



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA  
CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA PÓS-  
GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE  
FUNGOS, ALGAS E PLANTAS –  
PPGBFAP



Análise do potencial de micropropagação de *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) utilizando fitorreguladores e substâncias bloqueadoras das fibras do fuso

Filipe Augusto da Silva Neves

Florianópolis  
2013



FILIPE AUGUSTO DA SILVA NEVES

Análise do potencial de micropropagação de *Kappaphycus alvarezii*  
(Rhodophyta, Gigartinales) utilizando de fitoreguladores e substâncias  
bloqueadoras das fibras do fuso

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Mestre, na Área de Concentração de Fisiologia Aplicada ao cultivo de macroalgas.

Orientadora: Profa. Dra. Leila Hayashi

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Viana

Florianópolis  
2013



Dedico este trabalho  
aos meus pais,  
Olídia e Damião,  
aos meus irmãos,  
Angelina, Rodolfo e Bruno,  
e a todos os meus amigos.

“O tempo fica parado  
E nós avua nele  
É como a cachoeira  
A pedra fica a vida vai”

André Abujamra & José Abujamra

“A Ciência não se ensina  
A Ciência insemina  
A Ciência em si”

Gilberto Gil & Arnaldo Antunes



## Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Leila Hayashi, pelo empenho em me ajudar, pela compreensão em diversas ocasiões, pelas horas dedicadas em explicações e correções, pelas idéias e dicas, pela confiança e crédito a mim atribuídos. Sou muito honrado de ter tido você como minha mestra.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Ana Viana por ter aceitado me co-orientar e pelas sugestões dadas.

À Msc. Carmen, pela ajuda na experimentação, análise e escrita deste trabalho.

À Ana Luiza pela ajuda na correção de meus erros de linguagem.

A todos os meus mestres que contribuíram para a minha formação.

Aos amigos e colegas de laboratório, Gabriel, Eduardo, Ana Luiza, Giulia, Ronaldo, Marina, Marco, Silvano, Clóvis, Bruna, Mathias, Susan, Michele e Giovana, por toda a ajuda com os procedimentos laboratoriais, pelos momentos de descontração e pela amizade e compreensão.

Ao colega de laboratório Silvano por ter me ajudado com os experimentos mesmo na véspera de natal.

Aos colegas de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas, por terem compartilhado deste momento.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LABCEV) e à Profa. Dra. Zenilda, por cederem espaço e equipamentos para a execução de parte das atividades.

Ao Prof. Dr. Paulo Horta por ter cedido os fitorreguladores necessários para a execução deste trabalho, e pelas sugestões fornecidas.

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

Aos funcionários e demais envolvidos do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), pelo atendimento e concessão de uso de equipamentos necessários a execução deste trabalho.

Aos órgãos de fomento e colaboradores: CAPES, pela bolsa de mestrado CAPES/REUNI nos anos 2011 e 2012; CNPq, pela verba concedida por meio do projeto Universal 2011; Ministério da Pesca e Aquicultura pela disposição de recursos por meio de aprovação de projeto em 2012; Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas, por toda disposição de recurso físico e humano; Departamento de Aquicultura, Laboratório de Camarões Marinhos,



Laboratório de Biologia Celular Vegetal e Laboratório de Ficologia, por toda a estrutura concedida.

Agradeço ainda aos todos os meus amigos que direta ou indiretamente, pessoalmente ou à distância, contribuíram para este momento, acreditaram em meu potencial, deram força para o meu trabalho e promoveram momentos de alegria e descontração.

Um agradecimento especial para os meus pais que, talvez mesmo não gostando de toda a minha ausência nestes dois anos, me apoiaram, e também aos meus irmãos que igualmente tem mostrado grande amizade e consideração.

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

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

## Resumo Geral

---

*Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. C. Silva é uma alga vermelha de grande importância comercial por ser a principal fonte de carragenana, um ficocolóide amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, têxtil e farmacêutica. A espécie é originária das Filipinas e da Indonésia onde é cultivada desde meados da década de 1970, sendo que sua principal forma de propagação é vegetativa, por meio da simples fragmentação do talo, fato este que pode ocasionar em perda da variabilidade genética e consequente redução na taxa de crescimento e aumento na susceptibilidade a pragas e doenças, resultando em perda da produtividade. Para contornar o problema, diversos estudos envolvendo técnicas de micropropagação vem sendo realizados para a espécie. Os objetivos deste trabalho foram: 1. caracterizar os níveis de ploidia de núcleos de células do calo; 2. analisar os efeitos de bloqueadores das fibras do fuso e de fitorreguladores no processo de regeneração indireta; 3. analisar os efeitos de bloqueadores das fibras do fuso e de fitorreguladores no processo de regeneração direta. Para o primeiro objetivo, núcleos de calos do tetrasporófito marrom com 30 e 60 dias de cultura foram marcados com DAPI e sua fluorescência foi captada em Microscópio Confocal de Fluorescência e quantificada por meio do software Image J. Os núcleos apresentaram variações na intensidade de fluorescência de 11.972 a 100.386 pixels  $\mu\text{m}^2$  e 20.000 a 80.975 para calos de 30 e 60 dias respectivamente. Este padrão de variação pode sugerir a ocorrência de núcleos com diversos níveis de ploidia e tendência a redução nesta variação decorrente da reorganização celular como consequência do processo de diferenciação. Para o segundo objetivo, calos com 60 dias do tetrasporófito marrom foram transferidos para meios de cultura líquidos e submetidos a 14 tratamentos com diferentes combinações e concentrações de bloqueadores de fibras do fuso e de fitorreguladores por 30 dias. Os tratamentos não interferiram na viabilidade dos calos, entretanto não foram observadas regenerações indiretas. Para o terceiro objetivo, explantes do tetrasporófito marrom foram submetidos a 7 tratamentos com diferentes concentrações de bloqueadores de fibras do fuso e 12 tratamentos com diferentes combinações e concentrações de fitorreguladores combinados com orizalina a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , adicionados ao meio de cultura líquido durante 2 semanas. Os tratamentos não influenciaram na taxa de sobrevivência. A orizalina sozinha ou combinada com fitorreguladores IAA ou K

estimulou a maior produção de eixos eretos por explante. A taxa de crescimento foi estimulada pela orizalina em combinação com a espermina ou com outros fitorreguladores (IAA e K; IAA e S; K e S; IAA, K e S). O presente trabalho demonstrou que a regeneração indireta é de difícil obtenção, por outro lado a regeneração direta é observada com frequência, sendo recomendada para a propagação da espécie, sendo que com a utilização de orizalina e com fitorreguladores há um aumento na formação de micropropágulos e da biomassa, sem afetar a taxa de sobrevivência dos explantes. Ambos os casos são importantes alternativas para aumentar a produtividade da macroalga *Kappaphycus alvarezii*.

## General Abstract

---

*Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. C. Silva is a red algae with great commercial importance because it is the main source of carrageenan, a phycocolloid largely used in food, textile and pharmaceutical industries. This species is original from the Phillipines and Indonesia, where is cultivated since early 1970's, and the main form of cultivation is through vegetatively propagation, by simple thallus fragmentation. This fact can be causing reduction in growth rates and a possible increase in the susceptibility to pests and diseases, resulting in productivity loss. To solve this problem, several studies evolving micropropagation techniques have been done for this species. The objectives of this study were: 1. Characterize the levels of ploidy in *calli* cells *nuclei*; 2. Analyze the effects of spindle inhibitors and plant growth regulators on the indirect regeneration process; 3. Analyse the effects of spindle inhibitors and phyto regulators on direct regeneraticon process. For the first objective, brown tetrasporophyte *calli nuclei* with 30 and 60 days were marked with DAPI and its fluorescence was captured in Confocal Microscopy of Fluorescence and measured with Image J software. The nuclei presented fluorescence intensity variation of 11.972 to 100.386 pixels  $\mu\text{m}^{-2}$  and 20.000 to 80.975 to 30 and 60 days old *calli*, respectively. This pattern of variation can suggest the occurrence of *nuclei* in several degrees of ploidy and a trend to reduction in this variation due to a cellular reorganization as consequence of differentiation process. For the second objective, 60 days old brown tetrasporophyte *calli* were transferred to liquid medium and submitted to 14 treatments with different combinations and concentrations of spindle inhibitors and phyto regulators for 30 days. Treatments had no influence in survival rates of the explants, although no indirect regeneration were observed. For the third objective, brown tetrasporophyte *thalli* were submitted to 7 treatments with different spindle inhibitors concentrations, and 12 different concentrations and combinations of phyto regulators combined with 1,0 mg L<sup>-1</sup> oryzalin added to liquid culture media for 2 weeks. The treatments did not influenced on survival rates. The oryzalin alone or in combination with IAA or K phyto regulators further stimulated the upright axes production per explant. The growth rates were stimulated by oryzalin in combination with spermine or the others phyto regulators (IAA and K; IAA and S; K and S; IAA, K and S). This study demonstrated that indirect

regeneration is hard to obtain, but direct regeneration is frequently observed and recommended for propagation of this species. Also, with utilization of oryzalin and phyto regulators, there is an increase on micropropagule formation and biomass without any effect on explant survival. Both cases are important alternatives to improve the production of the seaweed *Kappaphycus alvarezii*.

## Lista de Abreviaturas e Siglas

---

(2,4-D) Ácido 2,4-diclorofenoxilacético  
(AMPEP) Acadian Marine Plant Extract Powder  
(BAP) Benzilaminopurina  
(CAPES) Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
(C) Controle  
(Ch) Colchicina  
(Ch0,1) Colchicina 0,1 mg L<sup>-1</sup>  
(Ch0,5) Colchicina 0,5 mg L<sup>-1</sup>  
(Ch1,0) Colchicina 1,0 mg L<sup>-1</sup>  
(CNPq) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
(DAPI) 4',6-diamidino-2-fenilindol  
(DMSO) Dimetil sulfóxido  
(IAA) Ácido indolilacético  
(IAA0,1) IAA 0,1 mg L<sup>-1</sup> e orizalina 1,0 mg L<sup>-1</sup>  
(IAA1,0) IAA 1,0 mg L<sup>-1</sup> e orizalina 1,0 mg L<sup>-1</sup>  
(IAA0,1:K1,0) IAA 0,1 mg L<sup>-1</sup>, cinetina 1,0 mg L<sup>-1</sup> e orizalina 1,0 mg L<sup>-1</sup>  
(IAA1,0:K0,1) IAA 1,0 mg L<sup>-1</sup>, cinetina 0,1 mg L<sup>-1</sup> e orizalina 1,0 mg L<sup>-1</sup>  
(IAA:S) IAA 1,0 mg L<sup>-1</sup>, espermina 0,018 mg L<sup>-1</sup> e orizalina 1,0 mg L<sup>-1</sup>  
(IAA:K:S) IAA 1,0 mg L<sup>-1</sup>, cinetina 1,0 mg L<sup>-1</sup>, espermina 0,018 mg L<sup>-1</sup> e orizalina 1,0 mg L<sup>-1</sup>  
(IAA1,0:K0,1:Ch0,1) IAA 1,0 mg L<sup>-1</sup>, cinetina 0,1 mg L<sup>-1</sup> e colchicina 0,1 mg L<sup>-1</sup>  
(IAA1,0:K0,1:Ch1,0) IAA 1,0 mg L<sup>-1</sup>, cinetina 0,1 mg L<sup>-1</sup> e colchicina 1,0 mg L<sup>-1</sup>  
(IAA0,1:K1,0:Ch0,1) IAA 0,1 mg L<sup>-1</sup>, cinetina 1,0 mg L<sup>-1</sup> e colchicina 0,1 mg L<sup>-1</sup>  
(IAA0,1:K1,0:Ch1,0) IAA 0,1 mg L<sup>-1</sup>, cinetina 1,0 mg L<sup>-1</sup> e colchicina 1,0 mg L<sup>-1</sup>  
(IAA:S:Ch0,1) IAA 1,0 mg L<sup>-1</sup>, espermina 0,018 mg L<sup>-1</sup> e colchicina 0,1 mg L<sup>-1</sup>  
(IAA:S:Ch1,0) IAA 1,0 mg L<sup>-1</sup>, espermina 0,018 mg L<sup>-1</sup> e colchicina 1,0 mg L<sup>-1</sup>  
(IAA:K:S:Ch0,1) IAA 1,0 mg L<sup>-1</sup>, cinetina 1,0 mg L<sup>-1</sup>, espermina 0,018 mg L<sup>-1</sup> e colchicina 0,1 mg L<sup>-1</sup>

(IAA:K:S:Ch1,0) IAA 1,0 mg L<sup>-1</sup>, cinetina 1,0 mg L<sup>-1</sup>, espermina 0,018 mg L<sup>-1</sup> e colchicina 1,0 mg L<sup>-1</sup>

(IBAMA) Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

(K) Cinetina

(K:S) Cinetina 1,0 mg L<sup>-1</sup>, espermina 0,018 mg L<sup>-1</sup> e orizalina 1,0 mg L<sup>-1</sup>

(K:S:Ch0,1) Cinetina 1,0 mg L<sup>-1</sup>, espermina 0,018 mg L<sup>-1</sup> e colchicina 0,1 mg L<sup>-1</sup>

(K:S:Ch1,0) Cinetina 1,0 mg L<sup>-1</sup>, espermina 0,018 mg L<sup>-1</sup> e colchicina 1,0 mg L<sup>-1</sup>

(LABCEV) Laboratório de Biologia Celular Vegetal

(LCME) Laboratório Central de Microscopia Eletrônica

(LCM) Laboratório de Camarões Marinhos

(NaOh) Hidróxido de sódio

(Oz): Orizalina

(Oz0,1) Orizalina 0,1 mg L<sup>-1</sup>

(Oz0,5) Orizalina 0,5 mg L<sup>-1</sup>

(Oz1,0) Orizalina 1,0 mg L<sup>-1</sup>

(REUNI) Programa de Reestruturação e Expansão às Universidades Federais

(S) Espermina

(VS50) Solução de von Stosch a 50%

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I - Introdução Geral.....</b>	<b>9</b>
1. Introdução.....	9
1.1 <i>Kappaphycus alvarezii</i> .....	9
1.2 Importância comercial – produção de carragenana.....	10
1.3 Cultura de tecidos algáceos – micropropagação.....	11
2. Objetivo Geral.....	15
2.1 Objetivos Específicos.....	15
3. Referências Bibliográficas.....	17
<b>CAPÍTULO II - Caracterização dos níveis de ploidia em células do calo de <i>Kappaphycus alvarezii</i> (Rhodophyta, Gigartinales).....</b>	<b>21</b>
Resumo.....	21
Abstract.....	23
1. Introdução.....	25
2. Material e Métodos.....	27
3. Resultados.....	29
4. Discussão.....	33
5. Referências Bibliográficas.....	35
<b>CAPÍTULO III - Efeitos de fitorreguladores e bloqueadores das fibras do fuso sobre a de regeneração indireta em <i>Kappaphycus alvarezii</i> (Rhodophyta, Gigartinales).....</b>	<b>39</b>
Resumo.....	39
Abstract.....	41
1. Introdução.....	43
2. Material e Métodos.....	45
3. Resultados.....	47
4. Discussão.....	51
5. Referências Bibliográficas.....	55
<b>CAPÍTULO IV - Efeitos de substâncias bloqueadoras das fibras do fuso e de fitorreguladores sobre o processo de regeneração direta em <i>Kappaphycus alvarezii</i> (Rhodophyta, Gigartinales).....</b>	<b>57</b>
Resumo.....	57
Abstract.....	59
1. Introdução.....	61
2. Material e Métodos.....	63
3. Resultados.....	67
4. Discussão.....	75



5. Referências Bibliográficas.....	79
<b>CAPÍTULO V – Discussão Geral e Conclusão.....</b>	<b>81</b>
Referências Bibliográficas.....	85



## CAPÍTULO I

---

### Introdução Geral

#### 1. Introdução

##### 1.1 *Kappaphycus alvarezii*

*Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex. P.C. Silva, macroalga pertencente à Divisão Rhodophyta, Classe Florideophyceae, ordem Gigartinales, família Solieriaceae (Guiry, 2011), é originária das Filipinas e da Indonésia, onde ocorre naturalmente em águas claras e rasas de recifes de corais, com temperatura da água entre 20°C e 32°C (Paula *et al.* 1998). Seu talo é multiaxial parenquimatoso, apresentando três regiões principais: a região cortical, composta por uma camada de células alongadas; e duas a três camadas de células menos alongadas e vacuolizadas, a região subcortical e a região cortical, esta última formada por células grandes, arredondadas e com um eixo central formado por células pequenas e arredondadas. Diversas colorações são relatadas como variantes morfológicas, sendo que estas apresentam plasticidade fenotípica (Zitta 2011)

A espécie, atualmente, apresenta-se como de grande importância comercial devido à presença de carragenana *kappa* como parte constituinte em sua parede celular (Hayashi, 2007). Além da utilidade como matéria-prima do hidrocolóide, por ser fonte de minerais (como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ), os próprios talos da alga são utilizados na alimentação humana em saladas, e para a produção de rações (Peñaflorida & Golez, 1996). Hayashi *et al.* (2008b) demonstraram ainda que a espécie é capaz de captar os nutrientes dissolvidos na água reduzindo a eutrofização e demonstrando o potencial de sua utilização como biofiltros em sistemas integrados de cultivo multitróficos.

Em 2010, a produção mundial estimada da espécie foi superior a 1,8 milhões de toneladas (FAO, 2013), onde o maior produtor foi a Indonésia. No Brasil, a alga foi introduzida em 1995, no Instituto de Pesca da Secretaria de Agricultura e Abastecimento (Ubatuba, São Paulo) com objetivo de desenvolver estudos sobre o potencial da espécie para as atividades de maricultura no litoral brasileiro (Paula *et al.* 1998), e atualmente, uma área foi legalizada para o cultivo que se estende da Baía de Sepetiba, no estado do Rio de Janeiro, até o município de

Ilhabela no estado de São Paulo, segundo a Instrução Normativa IBAMA nº 185 de 2008.. Em Santa Catarina, estudos foram realizados de 2008 a 2010 em um cultivo experimental implantado na praia de Sambaqui, em Florianópolis (Hayashi *et al.* 2011). No momento, tais estudos estão suspensos até a emissão da licença ambiental pelo IBAMA.

