

Filipe Augusto da Silva Neves

Compostos bioestimulantes de macroalgas *Sargassum filipendula* e
Kappaphycus alvarezii para plantas vasculares

Tese apresentada como requisito a
obtenção do título de doutor em
Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias,
Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Leila Hayashi, Dra.
Coorientador: Marcelo Maraschin, Dr.

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Neves, Filipe Augusto da Silva
Compostos bioestimulantes de macroalgas
Sargassum filipendula e Kappaphycus alvarezii para
plantas vasculares / Filipe Augusto da Silva Neves
; orientadora, Leila Hayashi, coorientador,
Marcelo Maraschin, 2018.
117 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. agricultura. 3. extratos de
macroalgas. 4. bioestimulantes. I. Hayashi, Leila .
II. Maraschin, Marcelo . III. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Aquicultura. IV. Título.

Compostos bioestimulantes de macroalgas *Sargassum filipendula* e *Kappaphycus alvarezii* para plantas vasculares

Por

FILIPE AUGUSTO DA SILVA NEVES

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

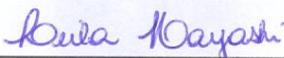
DOUTOR EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura.

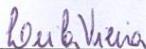


Profa. Leila Hayashi, Dra.
Coordenadora do PPG em Aquicultura

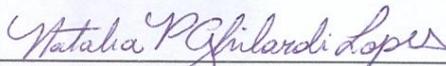
Banca Examinadora:



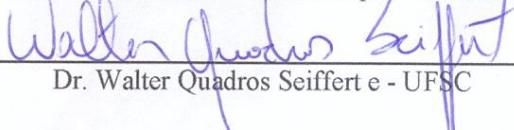
Dra. Leila Hayashi - *Orientadora*



Dra. Leila do Nascimento Vieira - UFPR



Dra. Natália Pirani Ghilardi-Lopes - UFABC



Dr. Walter Quadros Seiffert e - UFSC

À minha mãe, Olídia
Aos meus irmãos, Angelina, Rodolfo e Bruno
À minha esposa, Nicole
E em memória de meu pai, Damião

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Leila, pelo empenho em me ajudar, pela compreensão em diversas ocasiões, pelas horas dedicadas em explicações e correções, pelas ideias e dicas, pela confiança e crédito. Sou muito grato de ter tido você como minha mestra.

Ao meu co-orientador, Marcelo, por ter aceitado me co-orientar, pela ajuda com as análises de RMN e pelas diversas sugestões.

À minha esposa, Nicole, pelas diversas ajudas, como por exemplo, passar noites me ajudando a contar e medir o comprimento de raízes.

À Carmen e à Débora pela ajuda com os experimentos com rabanete.

À Fernanda Ramlov pela ajuda com análises de compostos fenólicos e flavonoides.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação.

Aos amigos e colegas de laboratório, Mari, Vitor, Fábio, Mathias, Fernando, Anna Gabi, Rodrigo, Luiza, Thallis, Clóvis, Evaldo, Alejandro, pela ajuda, pelos momentos de descontração e pela amizade. Provavelmente falta alguém nessa lista, desculpe-me a minha memória.

Aos amigos e colegas do laboratório no Canadá, Vanessa, Vinícius, Olívia, Fabiellen, Diego, Anne Sofie, Mahbobe e Celine, pelo companheirismo

Aos colegas de Pós-Graduação em Aquicultura, por terem compartilhado deste momento.

Aos funcionários, equipe técnica, colegas e demais envolvidos do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) pela convivência, pela disposição e ajuda.

Aos funcionários e demais envolvidos do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), pelo atendimento e concessão de uso de equipamentos necessários a execução deste trabalho.

Agradeço ainda aos todos os meus amigos que direta ou indiretamente, pessoalmente ou à distância, contribuíram para este momento.

Um agradecimento especial para os meus pais e irmãos, talvez mesmo não gostando de toda a minha ausência nestes quatro anos, me apoiaram.

Peço desculpas por algum possível esquecimento. Certamente, a realização deste trabalho conta com a participação de mais pessoas do que a minha memória me permite lembrar.

A todos os envolvidos, meus mais sinceros agradecimentos. Sua participação foi muito importante ao desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida durante todo o período de Doutorado, bem como no Doutorado sanduiche (MEC/MCTI/CAPES/CNPq/FAPs n° 71/2013).

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

“Quando acabar o maluco sou eu.”

Raul Seixas

RESUMO

O cultivo de macroalgas é um importante segmento da aquicultura. A maior parte das macroalgas produzidas é destinada à indústria alimentícia, porém, nos últimos anos, a utilização dessas como bioestimulantes para a indústria agrícola vem ganhando destaque. Isso se deve ao fato de extratos de macroalgas conterem uma grande quantidade de compostos bioativos que podem melhorar o desenvolvimento vegetal em suas diversas etapas do ciclo de vida, seja quando cultivados em condições ótimas, ou quando em condições de estresse. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de estimulação de plantas vasculares (*Arabidopsis thaliana* e rabanete *Raphanus sativus*) a partir do uso de extratos das macroalgas tropicais *Kappaphycus alvarezii* e *Sargassum filipendula*. O primeiro capítulo avaliou a produção de raízes e partes aéreas de *A. thaliana* após aplicação de extratos metanólicos de ambas as espécies de macroalgas cultivadas em diferentes condições. O segundo capítulo avaliou os efeitos de extratos aquosos obtidos sob pressão de ambas as macroalgas na germinação e crescimento do rabanete em estresse por alta temperatura. Foi observado que as concentrações mais baixas ($\leq 0,05$ mg mL⁻¹) dos extratos metanólicos estimularam o crescimento de raízes e parte aérea das plântulas de *A. thaliana*, ao passo que as concentrações mais altas ($\geq 0,10$ mg mL⁻¹) inibiram tais parâmetros. Ainda, observou-se que extratos metanólicos provenientes de macroalgas cultivadas em condições padrão de laboratório apresentaram maior potencial estimulatório nas plântulas e macroalgas cultivadas em diferentes condições apresentaram maior conteúdo de compostos fenólicos e de flavonóides. Além disso, os extratos provenientes dos tratamentos KP-padrão, KP-20°C, KP-AMPEP e SG-padrão apresentaram diferentes perfis de aminoácidos e substâncias relacionadas à estimulação de plantas vasculares, tais como a 4-hidroxiprolina, o ácido pipecólico e a cumarina. Com relação à extração aquosa obtida sob pressão, o rendimento foi avaliado para ambas as espécies. Posteriormente, os extratos foram testados em sementes de rabanete cultivadas em 25 °C e 35 °C, bem como em plantas cultivadas *outdoor* no verão. *K. alvarezii* rendeu três vezes mais extrato que *S. filipendula*, enquanto que o extrato de *S. filipendula* estimulou a germinação de sementes cultivadas em 35 °C em concentração cinco vezes mais baixa que o extrato de *K. alvarezii*. As análises demonstraram alterações morfológicas nas plântulas cultivadas em alta temperatura no entanto, não foi observada diferença no conteúdo de enzimas antioxidantes entre os tratamentos,

provavelmente por causa da presença de substâncias bioestimulantes nos extratos. Com base nos resultados observados, concluímos que os extratos metanólicos de ambas as espécies podem ser aproveitados na indústria agrícola em baixas concentrações (0,03 mg mL⁻¹ para *K. alvarezii* e 0,01 mg mL⁻¹ para *S. filipendula*), de preferência após aclimação das macroalgas por uma semana em laboratório previamente à produção dos extratos, pois é provável que a aclimação estabilizou os extratos. Ainda, extratos aquosos de ambas as espécies de macroalgas protegem as sementes em germinação dos efeitos do estresse por alta temperatura sem interferir no desenvolvimento posterior das plantas. Nesse contexto, as melhores concentrações foram de 0,05 mg mL⁻¹ para *K. alvarezii* e 0,01 mg mL⁻¹ para *S. filipendula*.

Palavras-chaves: aquicultura, agricultura, extratos de macroalgas, bioestimulantes

ABSTRACT

Seaweed cultivation is an important sector of aquaculture. While most of the seaweed production is destined to food industry, the utilization of seaweed biomass to produce biostimulants in agriculture has been growing in the last years. This fact is due to the seaweed composition, which may contain a wide range of bioactive compounds which can enhance the crop development in several stages of their life cycle in optimal farming conditions or under stress. The aim of this work was to evaluate the stimulation potential of tropical seaweeds *Kappaphycus alvarezii* and *Sargassum filipendula* extracts in *Arabidopsis thaliana* and radish *Raphanus sativus*. The first chapter evaluated the production of roots and aerial parts of *A. thaliana* plantlets after the application of methanolic extracts from both seaweeds species, previously cultivated in different conditions. In the second chapter, high pressurized aqueous seaweed extract from both seaweeds was tested on radish germination and growth under high temperature. Lower concentrations of methanolic extracts ($\leq 0.05 \text{ mg mL}^{-1}$) stimulated plant roots and aerial parts of *A. thaliana* plantlets, while higher concentrations ($\geq 0.10 \text{ mg mL}^{-1}$) inhibited those parameters. Moreover, the stimulatory effects was higher on plants after application of the methanolic extracts from seaweed previously cultivated under standard laboratory conditions and the phenolic and flavonoid content was higher in seaweeds cultivated under different conditions. Also, extracts from KP-padrão, KP-20°C, KP-AMPEP and SG-padrão presented different amino acid pattern as well as other compounds related to vascular plant stimulation, such as 4-hydroxylproline, pipercolic acid and coumarin. Regarding to high pressurized aqueous extract, the yield was evaluated for both seaweed species. After, those extracts were applied in radish seeds cultivated under 25 °C and 35 °C, as well as in plants cultivated outdoor in the summer. *K. alvarezii* yielded three times more extracts than *S. filipendula*, while *S. filipendula* extract stimulated the seed germination under 35 °C in concentrations five times lower than *K. alvarezii* extract. Microscopy analyzes showed morpho-histological alterations in plants cultivated in high temperature, although no difference was observed in antioxidant enzymes content among treatments, probably because of the bioactive compounds in the extracts. Based on the results, we concluded that the methanolic extracts of both species can be used in agricultural industry in low concentrations (0.03 mg mL^{-1} for *K. alvarezii* and 0.01 mg mL^{-1} for *S. filipendula*), preferably after a period of one-week acclimation in laboratory conditions before the extracts production

because the acclimation seems to stabilize the extracts. Also, seaweed aqueous extracts protect the seedlings from the effects of the high temperature stress without interfering in plants development. In this context, the best concentrations were 0.05 mg mL⁻¹ for *K. alvarezii* and 0.01 mg mL⁻¹ for *S. filipendula*.

Key words: aquaculture, agriculture, seaweed extracts, biostimulants

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Produção de mundial de macroalgas em biomassa e valor movimentado em dólares de 1950 a 2016 (FAO, 2018) 25
- Figura 2** Esquema do desenho experimental..... 50
- Figura 3** Comprimento linear de raízes de *Arabidopsis thaliana* tratadas por sete dias com 0,03 mg mL⁻¹ de extrato de *Kappaphycus alvarezii* (KP) e 0,01 mg mL⁻¹ de extrato de *Sargassum filipendula* (SG), e raízes não tratadas (c). As macroalgas foram cultivadas por sete dias em diferentes condições de temperatura antes da obtenção dos extratos. Os dados são apresentados em média ± intervalo de confiança de 95% (n=3). As letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos e o controle, de acordo com ANOVA unifatorial 57
- Figura 4** Número de raízes laterais produzidas por *Arabidopsis thaliana* após sete dias de tratamento com 0,03 mg mL⁻¹ de extrato de *Kappaphycus alvarezii* (KP) e 0,01 mg mL⁻¹ de extrato de *Sargassum filipendula* (SG), e plântulas não tratadas (c). As macroalgas foram cultivadas por sete dias em diferentes condições de temperatura antes da obtenção dos extratos. Os dados são apresentados em média ± intervalo de confiança de 95% (n=3). As letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos e o controle, de acordo com ANOVA unifatorial..... 58
- Figura 5** Número de raízes laterais produzidas por *Arabidopsis thaliana* após sete dias de tratamento com 0,03 mg mL⁻¹ de extrato de *Kappaphycus alvarezii* (KP) e 0,01 mg mL⁻¹ de extrato de *Sargassum filipendula* (SG), e plântulas não tratadas (c). As macroalgas foram cultivadas por sete dias em diferentes condições de nutrientes antes da obtenção dos extratos. Os dados são apresentados em média ± intervalo de confiança de 95%. As letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos e o controle, de acordo com ANOVA unifatorial..... 59
- Figura 6** Conteúdo de fenólicos totais e flavonoides de extratos obtidos de macroalgas cultivadas por sete dias em diferentes condições de cultivo. Valores são apresentados em média ± intervalo de confiança de 95%. As letras maiúsculas apresentam as diferenças

significativas nos compostos fenólicos totais e as minúsculas apresentam as diferenças no conteúdo de flavonoides.....60

Figura 7 Rendimento (% massa seca) de extratos de *Kappaphycus alvarezii* e *Sargassum filipendula* após extração aquosa de 2 h (= 1 h + 1 h) sob pressão de 100 psi. As barras de erro apresentam o intervalo de confiança de 95 % para três extrações de *K. alvarezii* (n = 3) e cinco extrações de *S. filipendula* (n = 5). As letras apresentam as diferenças entre as espécies segundo o teste t de student85

Figura 8 Porcentagem de sementes de rabanete germinadas por 48 h em duas temperaturas (25 °C e 35 °C) após o tratamento de imersão por 8 h em 4 concentrações de extratos de *Kappaphycus alvarezii* (0,01, 0,03, 0,05 e 0,10 mg mL⁻¹). Como controle, as sementes foram tratadas com água destilada. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%, as letras maiúsculas apontam as diferenças significativas (p < 0,05, n = 4) entre os grupos tratados com diferentes temperaturas e as letras minúsculas apontam as diferenças significativas entre os grupos tratados com as diferentes concentrações de extratos segundo o teste de ANOVA bifatorial e posterior teste de Tukey86

Figura 9 Porcentagem de sementes de rabanete germinadas por 48 h em duas temperaturas (25 °C e 35 °C) após o tratamento de imersão por 8 h em 4 concentrações de extratos de *Sargassum filipendula* (0,01, 0,03, 0,05 e 0,10 mg mL⁻¹). Como controle, as sementes foram tratadas com água destilada. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%, as letras maiúsculas apontam as diferenças significativas (p < 0,05, n = 4) entre os grupos tratados com diferentes temperaturas e as letras minúsculas apontam as diferenças significativas entre os grupos tratados com as diferentes concentrações de extratos segundo o teste de ANOVA bifatorial e posterior teste de Tukey87

Figura 10 Comprimento das radículas (cm) emitidas por plântulas de rabanete germinadas por 48 h em duas temperaturas (25 °C e 35 °C) após o tratamento de imersão por 8 h em 4 concentrações de extratos de *Kappaphycus alvarezii* (0,01, 0,03, 0,05 e 0,10 mg mL⁻¹). Como controle, as sementes foram tratadas com água destilada. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%, as letras maiúsculas apontam as diferenças significativas (p < 0,05, n = 4)

entre os grupos tratados com diferentes temperaturas e as letras minúsculas apontam as diferenças significativas entre os grupos tratados com as diferentes concentrações de extratos segundo o teste de ANOVA bifatorial e posterior teste de Tukey..... 88

Figura 11 Comprimento das radículas (cm) emitidas por plântulas de rabanete germinadas por 48 h em duas temperaturas (25 °C e 35 °C) após o tratamento de imersão por 8 h em 4 concentrações de extratos de *Sargassum filipendula* (0,01, 0,03, 0,05 e 0,10 mg mL⁻¹). Como controle, as sementes foram tratadas com água destilada. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%, as letras maiúsculas apontam as diferenças significativas (p < 0,05, n = 4) entre os grupos tratados com diferentes temperaturas e as letras minúsculas apontam as diferenças significativas entre os grupos tratados com as diferentes concentrações de extratos segundo o teste de ANOVA bifatorial e posterior teste de Tukey..... 89

Figura 12 Biomassa (g) da parte aérea de plantas de rabanete cultivadas por 30 dias outdoor. As plantas foram tratadas duas vezes (10° e 20° dia) com 100 mL de extratos *Kappaphycus alvarezii* e *Sargassum filipendula* em 4 concentrações (0,01, 0,03, 0,05 e 0,10 mg mL⁻¹). Como controle, as plantas foram tratadas com água destilada. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95% (n = 5)..... 90

Figura 13 Biomassa (g) das raízes tuberosas produzidas por plantas de rabanete cultivadas por 30 dias outdoor. As plantas foram tratadas duas vezes (10° e 20° dia) com 100 mL de extratos *Kappaphycus alvarezii* e *Sargassum filipendula* em 4 concentrações (0,01, 0,03, 0,05 e 0,10 mg mL⁻¹). Como controle, as plantas foram tratadas com água destilada. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95% (n = 5)..... 90

Figura 14 Secções transversais de raízes tuberosas de plântulas de rabanete tratados com azul de toluidina (ATO) após 48 horas de germinação em duas temperaturas. Plantas não tratadas (controle - c) em temperaturas de: a e b) 25 °C, c e d) 35 °C; plantas tratadas com 0,05 mg mL⁻¹ de extratos de *Kappaphycus alvarezii* (KP) em temperaturas de: e e f) 25 °C, g e h) 35 °C; plantas tratadas com 0,05 mg mL⁻¹ de extratos de *Sargassum filipendula* (SG) em temperaturas

de: i e j) 25 °C, (k e l) 35 °C. PC: parênquima cortical, CV: cilindro vascular e (*): epiderme91

Figura 15 Secções transversais de raízes tuberosas de plântulas de rabanete tratados com ácido periódico de Schiff (PAS) após 48 horas de germinação em duas temperaturas. Plantas não tratadas (controle - c) em temperaturas de: a e b) 25 °C, c e d) 35 °C; plantas tratadas com 0,05 mg mL⁻¹ de extratos de *Kappaphycus alvarezii* (KP) em temperaturas de: e e f) 25 °C, g e h) 35 °C; plantas tratadas com 0,05 mg mL⁻¹ de extratos de *Sargassum filipendula* (SG) em temperaturas de: i e j) 25 °C, (k e l) 35 °C. PC: parênquima cortical, CV: cilindro vascular, (*): epiderme, setas: de grãos de amido92

Lista de tabelas

- Tabela 1** Exemplos de produtos bioestimulantes formulados a partir de macroalgas..... 28
- Tabela 2** Número de folhas e raízes laterais, comprimento da raiz principal, linear de raízes e massa seca de plântulas de *Arabidopsis thaliana* após 7 dias de tratamento com seis concentrações (de 0,01 a 1,00 mg mL⁻¹) de extratos de *Kappaphycus alvarezii* e *Sargassum filipendula*. As plantas controle foram cultivadas com 10 µL L⁻¹ de metanol. Os valores são apresentados como média (n=3) ± intervalo de confiança de 95%. As letras “a” indicam os tratamentos que apresentaram estimulação, enquanto as letras “b” apresentam os tratamentos que apresentaram inibição, dos respectivos parâmetros comparados com o controle..... 56
- Tabela 3** Lista de metabolitos identificados por espectroscopia do 1H-NMR em extratos de *Kappaphycus alvarezii* (KP-padrão, KP-20°C e KP-AMPEP) e *Sargassum filipendula* (SG-padrão)..... 61
- Tabela 4** Conteúdo de proteínas e das enzimas anti-oxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (POX) em plântulas de rabanete (*Raphanus sativus*) em processo de germinação de 48 h. As sementes foram tratadas por 8 h de submersão em: 1) c – controle, água destilada; 2) KP – 0,05 mg mL⁻¹ de extrato de *Kappaphycus alvarezii*; e 3) SG – 0,05 mg mL⁻¹ de extrato de *Sargassum filipendula*. Valores apresentados em média ± intervalo de confiança de 95% (n = 4) 93

LISTA DE ABREVIÇÕES

- ¹³C-NMR: Ressonância Magnética Nuclear do carbono-13
¹H-NMR: Ressonância Magnética Nuclear do próton
ANOVA: Análise de Variância
AMPEP: extrato comercial da macroalga parda *Ascophyllum nodosum*
ATO: azul de toluidina
BFT: Biofloc Technology, sigla usada para designar a água de cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* em sistema de biofloco
CAT: catalase
Col-0: *Arabidopsis thaliana* var. columbia tipo selvagem
CV: cilindro vascular
DTT: ditioteitrol
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
FAO: Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência
IPCC: Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas
KP: *Kappaphycus alvarezii*
LCM: Laboratório de Camarões Marinhos
LMBV: Laboratório de Morfologia e Bioquímica Vegetal
NBT: cloreto de azul nitrotetrazólio
PAS: ácido periódico de Schiff
PC: parênquima cortical
PMFS: fenilmetilsulfonil fluoreto
POX: guaiacol peroxidase
PVP-40: polivinilpirrolidona
ROS: espécies reativas de oxigênio
SG: *Sargassum filipendula*
SM-At: meio padrão de cultivo de *Arabidopsis thaliana*
SOD: superóxido dismutase
TMS: tetrametilsilano
Triton X-100: polietilenoglicol terc-octilfenil eter
UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	25
1.1 Utilização de macroalgas como bioestimulante de plantas vasculares.....	26
1.2 Substâncias reguladoras do crescimento vegetal	28
1.2.1. Fitormônios.....	29
1.2.2. Outras substâncias bioativas em extratos de macroalga ...	32
1.3. <i>Kappaphycus alvarezii</i>	35
1.4. <i>Sargassum filipendula</i>	36
1.5. Modelos vegetais	37
1.5.1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
1.5.2. Rabanete	37
2. OBJETIVO GERAL	39
2.1. Objetivos Específicos.....	39
3. FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS.....	39
CAPÍTULO 1	41
Análise da estabilidade de extratos de macroalgas com potencial para agricultura frente a condições ambientais adversas.....	41
Resumo	43
Abstract.....	45
Introdução	47
Material e Métodos	49
Cultivo das Macroalgas em diferentes condições.....	50
Preparação dos extratos	51
Experimentos com <i>A. thaliana</i>	51
Dose-resposta de extratos de macroalgas em <i>A. thaliana</i>	52
Efeitos dos extratos de macroalgas cultivadas em diferentes condições sobre a produção de raízes de <i>A. thaliana</i>	52
Análise quantitativa de compostos fenólicos e flavonoides totais dos extratos	52
Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do próton (¹ H-NMR).....	53
Análise de Dados e Estatística.....	54
Resultados.....	54
Dose resposta de extratos de macroalgas em <i>A. thaliana</i>	54
Efeitos dos extratos de macroalgas cultivadas em diferentes condições sobre a produção de raízes de <i>A. thaliana</i>	57
Análise quantitativa de compostos fenólicos e flavonoides totais contidos nos extratos.....	59

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do próton (¹ H-NMR)	60
Discussão	62
Referências Bibliográficas	67
CAPÍTULO 2	73
Efeitos de extratos de <i>Kappaphycus alvarezii</i> e <i>Sargassum filipendula</i> na germinação de rabanete (<i>Raphanus sativus</i>) em alta temperatura.....	73
Resumo	75
Abstract.....	77
Introdução.....	79
Material e Métodos	80
Germinação de sementes de rabanete.....	81
Desenvolvimento de plantas cultivadas outdoor	81
Análise morfo-histológica	82
Análise de enzimas anti-oxidantes	82
Análise de Dados e Estatística	83
Resultados.....	84
Rendimento dos extratos	84
Germinação de sementes de rabanete.....	85
Desenvolvimento de plantas cultivadas outdoor	89
Análises morfo-histológicas e de enzimas antioxidantes	91
Discussão.....	93
Referências Bibliográficas.....	96
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101
5. CONCLUSÃO GERAL.....	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL	107

1. INTRODUÇÃO GERAL

O cultivo de macroalgas é uma atividade de grande importância comercial e estima-se que mais de um quarto da produção de organismos aquáticos é proveniente desta atividade. Em 2016, mais de 29 milhões de toneladas de macroalgas foram produzidas, as quais foram responsáveis pela movimentação de cerca de US\$ 10,8 bilhões. O crescimento da atividade segue em exponencial desde o início dos registros de produção, em 1950 (Fig. 1) (FAO, 2018).

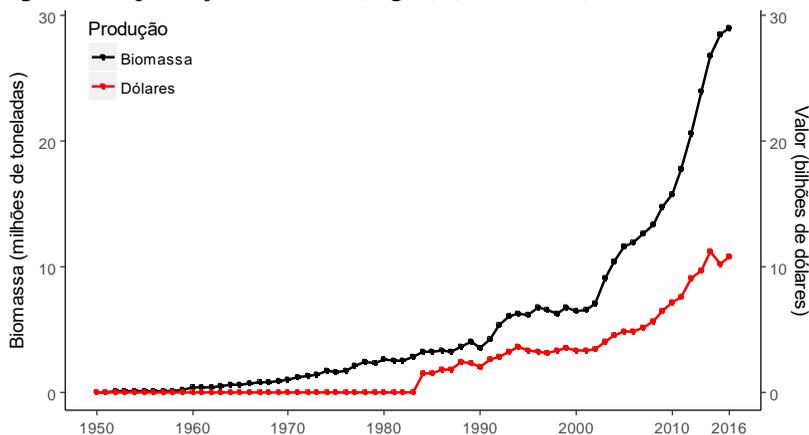


Figura 1 Produção de mundial de macroalgas em biomassa e valor movimentado em dólares de 1950 a 2016 (FAO, 2018)

As macroalgas são tradicionalmente consumidas em países orientais com finalidade alimentícia, o que ajuda a explicar o fato da maior parte da produção ocorrer em países como a China, Coréia, Filipinas, Indonésia e Japão. Atualmente, são produzidas em ampla variedade de formatos, tais como frescas, secas, em pó ou flocos, extratos líquidos, salgadas ou enlatadas. Além destes usos, as macroalgas são utilizadas como aditivos alimentares, para formulação de nutracêuticos, medicamentos, cosméticos, biocombustíveis, fertilizantes e bioestimulantes para a indústria agrícola (Buschmann, 2017). No entanto, a maior parte da biomassa obtida é destinada a indústria alimentícia e para suprir a demanda de ficocolóides (FAO 2016).

