



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEONIR BATISTA

EFEITOS DO ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (AIA), ÁCIDO JASMÔNICO (JA) E
ÁCIDO GIBERÉLICO (GA) NA REGENERAÇÃO DIRETA DE EXPLANTES DE
Gelidium floridanum

FLORIANÓPOLIS – SC

2019

DEONIR BATISTA

**EFEITOS DO ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (AIA), ÁCIDO JASMÔNICO E ÁCIDO
GIBERÉLICO NA REGENERAÇÃO DIRETA DE EXPLANTES DE *Gelidium*
*floridanum***

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao
curso de Graduação de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa Catarina para
obtenção do Título de Bacharel em Biologia.
Orientadora: Dra.Carmen Simioni

FLORIANÓPOLIS - SC

2019

Deonir Batista

EFEITOS DO ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (AIA), ÁCIDO JASMÔNICO E ÁCIDO GIBERÉLICO NA REGENERAÇÃO DIRETA DE EXPLANTES DE *Gelidium floridanum*

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado e adequado para obtenção do Título de Bacharel em Biologia, e aprovado em sua forma final pelo curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Local, 28 de Junho de 2019.

Prof.^a Dr
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dra Carmen Simioni
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra Chirle Ferreira
Universidade Federal de Santa Catarina

Doutoranda Débora Tomazi
Universidade Federal de Santa Catarina

Agradecimentos

Um agradecimento especial, à minha orientadora e segunda mãe da UFSC, Dr^a. Carmen Simioni. Por me aceitar, dar a oportunidade de trabalhar com ela e por fazer esse trabalho dar certo, por acreditar em mim e incentivar nos momentos que nem eu acreditava, pelos conselhos, conhecimento e por não desistir de mim, (e pelas guloseimas também), muito obrigada!

À Prof^a Luciane e aos meus colegas do LABCEV, Elisa, Fernanda, João e Mariana, pela amizade, pelos cafés, por compartilhar esse momento em laboratório, fazendo meus dias mais agradáveis. Aos meus colegas de UFSC, Gabriel, Ingrid, Jessica, Luiza, Patrick e meus amigos da vida, Denio e Fabrício por toda força que me deram, vocês são demais.

Queria agradecer a essa minha banca perfeita, todas essas mulheres me ajudaram muito a crescer como pessoa e como estudante, muito obrigada pelo aceite! À Débora por permitir acompanhá-la em seus experimentos e me ensinando com muita paciência diversas técnicas, além de mostrar como ser um pouco organizado, muito obrigada!

Um agradecimento especial à Prof^a Dr^a. Zenilda, pelo privilégio dado a mim de ser seu bolsista de IC, sendo uma fonte de inspiração como uma grande professora e pesquisadora, muito obrigada!

Outro agradecimento mais que especial para a melhor técnica que essa UFSC já teve minha primeira mãe da UFSC, Dr^a. Chirle. Por ter me dado a chance de trabalhar no LMF, vivenciar a rotina de um laboratório sensacional e com pessoas incríveis (LAMEB), além dar a oportunidade de vivenciar de perto a rotina de um pesquisador e apresentar o melhor laboratório da UFSC, vulgo LABCEV. Por fim obrigada por todo o carinho e atenção que me deu, serei eternamente grato!

Aos meus irmãos, Denise e Deni, por todo apoio que me deram e continuam dando. A rainha da minha vida, mais conhecida como minha mãe, obrigada por existir e sem ela não teria condições de estar aqui. Ao meu pai, que fez o possível e o impossível pela gente, ele estaria muito orgulhoso dessa família. À minhas princesas Luisa e Sophia, o Dindo/Tio baba por vocês. Obrigada por essa família maravilhosa, amo vocês!

À Stefani Joanne Angelina Germanotta, por me dar força e ajudar no meu autoconhecimento e na minha autoaceitação, **“Just put your paws up, cause you were born this way, baby”**.

Resumo

Gelidium floridanum é uma espécie de macroalga vermelha com grande importância econômica, por ser fonte de um ágar de alta qualidade. Sua extração ocorre exclusivamente através de bancos naturais, tornando necessário estudo de formas de cultivo para aumentar biomassa e produzir material de alta qualidade. O uso de fitorreguladores é uma área pouco explorada em cultura de macroalgas e uma provável alternativa para cultivos massivos. Assim, o objetivo do estudo foi analisar a regeneração direta de explantes de *G. floridanum* sob influência do ácido indol-3-acético (AIA), ácido jasmônico (JA) e do ácido giberélico (GA). Explantes de 5 mm foram cultivados em meio líquido contendo concentrações de AIA (0,57, 5,7 e 57 mM), JA (2, 4 e 8 mM) e GA (10, 15 e 20 mg/L⁻¹) durante 48 horas, sendo posteriormente cultivados até 20 dias. Para observar a morfologia e formação de novos eixos eretos, no 5º dia de cultivo, foram feitas micrografias através do microscópio estereoscópio e explantes foram processados para microscopia de luz (ML) com realização dos testes histoquímicos (Reativo de Schiff (PAS) e Azul de Toluidina (ATO), e processados para microscopia eletrônica de varredura (MEV). No final do experimento (20º dia) micrografias também foram obtidas através do microscópio estereoscópio para a contagem final dos eixos formados. A regeneração direta de *Gelidium floridanum*, após 5 dias de cultivo, já pode ser visualizada principalmente no tratamento com JA 2mM, com maior formação de eixos eretos . A formação dos eixos eretos surge a partir das células medulares dos explantes sendo que não ocorre acúmulo de grãos de amido das florídeas na região apical, somente na sua base. Já após 20 dias de cultivo, a formação de explantes foi maior nos tratamentos com AIA 5,7 mM. Concluímos que a regeneração direta de explantes de *Gelidium floridanum* ocorre a partir das células medulares e inicia-se já na primeira semana de cultivo. Dentre os fitorreguladores testados, o JA contribuiu para a formação mais precoce dos eixos eretos, porém após 20 dias o AIA se mostrou mais eficaz na formação e tamanho dos eixos eretos.

Palavras- chave: micropropagação, fitorreguladores, eixos eretos, macroalga vermelha.

Abstract

Gelidium floridanum is a species of red macroalgae of great economic importance, being a source of a high quality agar. Its extraction occurs exclusively through natural banks, making it necessary to study forms of cultivation to increase biomass and produce high quality material. The use of phyto regulators is an area not widely explored in macroalgal culture and a probable alternative for massive crops. Thus, the objective of this study was to analyze the direct regeneration of *G. floridanum* explants under the influence of indole-3-acetic acid (AIA), jasmonic acid (JA) and gibberellic acid (GA). Explants (5 mm) were cultured in liquid medium containing concentrations of AIA (0.57, 5.7 and 57 mM), JA (2, 4 and 8 mM) and GA (10, 15 and 20 mg / L⁻¹) for 48 hours, cultivated for up to 20 days. To observe the morphology and formation of new erect axes, on the 5th day of culture, micrographs were made through the stereoscope microscope and explants were processed for light microscopy (ML) with histochemical tests (Schiff's Reagent (PAS) and Blue of Toluidine (ATO)), and processed for scanning electron microscopy (SEM). At the end of the experiment (20th day) micrographs were also obtained through the stereoscope microscope for the final count of the formed axes. The formation of the erect axes occurs from the medullary cells two explants and there is no accumulation of florid starch grains in the apical region, only at its base. Already after 20 days of culture, the formation of explants was higher in the treatments with 5.7 mM AIA. We conclude that the direct regeneration of *G. floridanum* explants occurs from the medullary cells and starts already in the first week of culture. Among the phyto regulators tested, the JA contributed to the earlier formation of the erect axes, but after 20 days the indole-3-acetic acid proved to be more efficient in the formation and size of the erect axes.

Keywords: micropropagation, phyto regulators, erect axes, red seaweed.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Regeneração direta de explantes de *Gelidium floridanum* após 5 dias de cultivo.. 16
- Figura 2:** (a) Formação de eixos eretos e (b) Tamanho médio dos eixos eretos formados de explantes de *Gelidium floridanum* após 5 dias de cultivo 17
- Figura 3:** Microscopia eletrônica de varredura de explantes de *Gelidium floridanum* após 5 dias de cultivo.. 18
- Figura 4:** Microscopia de luz de secções longitudinais de explantes de *Gelidium floridanum* após 5 dias de cultivo corados com Reativo de Schiff (PAS). 20
- Figura 5:** Microscopia de luz de secções longitudinais de explantes de *Gelidium floridanum* após 5 dias de cultivo corados com Azul de Toluidina (ATO). 21
- Figura 6:** Regeneração direta de explantes de *Gelidium floridanum* após 20 dias de cultivo. Observe a formação dos eixos eretos (setas). 23
- Figura 7:** (a) Formação de eixos eretos e (b) Tamanho médio dos eixos eretos formados de explantes de *Gelidium floridanum* após 20 dias de cultivo 24

SUMÁRIO

Resumo	4
Abstract	5
LISTA DE FIGURAS	6
1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos	11
3. METODOLOGIA	12
3.1 Material algáceo	12
3.2 Regeneração de Explantes	12
3.3 Análises Morfológicas dos Explantes	13
3.4 Análise dos novos eixos eretos formados	14
3.5 Análise dos dados	14
4. RESULTADOS	14
5. DISCUSSÃO	25
6 REFERÊNCIAS	27

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Gelidium* (Rhodophyta, Gelidiales) inclui inúmeras espécies que são utilizadas como fontes de ágar e agarose. Eles são principalmente extraídos no Atlântico Nordeste, de Marrocos a Portugal e Espanha, e também na Coreia do Sul, Japão e México, fornecendo matéria-prima para a indústria do ágar (MCHUGH, 2003; BIXLER & PORSE, 2011; PORSE & RUDOLPH, 2017).