## 1.2 Importância comercial – produção de carragenana

Os principais subprodutos extraídos das algas são os hidrocolóides e dentre esses estão as carragenanas, que podem ser extraídas de diversas algas vermelhas, principalmente dos gêneros *Eucheuma* J. Agardh e *Kappaphycus* Doty. As carragenanas são polissacarídeos sulfatados compostas por subunidades de  $\beta$ -D-galactose e 3,6- $\alpha$ -anidro-D-galactose (Lechat *et al.* 2000), utilizadas pelas indústrias alimentícia, têxtil e farmacêutica, devido às características gelificante, espessante, emulsificante e estabilizantes (Hayashi 2007). Diversas aplicações são encontradas na indústria de laticínios, por apresentar afinidade com as proteínas do leite. Além disso, por possuir baixo teor calórico e pela propriedade de manter a estabilidade e suspensão dos ingredientes em pó solúveis, são utilizadas para a produção de molhos prontos e produtos dietéticos, e como aglutinante, são importantes na confecção de produtos embutidos. Entre as inúmeras outras aplicações para as carragenanas estão a produção de rações, cosméticos, creme dental, meios de cultura para organismos e tecidos, entre outros. (Trono, 1992; Hayashi, 2007; Santos *et al.*, 2008).

O mercado das carragenanas está em expansão, como demonstrado por Bixler e Porse (2011). Na década de 1970, as vendas foram estimadas na ordem de 70 milhões de dólares. Em 1999, o quilo do hidrocolóide era estimado em US\$ 7,00, sendo que em 2009 este valor subiu para US\$ 10,50, o que contribuiu para o aumento das vendas de 291 milhões de dólares em 1999 para 527 milhões em 2009 (Ask & Azanza, 2002; Bixler & Porse, 2011).

Dentre as muitas formas de carragenanas identificadas até o presente momento, as principais formas encontradas e de importância comercial são as denominadas: *kappa* com gel mais duro e quebradiço; *iota* com gel mais elástico e macio; e *lambda*, que não forma gel, mas líquidos com alto grau de viscosidade. A carragenana *kappa* é obtida principalmente pelo cultivo da *Kappaphycus alvarezii* e a *iota* é quase exclusivamente obtida pelo cultivo da *Eucheuma denticulatum* (N. L. Burman) F. S. Collins & Hervey, enquanto que a *lambda* é obtida

principalmente pela exploração de algas dos gêneros *Gigartina* Stackhouse, *Betaphycus* Doty in Silva, Basson & Moe e *Sarcothalia* Kützing (McHugh 2003, Bixler e Porse 2011).

A partir de meados da década de 1970, com o sucesso alcançado com os cultivos, a produção de carragenana foi remanejada do Canadá, onde era obtida através da exploração dos bancos naturais da macroalga vermelha *Chondrus crispus* Stackhouse, para cultivos de *Kappaphycus alvarezii* e *Euclima denticulatum* em países como as Filipinas, Indonésia e Tanzânia, onde ambas atendem pelo nome popular de “cotonii” e atualmente são responsáveis por 88% da produção mundial (Paula *et al.* 1999, McHugh 2003).

A forma de propagação comumente empregada em cultivo é a propagação vegetativa a partir da fragmentação do talo, fato este que pode estar propiciando redução na variabilidade genética, haja vista que muitas vezes cultivos extensivos de diferentes regiões são provenientes de uma única planta mãe, o que pode significar redução das taxas de crescimento, da produção e da resistência ao ataque de pragas e doenças (Paula *et al.*, 1999). Em uma tentativa de minimizar o problema, estudos com cultura de tecidos para micropropagação têm sido desenvolvidos com o objetivo de aumentar a variabilidade genética dos estoques de plantas matrizes e fornecer grande quantidade de propágulos em curto espaço de tempo (Reddy *et al.* 2003, Hayashi *et al.* 2008a).

### **1.3 Cultura de tecidos algáceos - micropropagação**

Um dos problemas para o cultivo comercial é a propagação em larga escala, pois o método geralmente empregado compromete parte da produção para a manutenção dos cultivares. Para sanar o problema, técnicas de micropropagação vêm sendo empregadas para a produção de indivíduos em grande quantidade para o rápido povoamento de uma área. Titlyanov e Titlyanova (2010) relatam que pesquisadores russos e alemães vêm desenvolvendo métodos de produção de plântulas a partir de meristemas apicais e marginais em *Palmaria palmata* (Linnaeus) Weber & Mohr e *Gelidium* spp. J. V. Lamoroux, obtendo a quantidade desejada de organismos e em qualquer época do ano em um período de 5 a 7 semanas. Outra vantagem na utilização deste processo está na possibilidade de obtenção de grande número de organismos com características distintas em curto espaço de tempo e, através de seleção, alcançar a produção de linhagens mais produtivas. De acordo com Ask e Azanza (2002) a produção de novas linhagens mais produtivas e com maior rendimento de carragenana poderia acarretar em aumento de até

2% na taxa de crescimento por dia e triplicar a produção em seis semanas de cultivo.

As técnicas de micropropagação envolvem a cultura de explantes *in vitro* e são obtidas basicamente através de dois processos: a regeneração direta, quando o talo é originado a partir de células do explante, ou a regeneração indireta, quando é formado a partir de células do calo (Hayashi *et al.* 2008a). Diversos trabalhos relatam para espécies algáceas a ocorrência de regeneração direta (Bravin *et al.* 2006; Hurtado & Biter 2007; Kumar *et al.* 2007; Hayashi *et al.* 2008a) e indireta (Huang & Fujita 1997; Reddy *et al.* 2003, Hayashi *et al.* 2008a). Para *Kappaphycus alvarezii*, a regeneração a partir do explante é o processo mais fácil de ser obtido, enquanto que a frequência de plântulas regeneradas de células calo é tida como baixa pela literatura. Hayashi *et al.* (2008a) observaram a produção de até 2,27% de eixos eretos por explante sem a utilização de qualquer fitorregulador, entretanto os autores observaram apenas um calo apresentando cerca de 90 plântulas regeneradas e Reddy *et al.* (2003) descreveram que este processo ocorre em menos de 10% dos calos.

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 exploração. Estas substâncias são compostos naturais ou sintéticos que são classificados em diversos grupos de acordo com sua estrutura química ou função. Entre estes grupos estão as auxinas, as citocininas e as poliaminas, todas as quais encontradas nas macroalgas em concentrações similares às descritas para vegetais vasculares.

Embora o uso de fitorreguladores promova a formação de plântulas em vegetais vasculares, conforme relatado em diversos trabalhos (Triqui *et al.* 2008, Mukhopadhyay *et al.* 2005) sua utilização em espécies de macroalgas ainda é pouco descrita. Hayashi *et al.* (2008a) observaram maior formação de eixos eretos por explante em combinação com IAA e a citocinina 6-benzilaminopurina, enquanto que tratamentos com os fitorreguladores em separado não mostraram diferença significativa, fato este que sugere que existe uma interação entre estas substâncias e que maiores resultados podem ser obtidos a partir de outras concentrações destes e de outros fitorreguladores.

Em macroalgas, as auxinas, como o ácido indolil acético, são relatadas como atuantes na formação de rizóides na alga verde *Bryopsis plumosa* (Berthold) H. Rietema, na aceleração do crescimento e desenvolvimento de calo em algas vermelhas, e no controle da

ramificação de talos de algas vermelhas e pardas, em um processo parecido com a dominância apical de plantas terrestres (Yokoya *et al.* 2010; Tarakhovskaya *et al.* 2007). As citocininas, tal qual a cinetina, em algas vermelhas demonstraram efeitos sobre a ativação da divisão celular, acumulação de proteínas e estimulação do processo fotossintético, como a acumulação de pigmentos e enzimas da Rubisco, ativação dos fotossistemas I e II e o crescimento e formação de calo (Yokoya *et al.* 2010; Tarakhovskaya *et al.* 2007; Stirk *et al.* 2003). A espermina é um fitorregulador do grupo das poliaminas, substâncias que têm de dois ou mais grupos amina na sua composição molecular e que são descritas como estimuladoras do crescimento e morfogênese, da esporulação em talos férteis e produção em resposta ao estresse (Tarakhovskaya *et al.* 2007; Marián *et al.* 2000). A partir destes efeitos, pode-se supor que estes compostos atuem melhorando os processos de regeneração direta e indireta.

Outro grupo de compostos que são empregados para o melhoramento na produção de espécies de plantas vasculares de interesse comercial são os bloqueadores das fibras do fuso, que atuam promovendo a poliploidia. A poliploidia é um fenômeno que ocorre naturalmente com certa frequência nas plantas vasculares, sendo definida como a duplicação, uma ou várias vezes, da carga genética de uma determinada espécie devido a uma falha na formação das fibras do fuso durante a mitose (Raven *et al.* 2007), contudo, este fenômeno pode ser induzido por meio do uso de substâncias inibidoras das fibras do fuso, como a colchicina e a orizalina.

A colchicina é um alcalóide aromático extraído de *Colchicum autumnale* L. (Makkar *et al.* 2007) e a orizalina é um herbicida do grupo dinitroanilina que, como a colchicina, atua revertendo a polimerização dos microtúbulos e, por isso, é objeto de estudos sobre processos dependentes destes, como migração dos cromossomos, estruturação celular, orientação e disposição das microfibrilas de celulose, formação da parede celular, movimento intracelular, diferenciação celular, conformação dos flagelos, entre outros (Hugdahl & Morejohn 1993; Binsfeld *et al.* 2000). Vários estudos quantificam e qualificam a atuação destas duas substâncias em tecidos vegetais em processo de divisão celular. Barandalla *et al.* (2006) pesquisando o efeito da orizalina e da colchicina em explantes apicais de duas espécies de batata (*Solanum stoloniferum* L. e *Solanum tuberosum* L.), obtiveram a formação de plântulas com vários níveis de ploidia, que vão desde diploides, tetraploides, octoploides e mixoploides, aplicando tratamentos com concentrações milimolares.

Apesar desta linha de pesquisa se estender às briófitas, algas e alguns protozoários, como apontado por Hugdahl & Morejohn (1993), a grande maioria dos trabalhos são restritos as plantas vasculares, o que indica a importância de pesquisas que colaborem para o conhecimento dos processos que regem a poliploidia, seus efeitos e aplicações, em espécies de algas.

Todavia, um grande problema encontrado em macroalgas no que diz respeito à produção de poliplóides é a constatação da ploidia nos indivíduos, devido à dificuldade da aplicação de técnicas de aferição comumente usadas em vegetais vasculares, como o estudo do cariótipo. Este problema está associado à dificuldade de observação dos cromossomos em certas espécies, como *Kappaphycus alvarezii*, em que como o observado por Bulboa (2001), estes são de difícil visualização devido ao seu tamanho diminuto e por causa da grande maioria das células não se encontrar em prófase I. Os poucos núcleos com cromossomos visíveis observados pelo autor apresentaram variação na quantidade, porém não superior a 6 bivalentes, entretanto Kapraun & Lopez-Bautista (1997) relataram a quantidade como sendo de 10 bivalentes.

Movidos pela necessidade em se estabelecer um protocolo de fácil aplicação para a determinação da ploidia de *K. alvarezii*, Zitta *et al.* (2011) demonstraram que núcleos marcados com DAPI e observados em microscópio confocal de fluorescência tendem a emitir maior ou menor intensidade luminosa de acordo com o nível de ploidia. Apesar da técnica não ser capaz de determinar a quantidade de cromossomos, mostrou-se eficaz na determinação da ploidia de três linhagens de *K. alvarezii*, tidas como tetrasporofíticas e gametofíticas, e pode ser uma poderosa ferramenta para identificar a diferença de ploidia na cultura de tecidos.



## 2. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo analisar o potencial de micropropagação de *Kappaphycus alvarezii* a partir dos processos de regeneração direta e indireta, utilizando inibidores da formação de fibras do fuso e fitorreguladores.

### 2.1 Objetivos Específicos:

- a) Verificar a variação de ploidia de células do calo com diferentes idades através de microscopia de fluorescência confocal e o programa Image J;
- b) Avaliar o potencial de regeneração de células do calo a partir da utilização de fitorreguladores e colchicina;
- c) Analisar os efeitos de substâncias bloqueadoras das fibras do fuso (colchicina e orizalina) e de fitorreguladores (ácido indolil acético, cinetina e espermina) sobre as taxas de sobrevivência, formação de eixos eretos e taxas de crescimento.



### 3. Referências Bibliográficas

- Ask E.I., Azanza R.V. 2002. Advances in cultivation technology of commercial eucheumatoid species: a review with suggestions for future research. *Aquaculture* 206:257-277.
- Barandalla L., Ritter E., Galarreta J.I.R. 2006. Oryzalin treatment of potato diploids yields tetraploid and chimeric plants from which euploids could be derived by callus induction. *Potato Res.* 49:143-154.
- Binsfeld P.C., Peters J.A., Schnabl H. 2000. Efeito de herbicidas sobre a polimerização dos microtúbulos e indução de micronúcleos em protoplastos de *Helianthus maximiliani*. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 12(3):263-272.
- Bixler H.J., Porse H. 2011. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *J. Appl. Phycol.* 23:321-335.
- Bravin I.C., Valentin Y.Y., Yookoya N.S. 2006. Formação de calos e regeneração de segmentos apicais de *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Gigartinales Rhodophyta): obtenção de culturas axênicas e efeitos da concentração do agar. *Rev. Bras. Bot.* 29:175-182.
- Bulboa C.R. 2001. Aspectos reprodutivos e biológicos de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. Silva e *K. Striatum* (Schmitz) Doty (Gigartinales, Rhodophyta). Bases para introdução e cultivo de espécies exóticas no litoral brasileiro. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 84pp.
- FAO. 2013. Disponível em:  
[http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hqp\\_2702555681029869132.xml&outtype=html](http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hqp_2702555681029869132.xml&outtype=html). Acesso em: 28/01/2013.
- Guiry, M.D. 2011. World-wide electronic publication. Disponível em: <<http://www.algaebase.org>>. Acesso em: 26/06/2011.
- Hayashi L. 2007. Contribuição à maricultura da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) para produção de carragenana Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 100pp.
- Hayashi L., Santos A.A., Faria G.S.M., Nunes B.G., Souza M.S., Fonseca A.L.D., Barreto P.L.M., Oliveira E.C., Bouzon Z.L. 2011. *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Areschougiceae) cultivated in subtropical waters in Southern Brazil. *J. Appl. Phycol.* 23: 337-342.

- Hayashi L., Yokoya N.S., Kikuchi D.M., Oliveira E.C. 2008a. Callus induction and micropropagation improved by colchicine and phytohormones in *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae). J. Appl. Phycol. 20:653-659.
- Hayashi L., Yokoya N.S., Ostini S., Pereira R.T.L., Braga E.S., Oliveira E.C. 2008b. Nutrients removed by *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in integrated cultivation with fishes in re-circulating water. Aquaculture 277:185-199.
- Huang W., Fujita Y. 1997. Callus induction and thallus regeneration of the red alga *Meristotheca papulosa* (Rhodophyta, Gigartinales). Bot. Mar. 40:55-61.
- Hugdahl J.D., Morejohn L.C. 1993. Rapid and reversible high-affinity binding of the dinitroaniline herbicide oryzalin to tubulin from *Zea mays* L. Plant Physiol. 102:725-740.
- Hurtado A.Q., Biter A.B. 2007. Plantlet regeneration of *Kappaphycus alvarezii* var. adik-adik by tissue culture. J. Appl. Phycol. 19: 783-786.
- Kapraun D.F., Lopez-Bautista J. 1997. Karyology, nuclear genome quantification and characterization of the carrageenopytes *Eucheuma* and *Kappaphycus* (Gigartinales). J. Appl. Phycol. 8: 465-471.
- Kumar G.R.K., Reddy C.R.K., Bhavanath J. 2007. Callus induction and thallus regeneration from callus of phycocolloid yielding seaweeds from the Indian coast. J. Appl. Phycol. 19: 15-25.
- Lechat H., Amat M., Mazoyer J. 2000. Structure and distribution of glucomannan and sulfated glucan in the cell walls of the red alga *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta) J. Phycol. 36:891-902.
- Makkar H.P.S., Siddhuraju P., Becker K. 2007. Plant Secondary Metabolites. Methods in Molecular Biology. Totowa, New Jersey.
- McHugh D.J. 2003. A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper 441, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Marián F.R., García-Jiménez P., Robaina R.R. 2000. Polyamines in marine macroalgae, levels of putrescine, spermidine and spermine in thalli and changes in their concentration during glycerol-induced cell growth *in vitro*. Physiol. Plant. 110: 530-534.

- Mukhopadhyay M.J., Sengupta P., Muchopadhyay S., Sen S. 2005. *In vitro* stable regeneration of onion and garlic from suspension culture and chromosomal instability in solid callus culture. *Sci. Hort.* 104: 1-9.
- Paula E.J., Pereira R.T.L., Ohno M. 1999. Strain selection in *Kappaphycus alvarezii* var. *alvarezii* (Soleriaceae, Rhodophyta) using tetraspore progeny. *J. Appl. Phycol.* 11:111-121.
- Paula E.J., Pereira R.T.L., Ostini S. 1998. Introdução de espécies exóticas de *Eucheuma* e *Kappaphycus* (Gigartinales, Rhodophyta) para fins de maricultura no litoral brasileiro: abordagem teórica experimental. I: Paula E.J.: Cordeiro-Marinho M., Santos D.P., Fujii M., Plastino E.M., Yokoya N. Anais do congresso Latino-Americano de Ficologia, II Reunião Ibero-Americana de Ficologia e VII Reunião Brasileira de Ficologia. Caxambú, MG. p 340-357.
- Peñaflores V.D., Golez N.V. 1996. Use of seaweed meals from *Kappaphycus alvarezii* and *Gracilaria heteroclada* as binders in diets for juvenile shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture.* 143: 393-401.
- Raven P.H., Evert R.F., Eichhorn S.E. 2007. *Biologia Vegetal*. Editora Guanabara Koogan. 7 ed. 856pp.
- Reddy C.R.K., Kunar G.R.K., Siddhanta K., Tewari A. 2003. *In vitro* somatic embryogenesis and regeneration of somatic embryos from pigmented callus of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty (Rhodophyta, Gigartinales). *J Phycol* 39: 610-616.
- Santos F.P., Bruniera L.B., Garcia C.E.R. 2008. Carragenana: uma visão ambiental. *Terra e Cultura.* 47:58-65.
- Stirk W. A., Novák O., Strnad M., van Staden J. 2003. Cytokinins in macroalgae. *Plant Growth Regul.* 41: 13-24.
- Tarakhovskaya E.R., Maslov Y.I., Shishova M.F. 2007. Phytohormones in algae. *Russ. J. Plant Physiol.* 54: 163-170.
- Titlyanov E.A., Titlyanova T.V. 2010. Seaweed cultivation: Methods and Problems. *Russ. J. Mar. Biol.* 36: 227-242.
- Triqui Z.E.A., Guédira A., Chlyah A., Chlyah H., Souvannavong V., Haicour R., Darasinh S. 2008. Effect of genotype, gelling agent, and auxin on the induction of somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomea batatas* Lam.). *C. R. Biologies.* 331: 198-205

Trono G.C. 1992. *Eucheuma* and *Kappaphycus*: taxonomy and cultivation. Bull. Mar. Sci. Fisch. 12: 51-65.

