s00344-012-9301-9.
- 21 WANG, G. P. et al. Overaccumulation of glycine betaine enhances tolerance to drought and
22 heat stress in wheat leaves in the protection of photosynthesis. **Photosynthetica**, v. 48, n. 1, p.
23 117–126, 2010. Available from: <<https://doi.org/10.1007/s11099-010-0016-5>>. Accessed:
24 Feb. 25, 2018. doi:10.1007/s11099-010-0016-5.

1 WHAPHAM, C. A. et al. Significance of betaines in the increased chlorophyll content of
2 plants treated with seaweed extract. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 2, p. 231–234,
3 1993. Available from: <<https://doi.org/10.1007/BF00004023>>. Accessed: Dec. 10, 2017.
4 doi:10.1007/BF00004023.

5 WISZNIEWSKA, A. et al. Promoting effects of organic medium supplements on the
6 micropropagation of promising ornamental *Daphne* species (Thymelaeaceae). **In vitro**
7 **Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 49, n. 1, p. 51–59, 2013. Available from:
8 <<https://doi.org/10.1007/s11627-012-9480-x>>. Accessed: Sept. 15, 2018.
9 doi:10.1007/s11627-012-9480-x.

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

1 Tabela 1. Utilização de macroalgas marinhas na regeneração *in vitro* de plantas por organogênese.

| | Macroalgas | Plantas | Referência |
|-------------------------|--|---|--|
| CHLOROPHYTA | | | |
| | <i>Enteromorpha prolifera</i> (O.F. Müll.) J.Agardh ¹ | <i>Ceropagia thwaitesii</i> Hook | MUTHUKRISHNAN et al. (2015) |
| | <i>Enteromorpha intestinalis</i> (L.) Nees ² | | |
| OCHROPHYTA/PHAEOPHYCEAE | | | |
| | <i>Caulerpa cylindracea</i> Sond. | <i>Prunus armeniaca</i> L. | ALBURQUERQUE et al. (2018) |
| | <i>Cystoseira cylindracea</i> Sauv. ³ | <i>Nicotiana benthamiana</i> | |
| | <i>Laminaria digitata</i> (Huds.) J.V.Lamour. | Domim. | |
| | <i>Fucus spiralis</i> L. | <i>Prunus domestica</i> L. | ESSERTI et al. (2017) |
| | | <i>Prunus armeniaca</i> | |
| | | <i>Vitis vinifera</i> L. | |
| | <i>Padina boergesenii</i> Allender & Kraft | <i>Solanum melongena</i> L. | SATISH et al. (2015) |
| | <i>Padina gymnospora</i> Sonder | | |
| | <i>Padina tetrastromatica</i> Hauck | <i>Ceropagia thwaitesii</i> Hook | MUTHUKRISHNAN et al. (2015) |
| | | <i>Lycopersicon esculentum</i> (L.) Karst. ex Farw. | VINOTH et al. (2019), VINOTH et al. (2011) |
| | | <i>(=Solanum lycopersicon</i> L.) | |
| | <i>Sargassum wightii</i> Grev. ex J.Agardh ⁴ | <i>Withania somnifera</i> (L.) Dunal | SIVANANDHAN & SELVARAJ (2014) |
| RHODOPHYTA | | | |
| | <i>Asparagopsis taxiformis</i> (Delile) Trevis. | <i>Prunus armeniaca</i> | ALBURQUERQUE et al. (2018) |
| | <i>Gelidiella acerosa</i> (Forssk.) Feldmann | <i>Solanum melongena</i> | SATISH et al. (2015) |
| | <i>Gracilaria edulis</i> (S.G.Gmel.) P.C.Silva ⁵ | <i>Lycopersicon esculentum</i> (<i>=Solanum lycopersicon</i>) | VINOTH et al. (2019); VINOTH et al. (2011) |
| | | <i>Withania somnifera</i> | SIVANANDHAN (2014) |
| | <i>Gracilaria foliifera</i> (Forssk.) Børgesen | <i>Alternanthera sessilis</i> Lem. | VENKATACHALAM et al. (2017) |
| | <i>Gracilaria salicornia</i> (C.Agardh) E.Y.Dawson | <i>Solanum melongena</i> <i>Bacopa monnieri</i> (L.) Wettst. | RENCY et al. (2017); SATISH et al. (2015) |
| | | <i>Picrorhiza kurroa</i> Royle ex Benth. | |
| | <i>Kappaphycus alvarezii</i> (Doty) Doty ex P.C.Silva | | SHARMA et al. (2015) |
| | | <i>Bacopa monnieri</i> | RENCY et al. (2017) |

2 1. = *Ulva prolifera* O.F. Müll.3. = *Ulva intestinalis* L.4. = *Cystoseira humilis* var. *myriophylloides* [Sauv.] J.H.Price & D.M.John5. = *Sargassum bacciferum* [Turner] C.Agardh6. = *Hydropuntia edulis* (S.G.Gmel.) Gurgel & Fredericq

1 Tabela 2. Utilização de macroalgas marinhas na regeneração *in vitro* de plantas por embriogênese somática.

| | Macroalgas | Plantas | Referência |
|-----------------------------|---|---|-------------------------|
| CHLOROPHYTA | <i>Caulerpa scalpelliformis</i> (R.Brown ex Turner) C.Agardh | <i>Lycopersicon esculentum</i> (L.) Karst. ex Farw. (= <i>Solanum lycopersicon</i> L.) | VINOTH et a. (2014) |
| | <i>Ulva lactuca</i> L. | <i>Gloriosa superba</i> L. | MAHENDRAN et al. (2017) |
| OCHROPHYTA/ PHAEOPHYCEAE | <i>Padina boergesenii</i> Allender & Kraft | <i>Eleusine coracana</i> Gaertn. | SATISH et al. (2016) |
| | <i>Gracilaria corticata</i> (J.Agardh) J.Agardh | <i>Lycopersicon esculentum</i> (= <i>Solanum lycopersicon</i>) | VINOTH et al. (2014) |
| RHODOPHYTA | <i>Gracilaria edulis</i> (S.G.Gmel.) P.C.Silva (= <i>Hydropuntia edulis</i> (S.G.Gmel.) Gurgel & <i>Eleusine coracana</i> Fredericq | | SATISH et al. (2016) |
| | | | |
| 2 | | | |
| 3 | | | |
| 4 | | | |
| 5 | | | |
| 6 | | | |
| 7 | | | |
| 8 | | | |
| 9 | | | |

CAPÍTULO 2

**Conservação e propagação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. em meio
suplementado com extrato de *Agardhiella subulata* (C.Agardh) Kraft &
M.J.Wynne**

Conservation and propagation *in vitro* of *Physalis peruviana* L. in an
supplemented medium with extract *Agardhiella subulata* (C.Agardh) Kraft &
M.J.Wynne

Conservação e propagação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. em meio alternativo com extrato de *Agardhiella subulata* (C.Agardh) Kraft & M.J.Wynne

Conservation and propagation *in vitro* of *Physalis peruviana* L. in an alternative medium with extract *Agardhiella subulata* (C.Agardh) Kraft & M.J.Wynne

Luane Portela Carmo^{1*} Carlos Wallace do Nascimento Moura² Alone Lima-Brito³

^{1*} Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, 44036-900, Feira de Santana, Bahia, Brasil. E-mail: luaneportela@yahoo.com.br. *Autor para correspondência.

² Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Ficologia, 44036-900, Feira de Santana, Bahia, Brasil.

³ Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Cultura de Tecidos – Unidade Experimental Horto Florestal, 44055-000, Bahia, Feira de Santana, Brasil.

Resumo:

A espécie *Physalis peruviana*, também conhecida como ‘goldenberry’, produz frutos com propriedades nutracêuticas associadas à sua composição química, rica em fitoesteróis, vitanolídeos, carotenoides, compostos fenólicos e fosalinas. Além disso, seu potencial ornamental é amplamente explorado na gastronomia. Devido ao crescente interesse no campo científico e por parte dos consumidores há a necessidade de estratégias para o aumento da produção de mudas e garantir a conservação desta espécie. A cultura de tecidos vegetais tem sido considerada uma alternativa eficiente para produção de plantas e conservação dos recursos genéticos vegetais, mas seu custo ainda é elevado. Visando a redução de custos do cultivo *in vitro* através da utilização de protocolos alternativos economicamente viáveis, o presente estudo avaliou os efeitos da suplementação do meio nutritivo com extratos da macroalga *Agardhiella subulata* na conservação e propagação *in vitro* de *P. peruviana*. A adição do extrato ao meio induziu a redução do crescimento *in vitro* de *P. peruviana* e manteve a capacidade regenerativa das plantas, portanto, indicado como método alternativo para conservação *in vitro* a curto prazo. A utilização do extrato para multiplicação via organogênese direta não é favorável para produção de brotos. No entanto, a suplementação em baixas concentrações aumentou o vigor das microplantas. Este é o primeiro trabalho a demonstrar o aproveitamento de macroalgas brasileiras no cultivo *in vitro* de plantas, como bem, o potencial de *A. subulata* no desenvolvimento vegetal.

Palavras-chaves: goldenberry, crescimento mínimo, multiplicação *in vitro*, extrato de macroalgas

Abstract:

The species *Physalis peruviana*, also known as 'goldenberry', produces fruits with nutraceutical properties associated with its chemical composition, rich in phytosterols, vitanolides, carotenoids, phenolic and fosaline compounds. In addition, its ornamental potential is widely explored in gastronomy. Due to the growing interest in the scientific field and by the consumers there is a need for strategies to increase the production of seedlings and to guarantee the conservation of this species. Plant tissue culture has been considered an efficient alternative for plant production and conservation of plant genetic resources, but its cost is still high. The present study evaluated the effects of supplementation of the nutrient medium with extracts of the seaweeds *Agardhiella subulata* on the *in vitro* conservation and propagation of *P. peruviana*, aiming at the reduction of costs of *in vitro* cultivation through the use of economically viable alternative protocols. The addition of the extract to the medium induced the reduction of the *in vitro* growth of *P. peruviana* and maintained the regenerative capacity of the plants, being therefore indicated as an alternative method for *in vitro* conservation in the short term. The use of the extract for multiplication via direct organogenesis is not favorable for shoot production. However, supplementation at low concentrations increased the vigor of microplants. This is the first work to demonstrate the use of Brazilian seaweeds in *in vitro* plant cultivation, as well, the potential of *A. subulata* in plant development.

Keyword: goldenberry, minimum growth, *in vitro* multiplication, seaweeds extract

Introdução

O gênero *Physalis* L. (Solanaceae) compreende cerca de 90 espécies, a maioria delas nativas da América, com exceção de *P. alkekengi* L. que possui distribuição euroasiática. *Physalis peruviana* L, também conhecida como ‘goldenberry’, apresenta um fruto caracterizado pela presença de um cálice frutífero acrescente, vesiculoso e inflado, que se expande envolvendo-o totalmente (Miranda et al. 2005). Segundo Puente et al. (2011), estas plantas possuem propriedades nutracêuticas associadas à sua composição química, rica em fitoesteróis, vitanolídeos, carotenoides, compostos fenólicos, fisalinas. Além disso, seu potencial ornamental é amplamente explorado na gastronomia. O crescente interesse científico e comercial pelos frutos tem requerido aumento de produção de mudas desta espécie.

Neste cenário, a cultura de tecidos vegetais tem sido considerada uma alternativa eficiente para produção de mudas com alta qualidade sanitária, em período de tempo e espaço físico reduzidos, independentemente da época do ano (El-Sherif 2018). A técnica baseia-se no princípio da totipotência celular, em que novas plantas podem ser geradas a partir de células e tecidos vegetais (Abdin et al. 2017). Desta forma, as microplantas podem ser obtidas através de dois processos distintos, denominados de organogênese e embriogênese somática, que podem ocorrer diretamente do explante ou indiretamente via formação de calo (Thorpe 1993). Além disso, permite a conservação *in vitro* dos recursos genéticos vegetais através de modificações no ambiente de cultivo e no meio nutritivo, as quais são capazes de reduzir o metabolismo vegetal, proporcionando o armazenamento a curto e médio prazo de plantas (El-Sherif 2018).

Os fatores que frequentemente determinam o sucesso do cultivo *in vitro* de plantas são a fonte do explante e a composição do meio nutritivo que é composto por minerais, reguladores de crescimento vegetais, sacarose e agentes gelificantes. A principal desvantagem da técnica são os custos elevados associados a infraestrutura, equipamentos e reagentes químicos. Como alternativa, o enriquecimento de meio nutritivo com suplementos orgânicos vem sendo usado como método econômico sem comprometer a qualidade das plantas (Datta et al. 2017).

Neste sentido, foram reportados trabalhos com a utilização de extrato de macroalgas marinhas na organogênese e embriogênese somática em espécies de solanáceas como tomate e berinjela (Vinoth et al. 2011, 2014, 2019; Satish et al. 2015). As macroalgas possuem

fitohormônios, tais como citocininas, auxinas, ácido abscísico, etileno e giberelinas, além de macronutrientes, micronutrientes, aminoácidos e vitaminas (Tarakhovskaya et al. 2007). Segundo Khan et al. (2009), estas fitomoléculas beneficiam o desenvolvimento de parte aérea e raiz, a aborção dos nutrientes, aumenta os níveis de pigmentos fotossintéticos, e melhora desempenho e rendimento de culturas.

