

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELY CRISTINA NEGRELLI CORDEIRO

MICROALGA *Asterarcys quadricellulare* COMO BIOFERTILIZANTE EM
BATATA E CEBOLA: ALTERAÇÕES METABÓLICAS E PRODUTIVIDADE

CURITIBA

2022

ELY CRISTINA NEGRELLI CORDEIRO

MICROALGA *Asterarcys quadricellulare* COMO BIOFERTILIZANTE EM
BATATA E CEBOLA: ALTERAÇÕES METABÓLICAS E PRODUTIVIDADE

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Átila Francisco Mógor

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Cordeiro, Ely Cristina Negrelli

Microalga *Asterarcys quadricellulare* como biofertilizante em batata e cebola: alterações metabólicas e produtividade / Ely Cristina Negrelli Cordeiro. – Curitiba, 2022.

1 recurso online: PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal).

Orientador: Prof. Dr. Átila Francisco Mógor

1. Microalga. 2. Batata. 3. Cebola. 4. Adubos e fertilizantes. I. Mógor, Átila Francisco. II. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal). III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA
(PRODUÇÃO VEGETAL) - 40001016031P6

TERMO DE APROVAÇÃO

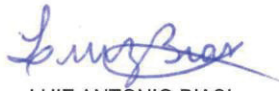
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ELY CRISTINA NEGRELLI CORDEIRO** intitulada: **MICROALGA *Asterarcys quadricellulare* COMO BIOFERTILIZANTE EM BATATA E CEBOLA: ALTERAÇÕES METABÓLICAS E PRODUTIVIDADE**, sob orientação do Prof. Dr. ÁTILA FRANCISCO MÓGOR, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 05 de Setembro de 2022.


ÁTILA FRANCISCO MÓGOR
Presidente da Banca Examinadora


JOÃO CARLOS BESPALHOK FILHO
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


MARILIA PEREIRA MACHADO
Avaliador Externo (SECRETARIA DE EDUCAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ)


LUIZ ANTONIO BIASI
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


LEANDRO FLAVIO CARNEIRO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ- DPTO
FITOTECNIA E FITOSSANITARISMO)

Ofereço a Deus, meu amigo, protetor e Salvador.

Dedico aos meus pais Erasmo e Lucia, ao meu irmão Eleon, a minha sobrinha Esther e ao meu noivo Rodrigo, por todo apoio que me dão em todas as situações da minha vida. Sem eles nada disso seria possível ou faria sentido.

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro e mais importante agradecimento é e sempre será a Deus, por me permitir ter a graça da Salvação por meio de seu filho Jesus Cristo, por me conduzir durante a caminhada e me fazer entender a cada dia que sem Ele e sua misericórdia eu nada sou.

Agradeço aos meus pais Erasmo e Lucia que são a minha base e meu exemplo desde sempre e para sempre. Sou grata por acreditarem tanto em mim e por me encorajarem a lutar pelos meus sonhos. O amor deles me move em todas as conquistas e a eles dedico todas as minhas vitórias, são a minha maior inspiração.

Ao meu irmão Eleon, um dos meus maiores incentivadores, sem ele não teria alcançado muitos dos meus sonhos. Sempre com a palavra certa, cheio de sabedoria e principalmente de amor.

A minha sobrinha Esther, que mesmo tão pequena já me ensina tanto com a sua intensidade e ao mesmo tempo com sua doçura.

Ao meu noivo Rodrigo, que foi um grato presente do Senhor na minha vida, que chegou quase no fim dessa jornada do doutorado mas que se fez tão importante nesse período. Seu amor e dedicação são um alento para o meu coração.

As minhas tias Iolanda e Irene que representam muito bem a minha família aqui em Curitiba, sempre com palavras acolhedoras, conselhos preciosos e ensinamentos tão sábios.

A todos os meus amigos, os de perto e os de longe que sempre me apoiaram, acreditaram em mim e me deram a mão seja nos bons momentos ou naqueles de dificuldade.

Aos meus irmãos na fé da Igreja Metodista Central de Curitiba por todo apoio nesse período, sem dúvidas evolui muito na minha caminhada cristã nesse tempo e isso consequentemente contribuiu para a minha maturidade profissional e como ser humano durante o doutorado.

Ao Professor Dr. Átila Francisco Mógor, meu orientador, que me ensinou tanto durante essa trajetória não apenas tecnicamente mas também sobre a vida e seu

percurso, seu exemplo de dedicação a profissão e como ser humano são uma inspiração para mim.

A Dra. Gilda Mógor por todo auxílio e ensinamentos transmitidos nas atividades laboratoriais, pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho, sempre tão assertiva e disposta a ensinar e principalmente pelo seu exemplo e sua amizade.

Aos meus amigos do Laboratório de Biofertilizantes Gabriel Bocchetti de Lara, Harielly Marianne Costa Marques e Juliana de Oliveira Amatussi por todo o apoio e ajuda nessa caminhada. Cada um deles tem um lugar especial no meu coração e marcou a minha vida a sua maneira.

A todos os professores da Pós-graduação em Produção Vegetal, da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade da obtenção deste título e pelos ensinamentos que contribuíram no aperfeiçoamento da minha formação profissional, em especial aos membros dessa banca Luiz Antonio Biasi e João Carlos Bessalho Filho.

Aos professores Leandro Flavio Carneiro e Marília Machado por aceitarem fazer parte dessa banca e pela sua contribuição para a melhoria desse trabalho.

Aos servidores da UFPR, em especial à Lucimara Antunes que esteve sempre disponível para sanar minhas dúvidas ou resolver qualquer situação que precisasse e também ao funcionário da área de Olericultura José por toda ajuda nos experimentos de campo.

A Capes pela concessão da bolsa de estudos durante todo o doutorado que me permitiu dedicação exclusiva a esse projeto.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a elaboração desse trabalho e na minha trajetória até aqui, minha eterna gratidão.

“Sabemos que todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito.” Bíblia Sagrada – Romanos 8:28

RESUMO

A ação das microalgas na agricultura tem ganho relevância, principalmente devido à identificação de substâncias que são sintetizadas por estes organismos, como aminoácidos, proteínas e fitohormônios, que aplicados em plantas podem promover crescimento e produtividade com ação biofertilizante. A microalga *Asterarcys quadricellulare* é fonte de L-aminoácidos livres como moléculas bioativas para produtos da classe dos biofertilizantes. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar o potencial bioativo da microalga *A. quadricellulare* (AQ) e sua ação no metabolismo, crescimento e produtividade em cebola e batata. Os experimentos foram instalados na área de Olericultura da Universidade Federal do Paraná. A biomassa de AQ (CCAP 294/1) foi obtida em sistema mixotrófico. As etapas da pesquisa são apresentadas em três capítulos. No primeiro capítulo investigou-se o uso da biomassa da microalga AQ em batata, adotando uma abordagem passo a passo, inicialmente com bioensaio usando as concentrações de 0,05; 0,15; 0,25 e 0,4 g L⁻¹ para identificar a bioatividade das microalgas. Posteriormente, usando a biomassa para pulverizações foliares no campo por duas safras para determinar os efeitos no crescimento, produtividade e variáveis bioquímicas. No bioensaio houve bioatividade com expansão de hipocótilo de tomate. Em campo ocorreram ganhos de produtividade nas duas safras e alterações bioquímicas que melhoraram a clorofila, aminoácidos, açúcar e atividade da enzima nitrato redutase. No segundo capítulo avaliou-se o efeito de AQ em cebola, verificando sua ação no metabolismo, crescimento e produtividade de duas cultivares (Alvará e Perfecta). Assim, foram realizados dois experimentos: (i) aplicações foliares em plantas cultivadas em vasos em casa de vegetação; (ii) aplicações foliares em plantas no campo. Os experimentos foram realizados utilizando soluções nas concentrações de 0,05; 0,15; 0,25 e 0,4 g L⁻¹ e variáveis biométricas, produtividade de bulbos e variáveis bioquímicas foram avaliadas. AQ promoveu o crescimento das plantas e aumentos no calibre e produtividade de bulbos nas duas cultivares. A biomassa de microalgas estimulou o metabolismo da planta pelo aumento nos teores de clorofila, carotenóides, aminoácidos e atividade da enzima nitrato redutase nas folhas, aminoácidos livres e teores de açúcares totais nos bulbos, destacando-se a concentração de 0,25 g L⁻¹. No terceiro capítulo, a biomassa de AQ foi utilizada verificando sua ação no metabolismo, produtividade e resposta metabólica com duas cultivares de cebola, duas concentrações de biomassa (0,15 e 0,25 g L⁻¹) e duas frequências de pulverização (semanal e quinzenal). Foram realizadas pulverizações foliares de AQ em campo, determinando efeitos no crescimento e produtividade nas plantas, assim como respostas bioquímicas nas folhas e bulbos e posteriormente avaliação metabólica de substâncias presentes nas folhas e bulbos. Nesse trabalho, AQ promoveu o crescimento das plantas e ganho de produtividade, desencadeando mudanças bioquímicas nos teores de aminoácidos, açúcares e na atividade da enzima nitrato redutase, assim como aumento no conteúdo de espermina em folhas, espermidina em bulbos, triptamina em folhas e bulbos, 5-hidroxitriptofano em bulbos e serotonina em bulbos. Esses achados demonstram que *A. quadricellulare* estimula o crescimento, a produtividade e a assimilação de nitrogênio das plantas, indicando que é uma fonte potencial de insumo sustentável para a produção de batata e cebola podendo seu efeito estar relacionado ao metabolismo dos aminoácidos, das poliaminas e das auxinas.

Palavras-chave: *Solanum tuberosum*. *Allium cepa* L. Chlorophyta. Sinalização. Bioatividade. Poliaminas.

ABSTRACT

The action of microalgae in agriculture has gained relevance, mainly due to the identification of substances that are synthesized by these organisms, such as amino acids, proteins and phytohormones, which when applied to plants can promote growth and productivity with biofertilizing action. The microalgae *Asterarcys quadricellulare* is a source of free L-amino acids as bioactive molecules for products in the biofertilizer class. Thus, the objective of this work was to study the bioactive potential of the microalgae *A. quadricellulare* (AQ) and its action on metabolism, growth and productivity in onion and potato. The experiments were installed in the Olericulture area of the Federal University of Paraná. The AQ biomass (CCAP 294/1) was obtained in a mixotrophic system. The research steps are presented in three chapters. In the first chapter, the use of AQ microalgae biomass in potatoes was investigated, adopting a step-by-step approach, initially with a bioassay using concentrations of 0.05; 0.15; 0.25 and 0.4 g L⁻¹ to identify microalgae bioactivity. Subsequently, using the biomass for foliar sprays in the field for two growing seasons to determine the effects on growth, productivity and biochemical variables. In the bioassay there was bioactivity with expansion of tomato hypocotyl. In the field there were gains in productivity in both harvests and biochemical changes that improved chlorophyll, amino acids, sugar and activity of the enzyme nitrate reductase. In the second chapter, the effect of AQ on onion was evaluated, verifying its action on the metabolism, growth and productivity of two cultivars (Alvará and Perfecta). Thus, two experiments were carried out: (i) foliar applications on plants grown in pots in a greenhouse; (ii) foliar applications on plants in the field. The experiments were carried out using solutions at concentrations of 0.05; 0.15; 0.25 and 0.4 g L⁻¹ and biometric variables, bulb yield and biochemical variables were evaluated. AQ promoted plant growth and increases in caliber and bulb yield in both cultivars. The microalgae biomass stimulated the plant's metabolism by increasing the levels of chlorophyll, carotenoids, amino acids and activity of the enzyme nitrate reductase in the leaves, free amino acids and total sugar levels in the bulbs, highlighting the concentration of 0.25 g L⁻¹. In the third chapter, AQ biomass was used to verify its action on metabolism, productivity and metabolomic response with two onion cultivars, two biomass concentrations (0.15 and 0.25 g L⁻¹) and two spraying frequencies (weekly and fortnightly). AQ foliar sprays were carried out in the field, determining effects on growth and productivity in plants, as well as biochemical responses in leaves and bulbs and later metabolomic evaluation of substances present in leaves and bulbs. In this work, AQ promoted plant growth and productivity gain, triggering biochemical changes in the levels of amino acids, sugars and in the activity of the enzyme nitrate reductase, as well as improvement in the content of spermine in leaves, spermidine in bulbs, tryptamine in leaves and bulbs, 5-hydroxytryptophan in bulbs and serotonin in bulbs. These findings demonstrate that *A. quadricellulare* stimulates plant growth, productivity and nitrogen assimilation, indicating that it is a potential source of sustainable input for potato and onion production, and its effect may be related to the metabolism of amino acids, polyamines and of auxins.

Keywords: *Solanum tuberosum*. *Allium cepa* L. Chlorophyta. Signaling. Bioactivity. Polyamines.

LISTA DE FIGURAS

3. CAPÍTULO 1 – MICROALGA BIOFERTILIZER IMPROVES POTATO GROWTH AND YIELD, STIMULATING AMINO ACID METABOLISM

FIGURA 1 – THE SUM OF THE LENGTH OF TOMATO (<i>Solanum lycopersicum</i>) HYPOCOTYLS BY <i>A. quadricellulare</i> CONCENTRATION TREATMENTS: CONTROL, 0.05 G L ⁻¹ (AQ5); 0.15 G L ⁻¹ (AQ15); 0.25 G L ⁻¹ (AQ25); AND 0.4 G L ⁻¹ (AQ40).....	37
FIGURA 2 – RELATIVE CHLOROPHYLL INDEX (A), TOTAL SOLUBLE SOLIDS CONTENT (B), FREE AMINO ACIDS IN LEAVES (C) AND FREE AMINO ACIDS IN TUBERS (D) OF ORGANICALLY GROWN POTATO (CULTIVAR CLARA) SUBMITTED TO FOLIAR SPRAYS WITH SUSPENSIONS OF THE MICROALGAE <i>A. quadricellulare</i> BIOMASS.....	38
FIGURA 3 – NUMBER OF TUBERS PER PLANT (A) AND AVERAGE YIELD (B) OF ORGANICALLY GROWN POTATO (CULTIVAR CLARA) SUBMITTED TO FOLIAR SPRAYS WITH SUSPENSIONS OF THE MICROALGAE <i>A. quadricellulare</i> BIOMASS	39
FIGURA 4 – CHLOROPHYLL A (A), CHLOROPHYLL B (B), TOTAL CHLOROPHYLL CONTENT (C), CAROTENOID CONTENT (D) OF ‘CLARA’ AND ‘CRISTAL’ POTATO CULTIVARS SUBMITTED TO FOLIAR SPRAYS WITH SUSPENSIONS OF THE MICROALGAE <i>A. quadricellulare</i> BIOMASS.....	41
FIGURA 5 – TOTAL SUGARS IN LEAVES (A), REDUCING SUGARS IN LEAVES (B), TOTAL SUGARS IN TUBERS (C) OF POTATO CULTIVARS ‘CLARA’ AND ‘CRISTAL’ SUBMITTED TO FOLIAR SPRAYS WITH SUSPENSIONS OF THE MICROALGAE <i>A. quadricellulare</i> BIOMASS	42
FIGURA 6 – FREE AMINO ACIDS IN LEAVES (A), FREE AMINO ACIDS IN TUBERS (B), ENZYME NITRATE REDUCTASE ACTIVITY (C) OF POTATO CULTIVARS ‘CRISTAL’ AND ‘CLARA’ SUBMITTED TO FOLIAR SPRAYS WITH SUSPENSIONS OF THE MICROALGAE <i>A. quadricellulare</i> BIOMASS.....	42