Dentre as aplicabilidades da biomassa de macroalgas descrita acima, a produção de insumos para a agricultura tem se destacado. A

utilização de macroalgas como fertilizante e melhorador de solo para a agricultura remonta a longa data. Há relatos em que, na Europa, as macroalgas pardas arribadas ou coletadas nas marés baixas eram misturadas ao solo para fertilizar plantações situadas próximas aos costões rochosos onde eram coletadas. Dentre as espécies mais comumente utilizadas estão as dos gêneros *Ascophyllum*, *Ecklonia*, *Fucus*. e *Sargassum*. (FAO 2003). Foi observado ainda que extratos de macroalgas podiam melhorar o desenvolvimento vegetal mesmo em pequenas concentrações (na ordem de micro ou nano molar), questionando se os efeitos na agricultura era apenas ação de macro e micronutrientes atuando como fertilizantes ou se os extratos apresentavam compostos bioestimulantes (YAKHIN, et al. 2017).

Desde a década de 1970, sabe-se que extratos de macroalgas contém fitormônios capazes de melhorar o desempenho agrícola. Além desses, outros compostos identificados podem desempenhar um importante papel na estimulação do desenvolvimento vegetal, tais como ácidos graxos, polissacarídeos, esteróides, pigmentos e polifenóis (CHOJNACKA, et al. 2012). Tais compostos administrados em baixas concentrações nas plantas vasculares podem influenciar seu desenvolvimento, aumentando as taxas de germinação (LATIQUE, et al. 2014), estimulando a produção de folhas e raízes (AREMU, et al. 2015; RAYORATH, et al. 2008), promovendo o crescimento e produção (SASIKALA, et al. 2016) ou desencadeando processos sistêmicos de resistência adquirida (MANSORI, et al. 2016; JAYARAJ, et al. 2008).

1.1 Utilização de macroalgas como bioestimulante de plantas vasculares

Diversos trabalhos demonstraram os efeitos de extratos de macroalgas em plantas vasculares. Por exemplo, AREMU et al. (2015) observaram que compostos fenólicos extraídos da macroalga parda *Ecklonia maxima* (Osbeck) Papenfuss quando aplicados *Eucomis autumnalis* (Mill.) Chitt induziram o crescimento de raízes e partes aéreas. De forma similar, extratos das macroalgas vermelhas *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex Silva e *Gracilaria edulis* (S. G. Gmelin) P. C. Silva foram efetivas no aumento da produtividade e qualidade de grãos de arroz (*Oryza sativa* L.) (LAYEK; et al., 2018). Ainda, plantas de milho (*Zea mays* L.) responderam ao tratamento com extratos de *K. alvarezii*, produzindo mais espigas e com melhor qualidade do que quando comparado com plantas não tratadas (MONDAL; et al., 2015) e extratos de *Sargassum tenerrimum* J.Agardh

melhoraram a germinação, crescimento e produção de tomateiros (*Solanum lycopersicum* L.) (SASIKALA; et al., 2016).

Além dos efeitos em plantas cultivadas em condições ótimas, alguns autores observaram que extratos de macroalgas tem a capacidade de proteger plantas vasculares crescidas em condições subótimas, sob efeito de estresses abióticos. Desta forma, ROUPHAEL et al. (2017) observaram que plantas de abobrinha (*Cucurbita pepo* L.) cultivadas com concentrações crescentes de cloreto de sódio (NaCl) apresentaram decréscimo de parâmetros fitotécnicos, morfológicos e anatômicos. No entanto, quando elas foram tratadas via spray foliar com extratos de *E. maxima*, estas apresentaram recuperação parcial dos parâmetros analisados. STANIELLO et al. (2017) observaram que extratos de *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jollis em *A. thaliana* podem reduzir o estresse por ressecamento, uma vez que estes alteram a expressão de genes envolvidos na resposta ao ácido abscísico, sinalizando o fechamento dos estômatos e reduzindo a perda de água pela evapotranspiração. Estes autores observaram ainda que as plantas apresentaram melhor desempenho fotossintético após o tratamento.

Devido a estes e outros efeitos que os extratos de macroalgas apresentam em plantas, diversos produtos bioestimulantes tem sido disponibilizados no mercado (Tab. 1).

Esse recente investimento das empresas de bioestimulantes em produtos à base de macroalgas é atribuída a sua composição química complexa. Apesar desta composição variar dependendo da espécie, estação e habitat, sua constituição principal inclui proteínas, lipídeos, carboidratos, compostos fenólicos, vitaminas e sais minerais (MACARTAIN, et al. 2007; MARINHO-SORIANO, et al. 2006). Cerca de 70 a 90% da biomassa de macroalgas é composta de água e, em sua massa seca, observa-se de 10 a 75% de carboidratos, 0,7 a 12% de lipídeos e 13 a 84% de minerais. Seu conteúdo proteico pode variar de 3 a 50% e apresenta grande quantidade de aminoácidos (NUNES, et al. 2017; HARNEDY; FITZGERALD, 2011, HONG; HIEN; SON, 2007; FLEURENCE, 1999). Esses compostos apresentam atividade estimulatória quando administrados em outros organismos, podendo-se dizer que são bioestimulantes (YAKHIN, et al. 2017).

Tabela 1 Exemplos de produtos bioestimulantes formulados a partir de macroalgas

Produto	País	Espécie	Forma comercial
Acadian	Canadá	<i>Ascophyllum nodosum</i>	líquido e pó
Alg-A-Mic	Estados Unidos	<i>Ascophyllum nodosum</i>	líquido
AgroKelp	Estados Unidos	<i>Macrocystis pyrifera</i>	líquido
Empathy all purpose	Reino Unido	não especificado	líquido
Espoma	Estados Unidos	alga parda não-especificada	granulado
Kelpak	África do Sul	<i>Ecklonia maxima</i>	líquido
Kelp Meal	Canadá	<i>Ascophyllum nodosum</i>	pó
Heromar	Espanha	<i>Ascophyllum nodosum</i>	líquido
Maxicrop	Estados Unidos	<i>Ascophyllum nodosum</i>	líquido e pó
Nitrozime	Estados Unidos	<i>Ascophyllum nodosum</i>	líquido
Plant Biovita	Índia	<i>Ascophyllum nodosum</i>	granulado
Profert	Chile	<i>Durvillaea antarctica</i>	líquido
Seasol	Austrália	<i>Durvilea potatorum</i>	líquido
SeaWeed Fe	China	não especificado	líquido
Stimplex	Canadá	<i>Ascophyllum nodosum</i>	líquido

1.2 Substâncias reguladoras do crescimento vegetal

Hormônios vegetais ou fitormônios são compostos orgânicos sintetizados em uma parte da planta que, em concentrações muito baixas podem desencadear respostas fisiológicas de estimulação ou inibição, muitas vezes em resposta a algum fator ambiental. Outras substâncias com atividade semelhante à dos fitormônios, mas que não se enquadram nesta categoria, ou seja, íons, compostos sintéticos ou compostos produzidos por outros organismos que não seja a planta em questão, são classificados como fitorreguladores (BUCHANAN, GRUISSEM, JONES 2000; HARBORNE 1998; SALISBURY, ROSS 1992). Diversos trabalhos levantaram a hipótese de que a principal causa dos efeitos estimulatórios observados em plantas tratadas com extratos de algas é proveniente da presença de hormônios vegetais em tais extratos.

Nove grupos de hormônios vegetais são reconhecidos: auxinas, citocininas, giberelinas, strigolactonas, brassinosteróides, ácido abscísico, ácido jasmônico, ácido salicílico e etileno (BUCHANAN, GRUISSEM, JONES 2000; TAIZ, ZEIGER, MURPHY 2017; ZWANENBURG, BLANCO-ANIA 2018), embora outras substâncias tenham demonstrado atividade hormonal e estejam sob investigação como estigmasterol (BOUVIER-NAVÉ, et al. 2010), óxido nítrico (ASGHER, et al. 2017), peptídeos (HIRAKAWA, TORII, UCHIDA 2017), poliaminas (BUCHANAN, GRUISSEM, JONES 2000), karrikinas (WALTERS 2017), triacontanol (WAQAS; et al., 2016), betaínas (CHOJNACKA; et al., 2012) entre outros. Dentre os hormônios vegetais e fitoreguladores vegetais, diversos foram identificados em macroalgas, conforme descrito abaixo.

1.2.1. Fitormônios

Auxinas são fitormônios amplamente distribuídos em plantas vasculares e são sintetizados nos ápices das plantas terrestres. Atuam na estimulação da formação e inibição do alongamento das raízes (BUCHANAN, GRUISSEM, JONES 2000; SALISBURY, ROSS 1992). A presença de auxinas em extratos de macroalgas data da década de 1980, quando SANDERSON, JAMESON, ZABKIEWICZ (1987) observaram a presença de ácido indolilacético em um extrato comercial obtido a partir de *A. nodosum*. Desde então, outros autores observaram auxinas em macroalgas (CROUCH; VAN STADEN, 1991) no entanto, sua origem ainda não está clara. Apesar de serem encontrados em algas vermelhas, nestas não foram encontrados genes homólogos das vias biossintéticas de produção do ácido acético, o que indica que as algas vermelhas ou produzem tais hormônios por vias biossintéticas diferentes das plantas vasculares, ou obtêm tais hormônios de forma exógena (MORI, et al. 2017). Em algas pardas, ao contrário, diversos genes homólogos foram observados (MORI, et al. 2017; LE BAIL, et al. 2010).

As citocininas estão relacionadas à divisão, expansão e diferenciação celular em combinação com auxinas, e redução do processo de senescência em vegetais (BUCHANAN, GRUISSEM, JONES 2000; SALISBURY, ROSS 1992). Em macroalgas, foram observadas pela primeira vez na fração metanólica de extratos de *Laminaria digitata* por meio de técnicas cromatográficas (HUSSAIN; BONEY, 1969). Posteriormente, TAY et al. (1985) constataram a presença de trans-zeatina e derivados em extrato comercial de *Durvillea*

potatorum (Labillardière) Areschoug, conhecido como Seasol. Outros trabalhos mais recentes também observaram a presença de citocininas em macroalgas (STIRK; VAN STADEN, 1997; PRASAD; et al., 2010).

Giberelinas são fitormônios que promovem o alongamento de partes aéreas de plantas em seu estado natural, ao contrário das auxinas, que promovem o alongamento de explantes de plantas. Além disso, a promoção da floração, da iniciação da germinação de sementes em estágio de dormência, a mobilização de nutrientes e minerais em plântulas em estágio de germinação, o desenvolvimento de frutos partenocárpicos e a indução de estado de vernalização também são estimulados por giberelinas (SALISBURY, ROSS 1992). O primeiro registro observado de giberelinas em macroalgas data de 1965, quando MOWAT (1965) observou 2 a 20 µg de giberelina por kg de massa seca de *Fucus spiralis* L. após extração acetônica. Recentemente, STIRK et al. (2014) relataram ter observado 0,05 a 696,83 pg mg⁻¹ de giberelinas por massa seca do extrato comercial de *E. maxima*, conhecido como Kelpak. Apesar de alguns autores atribuírem às giberelinas papel de bioestimulante em plantas vasculares (WANG; et al. 2017, STIRK; et al. 2014), essa atuação está em discussão. MONDAL et al. (2015) testaram extratos brutos com e sem giberelinas (extraídas com éter por PRASAD, et al. 2010) da macroalga vermelha *K. alvarezii* em plantas de milho (*Zea mays* L.). Os autores relataram que plantas tratadas com extratos livres de giberelinas apresentaram melhor desempenho do que aquelas tratadas com extratos brutos e concluíram que as giberelinas atuaram possivelmente anulando os efeitos positivos das citocininas.

O ácido abscísico é conhecido desde meados da década de 1950, e seus efeitos em plantas foram descritos em 1965 (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000). Sua atividade em plantas inclui a redução da resistência vegetal frente a patógenos, a adaptação de plantas às condições ambientais e a indução do fechamento de estômatos (MAUCH-MANI; MAUCH, 2005). Sua presença em macroalgas é relatada em *Enteromorpha compressa* (L.) Nees por NIEMANN; DORFFLING (1980), BOYER; DOUGHERTY (1988) e em *Ecklonia maxima* por STIRK; et al., (2014).

O ácido salicílico (SA) é um composto fenólico de baixo peso molecular, comparado aos polifenóis. Sua bioatividade em vegetais ainda não é bem compreendida, no entanto, algumas atividades regulatórias específicas têm sido descritas em plantas vasculares, como por exemplo, reguladora da termogênese em flores de lírio-vudu *Sauromatum guttatum* (sin. *Typhonium venosum* (Dryand. ex Aiton) Kunth) (BUCHANAN, GRUISSEM, JONES 2000). Ainda, há indícios

de que a administração de ácido salicílico em plantas de tabaco (*Nicotiniana tabacum* L.) levam-nas a produzirem proteínas relacionadas à infestação por patógenos e induziu processos de resistência adquirida nas plantas, reduzindo a lesão causada pelo vírus do mosaico do tabaco (RASKIN, 1992). Poucos trabalhos apresentam o conteúdo de ácido salicílico em macroalgas, no entanto, GUPTA et al. (2011) analisaram, por meio de técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), o conteúdo de fitormônios em seis espécies de algas verdes e observaram a presença de ácido salicílico em todas as amostras. Da mesma forma, NOVOA et al. (2011) observaram o ácido em amostras da macroalga verde *Halimeda incrassata* (J.Ellis) J.V.Lamouroux.

O ácido jasmônico e o ácido metil-jasmônico foram inicialmente identificados como inibidores de crescimento vegetal em 1980 (BUCHANAN, GRUISSEM, JONES 2000). Sua atividade em plantas vasculares é de inibição do crescimento em plantas sob o ataque de insetos, como forma de defesa do vegetal (VIJAYAN; et al., 1998). A presença de ácido jasmônico em macroalgas é relatada em gametófitos de *Chondrus crispus* Stackhouse (BOUARAB; et al., 2004) e em talos de *Gelidium latifolium* (sin. *Gelidium spinosum* (S.G.Gmelin) P.C.Silva) (KRUPINA; DATHE, 1991).

Os brassinosteróides são fitormônios esteroidais que foram isolados de extratos de pólen de colza (*Brassica napus* L.) em 1960 (BUCHANAN, GRUISSEM, JONES 2000). Estimulam o alongamento e divisão celular, o desenvolvimento de tecidos vasculares e a polarização da membrana e bomba de prótons, a aceleração do processo de senescência de folhas e cotilédones, bem como atuam em resposta ao estresse biótico e abiótico (CLOUSE; SASSE, 1998). STIRK; et al. (2014) relatam terem detectado dois tipos de brassinosteróides, o brassinolídeo e a castasterona em extratos de *E. maxima*, assim como no extrato comercial da alga, o Kelpak.

Com relação ao etileno e às estrigolactonas, o primeiro é um fitormônio de natureza gasosa é descrito como forte indutor de senescência em folhas, flores e frutos de plantas vasculares, e o segundo são fitormônios amplamente distribuídos entre os plantas vasculares e atuam na inibição da ramificação de raízes adventícias e laterais e promoção da formação de pelos absorventes, bem como promovem interações simbióticas na rizosfera entre fungos e plantas. A única evidência observada da presença de etileno em macroalgas foi relatada por CROUCH; VAN STADEN; et al. (1993) em *Acetabularia* sp., ao

passo que as estrigolactonas não foram identificadas em macroalgas até o presente.

1.2.2. Outras substâncias bioativas em extratos de macroalgas

Estudos recentes demonstram uma grande quantidade de substâncias apresentando bioatividade em plantas vasculares, sendo que a cada dia surgem mais evidências. Dentre tais substâncias, diversas são encontradas em macroalgas e seus subprodutos, conforme descrito abaixo.

Macroalgas são conhecidas por conterem diferentes tipos de carboidratos estruturais e de reserva, distintos daqueles encontrados em plantas vasculares (LEE, 2008), sendo que alguns desses carboidratos têm apresentado resposta bioestimulante em plantas vasculares. Carragenanas são carboidratos estruturais de alto peso molecular encontrados em diversas macroalgas vermelhas. Alguns trabalhos demonstraram que tanto as carragenanas quanto as frações obtidas de sua hidrólise apresentam bioatividade, desencadeando processos de resistência adquirida em plantas. ARMAN e QADER (2012) testaram a fração purificada de extratos de *Hypnea musciformis* que continha alto peso molecular (> 70 KDa) formada por principalmente κ -carragenana, em cotilédones de ervilhas (*Pisum sativum* L.) e grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.). Esses autores observaram que a κ -carragenana desencadeia o processo de defesa a patógenos. Além disso, oligossacarídeos de baixo peso molecular (entre 1,2 e 4,3 KDa) derivados da despolimerização das carragenanas de *K. alvarezii*, *Chondrus armatus* (Harvey) Okamura e *Tichocarpus crinitus* (S.G.Gmelin) Ruprecht apresentam atividade antiviral contra o vírus mosaico do tabaco (KALITNIK; et al., 2013).

Além de carboidratos, macroalgas são ricas em aminoácidos. HONG, HIEN e SON (2007) analisaram os aminoácidos de nove espécies de macroalgas do Vietnã e identificaram 18 dos 20 aminoácidos proteinogênicos. Além de poderem servir de fonte de nitrogênio (GANETEG; et al. 2017), há indícios de que aminoácidos tem bioatividade em plantas vasculares (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008; HOQUE; et al., 2007; OKUMA; et al., 2004; RAI, 2002). Talos de macroalgas também podem conter uma série de aminoácidos incomuns e não-proteinogênicos, tais como o ácido aminoglúterico e ácido domóico (*Chondria armata* (Kützinger) Okamura), ácido caínico (*Digenea simplex* (Wulfen) C.Agardh), gongrina e gigartinina (*Gymnogongrus flabelliformis* = *Ahnfeltiopsis flabelliformis* (Harvey)

Masuda), laminina (*Laminaria angustata* = *Saccharina angustata* (Kjellman) C.E.Lane), metil e dimetilhistidina (*Phyllospora comosa* (Labillardière) C.Agardh), ornitina, citrulina, ácido pipercolico e ácido γ -aminobutírico (diversas espécies), entre outros (SCHEVER, 1980). Dentre os supracitados, alguns tipos foram observados por apresentarem bioatividade em plantas. Por exemplo, o ácido pipercolico demonstrou atuar sinergicamente por mecanismos dependentes e independentes, com o ácido salicílico em plantas de *A. thaliana* durante a infestação com *Pseudomonas syringae* van Hall. Os autores relatam que a aplicação exógena de ácido pipercolico complementa lacunas de resistência nas plantas (BERNSDORFF; et al., 2016). Ainda, REZAEI-CHIYANEH; et al. (2018) relatam que a aplicação de ácido γ -aminobutírico estimula o crescimento de plantas de cuminho negro (*Nigella sativa* L.) quando cultivadas sob condições de estresse. Outro grupo de aminoácidos encontrado em macroalgas (WITE; et al., 2015; CROUCH; VAN STADEN, 1993) tem despertado interesse por estimular plantas vasculares, os aminoácidos N-metilados, ou betaínas. Há evidências de que células de tabaco apresentam menor inibição do crescimento quando cultivadas em condições de alta salinidade após aplicação de 20 mM de betaína (OKUMA; et al., 2004).

Com relação aos lipídeos, não foram observados trabalhos nos quais os autores consideraram aplicar diretamente em plantas vasculares, no entanto NAIR et al. (2012) aplicaram frações lipofílicas contendo ácidos graxos e esteróides do extrato comercial AMPEP de *A. nodosum* em plântulas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh e relataram que as plântulas apresentaram menos danos ao estresse por frio.

Outro grupo de substâncias presentes nas macroalgas são as poliaminas, que são compostos nitrogenados de baixo peso molecular encontrados em grande quantidade (na ordem de milimolar) em todos os seres vivos. Em plantas, estão relacionadas à divisão celular e estimulação da síntese de ácidos nucléicos, transcrição de genes, desenvolvimento de órgãos, desenvolvimento de frutos, senescência foliar e resposta ao estresse abiótico (KAUR-SAWHNEY; et al., 2003; BUCHANAN, GRUISSEM, JONES 2000). Sua presença em macroalgas está documentada por BADINI; PISTOCCHI; BAGNI (1994) que observaram putrescina, espermindina e espermina em talos de *Ulva rigida* C.Agardh em concentrações de 6 a 239 pmol cm⁻², quantidade significativamente inferior aos níveis encontrados em plantas vasculares. LEE (1998) também observou a presença destas poliaminas em talos de sete espécies de Chlorophyta por meio de técnicas de HPLC. Ainda, MARIÁN; GARCÍA-JIMÉNEZ; ROBAINA (2000) observaram

que a macroalga parda *Dyctiota dichotoma* (Hudson) J.V.Lamouroux, e as macroalgas vermelhas *Gelidium canariensis* (Grunow) Seoane-Camba ex Haroun, Gil-Rodríguez, Díaz de Castro & Prud'homme e *Grateloupia doryphora* (Montagne) M.Howe, continham níveis de poliaminas em quantidades comparáveis às plantas vasculares.

Macroalgas também são ricas em compostos fenólicos, substâncias essas que apresentam atividade antioxidante e, como consequência, estimulam o crescimento de raízes e podem desencadear processos sistêmicos de resistência adquirida, assim como atuam inibindo a herbivoria e epifitismo (CHOJNACKA; et al, 2012; NOVOA; et al, 2011).

Por fim, uma série de compostos são descritos em macroalgas, tais como peptídeos (HARNEDY; FITZGERALD, 2011), carotenoides e outros pigmentos (NUNES; et al. 2017; VERMA; et al., 2017), vitaminas (FERRACES-CASAI; et al., 2012), esteróides (KENDEL; et al. 2015), terpenos (BLUNT; et al., 2016; OLIVEIRA; et al., 2015), rodomorfinas (TARAKHOVSKAYA; MASLOV; SHISHOVA, 2007), entre outros. Tais compostos podem atuar isoladamente ou em sinergia/antagonia entre si, estimulando ou inibindo o crescimento de plantas vasculares.

No entanto, conforme demonstrado por WEI, et al. (2016) na macroalga vermelha *Pyropia haitanensis* (T.J.Chang & B.F.Zheng) N.Kikuchi & M.Miyata, o perfil metabólico de macroalgas é alterado de acordo com o período em que são colhidas, o que indica que sua composição pode ser afetada pelas condições em que vivem. Desta forma, alterações nas condições de cultivo das macroalgas, tais como temperatura, salinidade e regime de nutrientes, podem acarretar em alterações do seu potencial bioestimulante de plantas vasculares. A exemplo disso, foi demonstrado por LIU et al. (2014) que altas temperaturas podem ser uma sinalização ambiental que leva à estimulação de genes que codificam compostos do sistema fotossintético, proteínas, lipídeos de membrana e carboidratos estruturais em indivíduos da macroalga parda *Saccharina japonica* (Areschough) C.E.Lane, C.Mayes, Druehl & G.W.Saunders. Ainda, DITTAMI et al. (2011) observaram que indivíduos da macroalga parda *Ectocarpus siliculosus* (Dillwyn) Lyngbye respondem ao estresse hipo e hipersalino, acumulando manitol, prolina e o ácido γ -aminobutírico (GABA) em seus tecidos, assim como trocam ácidos graxos de n-3 para n-6. Com relação ao regime de nutrientes, ZUBIA, FREILE-PELEGRÍN e ROBLEDO (2014) observaram que altas cargas de nutrientes, associados a alta luminosidade, induzem talos da macroalga vermelha

Gracilariopsis tenuifrons (C.J.Bird & E.C.Oliveira) a produzirem e acumularem clorofila e carotenoides, bem como a consumirem seu conteúdo de ficoeritrinas e ficocianinas. De maneira similar, talos de *K. alvarezii* cultivados após a fertilização com o composto bioestimulante produzido a partir da macroalga parda *Ascophyllum nodosum* (AMPEP) em associação com a água do cultivo de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei* L.) em sistema de biofoco (BFT) apresentaram maior conteúdo de carotenoides, além de alterações no conteúdo de compostos fenólicos e de flavonoides (PEDRA, et al. 2017). BFT é um sistema de cultivo que utiliza bactérias heterotróficas e quimiotróficas para assimilar e reciclar nutrientes, tais como o nitrogênio e o fósforo, melhorando a qualidade de água e tornando a água de cultivo mais fértil para o crescimento de macroalgas (PEDRA, et al.; 2017).

Existe claramente um potencial da utilização de macroalgas e seus subprodutos como bioestimulantes na agricultura, já explorado por algumas empresas ao redor do mundo. No entanto, a necessidade de encontrar uma espécie cuja produção no Brasil seja viável para a implementação desta atividade é destacada. Entre as possibilidades, estão *Kappaphycus alvarezii* ou espécies do gênero *Sargassum*, tal como *Sargassum filipendula* C.Agardh.

