

*Estudo bioquímico e fisiológico aplicado à macroalga Saccorhiza
polyschides*

Madalena Sofia Fernandes Antunes

***Estudo bioquímico e fisiológico aplicado à macroalga Saccorhiza
polyschides***

Madalena Sofia Fernandes Antunes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos Marinhos

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Professor Doutor José Carlos Dias Duarte Gonçalves e do Doutor Clayton Debiasi e coorientação das Professoras Doutoras Clélia Paulete Correia Neves Afonso e Teresa Margarida Lopes da Silva Mougá

2021

Título: Estudo bioquímico e fisiológico aplicado à macroalga *Saccorhiza polyschides*

Copyright © Madalena Sofia Fernandes Antunes

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2021

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Doutor José Carlos Gonçalves, Doutor Clayton Debiasi, Doutora Clélia Afonso e Doutora Teresa Mouga, em especial aos Doutores José Gonçalves e Clayton Debiasi, por me terem tão bem-recebido no Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior.

À Doutora Marta Neves, por me ter dado motivação que precisava.

À Catarina Bruno, pela companhia nos serões de “Tese e Leite creme” e por me ter emprestado um computador com a capacidade de aguentar o SPSS.

Às atletas, Joana Domingues, Daniela Coutinho, Celina Barroca, Daniela Rebelo, Vanessa Temporão e Tatiana Diamantino, e ao David Frazão do CBPBI que me acompanharam e ajudaram na fase de trabalho experimental da dissertação.

Aos meus pais que me sustentaram financeira e emocionalmente até hoje e à minha irmã e afilhada pelo apoio incondicional que me deram e por nunca terem duvidado de mim.

À minha avó Maria dos Anjos, que tem sempre um abraço apertado para me dar.

A toda a minha família, em especial à minha tia Fernanda e madrinha Beatriz, que me deram os melhores conselhos e que entenderam melhor que ninguém o caminho que percorri.

Ao meu namorado e família, que enquanto estava longe da minha família, me deram abrigo e apoio que precisava em momentos menos bons e que festejaram comigo nos momentos felizes.

Aos meus amigos, os que estão perdidos, sem eles, não tinha metade da coragem que tenho hoje.

Aos meus avós, Manuel Fernandes, Manuel Antunes, Beatriz Cardosa que viverão para sempre no meu coração.

Obrigada

Resumo

As macroalgas marinhas são recursos abundantes muitas vezes subvalorizados. Tendo em conta a vasta costa portuguesa, as macroalgas são um recurso de fácil acesso e promissor no que respeita ao seu conteúdo em compostos bioativos. A cultura de células e tecidos vegetais é um ramo da biotecnologia que visa a propagação de espécies vegetais, inicialmente *in vitro*, em meio nutritivo e em condições assépticas. O meio de cultura para a multiplicação de espécies vegetais tem de fornecer o conteúdo mineral, uma fonte de carbono, vitaminas e, frequentemente, reguladores de crescimento. Dentro dos reguladores de crescimento mais conhecidos encontram-se as auxinas, citocininas, giberelinas e ácido abscísico, as quais são frequentemente obtidas sinteticamente, e aplicadas neste tipo de cultura. A *Saccorhiza polyschides*, uma macroalga abundante nos meses de verão na costa de Peniche, é regularmente associada à agricultura como um fertilizante eficaz. Desta forma, a sua associação a reguladores de crescimento vegetais torna-se inevitável. Sendo assim, o principal objetivo deste trabalho foi extrair reguladores de crescimento vegetais desta alga, de modo a substituir as comumente utilizadas em cultura de células e tecidos vegetais. Para tal, analisou-se o conteúdo em macro e microelementos da alga em estudo e avaliou-se um extrato etanólico no que respeita à sua capacidade antioxidante e reguladora de crescimento. Posteriormente, recorreu-se a técnicas cromatográficas para a extração, separação e purificação de compostos de natureza auxínica ou citocinínica. Verificou-se que a *S. polyschides* possui um conteúdo mineral maioritariamente composto por potássio e sódio, respetivamente aos macroelementos, e por boro e ferro, no que respeita aos oligonutrientes. O extrato etanólico demonstrou possuir um conteúdo total em fenóis de $400 \pm 13 \mu\text{g EAG/g PS}$. No entanto, este extrato não mostrou eficácia na substituição de citocininas durante a micropropagação de castanheiro (*Castanea* sp.) nas concentrações testadas, verificando-se ainda uma diminuição do vigor e um aumento da oxidação e vitrificação dos explantes com o aumento da concentração do extrato adicionado ao meio de cultura. Ainda assim, foi possível verificar a presença de citocininas no extrato algal, quando aplicadas em meio de cultura com a finalidade de produzir biomassa de *callus* de *Glycine max*. Não se observou a presença de auxinas após a tentativa de extração e purificação cromatográfica deste regulador de crescimento da alga.

Palavras-chave: auxinas, citocininas, composição nutricional, macroalgas, micropropagação, *Saccorhiza polyschides*,

Abstract

Marine macroalgae are abundant resources that are often undervalued. Taking into account the vast Portuguese coast, macroalgae are an easily accessible and promising resource with regard to their content in bioactive compounds. The culture of plant cells and tissues is a branch of biotechnology that aims to propagate plant species, initially *in vitro*, in a nutrient medium and under aseptic conditions. The culture medium for the multiplication of plant species must provide mineral content, a source of carbon, vitamins and often, growth regulators. Within the best-known growth regulators are auxins, cytokinins, gibberellins and abscisic acid, which are often synthetically obtained, and applied in this type of culture. *Saccorhiza polyschides*, a macroalgae abundant in the summer months off the coast of Peniche, is regularly associated with agriculture as an effective fertilizer. In this way, its association with plant growth regulators becomes inevitable. Therefore, the main objective of this work was to extract plant hormones from this alga, in order to replace those commonly used in plant cell and tissue culture. For this purpose, the macro, and microelements content of the seaweed under study were analyzed and an ethanolic extract was evaluated in terms of its antioxidant and growth-regulating capacity. Subsequently, chromatographic techniques were used for the extraction, separation, and purification of compounds like auxins and cytokinins. *S. polyschides* has a mineral content mainly composed of potassium and sodium, for macroelements, and boron and iron, for oligonutrients. The ethanol extract showed a total polyphenol content of $400 \pm 13 \mu\text{g EAG} / \text{g PS}$. However, this extract did not show effectiveness in replacing cytokinins during the micropropagation of chestnut (*Castanea* sp.) at the concentrations tested, also verifying a decrease in the vigor and an increase in oxidation and vitrification of the explants with an increase in the concentration of the extract added to the culture medium. Even so, it was possible to verify the presence of cytokinins-like compounds in the algal extract, when applied in culture medium with the purpose of producing biomass of soybean *callus* (*Glycine max*). The presence of auxins was not observed after the attempted extraction and chromatographic purification of this growth regulator from this alga.

Keywords: auxins, cytokinins, macroalgae, micropropagation, nutritional composition, *Saccorhiza polyschides*

Índice

Agradecimentos	v
Resumo.....	vii
Abstract	ix
Índice.....	xi
Índice de Figuras.....	xiii
Índice da Tabelas	xv
Lista de Siglas.....	xvii
1. Introdução.....	1
1.1. Biodiversidade marinha: algas como fonte de compostos bioativos.....	1
1.2. <i>Saccorhiza polyschides</i>	3
1.3. Cultura de células, tecidos e órgãos vegetais.....	6
1.3.1. Contextualização	6
1.3.2. Auxinas	8
1.3.3. Citocininas.....	10
1.4. Algas como fonte de fitohormonas.....	11
1.5. Objetivos	15
2. Materiais e métodos	17
2.1. Recolha e preparação das amostras.....	17
2.2. Teor em água.....	17
2.3. Determinação do teor em matéria orgânica.....	18
2.4. Determinação de azoto total.....	19
2.5. Quantificação de boro total na amostra.....	20
2.6. Quantificação do teor em macro e micronutrientes	21
2.6.1. Digestão da amostra.....	21
2.6.2. Quantificação do teor em fósforo	21
2.6.3. Determinação do teor em Ca, Mg, K, Mn, Cu, Pb, Cd, Zn, Fe, Cr, Ni e Na por espectrofotometria de absorção atômica	22
2.7. Extração de compostos fenólicos.....	24
2.7.1. Teor de Fenóis totais.....	24
2.7.2. Capacidade antioxidante (capacidade de redução do radical DPPH)	25
2.8. Extração de auxinas da amostra.....	26
2.9. Ensaio qualitativo de citocininas na amostra.....	29

2.9.1.	Extração de citocininas	29
2.9.2.	Ensaio <i>in vitro</i>	29
2.9.2.1.	Material vegetal.....	29
2.9.3.	Ensaio de multiplicação <i>in vitro</i>	31
2.10.	Ensaio quantitativo de citocininas na amostra.....	31
2.11.	Análise estatística	37
3.	Resultados e discussão	38
3.1.	Conteúdo total de cinzas, humidade e macro e micronutrientes.....	38
3.2.	Quantidade total de fenóis e atividade antioxidante (DPPH).....	39
3.3.	Inclusão de extrato na formulação de meios, verificação da presença de citocininas no extrato.....	40
3.3.1.	Variação do vigor, oxidação e vitrificação nos rebentos formados.....	41
3.3.2.	Variação do número e comprimento dos rebentos obtidos	44
3.4.	Quantificação de citocininas.....	49
3.5.	Quantificação de auxinas	50
4.	Conclusões e perspetivas futuras	55
5.	Referência bibliográficas.....	57

Índice de Figuras

Figura 1.1 - <i>Saccorhiza polyschides</i> em Portinho da Areia Norte, Peniche, Portugal.....	5
Figura 2.1 - Local de recolha da alga, zona intertidal, Portinho da Areia Norte, Peniche	17
Figura 2.2 - <i>Saccorhiza polyschides</i> na zona intertidal, durante a maré-baixa, Portinho da Areia-Norte, Peniche.....	17
Figura 2.3 - Espectrofotómetro de absorção atómica (Thermo scientific, Reino Unido)	23
Figura 2.4 - Placa de 96 poços após reação, para determinação da quantidade total de fenóis – método Folin-Ciocalteau.....	25
Figura 2.5 - Placa de 96 poços após reação, para determinação da capacidade de redução do radical livre DPPH.....	26
Figura 2.6 - Manifold (com duas colunas C18-E Strata (Phenomenex, USA) emparelhadas) utilizado para obtenção de vácuo moderado para a passagem dos extratos pela fase estacionária das colunas. a e b representam diferentes perspetivas.....	28
Figura 2.7 - Rebentos de castanheiro utilizados para estabelecimento <i>in vitro</i>	30
Figura 2.8 - Sementes de <i>Glycine max</i> utilizadas na germinação <i>ex vitro</i> de molho em água destilada.....	31
Figura 2.9 - Sementes de <i>Glycine max</i> verdes germinadas em bandeja de germinação <i>ex vitro</i>	31
Figura 2.10 - Sementes de <i>Glycine max</i> desinfetadas, para germinação <i>in vitro</i>	33
Figura 2.11 - Sementes de <i>Glycine max</i> germinadas <i>in vitro</i>	33
Figura 2.12 - Esquematização dos cortes (a tracejado) efetuados para posterior utilização na preparação dos meios de cultura para crescimento de <i>callus</i> de <i>Glycine max</i>	35
Figura 2.13 - <i>Callus</i> de <i>Glycine max</i> obtidos a partir dos rebentos germinados.....	37
Figura 2.14 - <i>Callus</i> de <i>Glycine max</i> no ensaio para quantificação de citocininas.....	37
Figura 3.1 - Vigor, oxidação e vitrificação dos rebentos formados nos diferentes tratamentos.....	42

Figura 3.2 - Número total de rebentos, número de rebentos com comprimento $\geq 0,5$ e número de rebentos com comprimento $< 0,5$ cm.....	45
Figura 3.3 - Média do número de rebentos gerados por explante de comprimento $\geq 0,5$ cm, média do número de rebentos gerados por explante de comprimento $< 0,5$ cm e média do número total de rebentos gerados por explante.....	46
Figura 3.4 - Comprimento médio do menor e maior rebento com mais de 0,5 cm.....	48
Figura 3.5 - Cromatograma de AIA e ANA a $2\mu\text{g/mL}$ em metanol.....	52
Figura 3.6 - Cromatograma de AIB e ANA a $2\mu\text{g/mL}$ em metanol.....	52
Figura 3.7 - Cromatograma de AIB, ANA e AIA a $2\mu\text{g/mL}$ em metanol.....	53
Figura 3.8 - Cromatograma do primeiro extrato contendo os compostos auxínicos da amostra e o padrão interno (ANA)	53
Figura 3.9 - Cromatograma do segundo extrato (sala escura e fria) contendo os compostos auxínicos da amostra e o padrão interno (ANA)	53
Figura 3.10 - Exemplo de extração por fase sólida de fitohormonas para análise simultânea (Mori et al., 2017)	55

Índice da Tabelas

Tabela 1.1 - Fitohormonas presentes em algas de vários grupos taxonómicos.....	14
Tabela 2.1 - Composição do meio de cultura para propagação de callus de <i>Glycine max</i> (Miller, 1965)	33
Tabela 3.1 - Conteúdo total de humidade, cinzas e micro e macroelementos quantificados a partir da macroalga <i>Saccorhiza polyschides</i>	40
Tabela 3.2 - Teor de fenóis totais e capacidade antioxidante (DPPH). Os valores estão representados em média \pm desvio padrão (n=4)	41
Tabela 3.4 - Rácio entre o número de explantes gerados e o número de explantes inicial.....	47
Tabela 3.4 - Concentração de compostos com atividade citocinínica transferida para o meio em $\mu\text{g eq. cinetina/L}$ de meio.....	51

Lista de Siglas

°C	Graus centígrados
%	Porcentagem
2-ip	Isopenteniladenina
[Amostra]	Concentração do elemento da amostra em mg/L
[B]	Concentração de Boro em mg/Kg
[E]	Concentração do elemento quantificado em mg/Kg
[EB]	Concentração do elemento no ensaio branco em mg/L
[P]	Concentração de fósforo em mg/Kg
A1	Porcentagem de água quantificada nas amostras a 65 °C
A2	Porcentagem de água quantificada nas amostras a 105 °C
Abs	Absorvância
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzothiazoline-6-ácido sulfônico)
AG ₃	Ácido giberélico 3
AIA	Ácido indol-3-acético
AIA _{sp}	Ácido indol-3-acético-aspartato
AIB	Ácido indol-3-butírico
Al	Alumínio
AL	Ácido lunulárico
ANA	Ácido α -naftalenoacético
As	Arsénio
B	Boro
BAP	6-benzilaminopurina
BHT	Hidroxitolueno butilado
Br	Bromo
C(HCl)	Concentração de HCl expressa em mol/L
Ca	Cálcio
Cd	Cádmio
Cl	Cloro
cm	Centímetro(s)
Co	Cobalto
Cr	Crómio

Cu	Cobre
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EtOH	Etanol
F	Flúor
Fd	Fator de diluição 50
Fe	Ferro
FRAP	Capacidade antioxidante de redução férrica
g	Gramas(s)
h	Hora(s)
HCl	Ácido clorídrico
Hg	Mercúrio
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HR	Humidade relativa
I	Iodo
IPA	Ácido Indolpropiónico
K	Potássio
Kg	Kilograma(s)
L	Litro
LD	Limite de deteção
M	Molar
m ²	Metro(s) quadrado(s)
M	Massa molar
m	Massa
mbar	Milibar(es)
MS	Murashige e Skoog
min	Minuto(s)
Mg	Magnésio
mg	Miligrama(s)

mL	Mililitro
mm	Milímetro(s)
Mn	Manganês
Mo	Molibdénio
MO	Matéria orgânica
mol	Moles
MS	Percentagem de matéria seca da amostra
N	Azoto
N	Normal
Na	Sódio
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NaOCl	Hipoclorito de sódio
Ni	Níquel
nm	Nanometro(s)
ORAC	Capacidade de absorção de radicais de oxigénio
P	Fósforo
P	Massa da amostra
Pb	Chumbo
PS	Peso seco
rpm	Rotações por minuto
S	Enxofre
s	Segundo(s)
Se	Selénio
Si	Silício
TFT	Teor de fenóis totais
Trolox	6-Hidro-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico
UV-vis	Ultravioleta-visível
V	Volume
Å	Ångström
µg	Micrograma(s)

eq.	Equivalente(s)
μL	Microlitro(s)
μm	Micrometro(s)
μM	Micromolar(es)
μmol	Micromol(es)

1. Introdução

1.1. Biodiversidade marinha: algas como fonte de compostos bioativos

O nosso planeta visto do espaço é, em grande parte, azul. Isto acontece, pois 71 % da superfície terrestre é coberta por água, dos quais, 96,5 % pertence aos oceanos. Não só a área coberta por oceanos é maior do que a coberta por terra, rochas e outros lugares secos, como também o volume dos oceanos que pode sustentar vida é muito maior do que o das suas contrapartes terrestre e aérea (Beer et al., 2014; Nasa, 2020; Wijesekara et al., 2011). Deste modo, é de prever que nos oceanos esteja presente uma grande diversidade de organismos. Devido a pressões ecológicas, como a competição por espaço, a defesa contra predadores, a captura de presas, a reprodução, entre outros, os organismos marinhos proporcionam uma extensa fonte de metabolitos secundários que podem ser integrados na pesquisa de novos compostos bioativos (Kelecom, 2002; Rhimou et al., 2010).

As algas devem ser consideradas os verdadeiros sobreviventes entre os organismos fotossintéticos, já que sobreviveram a mudanças dramáticas nas condições climáticas de uma atmosfera que era quente, rica em azoto, dióxido de carbono e metano para a que existe atualmente. As algas ocupam praticamente todos os nichos da Terra, dos trópicos aos desertos frios, secos e gelados da Antártida. O principal requisito para a sua sobrevivência é a existência de água no estado líquido, mesmo que apenas de forma intermitente. Gradualmente, as *Cyanobacteria* e, posteriormente, as algas produziram o oxigênio necessário para sustentar a vida animal e, talvez mais importante, participaram na evolução das macroalgas e das plantas terrestres das quais dependemos para nossa sobrevivência (Martin et al., 2017).

As macroalgas são divididas em três grandes grupos dependendo da natureza dos seus pigmentos: algas verdes (filos Charophyta e Chlorophyta), algas vermelhas (filo Rhodophyta) e algas castanhas (filo Ochrophyta, classe Phaeophyceae) (Wijesekara et al., 2011). Nos últimos anos, as ordens Laminariales, Fucales, Gigartinales, Ulvales

eGracilariales, e dentro delas os géneros de *Laminaria*, *Sargassum*, *Fucus*, *Eucheuma*, *Ulva* e *Gracilaria* têm sido extensivamente investigadas pela sua composição fitoquímica e bioatividades (Arsianti et al., 2018, 2020; Berneira et al., 2020; Kazir et al., 2019; Lorenzo et al., 2017; Marques et al., 2018; Jati et al., 2019; Ometto et al., 2018; Prato et al., 2018; Schmid et al., 2017).

Este grupo de algas é conhecido pela sua riqueza em minerais e algumas vitaminas, bem como pela presença de compostos bioativos como os polissacarídeos, proteínas, lípidos e polifenóis, conhecidos por terem efeitos medicinais, sendo utilizadas no tratamento e prevenção de certas doenças (Déléris et al., 2016; Rioux et al., 2017) ou até para uso como ingredientes alimentares. De facto, algumas macroalgas vivem em habitats complexos, submetidos a condições extremas, como mudanças de salinidade, temperatura, nutrientes, radiação UV, e, sendo organismos sésseis, têm de se adaptar rapidamente às novas condições ambientais. Assim, de maneira a sobreviver, produzem uma grande variedade de metabolitos secundários (biologicamente ativos), que não são encontrados noutros organismos (Plaza et al., 2008). A sua composição nutricional depende ainda do seu estágio de desenvolvimento e ainda mais das condições ambientais, como a localização geográfica, habitat, altura do ano e composição nutricional do meio de crescimento (Holdt & Kraan, 2011; Peinado et al., 2014). Estes seres vivos são já amplamente utilizados, principalmente no leste asiático, onde são usados como alimento, fonte de hidrocolóides, fertilizantes e rações para animais (Bixler & Porse, 2011; Nabti et al., 2017; Wells et al., 2017).

O uso de algas marinhas como fonte de matéria orgânica e nutrientes para plantas terrestres está relacionado com a germinação a maior velocidade das sementes, melhor desempenho e rendimento das culturas, maior resistência ao stress biótico e abiótico e maior vida útil pós- colheita de produtos precíveis (Arioli et al., 2015; Craigie, 2011; Sharma et al., 2014). As algas marinhas podem ser aplicadas diretamente no solo ou usadas como composto para melhorar a fertilidade do solo e a produtividade das culturas (Craigie, 2011; Illera-Vives et al., 2017; Nabti et al., 2017), mas os potenciais impactos negativos relacionados com o conteúdo em metais pesados, areia e sal devem ser levados em consideração (Nkemka & Murto, 2010). Nestes impactos negativos, provocados pelo stress osmótico e iónico que

afetam vários processos metabólicos primários nas plantas, incluem-se a interferência com a função da raiz na absorção de água, bem como efeitos prejudiciais em processos fisiológicos e bioquímicos, como a absorção e assimilação de nutrientes (Carillo et al., 2011).