Yokoya N.S., Stirk W.A., van Staden J., Novák O., Turecková V., Pěňčík A., Strmad M. 2010. Endogenous cytokinins, auxins, and abscisic acid in red algae from Brazil. J. Phycol. 46: 1198-1205.

Zitta, C.S. 2011. Determinação da ploidia de três linhagens de *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) cultivadas em laboratório e análise da ontogênese de calos da linhagem tetrasporofítica marrom. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. 78pp.

## Capítulo II

---

### **Caracterização dos níveis de ploidia em células do calo de *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales)**

**Resumo:** Estudos com células de calos de plantas vasculares apontam que estas podem apresentar variações no nível de ploidia e potencial para regeneração de novos indivíduos, sendo consideradas para a produção de novas linhagens. Entretanto, estudos que apontam essa variação para células do calo em macroalgas não foram observados até o momento. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a variação de ploidia de células do calo de *Kappaphycus alvarezii* da linhagem tetrasporofítica marrom. Para tanto, núcleos de calos com 30 e 60 dias de cultura foram corados com DAPI e analisados em Microscópio Confocal de Fluorescência com auxílio do software Image J. A grande variabilidade de intensidade de fluorescência observada pode indicar núcleos com diferentes níveis de ploidia. A intensidade de fluorescência variou entre de 11.972 a 100.386 pixels  $\mu\text{m}^{-2}$  e 20.000 a 80.975 pixels  $\mu\text{m}^{-2}$  para calos com 30 e 60 dias respectivamente, apresentando um maior agrupamento de pixels  $\mu\text{m}^{-2}$  no segundo caso, sugerindo estabilização da ploidia em decorrência da reorganização celular e preparação da célula para o processo de diferenciação.





**Abstract:** Studies with *calli* cells of vascular plants demonstrated that they can present variation in ploidy and potential to regenerate new plantlets, being considered for production of new crops. However, no ploidy variation in *calli* cells of seaweeds were observed yet. The aim of this work was to characterize the ploidy variation in *calli* cells of brown tetrasporophyte of *Kappaphycus alvarezii* through confocal microscopy techniques. *Calli* of 30 and 60 days old were observed using confocal fluorescence microscopy and Image J software. High variability of fluorescence intensity was observed, and can indicate nuclei with different level of ploidy. Intensity ranged from 11.972 to 100.386 pixels  $\mu\text{m}^{-2}$  e 20.000 to 80.975 pixels  $\mu\text{m}^{-2}$  in 30 and 60 days old *calli* respectively. Largest grouping of pixels  $\mu\text{m}^{-2}$  was observed in 60 days old *calli*, suggesting ploidy establishment in consequence of cellular reorganization and preparation of the cell to differentiation process.



## 1. Introdução

A produção da macroalga *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C. Silva pode estar diminuindo devido à perda na variabilidade genética decorrente da constante propagação vegetativa e formação de clones. Devido a este fato, e por causa de sua importância comercial para a produção de carragenana (Ask & Azanza 2002), estudos *in vitro* estão sendo realizados em busca de novas linhagens, o que pode ser demonstrado pelas diversas técnicas empregadas, tais como: bombardeamento de micro-partículas para inserção de genes com o objetivo de produção de linhagens transgênicas (Wang *et al.* 2010); germinação de esporos, cultivo, seleção e desenvolvimento de plântulas em condições de laboratório (Paula *et al.* 1999); utilização de cultura de tecidos para a produção de calos e regeneração de plântulas (Reddy *et al.* 2003; Muñoz *et al.* 2006; Hurtado & Biter 2007; Hayashi *et al.* 2008).

A técnica de cultura de tecidos em algas é aplicada em explantes (qualquer região do talo com capacidade de regeneração) cultivados em condições axênicas, ou seja, livre de bactérias e fungos (Yokoya & Yoneshighe-Valentin 2011). Dependendo da espécie, pode ocorrer a formação de calos, que são massas de células indiferenciadas que se formam em decorrência de um processo de estresse. Diversos autores relatam a ocorrência de calos filamentosos originados de células de explante em *K. alvarezii*, quando cultivados em meio de cultura solidificado com ágar (Reddy *et al.* 2003; Hayashi *et al.* 2008; Zitta *et al.* 2011). Ogura (1990) observou que as células do calo podem ser geneticamente instáveis, possuindo variações no número de cromossomos, e Kumar & Mathur (2004) confirmaram que calos provenientes de cultura de tecidos de ervilha (*Pisum sativum* L.) apresentaram núcleos com vários níveis de ploidia. Entretanto, estudos desta natureza com algas não foram realizados, o que pode ser explicado pela dificuldade de aplicação das técnicas de determinação da ploidia utilizadas em vegetais vasculares (Zitta *et al.* 2011).

O estudo do cariótipo de *K. alvarezii* não é eficaz para a determinação da ploidia. Segundo Bulboa (2001) os cromossomos são de difícil visualização devido ao seu tamanho diminuto. Neste estudo, a grande maioria das células não se encontrava em prófase I e nos poucos núcleos em que foram observados, os cromossomos apresentaram variação em quantidade, porém não superior a 6 bivalentes. Por outro

lado, Kapraun & Lopez-Bautista (1997) observaram a ocorrência de 10 cromossomos bivalentes no tetrasporófito.

Movidos pela necessidade em estabelecer um protocolo de fácil aplicação para a determinação da ploidia de *K. alvarezii*, Zitta *et al.* (2011) fizeram uso de técnicas de microscopia confocal, nas quais a quantidade de material cromossômico é estimada pela intensidade de fluorescência emitida por núcleos marcados com DAPI. Apesar da técnica não ser capaz de determinar o número de cromossomos, foi eficaz na determinação da ploidia de três linhagens de *K. alvarezii*, tidas como tetrasporofíticas e gametofíticas.

O objetivo deste trabalho foi analisar a variação de ploidia de células do calo da linhagem tetrasporofítica marrom de *Kappaphycus alvarezii* utilizando o método da microscopia de fluorescência confocal e programa Image J.

## 2. Material e Métodos

Para as análises, foi utilizado o tetrasporófito de coloração marrom de *Kappaphycus alvarezii* provenientes do 'USA' Marine Biological Institute, Kochi University Japan (Paula *et al.* 2001) e são cultivadas no banco de linhagens da Seção de Macroalgas do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) do Depto. de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias da UFSC, sob as seguintes condições: água do mar esterilizada (35 ups) enriquecida com solução von Stosch a 50% (VS50) (Aveal *et al.*, 1995), fotoperíodo de 12h, temperatura de 25°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), irradiância de 200 ( $\pm 10$ )  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e aeração constante.

Para o estabelecimento de culturas ax\u00e9nicas, ramos de aproximadamente 5 cm foram incubados por 7 dias com di\u00f3xido de germ\u00e2nio a 1mg L<sup>-1</sup> para retirar diatom\u00e1ceas da cultura. Ap\u00f3s este per\u00edodo, os talos foram incubados com solu\u00e7\u00e3o antibi\u00f3tica e antimic\u00f3tica (composta por 10.000 unidades mL<sup>-1</sup> de penicilina G, 10 mg mL<sup>-1</sup> de sulfato de estreptomicina e 25 mL<sup>-1</sup> de anfotericina B - Sigma) e 0,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de nistatina (Sigma) em \u00e1gua do mar enriquecida com solu\u00e7\u00e3o de von Stoch a 50% por 48 h. Em sequ\u00eancia, em em c\u00e2mara de fluxo laminar, os talos foram lavados com solu\u00e7\u00e3o de hipoclorito de s\u00f3dio a 0,05% por 5 segundos e, em seguida, com detergente org\u00e2nico a 1% por 5 segundos, ambos dilu\u00eddos em \u00e1gua destilada, concluindo com sucessivas lavagens com \u00e1gua do mar esterilizada e autoclavada.

A cultura em meio s\u00f3lido foi realizada em frascos de cultura pr\u00f3prios para tecido vegetal (Sigma), contendo 30 mL de meio de cultura s\u00f3lido, composto por \u00e1gua do mar autoclavada (35 ups), enriquecida com solu\u00e7\u00e3o VS50 e solidificada com \u00e1gar a 0,7%. Se\u00e7\u00f5es de 5 mm (explantes) foram obtidas a partir da regi\u00e3o intercalar do talo, inoculados nos frascos contendo 30 mL de meio de cultura e acondicionados em sala de cultura para a forma\u00e7\u00e3o dos calos, durante 60 dias, sob as seguintes condi\u00e7\u00f5es: irradi\u00e2ncia de 10 ( $\pm 5$ )  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoper\u00edodo de 12h e temperatura de 25 ( $\pm 1$ ) $^\circ\text{C}$ . Os meios de cultura foram renovados a cada 14 dias.

Calos com 30 e 60 dias de cultura foram separados dos explantes, corados com DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) em concentra\u00e7\u00e3o de 0,5 mg L<sup>-1</sup> em \u00e1gua destilada por aproximadamente 60 minutos (Ouriques & Bouzon, 2008) e montados em lâminas, e as amostras foram analisadas em Microsc\u00f3pio Confocal Leica DMI6000 B do Laborat\u00f3rio Central de Microscopia Eletr\u00f4nica (LCME) da UFSC. As imagens foram capturadas e aumento de 600x e a fluoresc\u00eancia dos n\u00facleos foi

observada em um comprimento de onda de excitação com laser de 405 nm (azul) em um espectro de emissão de 510 a 566 nm. A autofluorescência dos cloroplastos foi observada em um comprimento de onda de excitação com laser de 488 nm (violeta) em um espectro de emissão de 639 a 701 nm (Hepler & Gunning, 1998). As imagens foram capturadas somente em um plano para evitar a duplicidade da fluorescência dos núcleos. Imagens em campo claro das amostras também foram capturadas para serem utilizadas para análise da morfologia e anatomia das células do calo

Na quantificação dos níveis ploidia, foi utilizada a metodologia descrita por Zitta *et al.* (2011), onde a intensidade de fluorescência emitida pelos núcleos é medida com programa Image J. As imagens de fluorescência dos núcleos tratados com DAPI obtidas no microscópio confocal foram digitalizadas e reduzidas para o formato de 8 bits para facilitar a quantificação dos pontos de fluorescência. Com o auxílio do programa Image J (versão 1.43), medidas da intensidade de pixels foram realizadas em uma área padrão de  $5,0 \mu\text{m}^2$  compreendidos na região fluorescente de cada núcleo analisado. A intensidade de pixels foi medida em 100 núcleos de cada amostra ( $n= 100$ ) de um calo por amostra, e os valores apresentados em média com intervalo de confiança, considerando  $p<0,05$ . Foram obtidas imagens de microscopia de campo claro com o próprio microscópio confocal.

### 3. Resultados

Por meio da microscopia de campo claro, pode-se observar que as células do calo de *Kappaphycus alvarezii* apresentaram dois ou mais núcleos, formato irregular, parede celular espessa e diversas ligações celulares (Fig. 1).

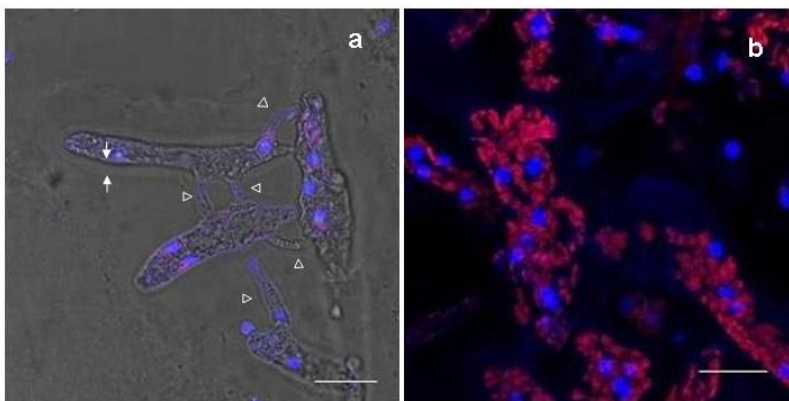


Fig. 1 – Imagens de *Kappaphycus alvarezii* obtidas por: a) microscopia de campo claro com sobreposição de microscopia confocal de fluorescência. As setas apontam para a parede celular e as cabeças de seta indicam as ligações celulares; b) microscopia confocal de fluorescência. Células tratadas com DAPI: a cor azul está marcando os núcleos, enquanto que a autofluorescência dos cloroplastos está indicada pela cor vermelha. Escala: 15  $\mu\text{m}$ .

A intensidade de fluorescência captada variou de 11.972 a 100.386 pixels  $\mu\text{m}^{-2}$  para calos com 30 dias e 20.000 a 80.975 pixels  $\mu\text{m}^{-2}$  para calos com 60 dias. Calos com 30 dias apresentaram média de fluorescência de  $58,665 \pm 4,325$  pixels  $\mu\text{m}^{-2}$ , enquanto calos com 60 dias apresentaram média de  $54,905 \pm 3,212$  pixels  $\mu\text{m}^{-2}$  (média  $\pm$  intervalo de confiança) (Fig. 2).

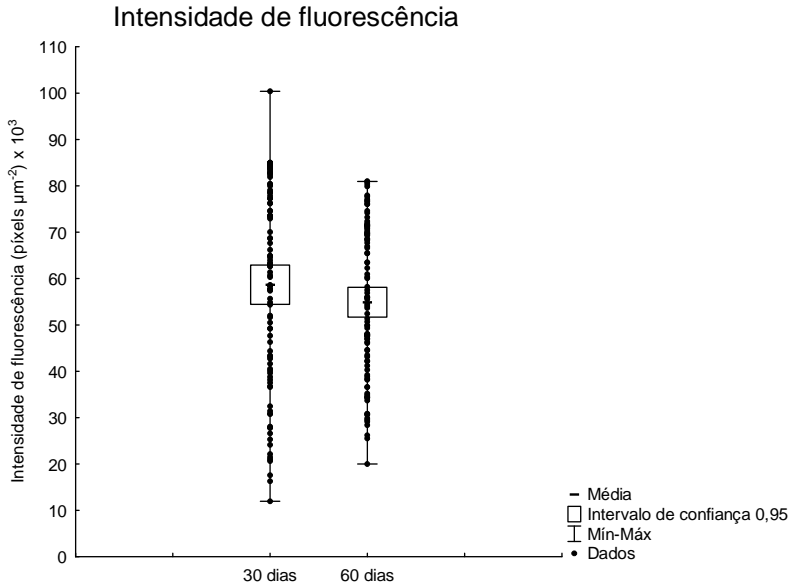


Figura 2 - Densidade de pixels por  $\mu\text{m}^2$  de núcleos de *Kappaphycus alvarezii* da linhagem tetrasporofítica marrom através de análise das imagens pelo programa Image J. Valores apresentados de acordo com a média da intensidade de fluorescência de núcleos ( $n=100$ ) e intervalo de confiança para o nível de significância de  $p<0,05$ . As barras verticais indicam os valores máximo e mínimo observados.

Quando agrupados por faixa de intensidade de fluorescência, distintas faixas de agrupamento foram observadas de acordo com o tempo de cultivo (Tab. 1). Para calos com 30 dias de cultura, os núcleos mostraram-se agrupados de forma mais homogênea em um intervalo de 20 a 90 mil pixels  $\mu\text{m}^{-2}$ . Para calos com 60 dias de cultura, os núcleos agruparam em um intervalo menor, de 30 a 80 mil pixels  $\mu\text{m}^{-2}$ .



Tabela 1 – Quantidade de núcleos por faixa de intensidade de fluorescência de 10000 pixels por  $5 \mu\text{m}^2$  para células do calo de *Kappaphycus alvarezii*.

Intensidade de fluorescência (pixels $\mu\text{m}^{-2}$ ) $\times 10^3$	calo de 30 dias	calo de 60 dias
0 - 10	0	0
10 - 20	3	0
20 - 30	10	7
30 - 40	10	15
40 - 50	11	22
50 - 60	13	13
60 - 70	16	19
70 - 80	16	21
80 - 90	20	3
90 - 100	0	0
acima de 100	1	0



#### 4. Discussão

O Microscópio Confocal de Fluorescência é equipado com sistemas de lasers controlados por filtros sintonizáveis que permitem uma regulagem precisa dos comprimentos de onda de excitação e captação, permitindo-se trabalhar com faixas desejadas e excluir a interferência de estruturas que emitam autofluorescência sem a necessidade de utilização de substâncias inibidoras (Claxton *et al.* 2013). Com isso, essa ferramenta também é eficaz para observação de diversas organelas celulares por meio de marcação com substâncias específicas, como o DAPI, capaz de se ligar ao núcleo e fluorescer quando excitado por comprimentos de onda específicos.

A análise de núcleos por meio de microscopia confocal de fluorescência é utilizada como um método alternativo para análise da ploidia (Feitosa *et al.* 2003, Hayes *et al.* 1995, Hamilton & Johnston 1997, Shimizu *et al.* 2008, Zitta *et al.* 2012). Fazendo uso desta técnica, Shimizu *et al.* (2008) descreveram a ploidia de plântulas de *Porphyra yezoensis* Ueda durante o processo de germinação de conchósporos. Os autores observaram que a meiose ocorre apenas após a germinação durante as primeiras divisões celulares, conforme previamente descrito pela literatura em estudos com outras técnicas de aferição.

Neste estudo, células do calo de *Kappaphycus alvarezii* foram observadas em microscopia de campo claro e de fluorescência por meio de Microscópio Confocal. Foram analisadas a morfologia das células e a variação de intensidade luminosa de núcleos tratados com DAPI. As células do calo apresentaram formato irregular, dois ou mais núcleos e parede celular espessa com diversas ligações celulares. Esta morfologia corrobora com o descrito por Zitta *et al.* (2012) que analisou a ontogenia de calos de *K. alvarezii* por microscopia eletrônica de transmissão e microscopia confocal, e é atribuída ao processo de desdiferenciação durante a sua formação. Os autores relacionaram estas alterações como sendo uma resposta à exposição ao ar, uma vez que foi observado o espessamento da parede celular, primeiramente nas células do talo em contato com o ar e nas células do calo, e foi mantido durante todo o período de formação, assim como pelo acúmulo de carboidratos ácidos e neutros, possivelmente celulose e carragenana, que conferem proteção higroscópica contra a dessecação (Zitta *et al.* 2012).