1.3. *Kappaphycus alvarezii*

Kappaphycus alvarezii é uma macroalga vermelha (Divisão Rhodophyta) nativa da região das Filipinas e Indonésia (BUSCHMANN, 2017). Atualmente, junto com espécies do gênero *Eucheuma*, são responsáveis pela maior parte da biomassa macroalgácea produzida no mundo. Em 2018, foram produzidas 12,260 milhões de toneladas (FAO, 2018) sendo que o principal destino dessa produção é para a extração de carragenana, um colóide requisitado em diversas indústrias, como a alimentícia, a têxtil e a de cosméticos, devido a sua capacidade espessante (BIXLER; PORSE, 2011).

O sucesso comercial da espécie é baseado na sua rusticidade, alta produção em regiões tropicais, baixa exigência de tecnologia de cultivo, baixo impacto ambiental, além de ser compatível com outras atividades de aquicultura e pesca, gerando emprego e renda em áreas com população de baixa renda (PICKERING, 2006). Devido a essas características, somado ao fato do Brasil depender quase que exclusivamente da importação para obtenção de carragenana, a espécie foi introduzida no país em 1995 em Ubatuba - SP, a partir de um talo proveniente do 'Usa' Marine Institute da Universidade de Kochi, no

Japão (PAULA, PEREIRA, OHNO 1999). Em 2004, a espécie foi introduzida comercialmente na Baía de Sepetiba – RJ (CASTELAR, REIS, BASTOS 2009), e em 2008 em Florianópolis – SC, com finalidade experimental (HAYASHI, et al. 2011).

Apesar dos esforços iniciais em implementar o cultivo comercial no país, hoje a produção da espécie é incipiente, contribuindo com aproximadamente 700 toneladas em 2016 (FAO, 2018). Esse fato é decorrente de diversos fatores discutidos por REIS, CASTELAR, SANTOS (2017), dentre os quais, a necessidade de se investir em estudos de promoção de tecnologia e inovação de novos produtos a partir da biomassa macroalgácea.

1.4. *Sargassum filipendula*

Sargassum é um gênero de macroalgas pardas (classe Phaeophyceae), cujas plantas são formadas basicamente por um apressório, eixos principais e ramos laterais primários com ramos laterais laminares, podendo possuir flutuadores (PAULA, 1988). O gênero é considerado o mais comum dentre as macroalgas pardas encontrado em águas temperadas, subtropicais e tropicais no mundo (KIM, et al. 2017). Os espécimes do gênero formam importantes coberturas densas nos costões rochosos principalmente na região Sudeste e Sul do Brasil e entre as principais espécies ocorrentes, estão *S. cymosum* C.Agardh, *S. rigidulum* Kützing, *S. stenophyllum* C.Martius, *S. furcatum* Kützing, *S. vulgare* (sin. *S. bacciferum* (Turner) C.Agardh), *S. ramifolium* Kützing e *S. filipendula*, sendo que cada espécie pode conter uma ou mais variedades (PAULA, 1988).

O potencial de cultivo de seis espécies de *Sargassum* foi avaliado em condições laboratoriais por HANISAK e SAMUEL (1986). *S. filipendula* apresentou taxas de crescimento de $0,1071 \pm 0,0030$ duplicações dia⁻¹, crescimento similar o relatado *in situ* e que significa rápido crescimento. Além disso, a espécie apresentou tolerância a uma ampla faixa de salinidade, sendo indicada para cultivo tanto em ambiente estuarino quanto para águas eurihalinas. Atualmente, diversas espécies do gênero *Sargassum* são cultivadas no Japão, China e Coréia para consumo humano, como saladas, temperos ou sopas (KIM; et al., 2017).

1.5. Modelos vegetais

A imensa variedade de organismos faz com que seja necessária a adoção de organismos modelo para uso científico. Historicamente, as comunidades científicas tem focado o estudo destes organismos para compreender, por meio de comparações, a resposta das demais espécies. Entre as principais características de um organismo modelo estão o tamanho reduzido, o tempo curto entre gerações e DNA pequeno. Organismos modelos são encontrados nos mais diversos táxons, e nos plantas vasculares, *Arabidopsis thaliana* está entre as espécies mais estudadas (HEDGES, 2002).

1.5.1. *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana é uma planta da família Brassicaceae. Sua adoção como modelo vegetal data da primeira metade do século XX, quando havia o interesse em se encontrar uma espécie para estudos em genética e citogenética, assim como *Drosophyla* spp. haviam sido utilizados como modelos animais. Suas características mais interessantes são o ciclo de vida curto (aproximadamente seis semanas), pequeno número de cromossomos (5), alta fecundidade e possibilidade de mutagênese. Entre os anos de 1950 e 1960, começaram a surgir as primeiras coleções de variantes mutantes e a partir de 1970 expedições foram realizadas para coleta de diferentes ecótipos, aumentando a quantidade de variedades disponíveis para servir à pesquisa (SOMERVILLE; KORNEEF, 2002; MEYEROWITZ, 2001). De 1980 ao presente, inúmeros trabalhos foram conduzidos no sentido de desenvolvimento de mutantes resistentes ou susceptíveis a algum trato fisiológico, aumentando assim o conhecimento do comportamento da espécie e ajudando a compreender a fisiologia de outras espécies vegetais.

1.5.2. Rabanete

O rabanete (*Raphanus sativus* L.) é uma planta da família Brassicaceae que produz uma raiz tuberosa com importância comercial. Apesar de no Brasil este cultivar ter pouca importância comercial, seu ciclo de vida muito curto com cerca de 30 dias, pode ser uma opção interessante para o cultivo na entressafra de outras plantas comerciais (SMARTT; SIMMONDS, 1995).

Nativa da região mediterrânea, a espécie possui anatomia e metabolismo de fixação do carbono típico C_3 e, como tal, apresenta temperatura ótima de crescimento inferior a plantas C_4 ou intermediárias C_3 - C_4 . Desta forma, a espécie é mais tolerante ao frio, suportando até mesmo geadas. No entanto, não tolera temperaturas elevadas típicas do verão brasileiro, sendo indicada para o plantio de outono a primavera (LAMBERS; CHAPIN III; PONS, 2008; UENO; et al., 2003).

Devido a estas características, a espécie desperta o interesse para aplicação como espécie modelo em experimentos que considerem os efeitos da temperatura sobre os processos vegetativos em plantas vasculares com aplicação comercial.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de estimulação de plantas vasculares (*Arabidopsis thaliana* e *Raphanus sativus*) com o uso de extratos obtidos das macroalgas *Kappaphycus alvarezii* e *Sargassum filipendula*.

2.1. Objetivos Específicos

- Estabelecer a concentração mais adequada de extratos metanólicos das macroalgas *Kappaphycus alvarezii* e *Sargassum filipendula* previamente cultivados em condição padrão de laboratório para estimular o crescimento de raízes e partes aéreas de *Arabidopsis thaliana*, por meio de experimento dose-resposta.

- Avaliar de formação de raízes e desenvolvimento das partes aéreas de plântulas de *A. thaliana* após aplicação de extratos metanólicos de *K. alvarezii* e *S. filipendula*, quando cultivados em diferentes condições laboratoriais.

- Relacionar as diferentes condições de cultivo de *K. alvarezii* e *S. filipendula*, bem como as diferenças nas composições bioquímicas, com as diferentes respostas observadas em plântulas de *A. thaliana* tratadas com os extratos das macroalgas.

- Analisar a composição bioquímica de extratos metanólicos de *K. alvarezii* e *S. filipendula* cultivados em diferentes condições laboratoriais.

- Avaliar a estimulação da germinação e desenvolvimento de plantas de rabanete (*Raphanus sativus*) sob estresse de temperatura, após aplicação de extratos aquosos obtidos sob pressão de *K. alvarezii* e *S. filipendula*.

- Analisar o estado de estresse oxidativo de plântulas de rabanete submetidas à estresse de temperatura após o tratamento com os extratos aquosos obtidos sob pressão das macroalgas.

- Analisar as alterações morfo-histológicas observadas em plântulas de rabanete submetidas à estresse de temperatura após o tratamento com os extratos aquosos obtidos sob pressão das macroalgas.

3. FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS

A tese está dividida em 2 capítulos. O primeiro capítulo corresponde ao primeiro artigo que foi formatado e submetido de acordo com as normas da revista Journal of Applied Phycology (A2, Fator de impacto:2,616). O segundo capítulo corresponde ao segundo artigo,

formatado também de acordo com as normas da revista *Journal of Applied Psychology*, à qual será submetido.

CAPÍTULO 1

Análise da estabilidade de extratos de macroalgas com potencial bioestimulante em plantas vasculares agrícolas frente a condições ambientais adversas pelo uso da planta modelo *Arabidopsis thaliana* Col-0

¹ Neves FAS*, ¹ Rover T, ² Ramlov F, ³ Prithiviraj B, ² Maraschin M, ¹ Hayashi L

¹ Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brasil

² Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, UFSC, Florianópolis, Brasil

³ Departamento de Ciências Vegetais e Animais, Dalhousie University, Truro, Canada

* Autor para correspondência: filipeficologia@hotmail.com

Resumo

As macroalgas têm sido usadas como promotoras de crescimento vegetal na agricultura devido aos seus compostos bioativos. A maioria dos extratos comerciais de macroalgas é proveniente de espécies de águas frias e pouca informação está disponível para espécies tropicais. Além disso, geralmente essas macroalgas são provenientes de bancos naturais e a influência das condições ambientais nestes compostos bioativos é desconhecida. Neste trabalho, duas espécies de macroalgas tropicais foram cultivadas em diferentes condições de temperatura, salinidade e nutrientes para avaliar a influência destas variáveis no desenvolvimento da planta modelo *Arabidopsis thaliana* assim como na produção de compostos bioativos. Para tanto, extratos metanólicos das macroalgas *Kappaphycus alvarezii* e *Sargassum filipendula* foram testados em plântulas de *A. thaliana*. Primeiro, um experimento de dose-resposta (0,01 a 1,00 mg mL⁻¹) com extratos das macroalgas cultivados em condições padrão de laboratório foi realizado e, posteriormente, as melhores concentrações (0,03 e 0,01 mg mL⁻¹, para *K. alvarezii* e *S. filipendula*, respectivamente) foram adotadas para avaliar os efeitos dos extratos das macroalgas cultivadas em diferentes condições de temperatura, salinidade e nutrientes. Concentrações menores que 0,05 mg mL⁻¹ estimularam o crescimento de raízes e incrementaram a massa seca, ao passo que concentrações mais altas (0,50 e 1,00 mg mL⁻¹) de ambos os extratos inibiram tais parâmetros. Quando as plantas foram tratadas com extratos de macroalgas cultivadas em diferentes condições, aquelas tratadas com extratos cultivados em condição padrão apresentaram uma quantidade significativamente maior de raízes. As macroalgas cultivadas em diferentes condições apresentaram extratos com diferentes perfis de aminoácidos e maior conteúdo de compostos fenólicos, o que pode indicar uma condição de estresse. Foi concluído que as diferentes condições de cultivo podem indicar que os extratos apresentam sazonalidade, no entanto, quando as macroalgas são aclimatadas às condições de laboratório por uma semana, seus compostos bioativos podem estabilizar e estimular o crescimento de *A. thaliana* quando administrados em concentrações menores que 0,05 mg mL⁻¹.

Palavras-chave: bioestimulantes, extratos de macroalgas, *Kappaphycus alvarezii*, *Sargassum filipendula*, *Arabidopsis thaliana*

Abstract

Seaweeds have been used as growth promoters in agriculture because of their bioactive compounds. Most of the commercial extracts come from cold water species and few information are available for tropical species. Besides, usually these seaweeds came from natural beds and the influence of environmental conditions in these bioactive compounds are unknown. In this work, two tropical seaweeds were cultivated in different conditions of temperature, salinity and nutrients to evaluate the influence of these variables in the growth of the model plant *Arabidopsis thaliana* and in the production of bioactive compounds. For that, methanolic extracts from the seaweeds *Kappaphycus alvarezii* and *Sargassum filipendula* were tested in *Arabidopsis thaliana* plantlets. First, a dose-response experiment (0.01 a 1.00 mg mL⁻¹) considering seaweeds cultivated under laboratory standard conditions was performed. Afterwards, the best concentrations (0.03 e 0.01 mg mL⁻¹, for *K. alvarezii* and *S. filipendula*, respectively) were adopted to evaluate the effects of the seaweed extracts cultivated in different conditions of temperature, salinity and nutrients. Concentrations lower than 0.05 mg mL⁻¹ stimulated root growing and increased the dry weight for both species while higher extracts concentrations (0.50 or 1.00 mg mL⁻¹) inhibited those parameters. When plantlets were treated with extracts from seaweed cultivated in different conditions, those from standard conditions showed significantly more roots. Seaweed cultivated in different conditions had extracts with different amino acid profiles and higher phenolic compounds content, which can indicate stress condition. We concluded that different cultivation conditions may indicate that extracts have seasonality however, when acclimated to laboratory conditions for one week, bioactive compounds may stabilize and stimulate *A. thaliana* growth in concentrations less than 0.05 mg mL⁻¹.

Key words: biostimulants, seaweed extracts, *Kappaphycus alvarezii*, *Sargassum filipendula*, *Arabidopsis thaliana*

Introdução

As macroalgas são um importante recurso econômico que movimentou aproximadamente 4,8 bilhões de dólares em 2015, quando a produção superou 27 milhões de toneladas (FAO 2017). Enquanto a maior parte da biomassa produzida é utilizada na indústria alimentícia, uma importante parte é destinada à agricultura como matéria prima de fertilizantes e bioestimulantes vegetais (Bulgari et al. 2015).

Extratos de macroalgas melhoram as propriedades do solo e fornecem macro e micronutrientes (Craigie 2011). Desde a década de 1970, trabalhos têm sido realizados para identificar compostos nestes extratos destinados ao uso da agricultura, tais como fitormônios. Outros compostos incluem ácidos graxos, polissacarídeos, esteroides, pigmentos e polifenóis (Chojnacka et al. 2012). Tais compostos, mesmo em baixas concentrações, exercem influência no crescimento vegetal (Ahmed e Shalaby 2012; Alam et al. 2013; Matner et al. 2013), aumentando as taxas de germinação (Latique et al. 2014), estimulando a produção de folhas e raízes (Aremu et al 2015, Rayorath et al. 2008) ou promovendo o crescimento e produção (Sasikala et al. 2016). Eles também podem desencadear processos sistêmicos de resistência adquirida, conferindo proteção ao estresse biótico (Jayaraj et al. 2008, Mansori et al. 2016).

Apesar dos esforços em avaliar o potencial bioestimulante de extratos de macroalgas na agricultura, a maioria dos trabalhos é realizada com espécies provenientes de águas frias, e poucos levam em consideração espécies tropicais. No entanto, alguns autores demonstraram o potencial de extratos de *Sargassum* spp. no aumento da ramificação, comprimento de raízes e ramos, biomassa das plantas e número de flores e frutos de tomates, bem como no aumento do comprimento das plúmulas e radículas e ganho na massa fresca de feijão mungo (Kumar et al. 2012; Kumari et al. 2011). Zodape et al. (2009) pulverizaram extratos de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex Silva em diferentes concentrações sobre folhas de plantas de trigo e observaram uma melhora na qualidade e quantidade de grãos.

Os metabólitos secundários presentes em extratos de macroalgas podem influenciar no metabolismo e sistema de defesa de plantas cultiváveis, e podem ser alterados pelas condições ambientais em que as macroalgas vivem. Por exemplo, Riter et al. (2014) demonstraram que indivíduos de *Ectocarpus siliculosus* (Dillwyn) Lyngbye apresentam acumulação de ácidos graxos polisaturados C18 e C20, fitoprostanos e aminoácidos aromáticos nas células após 4 a 8 horas de estresse por

cobre. Liu et al. (2014) relataram que *Saccharina japonica* (Areschough) C.E.Lane, C.Mayes, Druehl & G.W.Saunders, após 3 horas de exposição a altas temperaturas, apresentou estimulação em genes que codificam compostos do sistema fotossintético, proteínas, lipídeos de membrana, carboidratos estruturais, entre outros. Zubia et al. (2014) descreveram a variação no conteúdo de pigmentos de *Gracilariopsis tenuifrons* (C.J.Bird & E.C.Oliveira) Fredericq & Hommersand após o cultivo em alta luminosidade e carga de nutrientes. Eles observaram um maior conteúdo de clorofilas e carotenoides, porém um menor conteúdo de ficoeritrinas e ficocianinas.

Apesar destes trabalhos terem investigado os efeitos de condições abióticas no metabolismo de macroalgas, não foram observados trabalhos que analisaram a variabilidade e alterações nos metabólitos secundários dos extratos sob diferentes condições de cultivo. Ao considerar que as macroalgas apresentam alterações metabólicas dependendo das suas condições de cultivo, implica-se em que os extratos destas macroalgas podem apresentar sazonalidade. Essa variação é indesejável à indústria agrícola que busca produtos estáveis. Conforme o observado por Hayashi et al. (2011), *K. alvarezii* se desenvolve bem em temperatura média de 25 °C e salinidade de 35 ‰. Além disso, Pedra et al. (2017) observaram que a água de cultivo do camarão do pacífico *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistema de biofloco (BFT) pode ser utilizada para fertilizar a espécie. O BFT é um sistema de cultivo que utiliza bactérias heterotróficas e quimiotróficas para assimilar e reciclar nutrientes, tais como o nitrogênio e o fósforo, melhorando a qualidade de água e tornando a água de cultivo mais fértil para o crescimento de macroalgas (Pedra et al. 2017).

Existem diversos grupos de metabólitos secundários amplamente distribuídos em plantas e algas, incluindo os compostos fenólicos. Tal grupo de moléculas é caracterizado por um anel aromático de hidrocarbonetos ligado a um grupo hidroxila. Diferentes tipos de compostos fenólicos são classificados pela quantidade de anéis aromáticos e grupos funcionais ligados a estes, como ácidos fenólicos, flavonoides, isoflavonas, ácido cinâmico, ácido benzoico, quecertina, catequina, lignanos, florotaninos e floroglucinol. Eles são considerados antioxidantes e moduladores de hormônios vegetais, o que confere a eles o potencial de estimular ou inibir o crescimento e desenvolvimento vegetal (Chojnacka et al. 2012; Einhellling 1995; Maloney et al. 2014; Peer e Murphy 2007). Desta forma, a quantificação de compostos fenólicos e flavonoides associada à exposição das plantas aos extratos das macroalgas pode ajudar a elucidar o processo de estimulação.

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh é utilizada como uma planta modelo genético devido a sua rápida germinação e crescimento (ciclo de vida de seis semanas). As plantas são geralmente cultivadas em placas de Petri sob condições controladas para avaliar o crescimento radicular, ou em vasos em casas de vegetação, para avaliar o desenvolvimento das partes aéreas (Meinke et al. 1998). *Kappaphycus alvarezii* e *Sargassum filipendula* C.Agardh foram escolhidos neste trabalho porque a primeira espécie tem suas técnicas de cultivo bem estabelecidas e são provenientes de cultivo laboratorial, sob condições controladas. *S. filipendula* foi escolhido porque é nativa do Brasil, proveniente dos bancos naturais da costa do Estado de Santa Catarina.

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência de três condições de cultivo (temperatura, salinidade e regime de nutrientes) na produção de compostos possivelmente bioativos em extratos metanólicos de duas espécies de macroalgas (*Kappaphycus alvarezii* e *Sargassum filipendula*) e os efeitos desses extratos no crescimento da planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

Material e Métodos

Talos do tetrasporófito verde de *K. alvarezii* foram cultivados em água do mar esterilizada enriquecida com solução de von Stosch 50% (VS50) na Seção de Macroalgas do Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LCM – UFSC) sob condições padrão para a espécie: irradiância de $100 \pm 10 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 h, temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, salinidade de 35‰ e aeração constante (PAULA, et al. 2001).

Talos de *S. filipendula* foram coletados na praia de Sambaqui - Florianópolis, Brasil ($27^\circ 29' 25.398''\text{S}$ / $48^\circ 32' 14.530''\text{W}$), lavados e aclimatados nas mesmas condições descritas para *K. alvarezii* por sete dias antes do início dos experimentos. A figura 2 apresenta um esquema do desenho experimental.

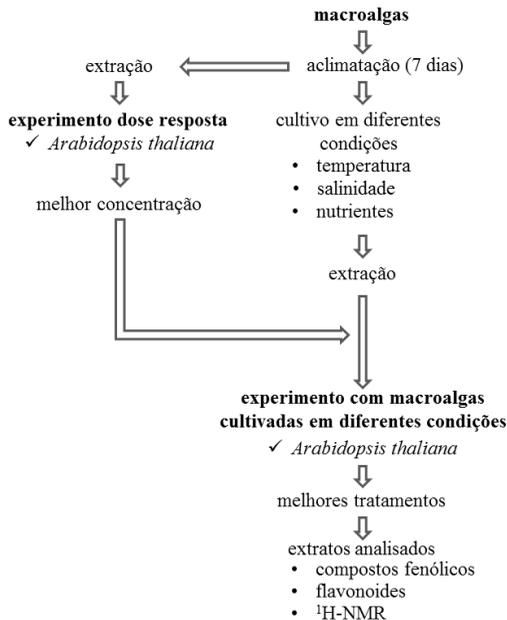


Figura 2 Esquema do desenho experimental

Cultivo das Macroalgas em diferentes condições

Após o período de aclimação, ambas as espécies de macroalgas (*K. alvarezii* – KP e *S. filipendula* - SG) foram colocadas em recipientes plásticos de 5 L, em densidade de 7 g L⁻¹, e cultivadas nas condições padrão descritas acima, com exceção de um parâmetro, o qual foi considerado como tratamento. Para temperatura, foram testados 20 ± 1 °C e 30 ± 1 °C (KP-20°C, KP-30°C, SG-20°C e SG-30°C); para salinidade, foram testados 25‰ e 35‰ (KP-25‰, KP-35‰, SG-25‰ e SG-35‰; e para nutrientes, os seguintes meios de cultura foram avaliados: a) um pulso inicial de 30 min com Acadian Marine Plant Extract Powder (0,01 g L⁻¹) (AMPEP – KP-AMPEP e SG-AMPEP) (Hurtado et al. 2012) seguido pelo cultivo em VS50, b) 25% de água do cultivo de camarão marinho criado em sistema de biofloc (BFT) (Pires 2017) em substituição ao VS50, (KP-BFT e SG-BFT) e c) um pulso inicial de AMPEP seguido pelo cultivo em BFT (KP AMPEP+BFT e SG AMPEP+BFT).

Cada tratamento (temperatura, salinidade e nutriente) foi realizado em três replicas (n=3). Como controle, as macroalgas foram cultivadas nas condições padrão.

As macroalgas foram cultivadas por uma semana de acordo com o controle ou tratamentos. Após este período, os talos foram dessalinizados por meio de lavagem abundante em água destilada, congeladas instantaneamente em nitrogênio líquido, liofilizadas e estocadas em -80 °C até a preparação dos extratos.

Preparação dos extratos

Os extratos foram preparados no Laboratório de Bioprodutos Marinhos do Departamento de Ciências Ambientais da Faculdade de Agricultura, Dalhousie University - Canadá, a partir de amostras de macroalgas tratadas e controle. Talos liofilizados foram macerados em nitrogênio líquido com auxílio de um cadinho. Os extratos metanólicos foram preparados adicionando-se 5 mL de metanol em 1 g de macroalga seca macerada, e deixados sob agitação em uma mesa agitadora por duas horas. A fase líquida foi coletada e o processo foi repetido para otimizar a extração. A fase líquida total foi coletada, centrifugada (2000 rpm) por 10 minutos, o metanol do sobrenadante foi evaporado em fluxo de nitrogênio e o extrato foi estocado em -20 °C.

Experimentos com *A. thaliana*

Sementes de *A. thaliana* var. columbia tipo selvagem (Col-0) provenientes da Lehle Seeds® foram utilizadas. Elas tiveram a superfície esterilizada em 1% de hipoclorito de sódio por um minuto e etanol 70% por 30 segundos, e lavadas com água destilada autoclavada. As sementes foram distribuídas em placas de Petri com meio de cultura padrão para *A. thaliana* (SM-At): Muhashige and Skoog 50% (MS/2) suplementado com vitaminas de MS e 1% de sacarose, solidificado com 0,7% de ágar. Na sequência, elas foram estratificadas por 2 dias em 4 °C para sincronizar a germinação (Sanchez-Serrano e Salinas 2014) e as placas foram colocadas na vertical em câmara de cultura sob as seguintes condições: irradiância de 100 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h e temperatura de 22 ± 1 °C. As plântulas foram mantidas nestas condições até atingirem o estágio de duas folhas (aproximadamente 3 ou 4 dias).

Dose-resposta de extratos de macroalgas em *A. thaliana*

Antes dos experimentos, a concentração ideal dos extratos para o crescimento de *A. thaliana* foi determinado. Para tanto, foram utilizadas algas do controle. Plântulas no estágio de duas folhas foram transferidas para novas placas com meio de cultura SM-*At* e extratos de *K. alvarezii* (KP) ou *Sargassum filipendula* (SG). Seis diferentes concentrações de extratos filtroesterilizados (0,22 μm) foram avaliadas (0,01; 0,03; 0,05; 0,10; 0,50 e 1,00 mg mL^{-1}). Como controle, as plântulas foram cultivadas em placas com meio de cultura SM-*At* com adição de metanol na concentração igual a maior concentração de metanol nos tratamentos (10 $\mu\text{L mL}^{-1}$). Após sete dias, as plântulas foram medidas quanto ao número de folhas, parâmetros radiculares e massa seca da parte aérea.

A melhor concentração do extrato de cada espécie de macroalga foi adotada para os experimentos subsequentes.

