CAPÍTULO 3

Microalgas na agricultura moderna: Utilização do extrato de *Desmodesmus subspicatus* na propagação *in vitro* da orquídea *Cattleya warneri*

Diego de Oliveira Corrêa, Beatriz Santos, Luciana Lopes Fortes Ribas, Érika Amano, Rogério Mamoru Suzuki, Miguel Daniel Nosedá

<https://doi.org/10.4322/mp.978-65-994457-8-1.c3>

Resumo

Um dos maiores desafios contemporâneos da humanidade consiste no equilíbrio entre o desenvolvimento de novas tecnologias e a conservação ambiental sem a sobre-exploração dos recursos naturais, o que coloca a agricultura no centro dessa discussão. Dessa forma, o uso das microalgas como bioestimulantes pode levar as culturas a desenvolver maior tolerância aos estresses bióticos e abióticos; aumentar a assimilação de nutrientes e minerais; melhorar a resistência a patógenos; e maximizar o crescimento das raízes e brotos, melhorando o crescimento, qualidade e produtividade das plantas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade bioestimulante do extrato aquoso da microalga *Desmodesmus subspicatus* na propagação *in vitro* da orquídea *Cattleya warneri*, através da suplementação do meio de cultura para germinação assimbiótica e produção de mudas. A germinação assimbiótica das sementes de orquídea e a produção de mudas foram positivamente afetadas pela adição do extrato no meio de cultura, promovendo a obtenção de protocormos e plântulas em estádios de desenvolvimento mais adiantados do que nos tratamentos controle. A presença da citocinina cinetina ribosídeo nos protocormos e de ácido abscísico nas plantas indica que o extrato foi capaz de modular a produção de fitormônios nas orquídeas, influenciando a velocidade dos processos de morfogênese. A análise dos resultados permite inferir que os efeitos são devidos a interações sinérgicas entre as moléculas do extrato, reforçando o potencial uso das microalgas na obtenção de compostos com atividade bioestimulante vegetal.

Palavras-chave: agricultura sustentável, bioestimulante vegetal, fitormônios, microalgas, orquídeas, propagação *in vitro*.

1. Introdução

Um dos maiores desafios contemporâneos da humanidade consiste no equilíbrio entre o desenvolvimento de novas tecnologias e a conservação ambiental sem causar a sobre-exploração dos recursos naturais, o que coloca a agricultura no centro dessa discussão. Desta forma, o desenvolvimento de novas tecnologias de produção agrícola sustentável tem se mostrado como uma ferramenta de grande relevância. Técnicas alternativas como o uso de substâncias que atuem na promoção do crescimento e desenvolvimento vegetal têm resultado no aumento da produtividade e melhoria da qualidade em diversos cultivos (CASTRO; VIEIRA, 2001).

O uso de compostos de origem natural vem sendo considerado uma alternativa rentável e sustentável ao uso de fertilizantes sintéticos. Sua utilização tem por objetivo melhorar qualitativa e quantitativamente a produtividade das culturas, bem como diminuir a poluição e os impactos ambientais associados ao uso de fertilizantes sintéticos (SPINELLI *et al.*, 2009; MORAES, 2015; SCAGLIA *et al.*, 2017). A utilização de compostos orgânicos com atividade bioestimulante vegetal tem ganhado cada vez mais espaço nesse cenário de agricultura orgânica, embora sua definição ainda seja alvo de discussão na comunidade científica. De acordo com du Jardin (2015), os bioestimulantes podem ser definidos como substâncias ou micro-organismos que produzem o aumento da eficiência nutricional, tolerância ao estresse abiótico, e melhoram as características de qualidade das culturas alvo, independentemente de seu conteúdo nutricional.

Compostos com atividade bioestimulante podem ser aplicadas diretamente nas plantas (folhas ou frutos) ou em sementes, e apresentam capacidade de promover ou modificar os processos morfológicos e fisiológicos a fim de aumentar a produtividade dos cultivos em diferentes estágios de desenvolvimento (MORAES, 2015). O uso de bioestimulantes pode levar a uma maior tolerância aos estresses bióticos e abióticos nas plantas; aumentar a assimilação de nutrientes e minerais; melhorar a resistência a patógenos; e maximizar o crescimento das raízes e brotos, melhorando o crescimento, qualidade e produtividade da planta (CALVO *et al.*, 2014; SCAGLIA *et al.*, 2017).

Diversos produtos de origem vegetal têm sido comercializados como biofertilizantes e bioestimulantes agrícolas (POVH, 2008; BATTACHARYYA *et*

al., 2015). Esses produtos possuem diferentes variações em sua composição e podem ser compostos por reguladores vegetais; aminoácidos e peptídeos derivados de hidrolisados proteicos; macro e micronutrientes; vitaminas; substâncias húmicas; extratos de macro e microalgas; e inoculantes com microrganismos (CALVO, *et al.*, 2014; CANELLAS *et al.*, 2015; COLLA *et al.*, 2015; MORAES, 2015).