Uma alternativa potencialmente vantajosa é o uso de extratos de algas marinhas como bioestimulantes orgânicos (Craigie, 2011; Rengasamy et al., 2016; Sharma et al., 2014). Extratos de algas marinhas são conhecidos por conterem minerais enriquecidos e misturas de oligoelementos de forma solúvel, muito convenientes para aplicação foliar ou no solo, e apresentam desempenho superior quando comparados com os fertilizantes químicos convencionais (Craigie, 2011; Santos, 2016; Saravana et al., 2016). O mecanismo pelo qual esses extratos afetam o metabolismo celular das plantas é baseado na presença de macro e micronutrientes, aminoácidos, vitaminas e outras substâncias, incluindo uma eventual ação sinérgica dos diferentes componentes (Gougoulis et al., 2018; Santos, 2016).

1.2. *Saccorhiza polyschides*

As macroalgas castanhas albergam mais de 1800 espécies; cerca de 95% dessas espécies são organismos marinhos prevalentes em águas frias a temperadas (nortonRioux & Turgeon, 2015). Inúmeros fatores, como a espécie, a estação do ano, a idade, a localização geográfica e os fatores ambientais influenciam o perfil fitoquímico. Estudos sobre as algas castanhas relatam níveis importantes de compostos fenólicos, caracterizados pela sua atividade biológica alta, e comparativamente às algas vermelhas e verdes, maior teor em antioxidantes ativos (Dang et al., 2018; S. Gupta & Abu-Ghannam, 2011; Montero et al., 2014).

Saccorhiza polyschides (Lightfoot) Batters, 1902 foi inicialmente classificada como *Fucus polyschides* (Lightfoot, 1777) até ser aceite pelo nome científico atual (Batters, 1902). Em Portugal, existem nomes populares como “carocha”, “caixeira”, “cintas”, “golfe” ou “gulfo”, “limo-correia” e “limo-corriola” (Norton, 1970).

Saccorhiza polyschides é uma alga castanha que pertence à família Phyllariaceae (classe Phaeophyceae) e é a alga marinha mais abundante no sul da Europa (Fernández, 2011). O seu ciclo de vida é determinado pela alternância de gerações, exibindo um ciclo de vida haplo-diplóide heteromórfico com fase esporófita (diploide) dominante, sendo a fase gametófita microscópica (Norton & Burrows, 1969). Tem esporófito de cor castanho-escuro a pálido, lâminas claramente diferenciadas, tem o estipe prostrado e muito achatado, com a base torcida, e órgão de fixação formando um “bolbo” muito rugoso com ápteros. As lâminas têm textura membranosa-coriácea, bem divididas, sem nervura central (Pereira, 2009). É oportunista e coloniza substratos rochosos no sublitoral (Pereira, 2010). Apesar de ser uma alga monocárpica, anual, o seu crescimento é muito rápido, obtendo cerca de 2 metros de comprimento em apenas 2 meses, podendo inclusive medir até cerca de 4 metros (Svendsen, 1962).

Esta espécie apresenta elevada percentagem de hidratos de carbono, um nível de proteína moderado, e baixa concentração de lípidos, sendo a concentração de minerais maior do que nas plantas terrestres (45,6 %; 14,4 %; 1,1 % e 28,15 %; respetivamente) (Rodrigues et al., 2015).

Por pertencer à zona entremarés (Figura 1.1) e, conseqüentemente, sofrer alterações contantes desalinidade e temperatura, é espectável a presença de compostos bioativos de extrema importância, dada a sua eficácia na adaptação às alterações externas.

Devido à sua notória presença na costa europeia, em Portugal, a utilização desta alga como fertilizante é uma prática comum, desde há centenas de anos. Em agosto e setembro, as algas marinhas eram colhidas durante a maré baixa, empilhadas e colocadas a secar ao sol (Santos, 2016). Extratos de *Saccorhiza polyschides* têm também sido utilizados como estimulantes orgânicos para plantas de horticultura, uma vez que conferem tolerância a stresses abióticos e conseqüentemente melhoram o rendimento e a vida útil dos produtos perecíveis (Soares et al., 2020). Assim sendo, a eficácia da utilização desta alga ou do seu extrato como fertilizante ou bioestimulante e na adaptação às alterações ambientais pode estar relacionada com a presença de reguladores de crescimento.

Embora as algas marinhas tenham uma morfologia mais simples, apresentam muitas semelhanças com as plantas vasculares, como eventos reprodutivos análogos e dominância apical (Bradley, 1991; Evans & Trewavas, 1991) que requerem um certo nível de organização. As fitohormonas endógenas controlam a maioria dos processos de crescimento e desenvolvimento em plantas vasculares e é possível que tenham uma função semelhante em algas marinhas. No entanto, o conhecimento sobre estas hormonas vegetais em algas marinhas não está tão avançado como nas plantas vasculares, especialmente a nível molecular. Embora o conhecimento sobre estes compostos em plantas vasculares forneça uma estrutura útil a partir da qual se possa investigar nas algas marinhas, a sua filogenia divergente deve ser tida em consideração ao comparar os dois seres vivos. Sabe-se que os reguladores de crescimento têm uma função dupla nas plantas - regulação dos processos de crescimento e percepção das mudanças ambientais (Gaspar et al., 1996). Desta forma, ambas as funções precisam ser consideradas ao investigar a presença e o papel destes reguladores de crescimento nas algas marinhas.



Figura 1.1 - *Saccorhiza polyschides* em Portinho da Areia Norte, Peniche, Portugal.

1.3. Cultura de células, tecidos e órgãos vegetais

1.3.1. Contextualização

A cultura de células, tecidos e órgãos vegetais é um conjunto de técnicas concebidas para o crescimento e multiplicação de células e sua organização em tecidos e órgãos vegetais, usando soluções nutritivas definidas, com controle de condições físicas e químicas, em ambientes *in vitro* e em condições assépticas. Desde que estes fatores sejam convenientemente definidos, explantes, tais como, meristemas, gomos, folhas, caules, raízes, etc., cultivados *in vitro*, sofrem processos de divisão e desenvolvimento coordenados, resultando na formação de várias e complexas estruturas organizadas, tais como novos meristemas, caules ou raízes e, por fim, plantas completas, ou estruturas desorganizadas, tais como *callus*, culturas de células em suspensão ou protoplastos (Bhatia et al., 2015). A cultura de células, tecidos e órgãos vegetais baseia-se no princípio da totipotência, que afirma que cada célula de uma planta tem o potencial de se regenerar em uma planta completa (Gupta & Ibaraki, 2008).

Resumidamente, estes sistemas de cultura vegetal *in vitro* são, atualmente, ferramentas tecnológicas comprovadas para o rápido estabelecimento de sistemas de propagação clonal (George & Sherrington, 1984; Neuman et al., 2009), para a preservação de espécies ameaçadas e valiosas, bem como para a regeneração e multiplicação de clones férteis geneticamente modificados (Bajaj, 1997; Neuman et al., 2009; Kayser & Quax, 2007; Trigiano & Gray, 2011), na produção de enzimas (González-Rábade et al., 2012) e na produção de compostos químicos de grande valor para diversos tipos de indústrias (Karuppusamy, 2009; Kayser & Quax, 2007; Smetanska, 2008; Trigiano & Gray, 2011). A abordagem empírica que tem sido extensivamente utilizada em numerosos estudos sobre as culturas vegetais *in vitro* demonstrou que o sucesso é em grande parte dependente de três fatores: escolha do explante, composição dos meios, especialmente combinações de reguladores de crescimento, e controle do ambiente físico. A composição de um meio nutritivo favorável a uma determinada espécie vegetal, é uma das tarefas mais importantes para o estabelecimento com sucesso destas técnicas.

Dependendo da parte da planta que é cultivada, podemos referi-la como cultura de células (células gaméticas, suspensão de células e cultura de protoplastos), cultura de tecidos (calos e tecidos diferenciados) e cultura de órgãos (qualquer órgão, como embriões zigóticos, raízes, rebentos e anteras, entre outros). Cada tipo de cultura é usado para diferentes aplicações básicas e biotecnológicas (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2018).

Para iniciar uma cultura de tecidos de plantas *in vitro* deve ter-se em mente os seguintes princípios básicos: (1) selecionar um explante apropriado de uma planta saudável e vigorosa, (2) eliminar a contaminação microbiana da superfície do explante, (3) inocular o explante em meio de cultura adequado, e (4) fornecer ao explante em cultura condições ambientais controladas adequadas. No caso de plantas regeneradas *in vitro*, são submetidas a um processo de adaptação (aclimatização) em câmaras de crescimento com luz, temperatura e humidade controladas antes da transferência para as condições *ex vitro* (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2018).

Atualmente, a principal aplicação comercial das técnicas de cultura de células e tecidos é a propagação de plantas. Embora, em alguns casos, também as progénies de programas de melhoramento tenham vindo a ser propagadas *in vitro* (por exemplo, cereais, batatas, beterraba sacarina), o esmagador uso prático é a propagação de plantas ornamentais (Neuman et al., 2009).

Este ramo da biotecnologia pode ainda ser útil no estudo de processos citológicos ou bioquímicos de crescimento relacionados com os processos de divisão, aumento e/ou diferenciação celular. Após a transferência de explantes recém cortados para condições de promoção de crescimento, geralmente na superfície do corte a divisão celular é iniciada e, como forma de cicatrização de feridas, ocorre crescimento desorganizado de *callus*. Ao suplementar o meio nutritivo com reguladores de crescimento, essa atividade inicial de divisão celular continuará e o crescimento desorganizado será mantido sem diferenciação morfológica reconhecível. No entanto, sob condições adequadas, a diferenciação de, por exemplo, raízes adventícias, caules ou mesmo embriões pode ser iniciada.

As formulações dos meios nutritivos ocupam uma posição central para o sucesso de um sistema de culturas vegetais *in vitro*. Para as culturas, um suplemento de hidratos de carbono no meio é necessário para atender às necessidades de energia. Para este propósito, são geralmente fornecidos mono ou dissacarídeos, frequentemente a sacarose. Para além da fonte de carbono, o meio de cultura tem de fornecer à planta um conjunto de minerais, como Fe, K, N, Na, Mg, S, Cl, Ca, Mn, B, Zn, Mo, Cu e Co; vitaminas, como o m-Inositol, ácido nicotínico, piridoxina, tiamina, biotina, entre outras e ainda manter o pH ideal para as células da planta em estudo. Finalmente, outros compostos geralmente adicionados aos meios de cultura são os reguladores de crescimento vegetais (Neuman et al., 2009).

As fitohormonas são um grupo de compostos naturais existente em plantas. Têm a particularidade de não serem produzidos em tecidos específicos e serem capazes de interferir em processos fisiológicos, em concentrações inferiores comparativamente às que nutrientes ou vitaminas afetariam nos mesmos processos (Davies, 2010; Santner & Estelle, 2009). A síntese de fitohormonas pode ser localizada, e pode ocorrer numa ampla variedade de tecidos ou células dentro dos tecidos. Embora possam ser transportados e ter a sua ação à distância, nem sempre é o caso. Também a sua atuação pode variar, podendo ser localizada no tecido onde é sintetizada ou dentro da mesma célula (Santos, 2016). Algumas das fitohormonas mais conhecidas e mais abundantes são as auxinas, as citocininas, as giberelinas e o ácido abscísico. Embora cada classe de fitohormonas tenha sido identificada pelas suas funções biológicas específicas, coletivamente regulam as respostas das plantas contra stresses bióticos e abióticos, com efeito sinérgico ou antagónico (Gao et al., 2014; Schmelz et al., 2003; Tong et al., 2014)

1.3.2. Auxinas

As auxinas são definidas como uma família de reguladores de crescimento, ou fitohormonas, envolvidos em vários mecanismos fisiológicos, nomeadamente notropismo, dominância apical, desenvolvimento de embriões e frutos, ou aquisição de totipotência celular (Kepinski & Leyser, 2005).

A primeira fitohormona descoberta foi a auxina ácido indol-3-acético (AIA) (Went & Thimann, 1937). Embora o AIA seja a forma fisiológica mais importante de auxinas nas plantas, existem outras formas naturais, como o ácido indol-3-butírico (AIB), no entanto, esta é menos estudada e os seus mecanismos de ação são considerados semelhantes aos do AIA. Existem também auxinas sintéticas úteis e comumente conhecidas, tais como o ácido naftalenoacético (ANA) e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético. As auxinas naturais e sintéticas diferem principalmente nas suas concentrações eficazes, estabilidade metabólica bem como nas propriedades de transporte (Santos, 2016).

Embora todos os tecidos vegetais pareçam ser capazes de sintetizar auxina, a maioria é normalmente produzida em partes jovens em desenvolvimento da planta, como o ápice do caule, folhas emergentes e sementes em desenvolvimento. Dos locais de síntese, a auxina é redistribuída por todo o corpo da planta, onde é necessária para uma variedade de processos de desenvolvimento, como divisão e alongamento celular, formação da raízes laterais, dominância apical, desenvolvimento de folha e flor e respostas trópicas a estímulos ambientais (Davies, 2010).

Com base em estudos e dados fisiológicos, moleculares e bioquímicos até agora realizados e recolhidos, sabe-se que a distribuição de auxina em toda a planta é conduzida por meio de duas vias de transporte fisiologicamente distintas e espacialmente separadas: um transporte rápido e apolar no floema e um transporte mais lento e polar de célula para célula em vários tecidos (Santos, 2016). O transporte não polar já foi descrito nalguns estudos onde as auxinas foram marcadas radioativamente e estabeleceram a existência de transporte no floema (Goldsmith, 1977). A auxina, junto com outros metabolitos que são transportados no floema, é gradualmente descarregada para os diferentes órgãos e tecidos, onde é redistribuída ainda mais por transporte polar regulado de curta distância (Baker, 2000). Com isto, a identificação de substâncias que possam inibir o fluxo de auxina, permitiu que se concluísse que é crucial para o transporte de auxina o ambiente químico intra e extracelular, especificamente o pH, que leva a um transporte assimétrico de auxinas para

células específicas formando os gradientes de auxina necessários para as respostas biológicas (Santos, 2016).

1.3.3. Citocininas

As citocininas foram descobertas devido ao seu efeito estimulante na divisão celular (Miller et al., 1956). No entanto, dependendo do sistema de ensaio, as citocininas também podem inibir a divisão celular (Hartig & Beck, 2006). A primeira substância caracterizada deste grupo foi acidentalmente detetada em ADN autoclavado. A sua suplementação em meio para explantes de tabaco induziu forte crescimento por divisão celular tendo sido denominada de cinetina (Miller et al., 1955). Quimicamente, a cinetina é uma adenina 6-substituída. Em plantas, este composto ainda não foi detetado, podendo ser o produto de reações químicas associadas ao processo de autoclavagem e desviar-se das reações enzimáticas que se desenvolvem nas plantas.

Usando explantes de tabaco, Skoog e Miller (1957) realizaram ensaios, demonstrando as influências das mudanças na razão de concentração de auxina / citocinina na organogênese em culturas. Se a auxina dominar, a formação de raízes adventícias será promovida; se as citocininas dominarem, então a diferenciação das partes do caule é observada. Num certo equilíbrio entre os dois grupos de reguladores de crescimento no meio, resulta um crescimento de *callus* indiferenciados (Skoog & Miller, 1957). A aplicação simultânea de uma citocinina ao meio nutritivo pode levar a uma promoção adicional da atividade de divisão celular, quando utilizadas auxinas mais lábeis. Frequentemente, a citocinina cinetina sintética é usada em concentrações muito baixas (0,1 mg/L). Concentrações mais altas podem ser bastante tóxicas. Para alguns sistemas de cultura, citocininas de ocorrência natural também são usadas, como zeatina ou 2-isopenteniladenina (2-iP), ou a 6-benzilaminopurina (BAP) sintética (Neuman et al., 2009).

Letham (1967), isolou a primeira citocinina nativa que foi chamada de zeatina. Pouco depois, foi identificada uma segunda citocinina nativa, a 2-isopenteniladenina (2-iP), que é

precursora da zeatina. Desde então, vários derivados foram descritos, e hoje são conhecidas mais de 20 citocininas de ocorrência natural, um número que certamente crescerá.

1.4. Algas como fonte de fitohormonas

As fitohormonas foram originalmente descobertas em plantas terrestres, e não em algas. Tal como as plantas, as macroalgas não têm sistema nervoso central e são controladas por sistemas diversos, no entanto, a resposta para a questão de se as macroalgas, tal como os seus parentes terrestres, são reguladas por hormonas vegetais e, caso sejam, como funcionam, ainda permanece equívoca. As macroalgas têm uma série de processos morfogénicos durante o seu ciclo de vida (germinação, ramificação, processos de reprodução e senescência) que requerem algum nível de organização. Desta forma, é de se esperar que as fitohormonas das algas desempenhem um papel no controle de alguns destes processos, como fazem nas plantas superiores. A síntese e o metabolismo das fitohormonas e as respostas fisiológicas das plantas superiores a esses compostos têm sido amplamente investigadas, embora muitas questões ainda permaneçam sem resposta. Informações semelhantes sobre os reguladores de crescimento e fitohormonas de algas são limitadas (Brain et al., 1973; Crouch & Van Staden, 1993; Sanderson & Jameson, 1986; Sanderson et al., 1987; Stirk & Van Staden, 1997; Stirk et al., 2003; Tay et al., 1987; Yokoya et al., 2010).

Na década de 60-70, uma busca ativa por fitohormonas em várias *taxa* de algas foi realizada. Durante este período, um amplo conjunto de compostos com atividade hormonal foi encontrado em diversos grupos de algas dos filos Chlorophyta, Phaeophyceae e Rhodophyta. Entre eles estão o ácido indolacético (AIA), o isopenteniladenina (IPA), o ácido giberelínico (AG) e o ácido lunulárico (AL) (Ballester, 1975; Brain et al., 1973; Kato et al., 1962; Provasoli & Carlucci, 1974; Pryce, 1972; Swaminathan et al., 1977). Provasoli e Carlucci (1974) reviram esses estudos de forma mais abrangente. No entanto, mais tarde, a presença e as concentrações de hormonas vegetais foram avaliadas e, após a separação cromatográfica dos extratos e subseqüentemente quantificação em bioensaios, descobriu-se que alguns dos resultados obtidos na década de 60-70 poderiam não refletir os compostos originais (Evans & Trewavas, 1991). Um crescente interesse pelas fitohormonas das algas

surgiu mais uma vez em meados da década de 80, e essencialmente todas as fitohormonas conhecidas de plantas superiores foram encontrados nas algas. Durante este período, os espectros da atividade biológica das hormonas vegetais das algas foram estudados, a interação entre as hormonas e o sistema hormonal das algas com outros sistemas reguladores começou a ser analisada (Bajguz & Czerpak, 1996; Cooke et al., 2002; Crouch & Van Staden, 1993; Niemann & Dorffling, 1980; Ördög et al., 2004; K. J. Sanderson & Jameson, 1986; Kevin J. Sanderson et al., 1987; Stirk & Van Staden, 1997; Tay et al., 1987).

Dentro das espécies utilizadas como substrato na produção de bioestimulante, encontram-se mencionadas algas castanhas como *Ascophyllum nodosum*, *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Durvillaea potatorum*, algas vermelhas como *Kappaphycus alvarezii* ou algas verdes do género *Ulva* (Craigie, 2011). Mas não só nestas foram encontradas evidências de citocininas (Stirk et al., 2003; Zhang et al., 1991) e auxinas (Crouch & Van Staden, 1993; Kingman & Moore, 1982; Kevin J. Sanderson et al., 1987). Stirk e Van Staden (1996), por exemplo, detetaram atividades como as das citocininas e das auxinas em extratos comerciais de algas como *Ecklonia maxima*, *Ascophyllum nodosum*, e outras das famílias Laminariaceae e Fucaceae. Neste estudo, um dos extratos de *Ascophyllum nodosum* foi o que apresentou maior crescimento dos *calli*, no entanto, no que diz respeito ao enraizamento, foi o extrato de *Ecklonia maxima* que apresentou maior eficácia no número de raízes em *Glycine max*.

Mais recentemente, extratos aquosos de *Sargassum johnstonii* a concentrações de 0,1 a 0,8% (m/v), usados na pulverização foliar e deposição no solo, aumentaram o crescimento vegetativo (altura da planta, comprimento da parte aérea, comprimento da raiz e número de ramos) e parâmetros reprodutivos (número de flores, número de frutos e peso fresco) de tomate (*Solanum lycopersicum*) (Kumari et al., 2011). A pré-imersão de sementes de trigo (*Triticum aestivum*) em 20% (0,2 mg/mL) extratos de *Sargassum wightii* durante 24 h proporcionou um aumento de 11% na germinação de sementes, um aumento de 63% no número de raízes laterais e aumento de 46% no comprimento dos rebentos em comparação com o controlo (Kumar & Sahoo, 2011).

Segundo El-Din (2015), a utilização de fertilizante líquido, obtido a partir das algas *Codium tomentosum* e *Sargassum vulgare*, conduz ao aumento das percentagens de germinação e dos comprimentos das raízes, dos rebentos e da planta completa, que são mais elevados em relação ao controlo, apontando para a presença de compostos com atividades semelhantes às giberelinas, citocininas e auxinas. O mesmo se verificou na planta *Triticum aestivum* var. Pusa Gold na presença de extratos líquidos da alga *Sargassum wightii* a 20% (Kumar & Sahoo, 2011). Ainda dentro do mesmo género, a alga *Sargassum johnstonii* mostrou também efeitos promissores nos parâmetros atrás enumerados, com extratos líquidos a 0,8% (Kumari et al., 2011).