Efeitos dos extratos de macroalgas cultivadas em diferentes condições sobre a produção de raízes de *A. thaliana*

Os extratos das macroalgas cultivados em diferentes condições de temperatura, salinidade e nutrientes foram testados em plântulas de *A. thaliana*. Plântulas no estágio de duas folhas foram cultivadas em placas de Petri com meio de cultura SM-*At* e extratos de *K. alvarezii* (KP) em concentração de 0,03 mg mL^{-1} , ou *Sargassum filipendula*, (SG) em concentração de 0,01 mg mL^{-1} . Como controle, as plântulas foram cultivadas sem adição de extratos ou metanol ao meio de cultura. Após sete dias, as plântulas foram medidas quanto aos parâmetros do sistema radicular.

Análise quantitativa de compostos fenólicos e flavonoides totais dos extratos

Os extratos que apresentaram atividade em *A. thaliana* (KP-padrão, KP-20°C, KP-AMPEP e SG-padrão) foram analisados quanto ao conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides totais no Laboratório de Morfologia e Bioquímica Vegetal (LMBV – UFSC).

Os compostos fenólicos totais foram medidos a partir de 1 g de extratos diluídos em 10 mL de solução de 80% de metanol, colocados no escuro por uma hora. Após esse período, 100 μL do sobrenadante foram coletados e adicionados a 75 μL de Folin-Ciocaltau e 825 μL de Na_2CO_3 a 2%. Após 2 horas, a absorbância foi medida em

espectrofotômetro (750 nm). A quantificação dos compostos fenólicos totais foi feita por meio da inferência utilizando a curva do ácido gálico (5 a 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$, $y = 0,01x$, $r^2 = 0,00$) (Schiavon et al. 2012).

O conteúdo de flavonoides foi medido usando 500 μL do extrato diluído em 2,5 mL de etanol e AlCl_3 (2%) dissolvido em metanol. Após uma hora de incubação no escuro, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (420 nm). A quantificação dos flavonoides foi feita por meio da inferência utilizando a curva da quecercina (10 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, $y = 0,01x$, $r^2 = 0,99$) (Zacarias et al. 2007).

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do próton ($^1\text{H-NMR}$)

Extratos de KP-padrão, KP-20°C, KP-AMPEP e SG-padrão foram analisados por espectroscopia do $^1\text{H-NMR}$ de acordo com a metodologia descrita por Cardoso et al. (2017) com modificações. Aos extratos foram adicionados 700 μL de metanol, contendo 0,024% de tetrametilsilano – TMS – como padrão interno. A solução foi misturada com vortex, centrifugada (4000 rpm, 10 min), e o sobrenadante coletado (650 μL). A aquisição dos espectros unidimensionais de NMR foi feita em espectrômetro de NMR Varian Inova de 500 MHz e os deslocamentos químicos (δ , ppm) foram referenciados pelos picos do TMS em 0,00 ppm $\delta(^1\text{H})$. Os parâmetros de aquisição foram: 5995,7 Hz, tempo de aquisição de 4 s, 32983 pontos complexos, 32 varreduras, tempo de atraso de relaxamento de 6 s, observação de pulso de 8,18 μsat , poder de compressão de 59/0,98, tempo de mistura de 100 ms para saturação da água ($\delta = 4,87$ ppm) e resolução digital de ± 0.08657 Hz. Os dados foram processados usando o software ACD/NMR processor v. 12.0, o que consistiu em *zero filling* e transformação de Fourier de 32 K pontos de dados. A linha de base foi corrigida manualmente e todos os espectros foram referenciados ao TMS. A informação espectroscópica de interesse foi exportada como arquivo comma-separated values (.csv) contendo uma matriz com os deslocamentos químicos e lista da intensidade dos picos. As regiões de sinal típicos do metanol do TMS foram removidos da base de dados para futuras análises. Cada espectro de $^1\text{H-NMR}$ foi processado utilizando uma rotina implementada no pacote specmine disponível na linguagem R. Os picos foram agrupados de acordo com a sua posição em uma faixa de 0,03 ppm. Os picos do mesmo grupo foram alinhados às suas posições medianas ao longo de todas as amostras. Os dados

faltantes foram preenchidos com um valor constante de 0,0005 e os dados pré-processados foram transformados por $\log(x)$.

Análise de Dados e Estatística

Os experimentos com *A. thaliana* foram conduzidos em triplicatas, contendo quatro plantas cada ($n = 3$). Após 7 dias de cultivo, o número de folhas foi contado manualmente e a quantidade de massa seca da parte aérea foi medida em balança analítica. Para medir o sistema radicular, as raízes foram espalhadas sobre folhas de transparência e escaneadas. A partir das imagens, o comprimento da raiz principal foi obtido com auxílio do software *Image J* v. 1.43. O comprimento linear total de raízes foi obtido com auxílio do software *WinRhizo* v. 2016, e a quantidade de raízes laterais foi contada manualmente. Todos os dados foram submetidos a testes de ANOVA uni ou multifatoriais, seguidos de testes de Newman-Keuls (considerando $p \leq 0,05$). As análises de conteúdo de compostos fenólicos totais e de flavonóides foram conduzidas em quadruplicatas ($n = 4$) e os dados foram analisados por ANOVA unifatorial seguido de teste de Newman-Keuls ($p \leq 0,05$). Toda a Análise Estatística foi feita com auxílio do software *Statistica* v. 8.0.

Resultados

Dose resposta de extratos de macroalgas em *A. thaliana*

A Tabela 2 apresenta os efeitos de diferentes concentrações de extratos de *K. alvarezii* e *S. filipendula* em *A. thaliana*. As plântulas foram estimuladas por extratos em concentrações mais baixas. As que foram tratadas com extratos de *K. alvarezii* em concentração de $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$ produziram mais folhas ($6,9 \pm 0,1$ folhas) em relação ao controle ($6,2 \pm 0,3$ folhas). Aquelas tratadas com o mesmo extrato em concentrações de $0,01$ e $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$, apresentaram raízes com maior comprimento linear (de $38,3 \pm 7,6$ a $40,7 \pm 0,5 \text{ cm}$) e maior massa seca em concentrações de $0,01$ e $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$ (127 ± 10 e $129 \pm 6 \mu\text{g}$) do que quando comparadas às plântulas controle ($29,1 \pm 1,4 \text{ cm}$ e $105 \pm 4 \text{ g}$). As plântulas tratadas com extratos de *S. filipendula* apresentaram raízes mais longas nas concentrações de $0,01$ e $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$ ($38,0 \pm 1,9$ e $34,7 \pm 2,9 \text{ cm}$) e maior massa seca em concentração de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ ($124 \pm 4 \mu\text{g}$) quando comparadas com as plantas controle ($29,1 \pm 1,4 \text{ cm}$ e $105 \pm 4 \mu\text{g}$).

Por outro lado, as plântulas foram inibidas pelas concentrações mais altas de extratos. Quando tratadas com $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$ de extratos de *K. alvarezii*, as plântulas tiveram menos raízes laterais ($12,8 \pm 1,4$ raízes), raízes principais mais curtas ($4,2 \pm 0,7 \text{ cm}$) e menor comprimento total de raízes ($19,1 \pm 1,4 \text{ cm}$) do que plantas controle ($20,2 \pm 3,8$ raízes, $7,3 \pm 0,3 \text{ cm}$ and $29,1 \pm 1,4 \text{ cm}$). Ainda, quando tratadas com extratos de *S. filipendula*, as plântulas foram significativamente inibidas ($p \leq 0.05$) em todos os parâmetros nas concentrações de $0,50$ e $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$ quando comparadas com plantas controle.

Tabela 2 Número de folhas e raízes laterais, comprimento da raiz principal, linear de raízes e massa seca de plântulas de *Arabidopsis thaliana* após 7 dias de tratamento com seis concentrações (de 0,01 a 1,00 mg mL⁻¹) de extratos de *Kappaphycus alvarezii* e *Sargassum filipendula*. As plantas controle foram cultivadas com 10 µL L⁻¹ de metanol. Os valores são apresentados como média (n=3) ± intervalo de confiança de 95%. As letras “a” indicam os tratamentos que apresentaram estimulação, enquanto as letras “b” apresentam os tratamentos que apresentaram inibição, dos respectivos parâmetros comparados com o controle

	número de folhas	número de raízes laterais	comprimento da raiz principal (cm)	comprimento linear das raízes (cm)	peso seco (µg)
controle	6,02 ± 0,3	20,2 ± 3,8	7,3 ± 0,3	29,1 ± 1,4	105 ± 4
<i>K. alvarezii</i>	0,01	6,6 ± 0,1	22,4 ± 2,8	7,0 ± 0,8	38,3 ± 7,6 ^a
	0,03	6,9 ± 0,1 ^a	26,6 ± 0,5	7,3 ± 0,5	40,7 ± 0,5 ^a
	0,05	6,3 ± 0,1	28,2 ± 4,4	7,6 ± 0,6	39,9 ± 7,2 ^a
	0,10	6,2 ± 0,1	23,9 ± 2,3	7,6 ± 0,5	30,9 ± 5,8
	0,50	6,2 ± 0,2	14,4 ± 3,8	6,8 ± 0,4	28,8 ± 4,4
<i>S. filipendula</i>	1,00	6,2 ± 0,3	12,8 ± 1,4 ^b	4,2 ± 0,7 ^b	19,1 ± 1,4 ^b
	0,01	6,6 ± 0,1	19,7 ± 5,4	6,6 ± 0,9	38,0 ± 1,9 ^a
	0,03	6,7 ± 0,2	22,6 ± 5,5	6,4 ± 0,3	34,7 ± 2,9 ^a
	0,05	6,2 ± 0,3	21,8 ± 3,9	7,1 ± 0,4	32,9 ± 9,6
	0,10	6,5 ± 0,1	29,3 ± 1,4 ^a	7,2 ± 0,1	36,5 ± 3,4 ^a
0,50	5,2 ± 0,1 ^b	8,5 ± 1,0 ^b	4,6 ± 0,3 ^b	12,9 ± 2,4 ^b	40 ± 7 ^b
1,00	5,1 ± 0,6 ^b	6,9 ± 1,6 ^b	1,4 ± 0,3 ^b	3,2 ± 1,2 ^b	27 ± 11 ^b

Efeitos dos extratos de macroalgas cultivadas em diferentes condições sobre a produção de raízes de *A. thaliana*

Plântulas tratadas com extratos das macroalgas cultivadas em condições padrão de laboratório apresentaram os comprimentos lineares de raízes significativamente maiores ($26,07 \pm 2,64$ cm e $25,39 \pm 2,37$ cm, respectivamente) comparadas às plantas controle ($12,09 \pm 1,33$ cm) (Fig. 2).

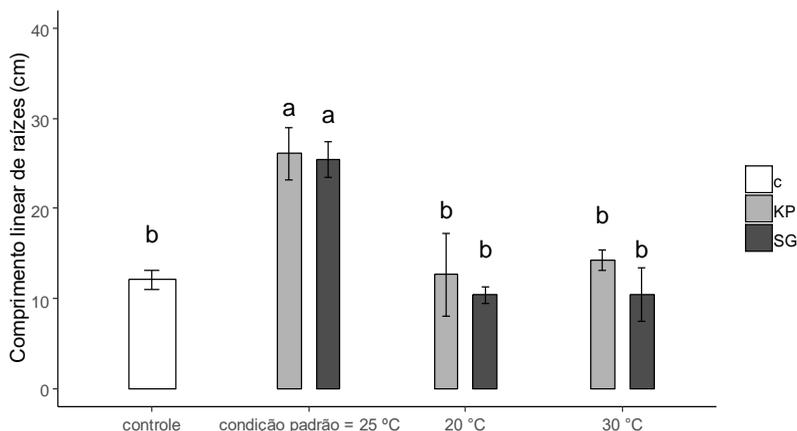


Figura 3 Comprimento linear de raízes de *Arabidopsis thaliana* tratadas por sete dias com $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$ de extrato de *Kappaphycus alvarezii* (KP) e $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ de extrato de *Sargassum filipendula* (SG), e raízes não tratadas (c). As macroalgas foram cultivadas por sete dias em diferentes condições de temperatura antes da obtenção dos extratos. Os dados são apresentados em média \pm intervalo de confiança de 95% ($n=3$). As letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos e o controle, de acordo com ANOVA unifatorial

A salinidade não teve influência nos extratos, uma vez que as plântulas tratadas apresentaram as mesmas características de raízes do que as plantas não tratadas.

A única estimulação observada por extratos provenientes de macroalgas cultivadas em diferentes condições foi em relação ao número de raízes laterais. Plântulas tratadas com os extratos KP-20°C, KP-padrão, KP-AMPEP e SG-padrão apresentaram comprimento significativamente maior ($9,7 \pm 3,1$; $14,3 \pm 0,8$; $10,0 \pm 0,9$; $17,9 \pm 0,8$

raízes, respectivamente), em relação às plantas não tratadas ($6,2 \pm 0,5$ raízes) (Fig. 3 e 4).

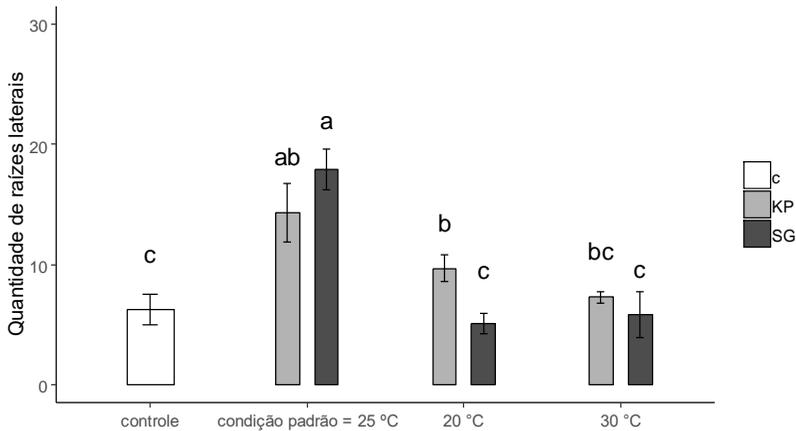


Figura 4 Número de raízes laterais produzidas por *Arabidopsis thaliana* após sete dias de tratamento com $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$ de extrato de *Kappaphycus alvarezii* (KP) e $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ de extrato de *Sargassum filipendula* (SG), e plântulas não tratadas (c). As macroalgas foram cultivadas por sete dias em diferentes condições de temperatura antes da obtenção dos extratos. Os dados são apresentados em média \pm intervalo de confiança de 95% ($n=3$). As letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos e o controle, de acordo com ANOVA unifatorial

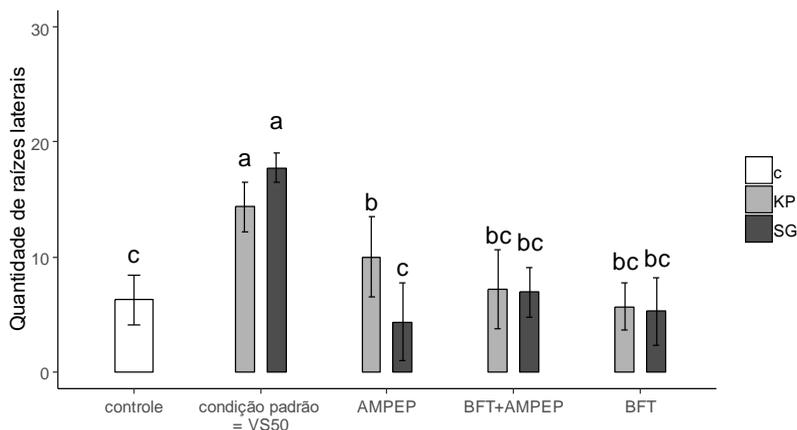


Figura 5 Número de raízes laterais produzidas por *Arabidopsis thaliana* após sete dias de tratamento com $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$ de extrato de *Kappaphycus alvarezii* (KP) e $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ de extrato de *Sargassum filipendula* (SG), e plântulas não tratadas (c). As macroalgas foram cultivadas por sete dias em diferentes condições de nutrientes antes da obtenção dos extratos. Os dados são apresentados em média \pm intervalo de confiança de 95%. As letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos e o controle, de acordo com ANOVA unifatorial

Análise quantitativa de compostos fenólicos e flavonoides totais contidos nos extratos

Foi observado conteúdo significativamente maior de compostos fenólicos totais em KP-AMPEP ($763,76 \pm 67,20 \mu\text{g g}^{-1}$) comparado aos demais extratos. Não houve diferença estatística entre o conteúdo de compostos fenólicos entre KP-20°C e SG-padrão ($595,49 \pm 22,44$ e $545,44 \pm 50,46 \mu\text{g g}^{-1}$ MS), e KP-padrão apresentou o menor conteúdo de compostos fenólicos quando comparado aos demais extratos ($314,96 \pm 11,11 \mu\text{g g}^{-1}$ MS). Com relação aos flavonóides, SG-padrão apresentou o maior conteúdo ($272,33 \pm 50,46 \mu\text{g g}^{-1}$ MS), seguido de KP-AMPEP ($186,38 \pm 67,20 \mu\text{g g}^{-1}$ MS), KP-20°C e KP-padrão ($74,82 \pm 22,44$ e $48,10 \pm 11,11 \mu\text{g g}^{-1}$ MS, respectivamente) (Fig. 5).

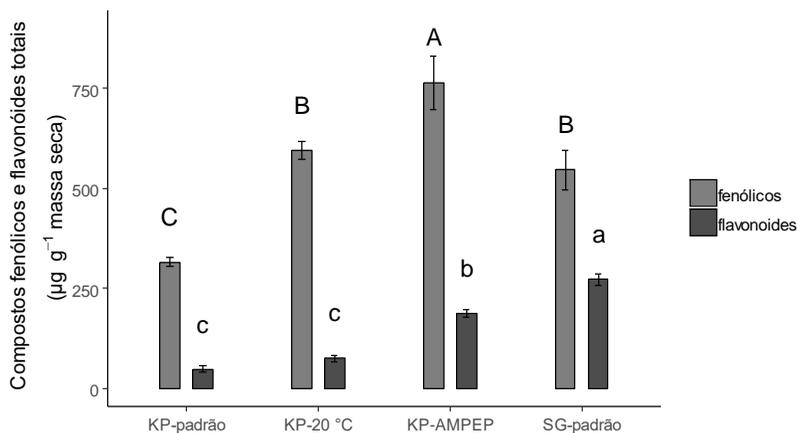


Figura 6 Conteúdo de fenólicos totais e flavonoides de extratos obtidos de macroalgas cultivadas por sete dias em diferentes condições de cultivo. Valores são apresentados em média \pm intervalo de confiança de 95%. As letras maiúsculas apresentam as diferenças significativas nos compostos fenólicos totais e as minúsculas apresentam as diferenças no conteúdo de flavonoides

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do próton (¹H-NMR)

Ao todo, foram identificados 32 compostos, dos quais oito ocorreram em todos os extratos (estigmasterol, ácido pipecólico, 3-metilhistidina, 4-hidroxiprolina, D-galactose, dimetil sulfeto, ácido pirúvico e eritról) (Tabela 2). A colesteno e o ácido 4-hidroxibenzoico foram encontrados em todos os extratos, exceto KP-AMPEP, enquanto a glicina foi encontrada em todos os extratos, exceto KP-20°C. A ceto-leucina e o ácido dimetilamônico foram encontrados em todos os extratos exceto KP-padrão e a butanona foi encontrada em todos os extratos de *K. alvarezii*.

A L-arginina, a L-alanina, e a tiramina foram encontrados em KP-padrão e KP-20°C, enquanto que o ácido oleico, o ácido elaidico e a 3-nitrotirosina foram encontrados em apenas nas amostras controle (KP-padrão e SG-padrão). A tiamina, o squaleno, e o ácido xiquímico foram

encontrados em KP-20°C e SG-padrão. O ácido 5-aminolevulínico, o ácido oxaloacético, o ácido succínico e o ácido málico foram encontrados apenas em KP-padrão. A D-ribose, a fosfocolina – PC(16:0/16:0), a L-cisteína e a cumarina foram encontrados apenas em SG-padrão (Tab. 3).

Tabela 2 Lista de metabolitos identificados por espectroscopia do ¹H-NMR em extratos de *Kappaphycus alvarezii* (KP-padrão, KP-20°C e KP-AMPEP) e *Sargassum filipendula* (SG-padrão)

	KP-padrão	KP-20°C	KP-AMPEP	SG-padrão
estigmasterol	x	x	x	x
ácido pipecólico	x	x	x	x
metil-3-histidina	x	x	x	x
4-hidroxiprolina	x	x	x	x
D-galactose	x	x	x	x
dimetil sulfeto	x	x	x	x
ácido pirúvico	x	x	x	x
eritritol	x	x	x	x
butanona	x	x	x	
ácido 4-hidroxibenzóico	x	x		x
glicina	x		x	x
ceto-leucina		x	x	x
ácido dimetilmalônico		x	x	x
L-arginina	x	x		
L-alanina	x	x		
tiramina	x	x		
ácido oleico	x			x
ácido elaídico	x			x
3-nitrotirosina	x			x
tiamina		x		x
esqualeno		x		x
ácido xiquímico		x		x
L-asparagina		x		x
ácido 5-aminolevulínico	x			
ácido oxalacético	x			
ácido succínico	x			
ácido málico	x			
D-ribose				x
PC(16:0/16:0)				x
L-cisteína				x
cumarina				x

Discussão

A maioria das alterações foi observada no sistema radicular de *A. thaliana*. De forma geral, quando as raízes foram estimuladas, as plantas também apresentaram mais folhas e maior biomassa nas partes aéreas. Isso ocorreu com o extrato de *K. alvarezii* na concentração de 0,03 mg mL⁻¹ e extrato de *S. filipendula* a 0,01 mg mL⁻¹. De forma similar, quando as plantas apresentaram as raízes inibidas por maiores concentrações de extrato (0,50 e 1,00 mg mL⁻¹) menos folhas foram produzidas e as partes aéreas apresentaram-se com menos massa. Esses resultados estão de acordo com Hernández-Herrera et al. (2014), que afirmam que a estimulação ou inibição do sistema radicular reflete nas partes aéreas da planta e com Aremu et al. (2015) que relataram que plantas de flor abacaxi *Eucomis autumnalis* tratados via radicular com compostos fenólicos extraídos de *Ecklonia maxima* em concentração de 10⁻⁵ M apresentaram inibição da área foliar e biomassa. No entanto, quando tratados com 10⁻⁷ M esta inibição não ocorreu. Outros trabalhos têm relatado o mesmo padrão de estimulação nas plantas pela aplicação de concentrações baixas de extratos de macroalgas, seguido pela progressiva inibição com o aumento das concentrações (Aremu et al. 2015; Castellanos-Barriga et al. 2017). Castellanos-Barriga et al. (2017) testaram os efeitos de extratos de *Ulva lactuca* L. em concentrações de 0,2 a 1,0% em feijão mungo (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) e observaram que em baixas concentrações (0,2%), os extratos reduziram o tempo de germinação, promoveram o vigor, raízes e partes aéreas, e um incremento biomassa e massa seca das plantas. No entanto, os resultados encontrados no presente trabalho apontam para efeitos inibitórios de extratos em concentrações mais baixas do que o descrito por Castellanos-Barriga et al. (2017) (0,50 e 1,00 mg mL⁻¹, ou seja, 0,05 a 0,1%). Estes autores trabalharam com concentrações e diluições de extrato bruto, enquanto que no presente trabalho os extratos foram centrifugados e purificados, o que pode ter concentrado os compostos bioativos, amplificando os processos de estimulação e inibição. Além disso, as espécies trabalhadas também foram diferentes.

McDonald et al. (2013) testaram um extrato comercial da macroalga parda *Ascophyllum nodosum* em pinheiro do Canadá (*Picea glauca* (Moench) Voss). Os autores testaram uma ampla gama de diluições dos extratos em água (de 1:500 a 1:75) em plantas cultivadas em berçário, estocadas em câmara fria para simular as condições do inverno. Eles observaram que plantas tratadas com extratos em altas

concentrações, ou seja, 1:75 (extrato:solvente, v:v), apresentaram redução no crescimento das raízes e, até mesmo, dano no sistema radicular. No entanto, quando as plantas foram transplantadas para condições de temperatura amenas, simulando primavera/verão, elas foram capazes de se recuperarem dos danos, e plantas tratadas com concentrações mais altas dos extratos apresentaram estimulação na produção de raízes, superando as plantas tratadas com concentrações mais baixas e plantas não tratadas (controle). Esses dados sugerem que altas concentrações de extratos podem ser inibitórias ao crescimento das raízes em determinadas condições, mas estimulatórias em outras condições. A inibição descrita pelos autores foi observada no presente trabalho, quando concentrações que inibiram as raízes de *A. thaliana* foram 0,50 a 1,00 mg mL⁻¹, ou seja, 1:2000 a 1:1000 (extrato:solvente, w:v).

A estimulação das plântulas observada em baixas concentrações dos extratos pode ser de grande interesse para a indústria, uma vez que implica em um menor gasto com matérias-primas. Além disso, a preparação de concentrados facilita a estocagem e transporte, para estes serem posteriormente dissolvidos na concentração desejada.

Como os extratos de *K. alvarezii* em 0,03 mg mL⁻¹ e de *S. filipendula* em 0,01 mg mL⁻¹ apresentaram, no geral, os melhores resultados, estes foram escolhidos para averiguar a influência das condições de cultivo das macroalgas na qualidade dos extratos. As plantas tratadas com os extratos das macroalgas cultivadas em condições controle apresentaram valores significativamente maiores para todos os parâmetros analisados. A análise dos compostos fenólicos totais e de flavonoides mostrou que KP-padrão apresentou o menor conteúdo de compostos fenólicos do que quando comparado a KP-20°C, KP-AMPEP e SG-padrão. De acordo com Einhelling (1995), compostos fenólicos podem inibir ou estimular o crescimento vegetal dependendo de sua interação com hormônios, como auxinas e citocininas. No caso do presente estudo, os compostos fenólicos podem estar interferindo no crescimento radicular de *A. thaliana*. Ainda, SG-padrão apresentou um significativo incremento na formação de raízes laterais de *A. thaliana* comparado a KP-padrão. SG-padrão, em particular, apresentou um maior conteúdo de flavonoides comparado a KP-padrão.