FIGURA 7 – NUMBER OF TUBERS PER PLANT (A) AND AVERAGE YIELD (B) OF POTATO CULTIVARS ‘CRISTAL’ AND ‘CLARA’ SUBMITTED TO FOLIAR SPRAYS OF SUSPENSIONS OF THE MICROALGAE <i>A. quadricellulare</i> BIOMASS.....	43
--	----

4. CAPÍTULO 2 - MICROALGA BIOFERTILIZER TRIGGERS METABOLIC CHANGES IMPROVING ONION GROWTH AND YIELD

FIGURA 1 – FRESH MASS OF THE LEAVES (A), LEAVES LENGHT (B), PSEUDOSTEM DIAMETER (C) OF ONION PLANTS OF THE ALVARÁ AND PERFECTA CULTIVARS AT 90 DAT (DAYS AFTER TRANSPLANTING) SUBMITTED TO FOLIAR SPRAYS OF BIOMASS SUSPENSIONS OF MICROALGAE <i>A. quadricellulare</i> AT DIFFERENT CONCENTRATIONS	56
FIGURA 2 – CHLOROPHYLL CONTENT (A), CAROTENOID CONTENT (B), FREE AMINO ACIDS (C) NITRATE REDUCTASE (D) IN LEAVES OF ONION CULTIVARS SUBMITTED TO FOLIAR APPLICATIONS OF BIOMASS SUSPENSIONS OF THE MICROALGAE <i>A. quadricellulare</i> AT DIFFERENT CONCENTRATIONS	57
FIGURA 3 – CLASSIFICATION OF CLASS III AND IV BULBS OF THE ALVARÁ ONION CULTIVAR (A), AVERAGE CLASSIFICATION OF CLASS III AND IV BULBS OF CULTIVAR PERFECTA (B), FRESH MASS OF BULBS OF THE ALVARÁ AND PERFECTA CULTIVARS (C) DRY MASS OF BULBS OF THE ALVARÁ AND PERFECTA CULTIVARS (D) SUBMITTED TO FOLIAR APPLICATIONS OF BIOMASS SUSPENSIONS OF THE MICROALGAE <i>A. quadricellulare</i> AT DIFFERENT CONCENTRATIONS.....	58
FIGURA 4 – YIELD OF ALVARÁ AND PERFECTA ONION CULTIVARS SUBMITTED TO FOLIAR APPLICATIONS OF <i>A. quadricellulare</i> MICROALGAE BIOMASS SUSPENSIONS AT DIFFERENT CONCENTRATIONS	59
FIGURA 5 – FREE AMINO ACIDS IN LEAVES (A), TOTAL SUGARS IN LEAVES (B), ENZYME NITRATE REDUCTASE ACTIVITY IN LEAVES (C), FREE AMINO ACIDS IN BULBS (D) TOTAL SUGARS IN BULBS (E)	

IN ONION CULTIVARS AT 135 DAT SUBMITTED TO FOLIAR APPLICATIONS OF BIOMASS SUSPENSIONS OF THE MICROALGAE <i>A. quadricellulare</i> AT DIFFERENT CONCENTRATIONS	60
---	----

5. CAPÍTULO 3 – MICROALGA *Asterarcys quadricellulare* ESTIMULA METABOLISMO DE AMINAS BIOATIVAS COM AUMENTO DE PRODUTIVIDADE EM CEBOLA

FIGURA 1 – MASSA FRESCA DE FOLHAS (A), MASSA SECA DE FOLHAS (B), MASSA FRESCA DO PSEUDOCAULE (C), MASSA SECA DO PSEUDOCAULE (D), MASSA FRESCA DE BULBOS (E) E MASSA FRESCA DE BULBOS (F) DE CEBOLA CULTIVADAS ORGANICAMENTE (CULTIVARES ALVARÁ E PERFECTA) SUBMETIDAS A APLICAÇÕES FOLIARES NA DOSE DE 1 ML.L ⁻¹ DE SUSPENSÕES DA BIOMASSA DA MICROALGA <i>A. quadricellulare</i> COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	74
FIGURA 2 – COMPRIMENTO DO PSEUDOCAULE (A), DIÂMETRO DO PSEUDOCAULE (B), VOLUME DO PSEUDOCAULE (C) E DIÂMETRO DE BULBOS (D) DE CEBOLA CULTIVADAS ORGANICAMENTE (CULTIVARES ALVARÁ E PERFECTA) SUBMETIDAS A APLICAÇÕES FOLIARES NA DOSE DE 1 ML.L ⁻¹ DE SUSPENSÕES DA BIOMASSA DA MICROALGA <i>A. quadricellulare</i> COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	75
FIGURA 3 – NÚMERO DE FOLHAS (A), COMPRIMENTO DE FOLHAS (B) E ÁREA FOLIAR (C) DE CEBOLA CULTIVADAS ORGANICAMENTE (CULTIVARES ALVARÁ E PERFECTA) SUBMETIDAS A APLICAÇÕES FOLIARES NA DOSE DE 1 ML.L ⁻¹ DE SUSPENSÕES DA BIOMASSA DA MICROALGA <i>A. quadricellulare</i> COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	76
FIGURA 4 – AÇÚCARES TOTAIS NAS FOLHAS (A), AÇÚCARES REDUTORES NAS FOLHAS (B), L-AMINOÁCIDOS NAS FOLHAS (C), L-AMINOÁCIDOS NOS BULBOS (D) E ATIVIDADE DA ENZIMA NITRATO REDUTASE (E) DE CEBOLA CULTIVADAS ORGANICAMENTE (CULTIVARES ALVARÁ E PERFECTA)	

	SUBMETIDAS A APLICAÇÕES FOLIARES NA DOSE DE 1 ML.L ⁻¹ DE SUSPENSÕES DA BIOMASSA DA MICROALGA <i>A. quadricellulare</i> COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	77
FIGURA 5	– PRODUTIVIDADE MÉDIA DE CEBOLA CULTIVADAS ORGANICAMENTE (CULTIVARES ALVARÁ E PERFECTA) SUBMETIDAS A APLICAÇÕES FOLIARES NA DOSE DE 1 ML.L ⁻¹ DE SUSPENSÕES DA BIOMASSA DA MICROALGA <i>A. quadricellulare</i> COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	77
FIGURA 6	– TRIPTAMINA(A), PUTRESCINA (B), ESPERMIDINA (C) E ESPERMINA (D) NAS FOLHAS DE CEBOLA CULTIVADAS ORGANICAMENTE (CULTIVARES ALVARÁ E PERFECTA) SUBMETIDAS A APLICAÇÕES FOLIARES NA DOSE DE 1 ML.L ⁻¹ DE SUSPENSÕES DA BIOMASSA DA MICROALGA <i>A. quadricellulare</i> COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	78
FIGURA 7 – 5	- HIDROXITRIPTOFANO (A), TRIPTAMINA (B) E PUTRESCINA (C) NOS BULBOS DE CEBOLA CULTIVADAS ORGANICAMENTE (CULTIVARES ALVARÁ E PERFECTA) SUBMETIDAS A APLICAÇÕES FOLIARES NA DOSE DE 1 ML.L ⁻¹ DE SUSPENSÕES DA BIOMASSA DA MICROALGA <i>A. quadricellulare</i> COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	79
FIGURA 8	– HISTAMINA (A), SEROTONINA (B), TIRAMINA (C) E ESPERMINA (D) NOS BULBOS DE CEBOLA CULTIVADAS ORGANICAMENTE (CULTIVARES ALVARÁ E PERFECTA) SUBMETIDAS A APLICAÇÕES FOLIARES NA DOSE DE 1 ML.L ⁻¹ DE SUSPENSÕES DA BIOMASSA DA MICROALGA <i>A. quadricellulare</i> COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	80

LISTA DE TABELAS

3. CAPÍTULO 1 – MICROALGA BIOFERTILIZER IMPROVES POTATO GROWTH AND YIELD, STIMULATING AMINO ACID METABOLISM

TABLE 1 – PERCENTAGE OF FREE L-AMINO ACIDS AND PROTEINS IN THE MICROALGAE BIOMASS OF <i>Asterarcys quadricellulare</i>	36
TABLE 2 – VALUES OF TUBER FRESH MASS, TUBER DIAMETER, TUBER LENGTH; FRESH AND DRY MASS OF THE AERIAL PART AND LEAF AREA OF ORGANICALLY GROWN POTATO (CULTIVAR CLARA) SUBMITTED TO FOLIAR SPRAYS WITH BIOMASS SUSPENSIONS OF THE MICROALGAE <i>A. quadricellulare</i>	38
TABLE 3 – POTATO TUBER FRESH MASS (G) ACCORDING TO TUBER CLASSIFICATION (CLASS: I > 70 MM; II-2: 50 TO 70 MM; II-1: 42 TO 50 MM; III: > 33 TO 42 MM; IV: 28 TO 33 MM AND V: <28 MM) OF CULTIVAR CLARA SUBMITTED TO FOLIAR SPRAYS WITH SUSPENSIONS OF THE MICROALGAE <i>A. quadricellulare</i> BIOMASS	39
TABLE 4 – VALUES OF FRESH AND DRY MASSES OF ‘CLARA’ AND ‘CRISTAL’ POTATO CULTIVARS SUBMITTED TO FOLIAR SPRAYS WITH SUSPENSIONS OF THE MICROALGAE <i>A. quadricellulare</i> BIOMASS BY WEEKLY AND BIWEEKLY FREQUENCY.....	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 OS BIOFERTILIZANTES	20
2.1.1 AMINOÁCIDOS COMO BIOFERTILIZANTES.....	22
2.1.2 MICROALGAS COMO BIOFERTILIZANTES	23
2.1.2.1 A microalga <i>Asterarcys quadricellulare</i> como biofertilizante	25
2.2 A CULTURA DA BATATA.....	26
2.3 A CULTURA DA CEBOLA	28
3 CAPÍTULO 1 – MICROALGA BIOFERTILIZER IMPROVES POTATO GROWTH AND YIELD, STIMULATING AMINO ACID METABOLISM	30
Abstract.....	30
1 Introduction.....	30
2 Materials and methods.....	31
2.1 Treatments.....	32
2.2 Bioassay.....	32
2.3 Field experiments.....	33
2.3.1 Experiment I.....	33
2.3.1.1 Biometric variables, relative chlorophyll. And tubers total soluble solid (°Brix) content.....	34
2.3.1.2 Yeld and tuber classification.....	34
2.3.2 Experiment II.....	35
2.3.3 Biochemical analysis.....	35
2.4 Statistical treatment.....	36
3 Results.....	36
3.1 Bioassay.....	37
3.2 Field Experiment I.....	37
3.3 Field Experiment II.....	40
4 Discussion.....	43
4.1 Bioassay.....	43
4.2 Field Experiment I.....	44
4.3 Field Experiment II.....	45
5 Conclusion.....	46

References.....	46
4 CAPÍTULO 2 – MICROALGA BIOFERTILIZER TRIGGERS METABOLIC CHANGES IMPROVING ONION GROWTH AND YELD	50
Abstract.....	50
1 Introduction.....	50
2 Material and Methods.....	51
2.1 Microalga Source and Treatments.....	52
2.2 Study area, Cultivars and Seedling Production.....	52
2.3 Pot Experiment.....	52
2.4 Field Experiment.....	53
2.5 Biochemical Analysis.....	55
2.6 Statistical treatment.....	55
3 Results.....	55
3.1 Pot Experiment.....	55
3.2 Field Experiment.....	57
4 Discussion.....	61
5 Conclusion.....	64
References.....	64
5 CAPÍTULO 3 – MICROALGA <i>Asterarcys quadricellulare</i> ESTIMULA METABOLISMO DE AMINAS BIOATIVAS COM AUMENTO DE PRODUTIVIDADE EM CEBOLA	68
Resumo.....	68
1 Introdução.....	68
2 Material e Métodos.....	70
2.1 Obtenção da biomassa dos tratamentos.....	70
2.2 Condução do Experimento no campo.....	70
2.3 Análises bioquímicas.....	71
2.4 Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	72
2.5 Análises estatísticas.....	73
3 Resultados.....	73
4 Discussão.....	81
5 Conclusão.....	84
Referências.....	84
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91

REFERÊNCIAS.....93

1 INTRODUÇÃO GERAL

A agricultura orgânica, tem aumentado de importância nos sistemas de produção de alimentos no Brasil e no mundo, fazendo uso de métodos que minimizam danos ao meio ambiente, priorizando uma produção mais sustentável (ABOU CHEHADE, 2017). Nesse contexto, o uso de alternativas como os biofertilizantes – definidos como produtos que contêm princípio ativo ou agente orgânico, isentos de agrotóxicos, capazes de atuar, direta ou indiretamente, sobre o todo ou sobre partes das plantas cultivadas, melhorando o desempenho do sistema de produção, sem considerar seu valor hormonal ou estimulante – ganham relevância (BRASIL, 2020).

Os biofertilizantes podem contribuir para o crescimento e aumento da produtividade das plantas, podendo reduzir a necessidade de uso de fertilizantes químicos (SINGH et al., 2016; RENUKA et al., 2018). Além do efeito em produção e crescimento, essas substâncias, dependendo de sua fonte, podem promover alterações metabólicas nos vegetais.

Para identificar a bioatividade dos biofertilizantes são usados os bioensaios, que são capazes de verificar o efeito benéfico que um biofertilizante apresenta sobre o todo ou parte das plantas, de forma rápida e eficaz, com avaliações biométricas e bioquímicas como resultado da ação de compostos biologicamente ativos (BRASIL, 2020)

As microalgas podem ser fonte de moléculas bioativas, como os L-aminoácidos livres para formulações de biofertilizantes, sendo organismos autotróficos unicelulares fotossintetizantes que tem se difundido em diversos setores, dentre os quais: aditivos para alimentos (MORRIS et al., 2008), geração de energia (biocombustíveis) (BOROWITZKA, 2013; CAVALCANTI, et al., 2014), produtos farmacêuticos e cosméticos. (BOROWITZKA, 2013).

Na agricultura, inúmeras espécies de microalgas tem sido estudadas quanto ao seu efeito promotor do crescimento vegetal ligado ao seu uso como biofertilizantes (GEMIN et al., 2019), atuando na promoção de crescimento de plantas e mitigação de estresses abióticos, efeitos relacionados aos altos teores de L-aminoácidos livres na biomassa, e outros compostos bioativos como polissacarídeos, poliaminas e citocininas (STIRK et al., 2013; ISHAQ et al., 2016; MÓGOR, et al., 2017; RENUKA et al., 2018; MÓGOR et al., 2018; ALVAREZ et al., 2021; MAZEPA et al., 2021).

A microalga Clorophyta *Asterarcys quadricellulare* (AQ), possui potencial para a produção de carotenoides (SINGH et al., 2019), alto teor de proteínas e conteúdo de carboidratos (GHOSH et al., 2017), portanto, apresentando potencial como fonte biofertilizante, porém, ainda possui poucos trabalhos com seu uso como biofertilizante no metabolismo vegetal. Desta forma, o objetivo dessa pesquisa foi investigar a bioatividade da biomassa de *A. quadricellulare* obtida em sistema mixotrófico e seca por atomização, e seu uso em aplicações foliares em plantas de batata e cebola cultivadas em sistema orgânico. Esse trabalho foi desenvolvido em três capítulos que serão apresentados a seguir.

No primeiro capítulo, inicialmente foi realizado bioensaio com hipocótilo de tomate visando verificar bioatividade da microalga *A. quadricellulare*, posteriormente realizou-se aplicação da sua biomassa em diferentes concentrações em plantas de batata cultivadas em sistema orgânico por dois anos objetivando avaliar sua bioatividade no crescimento, produtividade e variáveis bioquímicas para essa cultura (capítulo 1).