Alguns trabalhos demonstraram a viabilidade da cultura de tecidos para o cultivo *in vitro* de *P. peruviana*. Foram reportados estudos voltados para multiplicação *in vitro* por via direta (Guney et al. 2016; Singh et al. 2016), produção de metabólitos secundários através de calogênese (Lashin and Elhaw 2016) e conservação (Rezende et al. 2018). Entretanto não há relatos de estudos com estratégias para a redução de custos do cultivo da espécie.

O litoral brasileiro possui uma incrível biodiversidade de macroalgas que exibem diversas aplicações biotecnológicas (Fernandes et al. 2014), dentre estas, *Agardhiella subulata* (C.Agardh) Kraft & M.J.Wynne (Rhodophyta), uma espécie explorada para produção de carragenana (Chopin et al. 1990). Neste contexto, o presente estudo foi realizado para determinar a viabilidade da utilização de seu extrato na conservação *in vitro* e na regeneração de brotos via organogênese direta de *P. peruviana* como suplemento orgânico de baixo custo para meios sintéticos. Este é o primeiro trabalho a demonstrar o aproveitamento de macroalgas brasileiras no cultivo *in vitro* de plantas, como bem, o potencial de *A. subulata* no desenvolvimento vegetal.

Materiais e métodos

Coleta, identificação e preparação do extrato de *Agardhiella subulata*

Agardhiella subulata foi coletada no recife costeiro da Praia da Penha, Município de Vera Cruz, Ilha de Itaparica, Baía de Todos os Santos, Bahia (12°59'16.7"S / 38°37'21.3"W) em abril/2017, durante a baixa-mar. A identificação do táxon foi baseada em características morfológicas e um exemplar será tombado na coleção de referência no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS). A biomassa coletada foi triada em água do mar para eliminar partículas de areia, epífitas e outras impurezas, posteriormente, lavada com água corrente para retirar o excesso de sal. O material foi seco em estufa por 15 dias a 40 °C e pulverizado em moinho de facas. Para preparação do extrato de *A. subulata* (AsE), cerca de 50 g de pó da alga foi fervido em 500 mL de água destilada estéril a 50 °C durante 1h. A mistura foi filtrada usando quatro camadas de pano tipo “musseline”. O filtrado foi seco em

estufa a 40 °C até obtenção do peso constante, e armazenado a 4 °C.

Determinação do conteúdo mineral e teor salinidade do extrato de *Agardhiella subulata* (AsE)

Para determinação de macro e microelementos, o extrato (AsE) foi digerido em micro-ondas na presença de ácido nítrico 65%. A leitura dos elementos foi realizada com espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) (Perkin Elmer). O teor de salinidade dos extratos foi medido através de refratômetro-salinômetro. Como padrões foram usados água destilada (0.0 ups) e marinha (36 ups).

Coleta e identificação de *Physalis peruviana*

As sementes de *Physalis peruviana* foram obtidas de plantas cultivadas na Unidade Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana localizada no município de Feira de Santana (12°26'86,4''S / 38°93'84,1''W). A identificação do táxon foi baseada em características morfológicas e um exemplar será tombado na coleção de referência no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS).

Experimento para conservação *in vitro* de *Physalis peruviana*

Teste preliminares demonstraram que *Physalis peruviana* pode ser cultivada *in vitro* em baixas concentração de Murashige and Skoog (MS) (dados não amostrados). Na tentativa de reduzir os gastos da técnica, os experimentos para conservação *in vitro* foram realizados com $\frac{1}{4}$ da concentração de MS. Os meios nutritivos compostos por MS $\frac{1}{4}$ sem suplementação e MS com força total foram considerados como controles. Desta forma, as sementes foram desinfestadas em etanol 70% por 30s seguido de solução de hipoclorito de sódio – NaOCl (2,5% de cloro ativo) com uma gota de detergente neutro por 10 min e lavadas com três enxágues em água destilada estéril. Foram inoculadas em tubos de ensaio (25 x 180 mm) com 20 mL de meio nutritivo MS (1, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$) suplementado com diferentes concentrações de extrato aquoso de *A. subulata* (AsE) (0,1,2,3,4 mg.ml⁻¹) (Tabela 1). Após 180 dias foram registradas a taxa de sobrevivência e os parâmetros de crescimento, como número de folhas verdes, e comprimento e biomassa seca da parte aérea e raiz. O teor de clorofila foi determinado através do método de Arnon (1949). Cerca de 20mg de folhas frescas de cada tratamento foram incubadas em 10 mL de acetona 80% por 24 h no escuro. As absorbâncias das amostras foram lidas nos comprimentos 645 nm e 663 nm. Para avaliar a capacidade regenerativa, o nôcotiledonar foi isolado e inoculado em meio MS $\frac{1}{2}$ isento de extrato e de regulador vegetal e

mantido em sala de crescimento por 30 dias, quando foi avaliada a porcentagem de explantes responsivos, o número de brotos por explante e comprimento destes.

Experimento para organogênese direta de *Physalis peruviana*

Para avaliar a regeneração de brotos via organogênese direta foi utilizado o nó cotiledonar de plantas com 45 dias de idade germinadas em meio nutritivo MS $\frac{1}{2}$ (Rodrigues et al. 2013). O explante foi inoculado em tubos de ensaio (25 x 150 mm) com 10 mL de meio MS suplementado com 11,1 μM de BAP (6-benzilaminopurina), 0,024 μM de IBA (ácido indolil-3-butírico) (Singh et al. 2016) e diferentes concentrações de AsE (0,1,2,3,4 mg.ml^{-1}) (Tabela 2).

Após 30 dias de cultivo foi registrada a porcentagem de explantes com brotos, o número de brotos por explante além de comprimento e biomassa seca dos brotos. Parte dos brotos obtidos foram individualizados e transplantados para meio MS isento de reguladores vegetais e extrato para induzir o crescimento da parte aérea e raízes. Foi avaliado comprimento e biomassa seca da parte aérea e raiz das microplantas ao final de 30 dias.

Condições gerais de cultivo

Em todos os meios nutritivos foram adicionados 30 g.L^{-1} de sacarose e 7 g L^{-1} de ágar. O pH foi ajustado entre 5,6 - 5,8 e esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121 °C e 1,0 atm de pressão. Os experimentos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h, temperatura de 25 \pm 3°C e luz branca fluorescente a 60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Dados paramétricos foram avaliados pelo teste de Tukey e os não paramétricos pelo teste de Mann-Whitney, ambos a 5% de significância. As análises foram realizadas no software PAST (Hammer et al. 2001).

Resultados

Conservação *in vitro* de *Physalis peruviana*

A composição do meio nutritivo influenciou na sobrevivência e no crescimento das plantas com 180 dias de cultivo (Fig. 1a-g). Foi observada 100% de sobrevivência em meio MS e MS $\frac{1}{4}$ suplementado com extrato de *A. subulata* (AsE) (Tabela 3). As plantas

cultivadas em MS $\frac{1}{2}$ e MS $\frac{1}{4}$ não resistiram ao tempo de cultivo. O número de folhas verdes foi significativamente maior nos tratamentos com MS $\frac{1}{4}$ + 4 mg.ml $^{-1}$ de AsE. (Tabela 3). A suplementação com 1 e 2 mg.ml $^{-1}$ de extrato aumentou o comprimento da parte aérea das plantas. Entretanto, o enriquecimento do meio MS $\frac{1}{4}$ com 2, 3 e 4 mg.ml $^{-1}$ de AsE reduziu sensivelmente o comprimento da raiz e da biomassa seca da parte aérea e raízes (Tabela 3). A avaliação geral dos parâmetros de crescimento não demonstrou diferença significativa entre os meios MS e MS $\frac{1}{4}$ + 1 mg.ml $^{-1}$ AsE, indicando ser um substituto alternativo viável para o cultivo *in vitro* de *P. peruviana*.

Os dados indicaram que a suplementação com AsE possui um efeito positivo sobre a biossíntese da clorofila em comparação com o meio MS (Tabela 4). As maiores médias foram registradas em plantas cultivadas com MS $\frac{1}{4}$ + 4 mg.ml $^{-1}$ AsE; apenas para clorofila *a* o teor encontrado neste tratamento não diferiu do obtido no meio MS $\frac{1}{4}$ + 1 mg.ml $^{-1}$ AsE.

Todas as plantas cultivadas com MS e MS $\frac{1}{4}$ suplementado mantiveram a capacidade regenerativa a partir do nó cotiledonar (Fig. 2a), no entanto, apresentaram diferença significativa em relação ao número de brotos por explante e comprimento dos brotos (Fig. 2b, 2c). Os explantes provenientes de plantas cultivadas com AsE produziram, cada um, uma média de dois brotos com aproximadamente 1,5 cm de comprimento, enquanto que, o MS, apenas um broto com tamanho 4x maior. Neste último foi observada a regeneração espontânea ainda na planta mãe de uma das gemas do nó cotiledonar (Fig. 1h).

Organogênese direta de *Physalis peruviana*

A regeneração do nó cotiledonar ocorreu por organogênese direta (Fig. 3e-i). Todos os explantes produziram brotos com tamanho uniforme (Fig. 3a, 3c), embora a adição de AsE ao meio nutritivo tenha reduzido o número destes (Fig. 3b). Também foi observada a diminuição da biomassa seca com adição de 1 e 4 mg.ml $^{-1}$ de extrato quando comparado com o controle (Fig. 3d).

Após a individualização dos brotos, ocorreu o crescimento da parte aérea e a formação do sistema radicular, originando microplantas completas e normais (Fig. 3n-r). Os parâmetros de crescimento analisados apresentaram comportamento similar em relação aos tratamentos testados (Fig. 3j-m). Após 30 dias, os brotos obtidos em meio MS + 2 e 3 mg.ml $^{-1}$ AsE apresentaram comprimento e biomassa seca da parte aérea e das raízes significativamente maior em comparação com as microplantas originadas de brotos obtidos em meio MS e MS +

1 mg.ml⁻¹ AsE. Entre os meios suplementados com AsE, a utilização da concentração 4 mg.ml⁻¹ reduziu significativamente o crescimento das microplantas em todos os parâmetros avaliados, mas não deferiu do controle.

Determinação do conteúdo mineral e teor de salinidade do extrato de *Agardhiella subulata* (AsE)

A análise da composição mineral de AsE revelou a presença de macro e microelementos, tais como, P, K, Ca, Mg, S, B, Fe, Mn e Zn. O teor de salinidade no extrato é irrigório apresentando valor próximo ao encontrado na água destilada (Tabela 5).

Discussão

Na conservação *in vitro*, o crescimento mínimo das plantas é comumente atingido adicionando altas concentrações de sacarose e açúcares álcoois como sorbitol, glicerol e manitol ao meio nutritivo (Yaseen et al. 2013). Demo et al. (2008) estimaram que a adição de fontes de carbono de grau laboratorial contribuiu com cerca de 34% no custo de produção, tornando a cultura de tecidos mais dispendiosa. Recentemente, Rezende et al. (2018) testaram o efeito de sacarose, manitol e sorbitol associado com a variação de temperatura para conservação de segmentos nodais de *P. peruviana*. Os autores afirmaram ser possível manter o cultivo por 90 dias a 18°C, em meio com adição de 30 g.L⁻¹ de sacarose.

Os resultados do presente estudo demonstraram que a redução do MS para 1/4 da sua força mais a suplementação com extrato de *A. subulata* (AsE) foi capaz de manter *P. peruviana* por 180 dias *in vitro* sem necessidade de sub-cultivo (Fig. 1). As concentrações mais altas de extrato induziram o crescimento lento nas plantas como pode ser notado pela redução drástica do comprimento da raiz e biomassa seca da parte aérea e raízes (Tabela 3). Estes dados estão de acordo com resultados demonstrados por Kowalski et al (1999), que relataram a diminuição do comprimento e da biomassa seca das plantas de batata cultivadas *in vitro* com ‘Kelpak®’.

A sobrevivência das plantas em meio MS^{1/4} suplementado com AsE, mesmo com a redução das concentrações de sais, pode estar correlacionada com a presença de macro e microelementos no extrato *A. subulata* (Tabela 5). Diversos trabalhos comprovaram que nutrientes minerais, além de polissacarídeos, ácidos graxos, vitaminas, fitohormônios, são constituintes comuns em extrato de macroalgas marinhas (Khan et al. 2009; Stirk and Van Staden 2014; Nabti et al. 2017). Segundo Battacharyya et al. (2015), estes compostos

bioativos podem aumentar o crescimento de plantas e melhorar a tolerância das culturas a estresses abióticos, como salinidade, temperaturas extremas, deficiência de nutrientes e seca. Hernández-Herrera et al. (2014) demonstraram que a presença de Na, K, Ca e P nos extratos de *Ulva lactuca* L. e *Padina gymnospora* (Kütz.) Sond. e a utilização destes como excelentes bioestimulantes para germinação e crescimento do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.).

Vários autores também sugerem que o tratamento com extrato de macroalgas aumenta as concentrações de clorofila nas folhas (Blunden et al. 1996; Thirumaran et al. 2009; Sabir et al. 2014), como foi atestado neste estudo (Tabela 4). Castro et al. (2012) demonstraram que a utilização de carragenana aumentou a fotossíntese líquida, a eficiência do fotossistema II e os níveis de clorofila *a* e *b* em plantas de tabaco.