Outra resposta das células do calo decorrente da exposição ao ar são as diversas ligações celulares observadas. Zitta *et al.* (2012) constataram o surgimento de novas ligações celulares com o desenvolvimento do calo e atribuíram a estas origem secundária, com a

finalidade de manter a integridade dos filamentos. A observação de múltiplos núcleos também foi corroborada neste estudo. Segundo os autores, a grande quantidade de núcleos é decorrente da intensa atividade celular, evidenciada pelo acúmulo de organelas citoplasmáticas.

A variação foi de 11.972 a 100.386 pixels  $\mu\text{m}^{-2}$  e 20.000 a 80.975 pixels  $\mu\text{m}^{-2}$  para calos com 30 e 60 dias respectivamente. Essa grande variação observada pode indicar a ocorrência de núcleos com diferentes níveis de ploidia. A análise da ploidia utilizando a microscopia confocal em *K. alvarezii* foi testada primeiramente por Zitta *et al.* (2011) para a determinação do caráter tetrasporofítico e gametofítico de três linhagens da espécie.

Ao analisar a frequência de núcleos por faixa de intensidade de fluorescência, foi observado se observou foi observado que o calo com 30 dias de cultura apresentou distribuição mais homogênea, com dados mais dispersos dentro do intervalo de 20 a 90 mil  $\mu\text{m}^{-2}$ . Entretanto, o calo com 60 dias de cultura apresentou maior agrupamento na faixa de 30 a 80 mil pixels  $\mu\text{m}^{-2}$ . Este padrão de intensidade de fluorescência pode indicar uma tendência de estabilização da ploidia dos núcleos possivelmente em decorrência da reorganização celular conforme o observado por Zitta *et al.* (2012), os quais constataram calos com 60 dias de cultura apresentando as organelas concentradas mais periféricamente, demonstrando maior compartimentalização celular. Neste estágio, os autores observaram a realocação dos grânulos de amido das florídeas também em direção a periferia, aproximados às organelas, indicando a capacidade das células de produzirem seu próprio material orgânico.

O presente estudo apresentou pela primeira vez uma análise da intensidade de fluorescência de núcleos de células do calo de *K. alvarezii* com o objetivo de tentar estabelecer uma relação com os diferentes níveis de ploidia. Estudos posteriores com talos e calos em diferentes idades de cultura são requeridos para uma melhor compreensão da relação existente entre estes fatores.

## 5. Referências Bibliográficas

- Ask E.I., Azanza R.V. 2002. R. Advances in cultivation technology of commercial eucheumatoid species: a review with suggestions for future research. *Aquaculture* 206:257-277.
- Aveal K., Ferrario M.E., Oliveira E.C., Sar E. 1995. Manual e métodos ficológicos. Ediciones da Universidade de Concepción. 863p.
- Bulboa C.R. 2001. Aspectos reprodutivos e biológicos de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. Silva e *K. striatum* (Schmitz) Doty (Gigartinales, Rhodophyta). Bases para introdução e cultivo de espécies exóticas no litoral brasileiro. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 84pp.
- Claxton N.S., Fellers T.J., Davidson M.W. 2013. Laser scanning confocal microscopy. Disponível em: <http://www.olympusfluoview.com/theory/LSCIntro.pdf>. Acessado em 04/02/2013.
- Feitosa L.S., Cisalpino P.S., Santos M.R.M., Mortara R.A., Barros T.F., Morais F.V., Puccia R., Silveira J.F., Camargo Z.P. 2003. Chromosomal polymorphism, syntenic relationships and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet. Biol.* 39: 60-69.
- Hayashi L., Yokoya N.S., Kikuchi D.M., Oliveira E.C. 2008. Callus induction and micropropagation improved by colchicine and phyto regulators in *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae). *J. Appl. Phycol.* 20: 653-659.
- Hayes S.J., Hinchliffe S.A., Pope J.D., Eccles P., Khine M.M., Kaschula R.O.C., Sampedro A., van Velzen D. 1995. Ploidy analysis on Wilms' tumour touch imprints using ethidium bromide and automated image analysis integrated confocal laser scanning microscopy. *Virchows Arch.* 427: 101-104.
- Hepler P.K., Gunning B.E.S. 1998. Confocal fluorescence microscopy of plant cells. *Protoplasma.* 201: 121-157.
- Hurtado A.Q., Biter A.B. 2007. Plantlet regeneration of *Kappaphycus alvarezii* var. adik-adik by tissue culture . *J. Appl. Phycol.* 19: 783-786.
- Hamilton P.W., Johnston C.F. 1997. DNA ploidy by confocal laser scanning microscopy. *J. Pathol.* 181: 1-2.

Kapraun D.F., Lopez-Bautista J. 1997. Kariology, nuclear genome quantification and characterization of the carrageenophytes *Eucheuma* and *Kappaphycus* (Gigartinales) J. Appl. Phycol. 8: 465-471.

Kumar P.S., Mathur V.L. 2004. Chromosomal instability in callus culture of *Pisum sativum*. Plant Cell Tiss. Org. 78: 267-271.

Muñoz J., Cahue-López A.C., Patiño R., Robledo D. 2006. Use of plant growth regulators in micropropagation of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) in airlift bioreactors. J. Appl. Phycol. 18:209-218.

Ogura, H. 1990. Chromosome variation in plant tissue culture. In: Bajaj, Y. P. S. Somaclonal variation in crop improvement I. Biotechnology in agriculture and forestry. Berlin, Springer-Verlag. 11: 49-84.

Ouriques L.C., Bouzon Z.L. 2008. Organização estrutural e ultraestrutural das células vegetativas e da estrutura plurilocular de *Hincksia mitchelliae* (Harvey) P. C. Silva (Ectocarpales, Phaeophyceae). Rogriguésia. 59: 673-685.

Paula E.J., Pereira R.T.L., Ohno M. 1999. Strain selection in *Kappaphycus alvarezii* var. *alvarezii* (Soleriaceae, Rodophyta) using tetraspore progeny. J. Appl. Phycol. 11:111-121.

Paula E.J., Erbert C., Pereira R.T.L. 2001. Growth rate of carragenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rodophyta, Gigartinales) *in vitro*. Phycol. Res. 49: 155-161.

Reddy C.R.K., Kunar G.R.K., Siddhanta K., Tewari A. 2003. *In vitro* somatic embryogenesis and regeneration of somatic embryos from pigmented callus of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty (Rhodophyta, Gigartinales). J. Phycol. 39: 610-616.

Shimizu A., Morishima K., Kobayashi M., Kunimoto M., Nakayama I. 2008. Identification of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) meiosis by DNA quantification using confocal laser scanning microscopy. J. Appl. Phycol. 20: 83-88.

Wang J., Jiang P., Cui Y., Deng X., Li F., Liu J., Qin S. 2010 Genetic transformation in *Kappaphycus alvarezii* using micro-particle bombardment: a potential strategy for gemplasm improvement Aquacult. Int. 18: 1027-1034.

Yokoya N. S., Yoneshigue-Valentin Y. 2011. Micropropagation as a tool for sustainable utilization and conservation of populations of Rhodophyta. Braz. J. Pharmacog. 21: 334-339.

Zitta C.S., Oliveira E.M., Bouzon Z.L., Hayashi L. 2011. Ploidy determination of three *Kappaphycus alvarezii* strains (Rhodophyta, Gigartinales) by confocal fluorescence microscopy. *J. Appl. Phycol.* 24: 495-499.

Zitta C.S., Rover T., Hayashi L., Bouzon Z.L. 2012. Callus ontogeny of the *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) brown tetrasporophyte strain. *J. Appl Phycol.* DOI 10.1007/s10811-012-9896-z.





### Capítulo III

---

#### **Efeitos de fitorreguladores e bloqueadores das fibras do fuso sobre a regeneração indireta de *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales)**

**Resumo:** *Kappaphycus alvarezii* é propagada vegetativamente desde o início de seus cultivos comerciais, o que pode ocasionar perda da variabilidade genética. O objetivo deste trabalho foi testar os efeitos de bloqueadores de fibras do fuso e fitorreguladores sobre o processo de regeneração indireta na espécie. Para tanto explantes com calos do tetrasporófito marrom foram tratados com inibidores das fibras do fuso (colchicina e orizalina) e com fitorreguladores (ácido indolil acético, cinetina e espermina) em 14 tratamentos com diferentes concentrações e combinações por 30 dias. Não foram observadas regenerações indiretas, entretanto todos os tratamentos apresentaram formação de eixos eretos provenientes do explante, sendo que o tratamento controle apresentou o melhor resultado ( $2,83 \pm 0,72$  eixos eretos por explante). Tanto os fitorreguladores como os bloqueadores das fibras do fuso não mostraram influência sobre a taxa de sobrevivência, assim como não estimularam a formação e crescimento de eixos eretos. O presente estudo corrobora com os resultados relatados pela literatura de que a regeneração indireta para a espécie é baixa. Em contrapartida, a regeneração direta é de fácil obtenção, sendo recomendada para a propagação da espécie por ser uma técnica mais simples e de menor custo, produzindo grande quantidade de eixos eretos em curto espaço de tempo.



**Abstract:** *Kappaphycus alvarezii* is vegetatively propagated since the beginning of commercial cultivation, and because of that, probably its genetic variability has been lost. The aim of this study was to test the effects of spindle inhibitors and phytohormones on indirect regeneration process of this species. For that, brown tetrasporophyte explants with *calli* were treated with spindle inhibitors (colchicine and oryzalin) and plant growth regulators (indole acetic acid, kinetin and spermine) in 14 treatments with different concentrations and combinations for 30 days. No indirect regeneration was observed, however all treatments showed upright axes formation from explant, and control showed higher formation ( $2,83 \pm 0,72$  upright axes per explant.). Both phytohormones and spindle inhibitors have not stimulated the survival rates, as they have not stimulated the formation and growth of upright axes. This study corroborates with the results related in the literature that the indirect regeneration is low for this species. In other hand, direct regeneration is easy to obtain so is recommended for propagation of this species being a cheaper and more simple technique and producing high amounts of micropropagules in short time.



## 1. Introdução

*Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. C. Silva é uma macroalga de importância comercial que desde meados da década de 70 é propagada vegetativamente por meio da simples fragmentação do talo, fato este responsável pela redução da variabilidade genética, e consequentemente perdas na produtividade. Como forma alternativa de propagação, diversos estudos propõem técnicas de produção de micropropágulos em laboratório, entre eles: (a) regeneração direta, quando o novo talo é originado a partir de células do explante; e (b) regeneração indireta, quando é formado a partir de células do calo (Hayashi *et al.* 2008).

Embora a literatura relate como baixa a taxa de regeneração indireta para a espécie (Reddy *et al.* 2003; Hayashi *et al.* 2008), em macroalgas esse tipo de regeneração é observada normalmente, tanto em meio sólido quanto em meio líquido, sem a adição de fitorreguladores (Huang & Fujita 1996).

Diversos grupos de fitorreguladores, classificados de acordo com sua estrutura química ou função, são descritos tanto para vegetais vasculares como para algas, assumindo a função de regulação das funções fisiológicas. Entre esses grupos são encontrados as auxinas, as citocininas e as poliaminas, que em macroalgas são observadas em concentrações parecidas às encontradas em vegetais vasculares (Tarakhovskaya *et al.* 2007). Em macroalgas, para as auxinas são atribuídas funções de aceleração de crescimento e controle de ramificações, e para as citocininas, promoção da divisão celular, acúmulo de proteínas aceleração do processo fotossintético, enquanto que para as poliaminas são atribuídas o estímulo do crescimento e morfogênese (Tarakhovskaya *et al.* 2007, Stirik *et al.* 2003), funções estas que podem contribuir com o processo de diferenciação celular no calo e induzir a regeneração indireta.

Dentre os estudos com a utilização de fitorreguladores em cultura de tecidos de macroalgas, a maioria está direcionada ao melhoramento do processo de produção de calo e não à sua regeneração, uma vez que diversas algas apresentam regenerações indiretas sem a necessidade de utilização fitorreguladores. Bravin Bravin *et al.* (2006) constataram que calos de *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux apresentam regeneração indireta em resposta à concentração de ágar e tipo de solução nutritiva e Hurtado & Biter (2007) comprovaram que calos de *K. alvarezii* formados em meio sólido suplementado com fitorreguladores, quando cortados e cultivados em meio líquido com

agitação, possuem potencial para regenerar novos indivíduos sem a necessidade de fitorreguladores no meio de cultura líquido.

Apesar da transferência do meio sólido para o meio líquido ser um dos fatores descritos como favoráveis a regeneração indireta, Yokoya (2000), observou que em *Gracilariopsis tenuifrons* (Bird *et* Oliveira) Fredericq *et* Hommersand, este processo só ocorreu em meio sólido suplementado com a auxina ácido indolil acético (IAA) e a citocinina benzilaminopurina (BAP), sendo, sendo que estes foram essenciais para a diferenciação das células do calo. Para *Grateloupia dichotoma* J. Agardh, segundo Yokoya & Handro (1996), embora tenha ocorrido regenerações indiretas independentes do meio de cultura semi-sólido e líquido, estas regenerações foram estimuladas principalmente pela combinação IAA:BAP 1:5 mg L<sup>-1</sup>.

Estudos apontam que indivíduos obtidos a partir da regeneração indireta podem ser mais robustos, como comprovado por Yan (1984), em estudo com *Saccharina (Laminaria) japonica* (Areschoug) C. E. Lane, C. Mayes, Druehl & G. W. Saunders e *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, que apresentaram indivíduos a partir da regeneração de células do calo com maior taxa de crescimento e tolerância a alta temperatura por períodos superiores ao normal, demonstrando a eficácia da técnica na melhoria de sistema de produção. Indivíduos de *Kappaphycus alvarezii* formados a partir de regeneração indireta apresentaram taxa de crescimento diária de 1,5 a 1,8 vezes superior às algas de cultivares comerciais (Reddy *et al.* 2003). Este processo também possui alto potencial de propagação, pois com apenas um calo regenerado é possível obter aproximadamente 90 plântulas (Hayashi *et al.* 2008).

Outra aplicação para o processo de formação de micropropágulos a partir de células do calo é a possibilidade de tratamento destes com inibidores das fibras do fuso, tais como a colchicina e a orizalina, para a indução de micropropágulos poliploides.

O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos de inibidores de fibras do fuso e de fitorreguladores sobre o processo de regeneração indireta do tetrasporófito marrom.

## 2. Material e Métodos

No presente estudo, foi utilizado o tetrasporófito de coloração marrom de *Kappaphycus alvarezii* provenientes do 'USA' Marine Biological Institute, Kochi University Japan (Paula *et al.* 2001) e são cultivadas no banco de linhagens da Seção de Macroalgas do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) do Depto. de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias da UFSC, sob as seguintes condições: água do mar esterilizada (35 ups) enriquecida com solução von Stosch a 50% (VS50) (Aveal *et al.*, 1995), fotoperíodo de 12h, temperatura de 25°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), irradiância de 200 ( $\pm 10$ )  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e aeração constante.

Ramos de aproximadamente 5 cm foram incubados por 7 dias com dióxido de germânio a 1mg L<sup>-1</sup> para eliminar diatomáceas da cultura. Após este período, os talos foram incubados com solução antibiótica e antimicótica composta por 10.000 unidades mL<sup>-1</sup> de penicilina G, 10 mg mL<sup>-1</sup> de sulfato de estreptomicina e 25 mg mL<sup>-1</sup> de anfotericina B - Sigma e 0,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de nistatina (Sigma) em água do mar enriquecida com VS50 por 48 h. Em sequência, os talos foram lavados com solução de hipoclorito de sódio a 0,05% e detergente orgânico a 1% por 5 segundos e depois com água do mar esterilizada, em câmara de fluxo laminar.

Após estes procedimentos de assepsia, explantes de 5mm foram seccionados a partir da região intercalar do talo e incubados em frascos de cultura próprios para cultura de tecido vegetal (Sigma), contendo 30 mL de meio de cultura sólido, composto por água do mar autoclavada (35 ups), enriquecida com VS50 solidificado com ágar a 0,7%. Os frascos contendo os explantes foram acondicionados em sala de cultura para a formação dos calos sob as seguintes condições: irradiância de 10  $\pm 5$   $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 12h e temperatura de 25  $\pm 1^\circ\text{C}$ . Os meios de cultura foram renovados a cada 14 dias.

Os explantes com calos com 60 dias de cultura foram transferidos para o meio de cultura líquido, que, consistia em água do mar esterilizada enriquecida com VS50; fitorreguladores: ácido indolil acético (IAA - Sigma), cinetina (K - Sigma) e espermina (S - Sigma); e bloqueadores das fibras do fuso: colchicina (Ch - Sigma) e a orizalina (Oz - Sigma), nas combinações abaixo descritas:

- a) Controle sem adição de bloqueadores e fitorreguladores (C)
- b) Colchicina 0,1 mg L<sup>-1</sup> (Ch0,1)
- c) Colchicina 1,0 mg L<sup>-1</sup> (Ch1,0)

- d) Orizalina 1,0 mg L<sup>-1</sup> (Oz)
- e) IAA 1,0 mg L<sup>-1</sup>, cinetina 0,1 mg L<sup>-1</sup> e colchicina 0,1 mg L<sup>-1</sup> (IAA1,0:K0,1:Ch0,1)
- f) IAA 1,0 mg L<sup>-1</sup>, cinetina 0,1 mg L<sup>-1</sup> e colchicina 1,0 mg L<sup>-1</sup> (IAA1,0:K0,1:Ch1,0)
- g) IAA 0,1 mg L<sup>-1</sup>, cinetina 1,0 mg L<sup>-1</sup> e colchicina 0,1 mg L<sup>-1</sup> (IAA0,1:K1,0:Ch0,1)
- h) IAA 0,1 mg L<sup>-1</sup>, cinetina 1,0 mg L<sup>-1</sup> e colchicina 1,0 mg L<sup>-1</sup> (IAA0,1:K1,0:Ch1,0)
- i) IAA 1,0 mg L<sup>-1</sup>, espermina 0,018 mg L<sup>-1</sup> e colchicina 0,1 mg L<sup>-1</sup> (IAA:S:Ch0,1)
- j) IAA 1,0 mg L<sup>-1</sup>, espermina 0,018 mg L<sup>-1</sup> e colchicina 1,0 mg L<sup>-1</sup> (IAA:S:Ch1,0)
- k) Cinetina 1,0 mg L<sup>-1</sup>, espermina 0,018 mg L<sup>-1</sup> e colchicina 0,1 mg L<sup>-1</sup> (K:S:Ch0,1)
- l) Cinetina 1,0 mg L<sup>-1</sup>, espermina 0,018 mg L<sup>-1</sup> e colchicina 1,0 mg L<sup>-1</sup> (K:S:Ch1,0)
- m) IAA 1,0 mg L<sup>-1</sup>, cinetina 1,0 mg L<sup>-1</sup>, espermina 0,018 mg L<sup>-1</sup> e colchicina 0,1 mg L<sup>-1</sup> (IAA:K:S:Ch0,1)
- n) IAA 1,0 mg L<sup>-1</sup>, cinetina 1,0 mg L<sup>-1</sup>, espermina 0,018 mg L<sup>-1</sup> e colchicina 1,0 mg L<sup>-1</sup> (IAA:K:S:Ch1,0)

A orizalina, o IAA e a cinetina foram diluídas em 1 M de hidróxido de sódio (NaOH – Sigma) a 1%, a colchicina em 1% de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma) e água destilada, e a espermina foi dissolvida em água destilada. Os tratamentos consistiram na dissolução das substâncias diretamente no meio de cultura. O experimento foi realizado sob as seguintes condições: irradiância de  $15 \pm 5 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , fotoper\u00edodo de 12h, temperatura de 25°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) e agita\u00e7\u00e3o constante (30 ciclos  $\text{min}^{-1}$ ) em mesa agitadora orbital (Tecnal). Para cada tratamento foram utilizados 6 explantes por unidade amostral em tr\u00eas repeti\u00e7\u00f5es (n=3). O experimento teve dura\u00e7\u00e3o de 30 dias e renova\u00e7\u00e3o quinzenal dos meios de cultura.