No segundo capítulo, visando avaliar o uso de *A. quadricellulare* no crescimento inicial, rendimento e alterações bioquímicas em plantas de cebola foram conduzidos os seguintes experimentos: i) aplicações foliares em plantas de cebola cultivadas em vasos em casa de vegetação; ii) aplicações foliares em plantas de cebola cultivadas no campo em sistema orgânico; determinando variáveis biométricas de crescimento, classificação e produtividade de bulbos no campo, assim como bioquímicas, nas folhas (clorofila, carotenoides, aminoácidos e da atividade da enzima nitrato redutase) e bulbos (aminoácidos livres e açúcares totais) (capítulo 2).

No terceiro capítulo *A. quadricellulare* foi aplicada em plantas de cebola em duas cultivares, três concentrações (AQ15 e AQ25 – com base em resultados prévios do capítulo 2, assim como testemunha) e duas frequências, sendo determinadas variáveis biométricas de crescimento e produtividade, bem como variáveis bioquímicas nas folhas e bulbos e posteriormente avaliações metabolômicas de substâncias presentes nas folhas e bulbos (capítulo 3).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OS BIOFERTILIZANTES

A definição de biofertilizantes, conforme o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, consta na Instrução Normativa 61, de 8 de julho de 2020: “Biofertilizante: produto que contém princípio ativo ou agente orgânico, isento de agrotóxicos, capaz de atuar, direta ou indiretamente sobre a totalidade ou parte das plantas cultivadas, aumentando sua produtividade, sem considerar seu valor hormonal ou estimulante (BRASIL, 2020).

O uso dessas substâncias na agricultura é uma ferramenta tanto para sistemas de produção orgânica, onde os insumos naturais são essenciais, quanto em sistemas convencionais, buscando aumento de produtividade, com sustentabilidade, visando atender a demanda por alimentos (VASCONCELOS & GONÇALVES; 2013; MÓGOR et al., 2018).

Os biofertilizantes tem se destacado devido a sua capacidade de gerar ganhos produtivos, além de minimizar os impactos ambientais na agricultura (RENUKA et al., 2018; SINGH et al., 2016), podendo também auxiliar na capacidade nutricional dos alimentos (DU JARDIN, 2015).

A composição de um biofertilizante é bastante ampla, incluindo biomassa de algas, substâncias húmicas, hidrolisados de proteínas e microorganismos benéficos, que ao serem aplicados na planta podem produzir alterações metabólicas (DU JARDIN, 2015), podendo atuar também na melhora da qualidade química e biológica do solo ou estimular o crescimento da planta (ABDEL-RAOUF et al., 2012). Essas substâncias, mesmo em pequenas concentrações podem fornecer ótimos resultados, melhorando os processos fisiológicos e bioquímicos, buscando o máximo potencial genético e produtivo das plantas.

Sendo assim, a maneira que eles podem estimular respostas fisiológicas quando aplicados às plantas está sendo associada à sua ação de sinalização (MÓGOR et al., 2017; STADINIK et al., 2017). Os resultados demonstram que eles podem aumentar biometricamente raízes e folhas, auxiliando na fisiologia vegetal, ou até mesmo estimular respostas a estresses bióticos e abióticos (NARDI et al., 2016; STADINIK et al., 2017).

Existem diversos estudos mostrando que devido à diversidade em suas composições, o uso dessas substâncias e organismos como biofertilizante podem trazer inúmeras vantagens às culturas (ALVAREZ et al., 2021). Os L-aminoácidos, hidrolisados de proteínas, extratos de macroalgas, biomassas de microalgas, substâncias húmicas, são exemplos de fontes biofertilizantes a serem empregadas

no crescimento dos vegetais (NARDI et al., 2016; MÓGOR et al., 2018; RÖDER et al., 2018); os polissacarídeos, estimulam o crescimento, maior rendimento, absorção de nutrientes e resistência ao estresse (TARRAF et al., 2015; EL ARROUSSI et al., 2016). Além disso, o fornecimento de aminoácidos em soluções foliares fornece às plantas os elementos necessários para o desenvolvimento de estruturas, economizando energia metabólica (GARCIA et al., 2012; PLAZA et al., 2018).

A garantia para os biofertilizantes é dada pelo seu teor de carbono orgânico total, e a sua bioatividade é identificada por bioensaios e pesquisas de acordo com a Instrução Normativa 61 do Ministério da Agricultura. Os bioensaios podem identificar a bioatividade dos biofertilizantes de maneira rápida e eficaz, avaliando variáveis biométricas e bioquímicas como resultado da ação de compostos biologicamente ativos (BRASIL, 2020).

2.1.1 AMINOÁCIDOS COMO BIOFERTILIZANTES

Os aminoácidos fazem parte da composição ou participam da síntese de enzimas, de proteínas estruturais, da clorofila, de hormônios vegetais, do transporte e armazenamento do nitrogênio (N) nos tecidos vegetais. Eles atuam também em processos fisiológicos de crescimento e desenvolvimento das plantas, desde a germinação e emergência, à frutificação e senescência, assim como de adaptações aos estresses bióticos e abióticos (PATRELLI & PILOT, 2014; HILDEBRANDT et al., 2015; OHYAMA et al., 2017; MÓGOR & MÓGOR, 2022).

Desta forma, estudos mostram que o fornecimento de aminoácidos através de aplicações nas plantas podem melhorar o desenvolvimento das mesmas em suas diferentes fases. O fornecimento de aminoácidos aos vegetais pode reduzir a necessidade de sua síntese, economizando energia e produtividade essenciais, principalmente durante as fases de crescimento (REICHLING, 2018). Além disso, a aplicação dessas biomassas são extremamente baixas, podendo estar associadas a eventos de sinalização, que produzem alterações metabólicas (MÓGOR et al., 2018).

Pesquisas demonstram que os aminoácidos podem atuar por meio da sinalização da expressão gênica, resultando na síntese de proteínas, promovendo alterações dos níveis hormonais e provocando maior atividade enzimática, gerando alterações bioquímicas e estruturais fundamentais para o desenvolvimento da planta (CASTRO

et al., 2019). Podendo influenciar também uma sequência de processos fisiológicos (HILDEBRANDT et al., 2015).

Os aminoácidos atuam no processo de assimilação de nitrogênio pelas plantas. Após a absorção de NO_3^- , sofre os processos de transformação para NH_4^+ , sendo convertido em glutamato pela ação das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT). Em seguida, é incorporado a outros aminoácidos por meio de reações de transaminação (TEGEDER, 2014; KAN et al., 2015; TAIZ & ZEIGER, 2017). As aminotransferases atuam para produzir o conjunto de aminoácidos das plantas conforme as suas demandas metabólicas (MAJUMDAR et al., 2016), sendo a síntese de todos os aminoácidos conectada em algum ponto com a glutamina ou com o glutamato (PRATELLI & PILOT, 2014).

As microalgas verdes possuem em sua composição aminoácidos, entre os quais o maior percentual é o ácido glutâmico (CASTRO et al., 2017; LU et al., 2019). Como já descrito esse aminoácido participa da síntese de outros aminoácidos por meio da transaminação (FORDE & LEA, 2007). O ácido glutâmico pode promover economia de energia para as plantas, auxiliando no desenvolvimento da cultura e favorecendo a produtividade (RÖDER et al., 2018).

Biomassas de microalgas ricas em aminoácidos estão sendo estudadas por sua capacidade de servir como fonte dessas biomoléculas para biofertilizantes. Resultados como melhora no conteúdo de proteínas solúveis nas plantas, melhor assimilação de nitrogênio e estímulo no metabolismo de aminoácidos tem sido verificados (NARDI et al., 2016), assim como agentes redutores de estresse, fonte de nitrogênio e precursores hormonais (ZHAO, 2010). Também tem produzido moléculas promotoras de crescimento, vitaminas, aminoácidos e polipeptídeos que melhoram o crescimento e produtividade das plantas (SAFI et al., 2014).

2.1.2 MICROALGAS COMO BIOFERTILIZANTES

As microalgas são encontradas como parte do fitoplâncton em grande parte das superfícies aquáticas, em ambientes marinhos ou de água doce e também terrestres. Esses organismos são classificados principalmente conforme a sua pigmentação, ciclo de vida e estrutura celular. Supõe-se que existam em torno de 800.000 espécies de microalgas, cerca de 50.000 dessas espécies são descritas, sendo bastante diversas, incluindo as cianobactérias, que são procariotas, como a

Arthrospira platensis e organismos eucariotos, como as microalgas verdes (Chlorophyta), com diversas características fisiológicas e bioquímicas (RONGA et al., 2019).

As microalgas possuem diversas formas de produção, sendo fontes de recursos renováveis, devido a sua capacidade fotossintética elas são produtoras primárias de biomassa e de outros compostos de interesse, podendo ser usadas na indústria de alimentação humana e animal, na indústria de cosméticos, biocombustíveis, e muitas outras, assim como na agricultura (SINGH et al., 2016).

Esses organismos são fontes de diversas moléculas bioativas, como: poliaminas, que derivam da ornitina e apresentam efeito modulador do crescimento e desenvolvimento das plantas; polissacarídeos, que promovem crescimento e mitigam estresses abióticos; L- aminoácidos livres e peptídeos, que absorvidos por folhas ou raízes podem ser incorporados ao metabolismo conforme as necessidades metabólicas das plantas, ou estimular processos fisiológicos atuando como moléculas sinalizadoras (MÓGOR et al., 2017; MÓGOR et al., 2018; LIN & LIN, 2019; RACHIDI et al., 2020).

As pesquisas com uso de microalgas na agricultura tem aumentado muito nos últimos anos, relacionando seus efeitos à promoção do crescimento nas plantas, aumento de produtividade e na mitigação de estresses abióticos, como déficit hídrico e salinidade. A biomassa de *Acutodesmus dimorphus* promoveu o crescimento e desenvolvimento em plantas de tomate (GARCIA-GONZALEZ & SOMMERFELD, 2016); *Chlorella vulgaris* aplicada ao substrato potencializou o crescimento de mudas de alface (FAHHED & FATTAH, 2008); cianobactérias melhoraram a germinação e crescimento em trigo (HUSSAIN & HASNAIN, 2011) e ervilha (OSMAN et al., 2010), *C. vulgaris* e *Spirulina platensis* aumentaram os níveis de açúcares totais, aminoácidos e compostos fenólicos em plantas de cebola (DINESHKUMAR et al., 2020), aplicação de *Dunaliella salina* mitigou os efeitos de estresse oxidativo em tomate sob efeito de salinidade (EL ARROUSSI et al., 2018).

A bioatividade de um hidrolisado da biomassa de cianobactéria foi identificada em bioensaios, bem como no crescimento e produção de alface, sendo atribuído a alterações no metabolismo de poliaminas (MÓGOR et al., 2017). Mógor et al. (2018) com uso da biomassa de *A. platensis*, verificaram sua bioatividade em bioensaios e no aumento de produção de beterraba em sistema orgânico com aplicações foliares, relacionando as respostas à presença de L-aminoácidos livres. A associação da

biomassa da microalga *Scenedesmus subspicatus* com ácido fúlvico promoveram o crescimento, aumento de produtividade e de teores de nutrientes em bulbos de cebola (GEMIN et al., 2019).

O potencial agrícola das microalgas relaciona-se com sua capacidade de fornecer moléculas bioativas e eficientes como biofertilizantes. Os mecanismos induzidos pelas microalgas são complexos e ainda não são totalmente compreendidos. A ação desses organismos envolve a interação de várias moléculas (BARONE et al., 2019), que podem estar ligadas a uma rede de sinalização (MÓGOR et al., 2018).

2.1.2.1 A microalga *Asterarcys quadricellulare* como biofertilizante

A microalga *Asterarcys quadricellulare* (AQ) é uma alga verde pertencente ao filo Chlorophyta que teve sua sequência estrutural filogenética verificada por Hegewald et al. (2010). Essa microalga pode ser encontrada em águas marinhas e doces, com tamanho variado entre 2 a 10 µm de diâmetro e são dependentes de luz para seu crescimento autotrófico (HONG et al., 2012).

Possui uma alta quantidade de lipídeos em sua composição e por isso tem sido explorada como matéria-prima alternativa para a produção de biocombustíveis (OLIVEIRA et al., 2017; CHAUDHARY & KHATTAR, 2019; SANGAPILLAI & MARIMUTHU, 2019). Também possui altos rendimentos de carboidratos e proteínas, (GHOSH et al., 2017), altos teores de aminoácidos e polissacarídeos (VARSHNEY et al., 2018) e altos níveis de carotenoides em seu conteúdo (SINGH et al., 2019).

Algumas microalgas do gênero das clorófitas (como *Scenedesmus* e *Chlorella*) têm potencial relacionado à moléculas bioativas, podendo incluir aminoácidos e proteínas, que podem atuar na promoção do crescimento vegetal. Algumas espécies de microalgas apresentam 50-56% de seu peso seco em proteínas (ISHAQ et al., 2016).

O conteúdo proteico da microalga *A. quadricellulare* está na faixa de 39-45% de sua biomassa, que é igualmente rica em diferentes aminoácidos (GHOSH et al., 2017). Segundo diversos autores, grande parte das espécies de microalgas apresentam em sua composição maior quantidade dos aminoácidos aspartato e glutamato (XUPENG et al., 2017). Essas moléculas, na forma de L-aminoácidos

podem fornecer bioatividade, melhorando o crescimento da planta (MÓGOR et al., 2018).

Os primeiros trabalhos com uso de *A. quadricellulare* foram realizados recentemente, com uso nas culturas de cana-de-açúcar, tomate e soja (MÓGOR et al., 2022; LARA et al., 2022; PALMA et al., 2022). No crescimento de gemas de cana-de-açúcar houve aumento de aminoácidos e acúmulo de açúcares não redutores nos estágios iniciais da brotação, aumento de espermidina nos brotos, indicando as poliaminas como principais compostos do metabolismo do nitrogênio relacionados à brotação e crescimento de brotos em cana-de-açúcar com uso de *A. quadricellulare* (MÓGOR et al., 2022). Em tomate ocorreu aumento da área foliar e produtividade, além de maiores teores de açúcares, aminoácidos livres e proteínas em plantas tratadas com *A. quadricellulare* (LARA et al., 2022). Quando se avaliou plantas de soja sob estresse salino verificou-se que o uso da biomassa de *A. quadricellulare* reduziu o efeito nocivo da salinidade, sendo eficaz na manutenção do crescimento das plantas, com aumento dos teores de aminoácidos livres totais, prolina, proteínas e atividade de enzimas antioxidantes, bem como aumento do volume dos nódulos radiculares (PALMA et al., 2022). Esses resultados demonstram o potencial dessa microalga como biofertilizante.

Como visto nesses trabalhos, a microalga *Asterascys quadricellulare* possui potencial biofertilizante, porém sua capacidade de atuar no metabolismo das plantas ainda pode ser mais explorada, visando verificar sua ação no rendimento e na produção de alimentos saudáveis e sustentáveis, como foi realizado no presente trabalho.

2.2 A CULTURA DA BATATA

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é uma solanácea anual, dicotiledônea, de ciclo curto, apresenta caules aéreos, herbáceos e suas raízes originam-se na base desses caules ou hastes. O sistema radicular é delicado e superficial e suas raízes se concentram até 30 cm de profundidade. Suas folhas são compostas por folíolos arredondados e as flores hermafroditas apresentam-se reunidas em inflorescência no topo da planta. Há o predomínio da autopolinização, que origina um pequeno fruto verde, contendo numerosas sementes minúsculas e viáveis (FILGUEIRA, 2008).

O centro de origem da batata é próximo à Cordilheira dos Andes na América do Sul. A subespécie spp. *tuberosum* se espalhou por todo o mundo, sendo melhorada ao longo do tempo. A batata apresenta crescimento variando de 50 a 60 cm de altura com sistema radicular superficial, sendo nutridos nos primeiros 30 dias pelas reservas presentes nos tubérculos. Essa cultura possui 4 estádios de desenvolvimento a partir da semeadura, sendo: emergência, início da tuberização, enchimento de tubérculos e maturação (FILGUEIRA, 2008).