Flavonoides têm sido associados ao desenvolvimento de raízes em plantas devido a sua capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS atuam como moléculas de sinalização que regulam diversos processos de desenvolvimento vegetal, incluindo o alongamento de raízes primárias e pelos absorventes, diferenciação do

ápice das raízes e desenvolvimento de raízes adventícias. Maloney et al. (2014) estudaram dois mutantes de tomate (*Solanum lycopersicum*): o primeiro era *are* (antocianinas reduzidas) que apresentavam deficiência na via metabólica que sintetiza flavonoides, acumulando naringenina e o substrato F3S, o primeiro substrato na síntese de flavonoides que reduz os níveis de polifenóis *downstream*, como a quecercina e as antocianinas, comparadas com plantas não mutantes. O segundo era *anthocyanin without* o qual não apresenta antocianinas, mas elevados níveis de flavonóides. Enquanto *are* apresentava um baixo desenvolvimento radicular e alto conteúdo de pelos absorventes, *anthocyanin without* apresentava alto desenvolvimento radicular. De acordo com os autores, pela complementação do mutante *are* pelo transgene *p35S:F3H*, o gene reduziu as naringeninas e, consequentemente, restaurou os níveis de flavonóides e sistema radicular.

A estimulação ou inibição da formação de raízes pelos flavonoides é também descrita por Peer e Murphy (2007). Os autores mostraram que mutantes *tt4* de *A. thaliana* com cinco dias de idade, os quais tem mutados os genes que sintetizam chalconas, uma enzima chave na biossíntese de flavonoides e, assim, não apresentam flavonoides nos tecidos vegetativos, apresentaram aumento no transporte de auxinas das partes aéreas para as raízes comparados com plantas não mutantes. Como resultado, as plantas apresentaram raízes mais longas e com mais raízes laterais. Quando uma gotícula de naringenina foi adicionada sobre as partes aéreas, o transporte de auxinas das partes aéreas para as raízes foi reduzido, o que sugere que os flavonoides desempenham atividade modulatória sobre as auxinas. Estes estudos demonstram que a aplicação exógena de compostos fenólicos e flavonoides interferem com a produção de raízes em plantas vasculares e ajudam a explicar a estimulação observada nas raízes de *A. thaliana* quando tratadas com extratos com menor teor de fenólicos, como no caso de KP-padrão, ou alto teor de flavonóides, como no caso de SG-padrão.

De acordo com a ressonância magnética do próton (^1H NMR), os extratos apresentaram diferentes perfis de aminácidos, assim como seus ácidos orgânicos precursores. Os ácidos succínico, málico e oxálicos são precursores da via metabólica do aspartato, encontrado em KP-padrão, enquanto que o aminoácido *downstream* asparagina foi identificado em KP-20°C e SG-padrão. Outro aminoácido nesta via metabólica encontrado em todos os extratos foi o ácido pipecólico, um aminoácido incomum identificado em todos os extratos. Este aminoácido não

proteínogênico é originado da degradação da lisina e acumulado nos tecidos como resposta ao estresse, sendo tanto exógena quanto endogenamente associados com a iniciação de processos de resistência adquirida contra patógenos (Hartmann et al. 2017). Apesar deste efeito, nenhuma evidência foi observada ligando este aminoácido à estimulação de raízes de plantas saudáveis cultivadas *in vitro*. O xiquimato, precursor de aminoácidos aromáticos, também foi identificado no presente trabalho. Na via metabólica do xiquimato, o próprio xiquimato foi observado em KP-20°C e SG-padrão, enquanto que a amina *downstream* tiramina, o qual é gerado pela degradação do aminoácido tirosina, foi observado em KP-padrão e SG-padrão. Na via metabólica do glutamato, a arginina foi observada em KP-padrão e KP-20°C, enquanto que a 3-hidroxi metilhistidina, a qual é gerada pela metilação da histidina, foi encontrada em todos os extratos. Além disso, a 4-hidroxi prolina, originada da hidroxilação da prolina, foi observada em todos os extratos. A 4-hidroxi prolina pode aumentar os níveis endógenos de prolina, ajudando na proteção de plantas contra os estresses bióticos e abióticos (Raggi 2000) e, por causa disso, um método de preparação de um produto para a agricultura baseado na 4-hidroxi prolina foi patenteado nos EUA (Colucci et al. 2013). Ainda, a alanina foi identificada nos extratos KP-padrão e KP-20°C, enquanto que o seu precursor ácido pirúvico foi encontrado em todos os extratos. Na via metabólica da serina, dois aminoácidos foram identificados: a glicina ocorreu em KP-padrão, KP-AMPEP e SG-padrão, enquanto que a cisteína foi observada apenas em SG-padrão. Os aminoácidos encontrados nos extratos podem estar influenciando no efeito estimulatório observado nas plantas uma vez que estas podem ser usadas como fonte de nitrogênio pelas plantas. Ganeteg et al. (2017) demonstraram que plantas de *A. thaliana* podem obter nitrogênio por fontes orgânicas de nitrogênio, como aminoácidos.

O esqualeno, identificado em KP-20°C e SG-padrão, é um composto triterpenóide formado pela via metabólica do ácido mevalônico e é *upstream* na formação de brassinosteróides, como brassinolídeo, hormônio conhecido por regular a divisão e alongamento celular em diferentes órgãos vegetais, tais como folhas, flores, frutos e raízes (Vriet et al. 2013). Ainda, outro fitoesteróide originado do esqualeno foi observado. O estigmasterol, encontrado em todos os extratos, é comum em plantas. Em macroalgas, foi identificado em *Pteroladia capillacea* (sin. *Pterocladia capillacea* (S.G.Gmelin) Santelices & Hommersand) (El-din e El-Ahwany 2016) e *Laurencia obtusa* (Hudson) J.V.Lamouroux (Davis 2017). Os fitosteróides

demonstram importância na regulação da fluidez da membrana que exerce influência nas propriedades, funções e estrutura das membranas (Bouvier-Navé et al. 2010). Ainda que as funções específicas das formas livres do estigmasterol não sejam bem conhecidas, He et al. (2003), estudando mutantes de *A. thaliana* e fenilpropilmorfolina, o qual é uma substância que causa alterações na composição de esteróides, observou que o estigmasterol e outros esteroides, além dos brassinosteróides, também exercem influência na divisão da célula, embriogênese e desenvolvimento vegetal.

Entre outros compostos identificados nos extratos, alguns são de interesse na agricultura. A cumarina (encontrada em SG-padrão) é um composto fenólico com ocorrência natural em diversas plantas. De acordo com Lupini et al. (2014), *A. thaliana* tratada com 10^{-4} M de cumarina apresentou inibição do alongamento da raiz primária, enquanto a formação de raízes laterais foi estimulada, provavelmente por causa da interação entre a cumarina e os transportadores polares de auxinas. Em macroalgas, a cumarina foi identificada em extratos metanólicos de *Padina tetrastomatica* Hauck por Maheswari et al. (2017). O ácido 4-hidroxibenzóico (KP-padrão, KP-20°C e SG-padrão) é um composto polifenólico análogo ao ácido salicílico que demonstrou aumentar a resistência ao congelamento e ressecamento em plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.). O composto é também conhecido como responsável por aumentar os níveis de prolina e atuar como fitoalexina, promovendo proteção contra a infecção contra patógenos (Horváth et al. 2007). O ácido 5-aminolevulínico (KP-padrão), um precursor no metabolismo da clorofila, é atribuído em promover a repigmentação de plantas estioladas e estimular o sequestro de sulfato o qual leva a regulação da formação de cisteína e glutatona (Maruyama-Nakashita et al. 2010).

A variação supracitada nos compostos indica que os extratos apresentam sazonalidade dependendo da sua condição de cultivo. Essa sazonalidade era esperada, como atestado por Wei et al. (2016), Schiener et al. (2015), Stirk et al. (2014). Contudo, a sazonalidade é uma característica indesejável pela indústria, que busca um produto estável ao longo do ano, no qual o consumidor possa confiar que, independente do lote, irá observar resposta similar em sua lavoura. Uma vez que as macroalgas foram aclimatadas às condições de laboratório, a bioestimulação das raízes das plântulas de *A. thaliana* foi mais efetiva, o que indica que os compostos bioativos podem ter se estabilizado. Baseado nos resultados obtidos, concluímos que baixas concentrações (menores que $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$) são necessárias para estimular o sistema

radicular e foliar de *A. thaliana*, enquanto que altas concentrações (maiores que 0,50 mg mL⁻¹) são prejudiciais ao crescimento de *A. thaliana*. Ainda, diferentes condições de cultivo alteram a composição dos extratos, indicando sazonalidade. Uma vez que as macroalgas são aclimatadas as condições de laboratório, os extratos são mais efetivos ao crescimento de *A. thaliana*.

Referências Bibliográficas

Ahmed YM, Shalaby EA (2012) Effect of different seaweed extracts and compost on vegetative growth, yield and fruit quality of cucumber. *J Hort Sci & Ornament Plants* 4:235-240

Alam MZ, Braun G, Norrie J, Hodges M (2013) Effect of *Ascophyllum* extract application on plant growth, fruit yield and soil microbial communities of strawberry. *Can J Plant Sci* 93:23-36

Aremu AO, Masondo NA, Rengasamy KRR, Amoo SO, Gruz J, Bíba O, Šubrtová M, Pěňčík A, Novák O, Doležal K, Van Staden J (2015) Physiological role of phenolic biostimulants isolated from brown seaweed *Ecklonia maxima* on plant growth and development. *Planta* 241:1313-1324

Bouvier-Navé P, Berna A, Noiriél A, Compagnon V, Carlsson AS, Banas A, Stymne S, Schaller H (2010) Involvement of the phospholipid sterol acyltransferase1 in plant sterol homeostasis and leaf senescence. *Plant Physiol* 152: 107-119

Bulgari R, Cocetta G, Trivellini A, Vernieri P, Ferrante A (2015) Biostimulants and crop responses: a review. *Biol Agric Hortic* 31:1-17

Cardoso S, Maraschin M, Peruch LAM, Rocha M, Pereira A (2017) Characterization of the Chemical Composition of Banana Peels from Southern Brazil Across the Seasons Using Nuclear Magnetic Resonance and Chemometrics. In: Fdez-Riverola F, Mohamad M, Rocha M, De Paz J, Pinto T (eds) 11th International Conference on Practical Applications of Computational Biology & Bioinformatics. PACBB 2017. *Advances in Intelligent Systems and Computing*, vol 616. Springer, Cham

Castellanos-Barriga LG, Santacruz-Ruvalcaba F, Hernández-Carmona G, Ramírez-Briones E, Hernández-Herrera RM (2017) Effect of

seaweed liquid extracts from *Ulva lactuca* on seedling growth of mung bean (*Vigna radiata*). J Appl Phycol DOI 29:2479-2488

Chojnacka K, Saeid A, Witkowska Z, Tuhy L (2012) Biologically active compounds in seaweed extracts - the prospects for the application. Open Conf Proc J 3:20-28

Colucci MG, Apone F, Chrispeels MJ (2013) Method for the preparation of a composition based on 4-hydroxyproline and uses thereof in the agronomical field. US Patent 8349770

Craigie JS (2011) Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. J Appl Phycol 23:371-393

Davis GDJ (2017) Seawade Metabolite Database. available in: <http://www.swmd.co.in/>

Einhellig FA (1995) Mechanism of action of allelochemicals in allelopathy. In Allelopathy: Organisms, Processes and Applications. Washington, DC, pp 96–116

El-Din SMM, El-Ahwany AMD (2016) Bioactivity and phytochemical constituents of marine red seaweeds (*Jania rubens*, *Corallina mediterranea* and *Pterocladia capillacea*). J Taibah Univ Sci 10: 471-484

FAO FishStatPlus Database (2017) Global Aquaculture Production (online query). <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en>. Accessed 24 August 2017

Ganeteg U, Ahmad I, Jämtgård S, Agetoni-Cambui C, Inselbacher E, Svennerstam H, Schmidt S, Näsholm T (2017) Amino acid transporter mutants of *Arabidopsis* provides evidence that a non mycorrhizal plant acquires organic nitrogen from agricultural soil. Plant, Cell & Environ 40: 413-423

Hartmann M, Kim D, Bernsdorff F, Ajami-Rashidi Z, Scholten N, Schreiber S, Zeider T, Schuck S, Reichel-Deland V, Zeier J (2017) Biochemical principles and functional aspects of pipercolic acid biosynthesis in immunity. Plant Phys 174:124-153

Hayashi L, Santos AA, Faria GSM, Nunes BG, Souza MS, Fonseca ALD, Barreto PLM, Oliveira EC, Bouzon ZL (2011) *Kappaphycus*

alvarezii (Rhodophyta, Areschougiaceae) cultivated in subtropical waters in Southern Brazil. J Appl Phycol, 23: 337-343

He JX, Fujioka S, Li TC, Kang SG, Seto H, Takatsuto S, Yoshida S, Jang JC (2003) Sterols regulate development and gene expression in Arabidopsis. Plant Phys 131: 1258-1269

Hernández-Herrera RM, Santacruz-Ruvalcaba F, Ruiz-López MA, Norie J, Hernández-Carmona G (2014) Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.) J Appl Phycol 25:619-628

Horváth E, Pál M, Szalai G, Páldi E, Janda T (2007) Exogenous 4-hydroxybenzoic acid and salicylic acid modulate the effect of short-term drought and freezing stress on wheat plants. Biologia Plantarum 51: 480-487

Hurtado AQ, Joe M, Sanares RC, Fan D, Prithiviraj B, Critchley AT (2012) Investigation of the application of Acadian Marine Plant Extract Powder (AMPEP) to enhance the growth, phenolic content, free radical scavenging, and iron chelating activities of *Kappaphycus* Doty (Solieriaceae, Gigartinales, Rhodophyta). J Appl Phycol 24:601-611

Jayaraj J, Wan A, Rahman M, Punja ZK (2008) Seaweed extract reduces foliar fungal diseases on carrot. Crop Prot 27:1360-1366

Kumari R, Kaur I, Bhatnagar AK (2011) Effect of aqueous extract of *Sargassum johnstonii* Setchell & Gardner on growth, yield and quality of *Lycopersicon esculentum* Mill. J Appl Phycol 23:623-633

Kumar NA, Vanlalzarzova B, Shildar S, Baluswami M (2012) Effect of liquid seaweed fertilizer of *Sargassum wightii* Grev. on the growth and biochemical content of green gram (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek). Rec Res Sci Tech 4:40-45

Latique S, Elouaer MA, Chernane J, Hannachi C, Elkaoua M (2014) Effect of seaweed liquid extract of *Sargassum vulgare* on growth of durum wheat seedlings (*Triticum durum* L.) under salt stress. International J Innovation Appl Stud 4:1430-1435

Liu F, Wang W, Sun X, Liang Z, Wang F (2014) RNA-Seq revealed complex response to heat stress on transcriptomic level in *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyta). *J Appl Phycol* 25:1585-1596

Lupini A, Araniti F, Sunseri F, Abenavoli MR (2014) Coumarin interacts with auxin polar transport to modify root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul* 74: 23-31

MacDonald JE, Hacking J, Weng Y, Norrie J (2013) Effects of *Ascophyllum nodosum* extract application in the nursery on root growth of containerized white spruce seedlings. *Can J Plant Sci* 93:735-739

Maheswari MU, Reena A, Sivaraj C (2017) GC-MS analysis, antioxidant and antibacterial activity of the brown algae, *Padina tetrastomatica*. *Intern J Pharm Sci Res* 8: 4014-4020

Maloney GS, DiNapoli KT, Munday GK (2014) The anthocyanin reduced tomato mutant demonstrates the role of flavonols in tomato lateral root and root hair development. *Plant Physiol* 166:614-631

Mansori M, Chernane H, Latique S, Benaliat A, Hsissou D, Kaoua ME (2016). Effect of seaweed extract (*Ulva rigida*) on the water deficit tolerance of *Salvia officinalis* L. *J Appl Phycol* 28:1363-1370

Maruyama-Nakashita A, Hirai MY, Funada S, Fueki S (2010) Exogenous application of 5-aminolevulinic acid increases the transcript levels of sulfur transport and assimilatory genes, sulfate uptake, and cysteine and glutathione contents in *Arabidopsis thaliana*. *Soil Sci Plant Nut* 56: 281-288

Mattner SW, Wite D, Riches DA, Porter IJ, Arioli T (2013) The effect of kelp extract on seedling establishment of broccoli on contrasting soil types in southern Victoria, Australia. *Biol Agric Hort* 29:258-270

Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M. (1998) *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science* 282:662-682

Paula EJ, Erbert C, Pereira RTL (2001) Growth rate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) *in vitro*. *Phycol Res* 49:155-161

- Pedra AGLM, Ramlov F, Maraschin M, Hayashi L (2017) Cultivation of the red seaweed *Kappaphycus alvarezii* with effluents from shrimp cultivation and brown seaweed extract: Effects on growth and secondary metabolism. *Aquaculture*, 479: 297-303
- Peer WA and Murphy AS (2007) Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends Plant Sci* 12:556-563
- Pires CM (2017) Aproveitamento do efluente da carcinicultura de *Litopenaeus vannamei* em sistema biofoco pela macroalga *Kappaphycus alvarezii*. Dissertation, Federal University of Santa Catarina
- Raggi V (2000) Hydroxyproline-rich glycoprotein accumulation in tobacco leaves protected against *Erysiphe cichoracearum* by potato virus Y infection. *Plant path* 49: 179-186
- Rayorath P, Jithesh MN, Farid A, Khan W, Palanisamy R, Hankins SD, Critchley AT, Prithviraj B (2008) Rapid bioassays to evaluate the plant growth promoting activity of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. using a model plant, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *J Appl Phycol* 20:423-429
- Ritter A, Dittami SM, Goulitquer S, Correa JA, Boyen C, Potin P, Tonon T (2014) Transcriptomic and metabolomic analysis of copper stress acclimation in *Ectocarpus siliculosus* highlights signaling and tolerance mechanisms in brown algae. *BMC Plant Biol* 14:116
- Sanchez-Serrano JJ, Salinas J (2014) *Arabidopsis* Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, New York
- Schiavon M, Moro I, Pillon-Smits EAH, Matozzo V, Malagoli M, Vecchia FD (2012) Accumulation of selenium in *Ulva* sp. and effects on morphology, ultrastructure and antioxidant enzymes and metabolites. *Aquatic toxicol* 122-123:222-231
- Schiener P, Black KD, Stanley MS, Green DH (2015) The seasonal variation in the chemical composition of the kelp species *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina latissima* and *Alaria esculenta*. *J. Appl. Phycol*, 27: 363-373

Sasikala M, Indumathi E, Radhika S, Sasireka R (2016) Effect of Seaweed extract (*Sargassum tenerrimum*) on seed germination and growth of tomato plant (*Solanum lycopersicum*). International J Chem Tech Res 9:285-293

Stirk WA, Tarkowska D, Turecova V, Strnad M, van Staden J (2014) Abscisic acid, gibberellins and brassinosteroids in Kelpak®, a commercial seaweed extract made from *Ecklonia maxima*. J. Appl. Phycol, 26: 561-567

Vriet C, Russinova E, Reuzeau C (2013) From squalene to brassinolide: the steroid metabolic and signaling pathways across the plant kingdom. Mol Plant 6: 1738:1757

Wei D, Chen D, Lou Y, Ye Y, Yang R (2016) Metabolomic profile characteristics of *Pyropia haitanensis* as affected by harvest time. Food Science and Technology Research. 22: 529-536

Zacarias AA, Moresco HH, Horst H, Brighente IMC, Marques MCA, Pizzollati MG (2007). Determinação do teor de fenólicos e flavonóides no extrato e frações de *Tabebuia heptaphylla*. 30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, SP, 2007. CD-ROM.

Zodape ST, Mukherjee S, Reddy MP, Chaudhary DR (2009) Effect of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex Silva extract on grain quality, yield and some yield components of wheat (*Triticum aestivum* L.).Int J Plant Prod 3:97-101

Zubia M, Freile-Pelegrín Y, Robledo D (2014) Photosynthesis, pigment composition and antioxidant defences in the red alga *Gracilariaopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta) under environmental stress. J Appl Phycol 26:2001-2010

CAPÍTULO 2

Efeitos de extratos de *Kappaphycus alvarezii* e *Sargassum filipendula* na germinação e desenvolvimento de rabanete (*Raphanus sativus*) em estresse por alta temperatura

¹Neves FAS*, ³Simioni C, ²Ramlov F, ²Maraschin M, ¹Hayashi L

¹ Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brasil

² Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, UFSC

³ Laboratório de Biologia Celular Vegetal, UFSC

* Corresponding author: filipeficologia@hotmail.com

Resumo

Com as temperaturas em elevação devido às Mudanças Climáticas, existe a necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias para proteger plantas agrícolas do excesso de calor. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de extratos aquosos obtidos sob pressão de *Kappaphycus alvarezii* e *Sargassum filipendula* na germinação e crescimento do rabanete (*Raphanus sativus*) em estresse por alta temperatura. Primeiro, o rendimento dos extratos foi avaliado para ambas as espécies e, posteriormente, estes extratos foram aplicados em sementes cultivadas em 25 °C e 35 °C. Os extratos também foram testados em plantas cultivadas *outdoor* no verão. *K. alvarezii* produziu três vezes mais extratos que *S. filipendula* ($36,76 \pm 3,02\%$ e $12,60 \pm 1,93\%$ da massa seca, respectivamente), enquanto o extrato de *S. filipendula* estimulou a germinação de sementes cultivadas em 35 °C em concentração cinco vezes mais baixa ($0,01 \text{ mg mL}^{-1}$) que o extrato de *K. alvarezii* ($0,05 \text{ mg mL}^{-1}$) ($89,50 \pm 1,88\%$ e $89,50 \pm 4,35\%$, respectivamente) igualando às taxas de germinação das plantas cultivadas em 25 °C (de $87,50 \pm 4,04\%$ a $98,50 \pm 1,88\%$). As análises morfo-histológicas demonstraram alterações morfológicas nas plântulas cultivadas em alta temperatura, no entanto não foi observada diferença no conteúdo de enzimas antioxidantes entre os tratamentos. As plantas cultivadas *outdoor* não apresentaram diferença significativa entre plantas não tratadas ou tratadas, independente do extrato. Sugere-se que os resultados observados são decorrentes da presença de substâncias bioestimulantes, tais como fitormônios, presentes nos extratos. Foi concluído que os extratos das macroalgas estimulam a germinação em altas temperaturas sem interferir no desenvolvimento das plantas.

Palavras-chave: bioestimulantes, extratos de macroalgas, germinação, rabanete, estresse de alta temperatura.

Abstract

In a global warming scenario, new technologies to improve crop plants against high temperature are required. The aim of this work was to evaluate the effects of high pressure aqueous extracts from *Kappaphycus alvarezii* and *Sargassum filipendula* on radish (*Raphanus sativus*) germination and growth. First, seaweed extract yield was evaluated. After, those extracts were applied to radish seeds cultivated under 25 °C and 35 °C. Seaweed extracts were also tested in plants cultivated outdoor in the summer. *K. alvarezii* produced three times more extract than *S. filipendula* ($36.76 \pm 3.02\%$ and $12.60 \pm 1.93\%$ of dry weight, respectively), while *S. filipendula* extract stimulated seed germination under 35 °C in concentration five times lower (0.01 mg mL^{-1}) than *K. alvarezii* extract (0.05 mg mL^{-1}) ($89.50 \pm 1.88\%$ e $89.50 \pm 4.35\%$, respectively), equaling to the germination rates from plants cultivated under 25 °C (ranging from $87,50 \pm 4,04\%$ to $98,50 \pm 1,88\%$). Morpho-histological analyses showed morphological alterations in plants germinated under high temperature, although no differences were observed in antioxidant enzymes. Plants cultivated outdoor did not present significant difference among plants treated or not, regardless of the extracts. Based on the results, we suggested that the effects observed are due to biostimulant compounds, such as phytohormones, in the extracts. We concluded that seaweed extracts stimulate germination under high temperature without interfere with plant development.

Key words: biostimulants, seaweed extracts, germination, radish, high temperature stress.

Introdução

A temperatura média global tem aumentado a cada ano devido às atividades antrópicas, desde a era pré-industrial. De acordo com o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC) (IPCC, 2014), estima-se que o aumento da temperatura até o ano de 2100 pode alcançar de 1 °C, no cenário mais otimista, a 4 °C, no cenário mais pessimista. Dentre possíveis problemas ambientais atribuídos ao aquecimento global, acredita-se que eventos de ondas de calor serão mais frequentes e longos, o que pode ocasionar perdas na produção agrícola. Conforme relatado por Bisbis et al. (2018) e Yamori et al. (2014), a maioria das espécies agrícolas apresentam metabolismo C₃, cuja temperatura ideal de crescimento situa-se na faixa de 20 a 32 °C, e o aquecimento global pode contribuir com aumento da produção de tais espécies de plantas, desde que a temperatura não exceda seu limite em situações de ondas de calor, por exemplo.

Apesar do estresse causado por altas temperaturas estar frequentemente associado a outros tipos de estresse, como ressecamento ou estresse salino, a temperatura elevada por si só acarreta em alterações moleculares, celulares e morfológicas em plantas, refletindo em sua germinação e desenvolvimento inicial até seu crescimento e frutificação (Bita e Gerats, 2013).