Também a aplicação de extratos da alga castanha *Laminaria digitata* induziu um aumento na germinação de sementes de *Secale cereale*, *Avena strigosa* e *Hordeum vulgaree* provocou um efeito positivo no enraizamento destas, bastando para tal a exposição a extratos com concentração de 0,5% (Thorsen et al., 2010).

Esserti e colaboradores (2017) utilizaram extratos aquosos das algas *Fucus spiralis*, *Cystoseira humilis* subsp. *myriophylloides* e *Laminaria digitata*, em diferentes concentrações como substituto total ou parcial dos nutrientes e reguladores de crescimento vegetais do meio de cultura de *Nicotina benthamiana* ou de *Prunus domestica* var. Claudia verde e *Prunus armeniaca* var. Canino, respetivamente. No que respeita à propagação de *Nicotina benthamiana*, obtiveram maior número de nós, folhas e raízes e ainda maior comprimento dos novos rebentos, comparando com o controlo, quando os reguladores de crescimento, os micro e os macronutrientes foram completamente substituídos por extrato de *Fucus spiralis* com apenas 2,5% da sua concentração bruta. Por outro lado, não obteve resultados tão promissores aquando da propagação das plantas herbáceas, explicando os resultados por estas serem mais difíceis de propagar *in vitro*.

Na Tabela 1.1 estão ainda representadas as fitohormonas encontradas em alguns géneros de algas (Tarakhovskaya et al., 2007).

Tabela 1.1 - Fitohormonas presentes em algas de vários grupos taxonômicos

Divisão	Fitohormonas encontradas
Chlorophyta	AIA (géneros <i>Ulva</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Cladophora</i> , <i>Caulerpa</i>) Citocininas (géneros <i>Protococcus</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Scenedesmus</i> , <i>Chlamydomonas</i>) Giberelinas (género <i>Caulerpa</i>) ABA (géneros <i>Chlorella</i> , <i>Dunaliella</i> , <i>Haematococcus</i>) Ácido lunulárico (género <i>Ulva</i>) Ácido jasmónico (géneros <i>Dunaliella</i> , <i>Chlorella</i>) Poliaminas (géneros <i>Ulva</i> , <i>Chlorella</i>) Brassinosteróides (género <i>Hydrodictyon</i>)
Phaeophyceae	AIA (géneros <i>Macrocystis</i> , <i>Laminaria</i> , <i>Fucus</i> , <i>Ascophyllum</i>) Citocininas (géneros <i>Fucus</i> , <i>Ascophyllum</i> , <i>Sargassum</i> , <i>Macrocystis</i>) Giberelinas (género <i>Fucus</i>) ABA (géneros <i>Ascophyllum</i> , <i>Laminaria</i>) Poliaminas (género <i>Dyctiota</i>)
Rhodophyta	AIA (géneros <i>Botryocladia</i> , <i>Porphyra/Piropia</i>) Citocininas (género <i>Porphyra/Piropia</i>) Ácido jasmónico (género <i>Gelidium</i>) Poliaminas (géneros <i>Cyanidium</i> , <i>Gelidium</i> , <i>Grateloupia</i>) Rodomorfina (género <i>Griffithsia</i>)
Charophyta	Citocininas (género <i>Chara</i>)
Euglenophyta	Citocininas (género <i>Euglena</i>) Ácido jasmónico (género <i>Euglena</i>) Poliaminas (género <i>Euglena</i>)
Cyanobacteria	AIA (géneros <i>Oscillatoria</i> , <i>Chlorogloea</i>) Citocininas (géneros <i>Arthronema</i> , <i>Calothrix</i>) Ácido jasmónico (género <i>Arthrospira</i>)

Nota. Fonte: Adaptado de Tarakhovskaya, et al., (2007).

1.5. Objetivos

Os produtos relacionados com as macroalgas são diversos e estes organismos têm grande destaque no ecossistema aquático. Assim, são necessários estudos para sua correta aplicação, de forma a garantir o menor impacto possível no sistema em que habitam.

A alga *Saccorhiza polyschides* tem sido associada à fertilização de solos agrícolas, por possuir compostos suficientes para nutrir e estimular o desenvolvimento das plantas. Para além disso, a sua abundante presença, tanto na costa portuguesa como em todo o sul europeu, leva a que esta alga seja um alvo para o seu estudo no que respeita à presença e modo de ação de fitohormonas.

Desta forma, com este estudo pretende-se utilizar técnicas de extração e determinação da atividade de fitohormonas e reguladores de crescimento vegetais, respetivamente, empregando extratos etanólicos ou métodos específicos de extração de citocininas e auxinas, da macroalga *Saccorhiza polyschides*, para posterior utilização em meios de cultura ou quantificação de hormonas. Assim, visa-se avaliar o potencial desta alga como fornecedora de reguladores de crescimento vegetais, através da sua atuação no crescimento e desenvolvimento *in vitro*, de explantes de castanheiro (*Castanea* sp.) e *calli* de *Glycine max*.

Com este intuito, foram propostos os seguintes objetivos gerais:

- Contribuir para a elucidação de algumas questões bioquímicas e fisiológicas da espécie de alga em estudo, associadas à sua constituição química e potenciais efeitos quando aplicados na cultura de células e tecidos de plantas *in vitro*.

E os seguintes objetivos específicos:

- Quantificação e caracterização do conteúdo em minerais da alga *Saccorhiza polyschides*;

- Avaliação do potencial antioxidante e quantificação total de fenóis de extratos de *S. polyschides* adicionados a meio de cultura durante a cultura *in vitro* de plantas de castanheiro (*Castanea sp.*);
- Extração e quantificação de citocininas e auxinas de extratos de *S. polyschides* através de técnicas cromatográficas;
- Avaliação do potencial fitorregulador de extratos de *S. polyschides* aplicados em sistemas de cultura *in vitro* de plantas de castanheiro (*Castanea sp.*) e *callus* de soja (*Glycine max*).

2. Materiais e métodos

2.1. Recolha e preparação das amostras

A alga *Saccorhiza polyschides* foi recolhida na praia do Portinho da Areia Norte (39°22'07.7" N 9°22'40.7" O), Peniche em julho de 2018 (Fig. 2.1 e 2.2). Para a preparação da amostra, procedeu-se à sua limpeza com recurso a várias lavagens com água salgada, com o intuito de remover epífitas, areias e outros detritos. Após a lavagem, a alga foi cortada em tiras de modo a ser facilmente congelada a -20°C. Parte da alga foi seca em estufa ventilada a 30°C durante aproximadamente 3 dias, moída em moinho de café até atingir uma granulometria inferior a 200 µm de diâmetro e novamente congelada a -20°C.



Figura 2.1 - Local de recolha da alga, zona intertidal, Portinho da Areia Norte, Peniche.



Figura 2.2 - *Saccorhiza polyschides* na zona intertidal, durante a maré-baixa, Portinho da Areia-Norte, Peniche.

2.2. Teor em água

A amostra fresca foi descongelada, pesada e colocada em estufa ventilada a 65°C durante 48 horas. Findo este tempo, pesou-se novamente a amostra e determinou-se a percentagem (%) da “1ª água”, correspondente à água que se encontra no exterior da alga, que evapora a aproximadamente 65°C. Para calcular a “2ª água”, que corresponde à água que constitui internamente a amostra de alga (Ryan et al., 2012), a alga foi pesada num cadinho de vitrosil descontaminado previamente aquecido a 105°C em estufa ventilada. Ao cadinho adicionaram-se 10,0 g da amostra moída e seca a 65°C e colocou-se o conjunto em estufa ventilada por mais 24 horas a 105°C ± 2°C. Após 24 horas, pesou-se a amostra, já arrefecida em exsiccador e obteve-se a percentagem da 2ª humidade e, conseqüentemente, a

percentagem de matéria seca. Todo o procedimento foi realizado em triplicado.

A percentagem da “1ª água” é dada pela fórmula:

$$\% A1 = \frac{m - m'}{m} \times 100$$

Em que:

A1 – Percentagem de água quantificada nas amostras a 65°C

m – Massa da amostra verde, descongelada

m' – Massa da amostra seca a 65°C

A percentagem da “2ª água” é dada pela fórmula:

$$\% A2 = \frac{m' - m''}{m'} \times 100$$

Em que:

A2 – Percentagem de água quantificada nas amostras a 105°C

m' – Massa da amostra seca a 65°C

m'' – Massa da amostra seca a 105°C

Para determinar a percentagem de matéria seca total, recorreu-se à seguinte fórmula:

$$\% MS = (100 - \% A1) - \frac{(100 - \% A1)}{100} \times \% A2$$

Em que:

MS – Percentagem matéria seca da amostra

A1 – Percentagem de água quantificada nas amostras a 65°C

A2 – Percentagem de água quantificada nas amostras a 105°C

2.3. Determinação do teor em matéria orgânica

Após pesar em triplicado, 1,0 g de amostra moída e seca a 105°C em cadinho de vitriol incinerado, descontaminado e isento de humidade, submeteu-se este conjunto a uma temperatura de 480°C em mufla (Nabertherm, Liliemthal/Bermen, Alemanha) durante 16 horas (Ryan et al., 2012). Findo este tempo, e depois de arrefecidas as amostras em exsiccador, calculou-se a percentagem de matéria orgânica através da fórmula:

$$\% MO = \frac{m'' - m'''}{m''} \times 100$$

Em que:

MO – Percentagem de matéria orgânica da amostra

m'' – Massa da amostra seca a 105°C

m''' – Massa da amostra proveniente da mufla (480°C)

2.4. Determinação de azoto total

A quantificação de azoto total na amostra foi determinada pelo método de Kjeldhal (Cunnif & AOAC, 1995) com alterações (Ryan et al., 2012). Para tal, pesaram-se triplicados de 1,0 g de amostra moída e seca a 65°C e 1,0 g de sacarose, para a realização do branco, para tubos Kjeldhal. Nestes, adicionaram-se duas pastilhas de catalisador (7,8 g – sulfato de potássio e sulfato de cobre) e 12,5 mL de ácido sulfúrico concentrado (97-99% (m/V)) (ChemScene, USA). Para a digestão da amostra e do branco, levaram-se os tubos ao bloco digestor durante 15 min a 400°C. Finda a digestão e arrefecimento dos tubos, acrescentaram-se ao digerido 75 mL de água destilada tépida e procedeu-se à destilação. A destilação consistiu na adição automática de 60 mL de hidróxido de sódio (VWR, USA) a 10 mol/L com um tempo de contacto de 30 segundos. O destilado contendo todo o conteúdo em azoto, foi recolhido num Erlenmeyer com 25 mL de ácido bórico (VWR, USA) com uma concentração de 40 g/L e 5 gotas de indicador misto (verde de bromocresol e vermelho de metilo). O conteúdo final do Erlenmeyer foi, por fim, titulado com ácido clorídrico (VWR, USA) 0,1 N até ao ponto de viragem, de cor verde-azulado a rosa. O teor em azoto da amostra seca a 65°C é dado pela fórmula:

$$N_{total} = \frac{(V_a - V_{(EB)}) \times C(HCl) \times M(N)}{m_{amostra} \times 10}$$

Em que:

N_{total} – Quantidade de azoto total da amostra, em %

V_a – Volume de ácido sulfúrico gasto na titulação da amostra

$V_{(EB)}$ – Volume de ácido sulfúrico gasto na titulação do ensaio branco

$C(HCl)$ – concentração de HCl expressa em mol/L

$M(N)$ – Massa molar do azoto ($M = 14,001$ g/mol)

$m_{amostra}$ – Massa da amostra digerida

A partir deste valor, pode calcular-se o teor em proteína da alga seca moída e seca a 65°C multiplicando pelo fator de conversão correspondente às algas castanhas, 5,38 (Lourenço et al., 2002).

2.5. *Quantificação de boro total na amostra*

No intuito de quantificar o teor em boro da alga em estudo, levou-se à mufla em cadinhos de vitriossil, 1,0 g de amostra moída e seca a 105°C durante 6 horas a 550°C. Após se encontrarem à temperatura ambiente, as amostras foram digeridas adicionando 10 mL de ácido sulfúrico (ChemScene, USA) a 0,36 N ao cadinho. Depois de 1 h de digestão, o conteúdo do cadinho foi filtrado, com um filtro Whatman nº 41, para um balão volumétrico de 50 mL, perfazendo-se o volume com água ultrapura. Para a curva de calibração foram utilizadas concentrações de 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mg/L de boro (Merck, Alemanha), cada uma delas com a mesma concentração de ácido sulfúrico a 0,36 N da amostra e preparadas com água ultrapura.

Antes da leitura dos padrões e da amostra, foi necessária uma preparação prévia. Para tal, preparou-se uma solução tampão dissolvendo 25 g de acetato de amónio (Aldrich, Sigma, Alemanha) em 60 mL de água ultrapura, a esta solução aquosa, acrescentou-se 30 mL de ácido acético glacial (ChemScene, USA) e ajustou-se o pH a 4,8. Para a leitura, foram adicionados a tubos de vidro de 10 mL descontaminados, 1 mL de cada padrão ou de amostra,

2 mL de solução tampão, 1 mL de solução de EDTA (VWR, USA) 0,025 M, preparada com água ultrapura, e 2 mL de Azomethine-H (Aldrich, Sigma, Alemanha). Os tubos foram colocados no escuro durante aproximadamente 2 horas. De seguida efetuou-se a leitura das amostras no espectrofotómetro de absorção molecular (Thermo Scientific, USA) a 420 nm. A quantificação de boro na amostra foi realizada em duplicado e todos os materiais utilizados neste procedimento eram isentos de boro. O ensaio em branco foi executado em paralelo com a amostra (Ryan et al., 2012). A concentração de boro presente na amostra é dada por:

$$[B] = ([Amostra] - [EB]) \times \frac{Fd}{m_{amostra}}$$

Em que:

[B] – Concentração do elemento boro, em mg/Kg

[Amostra] – Concentração de boro obtido na amostra, em mg/L

[EB] – Concentração de boro obtido no ensaio branco

Fd – Fator de diluição

$m_{amostra}$ – Massa inicial da amostra

2.6. Quantificação do teor em macro e micronutrientes

2.6.1. Digestão da amostra

Para a quantificação do teor em macro e micronutrientes foi necessário digerir previamente as amostras. Para tal, levaram-se dois cadinhos de vitrosil descontaminados com 1,0 g de alga seca a 105°C cada, à mufla a 480°C durante 16 h. Terminado este tempo, colocaram-se os cadinhos com as cinzas da amostra numa placa de aquecimento, e adicionaram-se 3 mL de ácido clorídrico a 20%, os cadinhos foram mantidos fechados utilizando vidro de relógio. Após ebulição, filtrou-se o conteúdo para balões volumétricos de 50 mL com o auxílio de filtros Whatman nº 41 e perpez-se o volume com água ultrapura fervente (Ryan et al., 2012). O ensaio em branco foi executado em paralelo com a amostra. Todo o processo foi realizado em duplicado.

2.6.2. Quantificação do teor em fósforo

Em balões volumétricos de 50 mL, colocou-se a quantidade de fósforo (Merck, Alemanha) necessário para preparar soluções padrão (0,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mg/L) ou 10 mL das soluções de amostra digerida ou de ensaio branco. A cada balão adicionaram-se ainda, 5 mL de ácido nítrico (Merck, Alemanha) a 5 N e 10 mL de reagente corante de fósforo, perpez-se o volume com água ultrapura e colocaram-se os balões no escuro durante 30 min. Efetuaram-se as leituras dos padrões e das amostras no espectrofotômetro de absorção molecular (Thermo Scientific, USA, Fig. 2.3) a 470 nm (Ryan et al., 2012).

Para preparar a solução do reagente corante de fósforo, pesaram-se 0,250 g de vanadato de amônio para um vidro de relógio, seguidamente transferiu-se o pesado para um balão volumétrico de 200 mL com cerca de 40 mL de água ultrapura, o qual foi colocado em placa de agitação até completa dissolução. Simultaneamente foram pesados 4,5 g de molibdato de amônio (Aldrich, Sigma, Alemanha) para um copo de precipitação onde se adicionou 15 mL de água ultrapura. Após a sua dissolução, a última solução foi transferida para o balão volumétrico anterior, a este adicionou-se 50 mL de ácido nítrico a 65% e perpez-se o volume com água ultrapura. Esta solução foi guardada em frasco escuro, no escuro até a sua utilização. O teor em fosforo da amostra é dado por:

$$[P] = ([Amostra] - [EB]) \times \frac{Fd}{m_{amostra}}$$

Em que:

[P] – Concentração do elemento fosforo, em mg/Kg

[Amostra] – Concentração de fosforo na amostra obtida, em mg/L

[EB] – Concentração de fosforo do ensaio branco obtida, em mg/L

Fd – Fator de diluição, 50

$m_{amostra}$ – Massa da amostra inicial

2.6.3. Determinação do teor em Ca, Mg, K, Mn, Cu, Pb, Cd, Zn, Fe, Cr, Ni e Na por espectrofotometria de absorção atômica

Foram preparadas soluções padrão para os elementos Ca (0,0; 1,4; 2,8; 4,2; 5,6 e 7,0 mg/L), Mg (0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg/L), Na (0,0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2 e 1,5 mg/L), K (0,0; 0,8; 1,6; 2,4; 3,2 e 4,0 mg/L), Cu (0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,8 e 1,0 mg/L), Zn (0,0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2,0 mg/L), Fe (0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mg/L), Mn (0,0; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 7,5 mg/L), Cr (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg/L), Cd (0,0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8 mg/L), Pb (0,0; 0,3; 0,6; 1,2; 2,4 e 4,8 mg/L) e Ni (0,0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 mg/L) (Merck, Alemanha). Antes de perfazer o volume final de 100 mL, foram adicionados, a todas estas soluções padrão, 6 mL de HCl a 20%. Aos padrões dos elementos Ca e Mg, adicionaram-se ainda 10 mL de solução de cloreto de lantânio (Merck, Alemanha) (20,05 g/L) e às soluções preparadas com Na e K, acrescentaram-se 10 mL de solução de lítio (Merck, Alemanha) (61,09 g/L). Para a leitura das amostras e do ensaio branco, adicionou-se, tal como nas soluções padrão, solução de cloreto de lantânio para os elementos Ca e Mg, e solução de lítio para os elementos Na e K, numa proporção de 1:10 (Ryan et al., 2012). Todas as soluções foram lidas num espectrofotómetro de absorção atômica (Thermo Scientific, Reino Unido).



Figura 2.3 - Espectrofotómetro de absorção atômica (Thermo scientific, Reino Unido).

A quantidade do elemento quantificado por EAA na amostra é dada por:

$$[E] = ([Amostra] - [EB]) \times \frac{Fd}{m_{amostra}}$$

Em que:

[E] – Concentração do elemento quantificado, em mg/Kg

[Amostra] – Concentração do elemento na amostra, em mg/L

[EB] – Concentração do elemento no ensaio branco, em

mg/Ld – Fator de diluição

$m_{amostra}$ – Massa da amostra inicial

2.7. Extração de compostos fenólicos

Inicialmente, pesaram-se 2 g de alga seca, moída e congelada para um tubo de centrífuga de 16 mL, onde se adicionaram 10 mL de etanol (Merck, Alemanha) a 80%. O tubo foi levado ao *vortex* durante aproximadamente 30 segundos e seguidamente colocado em banho de ultrassons (Argo Lab, Carpi MO, Itália) durante 45 min, com potência 4 e a 35°C. Durante este período, a suspensão foi levada ao *vortex* três vezes (\approx de 10 em 10 min). Terminados os 45 min, a suspensão foi centrifugada (15 min, 5.000 rpm), após a qual se recolheu o sobrenadante. Ao *pellet*, foram novamente adicionados 10 mL de etanol a 80% e repetiu-se todo o processo anterior mais três vezes, todos os sobrenadantes foram juntos. Após a atuação anterior e antes de liofilizar o extrato (1 h a 0,30 mbar e 71 h a 0,20 mbar), procedeu-se à evaporação da fração orgânica, com recurso a um evaporador rotativo (IKA, Deutschland, Alemanha), em banho-maria a 40°C. O extrato foi diluído de forma a obter-se uma concentração final de 10 mg/mL (Samee et al., 2009; Ye et al., 2009).

2.7.1. Teor de Fenóis totais

O Teor de fenóis totais (TFT) foi avaliada através do método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965), adaptado a partir do trabalho realizado por Silva e colaboradores. (2019).

O ácido gálico (Sigma-Aldrich, Alemanha) foi escolhido como padrão e foram preparadas as concentrações de 1; 0,3; 0,1; 0,03; 0,01 e 0 mg/mL em água ultrapura para

determinar a curva de calibração. Numa placa de 96 poços (Fig. 2.4), foram adicionados 158 μL de água ultrapura e 2 μL de extrato para realizar os ensaios e 168 μL de água ultrapura para realizar os brancos. Para a curva de calibração realizou-se o mesmo procedimento substituindo os 2 μL de extrato pela mesma quantidade de padrão. Aos poços dos ensaios foram adicionados 10 μL de reagente Folin-Ciocalteu (Panreac, Barcelona, Espanha). Incubou-se a placa durante 2 minutos no escuro. Foram adicionados 30 μL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 20% (Merck, Dramstadt, Alemanha) aos poços e incubou-se a placa no escuro durante 1 hora. A absorvância foi medida a 760 nm num leitor de placas (Synergy H1 Hybrid Reader, USA). A TFT é expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de extrato.