O cultivo dessa cultura tem se tornado cada vez mais atrativo porque a batata combina um grande potencial de produção em um ciclo curto e com elevado valor nutricional (FERNANDES et al., 2010; DE JONG, 2016). Em um cenário de contínuo crescimento populacional, as características da cultura da batata fazem dela uma estratégia para melhorar a segurança alimentar, podendo ser cultivada nas mais diversas regiões do mundo, apresentando certa resistência aos efeitos das mudanças climáticas (KANTER et al., 2015; DEVAUX et al., 2020).

A batata (*S. tuberosum*) é um relevante alimento utilizado na dieta humana da maioria dos países do mundo, sendo considerada a terceira cultura de maior importância na alimentação humana depois do arroz e do trigo (NAVARRE & PAVEK, 2014; LIANG et al., 2019). A importância da batata como fonte de alimento ocorre devido a seus tubérculos possuírem quantidades balanceadas de proteínas, aminoácidos essenciais, carboidratos, fibras e potássio (K) (SILVA & FONTES, 2008). Entre as olerícolas, é a cultura de maior importância no Brasil e no mundo, por ter um ciclo curto e com produtividade elevada (FILGUEIRA, 2008).

Em 2020 houve uma produção de 359,07 milhões de toneladas (t) de tubérculos de batata em todo o mundo, cultivadas em cerca de 16,5 milhões de hectares (ha). Nesse mesmo ano, o Brasil produziu 3,76 milhões de t em 117,25 mil ha de solo. A produtividade brasileira foi de 32,06 t ha⁻¹, sendo maior que a mundial de 21,76 t ha⁻¹. O Brasil é o vigésimo primeiro maior país produtor de batata, sendo autossuficiente para o consumo interno (FAO, 2022). Quanto aos estados produtores, Minas Gerais (32,44%), Paraná (20,24%) e São Paulo (17,59%), possuem as maiores produções nacionais (IBGE, 2022).

A bataticultura oferece retorno socioeconômico para o país, com geração de emprego e renda. Em torno de 2 mil produtores geram mais de 30 mil postos de trabalho diretos e indiretos (RAMPAZZO, 2020).

2.3 A CULTURA DA CEBOLA

A cebola (*Allium cepa* L.) pertence a família das alliaceas, é uma das mais antigas espécies vegetais cultivadas no mundo tendo como centro de domesticação a Ásia central (SOUZA; ASSIS; ARAÚJO, 2015; MEHTA, 2017). É uma espécie polimórfica, com diferenças de cor e cerosidade das folhas, tamanho e cor de bulbos, bem como reação ao comprimento do dia (MELO, 2007). Pertence ao grupo das herbáceas, com folhas simples, incompletas, subaladas, invaginantes e grandes, dispostas alternadamente em duas fileiras, podendo ser cerosas ou não. O caule verdadeiro localiza-se abaixo da superfície do solo, sendo um disco compacto com formato cônico, situado na base inferior do bulbo, de onde partem as raízes. As bainhas foliares forma um pseudocaule onde a parte inferior é o próprio bulbo (FILGUEIRA, 2008; SOUZA; ASSIS; ARAÚJO, 2015).

Para sua classificação são consideradas características de exigências fotoperiódicas, o padrão genético, assim como a forma de consumo (OLIVEIRA et al., 2004). A cultivar a ser plantada deve ser escolhida em função das condições climáticas da região e da exigência do mercado quanto ao tipo de bulbo (COSTA et al., 2002).

O fotoperíodo (quantidade de horas de luz) e temperatura adequada tem grande importância na bulbificação da cebola, e essas variáveis dependem das exigências fisiológicas de cada cultivar. As plantas de dias curtos precisam de um fotoperíodo de 10 horas de luz, as intermediárias, de 12 a 14 horas de luz e as de dias longos, de um fotoperíodo superior a 14 horas de luz. Para a região sul do Brasil as cultivares mais indicadas para o plantio são as intermediárias (LEITE, 2014).

As plantas de cebola suportam temperaturas baixas no início do desenvolvimento vegetativo (<15°C), porém, nas fases mais avançadas de crescimento de plantas, temperaturas mais baixas podem induzir o florescimento prematuro das plantas (Bolting) e em temperaturas altas (>35°C) podem ocasionar a bulbificação precoce, ficando estas sem valor comercial (OLIVEIRA & BOITEUX, 2003). A relação fotoperíodo e temperaturas acima do mínimo necessário possibilitará a mobilização de reservas da planta e conseqüentemente haverá a formação de bulbos (LEITE, 2014).

No Brasil, a cebola foi introduzida pelos portugueses no século XVIII (MADEIRA et al., 2008), e atualmente está presente na maior parte do território nacional. A

cultura da cebola está em terceiro lugar dentre as hortaliças com maior expressão econômica no Brasil, sendo superada em importância econômica apenas pelas produções de batata e tomate (KURTZ et al., 2013; FERREIRA et al., 2018). Essa atividade socioeconômica é muito relevante para os estados da região sul do país, sendo o estado de Santa Catarina o maior produtor (431 mil t), seguido do Rio Grande do Sul (175 mil t) e Paraná (133 mil t) (IBGE, 2022). O cultivo da cebola para pequenos agricultores tem a necessidade de mão-de-obra, podendo gerar emprego e renda. Também na agricultura empresarial, a cebola tem grande importância na geração de empregos de forma direta e indireta (EL BALLA, 2013).

Conforme dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2022), a produção da cultura no ano de 2020 foi de 1,4 milhão de t em 47,5 mil ha cultivados, alcançando uma produtividade média de 31,4 t ha⁻¹. De acordo com dados do DERAL (Departamento de Economia Rural da Secretaria de Agricultura do Estado do Paraná, em 2018, a área plantada nesse estado foi de 4819 hectares, com produção de 125.737,5 t.

CAPÍTULO 1 – MICROALGA BIOFERTILIZER IMPROVES POTATO GROWTH AND YIELD, STIMULATING AMINO ACID METABOLISM

Journal of Applied Phycology
<https://doi.org/10.1007/s10811-021-02656-0>



Microalga biofertilizer improves potato growth and yield, stimulating amino acid metabolism

Ely Cristina Negrelli Cordeiro¹ · Átila Francisco Mógor¹ · Juliana Oliveira Amatussi¹ · Gilda Mógor¹ · Harielly Marianne Costa Marques¹ · Gabriel Bocchetti de Lara¹

Received: 23 July 2021 / Revised and accepted: 13 November 2021
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2021

Abstract

In the context of a growing demand for healthy food, nature-friendly alternatives such as biofertilizers and biostimulants, which are natural sources capable of promoting plant growth and yield, have relevance. Therefore, the aim of this work was to investigate the use of microalga *Asterarcys quadricellulare* (CCAP 294/1) biomass to grow potato, adopting a step-by-step approach initially with bioassay using biomass at concentrations of 0.05, 0.15, 0.25, and 0.4 g L⁻¹ to identify the microalgal bioactivity. After that, using the biomass for foliar sprays in the field for two seasons to determine the effects on potato growth, yield, and biochemical variables. In the bioassay, the biomass showed that bioactivity promoted hypocotyl expansion. In the field it promoted yield gains for two seasons, first using the same concentrations tested in bioassay; in the second, with two potato cultivars, two biomass concentrations (0.15 and 0.25 g L⁻¹) and two spray frequencies (weekly and biweekly). The microalga-biomass sprays increased potato yield and triggered biochemical changes that improve chlorophyll, amino acid, sugar, and nitrate reductase enzyme activity. These findings demonstrate that *A. quadricellulare* effectively stimulates plant growth, development, and nitrogen assimilation, indicating it is a potential source of sustainable input for potato production.

Keywords: *Asterarcys quadricellulare*, Biostimulant, Nitrate reductase, Organic system, *Solanum tuberosum*

1. Introduction

Sustainable farming techniques have gained considerable importance in food production systems worldwide. Therefore, alternative products such as biofertilizers are largely needed to meet the system demand. One example of such a biofertilizer is the microalgae biomass (Gemin et al. 2019).

Microalgae are photosynthetic unicellular organisms that have been widely used in several sectors, among them food additives (Morris et al. 2008), biofuels, medicines, and cosmetics (Borowitzka 2013). In agriculture, microalgae are used as biostimulants or biofertilizers, promoting plant growth and mitigating abiotic stresses (Alvarez et al. 2021). The effects of microalgae on plants can be attributed to the presence in the algae of bioactive compounds such as polysaccharides, polyamines, hormones, and free l-amino acids (Stirk et al. 2013; Ishaq et al. 2016; Mogor et al. 2017, 2018; Renuka et al. 2018).

Microalgae often reported as biofertilizers or biostimulants are primarily blue-green algae (Cyanophyta) such as *Arthrospira platensis* (Spirulina) (Mogor et al. 2017) and green algae (Chlorophyta) such as *Chlorella* spp. And *Scenedesmus* spp. (Bumandalai and Tserennadmid 2019).

Among Chlorophyta, *Asterarcys quadricellulare* shows high protein and carbohydrate content (Ghosh et al. 2017), pointing it as a potential biofertilizer source.

Potato (*Solanum tuberosum*) is considered the third most important food crop after rice and wheat. In 2017, 388 million tonnes of tubers was produced in the world. (Fao 2020). Brazil is the twenty-first largest potato-producing country, being self-sufficient for domestic consumption (Fao 2020). In this scenario, the search for new sustainable production techniques, such as the use of *A. quadricellulare* as biofertilizer, may be an alternative approach for organic and conventional potato production.

Therefore, the aim of this study was to evaluate bioactivity and the effects of microalga *A. quadricellulare* biomass on growth, development, yield, and biochemical variables of potato plants grown in organic system by 2 years.

2. Materials and Methods

The biomass of the microalga *Asterarcys quadricellulare* (CCAP 294/1), supplied by Alltech Crop Sciences—Brazil, was obtained from mixotrophic cultivation and atomized using a spray drying method, resulting in a fine greenish powder. Following cell disruption (Show et al. 2015; Stirk et al. 2020), the free amino acids were extracted (Magne and Larher 1992; Winters et al. 2002), indicating a concentration of 90.94 mg g⁻¹, which corresponds to 9% w/w of the microalgae biomass.

Determinations of the amino acid profile of *A. quadricellulare* (CCAP 294/1) and protein content were performed according to the methodologies of Lucas and Sotelo (1980), White et al. (1986), and Hagen et al. (1989). The contents of the amino acid were determined using an SPC1000 amino acid analyzer adapted to the pre-column derivatization method with phenylisothiocyanate (PITC) and quantification by reverse-phase highperformance liquid chromatography (HPLC) using UV detection at 254 nm. The set consisted of a degasser, a quaternary pump module, a Rheodyne injection valve, an oven module, and a UV detection module, equipped with a LUNA C18 100 A 5 μ column, 250 $\times$ 4.6 mm 00G-4252-EQ. The amino acid score was calculated through the ratio between the values of essential amino acids in the samples (mg g⁻¹) and the standard values (FAO/WHO 1991).

2.1. Treatments

The *A. quadricellulare* (AQ) biomass was suspended at the following concentrations: 50, 150, 250, and 400 g L⁻¹. From each suspension, a 1 mL L⁻¹ aliquot was taken and diluted with distilled water, inducing the treatments and producing solutions equivalent to the biomass concentrations of 0.05 g L⁻¹ (AQ 5); 0.15 g L⁻¹ (AQ 15); 0.25 g L⁻¹ (AQ 25); and 0.4 g L⁻¹ (AQ 40).

2.2. Bioassay

The first step was for observation of the bioactivity of the biomass with a possible growth-promoting effect. It included the bioassay of tomato hypocotyl (*Solanum lycopersicum*) expansion (Zhao et al. 1992; Stirk et al. 2002), using 20 seeds placed in a plastic box on a sheet of filter paper soaked for 30 s in concentration solutions of AQ 5, AQ 15, AQ 25, and AQ 40, as well as a control in the water. The bioassay was conducted in a growth chamber at 22 °C with a 12-h illumination period (photon flux intensity: 0.52–0.56 mmol photons m⁻² s⁻¹) for 8 days, in a completely randomized design with four replications ($n = 4$).

The sum of the length of the hypocotyls was determined using the WinRhizo Pro software (Regent Instr, Canada) and Epson dual-lens scanner (model v700 PHOTO).

2.3. Field experiments

The study was conducted at the Organic Horticulture Research Area of the Federal University of Parana, located at the municipality of Pinhais, Parana State, Brazil, at 25°23' 30" S and 49° 07' 30" W, at an average altitude of 920 m. The climate in the region is the Cfb-type temperate climate according to Koppen's classification.

The soil chemical analysis in the 0–30-cm layer indicated the average values of pH (CaCl₂) = 5.84; pH H₂O = 6.71; Al³⁺ = 0; H+Al³⁺ = 2.93 cmolc dm⁻³; Ca²⁺ = 5.28 cmolc dm⁻³; Mg²⁺ = 3.05 cmolc dm⁻³; K⁺ = 1.32 cmolc dm⁻³; P (Mehlich) = 49.0 mg dm⁻³; S = 33.49 mg dm⁻³; C = 26 g.dm⁻³; V% = 76.7; and CEC = 12.58 cmolc dm⁻³.

The soil was prepared with the application of 50 kg ha⁻¹ of magnesium thermophosphate, 50 kg ha⁻¹ of potassium sulfate, and 50 kg ha⁻¹ of magnesium sulfate, in the planting furrow, and 12.5 t ha⁻¹ of organic compost with the following values: C = 31.3 g kg⁻¹; N = 26.3 g kg⁻¹; P = 8.2 g kg⁻¹; K = 7.2 g kg⁻¹; Ca = 8.0 g kg⁻¹; Mg = 4.2 g kg⁻¹.

Two potato cultivars from Brazilian breeding programs were used. The cultivar BRS Clara has high productive potential, with large tubers and a more rustic appearance. It is resistant to late blight (*Phytophthora infestans*), with an average cycle of 100 days (Ribeiro et al. 2017).

The cultivar Cristal has high field resistance to late blight and black spots (*Alternaria* spp.), also with an average cycle of 100 days. These cultivars are widely used in organic production (Embrapa 2008).

2.3.1. Experiment I

The first experiment was set in August 2018 using the cultivar BRS Clara in a completely randomized design with five treatments and four replications, totaling 20 plots, composed of seven plants, being five useful and excluding border plants, arranged at a spacing of 0.35 m between plants and 0.80 m between lines, totaling 28 plants per treatment. The treatments consisted of foliar sprays of *A. quadricellulare* microalgae suspensions AQ 5, AQ 15, AQ 25, and AQ 40, as well as a control using water spray.

At 32 days after planting (DAP), sprays were started using an electric Kawashima backpack sprayer at constant pressure (40 psi) with a rate of 400 L ha⁻¹, in 7-day intervals, totaling eight applications throughout the experiment.

The area was irrigated through sprinkling aiming to maintain soil moisture at 80%, using a tensiometer for inspection.

2.3.1.1. Biometric variables, relative chlorophyll. And tubers total soluble solid (°Brix) content

At 56 DAP, after four applications, at the beginning of flowering, two plants were collected by replication, where the following was determined: longitudinal and transverse diameter of tubers (mm) using a digital pachymeter; fresh weight of tubers (g) and fresh weight and dry weight of the aerial part (g) quantified on a precision scale; and leaf area (cm²), using software WinRhizo (Regent Instruments Inc., Canada) coupled to a LA1600 scanner.

At 68 DAP, when the plants were in full bloom, the relative chlorophyll content of all plots was determined using a portable chlorophyll meter (N-Tester) that presents the average values of thirty randomized readings done in fully expanded leaves of the middle-third part of plants (Mogor et al. 2013). The readings were performed in the three central plants of each plot.