Sem suplementação, as plantas cultivadas em meio MS foram submetidas à condição de estresse devido a pouca quantidade de nutrientes para manutenção do cultivo por um período mais longo. A deficiência nutricional pode ter levado a regeneração espontânea de uma das gemas do nó cotiledonar como uma estratégia de sobrevivência (Fig. 1h). Segundo, Peres (2002), em condição desfavorável pode ocorrer a diferenciação de meristemas para formação de novos órgãos com intuito de garantir a sobrevivência e reprodução. Após o isolamento e sub cultivo do nó cotiledonar em meio nutritivo adequado, o desenvolvimento fisiológico foi normalizado, embora o número de brotos tenha sido negativamente afetado (Fig 2).

Alguns trabalhos sugeriram que os extratos de macroalgas marinhas possuem a capacidade de modular vias da biossíntese de fitohormônios em plantas. Patel et al. (2018) e Wally et al. (2013) evidenciaram aumento da expressão de citocinina e ácido abscísico (ABA) e redução dos níveis de auxina em plantas estabelecidas *in vitro* com *Kappaphycus alvarezi* (Doty) Doty ex P.C.Silva e *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis, respectivamente. A baixa produção de auxina pode ser atribuída ao efeito antagônico do aumento da citocinina e ABA, o que pode, pelo menos em parte, explicar a redução do crescimento e da biomassa das raízes neste estudo (Tabela 2). Segundo Carimi et al. (2003), em estudo *in vitro* feito com cenoura (*Daucus carota* L.) e *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, concentrações elevadas de citocininas bloqueiam a proliferação celular e induzem a morte celular programada. Além disso, os autores descobriram que o ABA protege as células contra a morte celular causada pela citocinina. Outras pesquisas relataram o uso de ABA para induzir crescimento lento *in vitro* em muitas espécies de planta (Jarret and Gawel 1991; Gopal et al. 2004; El-Dawayati 2017).

Estas observações sugerem que as relações antagônicas entre os fitohormônios podem regular o crescimento e retardar a senescência das plantas *in vitro*, portanto, uma possível estratégia para conservação.

Singh et al. (2016) propuseram um protocolo para multiplicação *in vitro* de *P. peruviana*, via organogênese direta, usando segmentos nodais e internodais. O explante nodal foi considerado melhor para a proliferação de brotos quando cultivado em BAP (2,5 mg.L⁻¹) e IBA (0,05 mg.L⁻¹) produzindo a média de 4,75 brotos por explantes com aproximadamente 4,87cm de comprimento. Os autores também salientam que o enraizamento só foi possível após transferência para meio suplementando com IBA. A produção e comprimentos dos brotos obtidos no presente estudo foi inferior mesmo utilizando as concentrações de reguladores recomendada pelos autores (Fig. 3b, 3c, 3e-i). A suplementação com extrato de *A. subulata* reduziu o número de brotos por explante e a biomassa seca dos mesmos (Fig. 2). Entretanto, o tratamento com extrato da macroalga produziu brotos mais vigorosos (Fig. 3j-m). Também foi observado o desenvolvimento de raízes em meio isento de regulador de crescimento vegetal (Fig. 3k), portanto, não há necessidade de seu acréscimo como relatado por Singh et al. (2016), o que diminuiria o custo do cultivo. Segundo Carmo et al. (dados não publicados/ver capítulo 1), os relatos da literatura indicam que a suplementação do meio com extrato de macroalgas não é significativo para promover a multiplicação das plantas, mas é benéfico para o aumento do crescimento da parte aérea e raízes e biomassa dos brotos, quando utilizados em concentrações baixas. Estes efeitos fisiológicos assemelham-se aos dos fitohormônios que possuem efeito estimulatório em baixas concentrações e inibitório em altas.

Conclusão

Este estudo demonstrou que a adição do extrato de *Agardhiella subulata* ao meio nutritivo promove a redução do crescimento *in vitro* de *Physalis peruviana* e mantém a capacidade regenerativa das plantas, portanto, indicado como método alternativo de baixo custo para conservação *in vitro* a curto prazo. A utilização do extrato para multiplicação via organogênese direta não é favorável para produção de brotos. No entanto, a suplementação em com 2 e 3 mg.mL⁻¹ produz brotos mais vigorosos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a professora Dra. Taise Bomfim de Jesus pelo auxilio na digestão das amostras, ao Laboratório de Microbiologia da Universidade de Feira de Santana pelo apoio na análise de teor de clorofila.

A primeira autora agradece a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) (Código de Financiamento 001). Os autores agradecem ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e FAPESB, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Projeto “Flora da Bahia”, 483909/2012) e Projeto PROCAD /CAPES 88881.068434.2014-01 (USP, UEFS e UENF) pelo apoio financeiro.

Referências

- Abdin MZ, Usha Kiran 1956-, Kamaluddin, Ali A (2017) *Plant biotechnology : Principles and applications*, 1st edn. Springer Singapore.
- Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology* 24:1–15.
- Battacharyya D, Babgohari MZ, Rathor P, Prithiviraj B (2015) Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae* 196:39–48.
- Blunden G, Jenkins T, Liu Y-W (1996) Enhanced leaf chlorophyll levels in plants treated with seaweed extract. *Journal of Applied Phycology* 8:535–543.
- Carimi F, Michela AE, Ae Z, et al (2003) Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta* 1:413–421.
- Castro J, Vera J, González A, Moenne A (2012) Oligo-carrageenans stimulate growth by enhancing photosynthesis, basal metabolism, and cell cycle in tobacco plants (var. Burley). *Journal of Plant Growth Regulation* 31:173–185.
- Chopin T, Hanisak MD, Koehn FE, et al (1990) Studies on carrageenans and effects of seawater phosphorus concentration on carrageenan content and growth of *Agardhiella subulata* (C. Agardh) Kraft and Wynne (Rhodophyceae, Solieriaceae). *Journal of Applied Phycology* 2:3–16.
- Datta SK, Chakraborty D, Janakiram T (2017) Low cost tissue culture : An overview. *The Journal of Plant Science Research* 33:181–199.
- Demo P, Kuria P, Nyende AB, Kahangi EM (2008) Table sugar as an alternative low cost medium component for *in vitro* micro-propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *African Journal of Biotechnology* 7:2578–2584.
- El-Dawayati MM (2017) *In vitro* conservation of date palm shoot-tip explants and callus cultures under minimal growth conditions. In: Al-Khayri J, Jain S, Johnson D (eds) *Methods in molecular biology*, Date Palm. Humana Press, New York, NY, pp 49–59.
- El-Sherif NA (2018) Impact of plant tissue culture on agricultural sustainability. In: Negm AM, Abuhashim M (eds) *Sustainability of agricultural environment in Egypt: Part II. The Handbook of Environmental Chemistry*, 77th edn. Springer, Cham, pp 93–107.

- Fernandes DRP, de Oliveira VP, Yoneshigue Valentin Y (2014) Seaweed biotechnology in Brazil: six decades of studies on natural products and their antibiotic and other biological activities. *Journal of Applied Phycology* 26:1923–1937.
- Gopal J, Chamail A, Sarkar D (2004) *In vitro* production of microtubers for conservation of potato germplasm: Effect of genotype, abscisic acid, and sucrose. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 40:485–490.
- Guney M, Kafkas S, Kefayati S, et al (2016) *In vitro* propagation of *Physalis peruviana* (L.) using apical shoot explants. *Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus* 15:109–118.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST-Palaeontological statistics.
- Hernández-Herrera RM, Santacruz-Ruvalcaba F, Ruiz-López MA, et al (2014) Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Applied Phycology* 26:619–628.
- Jarret RL, Gawel N (1991) Abscisic acid-induced growth inhibition of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 24:13–18.
- Khan W, Rayirath UP, Subramanian S, et al (2009) Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. 386–399.
- Kowalski B, Jäger AK, van Staden J (1999) The effect of a seaweed concentrate on the *in vitro* growth and acclimatization of potato plantlets. *Potato Research* 42:131–139.
- Lashin II, Elhaw MH (2016) Evaluation of secondary metabolites in callus and tissues of *Physalis peruviana*. *International Journal of Modern Botany* 6:10–17.
- Miranda D, Piedrahita W, Romero J (2005) Avances en cultivo, poscosecha y exportación de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) en Colombia. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15:473–497.
- Nabti E, Jha B, Hartmann A (2017) Impact of seaweeds on agricultural crop production as biofertilizer. *International Journal of Environmental Science and Technology* 14:1119–1134.
- Patel K, Agarwal P, Agarwal PK (2018) *Kappaphycus alvarezii* sap mitigates abiotic-induced stress in *Triticum durum* by modulating metabolic coordination and improves growth and yield. *Journal of Applied Phycology* 30:2659–2673.
- Peres LEP (2002) Bases fisiológicas e genéticas da regeneração *in vitro* de plantas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 25:44–48.
- Puente LA, Pinto-Muñoz CA, Castro ES, Cortés M (2011) *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. *Food Research International* 44:1733–1740.

- Rezende RALS, Rodrigues FA, Rezende RM, et al (2018) *In vitro* conservation of Cape gooseberry through slow-growth nodal segment cultures. *Pesq agropec bras* 651–655.
- Rodrigues FA, Penoni E dos S, Soares JDR, Pasqual M (2013) Diferentes concentrações de sais do meio MS e BAP na multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. *Bioscience Journal* 29:77–82.
- Sabir A, Yazar K, Sabir F, et al (2014) Vine growth, yield, berry quality attributes and leaf nutrient content of grapevines as influenced by seaweed extract (*Ascophyllum nodosum*) and nanosize fertilizer pulverizations. *Scientia Horticulturae* 175:1–8.
- Satish L, Rameshkumar R, Rathinapriya P, et al (2015) Effect of seaweed liquid extracts and plant growth regulators on *in vitro* mass propagation of brinjal (*Solanum melongena* L.) through hypocotyl and leaf disc explants. *Journal of Applied Phycology* 27:993–1002.
- Singh P, Singh S, Shalitra R, et al (2016) *In vitro* regeneration of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) through nodal segment. *The Bioscan* 11:41–44.
- Stirk WA, Van Staden J (2014) Plant growth regulators in seaweeds: Occurrence, regulation and functions. In: Bourgougnon N (ed) *Advances in botanical research—sea plants*. Academic Press, London, pp 125–159.
- Tarakhovskaya ER, Maslov YI, Shishova MF (2007) Phytohormones in algae. *Russian Journal of Plant Physiology* 54:163–170.
- Thirumaran G, Arumugam M, Arumugam R, Anantharaman P (2009) Effect of seaweed liquid fertilizer on growth and pigment concentration of *Cyamopsis tetragonoloba* (L) Taub.. *American-Eurasian Journal of Agronomy*, 2: 50-56.
- Thorpe TA (1993) *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis: physiological and biochemical aspects. In: Roubelakis-Angelakis KA, Van Thanh K. (eds) *Morphogenesis in plants*. Plenum Press, New York, pp 19–38.
- Vinoth S, Gurusaravanan P, Jayabalan N (2011) Effect of seaweed extracts and plant growth regulators on high-frequency *in vitro* mass propagation of *Lycopersicon esculentum* L (tomato) through double cotyledonary nodal explant. *Journal of Applied Phycology* 50:677–681.
- Vinoth S, Gurusaravanan P, Jayabalan N (2014) Optimization of somatic embryogenesis protocol in *Lycopersicon esculentum* L. using plant growth regulators and seaweed extracts. *Journal of Applied Phycology* 26:1527–1537.
- Vinoth S, Gurusaravanan P, Sivakumar S, Jayabalan N (2019) Influence of seaweed extracts and plant growth regulators on *in vitro* regeneration of *Lycopersicon esculentum* from leaf explant. *Journal of Applied Phycology*. doi: 10.1007/s10811-018-1703-z.
- 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. Journal of Plant Growth Regulation 32:324–339.

Yaseen M, Ahmad T, Sablok G, et al (2013) Review: role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. Molecular Biology Reports 40:2837–2849.