O ágar extraído de *Gelidium*, atualmente, representa apenas cerca de 1,6% da produção de ficocolóides do mundo (PORSE & RUDOLPH, 2017), mas seu ágar apresenta a melhor qualidade, maior rendimento e menor temperatura gelificante (34–36°C), sendo especialmente usado em aplicações farmacológicas, biomédicas e biotecnológicas e, difícil de ser substituído por ágar extraído de outras espécies (PORSE & RODOLPH, 2017).

Porém, a demanda por ágar bacteriológico e agarose de *Gelidium* aumentou de 250 e 15 toneladas, respectivamente, para cerca de 700 e 50 toneladas. A demanda é atualmente superior à oferta (CALLAWAY, 2015). Espécies de *Gelidium* ainda não são cultivadas e seus estoques naturais estão sendo esgotados a um ritmo alarmante (CALLAWAY, 2015).

O principal desafio, do ponto de vista tecnológico, é cultivar com sucesso as espécies de *Gelidium* (PORSE & RODOLPH, 2017). Ensaios experimentais de cultivo de *Gelidium* spp. foram realizadas em condições de laboratório, em tanques e na costa (por exemplo, SANTELICES, 1988; FEI & HUANG, 1991; MELO *et al.*, 1991; FRIEDLANDER, 2008), mas a produção em massa de culturas não é ainda difundido.

Uma alternativa é o desenvolvimento da cultura de tecido da espécie para a obtenção de mudas para cultivo e fornecimento constante de linhagens selecionadas com características desejadas (REDDY *et al.*, 2008). A cultura de tecidos de algas marinhas pode ser dividida em dois métodos: regeneração direta e indução de calos (regeneração indireta).

Apesar de todas as vantagens, o desenvolvimento da cultura de tecidos de algas é muito mais lento comparado ao das plantas (BAWEJA *et al.*, 2009). O conhecimento sobre a cultura de tecidos de algas é ainda bastante limitado, faltam estudos sobre o desenvolvimento de protocolos de esterilização de superfície adequados para cada espécie de alga e também o

meio adequado para cultivar as algas na obtenção de formação de calos ou na regeneração de explantes (MUHAMAD *et al.*, 2018). É difícil manter a esterilidade das algas para ser usado na cultura de tecidos porque ao contrário das plantas terrestres, algas marinhas não têm uma cutícula cerosa, o que as torna frágeis para alguns dos esterilizantes químicos (BAWEJA *et al.*, 2009). Geralmente, para culturas de tecidos de algas bem sucedidas, fatores importantes devem ser considerados, como o protocolo de esterilização da superfície, composição e tipos de meios, concentração e combinação de hormônios e condição da cultura. Esses fatores variam entre espécies e também são afetados pelos locais onde as espécies são coletadas. (MUHAMAD *et al.*, 2018).

O crescimento e a diferenciação de células, tecidos e órgãos são regulados através de fatores do ambiente físico, hormonal e genético. Os vegetais produzem moléculas sinalizadoras (fitohormônios/ fitorreguladores), que são substâncias sintetizadas em locais específicos e em pequenas concentrações que regulam no próprio local de síntese e/ou à distância, inúmeros efeitos no desenvolvimento vegetal (RAVEN *et al.*, 2014).

Os efeitos dos fitorreguladores sobre a regulação dos processos fisiológicos em vegetais vasculares é amplamente discutido, entretanto, o conhecimento da atuação destas substâncias em macroalgas ainda é uma área com grandes possibilidades de investigação. Estas substâncias são compostos naturais ou sintéticos que são classificados em diversos grupos de acordo com sua estrutura química ou função (NEVES *et al.*, 2015). O mais utilizado em estudos com macroalgas são as auxinas, como exemplo o ácido indol-3-acético (AIA) que induz a divisão e alongamento celular e formação de calos em culturas. Em geral, as auxinas são importantes na formação e manutenção de meristemas que são essenciais para estabelecer todo o corpo vegetal (TIBUBOS *et al.*, 2017). Nas macroalgas o uso de auxinas está bem documentado (REDDY *et al.*, 2007; HAYASHI *et al.*, 2008; TIBUBOS *et al.*, 2017).

Dentro os fitorreguladores pouco estudados destacam-se o ácido jasmônico (JA) e o ácido giberélico (GA). Grande quantidade de JA foi encontrada em praticamente todos os grupos de algas (TARAKHOVSKAYA *et al.*, 2007). Este fitohormônio foi detectado em algas verdes (*Dunaliella tertiolecta*, *D. salina* e *Chlorella* sp.), em algas vermelhas (*Gelidium latifolium*) e também em cianobactérias (*Spirulina* sp.) Em plantas terrestres, JA modula vários eventos fisiológicos, tais como resistência a patógenos e insetos e a diversos tipos de estresses (CREELMAN & MULLET, 1997; KÜPPER *et al.*, 2009; HOLOPAINEN, 2004). Ele também

regula aspectos do desenvolvimento das plantas e seu crescimento, tais como amadurecimento de frutos, e eventos relacionados à maturação e produção de pólen viáveis (AVANCI *et al.*, 2010), germinação de sementes (HAUSE *et al.*, 1996), e desenvolvimento de anteras e grãos de pólen (MCCONN, 1996). Em macroalgas, o JA mostrou estar relacionado ao estado reprodutivo, talos férteis liberaram quantidades significativas deste composto volátil comparado com talos inférteis (PILAR *et al.*, 2016).

As giberelinas são um grande grupo de fitorreguladores que têm importância nas respostas sobre o ciclo de vida das plantas. Elas podem estimular principalmente a germinação, expansão celular e regulam o tempo de reprodução (VANDENBUSSCHE *et al.*, 2007). As giberelinas estão envolvidas em todas as fases de crescimento e desenvolvimento das plantas, desde a germinação das sementes, o alongamento caulinar, expansão das folhas e flores e desenvolvimento do pólen até a sua senescência (FALKOWSKA *et al.*, 2011). Além disso, as giberelinas estão envolvidas na adaptação da planta ao estresse abiótico, quando o GA está ativo, melhora a permeabilidade da membrana e a absorção dos nutrientes, permitindo uma alta tolerância a solos salinos, assegurando um desenvolvimento da planta mesmo sob condições tóxicas (TUNA *et al.*, 2008). Em cultura de tecido de *Hypnea valentiae*, *Gracilaria corticata* e *Ulva fasciata*, o uso de GA favoreceu o aumento da biomassa (JOSEPH & CHENNUBLOTLA, 1999) nas maiores concentrações utilizadas (16 a 20 mg L⁻¹).

Estudos com os fitorreguladores AIA, JA e GA na espécie *Gelidium floridanum* W.R. TAYLOR ainda não foram documentados. *Gelidium floridanum* é uma macroalga vermelha encontrada nas áreas costeiras das Américas do Norte, Central e do Sul (GUIRY & GUIRY, 2018). No Brasil, a distribuição desta macroalga ocorre da costa do Espírito Santo ao Rio Grande do Sul, sendo encontrada frequentemente entre rochas na zona entre-marés (SCARIOT, 2010).

Assim, tendo em vista o aumento da demanda por macroalgas, principalmente do gênero *Gelidium*, o qual apresenta um ágar de melhor qualidade, e considerando que sua extração é feita exclusivamente de bancos naturais, tem-se por objetivo verificar a regeneração direta a partir de explantes de *G. floridanum* cultivados com diferentes fitorreguladores.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Analisar a regeneração direta de explantes de *Gelidium floridanum* cultivados com os fitorreguladores ácido indol-3- acético (AIA), ácido jasmônico (JA) e o ácido giberélico (GA).

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a morfologia de eixos eretos nos explantes após o uso dos fitorreguladores;
- Analisar a região de formação dos novos eixos eretos;
- Analisar a presença de grãos de amido e polissacarídeos ácidos nas células dos eixos eretos e dos explantes após o uso dos fitorreguladores;
- Quantificar a produção de novos eixos eretos após o uso dos fitorreguladores;
- Verificar o crescimento dos novos eixos eretos após o uso dos fitorreguladores;

3. METODOLOGIA

O experimento foi realizado no Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LABCEV) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

3.1 Material Algáceo

Talos tetrasporofíticos de *G. floridanum* foram coletados na Praia da Ponta do Sambaqui (27°29'18.8" S e 48°32'12.9" O), Florianópolis, Santa Catarina, de setembro a dezembro de 2018. As amostras de algas foram coletadas a partir do costão rochoso e transportadas à temperatura ambiente em recipientes para o LABCEV. Realizou-se minuciosamente a limpeza das algas coletadas com auxílio de uma escova e água do mar filtrada para eliminar macroepífitas e caprelídeos (invertebrados do gênero *Caprella*).

3.2 Regeneração de Explantes

As algas foram aclimatadas em béqueres de 500mL, com água do mar autoclavada, salinidade 35 ‰, enriquecida com solução de nutrientes von Stosch a 50 % (MCLACHLAN, 1973) durante 7 dias. A sala de cultura foi mantida com uma temperatura de 24 ± 2 °C, irradiância de 50 ± 10 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, aeração contínua e fotoperíodo de 12h.