Nas microalgas, a atividade bioestimulante é associada à presença de diferentes substâncias como aminoácidos e peptídeos (JIE *et al.*, 2008; RAMOS-SUÁREZ *et al.*, 2014); proteínas, polissacarídeos, vitaminas e minerais (PRIYADARSHANI; RATH, 2012; CHEW *et al.*, 2017); e especialmente à presença de diferentes classes de fitormônios (LU; XU, 2015). Embora os processos de biossíntese e ação dos fitormônios e outros reguladores de crescimento em plantas sejam muito bem descrito na literatura (SANTNER *et al.*, 2009), nas microalgas o seu papel fisiológico, efeitos endógenos e vias metabólicas ainda não são bem conhecidas (BAJGUZ, 2009; TARAKHOVSKAYA *et al.*, 2007; STIRK; VAN STADEN, 2010; LU *et al.*, 2014; LU; XU, 2015). Além dos fitormônios, as microalgas produzem outros compostos aminados que podem influenciar no crescimento e desenvolvimento de plantas (CAZZANIGA *et al.*, 2014; BURCZYK *et al.*, 2014).

Além da utilização das microalgas como bioestimulante e/ou biofertilizante para produção de alimentos, outro setor que ganha destaque é a utilização da biomassa e seus compostos na propagação *in vitro* de espécies ameaçadas, ou de forte apelo comercial, como as orquídeas. A germinação assimbiótica *in vitro* de orquídeas é uma ferramenta fundamental para o desenvolvimento de estratégias que possibilitem aumento da produtividade para atender ao mercado de flores de corte, bem como podem oportunizar novas estratégias de conservação de espécies ameaçadas de extinção, através da reprodução *in vitro* e posterior reintrodução na natureza. Por essa razão, a utilização de compostos de origem natural que possam ser utilizados como aditivos ao meio de cultura se mostram como alternativas que devem ser melhor exploradas. Vários trabalhos evidenciaram a utilização de água de coco, extratos vegetais como aditivos ao meio de cultura (MERCADO; CONTRERAS, 2017; UTAMI; HARIYANTO, 2020).

Um dos fatores que contribui para o status de vulnerabilidade das orquídeas são suas características reprodutivas, que incluem a formação de sementes microscópicas que não apresentam tecido de reserva para nutrição embrionária, o que resulta na necessidade de interações com fungos micorrízicos para promover sua germinação (GUPTA, 2016). Em função dessas características reprodutivas, a propagação *in vitro* de orquídeas é uma alternativa eficiente para produção de mudas, permitindo um maior número de plântulas e acelerando assim o processo de produção, o seu desenvolvimento ocorre mais rapidamente e fornecem mudas de melhor qualidade, mais uniformes e livres de doenças (SCHNEIDER *et al.*, 2014).

Na germinação assimbiótica, as sementes são colocadas em meios de cultura contendo os macro e micronutrientes necessários ao seu desenvolvimento, bem como vitaminas e uma fonte de carbono orgânico para nutrição do embrião. Após a germinação, formam-se os protocormos que posteriormente irão formar a plântula (YEUNG, 2017). Os protocolos de germinação e produção de mudas dependem de meios de cultura específicos, muitas vezes dependendo da adição de reguladores vegetais sintéticos, o que torna os procedimentos muito onerosos financeiramente. Nesse contexto, as microalgas representam uma nova opção de suplemento alternativo composição do meio de cultura.

Pereira *et al.* (2018) testaram o efeito da adição da microalga *Chlorella sorokiniana*, no meio de cultura WPM, suplementado com BAP (benzilaminopurina) e AIB (ácido indolbutílico) e verificaram a influência na multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Schomburgkia crispa*. Para a indução de brotos foi recomendado o meio suplementado somente com 22,19 μM de BAP, enquanto a adição de 12,26 μM de AIB com extrato de microalgas estimulou o enraizamento *in vitro*. Corbellini *et al.* (2020) avaliaram a efeito da biomassa e do extrato aquoso de *Messastrum gracile* e *Chlorella vulgaris* na propagação *in vitro* de *Cattleya labiata* através da técnica *thin cell layer* (TCL) e demonstraram que ambos os aditivos foram efetivos na formação de plantas, substituindo a adição de reguladores vegetais ao meio de cultura.

Em face ao potencial uso das microalgas como fonte de compostos com atividade bioestimulante e o crescente interesse na utilização desses microrganismos para o desenvolvimento de técnicas e produtos para uma

agricultura mais sustentável, o objetivo desse trabalho foi avaliar a suplementação do meio de cultura para propagação *in vitro* e produção de mudas da orquídea *Cattleya warneri* com o extrato aquoso da microalga *Desmodesmus subspicatus*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Extrato aquoso da microalga *Desmodesmus subspicatus*

O extrato utilizado como aditivo no meio de cultura para propagação de *C. warneri* foi obtido da biomassa de *D. subspicatus* produzida em fotobiorreator sob condições fotoautotróficas durante 14 dias de cultivo e recuperada por floculação utilizando quitosana como agente floculante. O extrato aquoso continha 16,5% de proteínas, 22% de carboidratos e cerca de 33% de sais inorgânicos. Análises de RMN ¹³C indicaram a presença de unidades monossacarídicas de glucose, galactose e manose, além da presença dos glicosídeos sulfoquinovosil-glicerol, monogalactosil-glicerol e digalactosil-glicerol. Análise de HPLC-MS demonstrou ainda a presença dos fitormônios *trans*-zeatina (45,8 ng mg⁻¹) e traços de ácido abscísico.