Tabelas

Tabela 1 Composição do meio nutritivo com diferentes concentrações de MS e de extrato de *Agardhiella subulata* (AsE) na conservação *in vitro* de *Physalis peruviana*.

| Tratamento | Composição do meio nutritivo |
|------------|----------------------------------|
| 1 | MS |
| 2 | MS ½ |
| 3 | MS ¼ |
| 4 | MS ¼ + 1 mg.ml ⁻¹ AsE |
| 5 | MS ¼ + 2 mg.ml ⁻¹ AsE |
| 6 | MS ¼ + 3 mg.ml ⁻¹ AsE |
| 7 | MS ¼ + 4 mg.ml ⁻¹ AsE |

Tabela 2 Composição do meio nutritivo MS com diferentes concentrações de extrato de *Agardhiella subulata* (AsE) na propagação *in vitro* de *Physalis peruviana* via organogênese direta.

| Tratamentos | Composição do meio nutritivo |
|-------------|---|
| 1. | MS + BAP (11,1 µM) + IBA (0,024 µM) (controle) |
| 2. | MS + 1 mg.ml ⁻¹ AsE + BAP (11,1 µM) + IBA (0,024 µM) |
| 3. | MS + 2 mg.ml ⁻¹ AsE + BAP (11,1 µM) + IBA (0,024 µM) |
| 4. | MS + 3 mg.ml ⁻¹ AsE + BAP (11,1 µM) + IBA (0,024 µM) |
| 5. | MS + 4 mg.ml ⁻¹ AsE + BAP (11,1 µM) + IBA (0,024 µM) |

Tabela 3 Taxa de sobrevivência e parâmetros de crescimento de *Physalis peruviana* após 180 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS e MS 1/4 suplementados com extrato de *Agardhiella subulata* (AsE).

| Composição do meio nutritivo | Taxa de sobrevivência (%) | Número de folhas verdes | Comprimento da parte aérea (cm) ^x | Comprimento da maior raiz (cm) | Biomassa seca da parte aérea (mg) | Biomassa seca das raízes (mg) |
|------------------------------------|---------------------------|--------------------------|--|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| MS | 100 ± 0 ^A | 3,6 ± 0,38 ^B | 21,1 ± 0,85 ^b | 9,76 ± 0,8 ^A | 75,7 ± 9,2 ^A | 32 ± 3,14 ^A |
| MS 1/2 | 0 ± 0 ^B | - | - | - | - | - |
| MS 1/4 | 0 ± 0 ^B | - | - | - | - | - |
| MS 1/4 + 1 mg.ml ⁻¹ AsE | 100 ± 0 ^A | 4,6 ± 0,79 ^{AB} | 28,79 ± 1,25 ^a | 10,1 ± 0,64 ^A | 81,02 ± 11,12 ^A | 36 ± 5,07 ^A |
| MS 1/4 + 2 mg.ml ⁻¹ AsE | 100 ± 0 ^A | 3,9 ± 0,33 ^B | 23,45 ± 1,45 ^{ab} | 4,93 ± 0,84 ^{BC} | 39,68 ± 10,31 ^{BC} | 16,97 ± 7,17 ^B |
| MS 1/4 + 3 mg.ml ⁻¹ AsE | 100 ± 0 ^A | 4,6 ± 0,41 ^B | 20,53 ± 1,28 ^b | 4,66 ± 0,71 ^C | 16,4 ± 2,94 ^C | 2,14 ± 1,2 ^B |
| MS 1/4 + 4 mg.ml ⁻¹ AsE | 100 ± 0 ^A | 5,6 ± 0,32 ^A | 21,81 ± 1,26 ^b | 6,86 ± 0,71 ^B | 22,22 ± 2,59 ^B | 1,17 ± 0,29 ^B |

Valores representam a média ± erro padrão (n=15)

Valores seguidos de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (letras minúsculas) e Mann-Whitney (letras maiúsculas) ($p \leq 0,05$)

^x Teste de Tukey realizados com médias transformados em log

Tabela 4 Teores de clorofila *a*, *b* e total (mg.g⁻¹ de matéria fresca) de *Physalis peruviana* após 180 dias de cultivo em meio nutritivo MS e MS ¼ suplementado com extrato de *Agardhiella subulata* (AsE).

| Meio nutritivo | Clorofila a | Clorofila b | Clorofila total |
|----------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| MS | 1,72 ± 0,23 ^b | 1,57 ± 0,45 ^c | 2,93 ± 0,54 ^c |
| MS ¼ + 1 mg.ml ⁻¹ AsE | 2,63 ± 0,056 ^{ab} | 3,14 ± 0,1 ^b | 5,77 ± 0,13 ^b |
| MS ¼ + 2 mg.ml ⁻¹ AsE | 1,97 ± 0,2 ^b | 2,96 ± 0,25 ^b | 4,93 ± 0,24 ^b |
| MS ¼ + 3 mg.ml ⁻¹ AsE | 1,95 ± 0,17 ^b | 2,26 ± 0,19 ^{bc} | 4,21 ± 0,36 ^b |
| MS ¼ + 4 mg.ml ⁻¹ AsE | 3,62 ± 0,25 ^a | 4,64 ± 0,23 ^a | 8,26 ± 0,47 ^a |

Valores representam a média ± erro padrão (n=3)

Valores seguidos de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05)

Tabela 5 Composição mineral e teor de salinidade estimados no extrato de *Agardhiella subulata* (AsE).

| Composição mineral e teor de salinidade | |
|---|-----------------|
| Macroelementos (g.kg ⁻¹) | |
| Fósforo (P) | 0,76 ± 0,08 |
| Potássio (K) | 111,96 ± 2,14 |
| Cálcio (Ca) | 23,06 ± 1,44 |
| Magnésio (Mg) | 15,8 ± 2,61 |
| Enxofre (S) | 59,36 ± 0,64 |
| Microelementos (mg.kg ⁻¹) | |
| Boro (B) | 218,83 ± 17,16 |
| Ferro (Fe) | 858,66 ± 164,20 |
| Manganês (Mn) | 38 ± 12,35 |
| Zinco (Zn) | 1.232 ± 541,80 |
| Teor de salinidade (ups) | |
| 1 mg.ml ⁻¹ | 0 ± 0 |
| 2 mg.ml ⁻¹ | 0,1 ± 0 |
| 3 mg.ml ⁻¹ | 0,2 ± 0 |
| 4 mg.ml ⁻¹ | 0,2 ± 0 |

Valores representam a média ± erro padrão (n=3)

Figuras

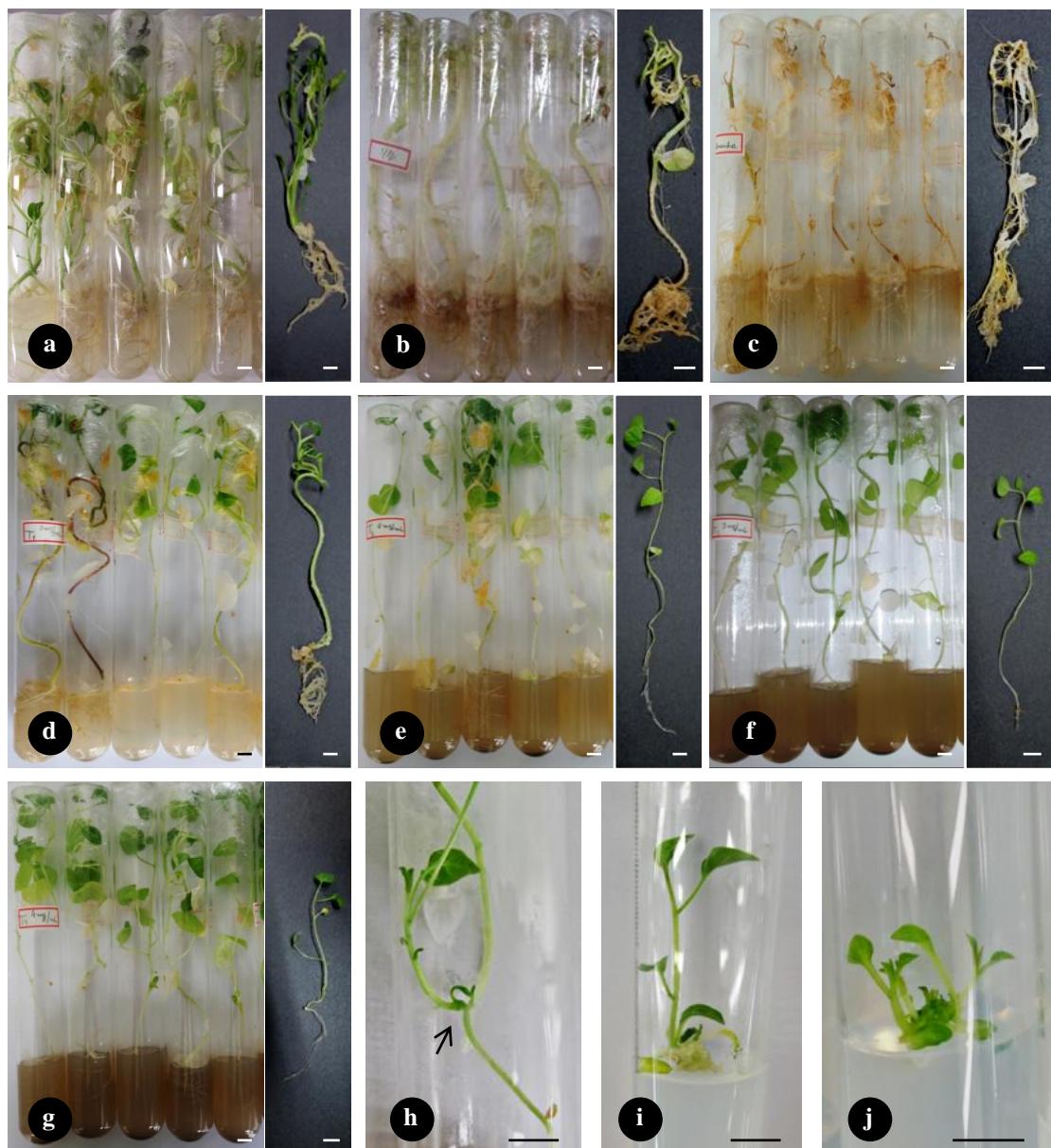


Fig. 1 a-g Aspecto geral de *Physalis peruviana* após 180 dias de cultivo *in vitro* em diferentes meios nutritivos em função do MS suplementado com extrato de *Agardhiella subulata* (AsE) **a** MS . **b** MS 1/2. **c** MS 1/4. **d** MS 1/4 + 1 mg.ml⁻¹AsE. **e** MS 1/4 + 2 mg.ml⁻¹AsE. **f** MS 1/4 + 3 mg.ml⁻¹AsE. **g** MS 1/4 + 4 mg.ml⁻¹AsE. **h** Regeneração espontânea de uma das gemas do segmento nodal de planta cultivada em MS. **i-j** Brotos oriundos da regeneração do nó cotiledonar das plantas cultivada em MS (**i**) e MS 1/4 suplementado com AsE (**j**) com 30 dias de idade. Barra= 1cm.

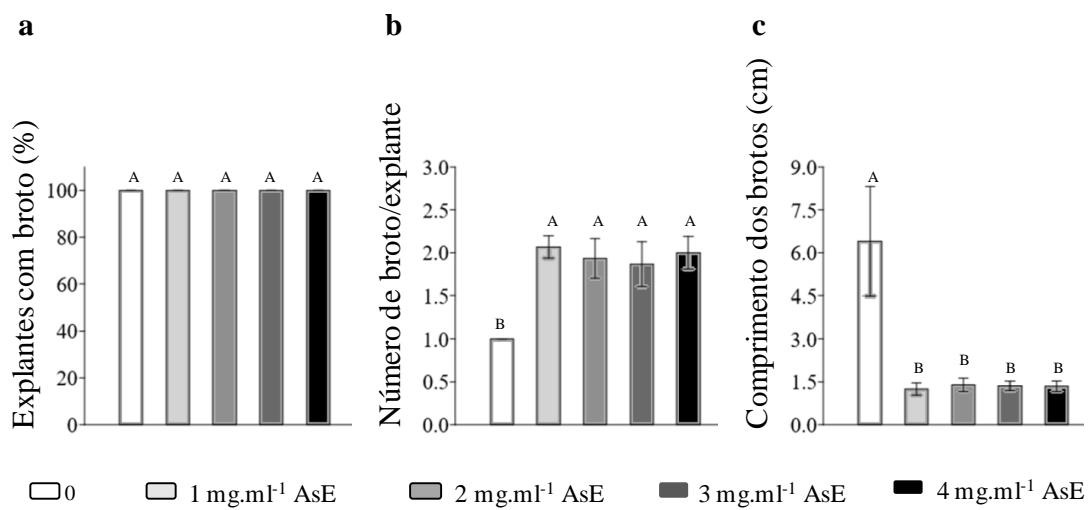


Fig. 2 Regeneração do nó cotiledonar de *Physalis peruviana* proveniente da conservação *in vitro* em meio MS e MS 1/4 suplementado com diferentes concentrações de extrato de *Agardhiella subulata* (AsE) após 30 dias de cultivo. Valores representam a média \pm erro padrão (n=15). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