A forma\u00e7\u00e3o de regenera\u00e7\u00f5es foi observada em estereomicrosc\u00f3pio (Tecnival) e a forma\u00e7\u00e3o de eixos eretos foi medida e apresentada em valor m\u00e9dio por explante com intervalo de confian\u00e7a considerando a signific\u00e2ncia de  $p < 0,05$ . A estat\u00edstica foi feita pela An\u00e1lise de Vari\u00e2ncia (ANOVA) Unifatorial e teste *a posteriori* de Fisher, utilizando o *software* Statistica (vers\u00e3o 7.0)



### 3. Resultados

Aos 60 dias de cultura em meio sólido, os explantes apresentaram calos filamentosos na região de exposição ao ar (Fig. 1a). Após a transferência para o meio líquido, todos os explantes mantiveram-se vivos e aparentemente saudáveis, apresentando coloração marrom escura; entretanto os calos desprenderam-se dos explantes e não produziram regenerações indiretas.

Em todos os tratamentos, foi observada a formação de eixos eretos, principalmente provenientes da região de corte do talo, denominadas de regenerações apicais (Fig. 1b), os quais apresentaram uma variação dentro das unidades amostrais de zero a nove eixos eretos por explante. Todavia, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, variando de  $1,44 \pm 0,48$  a  $2,55 \pm 2,53$  eixos eretos por explante em K:S:Ch0,1 e IAA1,0:K0,1:Ch1,0 respectivamente (valores em média  $\pm$  intervalo de confiança) (Tab. 1).

Diferenças significativas também foram observadas entre os tratamentos, para as regenerações laterais, sendo que o tratamento C mostrou a maior taxa de regeneração ( $0,5 \pm 1,09$  eixos eretos por explante) enquanto que os tratamentos K:S:Ch0,1 e Oz não apresentaram regenerações laterais (Tab 1).

Eixos eretos provenientes da região perpendicular à região de corte e na região oposta às primeiras regenerações foram observados em menor quantidade, denominadas de regenerações laterais (Fig. 1c) e regenerações opostas (Fig. 1d), respectivamente. Para as regenerações opostas foi constatada diferença significativa entre os tratamentos, sendo que IAA1,0:K0,1:Ch1,0 apresentou maior taxa de regeneração ( $0,33 \pm 0$  eixos eretos por explante) e Ch0,1, IAA:S:Ch1,0 e K:S:Ch1,0 não apresentaram regenerações (Tab. 1).

Somando todos os eixos eretos produzidos, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, sendo a maior média de formação em IAA1,0:K0,1:Ch1,0 ( $3,00 \pm 2,71$  eixos eretos por explante) e a menor em K:S:Ch0,1 ( $1,44 \pm 0,48$  eixos eretos por explante) (Tab. 1). Em relação ao tamanho dos eixos eretos, estes apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, variando de  $0,31 \pm 0,36$  a  $0,57 \pm 0,06$  cm nos tratamentos IAA:S:Ch0,1 e IAA1,0:K0,1:Ch1,0, respectivamente (Fig. 2).

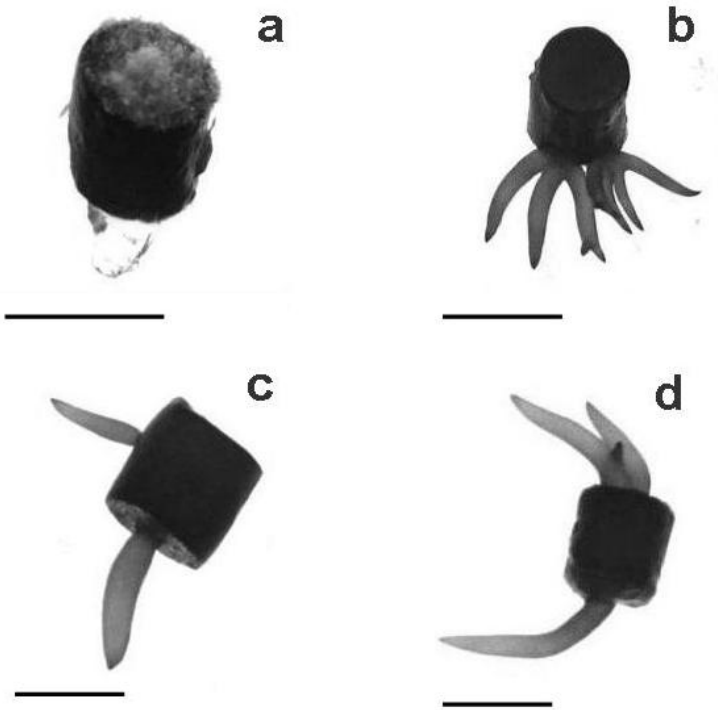


Figura 1 – Explantes de *Kappaphycus alvarezii* cultivados em meio de cultura líquido composto por água do mar enriquecida com VS50 e adição de fitorreguladores e bloqueadores de fuso a) explante de 60 dias apresentando calo filamentosos; b, c e d) explantes com calo submetido ao tratamento com fitorreguladores (ácido indolil acético, cinetina e espermina) e bloqueadores das fibras do fuso (colchicina e orizalina) em meio de cultura líquido por 30 dias, onde: b) explante apresentando diversos eixos eretos de uma mesma região de corte (regeneração apical); c) explante apresentando uma regeneração lateral; d) explante apresentando uma regeneração oposta. Escala: 0,5 cm.

Tabela 1 - Média de eixos eretos apicais, laterais, opostos e totais produzidos por explante tratados com 14 combinações de fitorreguladores (ácido indolil acético, cinetina e espermina) e os bloqueadores de fibras do fuso (colchicina e orizalina). Cada tratamento tinha três repetições com seis explantes em cada repetição (n=3). Os valores estão expressos em média  $\pm$  intervalo de confiança para  $p < 0,05$  e as letras representam as diferenças significativas entre os tratamentos segundo teste *a posteriori* de Fisher, considerando  $p < 0,05$ .

	Apicais	Laterais	Opostos	Totais
C	2,33 $\pm$ 1,09 <sup>A</sup>	0,50 $\pm$ 1,10 <sup>A</sup>	0,05 $\pm$ 0,24 <sup>AD</sup>	2,89 $\pm$ 0,48 <sup>AB</sup>
Ch0,1	2,38 $\pm$ 1,91 <sup>A</sup>	0,22 $\pm$ 0,63 <sup>AB</sup>	0,28 $\pm$ 0,48 <sup>BC</sup>	2,89 $\pm$ 2,50 <sup>AB</sup>
Ch1,0	1,50 $\pm$ 1,80 <sup>A</sup>	0,17 $\pm$ 0,41 <sup>B</sup>	0 <sup>D</sup>	1,67 $\pm$ 1,43 <sup>C</sup>
IAA1,0:K0,1:Ch0,1	2,22 $\pm$ 2,12 <sup>A</sup>	0,11 $\pm$ 0,48 <sup>B</sup>	0,22 $\pm$ 0,63 <sup>AB</sup>	2,56 $\pm$ 2,60 <sup>ABC</sup>
IAA1,0:K0,1:Ch1,0	2,56 $\pm$ 2,52 <sup>A</sup>	0,11 $\pm$ 0,24 <sup>B</sup>	0,33 $\pm$ 0 <sup>C</sup>	3,00 $\pm$ 2,71 <sup>B</sup>
IAA0,1:K1,0:Ch0,1	2,56 $\pm$ 2,28 <sup>A</sup>	0,22 $\pm$ 0,48 <sup>AB</sup>	0,06 $\pm$ 0,24 <sup>A</sup>	2,83 $\pm$ 2,30 <sup>AB</sup>
IAA0,1:K1,0:Ch1,0	2,11 $\pm$ 1,45 <sup>A</sup>	0,11 $\pm$ 0,24 <sup>B</sup>	0,06 $\pm$ 0,24 <sup>A</sup>	2,28 $\pm$ 1,26 <sup>ABC</sup>
IAA:S:Ch0,1	2,17 $\pm$ 1,09 <sup>A</sup>	0,22 $\pm$ 0,48 <sup>AB</sup>	0,11 $\pm$ 0,24 <sup>AB</sup>	2,50 $\pm$ 0,83 <sup>ABC</sup>
IAA:S:Ch1,0	1,78 $\pm$ 0,48 <sup>A</sup>	0,06 $\pm$ 0,24 <sup>B</sup>	0 <sup>D</sup>	1,83 $\pm$ 0,41 <sup>ABC</sup>
K:S:Ch0,1	1,44 $\pm$ 0,48 <sup>A</sup>	0 <sup>B</sup>	0,11 $\pm$ 0,24 <sup>AB</sup>	1,56 $\pm$ 0,63 <sup>C</sup>
K:S:Ch1,0	1,94 $\pm$ 3,05 <sup>A</sup>	0,06 $\pm$ 0,24 <sup>B</sup>	0 <sup>D</sup>	2,00 $\pm$ 2,90 <sup>ABC</sup>
IAA:K:S:Ch0,1	1,50 $\pm$ 0,41 <sup>A</sup>	0,11 $\pm$ 0,24 <sup>B</sup>	0,11 $\pm$ 0,24 <sup>AB</sup>	1,72 $\pm$ 0,48 <sup>AC</sup>
IAA:K:S:Ch1,0	1,94 $\pm$ 1,67 <sup>A</sup>	0,11 $\pm$ 0,48 <sup>B</sup>	0,22 $\pm$ 0,24 <sup>BC</sup>	2,28 $\pm$ 2,08 <sup>ABC</sup>
Oz	1,67 $\pm$ 1,43 <sup>A</sup>	0 <sup>B</sup>	0,05 $\pm$ 0,24 <sup>AD</sup>	1,72 $\pm$ 1,33 <sup>AC</sup>

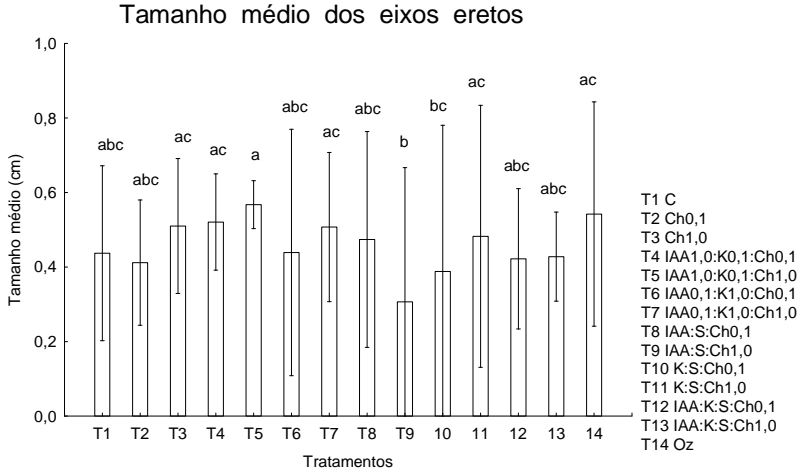


Fig 2 – Tamanho médio dos eixos eretos produzidos por explantes com calos tratados com 14 combinações de fitorreguladores (IAA, cinetina e espermina) e bloqueadores de fibras do fuso (colchicina e orizalina). Cada tratamento consistiu em três repetições com seis explantes em cada repetição (n=3). Os valores estão expressos em média, as barras representam o intervalo de confiança e as letras representam as diferenças entre os tratamentos, de acordo com teste *a posteriori* de Fisher, considerando  $p < 0,05$

#### 4. Discussão

O processo de regeneração indireta é relatado em diversas macroalgas. Huang & Fujita (1996) observaram a formação de novas plântulas a partir de células do calo em *Polyopes (Carpopeltis) affinis* (Harvey) Kawaguchi & Wang, *Polyopes prolifer (Carpopeltis prolifera)* (Hariot) Kawaguchi & Wang, *Grateloupia acuminata* Holmes, *Grateloupia turuturu* Yamada, *Grateloupia filicina* (J. V. Lamoroux) C. Agardh, *Grateloupia imbricata* Holmes, *Prionitis crispata* (Okamura) Kawaguchi e *Meristoteca papulosa* (Montagne) J. Agardh. Baweja & Sahoo (2009) reportaram que calos de *Grateloupia filicina* cultivados em meio suplementado com glicerol regeneraram filamentos, quando isolados e cultivados, formaram novos talos e Collantes *et al.* (2004) descreveram primórdios esféricos não desenvolvidos e plântulas desenvolvidas a partir de calos de *Gracilaria chilensis* Bird, McLachlan e Oliveira.

A regeneração indireta em *Kappaphycus alvarezii* foi descrita em diversos trabalhos anteriores (Reddy *et al.* 2003, Hurtado & Bitter 2007, Hayashi *et al.* 2008), entretanto o processo é tido como baixo para a espécie. Hayashi *et al.* (2008) relatam a regeneração de cerca de 90 plântulas a partir de um único calo quando tratado com 90 mM de glicerol e em agitação constante. Porém no presente trabalho, foi considerado apenas o efeito de fitorreguladores e bloqueadores de fuso no processo de regeneração, sendo que o efeito do glicerol será analisado posteriormente.

Yokoya *et al.* (2004) observaram que calos de *Gracilaria tenuistipitata* Chang & Xia mostraram-se capazes de regenerar em meio sólido, enquanto que em *Gracilaria perplexa* Byrne, Zuccarello, West, Liao & Kraft só foram observadas regenerações indiretas após a transferência do meio sólido para o meio líquido, demonstrando que o estado físico do meio de cultura pode influenciar a diferenciação das células do calo. Reddy *et al.* (2003) constataram que a excisão dos calos e posterior cultura em meio líquido é um fator que induz a regeneração de plântulas a partir dos filamentos do calo. Os autores ainda sugerem que a agitação mecânica também contribui para a regeneração. Hurtado & Bitter (2007) também descreveram a produção de primórdios de talos a partir de cortes do calo cultivados em meio líquido e com agitação mecânica e quando isolados produziram novos indivíduos. Neste estudo, os calos não foram separados do explante e mesmo assim, quando submetidos à agitação mecânica, estes se desprenderam dos explantes e não sobreviveram. Este fato foi corroborado por Muñoz *et al.* (2006)

que observaram o desprendimento dos calos quando transferidos transferidos para o meio de cultura líquido em um biorreator e estes não sobreviveram.

Reddy *et al.* (2003) relataram que a auxina ácido naftalenoacético e a citocinina benzilaminopurina contribuíram significativamente em todo o processo experimental, desde a formação do calo, na formação de eixos eretos a partir do explante e no processo de regeneração indireta a partir das células do calo, obtendo um valor de abaixo de 10% na porcentagem de regeneração do calo. Entretanto, os autores não apresentaram os dados Estes fitorreguladores não foram utilizados no presente trabalho e os utilizados, outra auxina e citocinina, não estimularam a diferenciação celular do calo em novas plântulas. Não foram testados os efeitos dos fitorreguladores no processo de formação do calo.

Outros compostos são descritos para a produção e regeneração do calo em *K. alvarezii*, como o estudo de Dawes *et al.* (1993) no qual foram analisados os efeitos do agente solidificador (agar e carragenana), reguladores de crescimento e extratos de baixo custo, como extrato de solo, água de coco e Algafer (extrato obtido a partir de algas vermelhas). Os autores descreveram a produção de calos filamentosos e não-filamentosos e a regeneração a partir do calo não-filamentoso, entretanto não fizeram menção à regeneração indireta a partir do calo filamentoso. Hurtado *et al.* (2008) utilizaram AMPEP (Acadian Marine Plant Extract Powder), um extrato de *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis amplamente usado em processos de produção experimental e comercial, porém apenas observaram regenerações provenientes do explante.

No presente estudo, não foram observadas regenerações indiretas. Todos os explantes sobreviveram aos tratamentos produzindo regenerações diretas, entretanto os fitorreguladores e bloqueadores de fuso não apresentaram resultados superiores ao tratamento controle. Os eixos eretos produzidos tiveram formação nas regiões apicais, laterais ou opostas às apicais. Este padrão de regeneração observado pode ser atribuído a: 1) o meio de cultura sólido poderia estar atuando na reversão da polaridade de crescimento; 2) os tratamentos com bloqueadores de fibras do fuso e fitorreguladores em combinações específicas pode atuar estimulando a despolarização do crescimento.

Com relação ao tamanho dos eixos eretos, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, com exceção do tratamento IAA:S:Ch1,0 que mostrou regenerações de menor comprimento a seis tratamentos, porém igual ao controle. Não foram

observados estudos que demonstrem a relação entre fitorreguladores e substâncias bloqueadoras das fibras do fuso para *K. alvarezii*.

Em conclusão, *Kappaphycus alvarezii* pode formar calos sem a utilização de fitorreguladores, como o observado por Hayashi *et al.* (2008) e Zitta *et al.* (2011) porém seu potencial para regeneração indireta mostra-se extremamente difícil e necessita de mais estudos neste aspecto. Entretanto, a espécie produz facilmente regenerações diretas, com e sem a aplicação de fitorreguladores, substâncias bloqueadoras do fuso e outros extratos mais baratos, como extratos de algas, de coco e de solo. Além disso, as técnicas são mais simples, por não exigir meio axênico e menos dispendiosas do que as técnicas de cultura para a produção de calo filamentoso.