The soluble solids in tubers were determined using a refractometer at room temperature and expressed in °Brix.

2.3.1.2. Yield and tuber classification

The harvest was carried out at 96 DAP, at plant senescence. Production was obtained by weighing the tubers of the three central plants of each plot, extrapolating the values to a population equivalent to 35.714 plants ha⁻¹. Yield values are related to standard comercial tubers (class I: > 70 mm, class II.2: > 50 to 70 mm, and class II.1: > 42 to 50 mm). The size classification of all tubers was done according to the following classification ranking: class I, class II.2, class II.1, class III: > 33 to 42 mm, class IV: > 28 to 33 mm; V: up to 28 mm, and data presented as the means of the tuber fresh mass in each class.

The dry mass of tubers was determined using an air circulation oven at 65 °C until the constant weight was obtained.

2.3.2. Experiment II

The second experiment was implemented in August 2019 in a completely randomized design at a triple factorial arrangement, 2 (cultivar) $\times$ 3 (treatments) $\times$ 2 (frequency) in four replications ($n = 4$) totaling 48 plots, each composed of seven plants, being five useful, excluding border plants arranged as in the previous experiment, using two cultivars (Cristal and Clara) and sprays with AQ 15 and AQ 25 plus control, at two frequencies (7 and 15 days).

Sprays started at 35 DAP, as described in experiment I. At 73 DAP, the relative chlorophyll content was determined. The harvest was carried out at 100 DAP, followed by the same evaluations performed in experiment I.

2.3.3. Biochemical analysis

Twelve fully expanded leaves from the middle third of three central plants (four leaves from each plant) in the plots were collected between 9:00 a.m. and 10:00 a.m. to determine biochemical variables at 56 DAP, after flowering. The tubers were collected at harvest among commercial sizes. One tuber of commercial class per useful plant was randomly chosen, where five tubers were selected in each plot. The materials were frozen immediately after collection and later macerated in liquid nitrogen until a fine powder was obtained.

The chlorophyll and carotenoids were extracted with 80% acetone in distilled water and the addition of 0.1% CaCO_3 (w/v) and readings were performed on a UV-visible spectrophotometer at 663, 647, and 470 nm (Lichtenthaler and Buschmann 2001), and the values expressed in micrograms of chlorophyll per gram of fresh plant material used.

Total sugars were determined with a standard curve obtained with glucose at 1 mg mL^{-1} (5.5 mM), with values between 50 and 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Readings were performed at 540 nm (Maldonado et al. 2013) and the values were expressed in micrograms of sugars per gram of fresh plant material.

Total free amino acids were extracted and the colorimetric reaction was performed with 1 mL of the sample plus 0.5 mL of 0.2 M pH 4.6 citrate buffer and 1 mL with ninhydrin solution (1% ninhydrin, 3% ascorbic acid in 2-methoxy ethanol). Readings were made at 570 nm. A standard curve was made with glutamine and asparagine (2 mM) with values ranging from 28 and 140 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Magne and Larher

1992) and the results are expressed in micrograms of total free amino acids per gram of plant material.

The determination of the activity of the enzyme nitrate reductase of the leaves followed the methodology proposed by Jaworski (1971), with modifications. The reading was performed on a spectrophotometer at 540 nm and the values were expressed in $\mu\text{mol NO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ of plant material.

2.4. Statistical treatment

The data obtained were subjected to analysis of variance and their homogeneity tested by the Bartlett test. The results that showed significance were compared using the tests of Tukey and Scott-Knott at the 5% level of significance. The tuber classification of experiment I was performed using a factorial scheme, as well as all data of experiment II. Statistical analyses were processed using the Assistat program, version 7.6 Beta (Silva and Azevedo 2016).

3. Results

The percentage of free L-amino acids and proteins in the biomass of *A. quadricellulare* is shown in Table 1. *Asterarcys quadricellulare* had a free L-amino acid content of 90.94 mg.g^{-1} , which corresponds to 9% of the algal biomass and 37.94% of protein (Table 1).

Table 1. Percentage of free L-amino acids and proteins in the microalgae biomass of *Asterarcys quadricellulare*.

L-Amino acids	%
Aspartic acid	3.32
Glutamic acid	4.27
Serine	1.66
Glycine	1.54
Histidine	0.71
Arginine	2.17
Threonine	1.45
Alanine	2.41
Proline	1.6
Tirosin	0.95
Valine	1.81
Methionine	0.51
Cystine	0.29

Isoleucine	1.41
Leucine	2.36
Phenylalanine	1.37
Lysine	2.11
Tryptophan	0.37
Protein	37.94

3.1. Bioassay

The length of the tomato hypocotyls assessed in the bioassay expressed the bioactive effect of *A. quadricellulare*, where AQ 15 and AQ 25 showed increases of 24.21% and 24.73%, respectively, over the control, while AQ 5 and AQ 40 increased the length of the hypocotyls in 11.55% and 9.47%, respectively, over the control (Fig.

1).

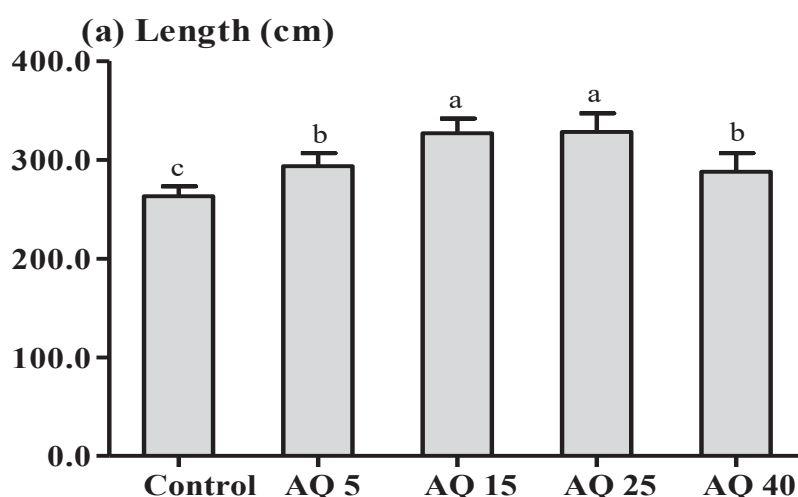


Fig. 1. The sum of the length of tomato (*Solanum lycopersicum*) hypocotyls by *A. quadricellulare* concentration treatments: control, 0.05 g L⁻¹ (AQ 5); 0.15 g L⁻¹ (AQ 15); 0.25 g L⁻¹ (AQ 25); and 0.4 g L⁻¹ (AQ 40). Means followed by the same letter in different columns do not differ statistically ($p < 0.05$) according to the Scott-Knott test ($n = 4$).

3.2. Field experimente I

The use of sprays increased tuber fresh mass by 116.42% and 104.58% with AQ 15 and AQ 25, respectively, compared to the control. All treatments with AQ increased tuber diameter and length. Fresh and dry mass of the aerial part was not affected by AQ, while AQ 15 and AQ 25 stimulated leaf expansion, with increments of 52.25% and 50.50% in the leaf area, in comparison to the control (Table 2).

Table 2. Values of tuber fresh mass, tuber diameter, tuber length; fresh and dry mass of the aerial part and leaf area of organically grown potato (cultivar Clara) submitted to foliar sprays with biomass suspensions of the microalgae *A. quadricellulare*.

	Control	AQ 5	AQ 15	AQ 25	AQ 40
TFM(g)	16,13±3,39 c	22,29±2,36 bc	34,91±2,18 a	33±3,40 a	25,84±1,58 b
TD(mm)	25,1±1,65 b	30,55±0,82 a	32,26±2,95 a	32,67±0,66 a	29,28±0,23 a
TL(mm)	38,34±2,62 b	46,82±1,75 a	48,58±3,52 a	51,39±1,92 a	51,45±1,24 a
SFM(g)	1316,14±157,29 c	1512,17±26,65 abc	1395,53±125,18bc	1649,33±16,20ab	1769,49±67,9 a
SDM(g)	90,22±11,65 b	113,84±14,31 ab	104,82±10,18 ab	131,07±7,11 a	125,29±11,12a
LA(cm ²)	581,12±37,58 b	677,91±58,46 b	884,8±99,07 a	874,63±78,75 a	644,57±6,03b

TFM: tuber fresh mass; TD: tuber diameter; TL: tuber length; SFM: shoot fresh mass; SDM: shoot dry mass; LA: leaf area. Foliar sprays with biomass suspensions of microalgae *A. quadricellulare*: control; 0.05 g L⁻¹ (AQ 5), 0.15 g L⁻¹ (AQ 15), 0.25 g L⁻¹ (AQ 25), 0.4 g L⁻¹ (AQ 40). Means followed by the same letter on the same line do not differ by Tukey's test ($p < 0.05$) +/- standard deviation.

The data of N-tester showed increases in relative chlorophyll index of 23.49%, 25.26%, and 22.92% for AQ 5, AQ 15, and AQ 25, respectively, over the control. The highest chlorophyll content resulted in higher soluble solids content in tubers for the same AQ treatments above with increments of 17.72%, 20%, and 17.97%, respectively. However, only AQ 25 improved the levels of total free amino acids in leaves and tubers up to 23.34% and 29.37%, respectively, over the control. On the other hand, AQ 40 had reduced the amino acids in tubers to values below the control (Fig. 2).

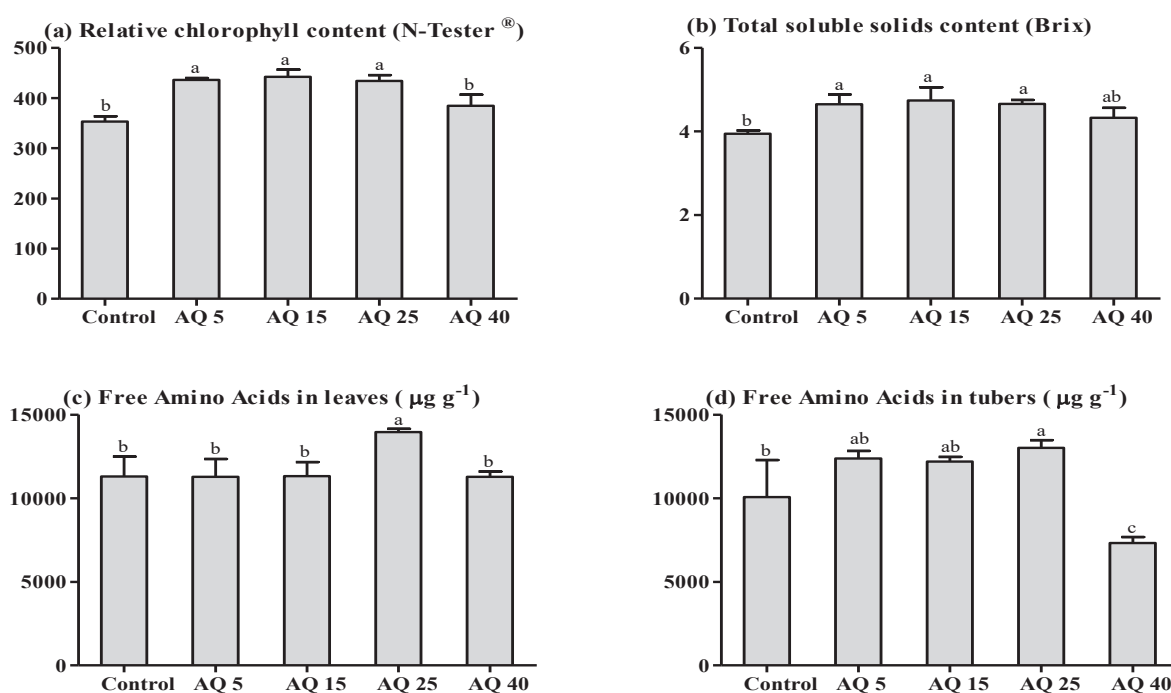


Fig. 2. Relative chlorophyll index (a), total soluble solids content (b), free amino acids in leaves (c) and free amino acids in tubers (d) of organically grown potato (cultivar Clara) submitted to foliar sprays with suspensions of the microalgae *A. quadricellulare* biomass: 0 mL.L⁻¹ (control); 0.05 g L⁻¹ (AQ 5), 0.15 g L⁻¹ (AQ 15), 0.25 g L⁻¹ (AQ 25), 0.4 g L⁻¹ (AQ 40). Means followed by the same letter over columns do not differ statistically ($p < 0.05$) by Tukey's test ($n = 4$).

In relation to tuber classification, the AQ 15 and AQ 25 treatments presented the highest values of fresh mass for type II-2, while AQ 5 and AQ 15 presented the highest values of fresh mass for type-I tubers (Table 3).

Table 3. Potato tuber fresh mass (g) according to tuber classification (Class: I > 70 mm; II-2: 50 to 70 mm; II-1: 42 to 50 mm; III: > 33 to 42 mm; IV: 28 to 33 mm and V: <28 mm) of cultivar Clara submitted to foliar sprays with suspensions of the microalgae *A. quadricellulare* biomass.

Tuber classes	Control	AQ 5	AQ 15	AQ 25	AQ 40
I	130,50±24,27 aB	149,16±43,84 aA	155,78±28,15 aA	135,91±29,16 aB	130,12±29,26 aB
II-2	59,17±14,02 bB	66,38±17,15 bB	75,92±13,67 bA	70,24±17,14 bA	62,11±15,70 bB
II-1	28,14±11,23 cA	35,34±5,19 cA	35,79±5,61 cA	36,43±8,68 cA	31,42±6,93 cA
III	17,67±6,96 dA	20,73±7,12 dA	23,95±4,12 dA	26,52±5,67 dA	19,36±3,76 dA
IV	11,69±3,23 eA	13,08±2,51 dA	14,94±2,70 eA	14,45±3,33 eA	12,92±2,79 eA
V	3,96±3,17 Ea	4,07±2,35 eA	5,71±2,91 fA	6,41±2,77 eA	4,61±2,51 eA

Foliar sprays with biomass suspensions of microalgae *A. quadricellulare*: control; 0.05 g L⁻¹ (AQ 5), 0.15 g L⁻¹ (AQ 15), 0.25 g L⁻¹ (AQ 25), 0.4 g L⁻¹ (AQ 40). Means followed by the same lowercase letters in column uppercase letters in line do not differ at the Scott Knott test ($p \leq 0.01$).

The number of tubers per plant was increased by AQ 5, which was not different from AQ 25, which in turn did not differ from the other treatments. Such improvements in the number of tubers by AQ 5 and fresh masses of type I (AQ 5, AQ 15) and type II-2 tubers at AQ 15 and AQ 25 increased the yield by 34.66%, 51.44%, and 62.78% in these AQ treatments over the control (Fig. 3).