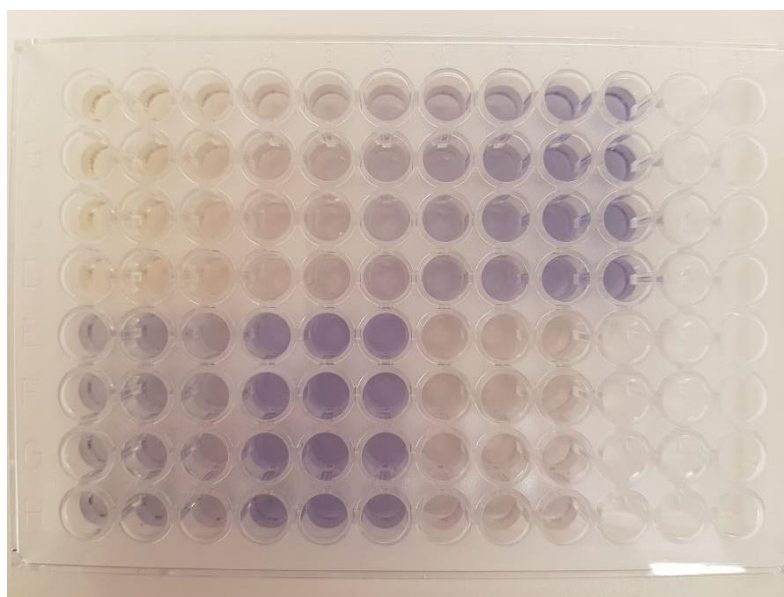


Figura 2.4 - Placa de 96 poços após reação, para determinação da quantidade total de fenóis – método Folin-Ciocalteu.

2.7.2. Capacidade antioxidante (capacidade de redução do radical DPPH)

A redução do radical livre de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (Blois, 1958) foi executada a partir do protocolo adaptado por Silva e colaboradores. (2019). Numa placa de 96 poços (Fig. 2.5), foram colocados 198 μL de solução stock 0,1 M DPPH (Sigma-Aldrich, Alemanha) previamente preparada em etanol absoluto e 2 μL de etanol 80% para o controlo, ou 2 μL de extrato para os ensaios. As reações em branco foram preparadas da mesma forma, substituindo-se o reagente DPPH por etanol. Incubou-se a placa no escuro durante 30

minutos e mediu-se a absorvância a 517 nm no leitor de placas (Synergy H1 Hybrid Reader, USA).

A capacidade de redução dos extratos calculada através da equação:

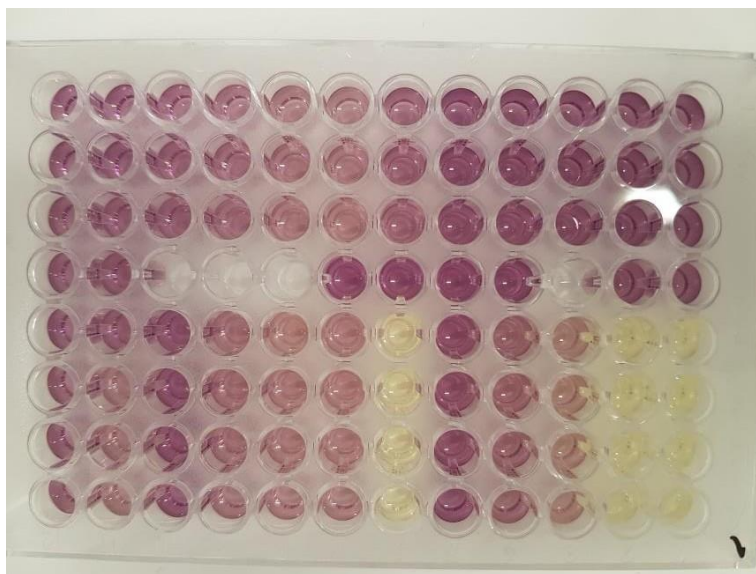


Figura 2.5 - Placa de 96 poços após reação, para determinação da capacidade de redução do radical livre DPPH.

2.8. *Extração de auxinas da amostra*

O protocolo de extração, purificação e filtração foi adaptado de Nordström & Eliasson (1991) e Nordström et al.(1991) (Gonçalves et al., 2008). Para a extração de auxinas na amostra pesaram-se 100 mg de alga seca moída e a mesma massa de alga fresca congelada e macerada em azoto líquido. Em almofariz as amostras foram maceradas com 5 mL de tampão fosfato de pH 6,5. As misturas foram transferidas para tubos de centrifuga e os almofarizes foram lavados duas vezes com a mesma quantidade de tampão. Aos tubos foram adicionados 100 µL de solução de padrão interno, ácido naftalenoacético (ANA) (Merck, Alemanha) 10 mg/L, e o mesmo volume de solução antioxidante, hidroxitolueno butilado (BHT) (Merck, Alemanha) 1 mg/L. Incubaram-se as soluções obtidas a 4°C durante 1 h. Findo o tempo de incubação os tubos foram centrifugados durante 25 min a 4000 rpm, os

sobrenadantes foram filtrados com papel Whatman n. 1 sobre um funil de Buckner G1 montado sobre um kitasato ligado a uma bomba de vácuo. Após a passagem da solução centrifugada, o sistema de filtração foi lavado com 5 mL de solução tampão fosfato com pH 6,5. Os volumes das soluções filtradas foram aferidos aos 20 mL em balão volumétrico e dividido em duas soluções de 10 mL. Cada solução de 10 mL foi passada por uma coluna C18-E Strata (Phenomenex, USA) previamente acondicionada com tampão fosfato com pH 6,5, usando para o efeito um manifold com vácuo moderado, tendo sido recolhida cada fração num goblé. Após recolha da fração, lavaram-se as colunas com 5ml de solução tampão fosfato com pH de 6,5 recolhendo a solução de lavagem no mesmo goblé que a fração obtida anteriormente. Às soluções resultantes no passo anterior foram adicionadas 3 gotas de ácido fosfórico 2,8 N para posteriormente passarem por 2 colunas C18 Chromabond (Macherey-Nagel, Alemanha) montadas em série e previamente acondicionadas com tampão fosfato com pH 2,5, usando um manifold com vácuo moderado (Fig. 2.6). Passaram-se então mais 2ml de água destilada nas colunas e tanto a fração anterior como esta foram descartadas. 2 mL de solução etanol:ácido acético:água (20:70:2) foram passados pelas mesmas colunas de modo a recolher compostos idênticos ao ácido 3-idolacético-aspartato (AIAsp) – extrato

1. Após a passagem de 2 mL de água destilada para a lavagem das colunas, eluíram-se todas as outras auxinas e compostos idênticos passando, por cada conjunto de colunas em série, 100 µL de metanol 100% e 500 µL de metanol 80% (V/V) – extrato 2.

O extrato 1 deveria ter sido concentrado em evaporador rotativo, liofilizado e diluído em 1,2 mL de metanol 80% (V/V) em banho de ultrassons, no entanto, dada a falta do padrão AIAsp, foi descartado. O extrato 2 foi conservado a -20°C e filtrado com filtro 0,2 µm nylon com 13 mm de diâmetro antes da injeção em HPLC (Agilent 1100 Series). A quantificação dos compostos auxínicos na amostra foi executada num HPLC com detetor de fluorescência utilizando uma coluna C18 de fase reversa Hypersil ODS de 4,6 mm de diâmetro, 60 mm de comprimento e com partículas com um tamanho de 3 µm com poros de 120 Å e com uma área de superfície de 170 m²/g. Todo o processo de quantificação decorreu a temperatura ambiente (± 20°C), a injeção foi realizada automaticamente e a fase móvel percorreu a coluna com uma velocidade de 1 mL/min. Como suporte informático de apoio foi utilizado o programa Millennium Chromatography Manager 2010. Como fase móvel, foi utilizada uma mistura de 84% de acetonitrilo: ácido acético: água (10:2:88, v:v:v) e 16% de acetonitrilo. Para a

fração descartada (extrato 1) a composição da fase móvel seria de 95% de acetonitrilo: ácido acético: água (10:2:88, v:v:v) e 5% de acetonitrilo para HPLC (Honeywell, USA). O valor de excitação do detetor de fluorescência programado foi de 292 nm e a luz de emissão foi monitorizada a 360 nm. A quantificação das auxinas teria sido feita por quantificação da área do pico de emissão, por extrapolação com retas de calibração, feitas com soluções standard de AIA, AIB e ANA.

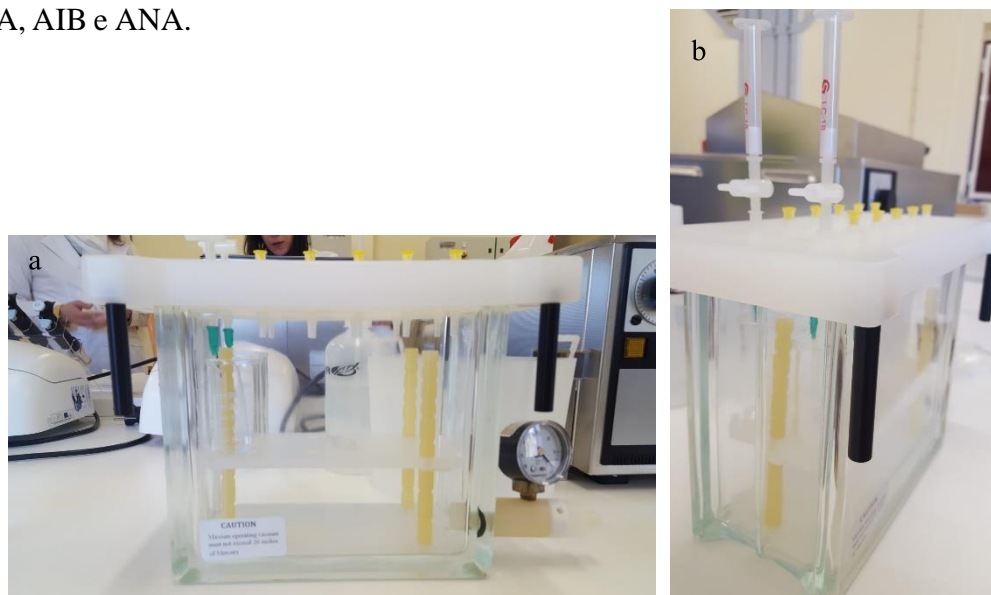


Figura 2.6 - Manifold (com duas colunas C18-E Strata (Phenomenex, USA) emparelhadas) utilizado para obtenção de vácuo moderado para a passagem dos extratos pela fase estacionária das colunas. a e b representam diferentes perspectivas.

2.9. Ensaio qualitativo de citocininas na amostra

2.9.1. Extração de citocininas

Inicialmente, pesaram-se 2 g de alga seca, moída e congelada para um tubo de centrífuga de 16 mL, onde se adicionaram 10 mL de etanol a 80%. O tubo foi levado ao *vortex* durante aproximadamente 30 segundos e seguidamente colocado em banho de ultrassons durante 45 min, com potência 4 e a 35°C. Durante este período, a suspensão foi levada ao *vortex* três vezes (\approx de 10 em 10 min). Terminados os 45 min, a suspensão foi centrifugada (15 min, 5.000 rpm), após a qual se recolheu o sobrenadante. Ao *pellet*, foram novamente adicionados 10 mL de etanol a 80% e repetiu-se todo o processo anterior mais três vezes. Todo o método de extração foi realizado com 5 réplicas, dos quais todos os sobrenadantes foram juntos (Samee et al., 2009; Stirk & Van Staden, 1997; Ye et al., 2009).

Após o procedimento anterior e antes de liofilizar o extrato, procedeu-se à evaporação da sua fração orgânica, com recurso a um evaporador rotativo, em banho-maria a 40°C. Liofilizado o extrato (1 h a 0,30 mbar e 71 h a 0,20 mbar), pesou-se e ressuspendeu-se o extrato em 25 mL de etanol a 80%.

2.9.2. Ensaio *in vitro*

2.9.2.1. Material vegetal

Como material vegetal para testar a presença de citocininas no extrato concentrado, utilizaram-se explantes de castanheiro (híbrido *C. sativa* × *C. crenata*, designado doravante por *Castanea* sp.). Para tal, cortaram-se novos rebentos da planta (Fig. 2.7) e removeram-se as folhas de maiores dimensões, estes foram lavados durante 25 min em água corrente, de maneira a remover a maior parte dos compostos fenólicos libertados durante o corte. Findos os 25 min, os rebentos passaram por uma solução de etanol a 70% durante 30 segundos, para remoção de ceras e outros lípidos. Seguidamente, foram submetidos, durante 10 min, sob agitação, a uma suspensão de 2,0 g/L do fungicida mancozebe (Bayer, Alemanha), para a eliminação fungos. Em seguida, e já numa câmara de fluxo laminar, desinfetaram-se os rebentos numa solução de hipoclorito de sódio 2% durante 10 min com agitação. Com o intuito de remover quaisquer vestígios de hipoclorito de sódio nos tecidos vegetais, os rebentos foram lavados 5 vezes com aproximadamente 300 mL de água pura esterilizada, sendo que a primeira lavagem foi de 30 segundos, a segunda de 1 min, e todas as outras de 3 min. Os explantes foram mantidos em água até à sua utilização. Utilizaram-se 25 explantes, com pelo menos 2 gomos axilares, em que se removeram uma parte das extremidades inferiores e laterais, que estiveram em maior contacto com o desinfetante utilizado. Os explantes foram passados por uma solução de ácido cítrico a 100 mg/L esterilizada, para evitar a forte oxidação frequente nesta espécie, antes de serem colocados em tubos de ensaio com 10 mL de meio MS, com ½ de nitratos, 1,0 mg/L de cadavitamina (ácido nicotínico, ácido ascórbico, glicina, piridoxina, pantotenato de cálcio e tiamina), 0,5 mg/L de BAP, 30 g/L de sacarose, pH 5,5 e 7 g/L de agar. Os tubos foram mantidos em câmara de crescimento a $23 \pm 2^\circ\text{C}$, com um fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após 5 semanas, os explantes foram segmentados e repicados para tubos de ensaio com idêntico

meio de cultura, mas com 0,2 mg/L de BAP e as mesmas condições de cultura. Passadas novas 5 semanas, os explantes foram novamente segmentados e repicados, desta vez para frascos com 50 mL do mesmo meio, onde se colocaram 7 explantes. Este último processo foi repetido até ser possível obter o número de explantes necessários para o ensaio.



Figura 2.7 - Rebentos de castanheiro utilizados para estabelecimento *in vitro*.

2.9.3. Ensaio de multiplicação *in vitro*

Para testar o efeito de citocininas no extrato concentrado da alga em estudo (160 mg/L), testaram-se 4 volumes de extrato diferentes. Desta forma, preparou-se meio para 4 ensaios e 2 controlos com a mesma formulação anterior. As modalidades testadas e os controlos variaram na presença de 0,2 mg/L de BAP (controlo positivo), ausência de qualquer fonte hormonal (controlo negativo) e utilização de 1,0 ml/L (ensaio 1), 2,0 ml/L (ensaio 2), 5 ml/L (ensaio 3) ou 10 ml/L (ensaio 4) de extrato concentrado. Foram preparados 250 mL de cada condição, distribuídos por 5 frascos, com 50 mL cada e onde se colocaram 7 explantes com apenas 2 gomos axilares, para um total de 35 explantes por modalidade. Os frascos foram mantidos em câmara de crescimento a 25/22°C, dia/noite, com um fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.10. Ensaio quantitativo de citocininas na amostra

O ensaio quantitativo de citocininas foi efetuado com base no cálculo da produção de biomassa de *callus* de *Glycine max* em meio de cultura (Miller, 1965). Para a obtenção dos *calli* de *Glycine max* procedeu-se à germinação de sementes de duas cultivares de *Glycine max* comerciais, soja verde (Batlle Huerto y jardin, Barcelona, Espanha) e soja branca (Clemente Viven, Vitoria, Espanha) (Fig. 2.8). Para tal, 40 sementes de cada foram demolidas em água destilada durante aproximadamente 12 horas. As sementes foram depois semeadas em bandejas de germinação com substrato universal e colocadas numa câmara *walk-in* a 25/22°C, dia/noite, com um fotoperíodo de 16 h, intensidade luminosa de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e uma humidade relativa (HR) de $60 \pm 2\%$. Após cerca de 2 semanas, verificou-se que apenas as sementes verdes germinaram, pelo que, apenas esta cultivar foi utilizada para todos os ensaios que se seguiram (Fig. 2.9).



Figura 2.8 - Sementes de *Glycine max* utilizadas na germinação *ex vitro* de molho em água destilada.



Figura 2.9 - Sementes de *Glycine max* verdes germinadas em bandeja de germinação *ex vitro*.

A partes aéreas das plantas foram desinfetados durante 30 segundos em etanol 70% (para a remoção de ceras e tornar mais eficiente a desinfecção) e, já na câmara de fluxo laminar (Biobase, China), imersos durante 1 min em hipoclorito de sódio a 1%. Para a remoção de quaisquer vestígios do último passo, procedeu-se a uma série de lavagens com água pura esterilizada, uma de 30 segundos, duas de 1 min e duas de 2 min. As extremidades e folhas dos rebentos, por estarem danificadas pelo reagente de desinfecção, foram removidas, os epicótilos foram divididos transversalmente em segmentos de 1 cm aproximadamente e cortados longitudinalmente, em duas partes iguais. O material vegetal obtido foi colocado com a superfície do corte longitudinal em contacto com o meio de cultura para indução de *callus*, em placa de Petri (Tabela 2.1).

Após uma semana, já eram visíveis contaminações fúngicas, pelo que todo o processo foi repetido, desde a germinação de sementes à indução dos *calli* em meio de cultura. No entanto, para evitar novas contaminações, procedeu-se à germinação *in vitro* de semente já desinfetadas. Para tal, em câmara de fluxo laminar, 40 sementes de soja verdes foram imersas em água pura esterilizada. Após cerca de 12 horas, as sementes foram desinfetadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 1% durante cerca de 1 min, seguiram-se 5 lavagens sucessivas com água destilada esterilizada de 30 s, 1 min e as restantes de 2 min. As sementes foram colocadas em frascos esterilizados, 5 sementes por frasco, com 2 camadas de filtro de papel no fundo e outras 2 no cimo e as 4 embebidas em água pura esterilizada (Fig. 2.10). Todos os frascos utilizados foram colocados numa câmara de cultura a 25/22°C, dia/noite, com um fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Quando já era visível a germinação das sementes, após cerca de 10 dias (Fig. 2.11), todo o processo de indução de *callus* foi repetido, no entanto, para obter maior quantidade de material vegetal, foram utilizados não só os epicótilos como também os hipocótilos do germinado. As placas de Petri obtidas permaneceram numa câmara de cultura nas mesmas condições descritas anteriormente, sem luz direta. Os *calli* obtidos foram repicados para novo meio de cultura com a mesma composição após 3 semanas, de modo a obter maior quantidade de material caloso e de maior qualidade, eliminando assim quaisquer zonas secas ou oxidadas por excesso de luz.

Tabela 2.1 - Composição do meio de cultura para propagação de *callus* de *Glycine max* (Miller, 1965).

Macronutrientes	mg/L	Compostos orgânicos	mg/L
KH ₂ PO ₄	300,0	Mio-Inositol	100,0
KNO ₃	1000,0	Glicina	2,0
NH ₄ NO ₃	1000,0	Ácido Nicotínico	0,5
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	500,0	Piridoxina	0,1
MgSO ₄ .7H ₂ O	71,5	Tiamina	0,1
KCl	65,0	Reguladores de crescimento	mg/L
Micronutrientes	mg/L	ANA	2,0
MnSO ₄ .4H ₂ O	14,00	Cinetina	0,5
NaFeEDTA	13,20	Fonte de carbono	g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	3,80	Sacarose	30
H ₃ BO ₃	1,60		
Cu(NO ₃) ₂ .3H ₂ O	0,35	Agar	8 g/L
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,10	pH	5.8



Figura 2.10 - Sementes de *Glycine max* desinfetadas, para germinação *in vitro*.



Figura 2.11 - Sementes de *Glycine max* germinadas *in vitro*.