Portanto a regeneração direta é recomendada para a finalidade de grande produção de indivíduos em curto espaço de tempo





## 5. Referências Bibliográficas

- Aveal K., Ferrario M.E., Oliveira E.C., Sar E. 1995. Manual e métodos ficológicos. Ediciones da Universidade de Concepción. 863p.
- Baweja P., Sahoo D. 2009. Regeneration studies in *Grateloupia filicina* (J. V. Lamouroux) C. Agardth - An important carragenophyte and edible seaweed. *Algae*. 24: 163-168.
- Bravin I.C., Valentin Y.Y., Yokoya N.S. 2006. Formação de calos e regeneração de segmentos apicais de *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Gigartinales, Rhodophyta): obtenção de culturas axênicas e efeitos da concentração do ágar. *Ver. Bras. Bot.* 29: 175-182.
- Collantes G., Melo C., Candia A. 2004. Micropropagation by explants of *Gracilaria chilensis* Bird, McLachlan and Oliveira. *J. Appl. Phycol.* 16: 203-213.
- Dawes C.J., Trono G.C., Lluisma A.O. 1993 Clonal propagation of *Eucheuma denticulatum* and *Kappaphycus alvarezii* for Philippine seaweed farms. *Hydrobiologia*. 260/261: 379-383.
- Hayashi L., Yokoya N.S., Kikuchi D.M., Oliveira E.C. 2008. Callus induction and micropropagation improved by colchicine and phytohormones in *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae). *J. Appl. Phycol.* 20: 653-659.
- Huang W., Fujita Y. 1997. Callus induction and thallus regeneration of the red alga *Meristotheca papulosa* (Rhodophyta, Gigartinales). *Bot. Mar.* 40: 55-61.
- Hurtado A.Q., Biter A.B. 2007. Plantlet regeneration of *Kappaphycus alvarezii* var. adik-adik by tissue culture . *J. Appl. Phycol.*, 19: 783-786.
- Hurtado A.Q., Yunque D.A., Tibubos K., Critchley A.T. 2008. Use of Acadian marine extract powder from *Ascophyllum nodosum* in tissue culture of *Kappaphycus alvarezii*. *J. Appl. Phycol.* 21: 633-639.
- Muñoz J., Cahue-López A.C., Patiño-Robledo D. 2006. Use of plant growth regulators in micropropagation of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) in airlift bioreactors. *J. Appl. Phycol.* 8:27-28

- Paula E.J., Erbert C., Pereira R.T.L. 2001. Growth rate of carragenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) *in vitro*. *Phycol. Res.* 49: 155-161.
- Reddy C.R.K., Kunar G.R.K., Siddhanta K., Tewari A. 2003. *In vitro* somatic embryogenesis and regeneration of somatic embryos from pigmented callus of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty (Rhodophyta, Gigartinales). *J. Phycol.* 39: 610-616.
- Stirk W.A., Novák O., Strnad M., van Staden J. 2003. Cytokinins in macroalgae. *Plant Growth Regul.* 41: 13-24
- Tarakhovskaya E.R., Maslov Y.I., Shishova M.F. 2007. Phytohormones in algae. *Russ. J. Plant Physl.* 54: 163-170.
- Yan Z.M. 1984. Studies on tissue culture of *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida*. *Hydrobiologia.* 116/117: 314-316.
- Yokoya N.S. 2000. Apical callus formation and plant regeneration controlled by plant growth regulators on axenic culture of the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycol. Res.* 48: 132-142.
- Yokoya N.S., Handro W. 1996. Effects of auxins and cytokinins on tissue culture of *Grateloupia dichotoma* (Gigartinales, Rodophyta). *Hydrobiologia.* 326/327: 393-400.
- Yokoya N.S., West J.A., Luchi A.E. 2004. Effects of plant growth regulators on callus formation, growth and regeneration in axenic tissue cultures of *Gracilaria tenuistipitata* and *Gracilaria perplexa* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycol. Res.* 52: 244-254.
- Zitta, C.S. 2011. Determinação da ploidia de três linhagens de *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) cultivadas em laboratório e análise da ontogênese de calos da linhagem tetrasporófitica marrom. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. 78pp.

## Capítulo IV

---

### **Efeitos de bloqueadores de fibras do fuso e de fitorreguladores sobre o processo de regeneração direta em *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales)**

**Resumo:** Desde o início dos cultivos comerciais, *Kappaphycus alvarezii* é propagada vegetativamente, fato este que pode estar ocasionando a perda da variabilidade genética e reduzindo sua produtividade. O objetivo deste trabalho foi testar os efeitos de bloqueadores de fibras do fuso e fitorreguladores sobre as taxas de sobrevivência, produção de eixos eretos e crescimento de micropropágulos da espécie. Para tanto, experimentos para analisar os efeitos da colchicina e da orizalina e os efeitos da orizalina em combinação com fitorreguladores foram realizados. Explantes foram cultivados nesses tratamentos por duas semanas e após este período, foram cultivados em água do mar esterilizada enriquecida com solução de von Stosch 50% por 12 semanas no caso dos tratamentos com colchicina e orizalina e por 9 semanas no caso dos tratamentos de orizalina em combinação com os fitorreguladores. Todos os explantes apresentaram eixos eretos provenientes da região de corte ou da região lateral do explante, sendo que o tratamento com orizalina a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  apresentou formação de eixos eretos e taxa de crescimento significativamente maior aos demais tratamentos com bloqueadores de fibras do fuso. Explantes tratados com orizalina sozinha ou combinada com ácido indolil acético (IAA) ou cinetina (K) estimularam a de eixos eretos por explante enquanto a orizalina em combinação com a espermina (S) ou com outros fitorreguladores (IAA e K; IAA e S; K e S; IAA, K e S) promoveram aumento significativo de biomassa. O presente estudo demonstrou que a orizalina sozinha ou combinada com fitorreguladores IAA ou K podem estimular a maior produção de eixos eretos por explante, garantindo maior número de micropropágulos. Por outro lado, a orizalina em combinação com a espermina ou com outros fitorreguladores (IAA e K; IAA e S; K e S; IAA, K e S) podem promover um aumento de biomassa. Ambos os casos são importantes alternativas para aumentar a produtividade da macroalga *K. alvarezii*, sem afetar a taxa de sobrevivência dos explantes.



**Abstract:** Since the beginning of commercial cultivation, *Kappaphycus alvarezii* is vegetatively propagated, being probably the cause loss of genetic variation and production decreasing. The aim of this study was to test the effects of spindle inhibitors and phyto regulators on survival and growth rates of micropropagules and upright axes formation of this species. Experiments to analyze the effects of colchicine and oryzalin in the first of all and after, the effects of combinations among oryzalin and plant growth regulators were made. Explants were cultivated in these treatments for two weeks and after this period, they were cultivated in sterilized seawater enriched with von Stosch 50% for 12 weeks in the case of the explants treated with colchicine and oryzalin and for 9 weeks in the case of the explants treated with oryzalin and combinations of phyto regulators. All explants presented upright axes in the section region or in lateral region of the explant and the treatment with  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  oryzalin showed significant increase in upright axes formation and growth rates, in relation to others treatments with spindle inhibitors. Explants treated with oryzalin alone or in combination with indolilacetic acid (IAA) or kinetin (K) promoted significant higher production of upright axes for explantes while oryzalin in combination with spermine (S) or with other phyto regulators (IAA e K; IAA e S; K e S; IAA, K e S) promoted significant increase of biomass. This study demonstrated that oryzalin alone or in combination with the IAA or K phyto regulators can improve the upright production per explant providing high amounts of micropropagules. In other hand, oryzalin in combination with spermine or the others phyto regulators (IAA and K; IAA and S; K and S; IAA, K and S) may further improve an increase of wet weight. Both cases are important alternatives to improve the productivity of the seaweed *Kappaphycus alvarezii*, without affecting in the survival rates of the explants.



## 1. Introdução

*Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex. P. C. Silva é uma alga de importância comercial para o mercado de ficocoloides, por ser a principal fonte de carragenana tipo *kappa*. Sua propagação é comumente feita através da simples fragmentação do talo, fato este que pode estar ocasionando perda na variabilidade genética, redução nas taxas de crescimento e resistência a pragas e doenças (Paula *et al.* 1999). Uma forma alternativa de propagação utilizada para contornar estes problemas é a utilização de técnicas de micropropagação, pelas quais é possível obter grande quantidade de indivíduos em um curto espaço de tempo, em qualquer época do ano, selecionar linhagens com qualidades superiores para o cultivo, por meio de variações somaclonais espontâneas, e a partir do emprego de fitorreguladores e substâncias inibidoras das fibras do fuso (Karp 1995, Titlyanov & Titlyanova 2010).

Fitorreguladores são substâncias naturais ou sintéticas que desempenham papel fundamental no controle das funções fisiológicas em plantas vasculares e em espécies algáceas (Tarakhovskaya *et al.* 2007), portanto estas substâncias podem ser utilizadas para o melhoramento de espécimes de interesse comercial. Diversas classes de fitorreguladores são relatadas em macroalgas, de acordo com suas estruturas moleculares ou funções, como as auxinas, as citocininas e as poliaminas, estas encontradas em concentrações parecidas às relatadas para plantas vasculares (Tarakhovskaya *et al.* 2007).

Em macroalgas as auxinas, como o ácido indolil acético, são relatadas como atuantes na formação de rizóides na alga verde *Bryopsis plumosa* (Berthold) H. Rietema, na aceleração do crescimento e desenvolvimento de calo em algas vermelhas, e no controle da ramificação de talos de algas vermelhas e pardas, em um processo parecido com a dominância apical de plantas vasculares (Yokoya *et al.* 2010; Tarakhovskaya *et al.* 2007). As citocininas, tal qual a cinetina, demonstraram efeitos sobre a ativação da divisão celular, acúmulo de proteínas e estimulação do processo fotossintético (como o acúmulo de pigmentos e da enzima Rubisco, e ativação dos fotossistemas I e II) e o crescimento e formação de calo em algas vermelhas (Yokoya *et al.* 2010, Tarakhovskaya *et al.* 2007, Stirk *et al.* 2003). A espermina é um fitorregulador do grupo das poliaminas, substâncias que têm de dois ou mais grupos amina na sua composição molecular, que podem estimular o crescimento e a morfogênese de macroalgas e a esporulação em talos férteis (Tarakhovskaya *et al.* 2007). Além disso, Marián *et al.* (2000)

observaram o aumento de concentração de poliaminas em indivíduos submetidos ao estresse.

A combinação entre auxinas e citocininas tem estimulado a produção de eixos eretos em explantes de *Gracilariopsis tenuifrons* (Bird *et* Oliveira) Fredericq *et* Hommersand e *K. alvarezii* (Yokoya 2000, Hayashi *et al.* 2008). Entretanto, o mesmo efeito não é observado quando os explantes são tratados com esses fitorreguladores isoladamente, sugerindo que existe uma interação entre estas substâncias e indicando que novas combinações com outros grupos de fitorreguladores ou concentrações poderiam interferir na micropropagação.

Estudos demonstraram que o tratamento com substâncias bloqueadoras das fibras do fuso, como a colchicina, podem induzir diferentes respostas em algas. Hayashi *et al.* (2008) observaram que explantes de *K. alvarezii* tratados com colchicina e glicerol apresentaram maior produção de eixos eretos. Ivanovskii & Kulepanov (2008) observaram em gametófitos de *Laminaria* (= *Saccharina*) *japonica* (J.E. Areschoug) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl & G.W. Saunders, após tratamentos com colchicina, radiação e temperatura, a formação de estruturas gametofíticas e somáticas que os autores sugeriram ser resultante de um processo de dihaploidização.

A partir dos efeitos que são relatados para estas substâncias, pode-se supor que o emprego destas em diferentes concentrações e combinações resulte em novas linhagens com melhor desempenho produtivo. De acordo com Ask e Azanza (2002) o desenvolvimento de novas linhagens mais produtivas e com maior rendimento de carragenana poderia acarretar em aumento de até 2% na taxa de crescimento por dia e triplicar a produção em seis semanas de cultivo. O objetivo deste trabalho foi analisar o potencial de micropropagação de explantes de *Kappaphycus alvarezii* a partir do tratamento com substâncias bloqueadoras das fibras do fuso (colchicina e orizalina) em combinações com fitorreguladores (IAA, cinetina e espermina), avaliando as taxas de sobrevivência, produção de eixos eretos e de crescimento.



## 2. Material e métodos

No presente estudo, foi utilizado o tetrasporófito de coloração marrom de *Kappaphycus alvarezii* provenientes do 'USA' Marine Biological Institute, Kochi University Japan (Paula *et al.* 2001) e são cultivadas no banco de linhagens da Seção de Macroalgas do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) do Depto. de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias da UFSC, sob as seguintes condições: água do mar esterilizada (35 ups) enriquecida com solução von Stosch a 50% (VS50) (Aveal *et al.*, 1995), fotoperíodo de 12h, temperatura de 25°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), irradiância de 200 ( $\pm 10$ )  $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e aeração constante.

### 1) Obtenção de cultura unialgal

A cultura unialgal foi obtida segundo metodologia descrita por Hayashi (2007). Ramos de aproximadamente 5 cm foram incubados por 7 dias com dióxido de germânio a 1 mg L<sup>-1</sup> para eliminar diatomáceas. Na sequência, os talos foram lavados com solução de hipoclorito de sódio a 0,05% por 5 segundos e, depois, detergente orgânico a 1% por 5 segundos, ambos diluídos em água destilada, seguidos de diversas lavagens com água do mar esterilizada. Após estes procedimentos de assepsia, os talos foram seccionados em fragmentos de 5 mm (denominados de explantes) na região intercalar e inoculados nos meios de cultura. Para todos os tratamentos foram utilizados seis explantes por unidade amostral em três repetições (n=3).

### 2) Condições gerais de cultura

Os meios de cultura utilizados durante todo o período experimental eram compostos de água do mar esterilizada enriquecida com VS50. Os tratamentos consistiram na adição ao meio de cultura dos bloqueadores das fibras do fuso colchicina (Ch – Sigma) e orizalina (Oz - Sigma) e os fitorreguladores ácido indolil acético (IAA – Sigma), cinetina (K - Sigma) e espermina (S - Sigma). A colchicina foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma) a 1%; a orizalina, o IAA e a cinetina foram diluídas em 1M de hidróxido de sódio (NaOH – Sigma) a 1% e em água destilada e a espermina foi dissolvida em água destilada. Todos os tratamentos foram administrados por duas semanas, com uma renovação na primeira semana, e após este período as unidades amostrais foram cultivadas em água do mar esterilizada enriquecida com VS50. Durante todo o período experimental, as unidades amostrais foram mantidas nas seguintes condições de cultura: salinidade de 35

ups, temperatura de 25°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), fotoperíodo de 12h e com aeração constante.

3) Efeitos de diferentes concentrações de colchicina e orizalina na regeneração direta

Explantos do tetrasporófito marrom foram cultivados por 2 semanas em irradiância de 40 ( $\pm 10$ )  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , nos seguintes tratamentos:

- a) controle sem adi\u00e7\u00e3o de colchicina e orizalina (C)
- b) colchicina 0,1  $\text{mg L}^{-1}$  (Ch0,1)
- c) colchicina 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  (Ch0,5)
- d) colchicina 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  (Ch1,0)
- e) orizalina 0,1  $\text{mg L}^{-1}$  (Oz0,1)
- f) orizalina 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  (Oz0,5)
- g) orizalina 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  (Oz1,0)

Ap\u00f3s esse per\u00edodo, os explantes foram mantidos em \u00e1gua do mar esterilizada enriquecida com VS50 por 12 semanas. As renova\u00e7\u00f5es dos meios de cultura foram feitas semanalmente.

4) Efeitos de combina\u00e7\u00f5es de fitorreguladores e orizalina na regenera\u00e7\u00e3o direta

Explantos do tetraspor\u00f3fito marrom foram cultivados por 2 semanas em irradi\u00e2ncia de 15 ( $\pm 5$ )  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , nos seguintes tratamentos:

- a) controle sem adi\u00e7\u00e3o de fitorreguladores e de orizalina (C)
- b) controle com orizalina e sem adi\u00e7\u00e3o de fitorreguladores (Oz)
- c) IAA 0,1  $\text{mg L}^{-1}$  e orizalina 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  (IAA0,1)
- d) IAA 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  e orizalina 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  (IAA1,0)
- e) cinetina 0,1  $\text{mg L}^{-1}$  e orizalina 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  (K0,1)
- f) cinetina 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  e orizalina 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  (K1,0)
- g) espermina 0,018  $\text{mg L}^{-1}$  e orizalina 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  (S)
- h) IAA 0,1  $\text{mg L}^{-1}$ , cinetina 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  e orizalina 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  (IAA0,1:K1,0)
- i) IAA 1,0  $\text{mg L}^{-1}$ , cinetina 0,1  $\text{mg L}^{-1}$  e orizalina 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  (IAA1,0:K0,1)
- j) IAA 1,0  $\text{mg L}^{-1}$ , espermina 0,018  $\text{mg L}^{-1}$  e orizalina 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  (IAA:S)
- k) cinetina 1,0  $\text{mg L}^{-1}$ , espermina 0,018  $\text{mg L}^{-1}$  e orizalina 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  (K:S)
- l) IAA 1,0  $\text{mg L}^{-1}$ , cinetina 1,0  $\text{mg L}^{-1}$ , espermina 0,018  $\text{mg L}^{-1}$  e orizalina 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  (IAA:K:S)

Após esse período, os explantes foram mantidos em água do mar esterilizada enriquecida com VS50 por 9 semanas. Nas primeiras 5 semanas, a irradiância foi mantida em  $15 (\pm 5) \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sendo alterada para  $50 (\pm 10) \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  nas 4 últimas semanas. As renovações dos meios de cultura foram feitas semanalmente.

## 5. Análise de dados e estatística

As medições foram feitas semanalmente durante as renovações dos meios de cultura. As contagens dos eixos eretos foram feitas a partir da primeira semana até que os explantes não apresentassem novas regenerações, o que ocorreu na oitava semana para o primeiro experimento e na sétima semana para o segundo. Após este período, a pesagem da biomassa passou a ser realizada. As contagens das regenerações diretas foram feitas a olho nu ou com auxílio de estereomicroscópio (Tecnival), e a pesagem da biomassa com balança analítica com quatro casas decimais (Denver Instrument). A taxa de crescimento foi calculada segundo a fórmula:  $TC = [(B_0/B_1)^{1/t} - 1] \cdot 100$ , onde  $B_0$ : biomassa inicial,  $B_1$ : biomassa final e  $t$ : tempo (Lignell & Pedersen 1989). Os valores foram expressos em média com intervalo de confiança, considerando a significância de  $p < 0,05$ . A análise estatística das taxas de sobrevivência, formação de eixos eretos e crescimento foram feitas pela Análise de Variância (ANOVA) Unifatorial e teste *a posteriori* de Fisher para indicar a diferença entre os tratamentos. Toda a análise estatística foi feita com o auxílio do programa Statistica (versão 7.0)



### 3. Resultados

1) Efeitos de diferentes concentrações de colchicina e orizalina na regeneração direta

Todos os tratamentos apresentaram talos regenerados a partir do explante (Fig. 1). Durante o período de tratamento, todas as concentrações de colchicina, Oz0,1 e o grupo controle apresentaram regeneração dos talos após a 1ª semana. Os tratamentos com Oz0,5 e Oz1,0, apresentaram regenerações após a 2ª semana e 3ª semana, respectivamente. Após a 8ª semana de cultivo, não foram observadas novas regenerações (Fig. 2).