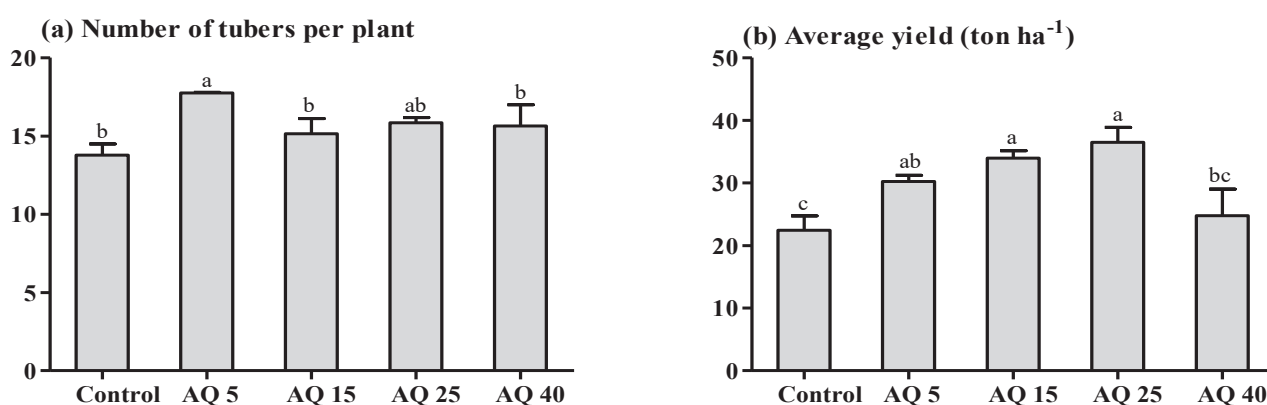


Fig. 3. Number of tubers per plant (a) and average yield (b) of organically grown potato (cultivar Clara) submitted to foliar sprays with suspensions of the microalgae

A. quadricellulare biomass: 0 mL.L⁻¹ (control); 0.05 g L⁻¹ (AQ 5), 0.15 g L⁻¹ (AQ 15), 0.25 g L⁻¹ (AQ 25), 0.4 g L⁻¹ (AQ 40). Means followed by the same letter in different columns do not differ statistically according to the Tukey's test ($p < 0.05$).

3.3. Field experiment II

Following the results of the first season (experiment I), the second experiment was conducted in a triple factorial arrangement: 2 (cultivars: 'Clara' and 'Cristal') $\times$ 3 (AQ treatments: QA 15, AQ 25 plus control) $\times$ 2 (frequency: weekly and biweekly). The AQ effects on potatoes were better explored and understood.

Comparing cultivars, the tuber fresh mass of the 'Clara' reached the highest value, except for the fortnightly frequency in AQ 25. Comparing AQ treatments and frequencies, the 'Cristal' showed reduction of fresh mass in fortnightly sprays with AQ 15, and 'Clara' at AQ 25. On the other hand, 'Clara' presented an increase for this trait when the plants received AQ 25 weekly and with AQ 15 fortnightly (Table 4).

The dry mass of the tubers did not differ among cultivars at weekly frequency. Regarding treatments, no difference was observed for 'Cristal', whereas for 'Clara' at AQ 15 weekly sprays presented an increase in dry mass of tubers over the control (Table 4).

Table 4. Values of fresh and dry masses of 'Clara' and 'Cristal' potato cultivars submitted to foliar sprays with suspensions of the microalgae *A. quadricellulare* biomass by weekly and biweekly frequency.

Frequency	Control	AQ 15	AQ 25
TFM (g)			
Weekly			
'Cristal'	125,15 $\pm$ 4,74Aba	127,98 $\pm$ 4,20Aba	122,75 $\pm$ 3,70Aba
'Clara'	141,6 $\pm$ 3,15 Baa	145,95 $\pm$ 18,07Bab	174,91 $\pm$ 3,32Aaa
Biweekly			
'Cristal'	125,15 $\pm$ 4,74Abaa	108,96 $\pm$ 3,15 Bbb	131,77 $\pm$ 4,11Aaa
'Clara'	141,6 $\pm$ 3,15 Baa	159,27 $\pm$ 6,94 Aaa	113,38 $\pm$ 7,73Cbb
DMT (g)			
Weekly			
'Cristal'	57,87 $\pm$ 3,84Aaa	58,24 $\pm$ 7,85Aaa	56,79 $\pm$ 6,58Aaa
'Clara'	53,53 $\pm$ 0,071Baa	65,16 $\pm$ 0,16Aaa	64,22 $\pm$ 0,61ABaa
Biweekly			
'Cristal'	57,87 $\pm$ 3,84 Aaa	48,5 $\pm$ 2,58 Abb	58,08 $\pm$ 0,82 Aaa
'Clara'	53,53 $\pm$ 0,071ABaa	62,17 $\pm$ 0,21Aaa	44,2 $\pm$ 0,099 Bbb

TMF: tubers fresh mass; TDS: tubers dry mass. Foliar sprays treatments of *A. quadricellulare*: control; 0.15 g L⁻¹ (AQ 15), 0.25 g L⁻¹ (AQ 25). Uppercase letters on the line comparing foliar sprays. Lowercase letters on the column comparing cultivars. Underlined Lowercase letters in the column comparing frequencies. Means followed by the same letter in the rows and columns do not differ by Tukey's test ($p \leq 0,05$).

The AQ sprays affected foliar pigments. For chlorophyll *a*, total chlorophyll, and carotenoid contents, an interaction was found among cultivars and treatments. For chlorophyll *b*, interaction occurred among treatments and frequencies. The chlorophyll *a* values were 33.91% and 47.97% higher in ‘Cristal’ at AQ 15 and AQ 25, respectively, whereas chlorophyll *b* content increased in average for both cultivars in 28.73% at AQ 25. Regarding total chlorophyll, values with AQ 15 and AQ 25 in ‘Cristal’ show an increase of approximately 44.82% over to the control. For carotenoids, an increase of 37.16% (AQ 15) and 29.20% (AQ 25) was found also in ‘Cristal’ when compared to control (Fig. 4).

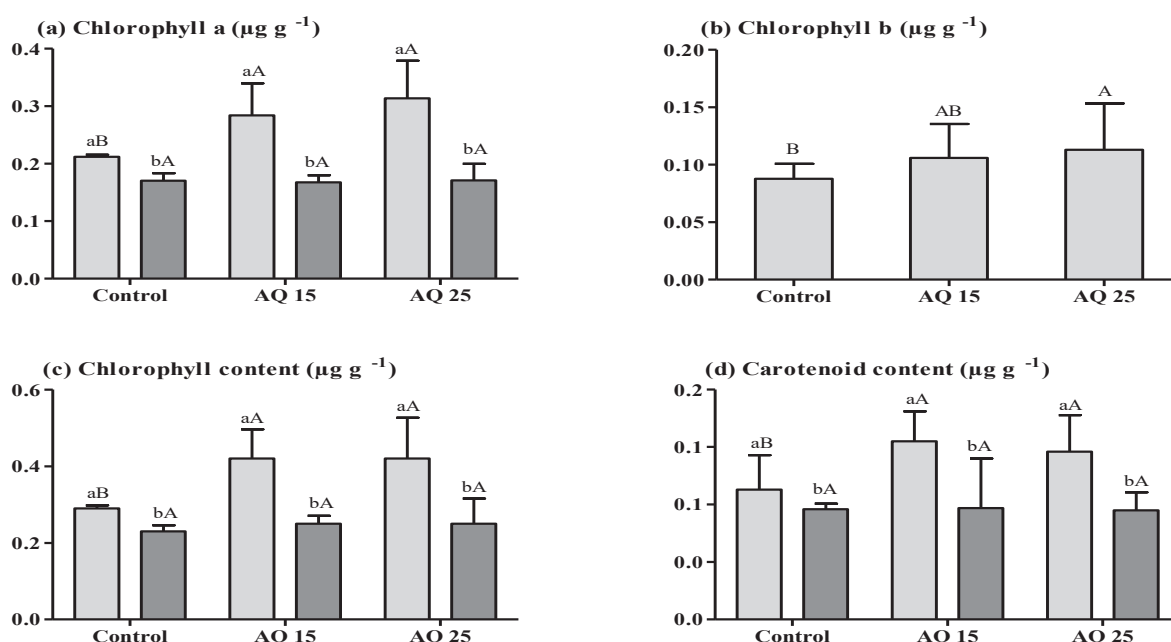


Fig. 4. Chlorophyll *a* (a), chlorophyll *b* (b), total chlorophyll content (c), carotenoid content (d) of ‘Clara’ and ‘Cristal’ potato cultivars submitted to foliar sprays with suspensions of the microalgae *A. quadricellulare* biomass (AQ) by weekly and biweekly frequency. Light gray column: ‘Cristal’; dark gray column: ‘Clara’. Treatments: control; 0.15 g L⁻¹ (AQ 15) and 0.25 g L⁻¹ (AQ 25). Lower case letters in the column: cultivars; capital letters in the column: treatments. Means followed by the same letter in different columns do not differ statistically by Tukey’s test ($p < 0.05$).

The sugar contents in leaves and tubers were affected by AQ sprays. A remarkable increase of 85.70% and 83.86% was found in AQ 15 and AQ 25, respectively, on average for both cultivars comparing to the control. The foliar contents of reducing sugars show an interaction between cultivar and treatments. When ‘Cristal’ received AQ 15, this trait had an increase of 92.46% over the control. On the other hand, AQ 15 and AQ 25 promoted an increase of 81.15% and 97.29% in foliar reducing sugars in the ‘Clara’ cultivar, over the control. As for total sugars in

tubers, a triple interaction was observed among factors, with significant difference observed for AQ treatments, particularly on AQ 15, showing an incremente above the control at both frequencies (Fig. 5).

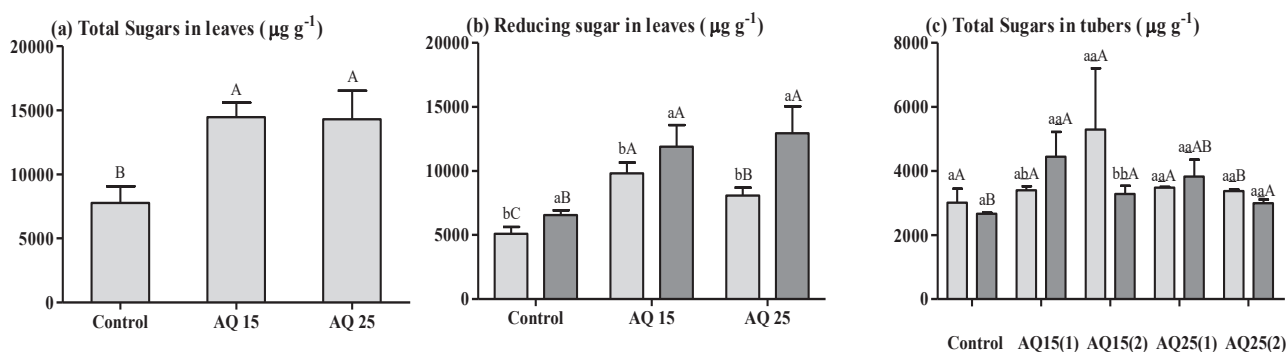


Fig. 5. Total sugars in leaves (a), reducing sugars in leaves (b), total sugars in tubers (c) of potato cultivars 'Clara' and 'Cristal' submitted to foliar sprays with suspensions of the microalgae *A. quadricellulare* biomass (AQ). Light gray column: 'Cristal'; dark gray column: 'Clara'. Treatments: control; 0.15 g L⁻¹ (AQ 15) and 0.25 g L⁻¹ (AQ 25). Frequencies: weekly (1), biweekly (2). Lower case letters in the column: cultivars; capital letters in the column: treatments; underlined letters in the column: frequencies. Means followed by the same letter in different columns do not differ by Tukey's test ($p < 0.05$).

The total free amino acid contents presented interactions among cultivars and treatments. Both AQ treatments promoted free amino acid increases in 'Cristal' leaves, highlighting AQ 15 with 40.37% over the control. While in the tubers, AQ 15 and AQ 25 increased for both cultivars by 16.77% and 14.98%, on average, the free amino acid content, respectively (Fig. 6). The enzyme nitrate reductase activity in leaves shows interaction among cultivars and treatments, where AQ 25 improved the enzyme activity by 49.57% in the 'Clara' cultivar (Fig. 6).

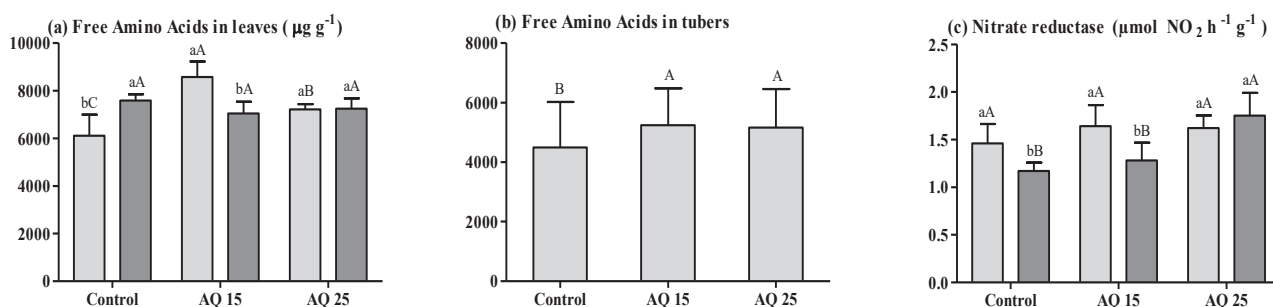


Fig. 6. Free amino acids in leaves (a), free amino acids in tubers (b), enzyme nitrate reductase activity (c) of potato cultivars 'Cristal' and 'Clara' submitted to foliar sprays with suspensions of the microalgae *A. quadricellulare* biomass (AQ). Light gray column: 'Cristal'; dark gray column: 'Clara'. Treatments: Treatments: control, 0.15 g

L⁻¹ (AQ 15) and 0.25 g L⁻¹ (AQ 25) by weekly and biweekly frequency. Lower case letters in the column: cultivars; capital letters in the column: treatments. Means followed by the same letter in columns do not differ by Tukey's test ($p < 0.05$).

The number of tubers presented a significant interaction among cultivars and treatments, where AQ 15 and AQ 25 showed increments of 29.61% and 28.46% for 'Cristal', respectively, and AQ 25 showed an increment of 20.56% for 'Clara', over the control. As a consequence of improvements in the number of tubers (Fig. 7) and tuber mass for 'Clara' (Table 4), the highest yield was achieved in average for both cultivars and frequencies, with AQ 15 and AQ 25 increasing yield by 17.48% and 19.07%, respectively (Fig. 7).

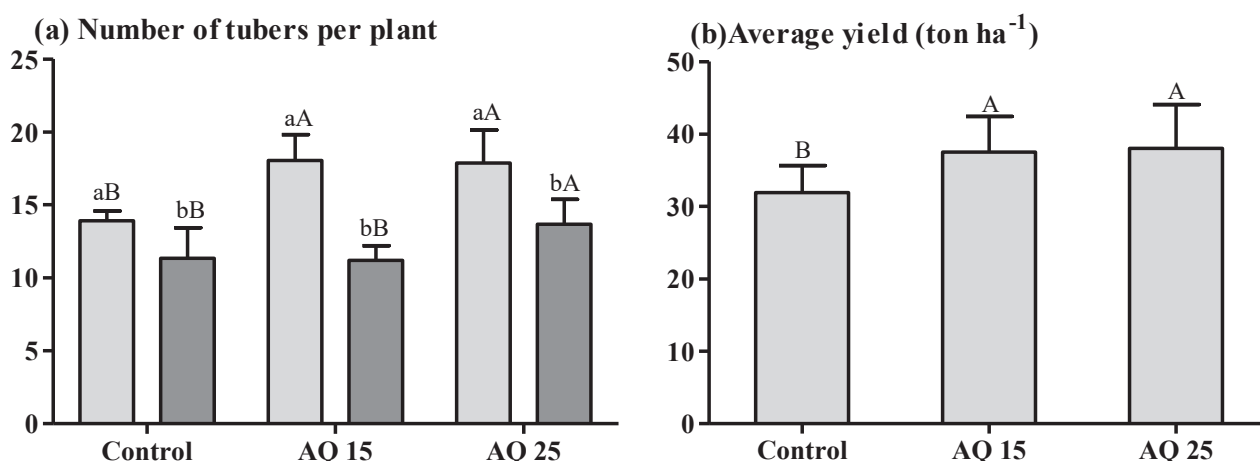


Fig. 7. Number of tubers per plant (a) and average yield (b) of potato cultivars 'Cristal' and 'Clara' submitted to foliar sprays of suspensions of the microalgae *A. quadricellulare* biomass. Light gray column: 'Cristal', dark gray column: 'Clara'. Treatments: control, 0.15 g L⁻¹ (AQ 15) and 0.25 g L⁻¹ (AQ 25). Lower case letters in the column: cultivars, capital letters in the column: treatments. Means followed by the same letter do not differ by Tukey's test ($p < 0.05$).