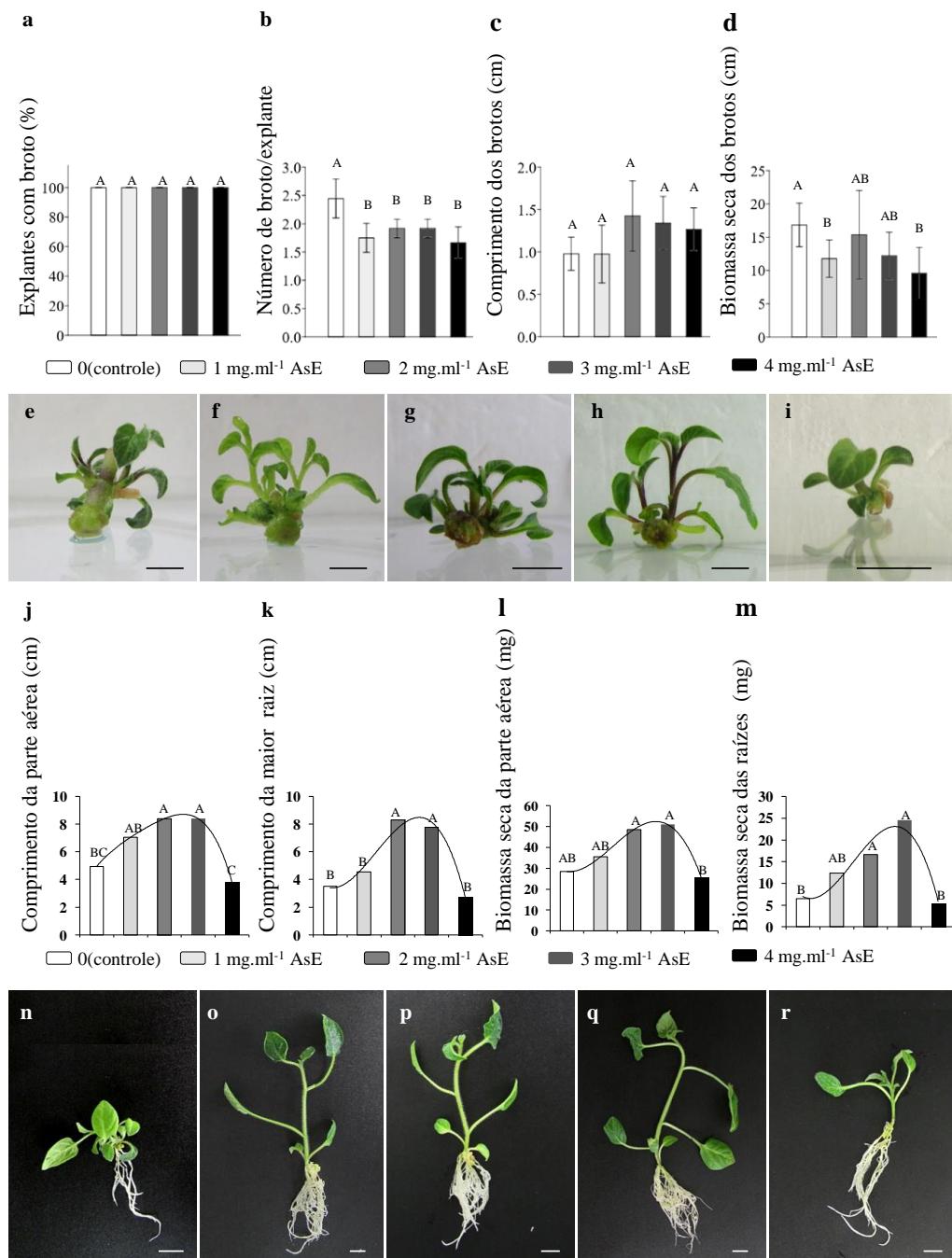


Fig. 3 Efeitos do extrato de *Agardhiella subulata* (AsE) na organogênese direta de *Physalis peruviana*. **a-d** Efeitos de AsE na formação de brotos. Valores representam a média \pm erro padrão (n=12). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$). **e-i** Brotos com 30 dias de idade obtidos a partir do nó cotiledonar cultivado em meio MS + BAP + IBA + AsE: **e** controle; **f** 1 mg.ml⁻¹ AsE; **g** 2 mg.ml⁻¹ AsE; **h** 3 mg.ml⁻¹ AsE; **i** 4 mg.ml⁻¹ AsE. **j-m** Parâmetros de crescimento dos brotos individualizados após 30 dias de cultivo em meio MS isento de AsE e reguladores. Valores representam a média \pm curva de tendência (n=10). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$). **n-r** Aspecto geral das microplantas após 30 dias de cultivo em meio MS isento de AsE e reguladores de crescimento vegetal obtidas de brotos proveniente do meio sem suplementação: **n** (controle); e com suplementação: **o** 1 mg.ml⁻¹ AsE; **p** 2 mg.ml⁻¹ AsE; **q** 3 mg.ml⁻¹ AsE; **r** 4 mg.ml⁻¹ AsE. Barra= 1cm.

CAPÍTULO 3

Extratos de macroalgas vermelhas afetam o crescimento *in vitro* e a formação de brotos em “sempre-viva de Mucugê”, uma espécie endêmica da Chapada Diamantina - Brasil em risco de extinção.

Red seaweeds extracts affect *in vitro* growth and shoots formation in “sempre-viva of Mucugê”, an endemic species of the endangered Chapada Diamantina - Brazil.

Extratos de macroalgas vermelhas afetam o crescimento *in vitro* e a formação de brotos em “sempre-viva de Mucugê”, uma espécie endêmica da Chapada Diamantina - Brasil em risco de extinção.

L. P. Carmo*, C. W. N. Moura, A. Lima-Brito

Universidade Estadual de Feira de Santana, 44036-900, Feira de Santana, Bahia, Brasil.

* Corresponding author

7 E-mail address: luanepoertela@yahoo.com.br (L.P. Carmo), wallace@uefs.br (C.W.N.
8 Moura), A. Lima-Brito (alone@uefs.br)

Destaques:

10 1 A utilização de meio Murashige and Skoog com metade das concentrações salinas e
11 15 g/L de sacarose foi eficiente para manter a sobrevivência das plantas por mais de 360
12 dias, sem subcultivo.

13 **2** A suplementação do meio com altas concentrações do extrato de *Argadhiella subulata*
14 diminuiu a germinação e o crescimento *in vitro* mas induziu a formação de brotos.

15 3 A suplementação do meio com o extrato de *Gracilaria* aumentou a formação de
16 brotos.

17 **4** A suplementação do meio com o extrato de *Hypnea pseudomusciformis* aumentou o
18 crescimento dos brotos.

19

20

21

1 Resumo

2 A espécie *Comanthera mucugensis* (Eriocaulaceae), também conhecida como “sempre-
3 viva de Mucugê”, endêmica da Chapada Diamantina, Brasil, tem grande potencial
4 ornamental e importância ecológica. Atualmente, encontra-se em risco de extinção
5 devido a redução das populações naturais ocasionada pela exploração extrativista,
6 queimadas e atividade agropecuária. Esforços estão sendo reunidos na tentativa de
7 estabelecer a produção de mudas e a conservação *ex situ* através da cultura de tecidos
8 vegetais. Diversos trabalhos reportaram que a utilização de bioestimulantes orgânicos
9 pode melhorar a eficiência do cultivo *in vitro*. Neste sentido, o presente estudo avaliou
10 os efeitos da suplementação do meio de cultura com extratos de macroalgas vermelhas
11 no cultivo de *C. mucugensis*. As sementes foram germinadas e cultivadas em meio
12 Murashige & Skoog com metade da concentração salina (MS $\frac{1}{2}$) suplementado com
13 diferentes concentrações do extrato de *Agardhiella subulata* (0,1,2,3, 4 mg/mL) por 370
14 dias. Para induzir a formação de brotos, microplantas da espécie foram cultivadas por
15 160 dias em três tipos de meio; MS $\frac{1}{2}$, MS $\frac{1}{2}$ + 1 mg/mL de extrato de *Hypnea*
16 *pseudomusciformis* e MS $\frac{1}{2}$ + 1 mg/mL de extrato de *Gracilaria* sp. O estabelecimento
17 *in vitro* de *C. mucugensis* com altas concentrações do extrato de *A. subulata* diminuiu a
18 germinação das sementes, a sobrevivência e o crescimento das plantas, contudo,
19 promoveu a formação de brotos. A adição do extrato de *Gracilaria* sp. dobrou a
20 produção de brotos a partir de microplantas, ao passo que, *H. pseudomusciformis*
21 interferiu positivamente no crescimento da parte aérea e raízes dos brotos. Portanto, a
22 utilização dos extratos das macroalgas no meio pode ser considerada um método
23 alternativo para propagação e conservação *in vitro* de *C. mucugensis*. Este é o primeiro
24 trabalho a demonstrar o efeitos desses bioestimulantes no cultivo *in vitro* das “sempre-
25 vivas”.

1 **Palavras-chaves:** Eriocaulaceae; *Comanthera mucugensis*; conservação *ex situ*;
2 multiplicação *in vitro*; *bioestimulantes*; *Rhodophyta*.

3 **Abstract**

4 The specie *Comanthera mucugensis* (Eriocaulaceae), also known as “sempre-viva of
5 Mucugê”, endemic to Chapada Diamantina, Brazil, has great ornamental potential and
6 ecological importance. Currently, it is in danger of extinction due to the reduction of
7 natural populations caused by extraction, burning and agricultural activity. Efforts are
8 being pooled in an attempt to establish seedling production and *ex situ* conservation
9 through plant tissue culture. Several studies have reported that the use of organic
10 biostimulants can improve the efficiency of *in vitro* cultivation. In this sense, the present
11 study evaluated the effects of culture medium supplementation with red seaweeds
12 extracts on *C. mucugensis* cultivation. The seeds were germinated and cultivated in
13 Murashige and Skoog medium with half saline concentration (MS $\frac{1}{2}$) supplemented with
14 different concentrations of *Agardhiella subulata* extract (0, 1, 2, 3, 4 mg/mL) for 370
15 days. To induce bud formation, microplants of the species were cultivated for 160 days
16 in three types of medium; MS $\frac{1}{2}$, MS $\frac{1}{2}$ + 1 mg/mL *Hpynea pseudomusciformis* extract
17 and MS $\frac{1}{2}$ + 1 mg/mL *Gracilaria* sp. *In vitro* establishment of *C. mucugensis* with high
18 concentrations of *A. subulata* extract reduced seed germination, plant survival and
19 growth, however, promoted shoots formation. The addition of *Gracilaria* sp. doubled
20 the production of shoots from microplants, whereas *H. pseudomusciformis* had a
21 positive effect on shoot aerial part and root growth. Therefore, the use of seaweeds
22 extracts in the medium can be considered an alternative method for *in vitro* propagation
23 and conservation of *C. mucugensis*. This is the first work to demonstrate the effects of
24 these biostimulants on *in vitro* cultivation of “sempre-vivas”.

1 **Keywords:** Eriocaulaceae; *Comanthera mucugensis*; *ex situ* conservation; *in vitro*
2 multiplication; biostimulants; Rhodophyta

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

1 **1. Introdução**

2 A Chapada Diamantina, localizada no centro do estado da Bahia (Brasil), possui
3 uma flora extremamente diversificada, incluindo espécies ornamentais economicamente
4 importantes. Muitas destas espécies são endêmicas e a exploração extrativista para o
5 mercado florístico levou a uma redução significativa das populações naturais (Costa et
6 al., 2008). Dentre os casos mais críticos, estão algumas espécies de “sempre-vivas”,
7 nome genérico dado as plantas cuja as flores, após serem colhidas, conservam a cor e a
8 forma por um período longo de tempo (Giulietti et al., 1988).

9 Conhecida como “sempre viva de Mucugê”, *Comanthera mucugensis* (Giul.)
10 L.R.Parra & Giul. (basiônimo = *Syngonanthus mucugensis*) (Eriocaulaceae) está
11 classificada como espécie “em risco” de extinção (Martinelli and Moraes, 2013). Sua
12 coleta foi proibida, embora a exploração ainda persista (Costa et al., 2008). Além do
13 extrativismo, as queimadas e a agropecuária contribuem para a redução da população e
14 contínua perda da qualidade do habitat (Martinelli and Moraes, 2013). Sua conservação
15 está restrita à preservação em seu ambiente natural no Parque Nacional da Chapada
16 Diamantina e ao estabelecimento de protocolos para a manutenção *ex situ* (Lima-Brito
17 et al., 2015, Lima-Brito et al., 2011a).

18 A propagação de plantas *in vitro* pode contribuir para o sustento do cultivo e
19 manejo de genótipos comercialmente importantes de espécies nativas superexploradas
20 e/ou em risco nos seus habitats naturais. Desta forma evita-se o extrativismo *in situ*
21 descomedido que vem causando perda de biodiversidade por erosão genética e extinção
22 de muitas espécies (Pilatti et al., 2011).

23 Nos últimos anos, alguns estudos demonstraram que a técnica de cultura de
24 tecidos vegetais é uma alternativa viável para a propagação e conservação *in vitro* de

1 espécies de “sempre-vivas”. A micropropagação, via organogênese indireta, foi indicada
2 para *C. elegantula* (Ruhland) L.R.Parra & Giul. (Pêgo et al., 2013, como *Syngonanthus*
3 *elegantulus*) e *C. elegans* (Bong.) L.R.Parra & Giul. (Pêgo et al., 2014, como
4 *Syngonanthus elegans*). A germinação e o crescimento *in vitro* de *C. curralensis*
5 (Moldenke) L.R.Parra & Giul. foi demonstrado por Albuquerque et al. 2016 utilizando
6 o sistema do co-cultivo.

7 O estabelecimento *in vitro* de *C. mucugensis* foi inicialmente proposto por
8 Paixão-Santos et al. (2003) e Silva et al. (2005a, 2005b). Posteriormente, Lima-brito et
9 al. (2011b) avaliaram a morfogênese *in vitro* da espécie e propuseram as diretrizes para
10 a multiplicação por organogênese direta e indireta. Outros estudos estabeleceram o
11 protocolo para a conservação *in vitro* da “sempre-viva de Mucugê” (Lima-Brito et al.,
12 2011a; 2015).

13 Apesar dos resultados demonstrado em estudos anteriores, a propagação *in vitro*
14 de *C. mucugensis* ainda é limitada e não atende adequadamente a demanda para o
15 mercado de flores secas. Além disso, o baixo sucesso na etapa da aclimatização das
16 plantas agrava a viabilidade comercial do método (Lima-Brito et al., 2016). Desta
17 forma, esforços são necessários para otimizar do cultivo *in vitro* desta espécie, visando a
18 criação de um sistema de produção de mudas eficiente capaz de superar a exploração *in*
19 *situ*, consequentemente, contribuindo com a manutenção do germoplasma.

20 Para melhorar a eficiência das culturas de células e tecidos vegetais *in vitro*, a
21 suplementação do meio de cultura com bioestimulantes orgânicos como tem sido
22 frequentemente reportado em diversos trabalhos (Eeuwens, 1978; Gurusaravanan et al.,
23 2013; Wiszniewska et al., 2013).