2.2. Germinação assimbiótica e produção de plântulas de *C. warneri*

O extrato aquoso de *D. subspicatus* foi utilizado como aditivo ao meio de cultivo para propagação de *Cattleya warneri* (Orchidaceae) em duas etapas experimentais sequenciais: germinação assimbiótica *in vitro*; e posteriormente no crescimento de plântulas com sistema foliar e radicular desenvolvidos. As seções a seguir detalham as metodologias empregadas nos bioensaios com orquídeas.

2.2.1. Obtenção das sementes e teste de viabilidade

Plantas de *C. warneri* originárias da Coleção Científica “Frederico Carlos Hoehne”, Instituto de Botânica, São Paulo - Brasil, foram previamente selecionadas para polinização cruzada para obtenção das sementes usadas para germinação assimbiótica. O teste de viabilidade foi realizado de acordo com metodologia descrita por Suzuki *et al.* (2012) e consiste em pesar 10 mg de sementes em microtubos; adicionar 2 mL de solução aquosa de sacarose (10% m v⁻¹) e manter em temperatura ambiente e no escuro por 24 h; após esse

período a solução de sacarose foi substituída por uma solução aquosa de tetrazólio (1% m v⁻¹) e incubada no escuro a 38 °C por 24 h. Para finalizar, a solução de tetrazólio foi descartada e substituída por água destilada e as sementes foram analisadas sob estereomicroscópio óptico para determinar a viabilidade das sementes.

2.2.2. Desinfestação das sementes e meio de cultura

As sementes foram submetidas a um protocolo de desinfestação com hipoclorito de sódio 1% (v v⁻¹) por 10 minutos; decorrido esse tempo a solução foi descartada e foram realizadas cinco lavagens sequenciais com água destilada esterilizada em papel filtro autoclavado, a fim de garantir a ausência de contaminantes na cultura. Em todos os tratamentos foi utilizado meio de cultura MS/2, que consiste no meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com a concentração dos sais que compõem os macronutrientes reduzida pela metade.

2.2.3. Germinação assimbiótica

Após a determinação da viabilidade e desinfestação, as sementes de *C. warneri* foram semeadas em placas de Petri contendo meio MS/2 com diferentes condições de cultivo: Controle (sem adição extrato) e cinco concentrações de extrato de *D. subspicatus* (0,5; 1; 2; 4; e 8 g L⁻¹). Foram distribuídas aproximadamente 800 sementes por placa, com oito repetições por tratamento. Em cada placa foram delimitadas três regiões contendo aproximadamente 100 sementes para acompanhamento da germinação e desenvolvimento dos protocormos. A germinação foi avaliada após 90 dias da semeadura, quando foram determinados os estádios de desenvolvimento dos protocormos; a massa seca; e os teores de fitormônios.

2.2.4. Produção de plântulas

Após os 90 dias da germinação, parte dos protocormos referentes a cada tratamento foi transplantada para frascos contendo meio de cultura e as mesmas concentrações de extrato, a fim de promover o crescimento das plântulas até formação de sistema foliar e radicular. Cada tratamento consistiu em 8 placas de Petri com 20 protocormos cada. Após 120 dias do transplântio, as plântulas foram avaliadas quanto ao número e comprimento das folhas; número e

comprimento das raízes; massa seca; e teores de fitormônios. Todos os bioensaios de propagação de orquídeas foram realizados no Laboratório de Micropropagação Vegetal do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

2.3. Determinação dos fitormônios nos protocormos e plântulas de *C. warneri* produzidos in vitro

Os protocormos produzidos durante a etapa de germinação assimbiótica e as plântulas obtidas após o transplântio foram avaliados quanto ao teor de fitormônios, com o objetivo de correlacionar as respostas de morfogênese com as respostas fisiológicas. A extração dos fitormônios foi realizada seguindo metodologia adaptada de Großkinsky *et al.* (2014) que consiste na maceração do material vegetal em nitrogênio líquido, extração utilizando etanol 80% e separação dos compostos por cartuchos de extração em fase sólida (SPE) para remoção de contaminantes da amostra. Os extratos vegetais foram avaliados seguindo metodologia descrita por Mazepa *et al.* (2021), e consiste na análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (HPLC-MS). A correlação dos resultados dos extratos vegetais foi realizada comparando os tempos de retenção dos compostos com os padrões de fitormônios *trans*-zeatina, dihidrozeatina, zeatina ribosídeo, cinetina, cinetina ribosídeo (KR), benziladenina, benziladenosina, ácido giberélico, ácido indol acético e ácido abscísico.