O método de cultura axênica foi obtido segundo metodologia descrita por Hayashi (2007), com modificações. Ramos de *G. floridanum* foram incubados com 0,1 mg L⁻¹ de nistatina (Sigma) e 2 mL L⁻¹ solução antimicótica e antibiótica (composta por 10.000 unidade mL⁻¹ de penicilina G, 10 mg mL⁻¹ de sulfato de estreptomicina e 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de anfotericina B - Sigma) diluídas em água do mar autoclavada enriquecida com solução von Stosch a 50 % por 2 dias.

Após a assepsia, os ramos foram seccionados em explantes de aproximadamente 5 mm e colocados em Erlemeyers (20 explantes cada) com 250 mL de meio de cultura contendo água do mar autoclavada enriquecida com solução von Stosch a 50%. Realizou-se os tratamentos em quadruplicatas nas seguintes concentrações: JA (2; 4 e 8 mM) (PILAR et al., 2016), GA (10; 15 e 20 mg.L⁻¹) (JOSEPH & CHENNUBHOTLA, 1999) e AIA (0,57; 5,7 e 57 mM) (HAYASHI et al., 2007). Para o controle foi utilizado apenas água do mar autoclavada enriquecida com a solução von Stosch a 50%. Após a aclimação e assepsia, os explantes permaneceram 48h nos tratamentos com os fitorreguladores sob a mesma condição

de cultura da aclimação. Passado esse tempo, trocou-se o meio de cultura inserindo apenas água do mar autoclavada enriquecida com solução von Stosch a 50 %, sendo mantido em cultura por 20 dias realizando a troca do mesmo a cada 5 dias.

3.3 Análises Morfológicas dos Explantes

No 5° e no 20° dia foram retirados três ramos, de cada réplica de cada tratamento, para realizar análises morfológicas dos explantes e formação de novos eixos eretos. As análises ocorreram no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB-UFSC), através de um microscópio estereoscópio com sistema de captura de imagens embutido (Estereomicroscópio Olympus SZX16).

A formação inicial de novos eixos nos explantes, no 5° dia, também foi observada através da microscopia de luz (ML) com análise citoquímica e através do microscópio eletrônico de varredura (MEV).

Na ML, os explantes foram fixados em solução de paraformaldeído a 2,5 % em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, à temperatura de 4° C, *overnight*. Posteriormente, foram lavados no mesmo tampão e desidratados em séries crescentes de álcool etílico. O material foi infiltrado em historesina (Leica Historesin) e as amostras foram seccionadas, com espessura de 4 µm, em micrótomo rotativo modelo Leica RM 2135, com navalhas de tungstênio. O material foi submetido aos seguintes testes citoquímicos:

- Azul de Toluidina (ATO), para identificar polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia. As lâminas contendo as secções foram tratadas com solução aquosa de ATO a 0,5 %, acidificada com HCl 1 N para pH 3,0 por 30 s, lavadas em água destilada e secas ao ar (MCCULLY, 1970; GORDON & MCCANDLESS, 1973).
- Ácido Periódico de Schiff (PAS), para identificar a presença de polissacarídeos neutros. As secções foram oxidadas com solução aquosa de ácido periódico a 1 % durante 20 min, lavados em água corrente e corados com reativo de Schiff por 20 min (GAHAN, 1984).

Após as lâminas prontas e coradas, as imagens foram obtidas no sistema de captura Image Q Capture Pro 5.1 Software (Qimaging Corporation, Austin, TX, Estados Unidos da América) do microscópio de Epifluorescência (Olympus BX 41, Tokyo, Japan) no LAMEB.

Para o MEV, os explantes foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio (0,1M), pH 7,2, à temperatura de 4° C, *overnigh*. Lavados no mesmo tampão, desidratados em séries crescentes de álcool etílico e, em seguida as amostras foram secas com o ponto crítico EM-DPC-030, e, revestidas com ouro antes da análise. As amostras foram examinadas no MEV JSM 6390 LV do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

3.4 Análise dos Novos Eixos Eretos Formados

Após obtidas as imagens das amostras frescas no sistema de captura Image Q Capture Pro 5.1 Software (Qimaging Corporation, Austin, TX, Estados Unidos da América) do microscópio de Epifluorescência (Olympus BX 41, Tokyo, Japan), foram utilizadas 3 imagens de explantes, de cada réplica (n=4), de cada tratamento para a contagem dos novos eixos formados nas extremidades (região seccionada). Após foram realizadas medições de tamanho de cada eixo ereto formado.

3.5 Análise dos dados

Realizou-se as análises descritivas (média e erro padrão), com posterior análise Unifatorial (ANOVA), seguida por teste de comparação de Tukey (5%). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Statistica (versão 7.0) considerando-se $p \leq 0,05$ como estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

Após 5 dias de cultura, a formação dos eixos eretos já pode ser visualizada, com presença de pequenas protuberância na região seccionada (Fig. 1). Diferenças estatísticas foram observadas na formação de novos eixos eretos (Fig. 2a), onde a maior quantidade de eixos eretos formados foi no cultivo com o JA 2 mM com formação média de 6,25 eixos eretos, seguido do controle, do cultivo com JA 4 mM e do AIA 0,57 μ M que apresentaram respectivamente 5,67, 5,42 e 4,92 eixos formados. Não ocorreu formação de nenhum eixo ereto no tratamento com AIA 57 μ M (Fig. 2a). Dos que apresentaram a formação de eixos foram observadas diferenças estatísticas na média geral de tamanho dos eixos eretos formados, sendo que o controle apresentou o maior tamanho e manteve uma média geral de

tamanho entre os eixos eretos formados seguido de todos os tratamentos com JA (Fig. 2b), sendo bem visíveis na região seccionada (Fig 1).

Quando observados através da microscopia de varredura, eixos eretos puderam ser observados no início de sua formação (Fig. 3). Pequenos eixos eretos se formaram na região medular dos explantes, na região seccionada. Não foram observadas formações na região cortical dos talos. Os tratamentos de GA (10, 15 e 20 mg. L⁻¹) apresentaram as menores formações de eixos eretos sendo somente visualizados através da microscopia de varredura.

Figura 1: Regeneração direta de explantes de *Gelidium floridanum* após 5 dias de cultivo. Observe a formação dos eixos eretos (setas) (a, b, c, d, h, i). Tratamentos com GA (e, f, g) e com AIA 57 μ M (j) não houve formação de eixos eretos.

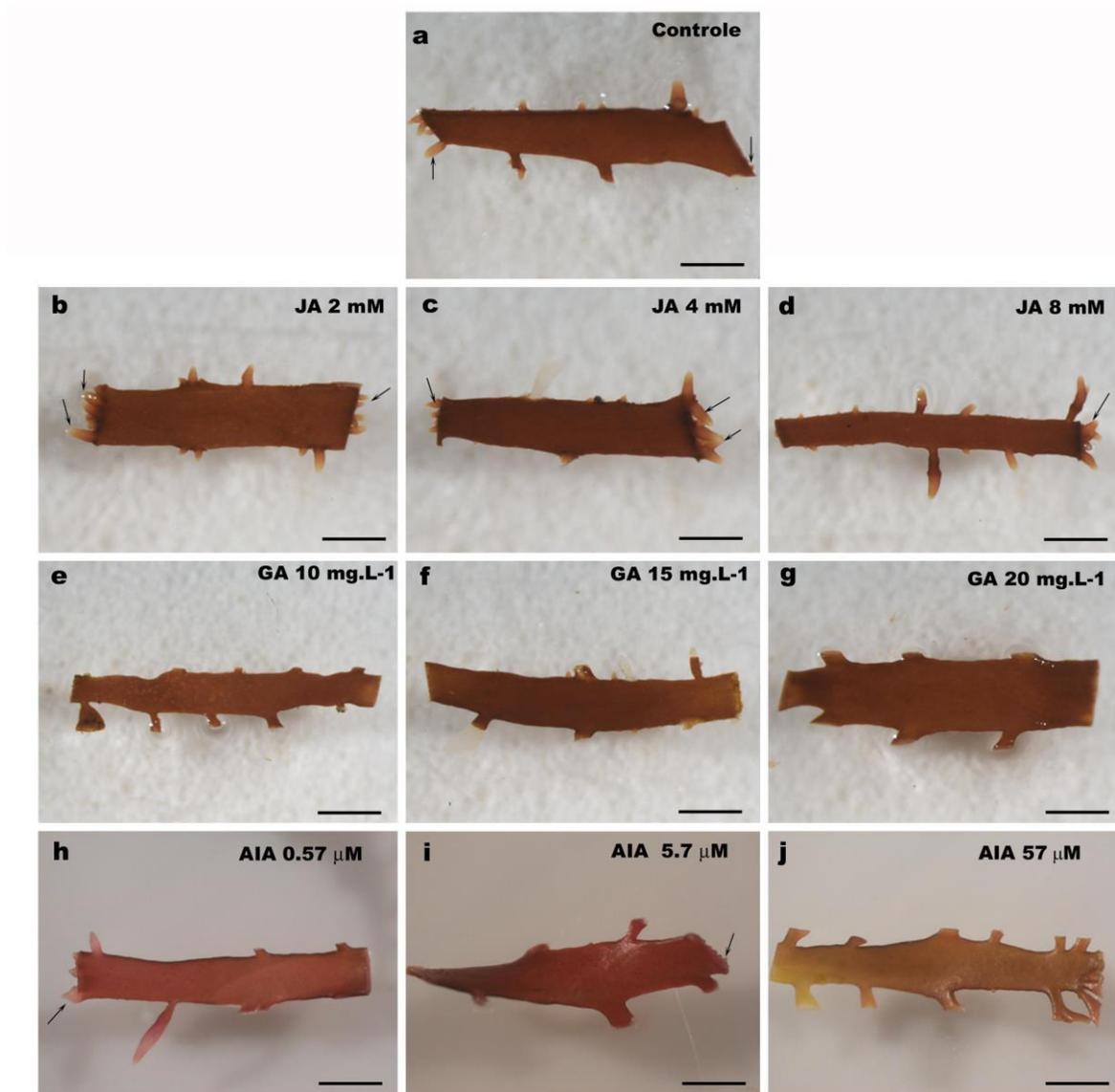


Figura 2: (a) Formação de eixos eretos e (b) Tamanho médio dos eixos eretos formados de explantes de *Gelidium floridanum* após 5 dias de cultivo (n=4, média ± EP). Letras distintas indicam as diferenças significativas de acordo com ANOVA unifatorial e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