1 Recentemente, a atividade bioestimulante dos extrato de macroalgas marinhas
2 foi avaliado no cultivo *in vitro* de diversas plantas envolvendo os processos de
3 organogênese e embriogênese somática (Gayathri et al., 2015; Satish et al., 2016;
4 Esserti et al., 2017; Venkatachalam et al., 2017). Acredita-se que fitohormônios como
5 auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico, etileno, betaína e poliaminas além de
6 macro e micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, polissacarídeos e substâncias
7 secundárias presentes nos extratos algacéos atuem no metabolismo celular de plantas
8 estimulando processos de morfogênese e crescimento (Battacharyya et al., 2015).

9 O litoral brasileiro possui uma grande diversidade de macroalgas vermelhas
10 (*Rhodophyta*), no entanto, o potencial dessas espécies como bioestimulantes no cultivo
11 *in vitro* de plantas ainda é pouco explorado. Neste contexto, o presente estudo avaliou
12 os efeitos dos extratos de rodofíceas coletadas no litoral do Brasil no crescimento e
13 multiplicação *in vitro* de *C. mucugensis*. Este é o primeiro trabalho que demonstra o
14 aproveitamento das macroalgas marinhas no cultivo *in vitro* das “sempre-vivas”.

15 **2. Materiais e métodos**

16 2.1. Coleta, identificação e preparação dos extratos das macroalgas

17 A seleção das espécies foi determinada pela condição de campo e pela
18 quantidade de biomassa disponível. Desta forma, *Agardhiella subulata*, *Hypnea*
19 *pseudomusciformis* e *Gracilaria* sp. foram coletadas no recife costeiro da Praia da
20 Penha - Ilha de Itaparica, Bahia, Brasil (12°59'16.7"S / 38°37'21.3"W) em abril/2017,
21 durante a baixa-mar. A identificação dos táxons foi baseada em características
22 morfológicas e um exemplar foi tombado na coleção de referência no Herbário da
23 Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS xxx,xxxxx, xxxx,
24 respectivamente). As macroalgas coletadas foram triadas em água do mar para eliminar

1 partículas de areia, epífitas e outras impurezas, posteriormente, lavadas com água
2 corrente para retirar o excesso de sal. Foram secas em estufa por 15 dias a 40 °C e
3 pulverizadas em moinho de facas.

4 Para preparação do extrato de *A. subulata* (AsE), *H. pseudomusciformis* (HpE) e
5 *Gracilaria* sp.(GrE), cerca de 50 g de pó de cada macroalga foi fervido em 500 mL de
6 água destilada estéril a 50 °C durante 1h. A mistura foi filtrada usando quatro camadas
7 de pano tipo “musseline”, seca em estufa a 40 °C até obtenção do peso constante, e
8 armazenada a 4 °C.

9 2.2. Determinação do conteúdo mineral dos extratos das macroalgas

10 Para determinação do fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre
11 (S), boro (B), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn), os extrato de *Agardhiella*.
12 *subulata* (AsE), *Hypnea pseudomusciformis* (HpE) e *Gracilaria* sp.(GrE) foram
13 digeridos em micro-ondas na presença de ácido nítrico 65%. A leitura dos elementos foi
14 realizada com espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente
15 (ICP-OES) (Perkin Elmer) em triplicata.

16 2.3. Coleta e identificação de *Comanthera mucugensis*

17 As sementes de *Comanthera mucugensis* foram coletadas no Parque Municipal
18 de Mucugê localizado no município de Mucugê (12°99'21,3''S e 41°34'19,6''W),
19 Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. A identificação do táxon foi baseada em
20 características morfológicas e um exemplar foi tombado na coleção de referência no
21 Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS xxxx).

1 2.4. Crescimento *in vitro* de *Comanthera mucugensis* em meio suplementado com
2 extrato de *Agardhiella subulata* (AsE)

3 As sementes de *Comanthera mucugensis* foram desinfestadas em etanol 70% por
4 30 s seguido de solução de hipoclorito de sódio – NaOCl (2,5% de cloro ativo) com
5 uma gota de detergente neutro por 10 min e lavadas com três enxágues em água
6 destilada estéril. Foram inoculadas em meio de cultura MS (Murashige and Skoog,
7 1962) com metade da concentração salina (MS $\frac{1}{2}$) suplementado com diferentes
8 concentrações de extrato de *A. subulata* (AsE) (1,2,3,4 mg/mL). O meio MS $\frac{1}{2}$ isento de
9 extrato foi utilizado como controle.

10 Após 30 dias foi registrada a taxa de germinação considerando germinadas as
11 sementes com protrusão do eixo embrionário superior a 2-3mm. Ao final de 370 dias foi
12 avaliada a taxa de sobrevivência das plantas germinadas, assim como os parâmetros de
13 crescimento: comprimento da parte aérea e da raiz, número de raízes e peso seco da
14 parte aérea e raízes. Também foi analisada a porcentagem de plantas com brotos e o
15 número de brotos emitidos por planta. O experimento foi composto por vinte repetições
16 por tratamento.

17 2.5. Multiplicação *in vitro* de *Comanthera mucugensis* em meio suplementado com
18 extrato de *Hypnea pseudomusciformis* (HpE) e *Gracilaria* sp. (GrE)

19 Para induzir a formação de brotos foram utilizadas microplantas de *Comanthera*
20 *mucugensis* com aproximadamente 1 cm, previamente obtidas por organogênese direta
21 em meio livre de regulador vegetal e/ ou extrato, como explantes. Em seguida, foram
22 inoculadas em meio MS $\frac{1}{2}$ + 1 mg/mL de extrato de *H. pseudomusciformis* (HpE) e em
23 MS $\frac{1}{2}$ + 1 mg/mL de extrato de *Gracilaria* sp. (GrE). O meio MS $\frac{1}{2}$ isento de extrato foi
24 considerado como controle.

1 Após 160 dias de cultivo foram registrados a taxa de sobrevivência, número de
2 microplantas que produziram brotos, número de brotos por microplanta e comprimento
3 da parte aérea e da raiz dos brotos. O experimento foi composto por vinte repetições por
4 tratamento.

5 2.6. Condições gerais de cultivo

6 Em todos meios de cultura foram adicionados 15 g/L de sacarose e 7 g/L de
7 ágar. Em seguida, o pH foi ajustado entre 5,6 - 5,8 e esterilizado em autoclave por 15
8 minutos a 121 °C e 1,0 atm de pressão. Os experimentos foram mantidos em sala de
9 crescimento com fotoperíodo de 16h, temperatura de 25 ± 3°C e luz branca fluorescente
10 a 60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}$.

11 2.7. Delineamento experimental e análise estatística

12 O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Os
13 resultados foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados
14 paramétricos foram avaliados pela análise de variância ANOVA seguido pelo teste de
15 Tukey e os não paramétricos pela análise de variância de Kruskal-Wallis seguido pelo
16 teste de Mann-Whitney. Todas análises foram realizados a 5% de significância no
17 software PAST (Hammer et al. 2001).

18 **3. Resultados**

19 3.1. Composição mineral dos extratos de macroalgas

20 A análise da composição mineral dos extratos das macroalgas revelou a presença
21 de macro e microelementos, tais como, fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio
22 (Mg), enxofre (S), boro (B), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn) (Tabela 1). O
23 maior teor de fósforo foi registrado nos extratos de *H. pseudomusciformis* e *Gracilaria*

1 sp. A quantidade de potássio nos extratos de *A. subulata* e *Gracilaria* sp. foi cerca de 4x
2 vezes maior quando comparada com HpE. Os níveis de enxofre e boro foram
3 significativamente maiores em AsE e HpE. As concentrações de cálcio, magnésio,
4 ferro, manganês e zinco nos extratos das três macroalgas foram estatisticamente
5 semelhantes, no entanto, ressaltar-se que o conteúdo de ferro e zinco é bastante alto.

6 3.2. Crescimento *in vitro* de *Comanthera mucugensis* em meio suplementado com
7 extrato de *Agardhiella subulata* (AsE)

8 A suplementação do meio de cultura com extrato de *A. subulata* afetou
9 negativamente as taxas de germinação e de sobrevivência de *C. mucugensis* (Tabela 2).
10 A adição do extrato nas concentrações 2,3 e 4 mg/mL diminuiu significativamente a
11 taxa de germinação das sementes quando comparada com o controle. A taxa de
12 sobrevivência das plantas cultivadas com o extrato da macroalga também reduziu,
13 sobretudo, no meio com 2 mg/mL de AsE. A melhor taxa de germinação e de
14 sobrevivência foi observada no controle (meio sem suplementação) que manteve a
15 viabilidade das plantas em 100%.

16 O crescimento *in vitro* de *C. mucugensis* foi significativamente afetado pelo
17 extrato de *A. subulata* (Figura 1). A suplementação do meio com 2, 3 e 4 mg/mL AsE
18 reduziu drasticamente o comprimento da parte aérea e o número de raízes (Tabela 3).
19 Em comparação com o controle, as plantas cultivadas com 3 e 4 mg/ml AsE
20 apresentaram o menor comprimento da raiz. A adição de extrato também diminui o
21 peso seco da parte área e das raízes, embora, a suplementação do meio com 1 mg/mL
22 não tenha diferido do controle.

23 Também foi observado a formação de brotos a partir das plantas cultivadas em
24 MS½ e MS½ com suplementação de AsE, exceto na concentração 2 mg/mL (Tabela 4).

1 A maior porcentagem de plantas com broto foi obtida no meio suplementado com 3 e 4
2 mg/mL de AsE apresentando uma taxa 2,5 - 3,2x superior que o controle. O número de
3 brotos por planta também foi significativamente maior nos tratamentos com alta
4 concentração de AsE, produzindo em média 3-4x mais brotos que o meio sem a
5 suplementação.

6 3.3. Multiplicação *in vitro* de *Comanthera mucugensis* em meio suplementado com
7 extrato de *Hypnea pseudomusciformis* (HpE) e *Gracilaria* sp. (GrE)

8 Foi observado a formação de brotos a partir das microplantas no meio com e
9 sem extratos das macroalgas (Figura 2a). A composição do meio de cultura não
10 interferiu na sobrevivência e na porcentagem de plantas com brotos (Tabela 4). A
11 suplementação com extrato de *Gracilaria* sp. promoveu o aumento significativo na
12 formação dos brotos. Neste o número de brotos por planta foi cerca de 2x maior quando
13 comparado com os demais meios. Por outro lado, a presença de HpE incrementou o
14 crescimento da parte aérea e da raiz dos brotos (Tabela 4). Em alguns casos, foi
15 observado a morte da microplanta após emissão dos brotos (Figura 2b).

16 Discussão

17 O gênero *Comanthera* congrega muitas espécies conhecidas popularmente como
18 “sempre-vivas”. Dentre estas, *C. mucugensis* é exemplo de espécie micro-endêmica,
19 restrita ao município de Mucugê do Estado da Bahia, que sofre forte pressão de coleta
20 devido ao seu valor ornamental. Apesar da proibição de sua coleta pelo IBAMA
21 (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) em 1990,
22 a “sempre-viva de Mucugê” continua sendo explorada pelas comunidades locais como
23 uma importante fonte de renda (Costa et al., 2008; Martinelli and Moraes, 2013).
24 Portanto, a busca de alternativas sustentáveis para sua propagação é extremamente

1 necessária e de grande importância socioeconômica. A propagação *in vitro* pode ser a
2 chave para superar este desafio.

3 Estudos anteriores relataram a viabilidade da técnica de cultura de tecidos para
4 *C. mucugensis*. Seu estabelecimento *in vitro* foi demonstrado por Paixão-Santos et al.
5 (2003) e Silva et al. (2005a, 2005b) que determinaram o protocolo para germinação e
6 crescimento utilizando o meio de cultura MS com metade das concentrações salinas.
7 Posteriormente, Lima-Brito et al. (2011b) estudaram a propagação via organogênese
8 direta e indireta. Os autores concluíram que o caule foi a melhor fonte de explante para
9 a regeneração de brotos, tanto via direta, em meio MS $\frac{1}{2}$ isento de regulador, quanto
10 indireta, na presença de BAP.

11 A técnica de cultura de tecidos vegetais também foi indicada como uma
12 alternativa viável para a conservação *in vitro* de *C. mucugensis* (Lima-Brito et al., 2015,
13 2011a). A adição de agentes osmóticos, como sorbitol e manitol, e de reguladores
14 vegetais, como ancimidol e paclobutrazol, ao meio de cultura foram capazes de induzir
15 o crescimento mínimo, no entanto diminuíram a sobrevivência das plantas. Desta
16 forma, Lima-Brito et al. (2015) sugeriram que a conservação de *C. mucugensis* pode ser
17 feita em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ suplementado com 15 g/L por até 180 dias, sem
18 subcultivo.

19 Os resultados obtidos no presente estudo atestaram que o cultivo de *C.*
20 *mucugensis* em meio MS $\frac{1}{2}$ com 15 g/L de sacarose foi capaz de manter a sobrevivência
21 da planta por até 370 dias, tempo superior ao relatado por Lima-Brito et al. (2015). O
22 meio de cultura suplementado com altas concentrações de extrato de *A. subulata* (AsE)
23 também induziu o crescimento mínimo, mas afetou negativamente a sobrevivência de
24 *C. mucugensis*. A diminuição do crescimento das plantas estabelecidas em meio MS $\frac{1}{2}$ +

1 3 mg/mL AsE e MS½ + 4 mg/mL AsE pode ser creditada a expressiva formação de
2 brotos. A competição por nutrientes entre os novos indivíduos e a “planta-mãe” pode ter
3 interferido no seu crescimento. Além disso, a composição mineral dos extratos pode ter
4 forte influência sobre os resultados observados.