2.4. Análise estatística

Todos os parâmetros foram avaliados estatisticamente aplicando análise de variância (ANOVA) seguida de Teste de Tukey para determinação das diferenças entre as médias de todos os tratamentos. Dados com *p* valor menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Todos os gráficos foram gerados a partir do software GraphPad Prism 8 (version 8.0.2 GraphPad software inc., 2010, San Diego, USA).

3. Resultados e Discussão

Os resultados do teste do tetrazólio para determinação da viabilidade das sementes de *C. warneri* permitiu identificar três categorias de resposta:

Sementes viáveis ($86 \pm 3\%$), caracterizadas pela intensa coloração avermelhada do embrião no interior da semente; Sementes inviáveis ($3 \pm 0,5\%$), caracterizadas pela ausência de pigmentação avermelhada no embrião, embora este seja visível; e Palha ($11 \pm 1\%$), caracterizadas pela ocorrência apenas do tegumento externo da semente e pela ausência do embrião (Figura 1).

Figura 4. Teste de viabilidade das sementes de *C. warneri*.

A determinação da viabilidade das sementes utilizadas nos protocolos de propagação de orquídeas é de fundamental importância, uma vez que as sementes são desprovidas de endosperma e os processos de germinação são mais exigentes quando comparados com outras espécies vegetais. O elevado percentual de viabilidade observado para as sementes de *C. warneri* indica que as metodologias de coleta e armazenamento das sementes foi adequado, o que permite avaliar de forma mais objetiva as respostas morfológicas e fisiológicas das plantas frente ao uso do extrato como aditivo no meio de cultura na germinação assimbiótica.

A germinação de sementes de orquídeas apresenta estádios de desenvolvimento específicos e bem definidos: Absorção de água e intumescimento das sementes; desenvolvimento de embrião clorofilado; rompimento da testa e exposição de um embrião globular; desenvolvimento do ápice foliar; e formação de folhas. De acordo com Jorge, Abrão e Suzuki (2015) as sementes são consideradas germinadas ao apresentarem embrião intumescido, clorofilado e com a testa rompida. Decorridos 90 dias da semeadura todos os tratamentos foram considerados germinados, diferindo

morfologicamente entre si pelo estágio de desenvolvimento. A Figura 2 ilustra as características morfológicas dos protocormos de *C. warneri* após 90 dias de semeadura.

Figura 5. Protocormos produzidos por germinação assimbiótica após 90 dias.

Ao final do período de germinação, o tratamento controle (sem adição de extrato) apresentou protocormos clorofilados com presença de ápice foliar em início de desenvolvimento, no entanto, quando comparado com os demais tratamentos, destaca-se a diferença de volume dos protocormos. Os tratamentos com 0,5 e 4,0 g L⁻¹ de extrato aquoso de *D. subspicatus* apresentaram protocormos com início de desenvolvimento de folhas. Qualitativamente, os tratamentos com 1,0 e 2,0 g L⁻¹ de extrato apresentaram maior desenvolvimento,

com protocormos com uma ou mais folhas desenvolvidas, diferindo dos demais tratamentos, ainda que o tratamento $1,0 \text{ g L}^{-1}$ tenha apresentado folhas mais bem desenvolvidas. O tratamento com maior concentração de extrato ($8,0 \text{ g L}^{-1}$) foi o que apresentou menor desenvolvimento, com a formação de ápice foliar apenas, embora tenha apresentado maior volume entre todos os tratamentos.

Em síntese, uma análise qualitativa dos estádios de desenvolvimento dos protocormos após 90 dias de semeadura indica que a adição do extrato de *D. subspicatus* possui efeito promotor de crescimento na germinação assimbiótica de sementes de *C. warneri*, com maior desenvolvimento para concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ e inibição/retardamento do desenvolvimento para a maior concentração de extrato com $8,0 \text{ g L}^{-1}$. Os resultados referentes à germinação servem de indicativo da ação bioestimulante do extrato de *D. subspicatus* sobre os estádios de desenvolvimento das sementes de *C. warneri* germinadas *in vitro*.

Os estádios de desenvolvimento observados no presente estudo são mais avançados aos observados por Jorge, Abrão e Suzuki (2015), que descrevem a germinação de assimbiótica de *Cattleya warneri* em meio de cultura MS/2 e relatam que na avaliação de 90 dias foram registrados apenas protocormos intumescidos e clorofilados. Esse resultado indica que a utilização do extrato aquoso de *D. subspicatus* como aditivo no meio de cultura para germinação assimbiótica da orquídea *C. warneri* promove a obtenção de plântulas melhor desenvolvidas em intervalo de tempo menor do que os protocolos disponíveis na literatura científica.

Para complementar as análises de avaliação dos estádios de desenvolvimento das sementes germinadas, foi determinada a massa seca dos protocormos obtidos em cada tratamento ao final dos 90 dias de cultivo. A Figura 3 apresenta os resultados de massa seca para 100 protocormos de cada tratamento.