Para a extração de citocininas da alga para o ensaio de crescimento de biomassa de *callus* de *Glycine max*, utilizou-se alga fresca e alga seca de modo a averiguar eventuais perdas hormonais durante o processo de secagem. Como solvente de extração foi utilizado o solvente de Bielecki modificado (metanol/ácido fórmico água, 15:1:4, V/V), que elimina o clorofórmio do solvente original (metanol/clorofórmio/ácido fórmico/água, 12:5:1:2, V/V) (Bielecki, 1964). Esta escolha foi influenciada pelos resultados obtidos por Hoyerova et al. (2006) que estudaram o efeito de três solventes: metanol 80% (V/V), solvente de Bielecki e de Bielecki modificado, mostrando que o solvente sem clorofórmio é mais favorável na purificação e análise dos produtos. Para tal, adicionou-se 1 g de alga seca moída a 10 tubos de centrifuga, aos quais foram acrescentados 10 mL do solvente de extração. Seguidamente foram levados ao *vortex* por 1 min e permaneceram durante a noite a -20°C. Posteriormente, procedeu-se à centrifugação dos extratos a 4400 rpm durante 30 min a 4°C. Os sobrenadantes foram juntos e procedeu-se a uma re-extração dos *pellets* com 5 mL do mesmo solvente. Na segunda extração os tubos sofreram agitação por *vortex* durante 30 s e foram mantidos a -20°C por 1 h. O resultado da re-extração foi então centrifugado (4400 rpm, 30 min, 4°C) e os sobrenadantes foram acrescentados aos anteriores. Todo o processo foi executado de igual forma para alga fresca macerada em azoto líquido. Os sobrenadantes obtidos foram à vez filtrados com papel Whatman n. 1 sob vácuo. Para a separação das citocininas utilizou-se a técnica de cromatografia líquida. Para tal, acondicionou-se uma coluna cromatográfica com cerca de 50 g de gel de acondicionamento comercial (Dowex 50W-X8), servindo assim de fase estacionária na cromatografia de troca-iónica realizada seguidamente. A coluna foi acondicionada com etanol a 80 % e, após a acidificação das amostras a pH=3, 100 mL do extrato de alga seca foi passado lentamente (20 mL/h) pela coluna. Após uma lavagem com 100 mL de etanol 80%, foram passados lentamente 100 mL de hidróxido de sódio 5 N, de modo a arrastar as citocininas retidas na coluna. A coluna foi novamente lavada e acondicionada com etanol 80 % e os processos de reter e arrastar as citocininas na/da fase estacionária foram repetidos para o extrato de alga fresca. As frações de hidróxido de sódio recolhidas foram liofilizadas (1 h a 0,30 mbar e 71 h a 0,20 mbar) e o resíduo ressuspenso em 3 mL de etanol 80 %. A suspensão obtida foi aplicada em papel cromatográfico Whatman nº 1, 11 gotas de 10 µL com 1,5 cm de distância (Figura 2.12), para execução de cromatografia em papel, com resolução ascendente com isopropanol: hidróxido de amónio

25 %: água (10:1:1, V/V). A cromatografia foi dada por concluída após a frente do solvente ter percorrido aproximadamente 30 cm.

O papel cromatográfico resultante da última cromatografia executada, foi dividido em 10 partes iguais no sentido do comprimento contendo cada faixa compostos diferentes, com diferentes tamanhos. Cada faixa foi ainda dividida em três partes iguais de modo a obter três réplicas de cada conjunto de compostos. Os cortes do papel cromatográfico estão esquematizados na figura 2.12, a cinzentos escuro e claro apresentam-se os cortes obtidos e utilizados na preparação dos meios de cultura de *callus* de *Glycine max*.

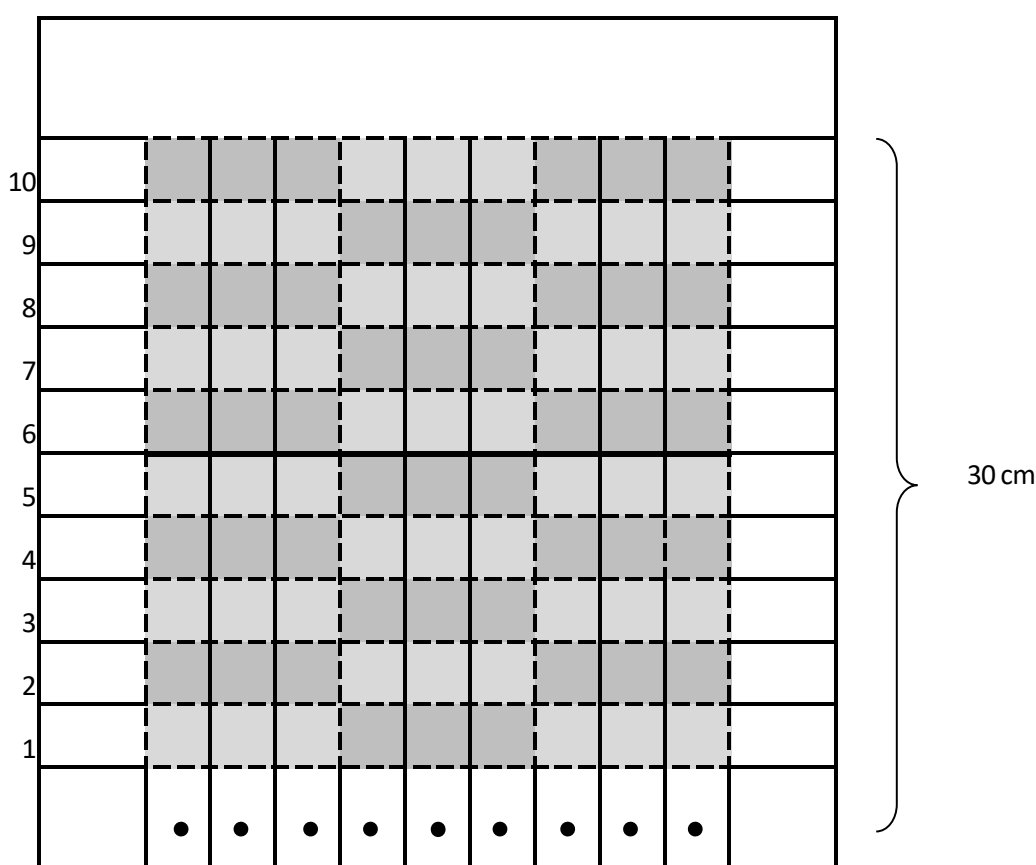


Figura 2.12 - Esquematização dos cortes (a tracejado) efetuados para posterior utilização na preparação dos meios de cultura para crescimento de *callus* de *Glycine max*.

Para quantificação de compostos citocinínicos, preparou-se o mesmo meio de cultura de *callus* de *Glycine max* anteriormente descrito, no entanto, sem cinetina. Após a dissolução do agar, o meio foi distribuído por tubo de vidro (12 mL por tubo) e as tiras obtidas do papel

cromatográfico foram submersas no meio durante 30 segundos (1 tira por tubo). Foi ainda preparado meio de cultura com concentrações conhecidas de cinetina (0, 1, 10, 50 $\mu\text{g/L}$) para elaborar uma reta de calibração e com a concentração utilizada no meio de cultura original 500 $\mu\text{g/L}$. Todos os meios elaborados foram preparados em triplicado.

Após esterilização e solidificação dos meios em autoclave horizontal, foram colocados, em cada tubo e sob condições assépticas, 10 mg de *callus* de *Glycine max* com aproximadamente 4 semanas (Fig. 2.13 e 2.14). Após 4 semanas, os *calli* foram novamente pesados e, através de uma curva de calibração obtida pelo aumento de biomassa em função das concentrações de cinetina presente no meio, calculou-se a concentração de compostos citocinínicos presentes no meio em equivalentes de cinetina.

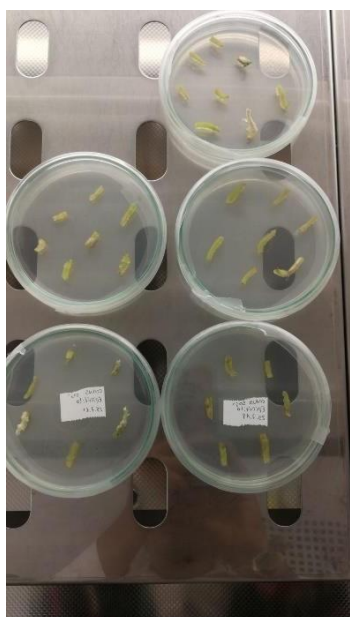


Figura 2.13 - *Calli* de *Glycine max* obtidos a partir dos rebentos germinados.



Figura 2.14 - *Calli* de *Glycine max* no ensaio para quantificação de citocininas.

2.11. Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados no software SPSS versão 25 (IBM 324 Corporation, USA). Os dados obtidos foram avaliados através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis, por não se verificar homogeneidade de variância em nenhuma das análises,

pelo teste de Levene. Nas análises onde se verificou diferenças estatisticamente significativas, pelo teste de Kruskal-Wallis, recorreu-se ao teste de comparações múltiplas de Games-Howell. Em todas as análises, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de significância de $p\text{-value} \leq 0,05$.

3. Resultados e discussão

3.1. Conteúdo total de cinzas, humidade e macro e micronutrientes

A macroalga castanha *Saccorhiza polyschides*, presente abundantemente na costa de Peniche nos meses de verão, contém cerca de 5,2% de humidade no interior das suas células e tem um conteúdo mineral de quase 50% do seu peso seco, resultado acima do obtido por García e colaboradores (2016). Esta alga apresenta ainda um conteúdo em proteína total de aproximadamente 4,73% (Tabela 3.1), menor que o obtido por García e colaboradores (2016) que avalia o conteúdo nutricional da mesma espécie de alga, o qual obteve um valor de 7,3%, recolhida durante o outono no sul de Espanha a uma profundidade entre 12 e 15 metros. De referir, porém, que este autor usou o fator de conversão de 6,45 para plantas superiores, o que sobre dimensiona o valor obtido para proteína. Outra avaliação nutricional desta alga recolhida em abril 2012 na Figueira da Foz, Portugal, obtém resultados de proteína total ainda mais elevados (14,4%), também usando o fator de conversão de 6,45 (Rodrigues et al., 2015), o que leva a crer que alterações na localização geográfica, as condições climáticas, se pertence ou não à zona intertidal e a altura da recolha pode claramente alterar o seu conteúdo nutricional.

De todo o conteúdo em cinzas, esta alga é composta maioritariamente por K (10 g/100g PS) e Na (3,08 g/100g PS), mas também possui uma quantidade elevada de Mg e Ca (1,78 e 1,62 g/100g PS, respetivamente). Porém, apresenta quantidades menores de N (0,88 g/100g PS). Por outro lado, dentro dos micronutrientes, a alga analisada contém na sua maioria B, Fe e Zn (58,3; 31; 11,1 mg/Kg PS, respetivamente), e em quantidades vestigiais Cu, Pb e Cd (Tabela 3.1). Estes resultados são coerentes com os obtidos por García e co-autores e Rodrigues e co-autores (García et al., 2016; Rodrigues et al., 2015) que analisaram a mesma alga no outono de 2011 e em Abril de 2012, proveniente do Golfo de Cádiz, Espanha, e de Figueira da Foz, Portugal, respetivamente. Para as plantas, esta alga seria uma boa fonte de potássio, no entanto, o seu elevado teor em sódio pode não ser uma mais-valia, sendo esta uma das principais desvantagens na utilização de algas secas como fertilizante. Desta forma, a análise da composição mineral de extratos desta alga, podia demonstrar se

estes poderiam ser utilizados como bioestimulantes de plantas e ainda substituir meios de cultura para propagação de plantas *in vitro*.

Tabela 3.1 - Conteúdo total de humidade, cinzas e micro e macronutrientes na macroalga *Saccorhiza polyschides*.

Conteúdo total			
Água (65°C)	66,9% PF		
Água (105°C)	72,1% PF	Micronutrientes (mg/Kg PS)	
Cinzas	47,4% PS	Fe	31
Proteína total	4,73% PS	Cu	0,44
Macronutrientes (g/100g PS)		Zn	11,1
N	0,88	Mn	1,88
P	0,14	Cr	2,26
K	10,0	Cd	< LD (0,02)
Ca	1,62	Ni	5,21
Mg	1,78	Pb	< LD (0,72)
Na	3,08	B	58,3

LD – Limite de deteção

3.2. Quantidade total de fenóis e atividade antioxidante (DPPH)

O extrato etanólico preparado a partir da alga em estudo possui um conteúdo total em fenóis de $400 \pm 13 \mu\text{g EAG/g PS}$ (Tabela 3.2). O valor obtido está entre os obtidos por Pinteus et al. (2017), que alcançou valores de 66,89 e 0,26 mg EAG/g PS de alga para extratos metanólicos e com diclorometano (Pinteus et al., 2017).

A atividade do extrato etanólico realizado durante o presente estudo para a redução do radical DPPH, é apresentado em percentagem de inibição, contendo quase 10 % de atividade (Tabela 3.2). Os valores exibidos são baixos, o que pode ser esclarecido pelo elevado conteúdo em NaCl, que pode ter prejudicado a atividade antioxidante do extrato,

explicando a quantidade relevante em fenóis, mas a baixa capacidade de redução do radical DPPH.

No entanto, tendo em conta que esta forma de apresentar o resultado pode facilmente sofrer alterações consoante o método e a sua forma de execução, a sua comparação com outros estudos não é fiável. Não tendo sido possível realizar, uma das formas de apresentação de resultado mais frequentes é em IC50, que indica a concentração em que o extrato apresenta inibição de 50 % do radical DPPH. Para tal, deveriam ter-se testado várias concentrações do extrato de forma a gerar uma curva de calibração, e assim, calcular o valor de IC50. Outra opção seria ainda apresentar resultados em equivalentes de um antioxidante conhecido (Trolox, BHT ou ácido ascórbico) e realizar outros ensaios de análise de antioxidantes, como o FRAP, ORAC ou ABTS.

Tabela 3.2 - Teor fenólico total e capacidade antioxidante (DPPH). Os valores estão representados em média \pm desvio padrão (n=4).

Parâmetro	
TFT (μ g EAG/g PS)	400 \pm 13
DPPH (% de redução)	8,97 \pm 0,70

3.3. Inclusão de extrato na formulação de meios, verificação da presença de citocininas no extrato

No que diz respeito aos resultados obtidos na inclusão do extrato etanólico preparado com o *Saccorhiza polyschides* no meio de cultura para propagação de *Castanea* sp., não se observam os resultados esperados. Tendo em consideração o objetivo de substituir os reguladores de crescimento geralmente adicionadas ao meio de cultura, era de esperar um acréscimo no tamanho e número de rebentos, sem que estes sofressem perdas de vigor e aumento de vitrificação e oxidação. Porém, verificou-se um aumento de vitrificação e oxidação e diminuição do vigor com o aumento da concentração de extrato.

3.3.1. Variação do vigor, oxidação e vitrificação nos rebentos formados

Observando a figura 3.1, é notório o decréscimo do vigor nos rebentos obtidos do meio com extrato de alga, principalmente dos meios com maior concentração de extrato por litro de meio (5 e 10 mL/L) que apresentam diferenças estatisticamente significativas com os meios preparados com 1 e 2 mL/L, que por sua vez também as apresentam com o meio preparado sem hormona. O valor médio de vigor dos explantes mais elevado obteve-se no meio preparado com BAP, apresentando ainda diferenças estatisticamente significativas com todos os outros.

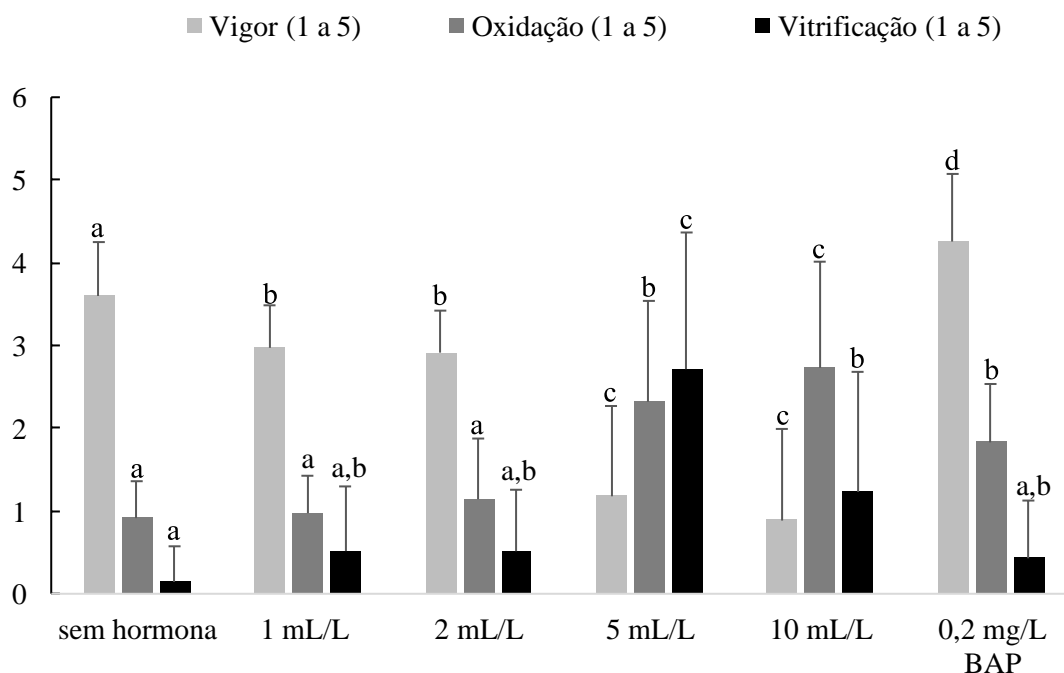


Figura 3.1 - Vigor, oxidação e vitrificação dos rebentos formados nos diferentes tratamentos. Os resultados representam a média (\pm Desvio padrão, n=26-35), na mesma análise, letras diferentes entre tratamento, representam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) pelo teste de comparações múltiplas de Games Howell.

De acordo com Arnon & Stout (1939a; 1939b), para as plantas serem vigorosas são necessários nutrientes específicos em concentrações particulares, para cada espécie de planta, quer no solo quer no meio de cultura. Os nutrientes vegetais podem ser classificados levando-se em consideração a sua importância e as quantidades necessárias para as plantas.

Estes autores propõem como principais macronutrientes: N, P e K sendo estes indispensáveis às plantas em grandes quantidades sendo a sua adição necessária através de fertilização. Como macronutrientes secundários apresentam o Ca, o Mg e o S necessários para as plantas também em grandes quantidades, mas geralmente disponíveis no solo. No que diz respeito aos oligoelementos, referem Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, B, Mo e Cl, como vitais para as plantas em baixa quantidades e geralmente tóxicas em altas concentrações. São, ainda, minerais benéficos Na, Si, Co, Al, V, Ni, Se, As, F, Br, I, Cd, Cr e Pb, essenciais para algumas plantas, e Cd, Cr, Pb, Hg, Ni, Se e As são minerais potencialmente fitotóxicos para algumas plantas, mas principalmente tóxicos para humanos e animais.

Tendo em conta a composição da alga em estudo, pode verificar-se que o elevado conteúdo em Na, presente devido à composição salina das águas marinhas, possa prejudicar o desenvolvimento de plantas não halófitas, como o caso da planta utilizada no ensaio (Rayorath et al., 2008). Por outro lado, minerais como o P e o N teriam de estar presentes na alga em quantidades superiores. No entanto, tendo sido utilizado um extrato e não a alga completa, apesar de não ter sido possível a sua realização, a quantificação de minerais do extrato seria importante. Desta forma, poderia verificar-se se realmente a perda de vigor poderia estar associada à presença de elementos em quantidades excessivas pela adição de extrato ao meio.

No que toca à oxidação dos explantes (figura 3.1), não existem diferenças estatisticamente significativas entre os meios preparados com 1 e 2 mL/L e o meio sem hormona, no entanto verifica-se um aumento desta variável quando utilizados 5 e 10 mL/L de extrato. O meio preparado com o regulador de crescimento comumente utilizada para a propagação desta espécie de castanheiro, apresenta rebentos com uma oxidação superior quando comparado com os obtidos pelos meios preparados sem hormona e com 1 e 2 mL/L de extrato e não apresenta diferenças estatisticamente significativas com os obtidos com concentrações de extrato de 5 mL/L.

Analisando os resultados, verifica-se que o regulador de crescimento utilizado para a propagação de castanheiro pode ter um poder oxidativo nos novos rebentos,

significativamente superior ao que se observa nos rebentos desenvolvidos com extrato até 2 mL/L. Isto leva a crer de só em concentrações superiores é que o estrato demonstra possuir poder pró-oxidativo, provavelmente devido à quantidade de fenóis nele presente que, em concentrações excessivas, podem levar à oxidação, inibição do crescimento ou até à morte dos explantes (de Klerk et al., 2011; Osterc et al., 2004; Trobec et al., 2005).

Tendo em conta a vitrificação dos rebentos (Figura 3.1), observa-se que, para os controlos (com BAP e sem hormona), não existe uma vitrificação acentuada. O mesmo acontece para os meios com 1 e 2 mL/L de extrato que, apesar de apresentarem valores superiores que os controlos, não apresentam diferenças estatisticamente significativas com estes. Já para os meios com 5 e 10 mL/L de extrato verifica-se um aumento desta variável, mais acentuada ainda nos explantes gerados no meio com 5 mL/L de extrato. No entanto, os meios preparados com 10 mg/L de extrato só apresentam diferenças estatisticamente significativas com os meios sem hormona (que apresentam pouca vitrificação) e com 5 mL/L de extrato (que apresenta elevada vitrificação).