5 Os extratos de macroalgas são comumente considerados como fertilizantes
6 devido a presença de macro e micronutrientes. Sua composição mineral apresenta
7 grande variação pois está relacionada a vários fatores ambientais, incluindo teor de sais
8 na água, temperatura, salinidade, pH, e intensidade da luz (Marinho-Soriano et al.,
9 2006). Além disso, Yoganandham et al. (2019) observaram diferenças consideráveis
10 nas concentrações dos minerais entre os grupos de macroalgas marinhas Rhodophyta,
11 Ochrophyta/ Phaeophyceae e Chlorophyta. Segundo os autores, as rodofíceas tendem a
12 apresentar níveis significativamente mais elevados de ferro, potássio, magnésio e
13 enxofre em comparação com as *clorofíceas e feofíceas*.

14 No presente estudo, a análise da composição mineral dos extratos revelou a
15 presença considerável de macro e microelementos. Foi observado que o teor de potássio
16 e magnésio registrado em HpE, GrE e AsE foi superior ao relatado por Brito et al.
17 (2017) para as espécies do gênero *Hypnea*, *Gracilaria* e *Agardhiella* coletadas na Praia
18 da Penha – Ilha de Itaparica, Bahia, Brasil entre março e novembro de 2014. Ao passo
19 que, os extratos de *H. pseudomusciformis* e *Gracilaria* sp. apresentam valores de cálcio
20 dentro da faixa relatada pelos autores para os respectivos gêneros.

21 Com base nestes dados, é possível inferir que a suplementação do MS½ com os
22 extratos das macroalgas aumentou a quantidade de sais minerais no meio. A alta
23 concentração salina cria uma condição de estresse osmótico que pode estar associado

1 com o incremento significativo na formação de brotos observado no cultivo de *C.*
2 *mucugensis* com altas concentrações de AsE e com 1mg/mL GrE.

3 O estudo realizado por Lima-Brito et al. (2011a) reportou a formação de brotos
4 de *C. mucugensis* a partir de plantas cultivadas com alta concentração de sacarose
5 combinado com sorbitol ou manitol. Os autores relacionaram este efeito ao estresse
6 osmótico causado pela adição de carboidratos ao meio. De acordo com a fenologia de *C.*
7 *mucugensis*, a escassez hídrica parece favorecer o desenvolvimento reprodutivo
8 (Cerqueira et al., 2008). Portanto, a obtenção de brotos em decorrência do estresse
9 hídrico, causado por agentes osmóticos, reproduz um comportamento natural da espécie
10 na condição *ex vitro* (Lima-Brito et al., 2011a).

11 Trabalhos anteriores também reportaram a sensibilidade das sementes de “sempre-
12 vivas” a meios com altas concentrações salinas (Paixão-Santos et al., 2003; Pêgo et al.,
13 2013; 2014; Albuquerque et al., 2016). No presente estudo foi observado que a taxa de
14 germinação de *C. mucugensis* reduziu com a adição de altas concentrações de AsE.
15 Diante disso, é possível ponderar que, no cultivo *in vitro* da “sempre-viva de mucugê”,
16 os extratos das macroalgas podem atuar como agentes osmóticos.

17 Diversos trabalhos demonstraram que extratos de macroalgas também atuam
18 como bioestimulantes. Por exemplo, a utilização de *Hypnea musciformis* incrementou o
19 crescimento da parte aérea, raiz e biomassa em *Vigna radiata* (L.) Wilczek
20 (Gopalakrishnan and Binumol, 2016). Outros estudos reportaram que espécies do
21 gênero *Gracilaria* promoveram aumento significativos na indução de brotos de
22 *Solanum melongena* L (Satish et al., 2015) e na maturação e germinação dos embriões
23 somáticos de tomate (Vinoth et al., 2014).

1 Estes resultados tem sido frequentemente atribuídos aos efeitos diretos e
2 indiretos dos fitormônios presentes nos extratos das macroalgas (Battacharyya et al.,
3 2015), embora algumas pesquisas tenham sugerido que outras moléculas, como os
4 polissacarídeos, podem ser importantes bioestimuladores (Shukla et al., 2016). Segundo
5 Wally et al. (2013) a aplicação do extrato de *Ascophyllum nodosum* em *Arabidopsis*
6 estimulou a expressão de citocinina e ácido abscísico (ABA) e a redução dos níveis de
7 auxina, levando ao aumento do crescimento vegetativo das plantas. Estes dados, podem,
8 pelo menos em parte, explicar o incremento das brotação com a utilização de GrE e do
9 crescimento dos brotos com HpE observados no presente estudo.

10 Está bem estabelecido que os extratos de macroalgas são fonte de compostos
11 bioativos que podem variar de acordo com o grupo/espécie da macroalga, o local de
12 coleta e o método de obtenção do extrato. Existe um consenso entre os pesquisadores
13 que os efeitos benéficos da sua aplicação é resultado de muitos componentes que podem
14 trabalhar sinergicamente em diferentes concentrações. Desta forma, são necessários
15 novos estudos para uma maior compreensão dos modos de ação desse recurso no
16 crescimento e na multiplicação *in vitro* das “sempre-vivas”.

17 **5. Conclusão**

18 Neste trabalho foi demonstrado que a adição de altas concentrações do extrato de
19 *Agardhiella subulata* no meio reduziu a germinação e o crescimento *in vitro* de
20 *Comandra mucugensis*, no entanto, induziu a formação de brotos. Confirma-se que a
21 utilização de MS $\frac{1}{2}$ suplementado com 15 g/L de sacarose foi um método eficiente para
22 conservação *in vitro* da espécie. O extrato de *Gracilaria* sp. aumentou a produção de
23 brotos, enquanto que o extrato de *Hypnea pseudomusciformis* incrementou o
24 crescimento dos brotos. Logo, a suplementação do meio com extratos das macroalgas

1 pode ser considerado um método alternativo para propagação e conservação *in vitro* de
2 *C. mucugensis*.

3 **Declarations of competing interest**

4 The authors have no conflict of interest to declare.

5 **Agradecimentos**

6 A primeira autora agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
7 Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 pelo apoio no presente
8 trabalho. Os autores agradecem ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento
9 Científico e Tecnológico e FAPESB, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da
10 Bahia (Projeto “Flora da Bahia”, 483909/2012) e ao Projeto PROCAD /CAPES
11 88881.068434.2014-01 (USP, UEFS e UENF) pelo apoio financeiro.

12 **Referências**

13 Albuquerque, M.M.S., Lima-Brito, A., Lima, A.P.P.S., Alvim, B.F.M., Santana, J.R.F. de, 2016. *In vitro*
14 establishment of *Comanthera curralensis*, “sempre viva” native of Chapada Diamantina – Bahia
15 Estabelecimento. Ciência Rural 46, 991–995. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20131091>.

16 Battacharyya, D., Babgohari, M.Z., Rathor, P., Prithiviraj, B., 2015. Seaweed extracts as biostimulants in
17 horticulture. Sci. Hortic. (Amsterdam). 196, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.012>.

18 Brito, G.B., Teixeira, L.S.G., Korn, M.G.A., 2017. Direct analysis of marine macroalgae for
19 determination of macro minerals by energy dispersive X-ray fluorescence. Microchem. J. 134, 35–
20 40. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2017.05.001>.

21 Cerqueira, C.O., Funch, L.S., Borba, E.L., 2008. Fenologia de *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp.
22 *mucugensis* e *S. curralensis* Moldenke (Eriocaulaceae), nos municípios de Mucugê e Morro do
23 Chapéu, Chapada Diamantina, BA, Brasil. Acta Bot. Brasilica 22, 962–969.
24 <https://doi.org/10.1590/S0102-33062008000400007>.

25 Costa, F.N., Trovó, M., Sano, P.T., 2008. Eriocaulaceae na Cadeia do Espinhaço: riqueza, endemismo e
26 ameaças. Megadiversidade 4, 117–125.

- 1 Eeuwens, C.J., 1978. Effects of organic nutrients and hormones on growth and development of tissue
2 explants from coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *in vitro*.
3 *Physiol. Plant.* 42, 173–178. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1978.tb02543.x>.
- 4 Esserti, S., Faize, M., Rifai, L.A., Smaili, A., Belfaiza, M., Faize, L., Alburquerque, N., Burgos, L.,
5 Koussa, T., Makroum, K., 2017. Media derived from brown seaweeds *Cystoseira myriophylloides*
6 and *Fucus spiralis* for *in vitro* plant tissue culture. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 128, 437–446.
7 <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1121-3>.
- 8 Gayathri, M., Kumar, P.S., Prabha, A.M.L., Muralitharan, G., 2015. *In vitro* regeneration of *Arachis*
9 *hypogaea* L. and *Moringa oleifera* Lam. using extracellular phytohormones from *Aphanothecace* sp.
10 MBDU 515. *Algal Res.* 7, 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.12.009>.
- 11 Giulietti, N., Giulietti, A.M., Rubens, J., 1988. Estudos em sempre-vivas: importância econômica do
12 extrativismo em Minas Gerais, Brasil. *Acta Bot. Brasilica* 1, 179–193.
- 13 Gopalakrishnan, C.N., Binumol, T., 2016. Preliminary studies on the effect of bioactive substances of
14 *Hypnea musciformis* (Wulf.) Lamour. on the growth of seedlings in green gram, *Vigna radiata* L. J.
15 *Phytol.* 8, 1–6. <https://doi.org/10.19071/jp.2016.v8.2973>.
- 16 Gurusaravanan, P., Vinoth, S., Satheesh Kumar, M., Thajuddin, N., Jayabalan, N., 2013. Effect of
17 cyanobacterial extracellular products on high-frequency *in vitro* induction and elongation of
18 *Gossypium hirsutum* L. organs through shoot apex explants. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 11, 9–16.
19 <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2013.04.001>.
- 20 Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST-Palaeontological statistics.
- 21 Lima-Brito, A., Albuquerque, M.M.S., Alvim, B.F.M., Resende, S.V., Bellintani, M.C., Santana, J.R.F.
22 de, 2011a. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. *Ciência Rural*
23 41, 1354–1361. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011000800010>.
- 24 Lima-Brito, A., Resende, S.V., Lima, C.O. de C., Alvim, B.F.M., Carneiro, C.E., de Santana, J.R.F.,
25 2011b. *In vitro* morphogenesis of *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. *Ciência e*
26 *Agrotecnologia* 35, 502–510. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000300010>.
- 27 Lima-Brito, A., Albuquerque, M.M.S., Alvim, B.M., Resende, S.V., Bellintani, M.C., Santana, J.R.F. de,

- 1 2015. Plant growth regulators for *in vitro* minimal growth of *Comanthera mucugensis*. Plant Cell
2 Cult. Micropag. 11, 11–18.
- 3 Lima-Brito, A., Albuquerque, M.M.S., Resende, S.V., Carneiro, C.E., Santana, J.R.F., 2016. Rustificação
4 *in vitro* em diferentes ambientes e aclimatização de microplantas de *Comanthera mucugensis* Giul.
5 subsp. *mucugensis*. Rev. Cienc. Agron. 47, 152–161. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20160018>.
- 6 Marinho-Soriano, E., Fonseca, P.C., Carneiro, M.A.A., Moreira, W.S.C., 2006. Seasonal variation in the
7 chemical composition of two tropical seaweeds. Bioresour. Technol. 97, 2402–2406.
8 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.10.014>.
- 9 Martinelli, G., Moraes, M.A., 2013. Livro vermelho da flora do Brasil. Instituto de Pesquisas Jardim
10 Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- 11 Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue
12 cultures. Physiol. Plant. 15, 473–497.
- 13 Paixão-Santos, J. D., Dornelles, A. L. C., Silva, J. D. S., Rios, A. P., 2003. Germinação *in vitro* de
14 *Syngonanthus mucugensis* Giulietti. Sitientibus 3, 120-124.
- 15 Pêgo, R.G., Paiva, P.D. de O., Paiva, R., 2013. Micropropagação de *Syngonanthus elegantulus*. Cienc. e
16 Agrotecnologia 37, 32–39. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542013000100004>.
- 17 Pêgo, R.G., Paiva, P.D. de O., Paiva, R., 2014. Micropropagation protocol for *Syngonanthus elegans*
18 (Bong.) Ruhland: an ornamental species. Acta Sci. Agron. 36, 347.
19 <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v36i3.17946>.
- 20 Pilatti, F.K., Aguiar, T., Simões, T., Benson, E.E., Viana, A.M., 2011. *In vitro* and cryogenic preservation
21 of plant biodiversity in Brazil. Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant 47, 82–98.
22 <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9302-y>.
- 23 Satish, L., Rameshkumar, R., Rathinapriya, P., Pandian, S., Rency, A.S., Sunitha, T., Ramesh, M., 2015.
24 Effect of seaweed liquid extracts and plant growth regulators on *in vitro* mass propagation of brinjal
25 (*Solanum melongena* L.) through hypocotyl and leaf disc explants. J. Appl. Phycol. 27, 993–1002.
26 <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0375-6>.