Figura 6. Massa seca dos protocormos após 90 dias de germinação.

Os resultados da determinação da massa seca dos protocormos resultantes dos 90 dias de germinação assimbiótica refletem os resultados dos estádios de desenvolvimento e corroboram a avaliação qualitativa do volume dos protocormos. O tratamento com 8,0 g L⁻¹ de extrato aquoso apresentou maior massa seca dentre os demais, enquanto os tratamentos 0,5; 1,0; 2,0; e 4,0 g L⁻¹ não diferem significativamente entre si, e o tratamento controle sem adição de extrato aquoso apresentou o menor resultado de massa seca. Assim como na avaliação do desenvolvimento dos protocormos, a adição do extrato aquoso ao meio de cultura permitiu maior crescimento dos protocormos quando comparados ao controle. Vale destacar que apesar de o tratamento com maior concentração de extrato (8,0 g L⁻¹) não resultar em protocormos tão bem desenvolvidos como nas outras concentrações, permitiu o maior ganho de massa, resultando em aproximadamente o dobro da biomassa registrada no tratamento controle.

Os trabalhos que se dedicam a avaliação da germinação de orquídeas *in vitro* objetivam em sua maioria o desenvolvimento de protocolos para a propagação e obtenção de plântulas, por essa razão não foram encontrados resultados na literatura que permitissem uma comparação da biomassa dos protocormos sob efeito do extrato aquoso com outras condições de cultivo. Ainda assim, a correlação entre a avaliação dos estádios de desenvolvimento dos protocormos com a biomassa produzida permite inferir que a concentração de

1,0 g L⁻¹ permite o equilíbrio entre a divisão celular e os processos de morfogênese.

A fim de avaliar a resposta fisiológica dos protocormos desenvolvidos na germinação em resposta a adição do extrato, foram realizadas extrações com solução etanólica (80% v v⁻¹) dos protocormos após 90 dias da semeadura para determinação dos fitormônios por HPLC-MS. A análise permitiu identificar um composto com eluição em 9,8 min e através da comparação do tempo de retenção e dos espectros de massas dos fitormônios utilizados para confecção da curva de referência foi possível identificar a presença da citocinina cinetina ribosídeo. Com base na avaliação dos extratos de cada tratamento é possível indicar que o tratamento controle não apresentou a presença dessa citocinina, enquanto os tratamentos contendo extrato da microalga *D. subspicatus* favoreceram a biossíntese de cinetina ribosídeo pelos protocormos em desenvolvimento durante a germinação assimbiótica.

Pintos *et al.* (2002) avaliaram os níveis de citocininas endógenos em explantes de pecíolo de *Medicago arborea* e em calos embriogênicos e não embriogênicos induzidos a partir de explantes de pecíolo e observaram a aplicação de citocininas exógenas induzia o aumento da síntese das citocininas endógenas após o primeiro mês de cultivo. Os autores argumentam que os processos de morfogênese, organogênese e embriogênese *in vitro* dependem do equilíbrio entre os reguladores aplicados externamente e os fitormônios presentes no explante. Esses resultados auxiliam a explicar a ausência de cinetina ribosídeo no tratamento controle, sem aplicação da zeatina presente no extrato aquoso.

A quantificação de cinetina ribosídeo por HPLC-MS juntamente com os rendimentos da extração etanólica dos protocormos serviram para determinar a razão mássica dessa citocinina na biomassa vegetal. A Figura 4 apresenta os resultados da quantificação de cinetina ribosídeo nos protocormos produzidos por germinação assimbiótica de sementes de *C. warneri*.

Figura 4. Quantificação de cinetina ribosídeo nos protocormos.

É possível destacar que os maiores teores de cinetina ribosídeo presentes na biomassa dos protocormos foram observados nas concentrações de 1,0; 2,0; e 4,0 g L⁻¹ de extrato de microalgas, com aproximadamente 2,8 ng de KR por mg de biomassa vegetal, não diferindo significativamente entre si. Em seguida aparece o tratamento com 0,5 g L⁻¹ de extrato, com 2,0 ng mg⁻¹; e a concentração de 8,0 g L⁻¹ com 1,8 ng mg⁻¹. O tratamento controle foi o único a não apresentar conteúdo de cinetina ribosídeo no extrato etanólico obtido da biomassa dos protocormos.

As citocininas ocorrem de forma livre ou glicosiladas nos tecidos vegetais, como é o caso da cinetina ribosídeo, que está associada ao aumento da divisão celular, alongamento dos tecidos e formação de parte aérea (SAKAKIBARA, 2006). Os elevados teores de KR nos protocormos dos tratamentos com 1,0; 2,0; e 4,0 g L⁻¹ quando comparados aos demais tratamentos podem explicar os resultados da avaliação dos estádios de desenvolvimento dos protocormos. Enquanto esses tratamentos apresentaram protocormos com folhas desenvolvidas, os demais tratamentos apresentaram apenas o surgimento dos ápices foliares. Como a KR é uma citocinina e tem papel nos processos de organogênese associados à parte aérea, é condizente a presença de maiores concentrações desse regulador nos protocormos mais desenvolvidos.