A vitrificação é definida como um estado fisiológico em que a planta apresenta um aspeto translúcido característico resultante da acumulação excessivo de água no interior das células. Esta anomalia é uma das principais observadas em cultura de células e tecidos vegetais, principalmente em meios líquidos e semilíquidos (Debergh et al., 1992; Gaspar et al., 1991; Kevers et al., 1984; Ziv, 1991). Alguns autores sugerem que o stress oxidativo, provocado pelo desequilíbrio entre compostos antioxidantes e pro-oxidantes, pode ser um fator importante que pode provocar a vitrificação dos tecidos (Chen & Ziv, 2001; Franck et al., 1995, 1998; Piqueras et al., 1998). Outros trabalhos destacam que a vitrificação possa ainda ser desencadeada pelo desequilíbrio dos componentes do meio de cultura, especialmente dos reguladores de crescimento, sobretudo devido à presença de grandes concentrações de auxinas e/ou citocininas (de Oliveira et al., 1997; Joyce et al., 2003; Kataeva et al., 1991; Picoli et al., 2001) que justifica a existência de maior vitrificação nos rebentos do controlo com BAP do que do controlo sem hormona. Tendo isto em conta, a alta vitrificação encontrada nos rebentos gerados a partir do meio de cultura com extrato de alga, pode ser explicada pela presença em excesso de minerais e de compostos fenólicos bem

como a presença elevada de reguladores de crescimento, provocado pela adição de extrato a um meio de cultura completo a nível mineral.

3.3.2. Variação do número e comprimento dos rebentos obtidos

No que diz respeito ao número de rebentos formados (Figura 3.2), é notório o decréscimo dos rebentos com um tamanho superior a 0,5 cm à medida que se aumenta a concentração de extrato no meio. Tendo em conta os meios preparados com extrato de alga, foi a partir do meio com 1 mL/L de extrato que se observaram o maior número de rebentos com mais de 0,5 cm, no entanto, este número é muito inferior ao obtido no tratamento com BAP.

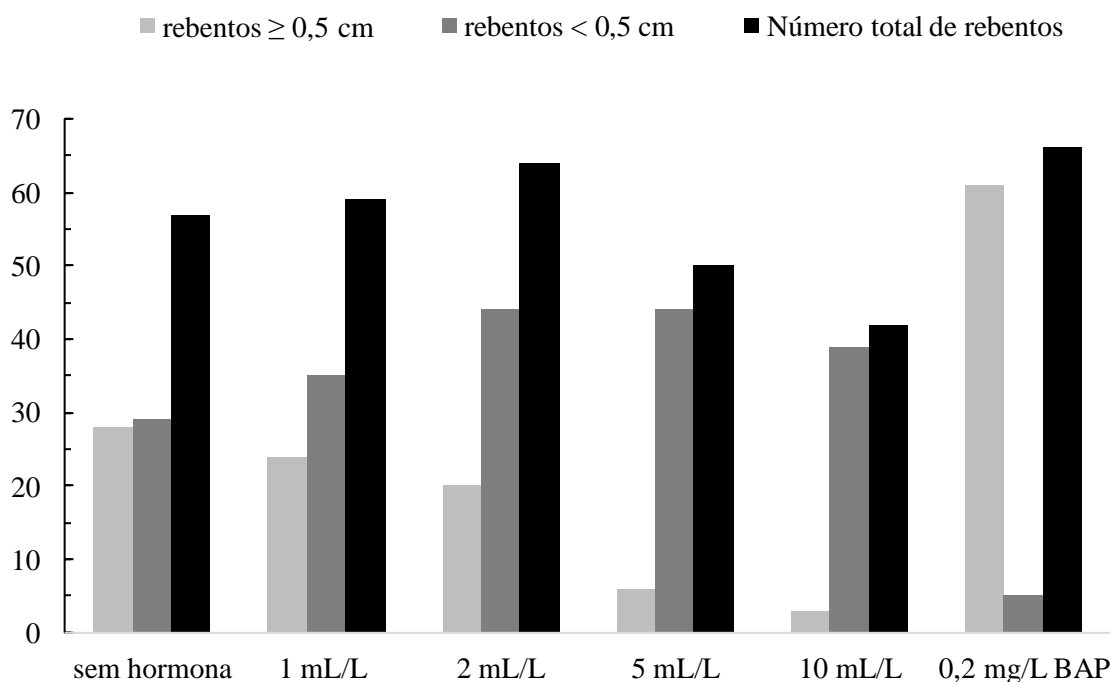


Figura 3.2 - Número total de rebentos, número de rebentos com comprimento \geq de 0,5 e número de rebentos com comprimento $<$ de 0,5 cm.

A partir do gráfico da figura 3.3, pode ainda perceber-se que o crescimento do número médio de rebentos por explante com comprimento inferior a 0,5 cm tanto no tratamento com 5 mL/L como o no com 10 mL/L de extrato, apresentam diferenças estatisticamente significativas dos tratamentos sem hormona e com 1 mL/L de extrato. O mesmo se verifica quando se analisa decréscimo do número médio de rebentos por explante com comprimento superior a 0,5 cm, diferindo apenas na presença de diferenças estatisticamente significativas do tratamento com 10 mL/L também do tratamento com 2 mL/L de extrato. De notar também que, para o do número médio de rebentos por explante com comprimento tanto superior como inferior a 0,5 cm, o tratamento realizado com 0,2 mg/L de BAP apresenta diferenças estatisticamente significativas com todos os outros. No entanto, quando se analisa o número médio total de rebentos gerados por explante, não existem quaisquer diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos.

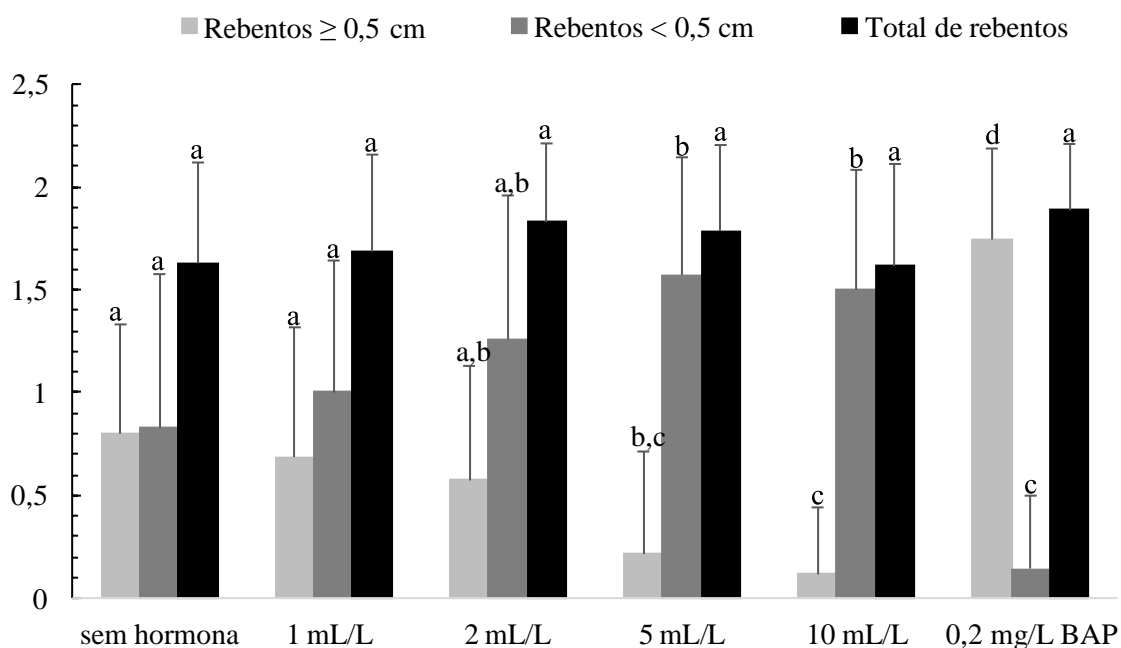


Figura 3.3 - Média do número de rebentos gerados por explante de comprimento \geq a 0,5 cm, média do número de rebentos gerados por explante de comprimento $<$ a 0,5cm e média do número total de rebentos gerados por explante.

Os resultados representam a média (\pm Desvio padrão, $n=26-35$), na mesma análise, letras diferentes entre tratamento, representam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) pelo teste de comparações múltiplas de Games Howell.

Para a propagação desta planta, o comprimento dos rebentos ser superior a 0,5 cm é um requisito para a sua utilização como novo explante. Desta forma, tendo em conta os resultados, e apesar de não existirem diferenças estatisticamente significativas no número total de rebentos entre tratamentos, o comprimento destes rebentos apresenta. Assim sendo, estes resultados vão refletir-se quando analisados o número de explantes gerados por tratamento.

Ao observar a tabela 3.3, verifica-se que o rácio entre o número de explantes gerados e o número de explantes inicial decresce à medida que se aumenta a concentração de extrato no meio de cultura. Para a micropropagação de plantas ser bem-sucedida, este rácio tem de ser superior a 1, o que significa que cada explante inicial gera mais que 1 explante, e assim a planta é propagada, caso contrário, o número de explantes mantinha-se, não sendo possível a sua propagação. No entanto, isto só se verificou no tratamento controlo, com 2 mg/mL de BAP adicionados ao meio, em que cada explante inicial gera em média 3,29 explantes novos. É ainda relevante referir que, no meio preparado com 10 mL/L, observou-se a morte de 25% dos explantes testados.

Tabela 3.3 - Rácio entre o número de explantes gerados e o número de explantes inicial

Tratamento	<u>nr de explantes gerados</u> <u>nr de explantes inicial</u>
S/ hormona	0,91
1 mL/L	0,74
2 mL/L	0,66
5 mL/L	0,14
10 mL/L	0,09
0,2 mg/mL BAP	3,29

Respetivamente ao tamanho do menor rebento (Figura 3.4) com dimensão superior a 0,5 cm, observa-se que, nos meios preparado com BAP, o valor médio obtido é superior aos valores médios dos rebentos com mais de 0,5 cm de todos os restantes tratamentos.

É de notar que os reguladores de crescimento vegetais são eficazes em concentrações muito baixas, desta forma, concentrações mais elevadas destes compostos podem ter um efeito antagónico ao que se pretende (Wally et al., 2013; Wu & Hu, 2009). Assim, a possível presença de citocininas em elevadas concentrações no extrato pode explicar o a baixa produção de novos rebentos e o seu reduzido crescimento nos explantes submetidos a meios de cultura com concentrações elevadas de extrato de alga.

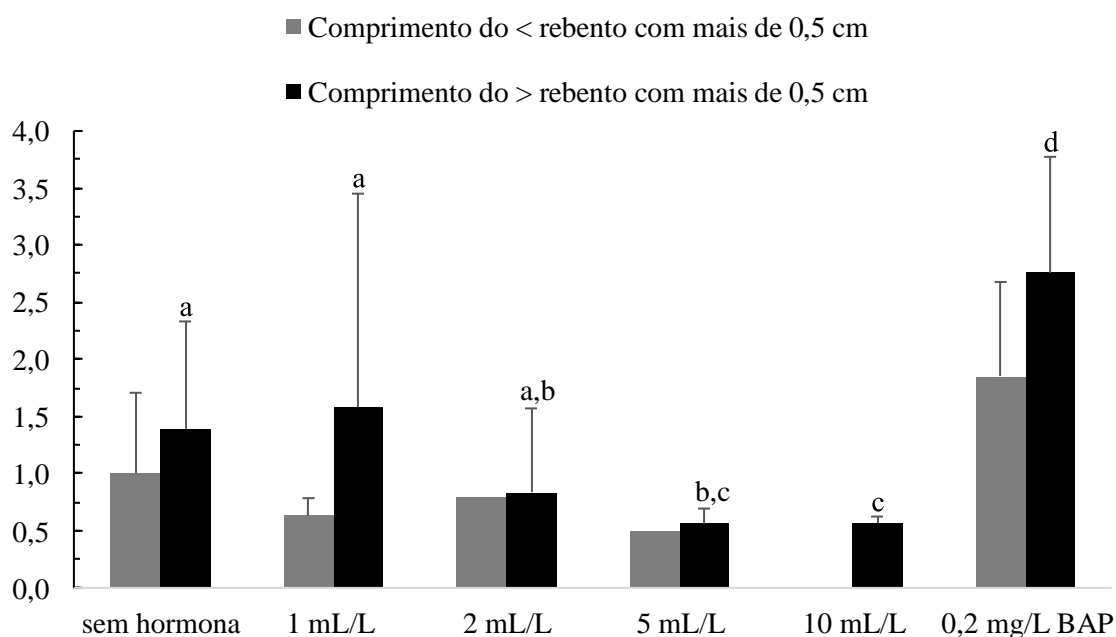


Figura 3.4 - Comprimento médio do menor e maior rebento com mais de 0,5 cm.

Explantes que geraram apenas um rebento de comprimento superior a 0,5 cm, o rebento foi contabilizado apenas no conjunto “comprimento do maior rebento com mais de 0,5 cm”.

Os resultados representam a média (\pm Desvio padrão, n=26-35), na mesma análise, letras diferentes entre tratamento, representam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) pelo teste de comparações múltiplas de Games Howell.

No seguimento destes resultados, nenhuma das concentrações utilizadas mostrou ser uma mais-valia na substituição dos reguladores de crescimento comerciais. No entanto, os

meios formulados com 1 e 2 mL/L de extrato mostraram possuir maior capacidade para inibir a oxidação dos rebentos, podendo este ser explicado pela capacidade antioxidante do extrato anteriormente referida. Esta capacidade antioxidante não foi exibida nos meios preparados com concentrações superiores de extrato, podendo estar relacionada com a pro-oxidação provocada pelo excesso de compostos fenólicos adicionados ao meio através extrato.

Alguns autores sugerem ainda que extratos de algas exibem efeitos biológicos de indução de rebentos, germinação, aumento do comprimento dos explantes, raízes e folhas, a concentrações baixas, sugerindo que existem de facto fitohormonas nestes extratos, e que estas são o principal responsável por estas induções (Esserti et al., 2017; Khan et al., 2009; Kumar & Sahoo, 2011; Latique et al., 2013; Rayorath et al., 2008; Sivasankari et al., 2006). Deste modo, seria interessante uma avaliação, nas mesmas condições, de novos explantes expostos a meios de cultura com concentrações mais baixas de extrato de alga, assim, reduzia-se o desequilíbrio de minerais e de reguladores de crescimento no meio de cultura, que possa estar a ser provocado pela adição de concentrações elevadas de extrato. Outra hipótese seria a quantificação de minerais do extrato e equilibrá-los com os já presentes no meio de cultura, desta forma, verificar-se-ia se a elevada vitrificação e oxidação estariam a ser provocadas apenas pelo desequilíbrio mineral. A elaboração de extratos aquosos pode ainda ser uma alternativa ao extrato etanólico realizado (Esserti et al., 2017; Kalaiivanan & Venkatesalu, 2012; Kumar & Sahoo, 2011; Latique et al., 2013). Por exemplo, Esserti e colaboradores (2017) verificaram que extratos aquosos das algas *Cystoseira humilis* subsp. *myriophylloides*, *Laminaria digitata* e *Fucus spiralis* foram eficazes em baixas concentrações na substituição total ou parcial dos minerais, vitaminas e hormonas do meio de cultura na propagação de *Nicotina benthamiana*, *Prunus domestica*, *Prunus armeniaca* e *Vitis vinífera*.

Tendo em conta as quantidades de Na presentes na amostra, é possível que parte deste esteja presente no extrato e interfira com a absorção de água pelos tecidos vegetais, diminuindo o seu vigor e podendo levá-los à morte (Nkemka & Murto, 2010; Provin & Pitt, 2017). Desta forma, a utilização de explantes de plantas halófitas, podia confirmar a presença ou ausência de citocininas com o método utilizado no presente estudo.

Apesar de não ter sido possível, seria adequada uma avaliação do extrato efetuado por HPLC, assim, verificar-se-ia a existência, ou não, de citocininas provando a eficácia do método executado no que diz respeito à extração de citocininas da amostra de alga.

3.4. *Quantificação de citocininas*

Os resultados obtidos por gravimetria, para quantificação de compostos citocinínicos separados por cromatografia em papel, levam a crer que é na alga fresca que se conseguem obter maiores concentrações. No entanto, não se verifica coerência entre as várias réplicas. Como se pode verificar na tabela 3.4 as maiores concentrações de compostos semelhantes às citocininas são obtidos na réplica 1 da alga fresca, nas posições 6, 7 e 8, mas o mesmo não é verificado nas réplicas 2 e 3, observando-se concentrações algo menores. Como exemplo, é também na posição 8, que se apresenta o menor valor de concentração, réplica 3, o que poderia levar a crer que a existência de compostos como as citocininas é escassa ou nenhuma neste conjunto.

Neste sentido, as diferenças observadas na variação gravimétrica dos *calli* de *Glycine max* sugerem que, apesar de terem sido realizadas nas mesmas condições, pode ter existido uma má diluição e/ou passagem das citocininas presentes no papel para o meio de cultura, tendo em conta que nos tubos iniciais o meio de cultura poderia estar a uma temperatura mais elevada que os seguintes. Este fator poderia ser melhorado com o aumento do tempo de demorância do papel cromatográfico no meio. Outra hipótese, sustentada pela observação de valores de concentração semelhantes entre conjuntos de compostos próximos (exemplo: os compostos 3 das réplicas 1 e 3 e 2 da réplica 2 da alga fresca), sugere que possam não ter havido uma ascensão uniforme do extrato durante o processo cromatográfico. Todavia, é perceptível a existência de compostos de natureza citocinínica, ainda assim, o aumento da quantidade de extrato colocado no fundo do papel cromatográfico e a utilização de um maior pedaço de papel detentor dos compostos separados, poderia gerar resultados mais significativos e coerentes.

Tabela 3.4 - Concentração de compostos com atividade citocinínica transferida para o meio em μg eq. cinetina/L de meio. A verde assinalam-se os compostos quantificados em concentrações superiores a $20 \mu\text{g}$ eq. cinetina/L, a amarelo os compostos com concentrações entre 10 e $20 \mu\text{g}$ eq. cinetina/L e a vermelho os compostos não detetados (sem atividade).

Conjunto de compostos	Concentração de citocininas (μg eq. cinetina/L)					
	Alga fresca			Alga seca		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
1	9,90	10,51	-0,73	23,28	-5,73	-0,27
2	1,93	-6,24	-4,05	-0,37	16,44	5,10
3	15,77	7,29	17,25	-1,29	12,91	10,20
4	4,53	13,27	-4,20	14,70	6,68	-5,78
5	-6,09	8,77	0,14	2,64	7,55	0,60
6	55,10	8,77	4,13	-1,70	7,09	-0,57
7	33,24	3,10	18,79	-2,67	19,45	1,62
8	59,96	15,26	-14,93	14,85	-7,62	3,72
9	7,04	-8,80	3,05	2,80	-6,81	1,83
10	7,04	-4,92	-7,16	8,42	-0,11	-4,86

Ainda assim, tendo em conta os valores em equivalentes cinetina obtidos, é de notar a presença de compostos citocinínicos. Note-se que, são nas frações 6, 7 e 8 que se encontram os valores mais elevados de compostos com atividade equivalente à cinetina ($59,96$; $55,10$ e $33,24 \mu\text{g}$ eq. cinetina/L, tabela 3.3). Estes resultados vão ao encontro dos obtidos por Stirk et al. (2004) que utilizaram o mesmo método de purificação e quantificação de citocininas e obtiveram os melhores resultados nas frações 7, 8 e 9 com valores próximos de $50 \mu\text{g}$ eq. cinetina/L. Uma análise por HPLC-MS do extrato utilizado, poderia revelar quais os compostos específicos e ainda as suas concentrações nele presentes.

3.5. Quantificação de auxinas

Analisando os resultados da extração de auxinas, não se verificou a presença destas na amostra de alga analisada. Inicialmente injetou-se apenas metanol 80% para verificar o tempo de retenção do solvente, para servir de padrão injetaram-se 3 misturas de auxinas padrão, AIA e ANA; AIB e ANA; e AIB, ANA e AIA, para, desta forma, se obterem os tempos de retenção (Figura 3.5, 3.6 e 3.7). Sendo assim, ao comparar os diferentes

cromatogramas, verificou-se que para o ANA o tempo de retenção está próximo dos 3 min, para o AIB próximo dos 2,3 min e para o AIA próximo dos 1,1 min.

Como referido anteriormente utilizou-se como padrão interno ANA. Deste modo, era expectável detetar-se, após injeção em HPLC, o pico do solvente, um pico perto dos 3 min e outros com tempos inferiores ou até superiores. Após a primeira injeção do produto final da extração e pré-purificação de compostos auxínicos da amostra, verificou-se que apenas estava presente o padrão interno (Figura 3.8), levando a crer que não existem este tipo de compostos na alga ou, caso existam, estão presentes em concentrações mínimas.

Tendo em conta a foto- e termo-sensibilidade das auxinas, repetiu-se todo o processo em gelo e em sala escura e fria. No entanto, os resultados foram ainda menos significativos, detetando-se apenas um pico correspondente ao solvente (Figura 3.9). Uma explicação para o sucedido pode ser a presença de grandes quantidades de sal, não só presente naturalmente, mas também devido ao processo de lavagem efetuado na alga, que podem ter interferido na purificação dos compostos com efeitos auxínicos.