Neste contexto, extratos de macroalgas podem ser utilizados para aumentar a resistência das plantas contra os danos causados pelo aumento de temperatura. Esses extratos são conhecidos por conter uma ampla gama de compostos, tais como lipídeos, carboidratos, aminoácidos, compostos fenólicos, hormônios e fitorreguladores vegetais (Chojnacka et al., 2012). Tais compostos, mesmo em pequenas concentrações, podem desencadear processos sistêmicos de resistência adquirida, estimulando o crescimento ou resistência de plantas vasculares ao estresse abiótico. Por exemplo, extratos de *Ecklonia maxima* reduziram os danos causados por cloreto de sódio (NaCl) em plantas de abobrinha (*Cucurbita pepo* L.) (Rouphael et al. 2017) e extratos de *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jollis melhoraram a capacidade de plantas de *Arabidopsis thaliana* em tolerar o estresse por ressecamento (Staniello et al. 2017), assim como melhoram sua tolerância ao congelamento (Rayorath et al., 2009).

Com relação ao estresse por altas temperaturas, poucos trabalhos foram observados nos quais foram utilizados extratos de macroalgas como agente de mitigação em plantas vasculares. Dentre estes, pode-se citar os trabalhos de Zhang et al. (2008, 2010) com extratos de *A.*

nodosum em plantas de capim-panasco (*Agrostis stolonifera* L.), onde os autores observaram que a aplicação repetida dos extratos eleva significativamente os conteúdos de clorofilas a e b nas plantas submetidas a altas temperaturas. O mesmo grupo também observou que o pré-tratamento de festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb.) com os mesmos extratos em combinação com ácidos húmicos estimula o enraizamento em temperatura elevada (Zhang et al. 2003). Com base nesses trabalhos, sugere-se que outras espécies de macroalgas, tais como *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex Silva e *Sargassum filipendula* C.Agardh, possam ter efeito protetor contra o calor em plantas agrícolas, uma vez que essas crescem em regiões tropicais e, portanto, podem produzir substâncias que as protegem das altas temperaturas.

O rabanete (*Raphanus sativus* L.) é uma planta da família da couve e do repolho (Brassicaceae), que produz uma raiz tuberosa comestível. Originária do Mediterrâneo, é resistente ao frio e geadas, no entanto não é resistente ao calor excessivo (Smartt e Simmonds, 1995). Devido a este fato, e por possuir ciclo de vida curto de aproximadamente 30 dias, a espécie é pertinente ao uso como modelo de vegetal comercial para experimentos com temperaturas elevadas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o rendimento de extratos aquosos das macroalgas *Kappaphycus alvarezii* e *Sargassum filipendula*, bem como o efeito destes extratos em: a) germinação e crescimento de radícula de plântulas de rabanete (*Raphanus sativus* var. sparkler) cultivados por 48 h em duas temperaturas: 25 e 35 °C; b) estresse oxidativo de sementes germinadas sob as temperaturas de 25 e 35 °C, por meio da análise de enzimas antioxidantes; e c) desenvolvimento completo de plantas de rabanete cultivados *outdoor* no verão.

Material e Métodos

Talos de tetrasporófito verde de *Kappaphycus alvarezii* provenientes do cultivo da Seção de Macroalgas do Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LCM – UFSC) foram aclimatados por 7 dias nas seguintes condições: água do mar (35‰) esterilizada por radiação UV enriquecida com solução de von Stosch 50% (VS50), densidade de 7 g L⁻¹, irradiância de 100 ± 10 μmol fótons m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 12 h, temperatura de 25 ± 1 °C e aeração constante (Paula et al. 2001).

Talos de *Sargassum filipendula* foram coletados na praia do Sambaqui - Florianópolis, Brasil (27°29'25.398"S/ 48°32'14.530"W),

limpos de organismos associados e aclimatados por 7 dias nas mesmas condições descritas acima para *K. alvarezii*.

Após a semana de aclimação, as macroalgas foram dessalinizadas por submersão em solução de 0,5 M de formiato de amônio, seguido de lavagem por diversas vezes em água destilada. Na sequência, as algas foram liofilizadas e estocadas em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior preparo dos extratos, realizado no Laboratório de Morfologia e Bioquímica Vegetal (LMBV - UFSC). As macroalgas secas foram trituradas em nitrogênio líquido com auxílio de um cadinho. Para cada grama de massa seca foi adicionado 20 mL de água destilada em um aparelho de ultrapressão (Mazzarino et al. 2018) mantido sob a pressão de 100 psi (aproximadamente 7 kgf cm^{-2}) por 1 hora. Posteriormente, a fase líquida foi coletada e o procedimento foi repetido para otimização da extração. Na sequência, a fase líquida foi centrifugada (2000 rpm por 10 min), o sobrenadante foi coletado, liofilizado e o extrato obtido foi estocado sob refrigeração ($-4\text{ }^{\circ}\text{C}$) até a utilização nos experimentos subsequentes.

Germinação de sementes de rabanete

Cinquenta sementes por repetição, em quadruplicata ($n = 4$), de rabanete (*Raphanus sativus* var. sparkler) foram embebidas em água destilada com extratos das macroalgas em concentrações de 0,01, 0,03, 0,05 e 0,10 mg mL^{-1} em câmaras de cultivo, no escuro, sob a temperatura de $25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou $35 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo a primeira a temperatura ideal de cultivo da espécie e a segunda uma temperatura facilmente alcançada em eventos de ondas de calor. Como controle, as sementes foram embebidas em água destilada sem adição de extrato. Após 8 horas, as sementes foram transferidas para placas de Petri sob papéis filtro, umedecidos com 3 mL g^{-1} de água destilada. As placas foram seladas com filme de plástico PVC para reduzir a evaporação e mantidas em câmara de germinação no escuro por 48 h nas duas temperaturas. Na sequência, as sementes foram retiradas, e as plantas em processo de germinação foram contadas e fotografadas. Três amostras por tratamento ($n=3$) foram coletadas aleatoriamente e fixadas em glutaraldeído para posterior análise morfo-histológica.

Desenvolvimento de plantas cultivadas *outdoor*

Foram utilizados potes plásticos com capacidade de 500 mL preenchidos com 300 g de substrato próprio para cultivo de hortaliças

(Tropstrato Hortaliças HA®). Três sementes foram semeadas por pote à profundidade de 1 – 1,5 cm e regados com água até a saturação do substrato. Após a germinação (4 dias) as plântulas menos vigorosas foram retiradas deixando apenas uma planta por pote. As plântulas que germinaram após este período também foram excluídas. Cada pote contendo uma plântula em desenvolvimento foi considerado uma unidade amostral. As regas foram realizadas diariamente até a saturação do substrato. Foram realizadas duas aplicações de extratos das macroalgas, uma no décimo e outra no vigésimo dia após a semeadura. As concentrações utilizadas foram 0,01, 0,03, 0,05 e 0,10 mg mL⁻¹ em volume de 100 mL por unidade amostral. Como controle, plantas foram tratadas com aplicação de 100 mL de água, sem adição de extrato. O experimento foi conduzido em 5 unidades amostrais por repetição, em 5 repetições por tratamento (n = 5). Após trinta dias contados a partir da semeadura, as plantas foram coletadas e foram realizadas biometrias das partes aéreas e das raízes tuberosas.

Análise morfo-histológica

As análises morfo-histológicas foram conduzidas conforme o descrito por Ouriques et al. (2017). Amostras previamente fixadas por 12 h com 2,5 % de glutaraldeído em tampão de cacodilato 0,1 M e sacarose 0,2 M foram utilizadas. Para Microscopia de Luz (ML) e citoquímica, as amostras foram desidratadas em série etílica e infiltradas em historesina. Secções finas (5 µm) foram tratadas com ácido periódico de Schiff (PAS) para identificar polissacarídeos neutros, ou com azul de toluidina (ATO) para identificar carboidratos ácidos de parede. As secções foram examinadas em microscópico de epifluorescência (Olympus BX41, Tóquio, Japão) sob aumento de 100 e 400 x.

Análise de enzimas anti-oxidantes

Plântulas do experimento de germinação referentes ao controle e aos tratamentos com extratos das macroalgas em concentração de 0,05 mg mL⁻¹ foram avaliadas quanto ao conteúdo de proteína de acordo com o descrito por Aguilera et al. (2002), com modificações. Amostras de 150 mg de plântulas foram trituradas com auxílio de nitrogênio líquido. Foram adicionados 150 µL de solução de Bradford (907 µL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, 0,1 g de PVP-40, 2,5 µL de Triton X-100, 50 µL de DTT 20 mM, 20 µL de EDTA 5 mM e 20 µL de PMFS 50 mM). As amostras foram mantidas em gelo ao abrigo de luz por 20

minutos. Posteriormente, foram centrifugadas por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante coletado (extrato bruto) e utilizado nas análises subsequentes.

Para a quantificação das proteínas, 200 µL do extrato bruto foi adicionado a 1 mL de álcool isopropílico a 4 °C e mantido por 15 minutos no freezer. Após esse período, a solução foi centrifugada, o sobrenadante descartado e ao pellet foi adicionado 100 µL de solução de 3% de NaCl. Na sequência, 10 µL da solução resultante foi adicionada a 290 µL de solução de Bradford e, após 15 minutos no escuro, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 295 nm (Aguilera et al., 2002, com modificações).

Para a quantificação da superóxido dismutase (SOD), 20 µL do extrato bruto foi adicionado a 280 µL de solução tampão de extração (120 mL de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, 0,2328 g de L-metionina, 0,0072 g de NBT, 228 µL de EDTA 68,44 µM e 4,48 mL de riboflavina 53,14 µM). A reação foi realizada em duplicata, sendo que uma foi mantida no escuro enquanto a outra foi mantida sob luz por 10 minutos. Após esse período, as amostras foram avaliadas em espectrofotômetro a 560 nm (Giannopolitis e Ries, 1977).

Para a quantificação da catalase (CAT), 20 µL do extrato bruto foram adicionados a 280 µL de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0). Foram adicionadas às amostras H₂O₂ 100 mM aos poucos até que a absorbância apresentasse valores entre 0,38 e 0,40 (aproximadamente 5 gotas). Posteriormente, o decréscimo nos níveis de H₂O₂ foi monitorado durante 10 minutos em espectrofotômetro a 240 nm (Aguilera et al., 2002, com modificações).

Para a quantificação do guaiacol peroxidase (POX), 20 µL do extrato bruto foi adicionado a 280 µL da solução tampão de reação. Nos 20 µL da solução resultante foi adicionado 24 µL de guaiacol, 29 µL de H₂O₂ e 227 µL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0. A absorbância foi avaliada em espectrofotômetro (470 nm) por 50 min a 30 °C (Hammerschmidt et al. 1982, com modificações).

Análise de Dados e Estatística

Os dados de rendimento de extratos foram submetidos a teste de t de student, considerando-se três extrações para *K. alvarezii* (n = 3) e 5 extrações para *S. filipendula* (n = 5). Os experimentos de germinação de sementes de rabanete foram conduzidos em quadruplicata (n = 4), cada

uma com 50 sementes. Ao final de 48 horas, foram contadas as sementes germinadas e os valores foram transformados em frequência. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentavam emissão de radícula de, no mínimo, 2 mm de comprimento. Aos valores de frequência germinativa foram aplicados os testes de Shapiro-Wilk e de Levene para constatar a normalidade e homocedasticidade dos dados. Como estes não obtiveram os valores mínimos exigidos para cumprir os requisitos da Análise de variância (ANOVA), os dados foram transformados em arco seno da raiz quadrada da frequência e foram aplicados novamente os testes de Shapiro-Wilk e de Levene. Como desta vez os dados cumpriram os requisitos mínimos, foram aplicados testes de ANOVA uni ou multifatoriais, seguidos de teste Tukey HSD. Os dados são apresentados em porcentagem de sementes germinadas \pm intervalo de confiança ($p \leq 0,05$). As biometrias das partes aéreas e das raízes tuberosas das plantas cultivadas *outdoor* foram submetidas a testes de ANOVA, respeitando-se os preceitos de homocedasticidade e homogeneidade e, caso fossem encontradas diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$), estes seriam submetidos a testes *post-hoc*. Toda a manipulação de dados e Análise Estatística foi realizada com auxílio do software R-Studio, disponível para o ambiente R.

Resultados

Rendimento dos extratos

O rendimento do extrato aquoso obtido sob pressão foi significativamente superior em *K. alvarezii* ($36,76 \pm 3,02$ % massa seca⁻¹) comparado ao extrato de *S. filipendula* ($12,60 \pm 1,93$ % massa seca⁻¹) (Fig. 6).

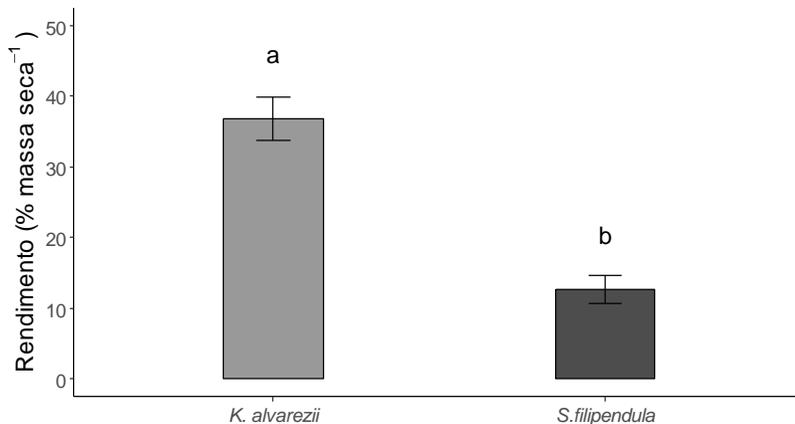


Figura 7 Rendimento (% massa seca) de extratos de *Kappaphycus alvarezii* e *Sargassum filipendula* após extração aquosa de 2 h (= 1 h + 1 h) sob pressão de 100 psi. As barras de erro apresentam o intervalo de confiança de 95 % para três extrações de *K. alvarezii* (n = 3) e cinco extrações de *S. filipendula* (n = 5). As letras apresentam as diferenças entre as espécies segundo o teste t de student

Germinação de sementes de rabanete

As sementes cultivadas em 25 °C não apresentaram diferenças significativas na germinação entre as diferentes concentrações de extratos de *K. alvarezii* (95,0 ± 4,1% a 99,5 ± 1,0%). A germinação em 25 °C foi significativamente superior a germinação em 35 °C quando as sementes foram tratadas com concentrações menores ou iguais a 0,03 mg mL⁻¹ (≤ 75,5 ± 5,1%). No entanto, quando tratadas com concentrações mais altas (0,05 e 0,10 mg mL⁻¹), a germinação (89,5 ± 4,3 e 91,5 ± 5,1 %) não apresentou diferença entre as diferentes temperaturas (Fig. 7).

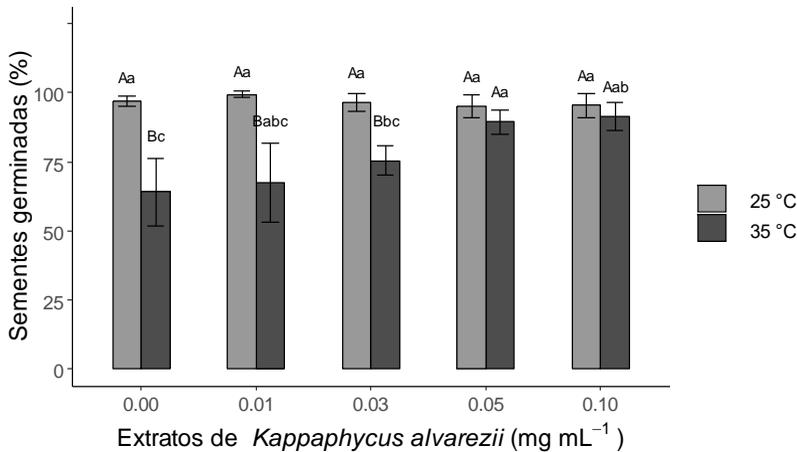


Figura 8 Porcentagem de sementes de rabanete germinadas por 48 h em duas temperaturas (25 °C e 35 °C) após o tratamento de imersão por 8 h em 4 concentrações de extratos de *Kappaphycus alvarezii* (0,01, 0,03, 0,05 e 0,10 mg mL⁻¹). Como controle, as sementes foram tratadas com água destilada. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%, as letras maiúsculas apontam as diferenças significativas ($p < 0,05$, $n = 4$) entre os grupos tratados com diferentes temperaturas e as letras minúsculas apontam as diferenças significativas entre os grupos tratados com as diferentes concentrações de extratos segundo o teste de ANOVA bifatorial e posterior teste de Tukey

De forma similar, as sementes tratadas com extrato de *S. filipendula* apresentaram maior taxa de germinação em temperatura de 25 °C ($98,0 \pm 1,6$ a $98,5 \pm 1,9$ %) sem apresentar diferenças significativas entre as diferentes concentrações de extratos, assim como as cultivadas em 35 °C tratadas com 0,01 a 0,05 mg mL⁻¹ de extrato. Em temperatura de 35 °C, as sementes tratadas com o extrato em concentrações de 0,01 a 0,05 mg mL⁻¹ apresentaram germinação significativa maior ($89,5 \pm 1,9$ a $96,5 \pm 3,0$ %) às plantas não tratadas e as tratadas com concentração de 0,10 mg mL⁻¹ ($67,5 \pm 6,9$ e $87,5 \pm 4,0$ %) (Fig. 8).

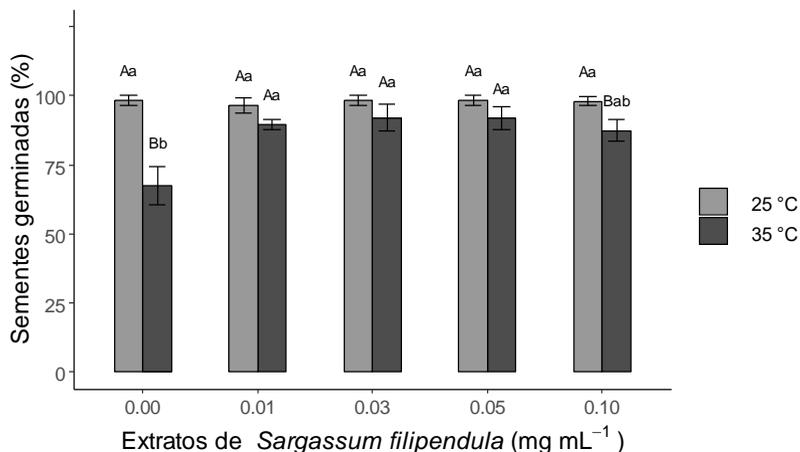


Figura 9 Porcentagem de sementes de rabanete germinadas por 48 h em duas temperaturas (25 °C e 35 °C) após o tratamento de imersão por 8 h em 4 concentrações de extratos de *Sargassum filipendula* (0,01, 0,03, 0,05 e 0,10 mg mL⁻¹). Como controle, as sementes foram tratadas com água destilada. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%, as letras maiúsculas apontam as diferenças significativas ($p < 0,05$, $n = 4$) entre os grupos tratados com diferentes temperaturas e as letras minúsculas apontam as diferenças significativas entre os grupos tratados com as diferentes concentrações de extratos segundo o teste de ANOVA bifatorial e posterior teste de Tukey

Com relação ao crescimento de radícula, as plântulas cultivadas em temperatura de 25 °C apresentaram raízes tuberosas significativamente mais compridas do que plântulas cultivadas em 35 °C. Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas no comprimento entre as diferentes concentrações, tanto para os extratos de *K. alvarezii* (Fig. 9), quanto para os extratos de *S. filipendula* (Fig. 10).

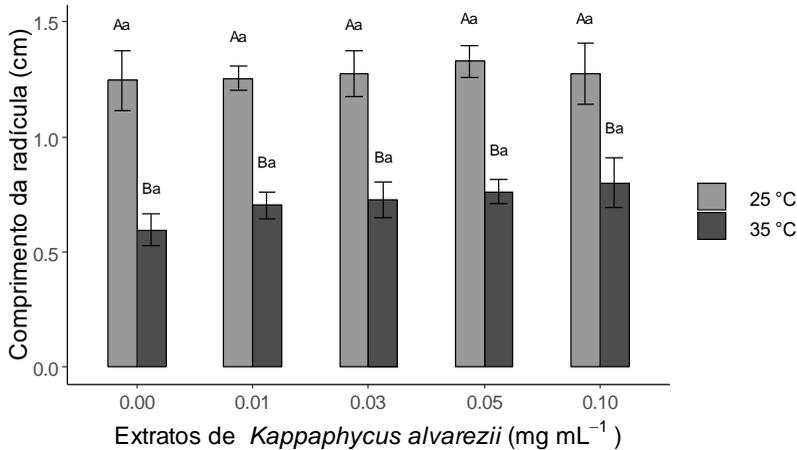


Figura 10 Comprimento das radículas (cm) emitidas por plântulas de rabanete germinadas por 48 h em duas temperaturas (25 °C e 35 °C) após o tratamento de imersão por 8 h em 4 concentrações de extratos de *Kappaphycus alvarezii* (0,01, 0,03, 0,05 e 0,10 mg mL⁻¹). Como controle, as sementes foram tratadas com água destilada. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%, as letras maiúsculas apontam as diferenças significativas ($p < 0,05$, $n = 4$) entre os grupos tratados com diferentes temperaturas e as letras minúsculas apontam as diferenças significativas entre os grupos tratados com as diferentes concentrações de extratos segundo o teste de ANOVA bifatorial e posterior teste de Tukey

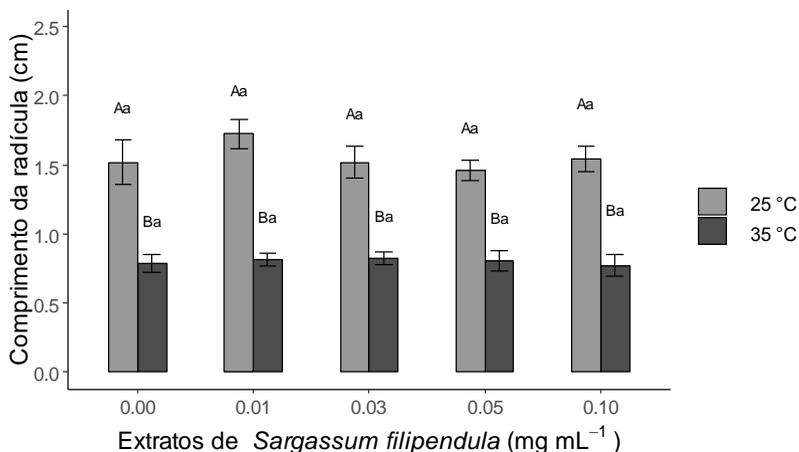


Figura 11 Comprimento das radículas (cm) emitidas por plântulas de rabanete germinadas por 48 h em duas temperaturas (25 °C e 35 °C) após o tratamento de imersão por 8 h em 4 concentrações de extratos de *Sargassum filipendula* (0,01, 0,03, 0,05 e 0,10 mg mL⁻¹). Como controle, as sementes foram tratadas com água destilada. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%, as letras maiúsculas apontam as diferenças significativas ($p < 0,05$, $n = 4$) entre os grupos tratados com diferentes temperaturas e as letras minúsculas apontam as diferenças significativas entre os grupos tratados com as diferentes concentrações de extratos segundo o teste de ANOVA bifatorial e posterior teste de Tukey

Desenvolvimento de plantas cultivadas *outdoor*

As plantas cultivadas em condições de campo, não controladas, não apresentaram diferença estatística entre plantas não tratadas ou tratadas com os extratos de ambas as espécies de macroalgas, tanto para a biomassa da parte aérea (Fig. 11), quanto para a biomassa da raiz tuberosa (Fig. 12).