Sequencialmente à etapa de germinação assimbiótica e obtenção de protocormos com ápices foliares ou folhas desenvolvidas, os protocormos foram transplantados para novas placas de Petri contendo meio MS/2 nas mesmas condições de cultivo. Para essa etapa o tratamento com $8,0 \text{ g L}^{-1}$ foi excluído, uma vez que essa concentração retardou/inibiu o desenvolvimento dos protocormos. A etapa de transplântio teve por objetivo a produção de plântulas com sistema foliar e radicular plenamente desenvolvidos e teve duração de 120 dias de cultivo. Ao final desse período, as plântulas foram avaliadas quanto ao número e comprimento de folhas produzidas, número e comprimento de raízes, massa seca das plântulas e teor de fitormônios (Figura 5).

Figura 5. Plântulas de orquídeas produzidas após transplântio.

Todos os tratamentos produziram plântulas com folhas e raízes desenvolvidas, diferindo entre si pelo tamanho das plântulas, e pela complexidade dos sistemas foliar e radicular. Apesar de o tratamento controle ter produzido protocormos pouco desenvolvidos na etapa de germinação anterior ao transplântio, nessa etapa foram obtidas plântulas completas. Assim como o tratamento controle, os demais tratamentos com diferentes concentrações de extrato aquoso resultaram em plântulas com sistema foliar e radicular bem desenvolvido.

Quando avaliados os resultados referentes à formação do sistema foliar, é possível destacar que o tratamento com adição de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de microalgas resultou em plântulas com maior número de folhas e maior comprimento total de folhas dentre todos os tratamentos (Figura 6-A).

Figura 6. Número (A) e comprimento (B) das folhas das plântulas de orquídeas.

Com base nos resultados destacados na Figura 6-A nota-se o maior número de folhas por plântula registrado no tratamento com $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ($4,16 \pm 0,7$), com diferença significativa em relação ao tratamento controle ($3,48 \pm 0,5$) e às demais concentrações de extrato, exceto para $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ($3,68 \pm 0,6$). De maneira semelhante, quando comparados os resultados referentes ao comprimento total das folhas de cada plântula obtida nos diferentes tratamentos, é possível destacar a mesma tendência, com os melhores resultados referentes ao tratamento com $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato diferindo significativamente de todas as outras condições. Em seguida aparecem o tratamento controle; $0,5$; $2,0$ e $4,0 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente (Figura 6-B). Assim como observado na etapa de germinação assimbiótica, os tratamentos contendo maiores concentrações de extrato aquoso de *D. subspicatus* apresentaram algum grau de inibição no desenvolvimento do sistema foliar dos explantes. A avaliação do número de raízes formadas em cada plântula indica não haver diferença entre o tratamento controle e as menores concentrações de extrato ($0,5$ e $1,0 \text{ g L}^{-1}$), sendo estes os melhores resultados, seguidos das concentrações $2,0$ e $4,0 \text{ g L}^{-1}$ (Figura 7-A).

A avaliação da massa seca das plântulas obtidas ao final dos 120 dias de cultivo mostrou que os tratamentos controle e $1,0 \text{ g L}^{-1}$ não diferem significativamente um do outro, sendo estes os melhores resultados observados. Na sequência aparecem os tratamentos com $0,5$; $2,0$ e $4,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de *D. subspicatus* no meio de cultura (Figura 8). Os dados de número e comprimento de folhas e raízes, juntamente os resultados da massa seca das plântulas permitem definir que o melhor tratamento foi $1,0 \text{ g L}^{-1}$, uma vez que permitiu o desenvolvimento de plântulas superiores aos demais tratamentos, sobretudo no que se refere à formação e desenvolvimento do sistema radicular.

Figura 7. Número (A) e comprimento (B) das raízes das plântulas de orquídeas.

Figura 8. Massa seca das plântulas.

As plântulas foram ainda avaliadas quanto aos teores de fitormônios presentes em sua biomassa. De maneira similar ao observado na quantificação de fitormônios dos protocormos, foi possível identificar apenas um tipo de regulador vegetal, nesse caso o ácido abscísico. Para sua identificação foram comparados os perfis de eluição dos extratos de cada tratamento com a curva de referência, permitindo identificar a presença de ABA em 13,1 min de eluição em HPLC-MS.

Diferente dos dados apresentados para a quantificação de fitormônios nos protocormos, que mostraram a presença de KR nos tratamentos com adição de extrato de microalgas, mas não no tratamento controle, os resultados das plântulas mostraram a presença de ABA em todos os tratamentos. A quantificação desse composto mostrou que as plântulas do tratamento com 1,0 g L⁻¹ de extrato possuem menores teores de ABA em sua biomassa, diferindo significativamente dos demais tratamentos. O controle e as concentrações 2,0 e 4,0 g L⁻¹ não diferem entre si, enquanto a maior concentração de ABA na biomassa das plântulas foi observada para o tratamento com 0,5 g L⁻¹ de extrato de microalgas (Figura 9).