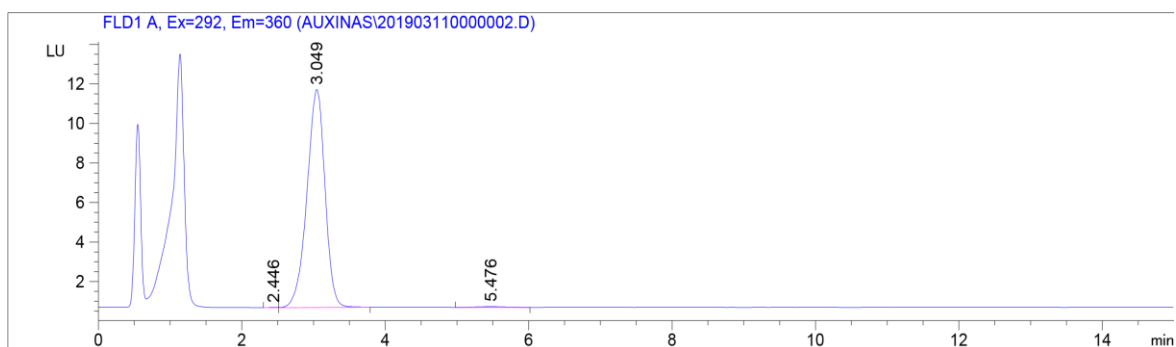


Figura 3.5 - Cromatograma de AIA e ANA a 2µg/mL em metanol.

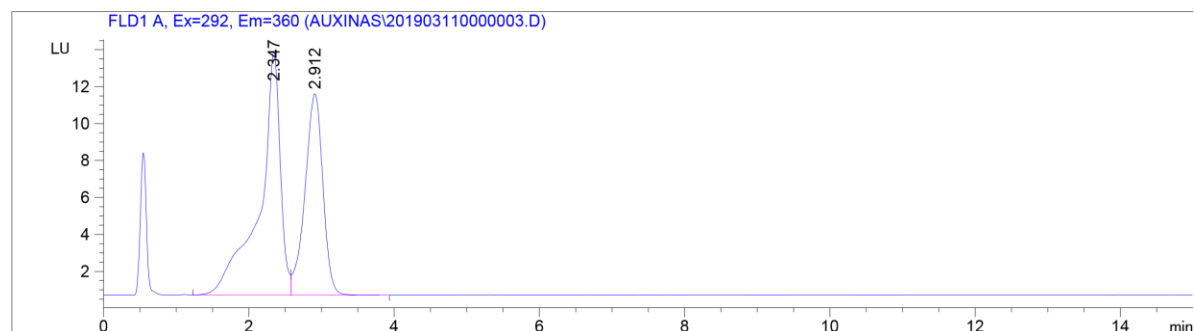


Figura 3.6 - Cromatograma de AIB e ANA a 2µg/mL em metanol.

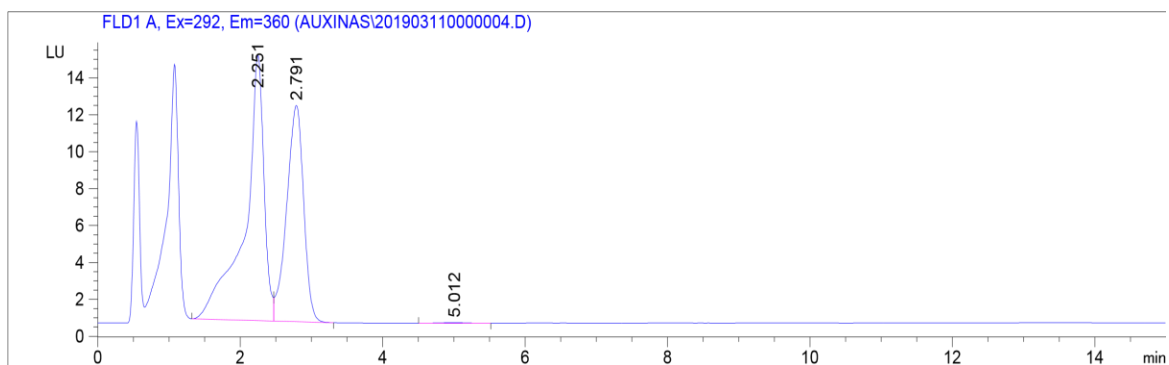


Figura 3.7 - Cromatograma de AIB, ANA e AIA a 2µg/mL em metanol.

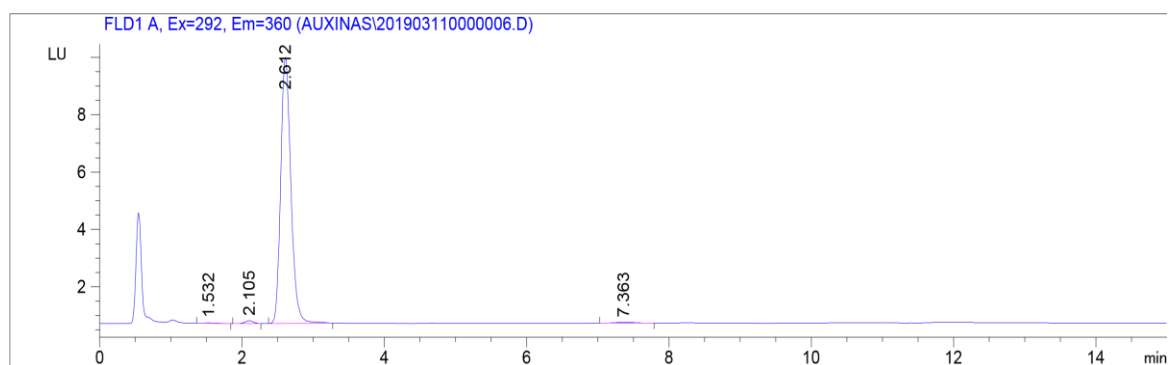


Figura 3.8 - Cromatograma do primeiro extrato contendo os compostos auxínicos da amostra e o padrão interno (ANA)

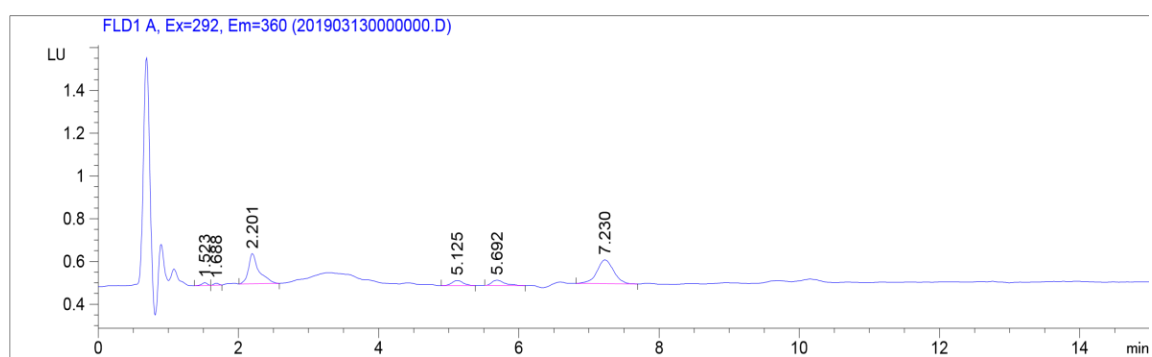


Figura 3.9 - Cromatograma do segundo extrato (sala escura e fria) contendo os compostos auxínicos da amostra e o padrão interno (ANA)

A presença de pequenas quantidades destes compostos podia ainda requerer uma utilização acrescida de massa algal, tendo em conta que o protocolo foi desenvolvido para extração de auxinas de plantas, que podem conter quantidades muito superiores. Tal como acontece nas plantas vasculares, as auxinas podem ainda apresentar-se em diferentes concentrações, dependendo da localização e tipo de parte da alga, o que não foi levado em consideração no presente estudo, uma vez que foi selecionada aleatoriamente a parte algal a analisar. Desta forma, deveria ter-se procedido, após a sua recolha, à lavagem da alga com água destilada, de modo a eliminar sais eventualmente presentes na superfície da amostra e testar a extração de auxinas, tanto de uma maior massa de alga, como de diferentes partes da alga (lâminas, estipe e órgão de fixação).

Por outro lado, tendo em conta que numa das avaliações quanto à presença e quantificação de compostos auxínicos, observou-se no cromatograma o pico correspondente ao padrão interno adicionado, a extração de auxinas da alga com o tampão fosfato pode ter sido ineficaz. Mikami et al. (2016), utilizou como solvente de extração uma solução de acetonitrilo 80 % (V/V) e 1 % (V/V) de ácido acético, o qual mostrou eficácia neste processo, podendo este ser uma alternativa ao tampão fosfato utilizado.

Sugere-se ainda uma alteração ao processo de extração de auxinas, Mori et al. (2017) sugere um método de purificação de várias hormonas, que mostrou eficácia na purificação de auxinas de plantas (Tsukahara et al., 2015) e de algas (Mikami et al., 2016). O esquema, figura 3.10, elaborado por Mori et al. (2017), representa o procedimento de purificação e fracionamento de fitohormonas relatado por Tsukahara et al. (2015) e Mikami et al. (2016). O extrato contendo as fitohormonas foi fracionado em três. A fração básica eluída seletivamente da coluna de troca catiónica inclui trans-zeatina, dihidrozeatina e isopenteniladenina. Esta fração foi analisada com o método LC-MS 2. O ácido salicílico foi separado após a eluição da fração neutra e ácida da coluna de troca catiónica, uma vez que o seu tempo de retenção se sobrepõe com a giberelina A1 e com o ácido indolacético, e foi analisada com o método LC-MS 3. As fitohormonas restantes foram eluídas da coluna de troca aniónica com a fração ácida e analisadas sucessivamente pelo método LC-MS 1.

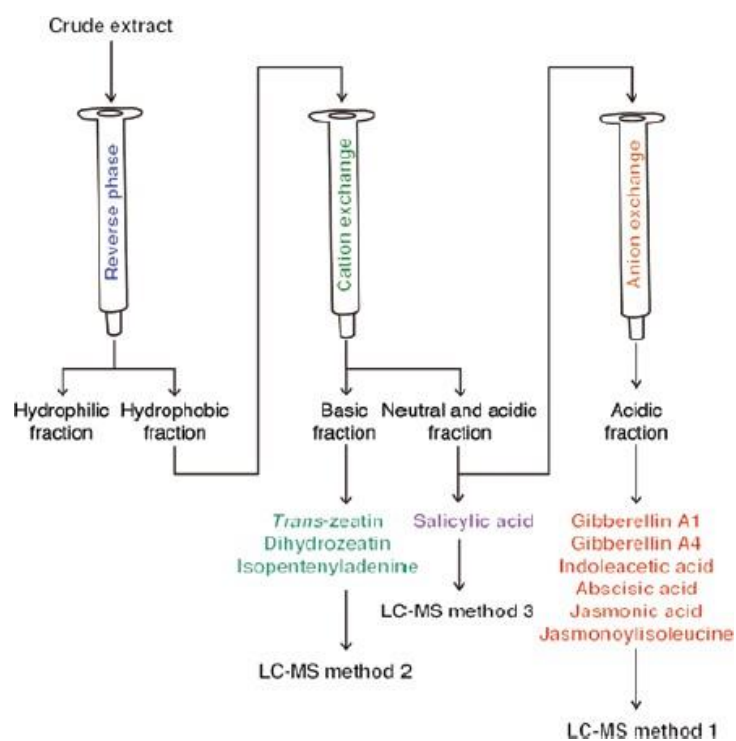


Figura 3.10 - Exemplo de extração por fase sólida de fitohormonas para análise simultânea (extraído de Mori et al., 2017).

4. Conclusões e perspectivas futuras

As algas marinhas são um recurso renovável com enorme potencial representando uma imensa fonte de compostos naturais muito interessantes para aplicações biotecnológicas. No que toca ao conteúdo em fitohormonas em macroalgas, *Saccorhiza polyschides* era uma alga promissora, pela sua habitual utilização como fertilizante em agricultura.

Tendo em conta o objetivo de extrair compostos com efeito regulador e de crescimento de células e tecidos vegetais, pode destacar-se a presença de compostos com atividade semelhante às citocininas na alga estudada. Após a avaliação de compostos extraídos e separados por cromatografia, os *calli* avaliados mostraram, para alguns dos compostos, um aumento de biomassa significativo, podendo este ser comparado ao efeito de um regulador de crescimento comumente conhecido e utilizado para este tipo de culturas, a cinetina. Para aprofundar o conhecimento acerca da presença de compostos citocinínicos nesta alga, uma avaliação por HPLC seria necessária, de forma a separar e identificar os compostos presentes no extrato utilizado. No que respeita à avaliação da presença de citocininas ao adicionar extrato ao meio de cultura, propõe-se testagens com menores concentrações de extrato bem como a sua avaliação em plantas não herbáceas halófitas e/ou de zonas costeiras.

Por outro lado, não foi significativa a presença de compostos auxínicos no extrato obtido. Estes resultados podem ser consequência do método de extração não ser o adequado à amostra em estudo, podendo dever-se à presença elevada de sais. Desta forma, propõe-se o aperfeiçoamento do método de extração e separação de auxinas provenientes de algas.

No que respeita ao conteúdo em minerais, foi possível verificar que a macroalga analisada pode ser promissora na substituição, não só de reguladores de crescimento, como também de macro e micronutrientes nos meios de cultura. Pode ainda, após um estudo mais aprofundado sobre a sua capacidade antioxidante, acrescentar valor antioxidante aos meios nutritivos.

5. Referência bibliográficas

- Arioli, T., Mattner, S. W., & Winberg, P. C. (2015). Applications of seaweed extracts in Australian agriculture: past, present and future. *Journal of Applied Phycology*, 27(5), 2007-2015.
- Arnon, D. I., & Stout, P. R. (1939a). The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. *Plant Physiology*, 14(2), 371.
- Arnon, D. I., & Stout, P. R. (1939b). Molybdenum as an essential element for higher plants. *Plant Physiology*, 14(3), 599.
- Arsianti, A., Aziza, Y. A. N., Kurniasari, K. D., Mandasari, B. K. D., Masita, R., Zulfa, F. R., Dewi, M. K., Zagloel, C. R. Z., Azizah, N. N., & Putrianingsih, R. (2018). Phytochemical test and cytotoxic activity of macroalgae *Euclima cottonii* against cervical HeLa cells. *Pharmacognosy Journal*, 10(5).
- Arsianti, A., Kurniawan, G., Tejaputri, N. A., Qorina, F., Fithrotunnisa, Q., Azizah, N. N., & Fajrin, A. M. (2020). Phytochemical Profile, Antioxidant Activity and Cell Line Study of Marine Red Macroalgae *Euclima cottonii* on Lung A-549 Cancer Cells. *Pharmacognosy Journal*, 12(2).
- Bajaj, Y. P. S. (1997). Biotechnology for the improvement of medicinal plants. *Acta Horticulturae*, 457, 37-46.
- Bajguz, A., & Czerpak, R. (1996). Effect of brassinosteroids on growth and proton extrusion in the alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Chlorophyceae). *Journal of Plant Growth Regulation*, 15(3), 153-156.
- Baker, D. A. (2000). Long-distance vascular transport of endogenous hormones in plants and their role in source: sink regulation. *Israel Journal of Plant Sciences*, 48(3), 199-203.
- Ballester, A. (1975). Growth regulators from the seaweed *Chondrus crispus* L.(Lyn.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 20(2), 179-182.
- Batters, E. A. L. (1902). A catalogue of the British marine algae being a list of all the species of seaweeds known to occur on the shores of the British Islands, with the localities where they are found. *Journal of Botany*, (Supplement), 1-107.
- Beer, S., Björk, M., & Beardall, J. (2014). The evolution of photosynthetic organisms in the oceans. In *Photosynthesis in the Marine Environment* (Cap. 1, pp. 5-14). Oxford: John Wiley & Sons.

- Berneira, L., da Silva, C., Poletti, T., Ritter, M., dosSantos, M., Colepicolo, P., & de Pereira, C. M. P. (2020). Evaluation of the volatile composition and fatty acid profile of seven Antarctic macroalgae. *Journal of Applied Phycology*, 32(5), 3319-3329.
- Bhatia, S., Sharma, K., Dahiya, R., & Bera, T. (2015). *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. London: Academic Press.
- Bieleski, R. L. (1964). The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. *Analytical Biochemistry*, 9(4), 431-442.
- Bixler, H. J., & Porse, H. (2011). A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 321-335.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Bradley, P. M. (1991). Plant hormones do have a role in controlling growth and development of algae. *Journal of Phycology*, 27(3), 317-321.
- Brain, K. R., Chalopin, M. C., Turner, T. D., Blunden, G., & Wildgoose, P. B. (1973). Cytokinin activity of commercial aqueous seaweed extract. *Plant Science Letters*, 1(6), 241-245.
- Carillo, P., Annunziata, M. G., Pontecorvo, G., Fuggi, A., & Woodrow, P. (2011). Salinity stress and salt tolerance. *Abiotic Stress in Plants—Mechanisms and Adaptations*, 1, 21-38.
- Chen, J., & Ziv, M. (2001). The effect of ancymidol on hyperhydricity, regeneration, starch and antioxidant enzymatic activities in liquid-cultured Narcissus. *Plant Cell Reports*, 20(1), 22-27.
- Cooke, T. J., Poli, D., Szein, A. E., & Cohen, J. D. (2002). Evolutionary patterns in auxin action. *Plant Molecular Biology*, 49, 319-338.
- Craigie, J. S. (2011). Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 371-393.
- Crouch, I. J., & Van Staden, J. (1993). Evidence for the presence of plant growth regulators in commercial seaweed products. *Plant Growth Regulation*, 13(1), 21-29.
- Cunniff, P., & Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1995). *Official methods of analysis of AOAC international*. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Dang, T. T., Bowyer, M. C., Van Altena, I. A., & Scarlett, C. J. (2018). Comparison of chemical profile and antioxidant properties of the brown algae. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(1), 174-181.

- Davies, P. J. (2010). The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In *Plant Hormones* (pp. 1-15). Berlin: Springer.
- De Klerk, G. J., Guan, H., Huisman, P., & Marinova, S. (2011). Effects of phenolic compounds on adventitious root formation and oxidative decarboxylation of applied indoleacetic acid in *Malus* 'Jork 9'. *Plant Growth Regulation*, 63(2), 175-185.
- de Oliveira, Â. K. D., Cañal, M. J., Centeno, M. L., Feito, I., & Fernández, B. (1997). Endogenous plant growth regulators in carnation tissue cultures under different conditions of ventilation. *Plant Growth Regulation*, 22(3), 169-174.
- Debergh, P., Aitken-Christie, J., Cohen, D., Grout, B., Von Arnold, S., Zimmerman, R., & Ziv, M. (1992). Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 30(2), 135-140.
- Déléris, P., Nazih, H., & Bard, J. M. (2016). Seaweeds in human health. In J. Fleurence, & I. Levine (Eds.), *Seaweed in health and disease prevention* (Cap.10, pp. 319-367). Massachusetts: Academic Press.
- El-Din, S. M. (2015). Utilization of seaweed extracts as bio-fertilizers to stimulate the growth of wheat seedlings. *The Egyptian Journal of Experimental Biology*, 11(1), 31- 39.
- Esserti, S., Faize, M., Rifai, L. A., Smaili, A., Belfaiza, M., Faize, L., Albuquerque, N., Burgos, L., Koussa, T., & Makroum, K. (2017). Media derived from brown seaweeds *Cystoseira myriophylloides* and *Fucus spiralis* for in vitro plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 128(2), 437-446.
- Evans, L. V., & Trewavas, A. J. (1991). Is algal development controlled by plant growth substances?. *Journal of Phycology*, 27(3), 322-326.
- Fernández, C. (2011). The retreat of large brown seaweeds on the north coast of Spain: the case of *Saccorhiza polyschides*. *European Journal of Phycology*, 46(4), 352-360.
- Franck, T., Kevers, C., & Gaspar, T. (1995). Protective enzymatic systems against activated oxygen species compared in normal and vitrified shoots of *Prunus avium* LL raised *in vitro*. *Plant Growth Regulation*, 16(3), 253-256.
- Franck, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Hausman, J. F., & Gaspar, T. (1998). Reducing properties, and markers of lipid peroxidation in normal and hyperhydrating shoots of *Prunus avium* L. *Journal of Plant Physiology*, 153(3-4), 339-346.
- Gao, S., Fang, J., Xu, F., Wang, W., Sun, X., Chu, J., Cai, B., Feng, Y., & Chu, C. (2014). CYTOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASE4 integrates cytokinin and auxin signaling to control rice crown root formation. *Plant Physiology*, 165(3), 1035-1046.

- Garcia, J., Palacios, V., & Roldán, A. (2016). Nutritional potential of four seaweed species collected in the Barbate Estuary (Gulf of Cadiz, Spain). *Journal of Nutrition and Food Sciences*, 6(2), 12.
- Gaspar, T., Hagège, D., Kevers, C., Penel, C., Crèvecoeur, M., Engelmann, I., Greppin, H., & Foidart, J. M. (1991). When plant teratomas turn into cancers in the absence of pathogens. *Physiologia Plantarum*, 83(4), 696-701.
- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. M., & Thorpe, T. A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 32(4), 272-289.
- George, E. F., & Sherrington, P. D. (1984). *Plant Propagation by Tissue Culture Handbook and Dictionary of Commercial Laboratories*. England: Exgetics Ltd.
- Goldsmith, M. H. M. (1977). The polar transport of auxin. *Annual Review of Plant Physiology*, 28(1), 439-478.
- Gonçalves, J. C., Diogo, G., Coelho, M. T., Vidal, N., & Amâncio, S. (2008). Quantitation of endogenous levels of IAA, IAAsp and IBA in micro-propagated shoots of hybrid chestnut pre-treated with IBA. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 44(5), 412-418.
- González-Rábade, N., del Carmen Oliver-Salvador, M., Salgado-Manjarrez, E., & Badillo-Corona, J. A. (2012). In vitro production of plant peroxidases—a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(7), 1644-1660.
- Gougoulis, N., Papapolymerou, G., Karayannis, V., Spiliotis, X., & Chouliaras, N. (2018). Effects of manure enriched with algae *Chlorella vulgaris* on soil chemical properties. *Soil and Water Research*, 13(1), 51-59.
- Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 315-326.
- Gupta, S. D., & Ibaraki, Y. (Eds.). (2006). *Plant tissue culture engineering*. In M. Hofman, & J. Anné (Eds), Focus on Biotechnology (Vol. 6). Dordrecht: Springer.
- Hartig, K., & Beck, E. (2006). Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle. *Plant Biology*, 8(03), 389-396.
- Holdt, S. L., & Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 543-597.
- Hoyerová, K., Gaudinová, A., Malbeck, J., Dobrev, P. I., Kocábek, T., Šolcová, B., Trávníčková, A., & Kamínek, M. (2006). Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. *Phytochemistry*, 67(11), 1151-1159.