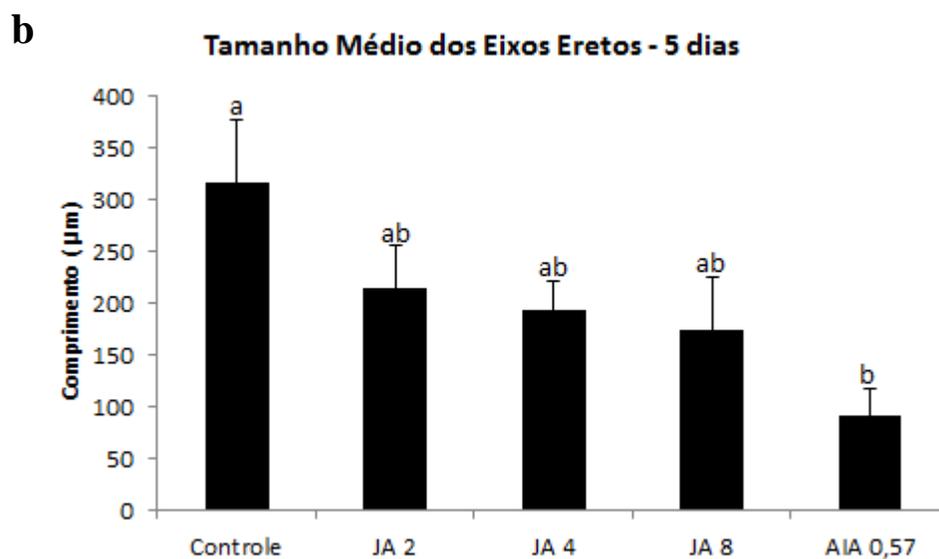
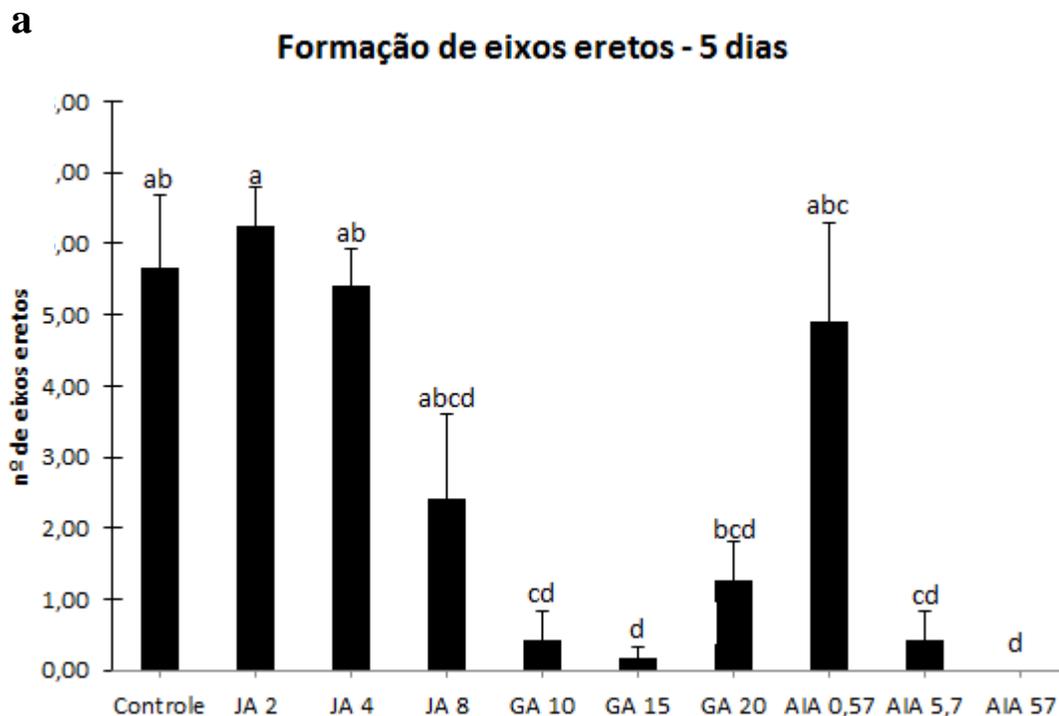
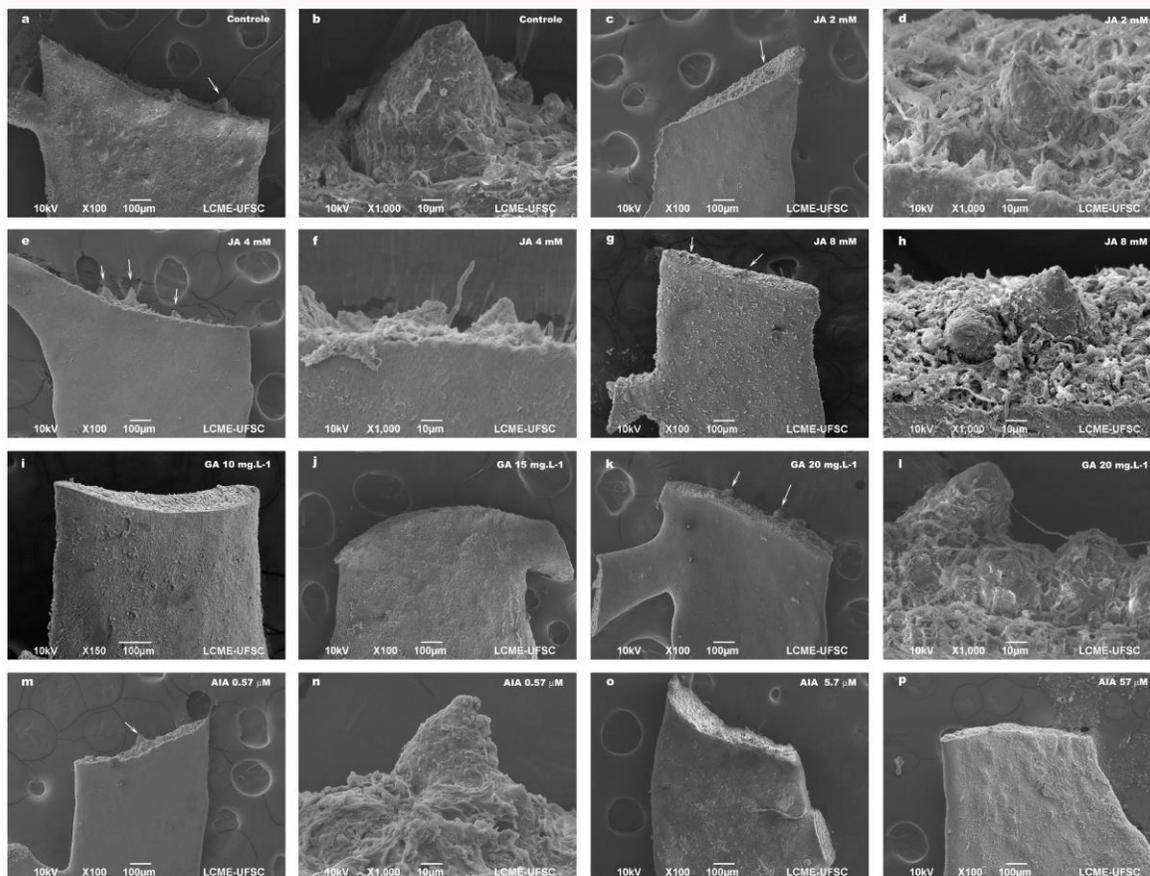


Figura 3: Microscopia eletrônica de varredura de explantes de *Gelidium floridanum* após 5 dias de cultivo. Visão geral da região apical do explante com formação de eixos eretos (setas) na região medular (**a, c, e, g, k, m**). Detalhe do eixo ereto formado na região medular (**b, d, f, h, l, n**). Visão geral de explantes sem a formação de eixos eretos (**i, j, o, p**).



Quando analisados na microscopia de luz, as secções longitudinais dos explantes de *G. floridanum* submetidas ao PAS (Fig. 4) exibiram uma reação na parede celular, o que sugere a presença de compostos de celulose, essa reação também ocorreu no citoplasma pela presença dos polissacarídeos neutros, os grãos de amidos das florídeas. No controle (Fig. 4a-c) os eixos eretos foram visualizados com maior quantidade de grãos de amido nas células da sua base sendo que as células do ápice não possuíam esse acúmulo de grãos no citoplasma (Fig. 4a,b). As células do explante controle (Fig. 4c) apresentavam intensa reação na parede celular bem como grande quantidade de amido das florídeas em seu citoplasma. Os tratamentos com JA (Fig. 4d-f) apresentaram eixos eretos com as mesmas características que o controle. Os tratamentos com GA não foram visualizados com formação de eixos eretos, mas na região

seccionada foi possível observar uma intensa proliferação celular e células com presença de grãos de amido (Fig. 4g-i). Nos tratamentos com AIA (Fig. 4j-l) ocorre a formação de pequenos eixos eretos com as mesmas características do controle, presença de células com grãos de amido somente na base do eixo. No tratamento AIA 5,7 μ M foi visualizada uma camada de células que se forma anteriormente a formação da regeneração e, esta apresentou reação ao PAS com presença de compostos de celulose (Fig. 4k).