Figura 9. Quantificação de ácido abscísico nas plântulas.

Esses resultados corroboram os demais dados de caracterização morfológica das plântulas obtidas após o cultivo de 120 dias, uma vez que o tratamento que apresentou melhores respostas de desenvolvimento de sistema

foliar e radicular, bem como acúmulo de biomassa coincide com a menor concentração de ABA em seus tecidos, considerando que este regulador vegetal é reconhecido por suas funções relacionadas à inibição do desenvolvimento vegetal.

A correlação dos resultados obtidos nos ensaios com as orquídeas na etapa de germinação e na etapa de produção de plântulas, juntamente com os resultados de composição do extrato aquoso, permite discutir a ação dos componentes do extrato sobre o desenvolvimento das orquídeas *in vitro*. Ainda que os resultados obtidos possam ser atribuídos à presença de fitormônios no extrato aquoso, é importante considerar uma possível ação sinérgica entre os diferentes componentes do extrato, carboidratos, proteínas, glicosídeos e fitormônios. De qualquer maneira, os resultados da utilização do extrato da microalga na propagação da orquídea mostraram grande potencial de aplicação.

4. Conclusão

A propagação *in vitro* de plantas de orquídeas é uma ferramenta fundamental nas estratégias de recuperação de espécies ameaçadas de extinção e na produção de plantas para o mercado de flores sem ocasionar a sobre-exploração das espécies em seus ambientes de ocorrência natural. Com base na importância desse processo, a utilização do extrato aquoso da microalga *D. subspicatus* como aditivo ao meio de cultura de propagação apresenta elevado potencial biotecnológico, uma vez que os resultados obtidos nas etapas de germinação assimbiótica e produção de mudas foram muito promissoras.

As respostas fisiológicas observadas indicam que a ação exógena dos compostos do extrato possui influência nos níveis endógenos de citocininas como a cinetina ribosídeo, o que acabou por favorecer as respostas de morfogênese nos protocormos. Da mesma forma, os níveis de ácido abscísico registrados nas plantas ao final de 120 dias de cultivo correlacionam-se com o desenvolvimento dos sistemas foliar e radicular observados.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) e Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de

Nível Superior (CAPES) através do financiamento de projetos e fornecimento de bolsas de pós-graduação.

6. Referências

BAJGUZ, A. Isolation and characterization of brassinosteroids from algal cultures of *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Trebouxiophyceae). **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 1946-1949, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.05.003>.

BATTACHARYYA, D. *et al.* Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 39-48, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.012>.

BURCZYK, J. *et al.* Polyamines in Cell Walls of Chlorococcalean Microalgae. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v. 69, p. 75–80, 2014. <https://doi.org/10.5560/znc.2012-0215>.

CALVO, P.; NELSON, L.; KLOPPER, J. W. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant and Soil**, v. 383, p. 3-41, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>.

CANELLAS, L. P. *et al.* Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 15-27, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.013>.

CASTRO, P. R. C.; VIEIRA, E. L. **Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2001. 131 p.

CAZZANIGA, S. *et al.* Domestication of the green alga *Chlorella sorokiniana*: reduction of antenna size improves light-use efficiency in a photobioreactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 1-13, 2014. <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0157-z>.

CHEW, K. W. *et al.* Microalgae biorefinery: high value products perspectives. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 53-62, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.006>.

COLLA, G. *et al.* Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 28-38, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.037>.

CORBELLINI, J. R. *et al.* Effect of microalgae *Messastrum gracile* and *Chlorella vulgaris* on the in vitro propagation of orchid *Cattleya labiate*. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, p. 4013-4027, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02251-9>.

DU JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 3-14, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>.

GROßKINSKY, D. K. *et al.* A Rapid Phytohormone and Phytoalexin Screening Method for Physiological Phenotyping. **Molecular Plant**, v. 7, p. 1053-1056, 2014. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu015>.

GUPTA, A. Asymbiotic seed germination in orchids: role of organic additives **International Advanced Research Journal in Science, Engineering and Technology**, v. 3, p. 143-147, 2016.

JIE, M. *et al.* Preparation and optimization of amino acid chelated micronutrient fertilizer by hydrolyzation of chicken waste feathers and the effects on growth of rice. **Journal of Plant Nutrition**, v. 31, p. 571-582, 2008. <https://doi.org/10.1080/01904160801895092>.

JORGE, J.; ABRÃO, M. C. R.; SUZUKI, R. M. Germinação e crescimento inicial *in vitro* de *Cattleya warneri* T. Moore (Orchidaceae). **Revista brasileira de biociências**, v. 13, p. 134-141, 2015.