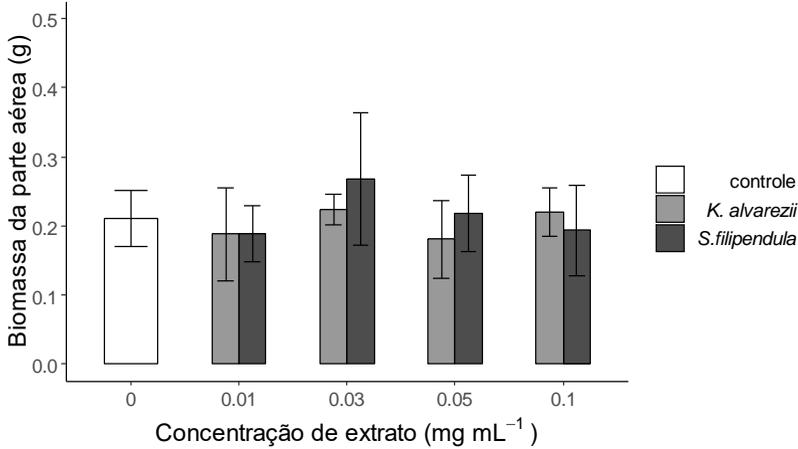


Figura 12 Biomassa (g) da parte aérea de plantas de rabanete cultivadas por 30 dias *outdoor*. As plantas foram tratadas duas vezes (10^o e 20^o dia) com 100 mL de extratos *Kappaphycus alvarezii* e *Sargassum filipendula* em 4 concentrações (0,01, 0,03, 0,05 e 0,10 mg mL⁻¹). Como controle, as plantas foram tratadas com água destilada. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95% (n = 5)

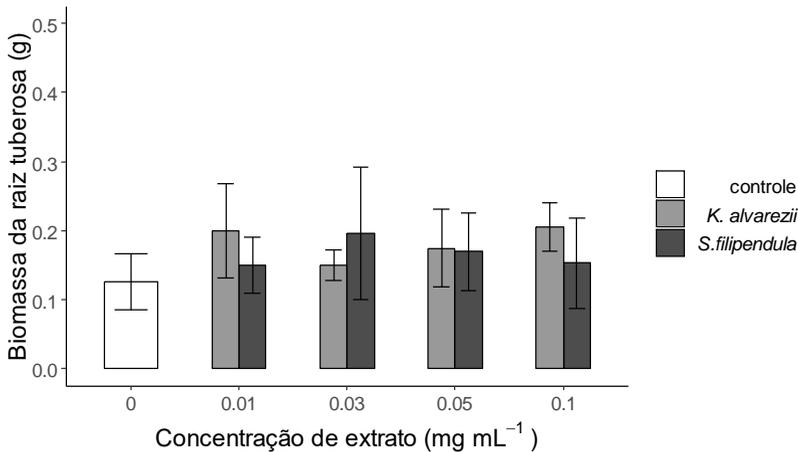


Figura 13 Biomassa (g) das raízes tuberosas produzidas por plantas de rabanete cultivadas por 30 dias *outdoor*. As plantas foram tratadas duas vezes (10^o e 20^o dia) com 100 mL de extratos *Kappaphycus alvarezii* e *Sargassum filipendula* em 4 concentrações (0,01, 0,03, 0,05 e 0,10 mg mL⁻¹). Como controle, as plantas foram tratadas com água destilada. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95% (n = 5)

Análises morfo-histológicas e de enzimas antioxidantes

Em temperatura de 35 °C, as raízes tuberosas das plântulas apresentaram acúmulo de polissacarídeos ácidos na camada da epiderme, o que não foi observado nas raízes tuberosas das plântulas cultivadas em temperatura de 25 °C (Fig. 13). Ainda, observou-se que as raízes tuberosas das plântulas, de forma geral, apresentavam acúmulo de grãos de amido na região próxima ao cilindro vascular, enquanto que em temperatura de 35 °C estes apresentaram-se espalhados ao longo do corte transversal. Foi observado que o cilindro vascular estava desorganizado em plantas tratadas com o extrato de *S. filipendula* e 35 °C (Fig. 14).

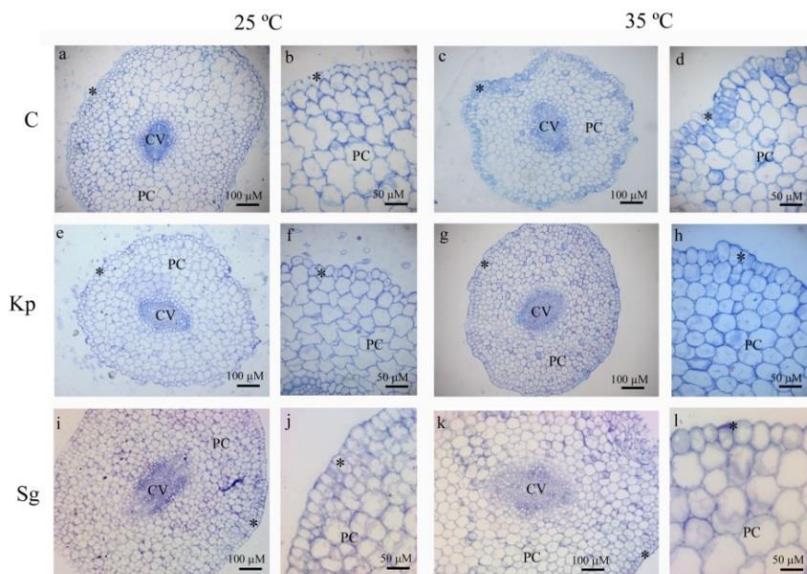


Figura 14 Secções transversais de raízes tuberosas de plântulas de rabanete tratados com azul de toluidina (ATO) após 48 horas de germinação em duas temperaturas. Plantas não tratadas (controle - c) em temperaturas de: a e b) 25 °C, c e d) 35 °C; plantas tratadas com 0,05 mg mL⁻¹ de extratos de *Kappaphycus alvarezii* (KP) em temperaturas de: e e f) 25 °C, g e h) 35 °C; plantas tratadas com 0,05 mg mL⁻¹ de extratos de *Sargassum filipendula* (SG) em temperaturas de: i e j) 25 °C, (k e l) 35 °C. PC: parênquima cortical, CV: cilindro vascular e (*): epiderme

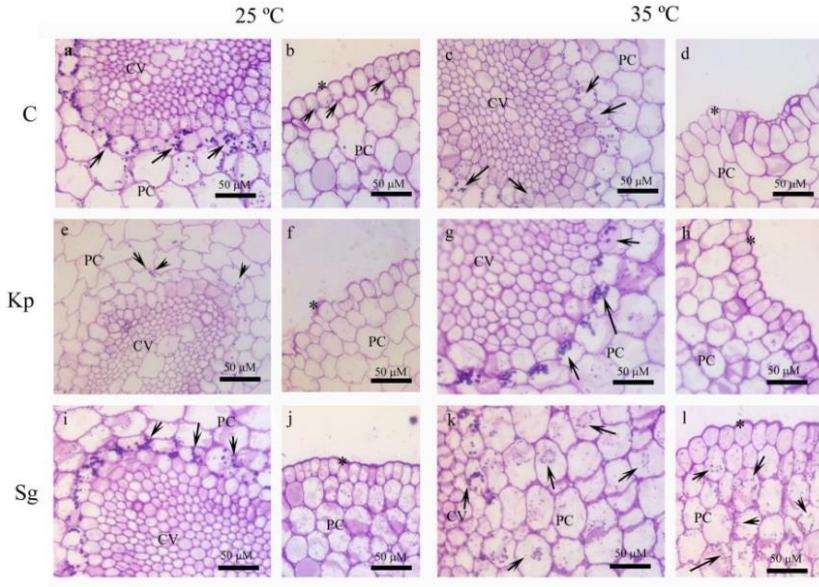


Figura 15 Secções transversais de raízes tuberosas de plântulas de rabanete tratados com ácido periódico de Schiff (PAS) após 48 horas de germinação em duas temperaturas. Plantas não tratadas (controle - c) em temperaturas de: a e b) 25 °C, c e d) 35 °C; plantas tratadas com 0,05 mg mL⁻¹ de extratos de *Kappaphycus alvarezii* (KP) em temperaturas de: e e f) 25 °C, g e h) 35 °C; plantas tratadas com 0,05 mg mL⁻¹ de extratos de *Sargassum filipendula* (SG) em temperaturas de: i e j) 25 °C, (k e l) 35 °C. PC: parênquima cortical, CV: cilindro vascular, (*): epiderme, setas: de grãos de amido

Com relação ao conteúdo de proteínas e enzimas anti-oxidantes, não foram observadas diferenças entre plantas tratadas ou não com os extratos das macroalgas (Tab. 4).

Tabela 4 Conteúdo de proteínas e das enzimas anti-oxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (POX) em plântulas de rabanete (*Raphanus sativus*) em processo de germinação de 48 h. As sementes foram tratadas por 8 h de submersão em: 1) c – controle, água destilada; 2) KP – 0,05 mg mL⁻¹ de extrato de *Kappaphycus alvarezii*; e 3) SG – 0,05 mg mL⁻¹ de extrato de *Sargassum filipendula*. Valores apresentados em média ± intervalo de confiança de 95% (n = 4)

Temperatura (°C)	Tratamentos (mg mL ⁻¹)	Proteínas (mg mL ⁻¹)	CAT (unidades mg protefina ⁻¹)	SOD (unidades mg protefina ⁻¹)	POX (unidades mg protefina ⁻¹)
25 C	c	607 ± 20	0,0056 ± 0,0043	13,08 ± 1,34	0,0049 ± 0,0017
	KP	623 ± 39	0,0041 ± 0,0040	14,31 ± 1,35	0,0121 ± 0,0061
	SG	602 ± 21	sem atividade	12,33 ± 0,62	0,0083 ± 0,0051
35 C	c	616 ± 48	0,0098 ± 0,0113	19,53 ± 2,81	0,0144 ± 0,0079
	KP	597 ± 51	sem atividade	15,98 ± 6,36	0,0111 ± 0,0029
	SG	600 ± 32	0,0100 ± 0,0072	16,46 ± 3,09	0,0076 ± 0,0012

Discussão

K. alvarezii apresentou produção três vezes maior de extrato comparado a *S. filipendula*. *K. alvarezii*, juntamente com outras espécies eucheumatóides, é a macroalga mais produzida no mundo, com produção estimada em mais de dez bilhões de toneladas anuais (FAO, 2018). Porém, a maior parte dessa biomassa é destinada à indústria alimentícia para a produção de ficocolóides, e o desenvolvimento de um novo produto a partir da espécie pode acarretar em conflito de interesse. Por sua vez, foi necessária uma quantidade cinco vezes menor do extrato de *S. filipendula* para estimular a germinação de sementes do rabanete, comparado aos extratos de *K. alvarezii*. Entretanto, *S. filipendula* não é produzida em escala comercial, bem como suas técnicas de cultivo ainda não são estabelecidas. Conforme observado por Hanisak e Samuel (1987), a espécie apresenta altas taxas de crescimento e adapta-se ao cultivo laboratorial, o que indica que esta pode ter seu cultivo comercial estabelecido, desde que haja investimento em pesquisas neste sentido. Neste cenário, cabe à indústria definir se seria mais viável investir na produção de um composto bioestimulante a partir de uma espécie cujo mercado está bem estabelecido, competindo com outros mercados com um novo produto de maior valor agregado ou se é mais interessante

investir esforços para o desenvolvimento de tecnologia de cultivo de uma espécie que ainda não tem utilização comercial.

Com relação às respostas observadas em plantas tratadas, diversos trabalhos têm demonstrado os efeitos positivos de extratos de macroalgas em amenizar o estresse abiótico de plantas agrícolas, porém, a maioria destes trabalhos utilizaram espécies de águas frias (Bonomelli et al. 2018, di Stasio et al. 2018, Rouphael et al. 2017). Ainda, poucos trabalhos avaliaram os efeitos destes extratos em plantas sob o efeito de estresse por altas temperaturas (Zhang et al., 2003, 2008, 2010).

Foi observado que sementes germinadas em temperatura ideal (25 °C) apresentaram taxa de germinação superior a 90%, sendo que os extratos não estimularam ou inibiram sua germinação. Quando germinadas em temperatura elevada (35 °C) as sementes apresentaram menor taxa de germinação, embora, quando tratadas com diferentes concentrações de extratos das macroalgas, estas apresentaram estimulação, equiparando às taxas de germinação de sementes cultivadas em temperatura ideal, dependendo da concentração. Esse fato indica que os extratos das macroalgas contêm substâncias que conferem efeito protetor a altas temperaturas durante o processo germinativo. Cavusoglu e Kabar (2007) relatam que o estresse por altas temperaturas causam alterações dos níveis endógenos de fitorreguladores, diminuindo os níveis de substâncias estimulantes e aumentando os níveis de substâncias inibidoras. Ainda, temperaturas supra-ótimas podem causar alterações no estado da membrana e inibir o processo de embebição da semente, bem como a atuação ou desnaturação de enzimas hidrolases, reduzindo o acesso às reservas de nutrientes (Bewley e Black, 1994).

Outro processo em que a temperatura elevada pode levar à inibição é por meio do aumento do metabolismo. Em temperaturas crescentes, as plantas aumentam as taxas respiratórias e fotossintéticas, o que eleva também a produção de radicais livres levando o vegetal ao estresse oxidativo nas membranas, lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos (Lambers et al., 2008). Com o excesso de temperatura, ocorre ainda a redução dos níveis endógenos de enzimas antioxidantes, tais como catalase e superóxido dismutase, o que leva ao agravamento do estresse oxidativo (Almeselmani et al., 2006). No presente trabalho, alterações nos níveis de enzimas antioxidantes não foram observadas, o que pode sugerir que: 1) o estresse por temperatura e os tratamentos com os extratos das macroalgas não foram suficientes para estimular ou inibir sua atividade; 2) é necessário uma exposição por tempo prolongado para que alterações sejam detectadas; ou 3) o efeito dos extratos das macroalgas sobre as enzimas antioxidantes já havia terminado no

momento da análise (48 h após o tratamento) e os níveis das enzimas já haviam se restabelecido. Embora a germinação tenha sido estimulada após a aplicação dos extratos, efeito similar não foi observado em relação ao alongamento das radículas cultivadas em condição supra-ótima de temperatura. Esse fato também foi observado por Cavusoglu e Kabar (2007) ao aplicar diversos fitormônios, isoladamente ou em combinação, em sementes de rabanete, estimulando a germinação, sem interferir no alongamento da radícula. No presente trabalho, foi observado ainda que os extratos não reduziram os danos gerados pelas altas temperaturas em plantas cultivadas *outdoor*. Estas respostas sugerem que os extratos de macroalgas atuam em momentos específicos do desenvolvimento de plantas vasculares, portanto, o desenvolvimento de pesquisas com abordagem mais específica é necessária para melhor compreensão dos processos de bioestimulação.

Com relação às concentrações, *S. filipendula* estimulou a germinação na concentração mais baixa testada ($0,01 \text{ mg mL}^{-1}$), enquanto que para *K. alvarezii*, a melhor concentração foi de $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$. A estimulação de germinação de sementes por extratos de macroalgas é relatada em diversas espécies de plantas, tais como Tomate (*Solanum lycopersicon* L.) (Demir et al. 2006), feijão preto da China (*Vigna mungo* (L.) Hepper (Kalaivanan e Venkatesalu 2012) e feijão mungo (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) (Castellanos-Barriga et al. 2017). Nestes trabalhos, de forma geral, observa-se que baixas concentrações estimulam o crescimento, enquanto que altas concentrações inibem. Segundo Castellanos-Barriga et al. (2017) esse padrão de comportamento é devido aos altos teores de carboidratos, minerais e proteínas contidos nos extratos que, nas concentrações mais altas, reduzem o potencial osmótico das sementes, dificultando o processo de embebição. Em baixas concentrações, o potencial osmótico não se altera, e as sementes apresentaram estimulação da germinação, possivelmente proporcionadas por substâncias fitorreguladoras presentes nos extratos. No presente trabalho, não foi observada inibição da germinação nas concentrações mais altas testadas, no entanto, a concentração mais alta testada foi $0,10 \text{ mg mL}^{-1}$, ou seja, 0,01 %, enquanto que as concentrações relacionadas com inibição situam se em uma faixa consideravelmente mais elevada ($> 0.1 \%$).

Por meio das análises morfológicas, pode-se observar uma resposta ao aumento da temperatura pelo espessamento da parede celular das células da epiderme, porém não foi observada resposta em relação a utilização dos extratos. Em temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ foi observada a mobilização do amido de reserva da região do entorno do cilindro

vascular para diversas regiões. Em plantas vasculares, a mobilização de reservas de sementes, que ocorre durante o processo de germinação, é crucial porque fornece substratos para o bom funcionamento de diferentes processos metabólicos que são essenciais para o crescimento do eixo embrionário (Zeeman et al., 2010).

A partir dos resultados observados, foi concluído que os extratos aquosos obtidos sob pressão de *Kappaphycus alvarezii* e *Sargassum filipendula*, oferecem efeito protetor em sementes em estágio de germinação sob altas temperaturas, sem interferir no posterior crescimento da planta. Neste sentido, as melhores concentrações foram 0,05 mg mL⁻¹ para o extrato de *K. alvarezii* e 0,01 mg mL⁻¹ para o extrato de *S. filipendula*. Essas espécies de macroalgas são nativas de regiões tropicais e apresentam potencial de exploração para a produção de compostos bioestimulantes

Referências Bibliográficas

- Aguilera J, Dummermuth A, Karsten U, Schriek R, Wiencke C (2002) Enzymatic defences against photooxidative stress induced by ultraviolet radiation in Arctic marine macroalgae. *Polar Biol.*, 25: 432-441
- Almeselmani M, Deshmukh PS, Sairam RK, Kushwaha SR, Singh (2006) Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. *Plant Science*, 171: 382-388
- Bewley JD, Black M (1994) *Seeds physiology development and germination* (2nd ed). Plenum Press, New York, 445 p.
- Bisbis MB, Gruda N, Blanke M (2018) Potential impacts of climate change on vegetable production and quality - a review. *Journal of Cleaner Production*, 170:1602-1620
- Bitá CE, Gerats T (2013) Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Front Plant Sci*, 4: 273
- Bonomelli C, Celis V, Lombardi G, Mártiz J (2018) Salt stress effects on avocado (*Persea americana* Mill.) plants with and without seaweed extract (*Ascophyllum nodosum*) application. *Agronomy*, 8: 64

Chojnacka K, Saeid A, Witkowska Z, Tuhy L (2012) Biologically active compounds in seaweed extracts - the prospects for the application. The Open Conference Proceedings Journal, 3: 20-28

Castellanos-Barriga LG, Santacruz-Ruvacalba F, Hernández-Carmona G, Ramírez-Briones, Hernández-Herrera RM (2017) Effect of seaweed liquid extracts from *Ulva lactuca* on seedling growth of mung bean (*Vigna radiata*). J Appl Phycol, 29: 2479-2488

Cavusoglu K, Kabar K (2007) Comparative effects of some plant growth regulators on the germination of barley and radish seeds under high temperature stress. EurAsian Journal of BioSciences, 1: 1-10

Demir N, Dural B, Yildirim K (2006) Effect of seaweed suspensions on seed germination of tomato, pepper and aubergine. J Biol Sci, 6: 1130-1133

di Stasio E, van Oosten MJ, Silletti S, Raimondi G, dell'Aversana E, Garillo P, Maggio A (2018) Ascophyllum nodosum-based algal extracts act as enhancers of growth, fruit quality, and adaptation to stress in salinized tomato plants. J. Appl. Phycol, DOI 10.1007/s10811-018-1439-9

FAO. FishStat Plus Database (2018) Global Aquaculture Production (online query). <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en>. Acessado em 31 de março de 2018

Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases: occurrence in higher plants. Plant Physiol., 59: 309-314

Hammerschmidt R, Nuckles EM, Kuó J (1982) Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. Physiological Plant Pathology, 20: 73-82

Hanisak MD, Samuel M (1987) Growth rates in culture of several species of *Sargassum* from Florida, USA. Hydrobiologia, 151/152: 399-404, 1987. In: Ragan MA, Bird CJ. Developments in hydrobiology. Twelfth International Seaweed Symposium. Brazil, 590 p.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (2014) IPCC, 2014: Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the

Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp

Kalaivanan C, Venkatesalu V (2012) Utilization of seaweed *Sargassum myriocystum* extracts as a stimulant of seedlings of *Vigna mungo* (L.) Hepper. Spanish Journal of Agricultural Research, 10: 466-470

Lambers H, Chapin III FS, Pons TL (2008) Plant physiological ecology (2nd ed). Springer, New York 604 p.

Mazzarino L, Pitz HS, Voytena APL, Trevisan ACD, Riberio-Do-Vale RM, Maraschin M (2018) Jaboticaba (*Plinia peruviana*) extract nanoemulsions: development, stability, and in vitro antioxidant activity. Drug Development and Industrial Pharmacy, 44: 643-651

Ourique LC, Pereira DT, Simioni C, Ramlov F, Maraschin M, Bouzon ZL, Schmidt E (2017) Physiological, morphological and ultrastructural responses to exposure to ultraviolet radiation in the red alga *Aglaothamnion uruguayense* (W.R. Taylor). Braz J Bot, 40: 783-791

Paula EJ, Erbert C, Pereira RTL (2001) Growth rate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) in vitro. Phycol Res 49:155-161

Rayorath P, Benkel B, Hodges DM, Allan-Wojtas P, MacKinnon S, Critchley AT, Prithiviraj B (2009) Lipophilic components of the brown seaweed, *Ascophyllum nodosum*, enhance freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Planta, 230: 135-147

Rouphael Y, de Micco V, Arena C, Raimondi G, Colla G, de Pascale S (2017) Effect of *Ecklonia maxima* seaweed extract on yield, mineral composition, gas exchange, and leaf anatomy of zucchini squash grown under saline conditions. Journal of Applied Phycology, 29: 459-470

Smartt J, Simmonds NW (1995) Evolution of crop plants (2nd ed). Longman Group Limited, Hong Kong 496 p.

Staniello A, Scartazza A, Gresta F, Loreti E, Biasone A, di Tommazo D, Piaggese A, Perata P (2017) *Ascophyllum nodosum* seaweed extract alleviates drought stress in *Arabidopsis* by affecting photosynthetic performance and related gene expression. Frontiers in Plant Science, 8: 1362

Yamori W, Hikosaka K, Way DA (2014) Temperature response of photosynthesis in C₃, C₄ and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaption. *Photosynth Res.*, 119: 101-117

Zeeman SC, Kossmann J, Smith AM (2010) Stach: its metabolism, evolution and biochemical modification in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 61: 209-234

Zhang X, Ervin EH (2008) Impact of seaweed extract-based cytokinins and zeatin riboside on creeping bentgrass heat tolerance. *Crop Sci.* 48: 364-370

Zhang X, Ervin EH, Schmidt RE (2003) Seaweed extract, humic acid, and propiconazole improve tall fescue sod heat tolerance and posttransplant quality. *HortScience*, 38: 440-443

Zhang X, Wang K, Ervin EH (2010) Optimizing dosages of seaweed extract-based cytokinins and zeatin riboside for improving creeping bentgrass heat tolerance. *Crop Sci.*, 50: 316-320

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho buscou avaliar o potencial de estimulação de plantas por extratos da macroalgas tropicais. Apesar da grande quantidade de produtos bioestimulantes de plantas formulados de macroalgas, a grande maioria utiliza espécies de águas frias. De forma similar, poucos estudos avaliaram os efeitos de extratos de macroalgas de águas tropicais e subtropicais.

A primeira parte desse trabalho teve como objetivo avaliar a estimulação de plântulas de *Arabidopsis thaliana*. Foi possível verificar que os extratos metanólicos das macroalgas, *K. alvarezii* e *S. filipendula* estimulam o crescimento de raízes de *A. thaliana*, sendo que a estimulação ocorre quando baixas concentrações, ($\leq 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$) são administradas às plantas. *A. thaliana* foi escolhida por ter tecnologia genética/molecular bem desenvolvida e esperava-se fazer avaliação dos genes regulados após a aplicação dos extratos. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioprodutos Marinhos do Departamento de Ciências Ambientais da Faculdade de Agricultura - Dalhousie University, Canadá, no entanto o laboratório não tinha protocolos estabelecidos e foi necessário dispensar grande tempo para estabelecê-los, tais como: 1) determinar a amplitude das concentrações dos extratos a ser testada; 2) determinar o tamanho das unidades amostrais; 3) padronizar as condições gerais de luminosidade incidida sobre as unidades amostrais; e 4) padronizar a forma de coleta e análise de dados de crescimento de raízes. Além disso, diversas contaminações fizeram com que os experimentos tivessem que ser repetidos uma grande quantidade de vezes, nas quais foram aplicadas diferentes metodologias de esterilização dos extratos, meios de cultura, utensílios, câmara de fluxo e esterilização superficial das sementes. Por fim, não houve tempo hábil para realizar as análises transcriptômicas. Durante o período, também foram realizados experimentos com *A. thaliana* cultivada em condições de estresse: diferentes salinidades e baixas temperaturas. As contaminações observadas durante o cultivo em baixas temperaturas inviabilizaram a análise de dados e, com relação aos experimentos em diferentes salinidades, as respostas observadas não apresentaram nenhum padrão e optou-se por não acrescentar à publicação. Foram testados também os efeitos dos extratos em plantas de *A. thaliana* no seu ciclo completo, mas a variação observada, possivelmente de origem genética, impossibilitou a verificação de diferenças entre os grupos. Em todos os experimentos com *A. thaliana*, foram testados extratos de *Ascophyllum nodosum*, mas optou-se por não adicionar os resultados ao

artigo publicado, uma vez que esta é uma espécie de águas frias. Ainda, foram testados os extratos das macroalgas, em parceria com uma empresa de produtos bioestimulantes, em bioensaios para avaliar a presença de fitorreguladores com feijão-preto-da-china (*Vigna mungo*), porém a empresa não autorizou a publicação dos dados. De retorno ao Brasil, foram realizadas análises metabolômicas dos extratos, as quais apontaram para a possibilidade da presença de compostos bioestimulantes previamente descritos na literatura.

A segunda parte deste trabalho teve como objetivo avaliar a estimulação de plantas de rabanete. Foi possível verificar que com os extratos aquosos das macroalgas as sementes de rabanete apresentam melhor taxa de germinação sob estresse de temperatura. Foram realizados experimentos com fatores ambientais não controlados. Primeiro, as sementes utilizadas que foram cedidas estavam com rotulagem errada, sendo que acreditou-se que eram sementes de nabo (*Brassica rapa* var. *rapa*), e, dessa forma, não se desenvolveram conforme o esperado. O experimento foi repetido, desta vez com sementes compradas, no entanto na época em que essas foram plantadas (verão) as temperaturas alcançaram valores acima do requerido para a espécie. Assim, estas tiveram crescimento subótimo, e a aplicação dos extratos não foi suficiente para estimular as plantas. Esse fato levantou o questionamento de como a temperatura afetava no crescimento do vegetal e se os extratos poderiam melhorar o desempenho das plantas em temperaturas moderadamente elevadas. Desta vez escolheu-se por trabalhar com condições controladas, no entanto, por questões de limitação espacial, não foi possível trabalhar com o ciclo completo, sendo que escolheu-se avaliar o período de germinação das sementes. Averiguado o potencial de proteção dos extratos das macroalgas sob a germinação das sementes em alta temperatura, foram realizados testes que indicaram que as sementes não estavam sob estresse oxidativo no momento das análises, no entanto as que foram tratadas com os extratos apresentaram alterações morfo-histológicas, como a mobilização de grânulos de amido da região do entorno do cilindro vascular para outras regiões da secção, fato este comum durante o processo germinativo e que mostrava que estas estavam em melhor condição. Nesse meio tempo, diversos outros experimentos foram realizados, porém os resultados não foram satisfatórios e não foram apresentados nesta tese. Por exemplo, foram averiguados os efeitos de extratos de macroalgas na germinação de salsa (*Petroselinum crispum*) e espinafre-da-Nova-Zelândia (*Tetragonia tetragonoides*).