Quando submetidas à reação histoquímica de ATO (Fig. 5), todas as secções longitudinais apresentaram reação positiva na parede celular indicando a presença de polissacarídeos ácidos. Tanto nas amostras controle (Fig. 5 a-c), nas amostras tratadas com JA (Fig. 5 d-f) e nas amostras com AIA (Fig. 5 j-l) os eixos eretos apresentaram uma reação menos intensa na região das células medulares que das corticais. Já no tratamento com GA (Fig. 5 g-i) que não apresentaram a formação de eixos eretos, na região seccionada as células apresentaram intensa reação ao ATO. No tratamento AIA 5,7 μ M também foi visualizada a camada de células que se forma anteriormente a formação da regeneração com reação ao ATO (Fig. 4k).

Em todas as secções observadas através da Microscopia de Luz não foi observado a formação de eixos eretos a partir de células corticais, a sua formação só foi visualizada a partir das células medulares do explante.

Figura 4: Microscopia de luz de secções longitudinais de explantes de *Gelidium floridanum* após 5 dias de cultivo corados com Reativo de Schiff (PAS). Amostras controle (a-c) com formação de eixos eretos (EE) com reação mais intensa na sua base indicando a presença de grãos de amido (setas), sendo que os ápices dos explantes (*) foram visualizados reação ao PAS somente na região da parede celular (a,b). Note que nas células do explante (c) ocorre intensa reação ao PAS no citoplasma, indicando a presença de grande quantidade de grãos de amido das florídeas. Amostras tratadas com JA 2 (d), 4 (e) e 8 mM (f) com reação ao PAS nos eixos eretos semelhante ao controle. Amostras tratadas com GA 10 (g), 15 (h) e 20 mg.mL⁻¹ (i) sem formação de eixos eretos, sendo que na região da injúria tem proliferação celular com acúmulo de grãos de amido de florídeas, note (i) organização celular para a formação do eixo ereto (seta branca). Amostras tratadas com AIA 0,57 (j), 5,7 (k) e 57 mM (l) com reação positiva ao PAS, note (k) formação de uma camada de células (seta azul) que ocorre anteriormente a formação dos eixos eretos. Células medulares (CM); Células corticais (CC); Células subcorticais (CS); Célula apical (CA). Escala: 100 µM.

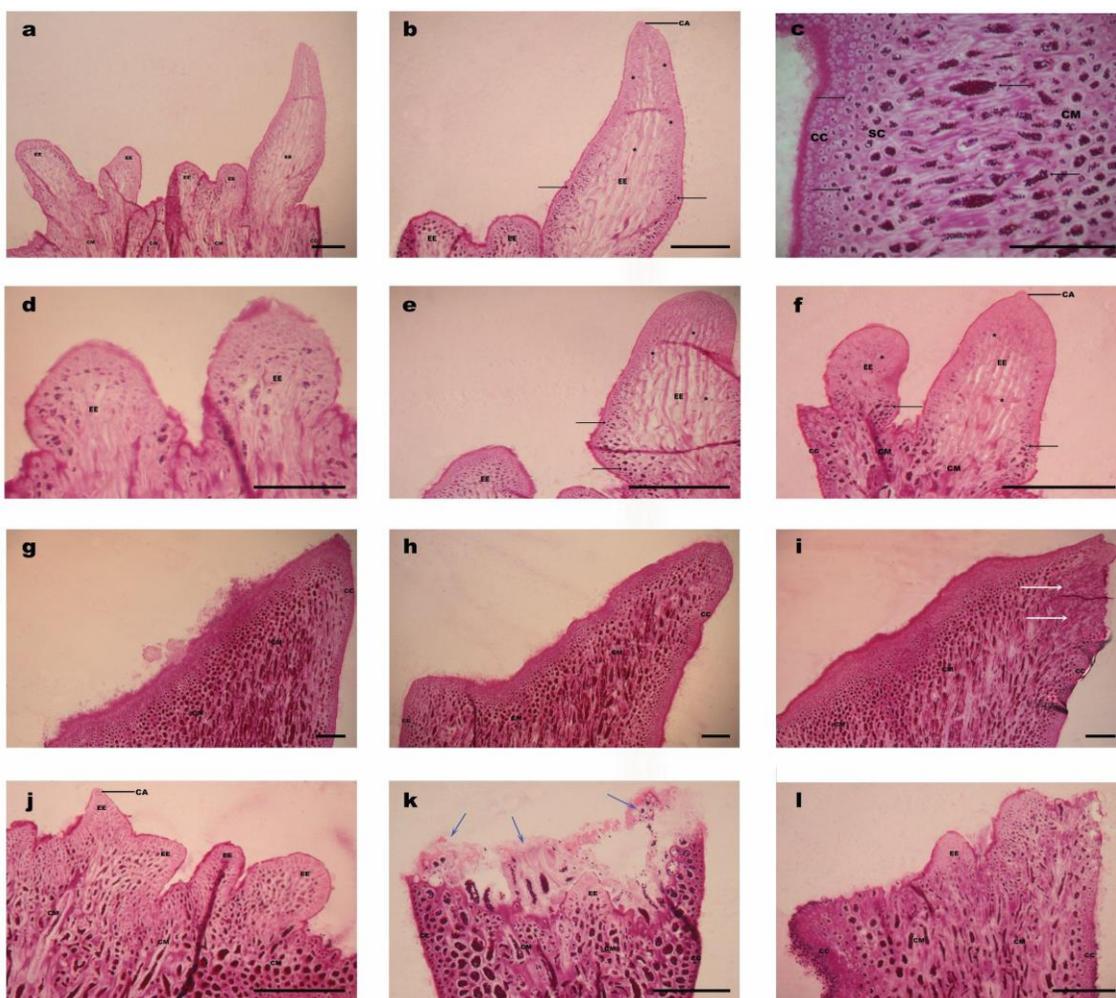
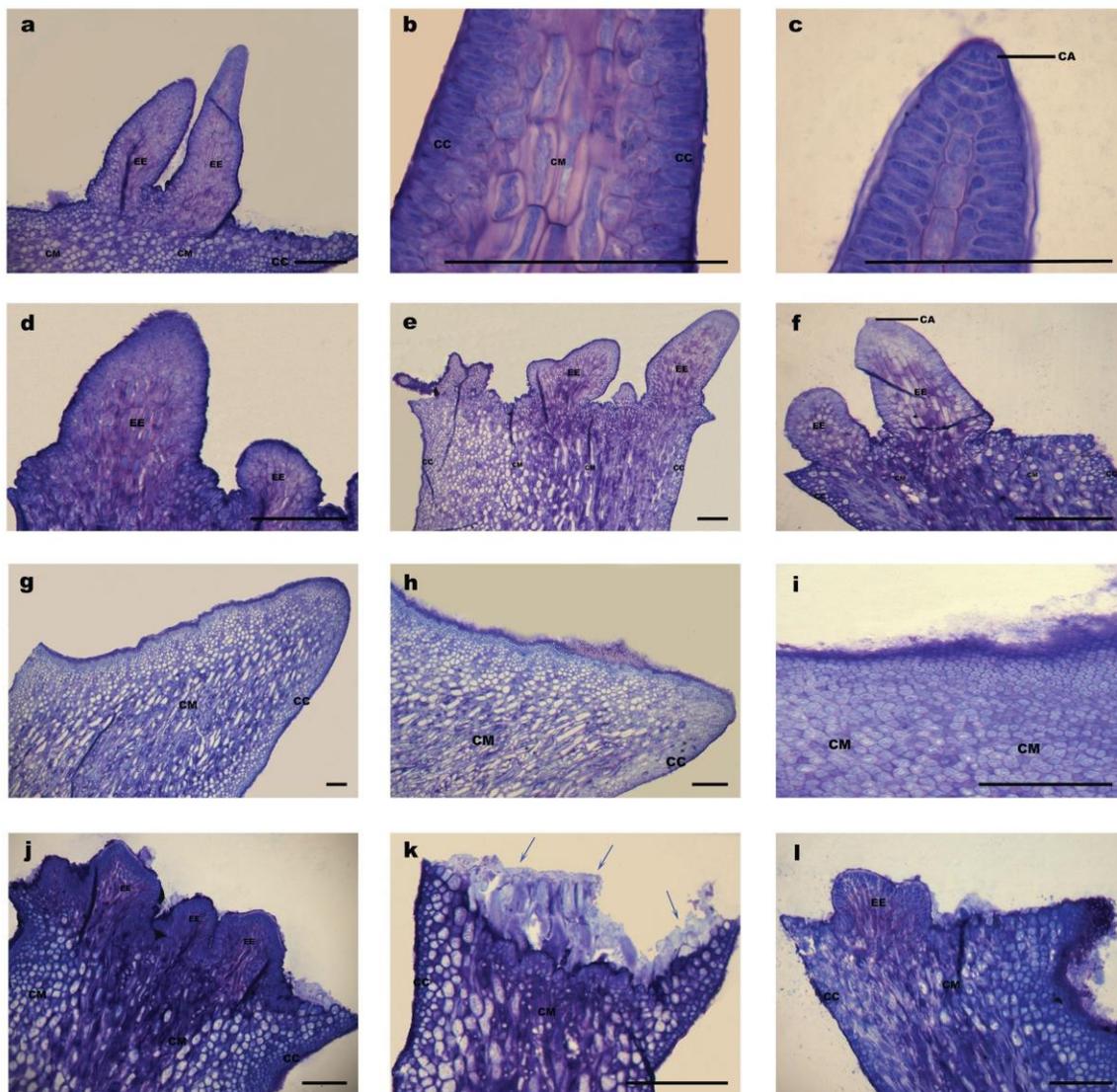