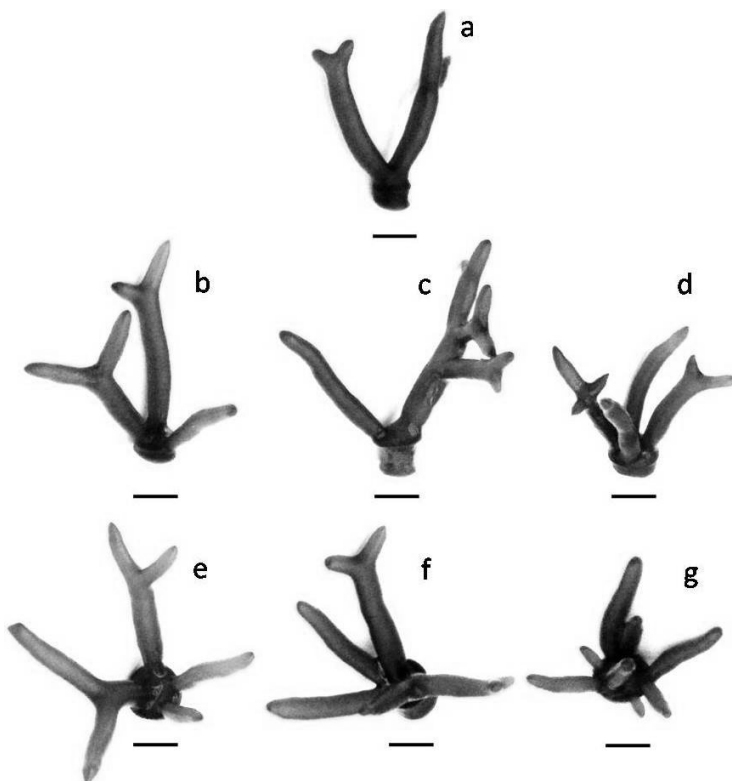


Figura 1 – Explantes de *Kappaphycus alvarezii* após 70 dias de cultura. a) Controle; b) Colchicina 0,1 mg L<sup>-1</sup>; c) Colchicina 0,5 mg L<sup>-1</sup>; d) Colchicina 1,0 mg L<sup>-1</sup>; e) Orizalina 0,1 mg L<sup>-1</sup>; f) Orizalina 0,5 mg L<sup>-1</sup> e g) Orizalina 1,0 mg L<sup>-1</sup>. Escala 0,5 cm.

Em relação à formação de eixos eretos (Fig. 2), não foram observadas diferenças significativas entre o grupo controle, os tratamentos com colchicina e os tratamentos com Oz0,1 e Oz0,5. Já o tratamento com Oz1,0 apresentou diferenças significativas em relação a todos os tratamentos e o controle, apresentando uma maior formação de eixos eretos.

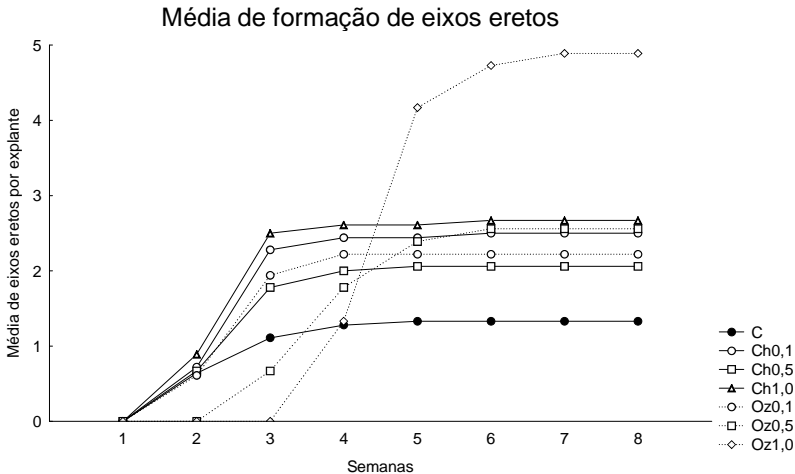


Figura 2 - Média de formação de eixos eretos por explante de *Kappaphycus alvarezii* tratados com colchicina e orizalina em concentrações de 0,1, 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>. Período compreendido entre 1<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semana, considerando 2 semanas de tratamento e 6 semanas de cultura. Valores apresentados em média de eixos eretos formados por explante e três repetições (n=3).

A taxa de sobrevivência (Tab. 1) foi alta em todos os tratamentos e não apresentou diferenças significativas entre eles. Somente na primeira semana de tratamento, foi observada a perda de dois explantes dentre seis de uma repetição do tratamento C e de um explante dentre seis de uma repetição do grupo tratado Oz0,5.

Tabela 1 - Taxa de sobrevivência de explantes tratados com colchicina e orizalina por 2 semanas. Período compreendido entre 1ª e 8ª semana. Valores apresentados como média (n=3)  $\pm$  intervalo de confiança (p<0,05).

Tratamentos	Sobrevivência (%)
C	88,89 $\pm$ 0,22
Ch0,1	100
Ch0,5	100
Ch1,0	100
Oz0,1	100
Oz0,5	94,44 $\pm$ 0,11
Oz1,0	100

A taxa de crescimento (Fig. 3) para o período compreendido entre a 8ª e a 14ª semana apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, sendo que Oz1,0 obteve a maior taxa de crescimento ( $4,31 \pm 0,63\%$  dia<sup>-1</sup>), diferindo de todos os outros tratamentos. A menor taxa de crescimento observada foi em Ch1,0 ( $2,73 \pm 0,92\%$  dia<sup>-1</sup>) que apresentou diferença significativa dos tratamentos Oz0,5 e Oz1,0. Os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas.

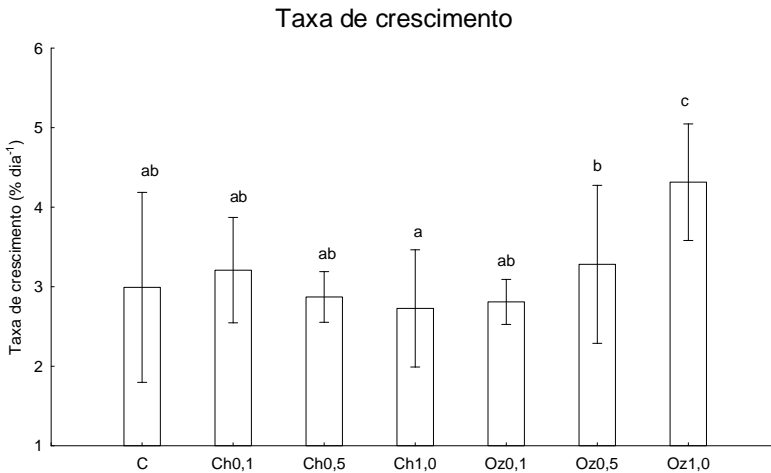


Figura 3 - Taxa de crescimento de eixos eretos produzidos por explantes tratados com colchicina e orizalina por 2 semanas. Período compreendido entre 8<sup>a</sup> ao 14<sup>a</sup> semana de cultura. Valores apresentados como média (n=3); as barras representam o intervalo de confiança ( $p < 0,05$ ) e as letras representam as diferenças significativas entre os tratamentos.

## 2) Efeitos de combinações de fitoreguladores e orizalina na regeneração direta

Assim como nos resultados anteriores, todos os tratamentos apresentaram talos regenerados a partir do explantes. Dois tipos de regeneração foram observados: formação de eixos eretos provenientes da região do corte (denominados de regenerações apicais) e da região perpendicular a região do corte (denominados de regenerações laterais) (Fig. 4).



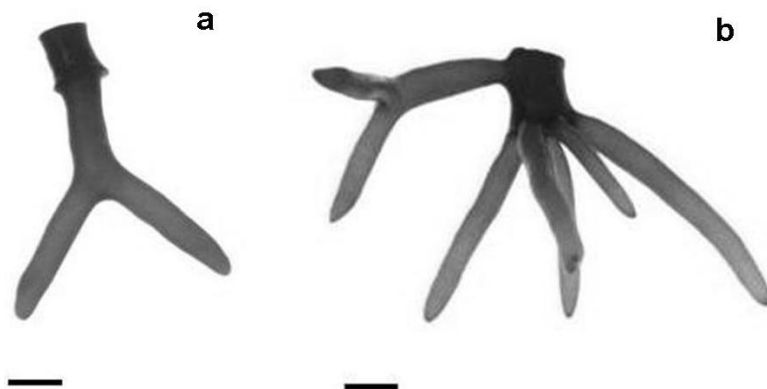


Figura 4 – Explantes de *Kappaphycus alvarezii* com 70 dias de cultura apresentando regenerações apicais e laterais. a) Controle; b) tratamento com IAA 1,0 mg L<sup>-1</sup> e orizalina 1,0 mg L<sup>-1</sup> (IAA1,0). Escala: 0,5 cm.

Foram observadas regenerações apicais primeiramente nos tratamentos C ( $1 \pm 0$  eixos eretos por explante), K0,1 ( $0,06 \pm 0,11$  eixos eretos por explante) e IAA:K:S ( $0,11 \pm 0,22$  eixos eretos por explante), após a primeira semana (média±intervalo de confiança) (Fig. 5) Os demais tratamentos só apresentaram regenerações apicais nas semanas seguintes, sendo que explantes cultivados no tratamento Oz só começaram a formar eixos eretos após a terceira semana.

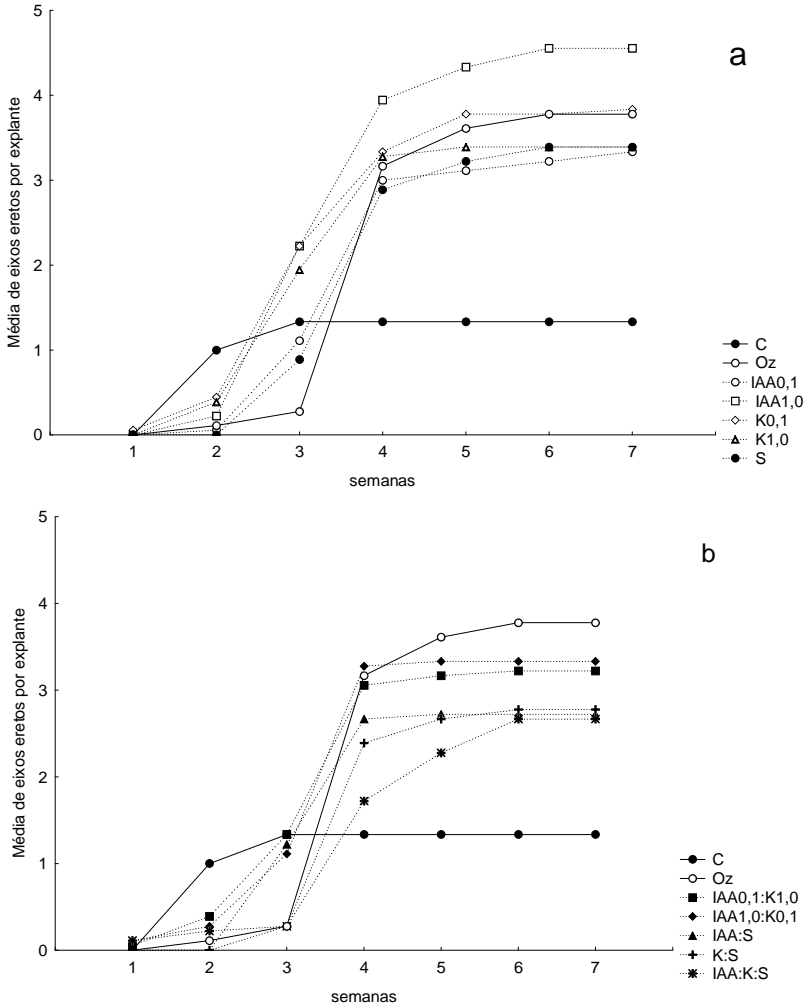


Figura 5 – Média de formação de eixos eretos por explantes de *Kappaphycus alvarezii* tratados com orizalina e fitorreguladores. Período compreendido entre 1ª e 7ª semana, considerando 2 semanas de tratamento e 5 semanas de cultura. a) tratamentos com fitorreguladores isolados e tratamentos controles; b) tratamentos com combinações de fitorreguladores e tratamentos controles. Valores apresentados em média de eixos eretos por explante em três repetições (n=3).

As regenerações laterais foram observadas em todos os tratamentos após a primeira semana, exceto o tratamento controle que não apresentou este tipo de regeneração durante todo o período experimental. O tratamento IAA1,0 apresentou a maior formação de eixos eretos laterais, com valor médio de  $1,61 \pm 1,91$  eixos eretos por explante. Somando as regenerações laterais e apicais, foram obtidos valores médios entre  $1,33 \pm 0,41$  e  $4,43 \pm 0,63$  eixos eretos por explante respectivamente para os tratamentos controle e IAA1,0 (Tab. 2).

Todos os explantes tratados com orizalina e fitorreguladores apresentaram maior quantidade de eixos eretos formados por explante em relação ao controle e os tratamentos com apenas orizalina e fitorreguladores isolados (IAA 1,0; K0,1 e K1,0) apresentaram formação de eixos eretos significativamente maior em relação aos demais tratamentos. Após sete semanas de cultura os explantes não apresentaram novas regenerações laterais ou apicais.

Tabela 2 - Média de eixos eretos apicais, laterais e totais formados por explante tratados com 12 combinações de fitorreguladores (IAA, cinetina e espermina) e orizalina. Os valores estão expressos em média  $\pm$  intervalo de confiança para  $p < 0,05$  e as letras representam as diferenças significativas entre os tratamentos.

	Apicais	Laterais	Totais
C	$1,33 \pm 0,41^D$	$0^A$	$1,33 \pm 0,41^D$
Oz	$3,50 \pm 1,90^{AC}$	$0,28 \pm 0,48^{AD}$	$3,78 \pm 2,28^{AB}$
IAA0,1	$3,28 \pm 0,24^{AC}$	$0,06 \pm 0,24^A$	$3,33 \pm 0^{AC}$
IAA1,0	$2,94 \pm 2,43^{ABC}$	$1,61 \pm 1,91^B$	$4,56 \pm 0,63^B$
K0,1	$2,67 \pm 2,59^{ABC}$	$1,17 \pm 0,83^{BCD}$	$3,82 \pm 2,52^{AB}$
K1,0	$2,72 \pm 1,33^{ABC}$	$0,67 \pm 0,41^{ACD}$	$3,39 \pm 0,96^{AC}$
S	$3,28 \pm 2,94^{AC}$	$0,11 \pm 0,48^{AD}$	$3,39 \pm 2,50^{AC}$
IAA0,1:K1,0	$2,28 \pm 0,86^{ABD}$	$0,94 \pm 1,87^C$	$3,22 \pm 1,04^{AC}$
IAA1,0:K0,1	$2,61 \pm 0,63^{ABC}$	$0,72 \pm 1,26^{CD}$	$3,33 \pm 1,90^{AC}$
IAA:S	$2,61 \pm 1,72^{ABC}$	$0,11 \pm 0,48^{AD}$	$2,72 \pm 1,26^C$
K:S	$2,72 \pm 1,45^{ABC}$	$0,06 \pm 0,24^A$	$2,78 \pm 1,45^{AC}$
IAA:K:S	$2,06 \pm 0,24^{BD}$	$0,61 \pm 0,48^{ACD}$	$2,67 \pm 0,41^{AC}$

Com relação às taxas de crescimento, o tratamento C apresentou o menor valor ( $3,59 \pm 0,22\%$  dia<sup>-1</sup>), diferindo significativamente de todos os outros tratamentos. Os tratamentos com S e todos que utilizaram fitorreguladores em combinação, apresentaram taxas de crescimento significativamente maiores que os demais (variando entre  $4,72 \pm 0,84$  a  $5,02 \pm 0,56\%$  dia<sup>-1</sup>) (Figura 6)

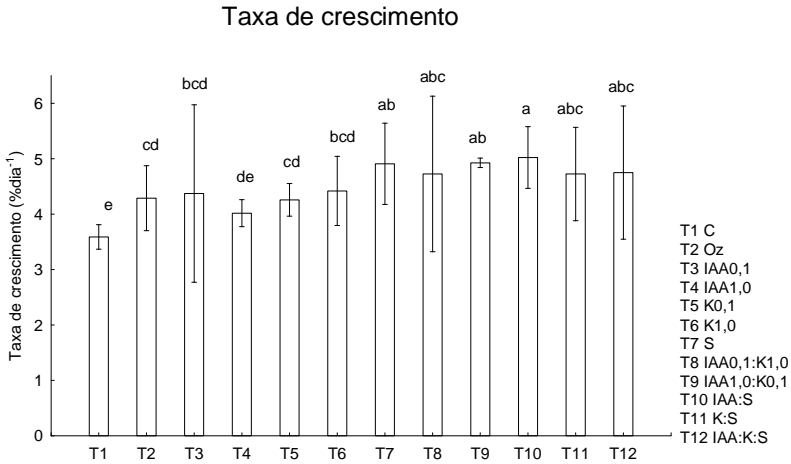


Figura 6 - Taxa de crescimento de eixos eretos formados por explantes tratados com orizalina e fitorreguladores por 2 semanas. Período compreendido entre 7<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> semana. Valores apresentados como médias (n=3); as barras representam o intervalo de confiança ( $p < 0,05\%$ ).

#### 4. Discussão

O processo de regeneração direta em *Kappaphycus alvarezii* é apresentado em diversos estudos anteriores (Azanza-Corrales & Dawes, 1989; Dawes & Koch, 1991, Munõz *et al.* 2006; Hayashi *et al.* 2008, Hurtado & Yunque 2009). Nesses trabalhos, foram relatados apenas a formação de eixos eretos apicais. Não foram observadas ou relatadas regenerações provenientes de regiões laterais ou na região de secção oposta à apical.

No presente trabalho, a taxa de sobrevivência foi alta (<88%) em explantes tratados com bloqueadores de fibras do fuso, e não houve diferenças significativas entre os tratamentos, o que mostra que estas substâncias não interferiram na viabilidade dos explantes para as concentrações utilizadas.