4. Discussion

4.1. Bioassay

Green microalgae (Chlorophyta) are photosynthetic organisms largely studied due to their commercial importance as a source of high protein content, vitamins, essential free l-amino acids, polysaccharides, and fatty acids (Parisi et al. 2009; Assis et al. 2012; Machado et al. 2014). The genus *Asterarcys* has the abovementioned characteristics in its composition (Ghosh et al. 2017).

The bioassay identified the bioactivity of *A. quadricellulare* by stimulating the expansion of tomato hypocotyls (Fig. 1). This improvement can be associated with

the presence of bioactive molecules in microalgae biomass (Mogor et al. 2017), such as free l-amino acids capable of promoting plant growth (Teixeira et al. 2017; Mogor et al. 2018). Thus, the intrinsic characteristics of the microalgae, including the set of free l-amino acids identified in *A. quadricellulare* (CCAP 294/1) (AQ) (Table 1), may act as a bioactive compound (Ronga et al. 2019) explaining, at least in part, the responses observed in the bioassay.

4.2. Experiment I

At the field in the first season, the sprays with AQ, mainly of AQ 5, AQ 15, and AQ 25, increased the yield by 34.66%, 51.44%, and 62.78%. These results could be related to a greater leaf expansion (Table 2) and increase in chlorophyll index (Fig. 2a), thus increasing the mass in commercial class tubers (Table 3) and higher levels of soluble solids (Fig. 2), as the potato plants with greater photosynthetic assimilation can produce and transport more carbohydrates to tubers (Braun et al. 2010, 2016). The leaf expansion of potato plants subjected to foliar sprays with free l-amino acids leading to increases in chlorophylls, tuber mass, and sugars resulting in yield gains also was reported by Roder et al. (2018), using free l-amino acids obtained from bacterial fermentation.

According to Nardi et al. (2016), amino acid-based biostimulants can improve the total soluble protein content in plants, promote better nitrogen assimilation, and stimulate the metabolism of amino acids, as observed in this study when a higher content of total free amino acids was found in leaves and tubers of plants treated with AQ 25 (Fig. 2). These results indicate that the microalga *A. quadricellulare* (CCAP 294/1), regarding its free l-amino acid content, can enhance chlorophyll synthesis, as well as signaling for the amino acid assimilation chain, consequently increasing leaf and tuber expansion, as well as sugar and amino acid accumulation.

In most microalgae species, glutamate and glutamine (glutamic acid) generally constitute a large proportion of the total free amino acid content (Xupeng et al. 2017), as found in *A. quadricellulare* with 4.27% (Table 1). The amino acid profile of the microalga may be related to the response of *A. quadricellulare*-treated plants concerning their amino acid contents, taking into account that glutamate plays a central role in the metabolism of amino acids, being the substrate for their synthesis. In addition, l-glutamic acid drives chlorophyll synthesis and activation (Beale et al. 1975; Yaronskaya et al. 2006).

4.3. Experiment II

To better explore the *A. quadricellulare* effects on potato, in the second season, AQ 15 and AQ 25 were tested over two cultivars and two spray frequencies.

Corroborating the effects of *A. quadricellulare* in chlorophyll index (Fig. 2a), the chlorophyll and carotenoid contents were improved by AQ 15 and AQ 25 mainly in 'Cristal' (Fig. 4). The level of the sugars was also increased in plants treated with *A. quadricellulare* (Fig. 5), being possible to relate higher levels of sugars to higher levels of chlorophyll and, consequently, to the higher yield which was found in the experiment (Fig. 7).

Total free amino acids in the leaves showed a significant difference in the *A. quadricellulare*-treated plants, where 'Cristal' cultivar showed higher values by 40.37% with AQ 15, while for total free amino acids of tubers, an increase of 16.77% and 14.98% was observed when plants received AQ 15 and AQ 25, respectively (Fig. 6).

In the composition of green microalgae extracts, the amount of bioactive compounds may vary according to the strains and production system. In general, among their free amino acid content, the L-glutamic acid composes the highest percentage (Castro et al. 2017; Lu et al. 2019), which was also observed in *A. quadricellulare* biomass (Table 1). This L-amino acid participates in many metabolic pathways, being considered a key component in plant growth and development since it is a precursor to other amino acids produced through transamination (Forde and Lea 2007; Nunes-Nesi et al. 2010), therefore being bioactive to promote potato plant growth and development through foliar sprays (Roder et al. 2018).

In nitrogen assimilation, nitrate (NO_3^-) is converted into a more energetic form, nitrite (NO_2^-). This reaction is catalyzed by the nitrate reductase enzyme (Pratelli and Pilot 2014), where the AQ 25 in the 'Clara' cultivar led to an increase of 49.57% in this enzyme activity (Fig. 6). This enzyme activity is regulated by several internal and external signals, such as light, ATP, and NADPH. These last two molecules are produced during photosynthesis and regulated by C and N metabolites such as sucrose and glutamine (Nunes-Nesi et al. 2010; Pratelli and Pilot 2014). In general, this enzyme reaches its maximum capacity when the leaf reaches its maximum expansion (Marschner 2012), as found in *A. quadricellulare* treatments.

As a consequence of the biochemical triggering induced by *A. quadricellulare* sprays, effects supported by the data obtained over 2 years in the field; the number

of tubers was improved followed by increments in tuber mass. Because of those improvements related to *A. quadricellulare* bioactivity, a yield gain greater than 15% was achieved on average for both cultivars and frequencies.

5. Conclusion

The microalga *A. quadricellulare* (CCAP 294/1) showed bioactivity in the bioassay and promoted yield gains in two potato growth seasons, triggering biochemical changes that improved chlorophyll, amino acids, sugars, and enzyme activity. These findings demonstrate that this microalga effectively stimulates plant growth, development, and nitrogen assimilation, highlighting it as a potential source for biofertilizers. Further *omics* approaches, such as genomics and transcriptomics, could contribute to a better understanding of the signaling processes triggered by *A. quadricellulare* in plants.

References

- Alvarez AL, Weyers SL, Goemann HM, Peyton BM, Gardner RD (2021) Microalgae, soil and plants: a critical review of microalgae as renewable resources for agriculture. *Algal Res* 54:102200
- Assis LM, Zavareze ER, Prentice-Hernandez C, Souza-Soares LA (2012) Revisao: caracteristicas de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. *Braz J Food Technol* 15:99–109
- Beale S, Gough SP, Granick S (1975) Biosynthesis of delta-aminolevulinic acid from the intact carbon skeleton of glutamic acid in greening barley. *Proc Natl Acad Sci* 72:2719–2723
- Borowitzka MA (2013) High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *J Appl Phycol* 25:743–756
- Braun H, Fontes PCR, Finger FL, Busato C, Cecon PR (2010) Carboidratos e matéria seca de tubérculos de cultivares de batata influenciados por doses de nitrogênio. *Cienc Agrotec* 34:285–293
- Braun H, Fontes PCR, Silva TP, Finger FL, Cecon PR, Ferreira APS (2016) Carbohydrates concentration in leaves of potato plants affected by nitrogen fertilization rates. *Rev Ceres* 63:241–248
- Bumandalai O, Tserennadmid R (2019) Effect of *Chlorella vulgaris* as a biofertilizer on germination of tomato and cucumber seeds. *Int J Aquat Biol* 7:95–99

- Castro PRC, Carvalho MEA, Mendes ACCM, Angelini BG (2017) Manual de estimulantes vegetais: nutrientes, biorreguladores, bioestimulantes, bioativadores, fosfitos e biofertilizantes na agricultura tropical. Agronomica Ceres, Piracicaba
- Embrapa (2008) Batata cristal. <https://www.embrapa.br/en/buscade-publi-cacaoes/-/publi-cacao/745285/batata-cristal>. Accessed 10 April 2021
- FAO (2020) Food and Agriculture Organization's Statistics. <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. Accessed 2 Dec 2020
- FAO/WHO (1991) Evaluation of protein quality. Report of the joint FAO/WHO expert consultation on protein quality evaluation. Food and Agriculture Organization/World Health Organization, Rome
- Forde BG, Lea PJ (2007) Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signaling. *J Exp Bot* 58:2339–2358
- Gemin LG, Mogor AF, Amatussi JO, Mogor G (2019) Microalgae associated to humic acid as a novel biostimulant improving onion growth and yield. *Sci Hort* 256:108560
- Ghosh A, Khanra S, Mondal M, Halder G, Tiwari ON, Bhowmick TK, Gayen K (2017) Effect of macronutrient supplements on growth and biochemical compositions in photoautotrophic cultivation of isolated *Asterarcys* sp. (BTA9034). *Energy Convers Manag* 149:39–51
- Hagen SR, Frost B, Augustin J (1989) Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid-chromatography of amino-acids in food. *JAOAC* 72:912–916
- Ishaq AG, Matias-Peralta HM, Basri H (2016) Bioactive compounds from green microalga-*Scenedesmus* and its potential applications: a brief review. *Pertanika J Trop Agric Sci* 39:1–16
- Jaworski EK (1971) Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 43:1274–1279
- Lichtenthaler HK, Buschmann C (2001) Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV–VIS spectroscopy. *Curr Protoc Food Anal Chem* F4.3.1–F4.3.8
- Lu K, Zhao X, Ho SH, Ma R, Xie Y, Chen J (2019) Biorefining and the functional properties of proteins from lipid and pigment extract residue of *Chlorella pyrenoidosa*. *Mar Drugs* 17:454
- Lucas B, Sotelo A (1980) Effect of alkalies, temperature and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and of food. *Anal Biochem* 109:192–197

- Machado AR, Assis LM, Machado MIR, Souza-Soares LA (2014) Importance of lecithin for encapsulation processes. *Afr J Food Sci* 8:176–183
- Magne C, Larher F (1992) High sugar content interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Anal Biochem* 200:115–118
- Maldonado IR, Carvalho PGB, Ferreira NA (2013) Protocolo para a Determinacao de Acucares Totais em Hortalicas pelo Metodo de DNS. Comunicado Tecnico 85, Embrapa
- Marschner P (2012) Marchner's mineral nutrition of higher plants. Waltham, London
- Mogor AF, Amatussi JO, Mogor G, Lara GB (2018) Bioactivity of cyanobacterial biomass related to amino acids induces growth and metabolic changes on seedlings and yield gains of organic red beet. *Am J Plant Sci* 9:996–978
- Mogor AF, Barbizan T, Pauletti V, Oliveira J, Bettoni MM (2013) Teores de clorofila em cultivares de tomateiro submetidas a aplicações foliares de magnésio. *Pesq Agropec Trop* 43:363–369
- Mogor AF, Ordog V, Lima GPP, Molnar Z, Mogor G (2017) Biostimulant properties of cyanobacterial hydrolysate related to polyamines. *J Appl Phycol* 30:453–460
- Morris HJ, Almarales A, Carrillo O, Bermudez RC (2008) Utilisation of *Chlorella vulgaris* cell biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. *Bioresour Technol* 99:7723–7729
- Nardi S, Pizzeghello D, Schiavon M, Ertani A (2016) Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzedbased products and humic substances in plant metabolism. *Sci Agric* 73:18–23
- Nunes-Nesi A, Fernie AR, Stitt M (2010) Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. *Mol Plant* 3:973–976
- Parisi AS, Younes S, Reinehr CO, Colla LM (2009) Avaliacao da atividade antibacteriana da microalga *Spirulina platensis*. *Rev C Farm Bas Apl* 30:297–301
- Pratelli R, Pilot G (2014) Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. *J Exp Bot* 65:5535–5556
- Renuka N, Guldhe A, Prasanna R, Singh P, Bux F (2018) Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges. *Biotechnol Adv* 36:1255–1273
- Ribeiro GHMR, Samarini CQ, Silva LFL, Vieira SD, Resende LV (2017) Cultivares. In: Nick C, Borem A (ed) *Batata: do plantio a colheita*. UFV, Vicosa

- Roder C, Mogor AF, Szilagyi-Zecchin VJ, Gemin LG, Mogor G (2018) Potato yield and metabolic changes by use of biofertilizer containing L-glutamic acid. *Com Sci* 9:211–218
- Ronga D, Biazzi E, Parati K, Carminati D, Carminati E, Tava A (2019) Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions. *Agron* 9:192
- Show KY, Lee DJ, Tay JH (2015) Microalgal drying and cell disruption- recent advances. *Bioresour Technol* 184:258–266
- Silva FAS, Azevedo CAV (2016) The Assistat software version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *Afr J Agric* 11:3733–3740
- Stirk WA, Balint P, Vambe M, Lovasz C, Molnar Z, van Staden J, Ordog V (2020) Effect of cell disruption methods on the extraction of bioactive metabolites from microalgal biomass. *J Biotech* 307:35–43
- Stirk WA, Ordog V, Novak O, Rolčik J, Balint MSP, van Staden J (2013) Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains. *J Phycol* 49:459–467
- Stirk WA, Ordog V, Van Staden J, Jager K (2002) Cytokinin and auxin like activity in Cyanophyta and microalgae. *J Appl Phycol* 14:215–221
- Teixeira WF, Fagan EB, Soares LH, Umburanas RC, Reichard K, Neto DD (2017) Foliar and seed application of amino acids affects the antioxidant metabolism of the soybean crop. *Front Plant Sci* 8:327
- White JA, Hart RJ, Fry JC (1986) An evaluation of the waters picotag system for the amino-acid-analysis of food materials. *J Anal Methods Chem* 8:170–177
- Winters AL, Lloyd JD, Jones R, Merry RJ (2002) Evaluation of a rapid method for estimating free amino acids in silages. *Anim Feed Sci Tech* 99:177–187
- Xupeng C, Song X, Xuran F (2017) Amino acid changes during energy storage compounds accumulation of microalgae under the nitrogen depletion. In: Asao T, Asaduzzaman M (eds) *Amino acid - new insights and roles in plant and animal*. Intech Open, Riejeke pp 197–208
- Yaronskaya E, Vershilovskaya I, Poers Y, Alawady AE, Averina N, Grimm B (2006) Cytokinin effects on tetrapyrrole biosynthesis and photosynthetic activity in barley seedlings. *Planta* 224:700–709
- Zhao ZR, Wu ZL, Huang GQ, Li GR (1992) An improved disk bioassay for determining activities of plant growth regulators. *J Plant Growth* 11:209

3 CAPÍTULO 2 – MICROALGA BIOFERTILIZER TRIGGERS METABOLIC CHANGES IMPROVING ONION GROWTH AND YIELD



horticulturae



Article

Microalga Biofertilizer Triggers Metabolic Changes Improving Onion Growth and Yield

Ely Cristina Negrelli Cordeiro, Átila Francisco Mógor *, Juliana de Oliveira Amatussi, Gilda Mógor, Gabriel Bocchetti de Lara and Harielly Marianne Costa Marques

Horticulturae 2022, 8, 223. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8030223>

Received: 10 February 2022 / Revised: 23 February 2022 / Accepted: 26 February 2022 / Published: 4 March 2022

Abstract

Seeking the development of nature-friendly agronomic techniques, the use of natural sources to promote plant growth and increase agricultural yield has gained relevance. In this context, the use of biofertilizers or biostimulants obtained from microalgae has been studied, as these microorganisms have in their composition a great diversity of bioactive molecules. This study aimed to evaluate the effect of microalga *Asterarcys quadricellulare* (CCAP 294/1) on organic onion production, verifying its action on metabolism, growth and yield of two cultivars. Thus, two experiments were carried out: (i) foliar applications on onion plants grown in pots in a greenhouse; (ii) foliar applications on field-grown onion under an organic system. Both experiments were undertaken using solutions with spray-dried microalga biomass at concentrations of 0.05, 0.15, 0.25 and 0.4 g L⁻¹. Biometric variables, yield of bulbs and biochemical variables were evaluated indicating that the use of *A. quadricellulare* promoted plant growth and increases in bulb caliber and yield of both onion cultivars. The microalga biomass stimulated plant metabolism by increases in contents of chlorophyll, carotenoids, amino acids, and the nitrate reductase enzyme activity in leaves, also free amino acids and total sugar contents in bulbs, highlighting the biomass concentration of 0.25 g L⁻¹.