Figura 5: Microscopia de luz de secções longitudinais de explantes de *Gelidium floridanum* após 5 dias de cultivo corados com Azul de Toluidina (ATO). Amostras controle (a-c) e amostras tratadas com JA 2 (d), 4(e) e 8 mM (f) com reação positiva ao ATO mais intensa no explante, nos eixos eretos (EE) (b, c) a reação é menos intensa nas células medulares (CM) do que nas corticais (CC). Amostras tratadas com GA 10 (g), 15 (h) e 20 mg/mL⁻¹ (i) sem formação de eixos eretos, mas com intensa reação ao ATO na região seccionada. Amostras tratadas com AIA 0,57 (j), 5,7 (k) e 57 mM (l) com reação positiva ao ATO menos intensa nas células medulares dos eixos eretos (j, i), note (k) na camada de células (seta azul) que ocorre anteriormente a formação dos eixos eretos ocorre reação ao ATO. Células medulares (CM); Células corticais (CC); Células subcorticais (CS); Célula apical (CA), (EE) Eixos eretos. Escala: 100 µM.



Após 20 dias de cultivo, a formação de novos eixos eretos foi visualizada tanto na região seccionada como em toda a região do explante (Fig. 6). Quando analisamos os eixos eretos formados na região seccionada, diferenças estatísticas foram observadas (Fig. 7a). O AIA 5,7 μM foi o tratamento que apresentou o maior número de eixos eretos formados com uma média de 14,33 seguido dos tratamentos AIA 0,57 μM (12,66 eixos), AIA 57 μM (11,25 eixos), JA 4 mM (10,25 eixos), GA 20 mg. L⁻¹ (10,08 eixos), GA 15 mg L⁻¹(9,91) e JA 2 mM (9,58) (Fig. 7a). Porém em relação à média de tamanho dos eixos formados (Fig. 7b), o tratamento que apresentou a melhor média foi JA 8 mM com 2,76 mm de tamanho. Já em relação ao tamanho máximo observado dos eixos formados não foi visualizada diferenças estatísticas entre os tratamentos e o controle (dados não mostrados).

Figura 6: Regeneração direta de explantes de *Gelidium floridanum* após 20 dias de cultivo. Observe a formação dos eixos eretos (setas).

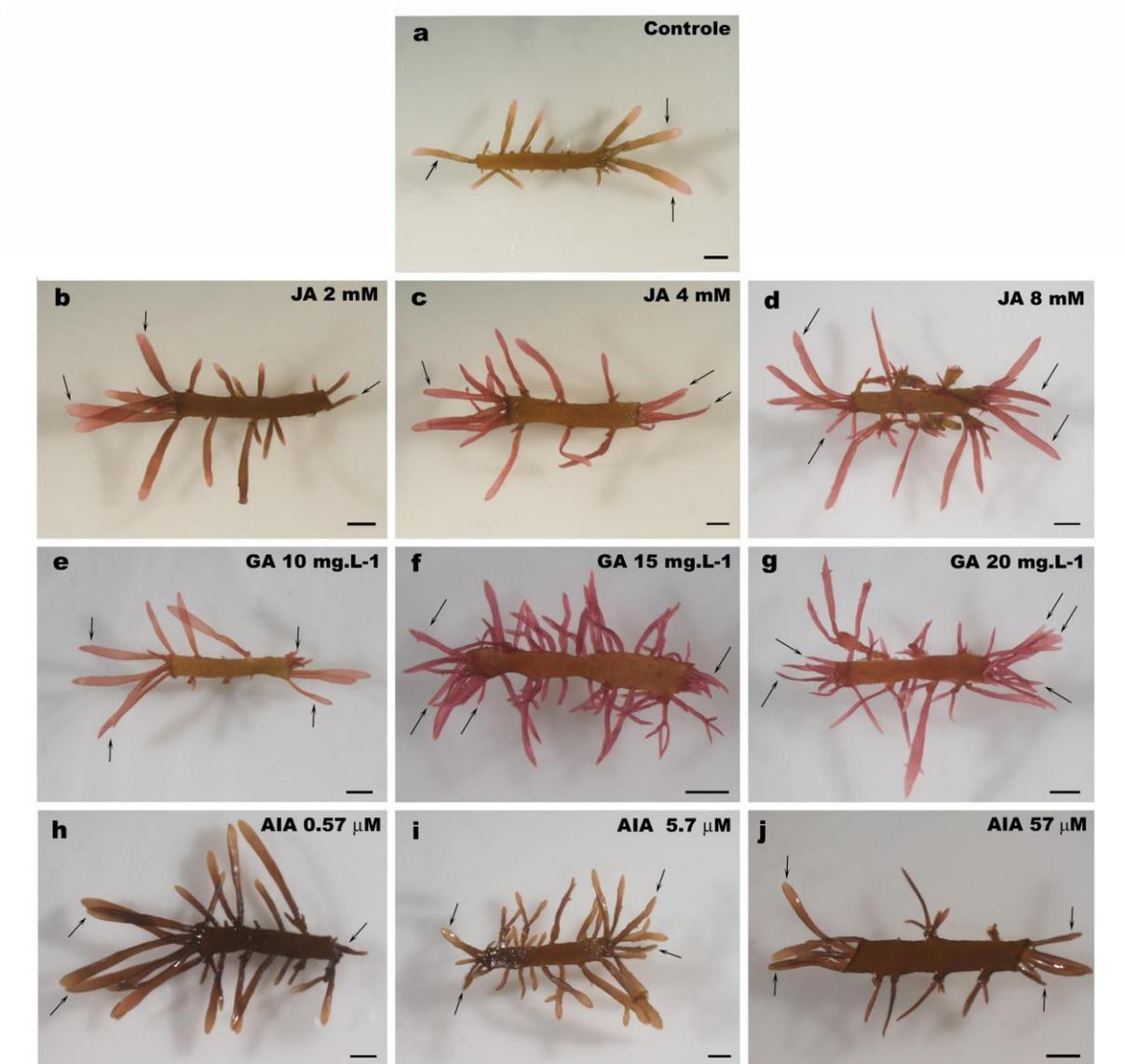
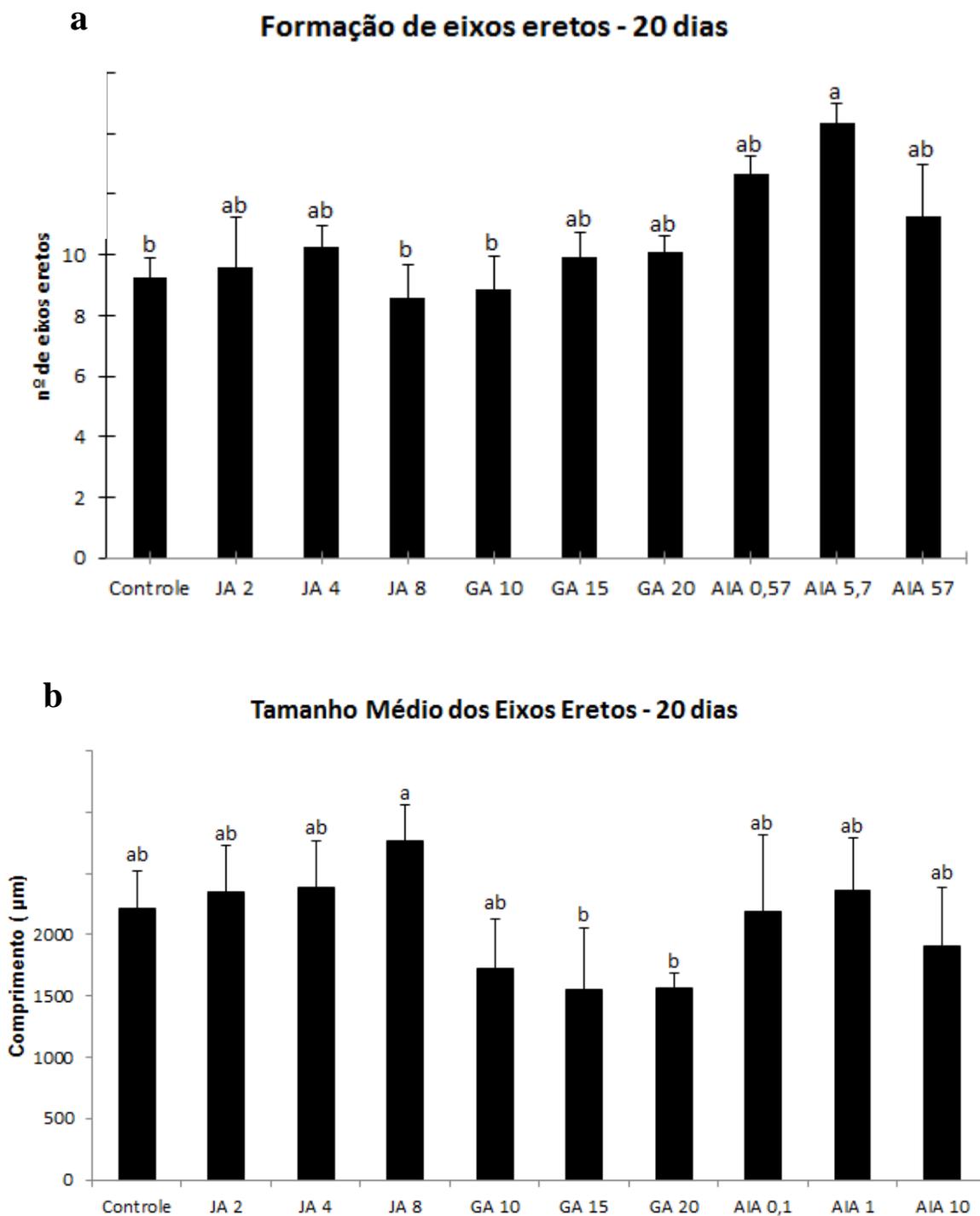