Os efeitos de diversas substâncias sobre a formação de eixos eretos são descritos para a espécie. Trabalhando com diferentes concentrações de AMPEP (Acadian Marine Plant Extract Powder) em combinação com fitorreguladores, Yunque *et al.* (2011) observaram a iniciação de regenerações entre 17 e 49 dias, e Dawes *et al.* (1993) relataram que o processo se iniciou em 4 a 6 semanas para *K. alvarezii* e *Euclima denticulatum* (N.L.Burman) F.S. Collins & Hervey tratadas com fitorreguladores, extratos comerciais de algas (AMPEP e Algafer) e extrato de água de coco e extrato de solo.

Neste trabalho foi observado que concentrações mais altas de orizalina inibiram o processo de regeneração, que foi observada após o período de tratamento, a partir da segunda semana para Oz0,5 e terceira para Oz1,0. Os demais tratamentos apresentaram a formação de eixos eretos após a primeira semana. Em plantas, a inibição do processo de regeneração é explicado pela análise da organização das organelas. Wacker (1987) em estudo sobre a influência do herbicida orizalina no citoesqueleto e crescimento de protonemas de *Funaria hygrometrica* Hedw (Funariaceae, Bryophyta) observaram alterações no arranjo dos plastídeos após a aplicação de orizalina, sendo este o primeiro sinal da enibição, e consequentemente a taxa de crescimento reduziu, no entanto as células continuaram a crescer. A recuperação completa, a redistribuição e orientação longitudinal dos plastídeos tiveram início duas horas após a transferência para um novo meio de cultura, quando a taxa de crescimento aumentou após a remoção do inibidor.

Com relação à taxa de regeneração, Hayashi *et al.* (2008) relatam que a produção de eixos eretos foi significativamente maior para o grupo tratado com colchicina por 14 dias em relação ao controle. Esses

dados não foram corroborados no presente trabalho, onde os tratamentos com colchicina, apesar de apresentarem maior produção de eixos eretos, não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle e os tratamentos Oz0,1 e Oz0,5. Somente o tratamento com concentração mais elevada de orizalina (Oz1,0) apresentou diferenças significativas em relação aos demais tratamentos, com uma média de formação superior a 4 eixos eretos por explante. Hayashi *et al.* (2008) observaram que a formação de regenerações foi de aproximadamente 3 eixos eretos por explante para o tratamento com colchicina por 14 dias, enquanto no controle, a formação foi de aproximadamente 1 eixo ereto por explante.

Apesar dos trabalhos que apontam que a colchicina apresenta melhor eficácia na indução de poliplóides em relação à orizalina (Pickens *et al.* 2006), neste estudo não foram realizados testes que comprovem a formação de indivíduos poliplóides, assim como não foi perceptível qualquer alteração morfológica. Entretanto, o tratamento Oz1,0 apresentou maior taxa de crescimento em relação a todos os tratamentos.

Assim, foram realizados experimentos com explantes tratados com orizalina 1,0 mg L<sup>-1</sup> em combinação com fitorreguladores. Nesse caso, todos os tratamentos testados produziram eixos eretos a partir da região de secção e não foram observadas regenerações opostas à secção apical do explante, semelhante ao observado no experimento anterior, e sugerindo que a espécie apresenta polaridade no crescimento em sentido único. Entretanto foram observadas regenerações provenientes da região lateral do explante.

Tanto a orizalina quanto os fitorreguladores não influenciaram na viabilidade dos explantes e a taxa de sobrevivência foi de 100% para todos os tratamentos. Apesar de Muñoz *et al.* (2006) ressaltar que a taxa de sobrevivência para explantes submetidos aos protocolos de obtenção de cultura axênicas a partir da administração de antibióticos e antimicóticos, podem influenciar significativamente na sua viabilidade, isso não foi observado no presente trabalho.

A formação de eixos eretos foi observada após a primeira semana, sendo que no tratamento controle essas regenerações foram apicais. No tratamento com concentração mais alta de orizalina (Oz) a formação foi observada apenas após a terceira semana, seguindo o mesmo padrão observado no experimento anterior, e fortalecendo a hipótese de que esta substância atua no retardo da regeneração apical. Entretanto, nos demais tratamentos com orizalina em combinação com fitorreguladores, foram observados eixos eretos após a primeira semana

em K0,1 e IAA:K:S, e na segunda semana nos demais tratamentos. Estes dados sugerem que os fitorreguladores atuaram estimulando o processo de regeneração.

Com exceção do controle, todos os tratamentos apresentaram regenerações laterais, observadas a partir da segunda semana para os tratamentos com espermina e primeira semana para os demais tratamentos. Mesmo o tratamento com orizalina sem fitorreguladores, apesar da baixa frequência, apresentou eixos eretos provenientes de regiões laterais, fato este não foi observado no primeiro experimento. Collantes *et al.* (2004) relataram que explantes de *Gracilaria chilensis* Bird, McLachlan and Oliveira produziram apenas regenerações diretas em um dos planos de secção além de regenerações laterais. Os autores citam que este padrão de regeneração é comum em macroalgas vermelhas. Yokoya & Handro (1996) constataram que as auxinas IAA e ácido 2,4-diclorofenoxilacético (2,4-D) inibiram a produção de regenerações laterais, enquanto que a citocinina BAP promoveu este tipo de regeneração em *Grateloupia dichotoma* J. Agardth. Estes dados não foram corroborados neste trabalho, quando o IAA estimulou a produção de regenerações laterais.

Explantes tratados com orizalina e os fitorreguladores IAA1,0; K0,1 e K1,0 apresentaram formação de eixos eretos significativamente maior em relação aos demais tratamentos, indicando que esses tratamentos seriam os mais eficazes para a produção de grande quantidade de indivíduos em curto espaço de tempo.

Com relação à taxa de crescimento, todos os tratamentos com orizalina, com exceção de IAA1,0, apresentaram diferenças significativas em relação ao controle, sendo que aqueles com espermina e em combinação com os fitorreguladores apresentaram as maiores taxas de crescimento.

A maior taxa de crescimento foi observada em IAA:S, com valor médio de 5,02% dia<sup>-1</sup>, enquanto que Paula *et al.* (2001), obtiveram valores médios aproximados de 3% dia<sup>-1</sup> para a espécie, quando cultivada *in vitro* com VS50 continuamente, as mesmas condições adotadas neste estudo. Muñoz *et al.* (2006) observaram que a espermina em combinação com outros fitorreguladores acelerou o processo de formação do calo. Neste trabalho não foi analisado este processo, entretanto este fitorregulador apesar de não acelerar o processo de regeneração direta, promoveu a taxa de crescimento. Além deste citado não foram observados outros estudos que apresentem o desempenho da espermina em *K. alvarezii*, assim como estudos com orizalina não são relatados para espécies algáceas.

O presente estudo contribuiu para o conhecimento dos efeitos de fitorreguladores e substâncias bloqueadoras das fibras do fuso sobre o processo de micropropagação através da regeneração direta em *Kappaphycus alvarezii*. Pela primeira vez foi utilizada a orizalina em macroalgas e espermina administrada via meio de cultura líquido, contribuindo com os estudos em micropropagação. Os resultados indicam que a orizalina sozinha ou combinada com fitorreguladores IAA ou K podem estimular a maior produção de eixos eretos por explante, garantindo maior número de microproágulos. Por outro lado, a orizalina em combinação com a espermina ou com outros fitorreguladores (IAA e K; IAA e S; K e S; IAA, K e S) podem promover um aumento de biomassa. Ambos os casos são importantes alternativas para aumentar a produtividade da macroalga *K. alvarezii*, sem afetar na taxa de sobrevivência dos explantes.



## 5. Referências Bibliográficas

- Ask E.I., Azanza R.V. 2002. R. Advances in cultivation technology of commercial euclidean species: a review with suggestions for future research. *Aquaculture* 206:257-277.
- Aveal K., Ferrario M.E., Oliveira E.C., Sar E. 1995. Manual e métodos ficológicos. Ediciones da Universidade de Concepción. 863p.
- Azanza-Corrales R., Dawes C. 1989. Wound healing in cultured *Euclidean alvarezii* var. *tambalang* Doty. *Bot. Mar.* 32: 229-234.
- Collantes G., Melo C., Candia A. 2004. Micropropagation by explants of *Gracilaria chilensis* Bird, McLachlan and Oliveira. *J. Appl. Phycol.* 16: 203-213.
- Dawes C.J., Koch E.W. 1991. Branch, micropropagule and tissue culture of the red algae *Euclidean denticulatum* and *Kappaphycus alvarezii* farmed in the Philippines. *J. Appl. Phycol.* 3: 247-257.
- Dawes C.J., Trono Jr G.C., Lluisma A.O. 1993 Clonal propagation of *Euclidean denticulatum* and *Kappaphycus alvarezii* for Philippine seaweed farms. *Hydrobiologia.* 260/261: 379-383.
- Hayashi L., Yokoya N.S., Kikuchi D.M., Oliveira E.C. 2008. Callus induction and micropropagation improved by colchicine and phyto regulators in *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae). *J. Appl. Phycol.* 20:653-659.
- Hurtado A.Q. Yunque D.A. 2009. Use of acadian marine plant extract powder from *Ascophyllum nodosum* in tissue culture of *Kappaphycus* varieties. *J. Appl. Phycol.* 21: 633-639.
- Ivanovskii Y.A., Kulepanov V.N. 2008. Initiation of gametophytic callus and somatic embryogenesis in *Laminaria japonica* (Phaeophyta) exposed to mutagenic agents. *Russ. J. Mar. Biol.* 34: 325-328.
- Karp A. 1995. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica.* 85: 295-302.
- Lignell A., Pedersén M. 1989. Agar composition as function of morphology and growth rate. Studies on some morphological strains of *Gracilaria secundata* and *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta). *Bot. Mar.* 32: 219-227.

Marián F.R., García-Jiménez P., Robaina R.R. 2000. Polyamines in marine macroalgae, levels of putrescine, spermidine and spermine in thalli and changes in their concentration during glycerol-induced cell growth *in vitro*. *Physiol. Plant.* 110:530-4.

Muñoz J., Cahue-López A. C., Patiño R., Robledo D. 2006. Use of plant growth regulators in micropropagation of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) in airlift bioreactors. *J. Appl. Phycol.* 18:209-218.

Paula E.J., Erbert C., Pereira R.T.L. 2001. Growth rate of carragenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rodophyta, Gigartinales) *in vitro*. *Phycol. Res.* 49: 155-161.

Paula E.J., Pereira R.T.L., Ohno M. 1999. Strain selection in *Kappaphycus alvarezii* var. *alvarezii* (Soleriaceae, Rodophyta) using tetraspore progeny. *J. Appl. Phycol.* 11:111-121.

Pickens K., Cheng Z. M., Kania S. 2006. Effects of colchicine and oryzalin on callus and adventitious shoot formation of *Euphorbia pulcherrima* 'winter rose'. *HortScience.* 41: 1651-1655.

Stirk W.A., Novák O., Strnad M., van Staden J. 2003. Cytokinins in macroalgae. *Plant Growth Regul.* 41: 13-24.

Tarakhovskaya E.R., Maslov Y.I., Shishova M.F. 2007. Phytohormones in algae. *Russ. J. Plant Physl.* 54: 163-170.

Titlyanov E.A., Titlyanova T.V. 2010. Seaweed cultivation: Methods and Problems. *Russ. J. Mar. Biol.* 36: 227-242.

Yokoya N.S. 2000. Apical callus formation and plant regeneration controlled by plant growth regulators on axenic culture of the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycol. Res.* 48: 132-142.

Yokoya N.S., Stirk W.A., van Staden J., Novák O., Turecková V., Pěňčík A., Strnad M. 2010. Endogenous cytokinins, auxins, and abscisic acid in red algae from Brazil. *J. Phycol.* 46: 1198-1205.

Yokoya N.S., Handro W. 1996. Effects of auxins and cytokinins on tissue culture of *Grateloupia dichotoma* (Gigartinales, Rodophyta). *Hydrobiologia.* 326/327: 393-400.

Yunque D. A.T., Tibubos K.R., Hurtado A.Q., Critchley A.T. 2011. Optimization of culture conditions for tissue culture production of young plantlets of carrageenophyte *Kappaphycus*. *J. Appl. Phycol.* 23: 433-438.

## Capítulo IV

---

### Discussão Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral analisar o potencial de micropropagação de *Kappaphycus alvarezii* a partir dos processos de regeneração direta e indireta, utilizando inibidores da formação de fibras do fuso e fitorreguladores.

Para tanto, inicialmente, o calo formado pela espécie foi analisado através da microscopia confocal de fluorescência, uma vez que foi observado na literatura que calos de vertais vasculares apresentam diversos níveis de ploidia decorrente do processo de dediferenciação (Ogura 1990, Kumar & Mathur 2004). Grande variação de intensidade de fluorescência foi observada nas células indiferenciadas do calo, o que pode sugerir que os núcleos apresentem diferentes níveis de ploidia. Esta variação foi maior em calos com 30 dias de cultura quando comparados com calos de 60 dias, gerando a hipótese de que a ploidia esteja entrando em estabilização com o processo de diferenciação celular. Estas informações são de grande importância para o aumento da variabilidade genética da espécie e encorajaram o estudo seguinte que teve como objetivo o melhoramento do processo de regeneração indireta (Reddy *et al.*, Hayashi *et al.* 2008).

Diversos estudos foram realizados antes do presente trabalho, com objetivo de obter micropropágulos de *K.alvarezii* via regeneração indireta. Desta forma, vários fatores que promove este processo foram testados, como uso de fitorreguladores, aplicação de glicerol e outras fontes de carbono, agitação mecânica e alteração do estado físico do meio de cultura (Reddy *et.al* 2003, Muñoz *et al.*2006, Hurtado & Bitter 2007, Hayashi *et. al* 2008, Hurtado *et. al* 2008). No presente trabalho, os efeitos de bloqueadores das fibras do fuso e de fitorreguladores foram analisados, associados à agitação mecânica e mudança do estado físico do meio de cultura. Apesar dos tratamentos não terem interferido na taxa de sobrevivência dos explantes com calos, não induziram a regeneração indireta, corroborando com os dados apresentados pela literatura que demonstram a baixa ocorrência deste processo.

Apesar da regeneração indireta não ter ocorrido, todos os tratamentos apresentaram eixos eretos formados a partir do explante,

indicando que a regeneração direta é o processo mais promissor para a propagação da espécie.

Devido a este fato, outro estudo foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos dos bloqueadores das fibras do fuso sobre a regeneração direta. Foram testadas três concentrações de colchicina e três concentrações de orizalina e foram avaliadas as taxas de sobrevivência, formação de eixos eretos e de crescimento.

Os tratamentos com colchicina e orizalina não interferiram na taxa de sobrevivência e de modo geral induziram a formação de eixos eretos. A orizalina aumentou consideravelmente a formação de eixos eretos em concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , assim como também promoveu o aumento significativo da taxa de crescimento em relação aos outros tratamentos. Estudos com a utilização de orizalina em espécies de macroalgas não foram observados.

Partindo do melhor resultado obtido no experimento anterior, novo experimento foi realizado associando este resultado (orizalina  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) com diferentes combinações de fitorreguladores. No controle com orizalina sem fitorreguladores, o mesmo retardo do experimento anterior foi observado e a formação de eixos eretos se iniciou após a terceira semana. Porém, os tratamentos com a orizalina quando em combinação com fitorreguladores IAA e cinetina (K), a formação de eixos eretos pode ser observada após a primeira ou segunda semana.

Com exceção do controle, todos os tratamentos apresentaram regenerações laterais, além das apicais, o que pode sugerir que os fitorreguladores atuem estimulando este processo. Ao verificar as regenerações totais, foi constatado que os explantes tratados com orizalina e os fitorreguladores IAA  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ; K  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  e K  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  apresentaram formação de eixos eretos significativamente maior em relação aos demais tratamentos.

Com relação à taxa de crescimento, todos os tratamentos com orizalina, com exceção de IAA a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , apresentaram diferenças significativas em relação ao controle, e aqueles com espermina e em combinação dos fitorreguladores apresentaram as maiores taxas de crescimento, sendo que o tratamento com IAA combinado com a espermina apresentou o maior valor ( $5,02\% \text{ dia}^{-1}$ ) e orizalina. O presente estudo apresenta pela primeira vez a análise da ploidia de células do calo, os efeitos da orizalina no processo de regeneração direta e indireta e os efeitos da espermina adicionada no meio de cultura líquido de *Kappaphycus alvarezii*, contribuindo com os estudos em micropropagação. Foi observado que células do calo podem apresentar diferentes níveis de ploidia e possuem potencial para produzir linhagens

poliplóides por meio da regeneração direta, porém este processo mostrou-se de difícil obtenção. Por outro lado, a regeneração direta ocorre com facilidade sem a necessidade de utilização de qualquer fator de promoção. Este processo foi aumentado significativamente com o uso de orizalina sozinha ou em combinação com fitorreguladores, principalmente IAA e K, estimulando a formação de eixos eretos por explante. Em contrapartida, a orizalina sozinha ou em combinação com fitorreguladores, principalmente a espermina promoveram o aumento considerável na taxa de fresimento. Ambos os casos são importantes alternativas para aumentar a produtividade da macroalga *K. alvarezii*.



## Referências Bibliográficas

- Hayashi L., Yokoya N.S., Kikuchi D.M., Oliveira E.C. 2008. Callus induction and micropropagation improved by colchicine and phytohormones in *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae). J. Appl. Phycol. 20:653-659.
- Hurtadoo A.Q., Bitter A.B. 2007. Plantlet regeneration of *Kappaphycus alvarezii* var adik-adik by tissue culture. J. Appl. Phycol. 19: 783-786.
- Hurtado A.Q., Yunque D.A., Tibubos K., Critchley A.T. 2008. Use of Acadian Marine extract powder from *Ascophyllum nodosum* in tissue culture of *Kappaphycus alvarezii*. J. Appl. Phycol. 21: 633-639
- Kumar P.S., Mathur V.L. 2004. Chromosomal instability in callus culture of *Pisum sativum*. Plant Cell Tiss. Org. 78: 267-271.
- Muñoz J., Cahue-López A.C., Patiño R., Robledo R. 2006. Use of plant growth regulators in micropropagation of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) in airlift bioreactors. J. Appl. Phycol. 18: 209-218.
- Ogura H. 1990. Chromosome variation in plant tissue culture. In: Bajaj Y.P.S. Somaclonal variation in crop improvement I. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Springer-Verlag. 11: 49-84.
- Reddy C.R.K., Kunar G.R.K, Siddhanta K., Tewari A. 2003. *In vitro* somatic embryogenesis and regeneration of somatic embryos from pigmented callus of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty (Rhodophyta, Gigartinales). J. Phycol. 39: 610-616.