- Illera-Vives, M., Labandeira, S. S., Loureiro, L. I., & López-Mosquera, M. E. (2017). Agronomic assessment of a compost consisting of seaweed and fish waste as an organic fertilizer for organic potato crops. *Journal of Applied Phycology*, 29(3), 1663-1671.
- Jati, B. N., Nuraeni, C., Yunilawati, R., & Oktarina, E. (2019). Phytochemical screening and total lipid content of marine macroalgae from Binuangeun beach. In *Journal of Physics: Conference Series*, 1317 (1).
- Joyce, S. M., Cassells, A. C., & Jain, S. M. (2003). Stress and aberrant phenotypes in vitro culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74(2), 103-121.
- 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(2), 466-470.
- Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13), 1222-1239.
- Kataeva, N. V., Alexandrova, I. G., Butenko, R. G., & Dragavtceva, E. V. (1991). Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured in vitro. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 27(2), 149-154.
- Kato, J., Purves, W. K., & Phinney, B. O. (1962). Gibberellin-like substances in plants. *Nature*, 196(4855), 687-688.
- Kayser, O., & Quax, W. (2007). *Medicinal Plant Biotechnology: From Basic Research to Industrial Applications* (Vol. 2). Weinheim: Wiley-VCH.
- Kazir, M., Abuhassira, Y., Robin, A., Nahor, O., Luo, J., Israel, A., Golberg, A., & Livney, Y. D. (2019). Extraction of proteins from two marine macroalgae, *Ulva* sp. and *Gracilaria* sp., for food application, and evaluating digestibility, amino acid composition and antioxidant properties of the protein concentrates. *Food Hydrocolloids*, 87, 194-203.
- Kelecom, A. (2002). Secondary metabolites from marine microorganisms. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 74(1), 151-170.
- Kepinski, S., & Leyser, O. (2005). Plant development: auxin in loops. *Current Biology*, 15(6), 208-210.
- Kevers, C., Coumans, M., Coumans-Gillès, M. F., & Caspar, T. H. (1984). Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured in vitro. *Physiologia Plantarum*, 61(1), 69-74.
- Khan, W., Rayirath, U. P., Subramanian, S., Jithesh, M. N., Rayorath, P., Hodges, D. M., Critchley, A. T., Craigie, J. S., Norrie, J., & Prithiviraj, B. (2009). Seaweed extracts as

- biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(4), 386-399.
- Kingman, A. R., & Moore, J. (1982). Isolation, purification and quantitation of several growth regulating substances in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyta). *Botanica Marina*, 25(4), 149-153.
- Kumar, G., & Sahoo, D. (2011). Effect of seaweed liquid extract on growth and yield of *Triticum aestivum* var. Pusa Gold. *Journal of Applied Phycology*, 23(2), 251-255.
- Kumari, R., Kaur, I., & Bhatnagar, A. K. (2011). Effect of aqueous extract of *Sargassum johnstonii* Setchell & Gardner on growth, yield and quality of *Lycopersicon esculentum* Mill. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 623-633.
- Latique, S., Chernane, H., Mansori, M., & El Kaoua, M. (2013). Seaweed liquid fertilizer effect on physiological and biochemical parameters of bean plant (*Phaesolus vulgaris* variety Paulista) under hydroponic system. *European Scientific Journal*, 9(30), 174-191.
- Letham, D. S. (1967). Regulators of cell division in plant tissues. *Planta*, 74(3), 228-242.
- Lightfoot, J. (1789). Flora Scotica: Or, A Systematic Arrangement, In *The Linnean Method, Of The Native Plants Of Scotland And The Hebrides* (Vol. 2). Londres: R. Faulder.
- Lorenzo, J. M., Agregán, R., Munekata, P. E., Franco, D., Carballo, J., Şahin, S., Lacomba, F., & Barba, F. J. (2017). Proximate composition and nutritional value of three macroalgae: *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Bifurcaria bifurcata*. *Marine drugs*, 15(11), 360.
- Lourenço, S. O., Barbarino, E., De-Paula, J. C., Pereira, L. O. D. S., & Marquez, U. M. L. (2002). Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycological Research*, 50(3), 233-241.
- Loyola-Vargas, V. M., & Ochoa-Alejo, N. (2018). An introduction to plant tissue culture: advances and perspectives. In *Plant cell culture protocols, Methods in Molecular Biology*, (Vol. 1815, pp. 3-13). Berlin: Springer.
- Marques, A., Ferreira, J., Abreu, H., Pereira, R., Rego, A., Serôdio, J., Christa, G., & Pacheco, M. (2018). Searching for antigenotoxic properties of marine macroalgae dietary supplementation against endogenous and exogenous challenges. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 81(18), 939-956.
- Martin, F. M., Uroz, S., & Barker, D. G. (2017). Ancestral alliances: plant mutualistic symbioses with fungi and bacteria. *Science*, 356(6340).
- Mikami, K., Mori, I. C., Matsuura, T., Ikeda, Y., Kojima, M., Sakakibara, H., & Hirayama, T. (2016). Comprehensive quantification and genome survey reveal the presence of

- novel phytohormone action modes in red seaweeds. *Journal of applied phycology*, 28(4), 2539-2548.
- Miller, C. O. (1965). Evidence for the natural occurrence of zeatin and derivatives: compounds from maize which promote cell division. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54(4), 1052-1058.
- Miller, C. O., Skoog, F., Okumura, F. S., Von Saltza, M. H., & Strong, F. M. (1956). Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *Journal of the American Chemical Society*, 78(7), 1375-1380.
- Miller, C. O., Skoog, F., Von Saltza, M. H., & Strong, F. M. (1955). Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 77(5), 1392-1392.
- Montero, L., Herrero, M., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2014). Separation and characterization of phlorotannins from brown algae *Cystoseira abies-marina* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Electrophoresis*, 35(11), 1644-1651.
- Mori, I. C., Ikeda, Y., Matsuura, T., Hirayama, T., & Mikami, K. (2017). Phytohormones in red seaweeds: a technical review of methods for analysis and a consideration of genomic data. *Botanica Marina*, 60(2), 153-170.
- Nabti, E., Jha, B., & Hartmann, A. (2017). Impact of seaweeds on agricultural crop production as biofertilizer. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14(5), 1119-1134.
- Nasa (2020, Março 26). How Much Water Is on Earth? | NASA Space Place – NASA Science for Kids. Consultado em 18 Julho 2020. <https://spaceplace.nasa.gov/water/en/>.
- Neumann, K. H., Kumar, A., & Imani, J. (2009). *Plant cell and tissue culture - a tool in biotechnology: Basics and Applications* (Vol. 12). Berlin: Springer.
- Niemann, D. I., & Dörffling, K. (1980). Growth-inhibitors and growth-promoters in enteromorpha compressa (chlorophyta). *Journal of Phycology*, 16(3), 383-389.
- Nkemka, V. N., & Murto, M. (2010). Evaluation of biogas production from seaweed in batch tests and in UASB reactors combined with the removal of heavy metals. *Journal of Environmental Management*, 91(7), 1573-1579.
- Nordström, A. C., & Eliasson, L. (1991). Levels of endogenous indole-3-acetic acid and indole-3-acetylaspartic acid during adventitious root formation in pea cuttings. *Physiologia Plantarum*, 82(4), 599-605.
- Nordstrom, A. C., Jacobs, F. A., & Eliasson, L. (1991). Effect of exogenous indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid on internal levels of the respective auxins and their

- conjugation with aspartic acid during adventitious root formation in pea cuttings. *Plant physiology*, 96(3), 856-861.
- Norton, T. (1970). Synopsis of biological data on *Saccorhiza polyschides*. *Food and Agriculture Organization Fisheries Synopsis*, (83), 1-35.
- Norton, T. A., & Burrows, E. M. (1969). Studies on marine algae of the British Isles. 7. *Saccorhiza polyschides* (Lightf.) Batt. *British Phycological Journal*, 4(1), 19-53.
- Ometto, F., Steinhovden, K. B., Kuci, H., Lunnbäck, J., Berg, A., Karlsson, A., Handå, A., Wollan, H., & Ejlertsson, J. (2018). Seasonal variation of elements composition and biomethane in brown macroalgae. *Biomass and Bioenergy*, 109, 31-38.
- Ördög, V., Stirk, W. A., Van Staden, J., Novák, O., & Strnad, M. (2004). Endogenous cytokinins in three genera of microalgae from the Chlorophyta. *Journal of Phycology*, 40(1), 88-95.
- Osterc, G., Trobec, M., Usenik, V., Solar, A., & Štampar, F. (2004, Janeiro). Changes in polyphenols in leafy cuttings during the root initiation phase regarding various cutting types at *Castanea*. *Phyton*, 44, 109-119.
- Peinado, I., Girón, J., Koutsidis, G., & Ames, J. M. (2014). Chemical composition, antioxidant activity and sensory evaluation of five different species of brown edible seaweeds. *Food Research International*, 66, 36-44.
- Pereira, L. (2009). *Guia ilustrado das macroalgas*. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra.
- Pereira, L. (2010). *Littoral of Viana do Castelo-ALGAE: Uses in agriculture, gastronomy and food industry (Bilingual)*. Viana do Castelo: Câmara Municipal de Viana Do Castelo.
- Picoli, E. A., Otoni, W. C., Figueira, M. L., Carolino, S. M., Almeida, R. S., Silva, E. A., Carvalho, C. R., & Fontes, E. P. (2001). Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). *Plant Science*, 160(5), 857-868.
- Pinteus, S., Silva, J., Alves, C., Horta, A., Fino, N., Rodrigues, A. I., Mendes, S., & Pedrosa, R. (2017). Cytoprotective effect of seaweeds with high antioxidant activity from the Peniche coast (Portugal). *Food Chemistry*, 218, 591-599.
- Piqueras, A., Han, B. H., Van Huylbroeck, J. M., & Debergh, P. C. (1998). Effect of different environmental conditions *in vitro* on sucrose metabolism and antioxidant enzymatic activities in cultured shoots of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Growth Regulation*, 25(1), 5-10.
- Plaza, M., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2008). In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science & Technology*, 19(1), 31-39.

- Prato, E., Fanelli, G., Angioni, A., Biandolino, F., Parlapiano, I., Papa, L., Denti, G., Secci, M., Chiantore, M., Kelly, M., Ferranti, M., & Addis, P. (2018). Influence of a prepared diet and a macroalga (*Ulva* sp.) on the growth, nutritional and sensory qualities of gonads of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*, 493, 240-250.
- Provasoli, L. A. A. F. C., & Carlucci, A. F. (1974). Vitamins and growth regulators. *Botanical Monographs*, 10, 741-787.
- Provin, T., & Pitt, J. L. (2001). Managing soil salinity. *Texas A&M AgriLife Extension, Irrigation* (E-60), 5.
- Pryce, R. (1972). The occurrence of lunularic and abscisic acids in plants. *Phytochemistry*, 11(5), 1759-1761.
- Rayorath, P., Jithesh, M. N., Farid, A., Khan, W., Palanisamy, R., Hankins, S. D., Critchley, A. T., & Prithiviraj, 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. *Journal of Applied Phycology*, 20(4), 423-429.
- Rengasamy, K. R., Kulkarni, M. G., Papenfus, H. B., & Van Staden, J. (2016). Quantification of plant growth biostimulants, phloroglucinol and eckol, in four commercial seaweed liquid fertilizers and some by-products. *Algal Research*, 20, 57-60.
- Rhimou, B., Hassane, R., José, M., & Nathalie, B. (2010). The antibacterial potential of the seaweeds (Rhodophyceae) of the Strait of Gibraltar and the Mediterranean Coast of Morocco. *African Journal of Biotechnology*, 9(38), 6365-6372.
- Rioux, L. E., Beaulieu, L., & Turgeon, S. L. (2017). Seaweeds: A traditional ingredients for new gastronomic sensation. *Food Hydrocolloids*, 68, 255-265.
- Rioux, L. E., & Turgeon, S. L. (2015). Seaweed carbohydrates. In *Seaweed Sustainability* (pp. 141-192). Academic Press.
- Rodrigues, D., Freitas, A. C., Pereira, L., Rocha-Santos, T. A., Vasconcelos, M. W., Roriz, M., Rodríguez-Alcalá, L. M., Gomes, A., & Duarte, A. C. (2015). Chemical composition of red, brown and green macroalgae from Buarcos bay in Central West Coast of Portugal. *Food Chemistry*, 183, 197-207.
- Ryan, J., Estefan, G., & Rashid, A. (2001). *Soil and plant analysis laboratory manual* (2^a ed.). Islamabad: International Center for Agricultural Research in the Dry Areas.
- Samee, H., Li, Z. X., Lin, H., Khalid, J., & Guo, Y. C. (2009). Anti-allergic effects of ethanol extracts from brown seaweeds. *Journal of Zhejiang University Science B*, 10(2), 147-153.
- Sanderson, K. J., & Jameson, P. E. (1985). The cytokinins in a liquid seaweed extract: could they be the active ingredients?. *Acta Horticulturae*, 179, 113-116.

- Sanderson, K. J., Jameson, P. E., & Zabkiewicz, J. A. (1987). Auxin in a seaweed extract: Identification and quantitation of indole-3-acetic acid by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Plant Physiology*, *129*(3-4), 363-367.
- Santner, A., & Estelle, M. (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature*, *459*(7250), 1071-1078.
- Santos, P. H. Q. P. D (2016). *Biotechnological evaluation of seaweeds as bio-fertilizer* (Dissertação de Mestrado não editada, Mestrado em Biodiversity and Biotechnology). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Saravana, P. S., Choi, J. H., Park, Y. B., Woo, H. C., & Chun, B. S. (2016). Evaluation of the chemical composition of brown seaweed (*Saccharina japonica*) hydrolysate by pressurized hot water extraction. *Algal Research*, *13*, 246-254.
- Schmelz, E. A., Engelberth, J., Alborn, H. T., O'Donnell, P., Sammons, M., Toshima, H., & Tumlinson, J. H. (2003). Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(18), 10552-10557.
- Schmid, M., Guihéneuf, F., & Stengel, D. B. (2017). Ecological and commercial implications of temporal and spatial variability in the composition of pigments and fattyacids in five Irish macroalgae. *Marine Biology*, *164*(8), 1-18.
- Sharma, H. S., Fleming, C., Selby, C., Rao, J. R., & Martin, T. (2014). Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. *Journal of Applied Phycology*, *26*(1), 465-490.
- Silva, J., Alves, C., Freitas, R., Martins, A., Pinteus, S., Ribeiro, J., Gaspar, H., Afonso, A., & Pedrosa, R. (2019). Antioxidant and neuroprotective potential of the brown seaweed *Bifurcaria bifurcata* in an in vitro Parkinson's disease model. *Marine Drugs*, *17*(2), 85.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144-158.
- Sivasankari, S., Venkatesalu, V., Anantharaj, M., & Chandrasekaran, M. (2006). Effect of seaweed extracts on the growth and biochemical constituents of *Vigna sinensis*. *Bioresource Technology*, *97*(14), 1745-1751.
- Skoog, F., & Miller, C. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, *11*, 118-131.
- Smetanska, I. (2008). Production of secondary metabolites using plant cell cultures. In *Food Biotechnology*, (Vol. 111, pp.187-228).
- Soares, C., Švarc-Gajić, J., Oliva-Teles, M. T., Pinto, E., Nastić, N., Savić, S., Almeida, A., & Delerue-Matos, C. (2020). Mineral composition of subcritical water extracts of

- Saccorhiza polyschides*, a brown seaweed used as fertilizer in the north of Portugal. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(4), 244.
- Stirk, W. A., Arthur, G. D., Lourens, A. F., Novak, O., Strnad, M., & Van Staden, J. (2004). Changes in cytokinin and auxin concentrations in seaweed concentrates when stored at an elevated temperature. *Journal of Applied Phycology*, 16(1), 31-39.
- Stirk, W. A., Novák, O., Strnad, M., & Van Staden, J. (2003). Cytokinins in macroalgae. *Plant Growth Regulation*, 41(1), 13-24.
- Stirk, W. A., & Van Staden, J. (1996). Comparison of cytokinin- and auxin-like activity in some commercially used seaweed extracts. *Journal of Applied Phycology*, 8(6), 503-508.
- Stirk, W. A., & Van Staden, J. (1997). Isolation and identification of cytokinins in a new commercial seaweed product made from *Fucus serratus* L. *Journal of Applied Phycology*, 9(4), 327-330.
- Svendsen, P. (1962). Some observations on *Saccorhiza polyschides* (Lightf.) Batt. (Phaeophyceae). *Sarsia*, 7(1), 11-13.
- Swaminathan, S., Bock, R. M., & Skoog, F. (1977). Subcellular localization of cytokinins in transfer ribonucleic acid. *Plant Physiology*, 59(4), 558-563.
- Tarakhovskaya, E. R., Maslov, Y. I., & Shishova, M. F. (2007). Phytohormones in algae. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54(2), 163-170.
- Tay, S. A. B., Palni, L. M. S., & MacLeod, J. K. (1987). Identification of cytokinin glucosides in a seaweed extract. *Journal of Plant Growth Regulation*, 5(3), 133-138.
- Thorsen, M. K., Woodward, S., & McKenzie, B. M. (2010). Kelp (*Laminaria digitata*) increases germination and affects rooting and plant vigour in crops and native plants from an arable grassland in the Outer Hebrides, Scotland. *Journal of Coastal Conservation*, 14(3), 239-247.
- Tong, H., Xiao, Y., Liu, D., Gao, S., Liu, L., Yin, Y., Jin, Y., Qian, Q., & Chu, C. (2014). Brassinosteroid regulates cell elongation by modulating gibberellin metabolism in rice. *The Plant Cell*, 26(11), 4376-4393.
- Trigiano, R. N., & Gray, D. J. (2011). *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*. Florida: CRC Press.
- Trobec, M., Štampar, F., Veberič, R., & Osterc, G. (2005). Fluctuations of different endogenous phenolic compounds and cinnamic acid in the first days of the rooting process of cherry rootstock 'GiSelA 5' leafy cuttings. *Journal of Plant Physiology*, 162(5), 589-597.

- Tsukahara, K., Sawada, H., Kohno, Y., Matsuura, T., Mori, I. C., Terao, T., Ioky, M., & Tamaoki, M. (2015). Ozone-induced rice grain yield loss is triggered via a change in panicle morphology that is controlled by ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 1 gene. *PLoS One*, *10*(4).
- Wally, O. S., Critchley, A. T., Hiltz, D., Craigie, J. S., Han, X., Zaharia, L. I., Abrams, S. R., & Prithiviraj, B. (2013). Regulation of phytohormone biosynthesis and accumulation in *Arabidopsis* following treatment with commercial extract from the marine macroalga *Ascophyllum nodosum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, *32*(2), 324-339.
- Wells, M. L., Potin, P., Craigie, J. S., Raven, J. A., Merchant, S. S., Helliwell, K. E., Smith, A. G., Camire, M. E., & Brawley, S. H. (2017). Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *Journal of Applied Phycology*, *29*(2), 949-982.
- Went, F. W., & Thimann, K. V. (1937). *Phytohormones*. New York: The Macmillan Company.
- Wijesekara, I., Pangestuti, R., & Kim, S. K. (2011). Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers*, *84*(1), 14-21.
- Wu, Y., & Hu, B. (2009). Simultaneous determination of several phytohormones in natural coconut juice by hollow fiber-based liquid-liquid-liquid microextraction-high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1216*(45), 7657-7663.
- Ye, H., Zhou, C., Sun, Y., Zhang, X., Liu, J., Hu, Q., & Zeng, X. (2009). Antioxidant activities in vitro of ethanol extract from brown seaweed *Sargassum pallidum*. *European Food Research and Technology*, *230*(1), 101-109.
- Yokoya, N. S., Stirk, W. A., Van Staden, J., Novák, O., Turečková, V., Pěňčík, A., & Strnad, M. (2010). Endogenous cytokinins, auxins, and abscisic acid in red algae from Brazil. *Journal of Phycology*, *46*(6), 1198-1205.
- Zhang, W., Chapman, D. J., Phinney, B. O., Spray, C. R., Yamane, H., & Takahashi, N. (1991). Identification of Cytokinins in *Sargassum muticum* (Phaeophyta) and *Porphyra perforata* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, *27*(1), 87-91.
- Ziv M. (1991) Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In P. C. Debergh, R. H. Zimmerman (Eds) *Micropropagation* (pp.45-49). Dordrecht: Springer.