Figura 7: (a) Formação de eixos eretos e (b) Tamanho médio dos eixos eretos formados de explantes de *Gelidium floridanum* após 20 dias de cultivo (n=4, média ± EP). Letras distintas indicam as diferenças significativas de acordo com ANOVA unifatorial e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



5. DISCUSSÃO

Em macroalgas, o desenvolvimento de cultivo *in vitro* é um dos potenciais tecnológicos para proliferação em massa e produção de compostos sob condições controladas (CHARRIER *et al.*, 2015). Esses clones micropropagados poderiam ser usados como mudas para o cultivo de algas marinhas, evitando a coleta de leitões naturais (YOKOYA & YONESHIGUE-VALENTIN, 2011).

No presente estudo, a regeneração direta dos explantes de *G. floridanum* ocorreu somente na região das células medulares. Dependendo do tipo de regeneração, direta ou indireta, a formação pode ocorrer também de células corticais, como no caso da formação de calos de *Kappahycus alvarezii* (ZITTA *et al.*, 2013).

Para a organização e formação dos eixos eretos, nos explantes, inicialmente ocorre uma formação de uma camada de células na região seccionada como resultado da injúria. Essa injúria é um fator fundamental na produção de novos eixos eretos, visto que observamos a formação em qualquer região que sofreu injúria, não somente nas extremidades do explante, mas também por toda a região do talo o qual apresentava alguma injúria.

As células dos eixos eretos de *G. floridanum* apresentam acúmulo de reserva, os grãos de amido das florídeas, observadas pela reação PAS positiva, somente na base dos eixos sendo ausente no seu ápice. Segundo Bouzon e colaboradores (2011) o acúmulo de reserva de grãos de amido das florídeas está relacionado à capacidade que essas células possuem de sintetizar seu material orgânico, porém no estudo o não acúmulo na região do ápice pode ser explicado pela mobilização destes grãos para formação de novas células e produção de parede celular.

A parede celular dos eixos eretos diferiu quanto à intensidade da coloração do ATO, apresentando na região das células medulares uma reação menos intensa, sugerindo ser a porção com menor quantidade de grupamentos sulfato ou carboxil. A reação metacromática ao ATO, segundo McCully (1968), ocorre pela ligação desse corante aos grupos carboxil e sulfato de polissacarídeos ácidos, produzindo uma cor violeta. No presente estudo, essa marcação ocorre pela presença de ágar, como observado também em calos de *Gracilaria tenuifrons* (BOUZON *et al.*, 2011).

A regeneração direta de *G. floridanum* já começou a ser visualizada na primeira semana de cultivo, sendo que a utilização do ácido jasmônico (2 mM) apresentou a maior quantidade e também a melhor média de tamanho dos eixos eretos. Os JAs desempenham papéis centrais no crescimento das plantas e processos de desenvolvimento, incluindo crescimento de raízes, germinação de sementes, desenvolvimento de flores, senescência foliar e defesa de plantas em respostas a estresses bióticos e abióticos (WASTERACK, 2007). A visualização de um maior número de eixos eretos com JA resulta da sua contribuição a tolerância ao estresse diminuindo a quantidade de espécies reativas de oxigênio (GARCIA-JIMENEZ & ROBAINA, 2017), formadas provavelmente pela injúria na região seccionada, favorecendo a formação inicial dos eixos.

Enzimas envolvidas na biossíntese de jasmonatos foram identificados em várias algas vermelhas, incluindo *Lithothamnion corallioides* e *Gracilariopsis* sp. (HAMBERG *et al.*, 1992; HAMBERG & GERWICK, 1993). Além disso, o jasmonato e a JA foram isolados da macroalga *Gelidium latifolium* (KRUPINA & DATHE, 1991) e das algas verdes unicelulares *Dunaliella tertiolecta* e *D. salina* (FUJII *et al.*, 1997). Os principais componentes voláteis de *Porphyra yezoensis* variam em resposta a tratamento externo com JA (LIHONG *et al.*, 2018). Em *Grateloupia imbricata*, liberação de jasmonato está relacionada ao estado reprodutivo, talos férteis liberaram quantidades significativas deste composto volátil comparado com talos inférteis. A aplicação de JA exógeno em talos de *G. imbricata* aumentou significativamente o número de cistocarpos após 48 h, indicando que talos de *G. imbricata* respondem ao JA (PILAR *et al.*, 2016).

A formação de eixos eretos em *G. floridanum* foi maior a partir do 15º dia, com maior número de eixos eretos com adição do AIA 5,7 mM com um total de 14,33 no 20º dia. Em um dos únicos trabalhos com regeneração direta de *Gelidium crinale*, a produção maior de eixos eretos foi a partir de 28º dia, sendo observado uma média de 16,3 eixos eretos por explantes e sem adição de nenhum fitohormônio (CROCE *et al.*, 2015). O AIA é um fitohormônio muito utilizado em cultura de tecido, estudos com regeneração direta mostram que a ação conjunta do AIA com inibidores do fuso (TIBUBOS *et al.*, 2017, NEVES *et al.*, 2015) favorece a maior produção de eixos eretos em *K. alvarezii*. No presente trabalho a utilização somente deste fitohormônio favoreceu a produção de novos eixos eretos. Além disso, o AIA tem se mostrado eficaz na formação de rizóides em diversas algas em cultura como *Bryopsis*, *Ulva* e

Caulerpa (MOSS, 1974), porém não observado neste estudo, talvez devido ao pouco tempo de cultivo.

Já em relação à utilização do ácido giberélico, uma classe de fitohormônio que desempenha um papel importante no crescimento e desenvolvimento das plantas (GE *et al.*, 2007), no presente trabalho não apresentou uma resposta efetiva nem inicialmente nem após os 20 dias quando comparado ao controle. A utilização de GA na regeneração indireta da alga marrom *Sargassum horneri* também não obteve resultado na formação de calos (UJI *et al.*, 2016).

Concluimos que a regeneração direta de explantes de *Gelidium floridanum* ocorre a partir das células medulares e inicia-se já na primeira semana de cultivo. Dentre os fitorreguladores testados, o ácido jasmônico contribuiu para a formação mais precoce dos eixos eretos, porém após 20 dias o AIA se mostrou mais eficaz na formação e tamanho dos eixos eretos.

6 REFERÊNCIAS

- AVANCI, N. C. *et al.* Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. **Genet Mol Res**, v. 9, n. 1, p. 484-505, 2010.
- BAWEJA, Pooja *et al.* Seaweed tissue culture as applied to biotechnology: problems, achievements and prospects. **Phycological Research**, v. 57, n. 1, p. 45-58, 2009.
- BIXLER, Harris J.; PORSE, Hans. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. **Journal of applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 321-335, 2011.
- BOUZON, Zenilda Laurita *et al.* Cytochemical characterization and ultrastructural organization in calluses of the agarophyte *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). **Micron**, v. 42, n. 1, p. 80-86, 2011.
- CALLAWAY, Ewen. Lab staple agar hit by seaweed shortage. **Nature News**, v. 528, n. 7581, p. 171, 2015.
- CHARRIER, Bénédicte *et al.* Production of genetically and developmentally modified seaweeds: exploiting the potential of artificial selection techniques. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 127, 2015.
- CHEN, LC-M.; TAYLOR, A. R. A. Medullary tissue culture of the red alga *Chondrus crispus*. **Canadian Journal of Botany**, v. 56, n. 7, p. 883-886, 1978.

CREELMAN, Robert A.; MULLET, John E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Annual review of plant biology**, v. 48, n. 1, p. 355-381, June, 1997.

CROCE, M. Emilia; VILLAR, Marcelo A.; PARODI, Elisa R. Assessment of alternative sources of seaweed polysaccharides in Argentina: potentials of the agarophyte *Gelidium crinale* (Hare ex Turner) Gaillon (Rhodophyta, Gelidiales). **Journal of applied phycology**, v. 27, n. 5, p. 2099-2110, 2015.

FALKOWSKA, Monika F.; PIETRYCZUK, Anna P.; BAJGUZ, Andrzej B.; GRYGORUK Aneta G, The Effect of Gibberellic Acid (GA3) on Growth, Metal Biosorption and Metabolism of the Green Algae *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae) Beijerinck Exposed to Cadmium and Lead Stress. **Polish J. of Environ**, v. 20, n. 1, p. 53–59, 2011.

FEI, X. G.; HUANG, L. J. Artificial sporeling and field cultivation of *Gelidium* in China. In: **International Workshop on Gelidium**. Springer, Dordrecht, 1991. p. 119-124.