- 1 Satish, L., Rathinapriya, P., Rency, A.S., Ceasar, S.A., Pandian, S., Rameshkumar, R., Ramesh, M., 2016.
2 Somatic embryogenesis and regeneration using *Gracilaria edulis* and *Padina boergesenii* seaweed
3 liquid extracts and genetic fidelity in finger millet (*Eleusine coracana*). *J. Appl. Phycol.* 28, 2083–
4 2098. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0696-0>.
- 5 Shukla, P.S., Borza, T., Critchley, A.T., Prithiviraj, B., 2016. Carrageenans from red seaweeds as
6 promoters of growth and elicitors of defense response in plants. *Front. Mar. Sci.* 3, 81.
7 <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00081>.
- 8 Silva, J. R. S., Paixão-Santos, J., Rios, A. P. S., Santana, J. R. F., Dornelles, A. L. C., 2005. Estudo da
9 germinação e morfologia do desenvolvimento pós-seminal de *Syngonanthus mucugensis* Giul. 'in
10 vitro'. *Sitientibus* 5, 60-62.
- 11 Silva, J. R. S., Lima-Brito, A., Santana, J. R. F., Dornelles, A. L. C., 2005b. Efeito da sacarose sobre o
12 enraizamento e desenvolvimento in vitro de *Syngonanthus mucugensis* Giul. *Sitientibus* 5, 56-59.
- 13 Venkatachalam, P., Malar, S., Thiagarajan, M., Indiraarulselvi, P., Geetha, N., 2017. Effect of
14 phycochemical coated silver nanocomplexes as novel growth-stimulating compounds for plant
15 regeneration of *Alternanthera sessilis* L. *J. Appl. Phycol.* 29, 1095–1106.
16 <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0977-2>.
- 17 Vinoth, S., Gurusaravanan, P., Jayabalan, N., 2014. Optimization of somatic embryogenesis protocol in
18 *Lycopersicon esculentum* L. using plant growth regulators and seaweed extracts. *J. Appl. Phycol.*
19 26, 1527–1537. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0151-z>.
- 20 Wally, O.S.D., Zaharia, L.I., Prithiviraj, B., Hiltz, D., Critchley, A.T., Abrams, S.R., Han, X., Craigie,
21 J.S., 2012. Regulation of phytohormone biosynthesis and accumulation in *Arabidopsis* following
22 treatment with commercial extract from the marine macroalga *Ascophyllum nodosum*. *J. Plant
23 Growth Regul.* 32, 324–339. <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9301-9>.
- 24 Wiszniewska, A., Hanus-Fajerska, E., Grabski, K., Tukaj, Z., 2013. Promoting effects of organic medium
25 supplements on the micropropagation of promising ornamental *Daphne* species (Thymelaeaceae).
26 *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 49, 51–59. <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9480-x>.
- 27 Yoganandham, S.T., Raguraman, V., Muniswamy, G., 2019. Mineral and trace metal concentrations in

1 seaweeds by microwave-assisted digestion method followed by quadrupole inductively coupled
2 plasma mass spectrometry. Biol. Trace Elem. Res. 187, 579–585. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1397-8>.

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

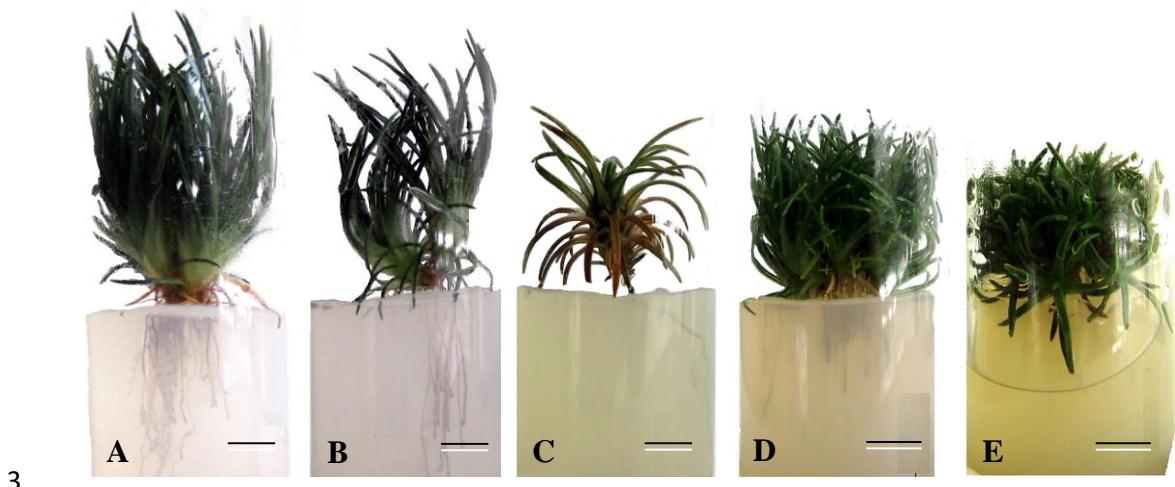
20

21

22

1 **Figuras**

2



3

4 **Figura 1** Aspecto geral de *Comathera mucugensis* após 370 dias de cultivo *in vitro* em
 5 meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ e MS $\frac{1}{2}$ suplementado com extrato de *Agardhiella subulata* (AsE).
 6 A. MS $\frac{1}{2}$. B. MS $\frac{1}{2}$ + 1mg/mL AsE. C. MS $\frac{1}{2}$ + 2mg/mL AsE. D. MS $\frac{1}{2}$ + 3mg/mL AsE.
 7 E. MS $\frac{1}{2}$ + 4 mg/mL AsE. Barra= 1cm.

8



9 **Figura 2** A, Formação de brotos de *Comathera mucugensis* a partir das microplantas
 10 após 160 dias de cultivo *in vitro*. B, Formação de dois brotos axilares na porção apical
 11 de uma microplanta senescente. Barra= 1cm.

Tabelas

Tabela 1 Composição mineral dos extratos de *Agardhiella subulata* (AsE), *Hypnea pseudomusciformis* (HpE) and *Gracilaria* sp. (GrE).

| Minerais | <i>Agardhiella subulata</i> | <i>Hypnea pseudomusciformis</i> | <i>Gracilaria</i> sp. |
|-----------------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| Fosforo (P) (g/kg) | 0,76 ± 0,08 b | 1,16 ± 0,03 a | 1,1 ± 0 a |
| Potássio (K) (g/kg) | 111,96 ± 2,14 a | 27,9 ± 1,3 b | 110,06 ± 0,88 a |
| Cálcio (Ca) (g/kg) | 23,06 ± 1,44 a | 20,7 ± 2,13 a | 16,96 ± 1,32 a |
| Magnésio (Mg) (g/kg) | 15,8 ± 2,61a | 12,6 ± 2,75 a | 10,76 ± 2,16 a |
| Enxofre (S) (g/kg) | 59,36 ± 0,64a | 61,66 ± 3,03 a | 35,93 ± 0,8 b |
| Boro (B) (mg/kg) | 218,83 ± 17,16 a | 241,16 ± 6,93 a | 109,83 ± 5,45 b |
| Ferro (Fe) (mg/kg) | 858,66 ± 164,20 a | 1.154,16 ± 81,08 a | 845,83 ± 45,01 a |
| Magnésio (Mn) (mg/kg) | 38 ± 12,35 a | 42 ± 12,55 a | 40,83 ± 11,83 a |
| Zinco (Zn) (mg/kg) | 1.232 ± 541,80 a | 1.079,5 ± 406,22 a | 954,16 ± 298,27 a |

Valores representam a média ± erro padrão. Valores seguidos de letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Tabela 2 Taxas de germinação (após 30 dias) e de sobrevivência (após 370 dias) de *Comathera mucugensis* estabelecida inicialmente em meio nutritivo MS½ suplementado com extrato de *Agardhiella subulata* (AsE).

| Composição do meio | Taxa de germinação (%) | Taxa de sobrevivência (%) |
|--------------------|------------------------|---------------------------|
| MS½ (controle) | 100 ± 0 a | 100 ± 0 a |
| MS½ + 1 mg/mL AsE | 84,21 ± 8,59 ab | 94,11 ± 5,11 ab |
| MS½ + 2 mg/mL AsE | 73,68 ± 10,37 b | 64,28 ± 13,28 bc |
| MS½ + 3 mg/mL AsE | 75 ± 9,93 b | 92,85 ± 7,14 ab |
| MS ½ + 4 mg/mL AsE | 73,68 ± 10,37 b | 78,57 ± 11,38 b |

Valores representam a média ± erro padrão. Valores seguidos de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Tabela 3 Parâmetros de crescimento de *Comathera mucugensis* após 370 dias de estabelecimento inicial em meio nutritivo MS½ suplementado com extrato de *Agardhiella subulata* (AsE).

| Composição do meio | Comprimento da parte aérea (cm) | Número de raízes | Comprimento da maior raiz (cm) | Biomassa seca da parte aérea (mg) | Biomassa seca das raízes (mg) |
|--------------------|---------------------------------|------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| MS½ (control) | 3,35 ± 0,32 a | 11,06 ± 1,65 a | 3,66 ± 0,28 a | 57,09 ± 8,74 a | 3,35 ± 0,76 a |
| MS½ + 1 mg/mL AsE | 2,99 ± 0,32 a | 8,43 ± 0,89 a | 3,7 ± 0,27 a | 34,43 ± 6,38 ab | 1,84 ± 0,78 ab |
| MS½ + 2 mg/mL AsE | 1,66 ± 0,16 b | 2 ± 0,68 b | 3,25 ± 0,65 a | 20,76 ± 4,68 b | 0,13 ± 0,06 b |
| MS½ + 3 mg/mL AsE | 2,1 ± 0,18 b | 1,2 ± 0,57 bc | 2,24 ± 0,71 b | 29,05 ± 3,46 b | 0,075 ± 0,04 bc |
| MS½ + 4 mg/mL AsE | 1,07 ± 0,12 c | 0,4 ± 0,4 c | 1,83 ± 0,83 b | 20,14 ± 4,25 b | 0 ± 0 c |

Valores representam a média ± erro padrão. Valores seguidos de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Tabela 4 Formação de brotos em *Comathera mucugensis* após 370 dias de estabelecimento inicial em meio MS½ suplementado com extrato de *Agardhiella subulata* (AsE).

| Culture medium composition | Plants with shoots (%) | Number of shoots per plant |
|----------------------------|------------------------|----------------------------|
| MS ½ (control) | 20 ± 9,17 c | 2 ± 1 b |
| MS½ + 1 mg/mL AsE | 25 ± 11,18 bc | 1,5 ± 0,5 b |
| MS½ + 2 mg/mL AsE | 0 ± 0 d | - |
| MS½ + 3 mg/mL AsE | 50 ± 13,86 ab | 8,3 ± 3,41 a |
| MS½ + 4 mg/mL AsE | 64,28 ± 13,28 a | 7,3 ± 3,32 a |

Valores representam a média ± erro padrão. Valores seguidos de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Tabela 5 Produção de brotos a partir de microplantas de *Comathera mucugensis* após 160 dias de cultivo *in vitro* em meio MS ½ e MS ½ suplementado com extrato de *Hypnea pseudomusciformis* (HpE) e *Gracilaria* sp. (GrE).

| Composição do meio | Taxa de sobrevivência (%) | Plantas brotos (%) | Número de brotos por planta | Comprimento da parte aérea dos brotos (cm) | Comprimento da maior raiz dos brotos (cm) |
|--------------------|---------------------------|--------------------|-----------------------------|--|---|
| MS ½ (controle) | 70 ± 10,5 a | 85,71 ± 9,7 a | 6,83 ± 2,16 b | 1,05 ± 0,08 b | 1,93 ± 0,16 b |
| MS ½ + 1mg/mL HpE | 73,68 ± 10,37 a | 78,57 ± 11,38 a | 6,09 ± 1,51 b | 1,62 ± 0,11 a | 2,43 ± 0,17 a |
| MS ½ + 1mg/mL GrE | 68,42 ± 10,95 a | 76,92 ± 12,16 a | 14,9 ± 3,5 a | 0,97 ± 0,05 b | 1,78 ± 0,08 b |

Valores representam a média ± erro padrão. Valores seguidos de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados aqui demonstrados permitiram ampliar os estudos sobre o aproveitamento de extratos de macroalgas na cultura de tecidos vegetais utilizando espécies do litoral do Brasil antes não amostrado. Além disso, apresenta novos métodos de propagação e conservação *in vitro* de plantas. O crescimento mínimo de *Physalis peruviana* pode ser atingido através de protocolo alternativo de baixo custo com adição de extrato *Agardhiella subulata* ao meio nutritivo. A utilização de extrato de *Gracilaria* sp. e *A. subulata* no meio pode ser considerada uma potencial estratégia para aumentar a produção de brotos *in vitro* de *Comandra mucugensis*. Em geral, os extratos algáceos podem estimular ou inibir o crescimento dependendo da concentração utilizada no meio nutritivo. O mecanismo de ação por traz desses efeitos ainda é desconhecido. Recomenda-se que esforços sejam reunidos na caracterização bioquímica e molecular das respostas fisiológicas induzidas. Por fim, estimula-se a utilização de extratos de macroalgas na cultura de tecidos vegetais, devido seu potencial como biorregulador de crescimento, como uma alternativa a redução do uso excessivo de reagentes químicos de alto custo e não biodegradáveis, promovendo assim, um cultivo *in vitro* de plantas mais sustentável e menos dispendioso.