LU, Y. *et al.* Antagonistic roles of abscisic acid and cytokinin during response to nitrogen depletion in oleaginous microalga *Nannochloropsis oceanica* expand the evolutionary breadth of phytohormone function. **The Plant Journal**, v. 80, p. 52-68, <https://doi.org/2014.10.1111/tpj.12615>.

LU, Y.; XU, J. Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology? **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 5, p. 273-282, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.01.006>.

MAZEPA, E. *et al.* Plant growth biostimulant activity of the green microalga *Desmodesmus subspicatus*. **Algal Research**, v. 59, p. 1-10, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102434>.

MERCADO, S. A. S.; CONTRERAS, N. A. V. Asymbiotic seed germination and in vitro propagation of *Cattleya trianae* Linden & Reichb. f. (Orchidaceae). **Acta Agronómica**, v. 66, p. 544–548, 2017. <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v66n4.63597>.

MORAES, J. G. V. Biofertilizantes: identificação das barreiras regulatórias e propostas para viabilizar esse insumo agrícola. Dissertação de Mestrado. São Paulo: Fundação Getúlio Vargas, Escola de Economia de São Paulo, 2015.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.

PEREIRA, N. S. *et al.* Application of *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae) as supplement and/or an alternative medium for the in vitro cultivation of *Schomburgkia crispa* (Orchidaceae). **Journal of Applied Phycology**, v. 30, p. 2347–2358, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1441-2>.

PINTOS, B. *et al.* Endogenous cytokinin levels in embryogenic and non-embryogenic calli of *Medicago arborea* L. **Plant Science**, v. 163, p. 955-960, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00244-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00244-3).

POVH, J. A. Reguladores Vegetais e Bioestimulantes no desenvolvimento de *Salvia officinalis* L: avaliações fisiológicas, bioquímicas e fitoquímicas. Tese de Doutorado. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2008.

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 3, n. 4, p. 89-100, 2012.

RAMOS-SUÁREZ, J. L. *et al.* Benefits of combining anaerobic digestion and amino acid extraction from microalgae. **Chemical Engineering Journal**, v. 258, p. 1-9, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.07.086>.

SAKAKIBARA, H. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. **Annual Reviews in Plant Biology**, v. 57, p. 431-449, 2006. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231>.

SANTNER, A.; CALDERON-VILLALOBOS, L. I. A.; ESTELLE, M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 5, p. 301-307, 2009. <https://doi.org/10.1038/nchembio.165>.

SCAGLIA, B.; POGNANI, M.; ADANI, F. The anaerobic digestion process capability to produce biostimulant: the case study of the dissolved organic matter (DOM) vs. auxin-like property. *Science of The Total Environment*, v. 589, p. 36-45, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.223>.

SCHNEIDER, L.; ARAÚJO, J. S. P.; ZAFFARI, G. R. Seed Germination of *Cattleya intermedia* and *Cattleya warneri* in Alternative culture Media. **American International Journal of Contemporary Research**, v. 4, n. 7; p. 60-66, 2014.

SPINELLI, F. *et al.* Perspectives on the use of a seaweed extract to moderate the negative effects of alternate bearing in apple trees. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 84, n. 6, p. 131-137, 2009. <http://dx.doi.org/10.1080/14620316.2009.11512610>.

STIRK, W. A.; VAN STADEN, J. Flow of cytokinins through the environment. **Plant Growth Regulation**, v. 62, p. 101-116, 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s10725-010-9481-x>

SUZUKI, R. M.; MOREIRA, V. C.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. M. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina*. **In Vitro Cell, Dev, Biol, Plant**, 48, 500-511, 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s11627-012-9460-1>.

TARAKHOVSKAYA, E. R.; MASLOV, Y. I.; SHISHOVA, M. F. Phytohormones in algae. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 54, n. 2, p. 163-170, 2007. <https://doi.org/10.1134/S1021443707020021>.

UTAMI, E. S. W.; HARIYANTO, S. Organic compounds: contents and their role in improving seed germination and protocorm development in orchids. **International Journal of Agronomy**, v. 2, p. 1-12, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/2795108>.

YEUNG, E. C. A perspective on orchid seed and protocorm development. **Botanical Studies**, v. 58, p.1-14, 2017. <https://doi.org/10.1186/s40529-017-0188-4>.

Autores

Diego de Oliveira Corrêa¹, Beatriz Santos¹, Luciana Lopes Fortes Ribas², Érika Amano², Rogério Mamoru Suzuki³, Miguel Daniel Nosedá⁴

1. Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável, Universidade Federal do Paraná, Av. Cel. Heráclito dos Santos, CEP 81531-980, Curitiba, Brasil.
2. Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná, Av. Cel. Heráclito dos Santos, CEP 81531-980, Curitiba, Brasil.
3. Orquidário do Estado, Instituto de Botânica, Av. Miguel Stéfano, 3687, CEP 04301-902, São Paulo, Brasil.
4. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Av. Cel. Heráclito dos Santos, CEP 81531-980, Curitiba, Brasil.

*Autor para correspondência: diego.biodoc@gmail.com