FRIEDLANDER, Michael. Israeli R & D activities in seaweed cultivation. **Israel Journal of Plant Sciences**, v. 56, n. 1-2, p. 15-28, 2008.

FUJII, Shuhei *et al.* Occurrence of jasmonic acid in *Dunaliella* (Dunaliellales, Chlorophyta). **Phycological Research**, v. 45, n. 4, p. 223-226, 1997.

GAHAN, Peter B. **Plant histochemistry and cytochemistry**. Academic Press, London, 1984.

GALIS, Ivan *et al.* Molecular mechanisms underlying plant memory in JA-mediated defence responses. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, n. 6, p. 617-627, May, 2009.

GARCIA-JIMENEZ, P.; ROBAINA, R. R. Volatiles in the aquatic marine ecosystem: Ethylene and related plant hormones and sporulation in red seaweeds. In: **Systems Biology of Marine Ecosystems**. Springer, Cham, 2017. p. 99-116.

GE, Liya *et al.* Analyses of gibberellins by capillary electrophoresis–mass spectrometry combined with solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1159, n. 1-2, p. 242-249, 2007.

GORDON, E. M.; MCCANDLESS, E. L. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. **Nova Scotian Inst Sci Proc**, p. 111-133, 1973.

HAMBERG, Mats; GARDNER, Harold W. Oxylin pathway to jasmonates: biochemistry and biological significance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1165, n. 1, p. 1-18, 1992.

HAMBERG, Mats; GERWICK, W. H. Biosynthesis of vicinal dihydroxy fatty acids in the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis*: identification of a sodium-dependent 12-lipoxygenase and

a hydroperoxide isomerase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 305, n. 1, p. 115-122, 1993.

HAUSE, Bettina *et al.* Developmental and tissue-specific expression of JIP-23, a jasmonate-inducible protein of barley. **Plant and Cell Physiology**, v. 37, n. 5, p. 641-649, July, 1996.

HAYASHI, Leila. *Contribuição á Maricultura da Alga Vermelha Kappaphycus alvarezzi (Rodophyta, soleriaceae) para a Produção de Carragena*. 2007. 99 f. Tese de Doutorado - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2007.

HAYASHI, Leila *et al.* Nutrients removed by *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in integrated cultivation with fishes in re-circulating water. **Aquaculture**, v. 277, n. 3-4, p. 185-191, 2008.

HAYASHI, Leila; YOKOYA, Nair S; KIKUCHI, Daniela M; OLIVEIRA, Eurico C. Callus induction and micropropagation improved by colchicine and phytohormones in *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae). **Journal of Applied Phycology**, v. 20, Issue 5, pp 653–659, out., 2007.

HE, Lihong *et al.* Effects of Methyl Jasmonate on the Composition of Volatile Compounds in *Pyropia yezoensis*. **Journal of Ocean University of China**, v. 17, n. 2, p. 291-296, 2018.

HOLOPAINEN, Jarmo K. Multiple functions of inducible plant volatiles. **Trends in plant science**, v. 9, n. 11, p. 529-533, nov., 2004.

KRUPINA, Marina V.; DATHE, Wilfried. Occurrence of jasmonic acid in the red alga *Gelidium latifolium*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 46, n. 11-12, p. 1127-1129, 1991.

KUMAR, G. Rajakrishna; REDDY, C. R. K.; JHA, Bhavanath. Callus induction and thallus regeneration from callus of phycocolloid yielding seaweeds from the Indian coast. **Journal of applied phycology**, v. 19, n. 1, p. 15-25, 2007.

KÜPPER, Frithjof C. *et al.* Free fatty acids and methyl jasmonate trigger defense reactions in *Laminaria digitata*. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, n. 4, p. 789-800, 2009.

JOSEPH, Imelda; CHENNUBHOTLA, V. S. K. Gibberellic acid and 2, 4-D as growth regulators in laboratory culture of seaweeds. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**, v. 28(1), p. 66-69, mar., 1999.

LIPPERT, H. *et al.* Macrofauna associated with macroalgae in the Kongsfjord (Spitsbergen). **Polar Biology**, v. 24, n. 7, p. 512-522, mar., 2001.

MCCONN, Michele *et al.* The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant. **The Plant Cell**, v. 8, n. 3, p. 403-416, mar., 1996.

MCCULLY, Margaret E. The histological localization of the structural polysaccharides of seaweeds. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 175, n. 1, p. 702-711, sept., 1970.

McHugh, D.J. A Guide to the Seaweed Industry. FAO Fisheries Technical Paper 441. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Rome, 2003.

McLachlan, J. Chapter 1-2: Growth media-marine. **Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements**, (Edited by J. R. Stein), Cambridge University Press, Cambridge. p. 25–55 ,1973.

M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2018. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 18 June, 2018.

MELO, Ricardo A.; HARGER, Bruce WW; NEUSHUL, Michael. Gelidium cultivation in the sea. In: **International Workshop on Gelidium**. Springer, Dordrecht, p. 91-106, 1991.

MOSS, Betty. Morphogenesis. In *Algae Physiology and Biochemistry*, ed. Stewart W. D. P., **Blackwell Scientific Publications**, Oxford, pp. 788-813, 1974.

MUHAMAD, Siti Nor Safriena; LING, Anna Pick-Kiong; WONG, Ching-Lee. Effect of plant growth regulators on direct regeneration and callus induction from *Sargassum polycystum* C. Agardh. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 6, p. 3299-3310, 2018.

NEVES, Filipe AS *et al.* Effects of spindle inhibitors and phyto regulators on the micropropagation of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales). **Journal of applied phycology**, v. 27, n. 1, p. 437-445, apr., 2015.

PILAR, Garcia-Jimenez; OLEGARIO, Brito-Romano; RAFAEL, Robaina R. Occurrence of jasmonates during cystocarp development in the red alga *Grateloupia imbricata*. **Journal of phycology**, v. 52, n. 6, p. 1085-1093, sept., 2016.

PORSE, Hans; RUDOLPH, Brian. The seaweed hydrocolloid industry: 2016 updates, requirements, and outlook. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 5, p. 2187-2200, apr., 2017.

- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 782p, feb., 2014.
- REDDY, C. R. K. et al. Seaweed micropropagation techniques and their potentials: an overview. In: **Nineteenth International Seaweed Symposium**. Springer, Dordrecht, 2007. p. 159-167.
- SANTELICES, Bernabe; SANTELICES, Bernabé. **Synopsis of biological data on the seaweed genera Gelidium and Pterocladia (Rhodophyta)**. Food & Agriculture Org., 1988.
- SANTOS, Rui Orlando Pimenta. Population ecology of the commercial seaweed, *Gelidium sesquipedale*: Biological input for resource management. 1993.
- SANTOS, Rui; MELO, Ricardo A. Global shortage of technical agars: back to basics (resource management). **Journal of applied phycology**, v. 30, n. 4, p. 2463-2473, 2018.
- SCARIOT, Lidiane Ângela. *Efeitos da radiação ultravioleta-B na germinação e desenvolvimento dos tetrásporos de Gelidium floridanum (Gelidiales, Rhodophyta): crescimento, morfologia e ultraestrutura*. 2010. 107 f. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós- Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.
- SIMIONI, C. *Análise dos mecanismos reguladores dos processos de polarização e germinação de esporos e, desenvolvimento de gametófitos jovens de Gelidium floridanum sob efeito da radiação ultravioleta e do metal pesado cádmio*. 2014. 120 f. Tese de Doutorado - Programa de Pós- Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.
- SIMIONI, Carmen *et al.* Effects of brefeldin A on the endomembrane system and germ tube formation of the tetraspore of *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Florideophyceae). **Journal of phycology**, v. 50, n. 3, p. 577-586, mar., 2014.
- TARAKHOVSKAYA, E. R.; MASLOV, Yu I.; SHISHOVA, M. F. Phytohormones in algae. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 54, n. 2, p. 163-170, june, 2007.
- TIBUBOS, Keneth R.; HURTADO, Anicia Q.; CRITCHLEY, Alan T. Direct formation of axes in new plantlets of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty, as influenced by the use of AMPEP K⁺, spindle inhibitors, and plant growth hormones. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 5, p. 2345-2349, 2017.

TUNA, A. L. *et al.* The combined effects of gibberellic acid and salinity on some antioxidant enzyme activities, plant growth parameters and nutritional status in maize plants.

Environmental and Experimental Botany, v. 62, n. 1, p. 1–9, jan, 2008.

UJI, Toshiki *et al.* Factors influencing the induction of adventitious bud and callus in the brown alga *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh. **Journal of applied phycology**, v. 28, n. 4, p. 2435-2443, 2016.

VANDENBUSSCHE, Filip *et al.* Evolutionary conservation of plant gibberellin signalling pathway components. **BMC Plant Biology**, v. 7, n. 1, p. 65, nov., 2007.

WASTERNAK, C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. **Annals of botany**, v. 100, n. 4, p. 681-697, 2007.

YOKOYA, Nair S.; YONESHIGUE-VALENTIN, Yocie. Micropropagation as a tool for sustainable utilization and conservation of populations of Rhodophyta. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 2, p. 334-339, 2011.

YONG, Yoong Soon; YONG, Wilson Thau Lym; ANTON, Ann. Analysis of formulae for determination of seaweed growth rate. **Journal of applied phycology**, v. 25, n. 6, p. 1831-1834, mar., 2013.

ZITTA, Carmen S. *et al.* Callus ontogeny of the *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) brown tetrasporophyte strain. **Journal Of Applied Phycology**, v. 25, n. 2, p.615-629, 25 ago., 2012.