Um problema observado é que extratos de macroalgas são produtos complexos que geralmente não têm um modo ou mecanismo de ação conhecidos. Além disso, devido a sua característica de conter diversos compostos que podem atuar em sinergia ou antagonia, ou ainda apresentar variação sazonal, temporal ou espécie-específica, uma demonstração prática do mecanismo de ação é mais interessante do que uma demonstração teórica do seu modo de ação (YAKHIN; et al, 2017).

Apesar dos resultados satisfatórios obtidos, recomenda-se que mais estudos sejam desenvolvidos com os extratos das macroalgas. Para aumentar a compreensão do comportamento das macroalgas com relação a produção de compostos bioativos recomenda-se cultivar as macroalgas em diferentes condições, mas com período de exposição mais curto (estresse agudo) e testar outras manipulações das condições de cultivo com o objetivo de aumentar a produção de algum composto específico, como flavonóides, por exemplo. Para avaliar os efeitos do processo de extração na qualidade dos extratos, recomenda-se obtê-los por diferentes processos e/ou, tratá-los com procedimentos para a eliminação de substâncias possivelmente antagônicas, como por exemplo, giberelinas e compostos fenólicos. Para aumentar o entendimento de como aplicar os extratos, recomenda-se realizar novos experimentos, com outras espécies e em diferentes fases do ciclo de vida destes. E, para melhor identificar a composição bioquímica das macroalgas e sua metabolômica, utilizar outras análises, tais como cromatografia líquida ou gasosa, Ressonância Magnética Nuclear do ^{13}C , Espetrometria de Massas, entre outras.

5. CONCLUSÃO GERAL

Com base nos resultados obtidos, concluímos que os extratos de ambas as espécies utilizadas podem ser aproveitados na indústria agrícola, em baixas concentrações, para estimular a formação de raízes em plantas. Isso indica que seus efeitos estão relacionados à ação de compostos bioativos, que podem estar atuando sinergicamente. Além disso, foi possível observar a importância do período de aclimação das macroalgas em condições-padrão de laboratório para estabilizar os extratos e potencializar sua capacidade de estimular plantas. Os extratos também apresentaram efeitos na germinação de sementes perante o estresse de temperatura, sendo uma importante alternativa para a produção agrícola em situações de mudanças climáticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

AREMU, A. O.; MASONDO, N. A.; RENGASAMY, K. R. R.; AMOO, S. O.; GRUZ, J. BÍBA, O.; ŠUBRTOVÁ, M.; PĚNČÍK, A.; NOVÁK, O.; DOLEŽAL, K.; VAN STADEN, J. Physiological role of phenolic biostimulants isolated from brown seaweed *Ecklonia maxima* on plant growth and development. *Planta* 241:1313-1324, 2015

ARMAN, M.; QADER, S. A. U. Structural analysis of kappa-carrageenan isolated from *Hypnea musciformis* (red algae) an evaluation as an elicitor of plant defense mechanism. *Carbohydrate Polymers*. 88: 1264-1271, 2012

ASGHER, M.; PER, T. S.; MASOOD, A.; FATMA, M.; FRESCHI, L.; CORPAS, F. J.; KHAN, N. A. Nitric oxide signaling and its crosstalk with other plant growth regulators in plant responses to abiotic stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 24: 2273-2285, 2017

BADINI, L.; PISTOCCHI, R.; BAGNI, N. Polyamine transport in the seaweed *Ulva rigida* (Chlorophyta). *H. Phycol.* 30: 599-605, 1994

BERNSDORFF, F.; DORING, A.; GRUNER, K.; SCHUCK, S.; BRAURIGAM, A.; ZEIER, J. Pipecolic acid orchestrates plant systemic acquired resistance and defense priming via salicylic acid -dependent and -independent pathways. *The Plant Cell*. 28: 102-129, 2016

BIXLER, H. J.; PORSE, H. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *J. Appl. Phycol.* 23: 321-325, 2011

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 33: 382-431, 2016

BOUARAB, K.; ADAS, F.; GAQUEREL, E.; KLOAREG, B.; SALAUN, J.; POTIN, P. The innate immunity of a marine red alga involves oxylipins from both the eicosanoid and octadecanoid pathways. *Plant Physiol.* 135: 1838-1848, 2004

BOUVIER-NAVÉ, P.; BERNA, A.; NOIRIEL, A.; COMPAGNON, V.; CARLSSON, A. S.; BANAS, A.; STYMNE, S.; SCHALLER, H. Involvement of the phospholipid sterol acyltransferase1 in plant sterol homeostasis and leaf senescence. *Plant Physiology*, 152: 107-119, 2010

BOYER, G. L.; DOUGHERTY, S. S. Identification of abscisic acid in the seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry*, 5: 1521-1522, 1988

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiology. Rockville, Maryland, USA: Courier Companies 1367 pp., 2000

BUSCHMANN; A. H. CAMUS, C.; INFANTE, I.; NEORI, A.; ISRAEL, A.; HERNÁNDEZ-GONZÁLES, M. C.; PEREDA, S. V.; GOMEZ-PINCHETTI, J. L.; GOLBERG, A.; TADMOR-SHALEV, N.; CRITCHLEY, A. T. Seaweed production: overview of the global state of exploitation, farming and emerging research activity. *European Journal of Phycology*, 52: 391-406, 2017

CASTELAR, B.; REIS, R. P.; BASTOS, M. Contribuição ao protocolo de monitoramento ambiental da maricultura de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. C. Silva (Areschougiaceae - Rhodophyta) na baía de Sepetiba, RJ, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 24: 613-617, 2009

CHOJNACKA, K.; SAEID, A.; WITKOWSKA, Z.; TUHY, L. Biologically active compounds in seaweed extracts - the prospects for the application. *The Open Conference Proceedings Journal*, 3:20-28, 2012

CLOUSE, S. D; SASSE, J. M. Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 427-451, 1998

CROUCH, I. J.; VAN STADEN, J. Evidence for rooting factors in seaweed concentrate prepared from *Ecklonia maxima*. *Journal of Plant Physiology*, 137: 319-322, 1991

CROUCH, I. J.; VAN STADEN, J. Evidence for the presence of plant growth regulators in commercial seaweed products. *Plant Growth Regulation*. 13: 21-29, 1993

DITTAMI, S. M.; GRAVOT, A.; RENAULT, D.; GOULITQUER, S.; EGGERT, A.; BOUCHEREAU, A.; BOYEN, C.; TONON, T. Integrative analysis of metabolite and transcript abundance during the short-term response to saline and oxidative stress in the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *Plant, Cell and Environment*. 34: 629-342, 2011

FAO. The state of world fisheries and aquaculture (SOFIA), Roma, 200 p, 2016

FAO. FAO Fisheries Technical Paper: A guide to the seaweed industry. Roma, 411 p, 2003

FAO. FishStat Plus Database. Global Aquaculture Production (online query). <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en>. Acessado em 31 de março de 2018

FERRACES-CASAI, P.; LAGE-YUSTY, M. A.; QUIRÓS, A.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J. Evaluation of bioactive compounds in fresh edible seaweeds. Food Anal. Methods, 5: 828-834, 2012

FLEURENCE, J. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. Trends in Food Science & Technology, 10: 25-28. 1999

GANETEG, U.; AHMAD, I.; JAMTGARD, S.; AGETONI-CAMBUI, C.; INSELBACHER, E.; SVENNERSTAM, H.; SCHMIDT, S.; NASHOLM, T. Amino acid transporter mutants of *Arabidopsis* provides evidence that a non mycorrhizal plant acquires organic nitrogen from agricultural soil. Plant, Cell & Environ 40: 413-423, 2017

GUPTA, V.; KUMAR, M. BRAHMBHATT, H.; REDDY, C. R. K.; SETH, A.; JHA, B. Simultaneous determination of different endogenous plant growth regulators in common green seaweeds using dispersive liquid-liquid microextraction method. Plant Phys. Biochem. 49: 1259-1263, 2011

HANISAK, M. D.; SAMUEL, M. Growth rates in culture of several species of *Sargassum* from Florida, USA. Hydrobiologia, 151/152: 399-404, 1987. In: RAGAN, M. A.; BIRD, C. J. Developments in hydrobiology. Twelfth International Seaweed Symposium. Brazil, 590 p., 1986

HARBORNE, J. B. Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis. Chapman & Hall, Londres, 302 pp. 3 ed., 1998

HARNEDY, P. A.; FITZGERALD, R. J. Bioactive proteins, peptides, and amino acids from macroalgae. J. Phycol. 47: 218-232, 2011

HAYASHI, L.; SANTOS, A. A.; FARIA, G. S. M.; NUNES, B. G.; SOUZA, M. S.; FONSECA, A. L. D.; BARRETO, P. L. M.; OLIVEIRA, E. C.; BOUZON, Z. L. *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Areschougiales) cultivated in subtropical waters in Southern Brazil. *Journal of Applied Phycology*, 23: 337-343, 2011

HEDGES, S. B. The origin and evolution of model organisms. *Nature Reviews Genetics*, 3: 838-849, 2002

HIRAKAWA, Y.; TORII, K. U.; UCHIDA, N. Mechanisms and strategies shaping plant peptide hormones. *Plant & Cell Physiology*, 58: 1313-1318, 2017

HONG, D. D.; HIEN, H. M.; SON, P. N. (2007) Seaweeds from Vietnam used for functional food, medicine and biofertilizer. *J. Appl. Phycol.* 19: 817-826

HOQUE, A.; OKUMA, E.; BANU, N. A.; NAKAMURA, Y.; SHIMOISHI, Y.; MURATA, Y. Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. *J. Plant Physiol.* 164: 553-561, 2007

HUSSAIN, A.; BONEY, A. D. Isolation of Kinin-like substances from *Laminaria digitata*. *Nature*, 223: 504-505, 1969

JAYARAJ, J.; WAN, A.; RAHMAN, M.; PUNJA, Z. K. Seaweed extract reduces foliar fungal diseases on carrot. *Crop Protection*, 27:1360-1366, 2008

KALITNIK, A. A.; BARABANOVA, B.; NAGORSKAYA, V. P.; REUNOV, A. V.; GLAZUNOV, V. P.; SOLOV'eva, T. F.; YERMAK, I. M. Low molecular weight derivatives of different carrageenan types and their antiviral activity. *J. Appl. Phycol.* 25: 65-72. 2013

KAUR-SAWHNEY, R.; TIBURCIO, A. F.; ALTABELLA, T.; GALSTON, A. W. Polyamines in plants: an overview. *J. Cell Mol. Biol.* 2: 1-12, 2003

KENDEL, M.; WIELGOSZ-COLLIN, G.; BERTRAND, S.; ROUSSAKIS, C.; BOURGOUGNON, N.; BEDOUX, G. Lipid composition, fatty acids and sterols in the seaweeds *Ulva armoricana*,

and *Solieria chordalis* from Brittany (France): an analysis from nutritional, chemotaxonomic, and antiproliferative activity perspectives. *Mar. Drugs*. 13: 5606-5628, 2015

KIM, J. K.; YARISH, C.; HWANG, E. K.; PARK, M.; KIM, Y. Seaweed aquaculture: cultivation technologies, challenges and its ecosystem services. *Algae*, 32: 1-13, 2017

KRUPINA, M. V.; DATHE, W. Occurrence of jasmonic acid in the red alga *Gelidium latifolium*. *Zeitschr. Naturforsch.* 46: 1127-1129 1991

LAMBERS, H.; CHAPIN III, F. S.; PONS, T. L. *Plant physiological ecology* (2nd ed). Springer, New York 604 pp. 2008

LATIQUE, S.; ELOUAER, M. A.; CHERNANE, J.; HANNACHI, C.; ELKAOUA, M. Effect of seaweed liquid extract of *Sargassum vulgare* on growth of durum wheat seedlings (*Triticum durum* L) under salt stress. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 4:1430-1435, 2014

LAYEK, J.; DAS, A.; IDAPUGANTI, R. G.; SARKAR, D.; GHOSH, A.; ZODAPE, S. T.; LAL, R.; YADAV, G. S.; PANWAR, A. S.; NGACHAN, S.; MEENA, R. S. Seaweed extract as organic bio-stimulant improves productivity and quality of rice in eastern Himalayas. *Journal of Applied Phycology*, 30: 547-558, 2018

LE BAIL, A.; BILLOUD, B.; KOWALCZYK, N.; KOWALCZYK, M.; GICQUEL, M.; LE PANSE, S.; STEWART, S.; SCORNET, D.; COCK, J. M.; LJUNG, K; CARRIER, B. Auxin metabolism and function in the multicellular brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *Plant Physiology*, 153: 128-144, 2010

LEE, R. E. *Phycology* (4th ed.). Cambridge University Press. New York, 547p., 2008

LEE, T. Investigations of some intertidal green macroalgae to hyposaline stress: Detrimental role of putrescine under extreme hyposaline conditions. *Plant Sci.* 138: 1-8, 1998

LIU, F.; WANG, W.; SUN, X.; LIANG, Z.; WANG, F. RNA-Seq revealed complex response to heat stress on transcriptomic level in

Saccharina japonica (Laminariales, Phaeophyta). J Appl Phycol 25:1585-1596, 2014

MACARTAIN, P.; GILL, C. I. R.; BROOKS, M.; CAMPBELL, R.; ROWLAND, I. R. Nutritional value of edible seaweeds. Nutritional Reviews, 65: 535-543, 2007

MANSORI, M.; CHERNANE, H.; LATIQUE, S.; BENALIAT, A.; HSISSOU, D.; KAOUA, M. E. Effect of seaweed extract (*Ulva rigida*) on the water deficit tolerance of *Salvia officinalis* L. Journal of Applied Phycology, 28:1363-1370, 2016

MARIÁN, F. D.; GARCÍA-JIMÉNEZ, P.; ROBAINA, R. R. Polyamines in marine macroalgae: Levels of putrescine, spermidine and spermine in the *talli* and changes in their concentration during glycerol-induced cell growth in vitro. Physiologia Plantarum. 110: 530-534. 2000

MARINHO-SORIANO, E.; FONSECA, P. C.; CARNEIRO, M. A. A.; MOREIRA, W. S. C. Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. Bioresource Technology, 97: 2402-2406. 2006

MAUCH-MANI, B.; MAUCH, F. The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. Current Opinion in Plant Biology, 8: 409-401, 2005

MEYEROWITZ, E. M. Prehistory and history of *Arabidopsis* research. Plant Physiology, 125: 15-19, 2001

MONDAL, D.; GHOSH, A.; PRASAD, K.; SINGH, S.; BHATT, N.; ZODAPE, S. T.; CHAUDHARY, J. P.; CHATTERJEE, P. B.; SETH, A.; GOSH, P. K. Elimination of gibberellin from *Kappaphycus alvarezii* seaweed sap foliar spray enhances corn stover production without compromising the grain yield advantage. Plant Growth Regulation, 75: 657-666, 2015

MORI, I. C.; IKEDA, Y.; MATSUURA, T.; HIRAYAMA, T.; MIKAMI, K. Phytohormones in red seaweeds: a technical review of methods for analysis and a consideration of genomic data. Botanica Marina, 60: 153-173, 2017

MOWAT, J. A survey of results on the occurrence of auxins and Gibberellins in Algae. *Botanica Marina* 8: 149-155, 1965

NAIR, P.; KANDASAMY, S.; ZHANG, J.; JI, X.; KIRBY, C.; BENKEL, B.; HODGES, M. D.; CRITCHLEY, A. T.; HILTZ, D.; PRITHIVIRAJ, B. Transcriptional and metabolomic analysis of *Ascophyllum nodosum* mediated freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*. 13: 643. 2012

NIEMANN, D. I.; DORFFLING, K. Growth-inhibitors and growth-promoters in *Enteromorpha compressa* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 16: 383-389, 1980

NOVOA, A. V.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; LINARES, A. F.; SILVA, A. M. O.; GENOVESE, M. I.; GONZÁLEZ, A. E. B.; VUORELA, P.; COSTA, A.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant activity and possible bioactive components in hydrophilic and lipophilic fractions from the seaweed *Halimeda incrassata*. *Braz. J. Pharmacog.* 21: 53-57, 2011

NUNES N.; FERRAZ, S.; VALENTE, S.; BARRETO, M. C.; CARVALHO, M. A. A. P. Biochemical composition, nutritional value, and antioxidant properties of seven seaweed species from Madeira Archipelago. *Journal of Applied Phycology*, DOI 10.1007/s101811-017-1074-x, 2017

OKUMA, E.; MURAKAMI, Y.; SHIMOISHI, Y.; TADA, M.; MURATA, Y. Effects of exogenous application of proline and betaine on the growth of tobacco cultured cells under saline conditions. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 50: 1301-1305, 2004

OLIVEIRA, L. S.; TSHOEKE, D. A.; OLIVEIRA, A. S.; HILL, L. J.; PARADAS, W. C.; SALGADO, L. T.; THOMPSON, C. C.; PEREIRA, R. C.; THOMPSON, F. L. New insights on the terpenome of the red seaweed *Laurencia dendroidea* (Florideophyceae, Rhodophyta). *Mar. Drugs*, 13: 879-902, 2015

PAULA, E. J. Gênero *Sargassum* C. Ag. (Phaeophyta - Fucales) no litoral do Estado de São Paulo, Brasil. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*, 10: 65-118, 1988

PAULA, E. J.; PEREIRA, R. T. L.; OHNO, M. Strain selection in *Kappaphycus alvarezii* var. *alvarezii* (Solieriaceae, Rhodophyta) using tetraspore progeny. *Journal of Applied Phycology*, 11: 111-121, 1999

PEDRA, A. G. L. M.; RAMLOV, F.; MARASCHIN, M.; HAYASHI, L. Cultivation of the red seaweed *Kappaphycus alvarezii* with effluents from shrimp cultivation and brown seaweed extract: Effects on growth and secondary metabolism. *Aquaculture*, 479: 297-303, 2017

PICKERING, T. Advances in seaweed aquaculture among Pacific Island countries. *J. Appl. Phycol*, 18: 227-234, 2006

PRASAD, K.; DAS, A. K.; OZA, M. D.; BRAHMBHATT, H.; SIDDHANTA, A. K.; MEENA, R.; ESWARAN, K.; RAJYAGURU, M. R.; GHOSH, P. K. Detection and quantification of some plant growth regulators in a seaweed-based foliar spray employing a mass spectrometric technique sans chromatographic separation. *J. Agric. Food Chem.* 58: 4594-4601, 2010

RAI, V. K. Role of amino acids in plant responses to stress. *Biologia Plantarum*. 45: 481-487, 2002

RASKIN, I. Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 439-463, 1992

RAYORATH, P.; JITHSH, M. N.; FARID, A.; KHAN, W.; PALANISAMY, R.; HANKINS, S. D.; CRITCHLEY, A. T.; PRITHIVIRAJ, B. Rapid bioassays to evaluate the plant growth promoting activity of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. using a model plant, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Journal of Applied Phycology*, 20:423-429, 2008

REIS, R. P.; CASTELAR, B.; SANTOS, A.A. Why is algaculture still incipient in Brazil? *J Appl Phycol*, 29: 673-682, 2017

REZAEI-CHIYANEH, E.; SEYYEDI, M. S.; EBRAHIMIAN, E.; MOGHADDAN, S. S.; DAMALAS, C. A. Exogenous application of gamma-aminobutyric acid (GABA) alleviates the effect of water deficit stress in black cumin (*Nigella sativa* L.). *Industrial Crops & Products*, 112: 741-748, 2018

ROUPHAEL, Y.; DE MICCO, V.; ARENA, C.; RAIMONDI, G.; COLLA, G.; DE PASCALE, S. Effect of *Ecklonia maxima* seaweed extract on yield, mineral composition, gas exchange, and leaf anatomy of zucchini squash grown under saline conditions. *Journal of Applied Phycology*, 29: 459-470, 2017

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. *Plant physiology*. Wadsworth Publishing Company, California 682pp., 1992

SANDERSON, K. J.; JAMESON, P. E.; ZABKIEWICZ, J. A. Auxin in a seaweed extract: identification and quantification of indole-3-acetic acid by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Plant Physiology*, 129: 363-367, 1987

SASIKALA, M.; INDUMATHI, E.; RADHIKA, S.; SAIREKA, R. Effect of Seaweed extract (*Sargassum tenerrimum*) on seed germination and growth of tomato plant (*Solanum lycopersicum*). *International Journal of ChemTech Research*, 9:285-293, 2016

SCHEVER, P. *Marine natural products volume III*. Academic Press, e-book ISBN 97800323159319, 245pp. 1980

SMARTT, J. SIMMONDS, N. W. *Evolution of crop plants* (2nd ed). Longman Group Limited, Hong Kong 496 pp. 1995

SOMERVILLE, C.; KORNNEEF, M. A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nature reviews Genetics*, 3: 883-889, 2002

STANIELLO, A.; SCARTAZZA, A.; GRESTA, F.; LORETI, E.; BIASONE, A.; DI TOMMASO, D.; PIAGGESI, A.; PERATA, P. *Ascophyllum nodosum* seaweed extract alleviates drought stress in *Arabidopsis* by affecting photosynthetic performance and related gene expression. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1362, 2017

STIRK, W. A.; TARKOWSKÁ, D.; TURECOVÁ, V.; STRNAD, M.; VAN STADEN, J. Abscisic acid, gibberellins and brassinosteroids in Kelpak®, a commercial seaweed extract made from *Ecklonia maxima*. *J. Appl. Phycol*, 26: 561-567, 2014

STIRK, W. A.; VAN STADEN, J. Isolation and identification of cytokinins in a new commercial seaweed product made from *Fucus serratus* L. *Journal of Applied Phycology*, 9: 327-330, 1997

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MURPHY, A. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal* (6 ed.). Artmed, Porto Alegre 896pp., 2017

TARAKHOVSKAYA, E. R.; MASLOV, Y. I.; SHISHOVA, M. F. Phytohormones in algae. *Fiziologiya Rastenii*, 54: 186-194, 2007

TAY, S. A. B.; MACLEOD, J. K.; PALNI, L. M. S.; LETHAM, D. S. Detection of cytokinins in a seaweed extract. *Phytochemistry*, 24: 2611-2614, 1985

UENO, O.; BANG, S. W.; WADA, Y.; KONDO, A.; ISHIHARA, K.; KANEKO, Y.; MATSUZAWA, Y. Structural and biochemical dissection of photorespiration in hybrids differing in genome constitution between *Diplotaxis tenuifolia* (C₃-C₄) and radish (C₃). *Plant Physiol.* 132: 1550-1559, 2003

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 35: 753-759, 2008

VERMA, P.; KUMAR, M.; MISHRA, G.; SAHOO, D. Multivariate analysis of fatty acid and biochemical constituents of seaweeds to characterize their potential as bioresource for biofuel and fine chemicals. *Bioresour. Technol.*, 226: 135-144, 2017

VIJAYAN, P.; SHOCKEY, J.; ANDRÉ-LÉVÉsQUE, C.; COOK, R. J.; BROWSE, J. A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 7209-7214, 1998

WALTERS, M. T. From little things big things grow: karrikins and new directions in plant development. *Functional Plant Biology*, 44: 373-383, 2017

WANG, G.; QWE, F.; XU, Z.; WANG, F.; xIONG, A. Exogenous gibberellin enhances secondary xylem development and lignification in carrot taproot. *Protoplasma*, 254: 839-848, 2017

WAQAS, M.; SHAHZAD, R.; KHAN, A. L.; ASAF, S.; KIM, Y.; KANG, S.; BILAL, S.; HAMAYUN, M.; LEE, I. Salvaging effect of

triacontanol on plant growth, thermotolerance, macro-nutrient content, amino acid concentration and modulation of defense hormonal levels under heat stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 99: 118-125, 2016

WEI, D.; CHEN, D.; LOU, Y.; YE, Y.; YANG, R. Metabolomic profile characteristics of *Pyropia haitanensis* as affected by harvest time. *Food Science and Technology Research*. 22: 529-536, 2016

WITE, D.; MATTNER, S. W.; PORTER, I. J.; ARIOLI, T. The suppressive effect of a commercial extract from *Durvillaea potatorum* and *Ascophyllum nodosum* on infection of broccoli by *plasmodiophora brassicae*. *J. Appl. Phycol*. 27: 2157-2161, 2015

YAKHIN, O. I.; LUBYANOV, A. A.; YAKHIN, I. A.; BROWN, P. H. Biostimulants in plant science: a global perspective. *Frontiers in Plant Science*. DOI: 10.3389/fpls.2016.02049, 2017

ZUBIA, M.; FREILE-PELEGRÍN, Y.; ROBLEDO, D. Photosynthesis, pigment composition and antioxidant defences in the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta) under environmental stress. *J Appl Phycol* 26:2001-2010, 2014

ZWANENBURG, B.; BLANCO-ANIA, D. Strigolactones: new plant hormones in the spotlight. *Journal of experimental botany*, DOI: 10.1093/jxb/erx487, 2018