Keywords: *Allium cepa* L.; *Asterarcys quadricellulare*; biostimulant.

1. Introduction

Organic agriculture uses methods that minimize damage to the environment, producing food sustainably [1]. In this sense, the use of biofertilizers has expanded its applicability and may contribute to an increase in yield [2,3].

Recently, numerous species of microalgae have been studied for their plant growthpromoting effect linked to their use as biofertilizers and biostimulants [4] especially associated with several bioactive compounds present in these organisms, such as polysaccharides, glycosides, phytohormones, polyamines, lipids, and free L-amino acids [3,5–9].

As examples, the use of the green microalgae (Chlorophyta) *Chlorella vulgaris* promoted growth in corn and wheat plants [10,11]. In lettuce, *C. vulgaris* increased protein content and leaf mass [12], and higher onion bulb caliber and yield were obtained using the Chlorophyta *Scenedesmus subspicatus* [4]. In tomatoes, the use of *Acutodesmus domorphus* applied to seedlings promoted biomass accumulation and flowering [13]. In addition, the bioactivity of a biomass hydrolysate from the cyanobacteria *Asthirospira platensis* in bioassays was identified, promoting growth and production of lettuce [6]. The use of *A. platensis* also showed bioactivity in bioassays and increased sugar beet production in organic systems by using foliar sprays [7].

The microalgae Chlorophyta *Asterarcys quadricellulare* (AQ) is a source for the production of carotenoids [14] and shows high protein and carbohydrate contents [15], therefore, presenting potential for application as a biofertilizer.

Onion (*Allium cepa*) is the third most produced and consumed vegetable in the world, considered as of great economic importance. Brazil is the 12th largest onion producer worldwide, with 1,550,000 tons in 2018 [16].

In this context, this work aimed to evaluate the use of the microalgae *A. quadricellulare* biomass verifying its action on metabolism, growth and yield of two onion cultivars.

2. Material and Methods

The following experiments were performed: (i) foliar sprays of *A. quadricellulare* spraydried biomass on onion plants grown in pots in a greenhouse determining biochemical alterations and biometric variables of growth; (ii) foliar sprays on organic field-grown onion plants; determining classification and yield of bulbs, as well as biochemical variables in leaves (chlorophyll, carotenoids, amino acids and the activity of the enzyme nitrate reductase) and in bulbs (free amino acids and total sugars).

2.1. Microalga Source and Treatments

The microalga *Asterarcys quadricellulare* (CCAP 294/1) biomass from Alltech Crop Sciences, Brazil, is a fine greenish powder obtained by spray drying method from mixotrophic cultivation. The L-free amino acids concentration in the biomass was of 90.94 mg g⁻¹, equivalent to 9% in mass, determined using 0.1 mg of dry biomass diluted in 1.7 ml of 80% ethanol preparing an extract from which 1.0 mL was diluted in distilled water [17]. The colorimetric reaction was also carried out [18]. The biomass was diluted in suspensions containing the following concentrations: 50, 150, 250 and 400 g L⁻¹, from which the 1 mL aliquot was removed, diluted in one liter of distilled water, giving rise to treatment equivalent to concentrations of 0.05 g L⁻¹ (AQ 5), 0.15 g L⁻¹ (AQ 15), 0.25 g L⁻¹ (AQ 25), and 0.4 g L⁻¹ (AQ 40).

2.2. Study area, Cultivars and Seedling Production

The experiment was performed in an organic system at the Experimental Station on Canguiri farm of the Federal University of Paraná UFPR, at latitude 25°23'03" south and longitude 49°07'03" west, average altitude of 920 m, state of Paraná, Brazil. The region's climate is temperate, humid, mesothermal, cfb-type, according to Koppen's classification.

Two onion cultivars were used for the experiment. The cultivar Alvará (Bejo®), with early maturation, high productivity, vigorous leaves growth, with good waxiness, gives it great versatility in terms of planting time. Its cycle lasts from 130 to 150 days and its sowing is recommended between May and June. The hybrid cultivar Perfecta (Topseed®) has high yield potential, good tolerance to diseases and excellent bulb quality, vigorous leaves, good waxy and dark green colored leaves. It is a short-day hybrid, with good tolerance to early bolting. Its cycle is 130–150 days, with sowing time indicated for the southern region from April to July.

In mid-May 2018, cultivars were sown in beds under plastic-covered high type tunnels. At 60 days after sowing (DAS), when transplanting was carried out, the seedlings had five leaves and pseudostem diameters of 4 mm.

2.3. Pot Experiment

The onion seedlings were transplanted into 3 L polyethylene pots containing a substrate on the basis of pine bark, peat, expanded vermiculite, enriched with macro

and micronutrients (Tropstrato®) combined with organic fertilizer (Provaso®), with a proportion of 1:1. The substrate presented the following chemical analysis: pH (CaCl₂) = 6.63; pH SMP = 7.03; Al³⁺ = 0; H⁺ + Al³⁺ = 2.31 cmol dm⁻³; Ca²⁺ = 12.34 cmol dm⁻³; Mg²⁺ = 3.52 cmol dm⁻³; K⁺ = 1.95 cmol dm⁻³; P = 193.81 mg dm⁻³; C = 55.21 g dm⁻³; base saturation = 88.5% and CEC = 20.12 cmol dm⁻³; Cu = 1.95 mg kg⁻¹; Mn = 31.80 mg kg⁻¹; Fe = 29.77 mg kg⁻¹; Zn = 2.30 mg kg⁻¹; B = 0.34 mg kg⁻¹; S = 141.12 mg kg⁻¹. Additionally, 3 cm³ of expanded vermiculite was added to the top of the pots. The pots were placed in a greenhouse, with drip irrigation to maintain humidity at 80% of the substrate's water holding capacity, measured with a tensiometer.

The biomass of *Asterarcys quadricellulare* (AQ) was suspended at the following concentrations: 50, 150, 250, and 400 g L⁻¹. An aliquot of 1 mL L⁻¹ was withdrawn from each suspension and diluted in distilled water, resulting in solutions with biomass concentrations of 0.05 g L⁻¹ (AQ 5), 0.15 g L⁻¹ (AQ 15), 0.25 g L⁻¹ (AQ 25), and 0.4 g L⁻¹ (AQ 40).

The foliar sprays started at 40 days after transplanting (DAT), with a weekly interval, totaling eight applications until the plants were collected, using a Kawashima® (Tokyo, Japan) electronic sprayer at pressure of 40 psi. The sprays volume varied from 5 mL plant⁻¹ (1st to 3rd applications) to 10 mL plant⁻¹ (4th to 6th applications) and 15 mL plant⁻¹ (7th and 8th applications), with increments following the plant growth.

At 90 DAT, to check the AQ effect on biomass accumulation and plant growth at the beginning of bulbification, all plants of both cultivars were collected for biometric evaluations of fresh mass and length of leaves, pseudostem diameter, and determinations of chlorophyll, sugars, amino acids and nitrate reductase enzyme activity in leaves.

With completely randomized design and factorial scheme, the experiment was run with four replications (n = 4), each consisting of four pots containing two plants per pot.

2.4. Field Experiment

Simultaneously to the experiment in greenhouse, the field experiment was conducted in the organic vegetables area described above, in a Red-Yellow latosol soil of médium texture [19].

The chemical analysis of the soil at the beginning of experiment in the 0–20 cm layer indicated the mean values of: pH (CaCl₂) = 5.84; pH H₂O = 6.71; Al³⁺ = 0; H + Al³⁺ = 2.93 cmolc dm⁻³; Ca²⁺ = 5.28 cmol cdm⁻³; Mg²⁺ = 3.05 cmol cdm⁻³; K⁺ = 1.32 cmolc dm⁻³; P (Mehlich) = 49.0 mg dm⁻³; S = 33.49 mg dm⁻³; C = 26 g dm⁻³; %; V% = 76.7 and CEC = 12.58 cmolc dm⁻³. Sprinkler irrigation was used to maintain the soil moisture at 80% and checked with a tensiometer.

One week before seedling transplantation, soil tillage was performed with the incorporation of 8 t.ha⁻¹ of organic compost with the following average values: C = 30.3 g kg⁻¹; N = 30.3 g kg⁻¹; P = 8.5 g kg⁻¹; K = 6.6 g kg⁻¹; Ca = 8.1 g kg⁻¹; Mg = 4.1 g kg⁻¹, following the Brazilian regulations for organic farming.

The onion seedlings of Alvará and Perfecta cultivars were transplanted in beds measuring 1.20 x 24 m, with a spacing of 30 cm between rows and 10 cm between plants, distributed in four planting rows, equivalent to a plant population of 240,000 per hectare.

The treatments consisted of foliar sprays of microalgae suspensions as described in the pot experiment. Ten applications were carried out using a 10 L Kawashima® electronic backpack sprayer, with an application rate of 400 L ha⁻¹, at intervals of 7 days. The experiment was established in a completely randomized design in a factorial scheme (A: two cultivars x B: 5 treatments, with 4 replications (n = 4)), totaling 40 plots with 60 plants (1.20 x 1.50 m).

At 120 DAT, leaves were collected for biochemical analysis at around 9 a.m. and 10 a.m., with five onion plants randomly chosen per plot and the four central leaves of these plants were collected.

At 135 DAT, at proper harvest time with about 80% of the plants presenting pseudostem collapse, 20 bulbs per plot were collected to determine the yield in commercial classes: class IV (70–90 mm) and class III (50–70 mm) according to the Brazilian Market rules for onion classification, extrapolating to the population of plants per hectare [4]. The presentation of class data was based on the mass of bulbs (g) shown in classes III and IV.

The fresh mass and dry mass of bulbs were also determined in an air-circulating oven at 65 °C until a constant weight was obtained. To determine the biochemical variables of the bulbs, five onion plants were randomly chosen per plot, and the bulbs of these plants were evaluated.

2.5. Biochemical Analysis

After collection, the plant materials were frozen and subsequently macerated. The readings were completed using a spectrophotometer with values expressed in $\mu\text{g g}^{-1}$ of the fresh mass of leaves and bulbs.

The determination of chlorophyll and carotenoids was carried out following [20] with modifications [21]. For extraction of total and reducing sugars from bulbs and leaves [22], samples were obtained by performing acid hydrolysis and after reacting with DNS. The readings were carried out at 540 nm.

The extraction of total free amino acids from leaves and bulbs [17] and colorimetric reaction [18] were performed, with readings carried out at 570 nm. The nitrate reductase enzyme activity was determined in leaves [23], with readings carried out at 540 nm and values expressed in $\mu\text{mol of NO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ of plant material.

2.6. Statistical Treatment

The data were subjected to ANOVA in a 2 x 5 factorial arrangement (cultivars x treatments) and compared by Tukey's test at 5% significance, using the software Assistat 7.7 Beta [24].

3. Results

3.1. Pot Experiment

The fresh mass of leaves presented increases, promoted by AQ 5 and AQ 15 in Alvará of 34.65 and 48.75% over the control, respectively; as well as a remarkable increase was promoted by AQ 5 and AQ 25 in Perfecta, respectively, of 151.87 and 162.73% over the control (Figure 1a). The length of leaves was improved in 18% by AQ 25 at Alvará, and in 20.23, 19.36, and 23.66% by AQ 15, AQ 25, and AQ 40, respectively, in Perfecta (Figure 1b).

The AQ 15, AQ 25, and AQ 40 increased the pseudostem diameter, respectively, of 23.53, 11.9, and 13.85% in Alvará; while AQ 5; AQ 25 and AQ 40 increased the diameter respectively of 23.3; 25.76 and 23.15% in Perfecta.

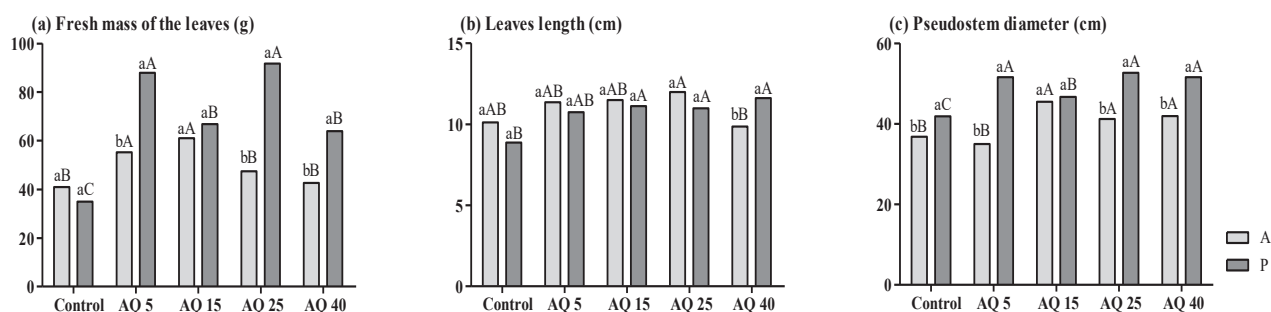


Fig 1. Fresh mass of the leaves (a), Leaves length (b), Pseudostem diameter (c) of onion plants of the Alvará and Perfecta cultivars at 90 DAT (days after transplanting) submitted to foliar sprays of biomass suspensions of microalgae *A. quadricellulare* at different concentrations. Treatments: 0 g.L⁻¹ (Control); 0.05 g.L⁻¹ (AQ 5); 0.15 g.L⁻¹ (AQ 15); 0.25 g.L⁻¹ (AQ 25); 0.4 g.L⁻¹ (AQ 40). Onion cultivars (A = Alvará, P = Perfecta). Low case letters in the column: cultivars; upper case letters in the column: treatments. Means followed by the same letter in the same column do not differ statistically ($p < 0.05$) according to Tukey's test ($n=4$).

In addition to the effects on growth (Figure 1), biochemical changes also occurred. Comparing cultivars, Perfecta had higher chlorophyll content in comparison to Alvará (27%). Comparing treatments, AQ 25 excelled in the cultivar Alvará with 44.71% greater chlorophyll content than the control. AQ 5, AQ 15, AQ 40 in the cultivar Perfecta improved chlorophyll to 34.1, 31.75 and 42.91% (Figure 2a).

For carotenoids, Perfecta presented a concentration 25.5% higher than Alvará. Comparing treatments, AQ 25 showed improved carotenoids content in 59.15% higher than the control in Alvará, and in Perfecta, AQ 5 and AQ 40 promoted, respectively, increases of 19.06 and 27.37% (Figure 2b).

As for the total free amino acid content in leaves, Perfecta showed a concentration 18.92% higher than Alvará. Comparing treatments, AQ 15 promoted an increase of 38.85% in Alvará, while AQ 5, AQ 15, and AQ 40 improved free amino acids of 17.41, 19.89, and 17.08% above the control, respectively, in Perfecta (Figure 2c). For the activity of the nitrate reductase enzyme, no interaction was found among treatments and cultivars. Whereas, there was an effect of treatments, with higher enzyme activity promoted by AQ 25 and AQ 40 in comparison to the control (18 and 23.16%) (Figure 2d).

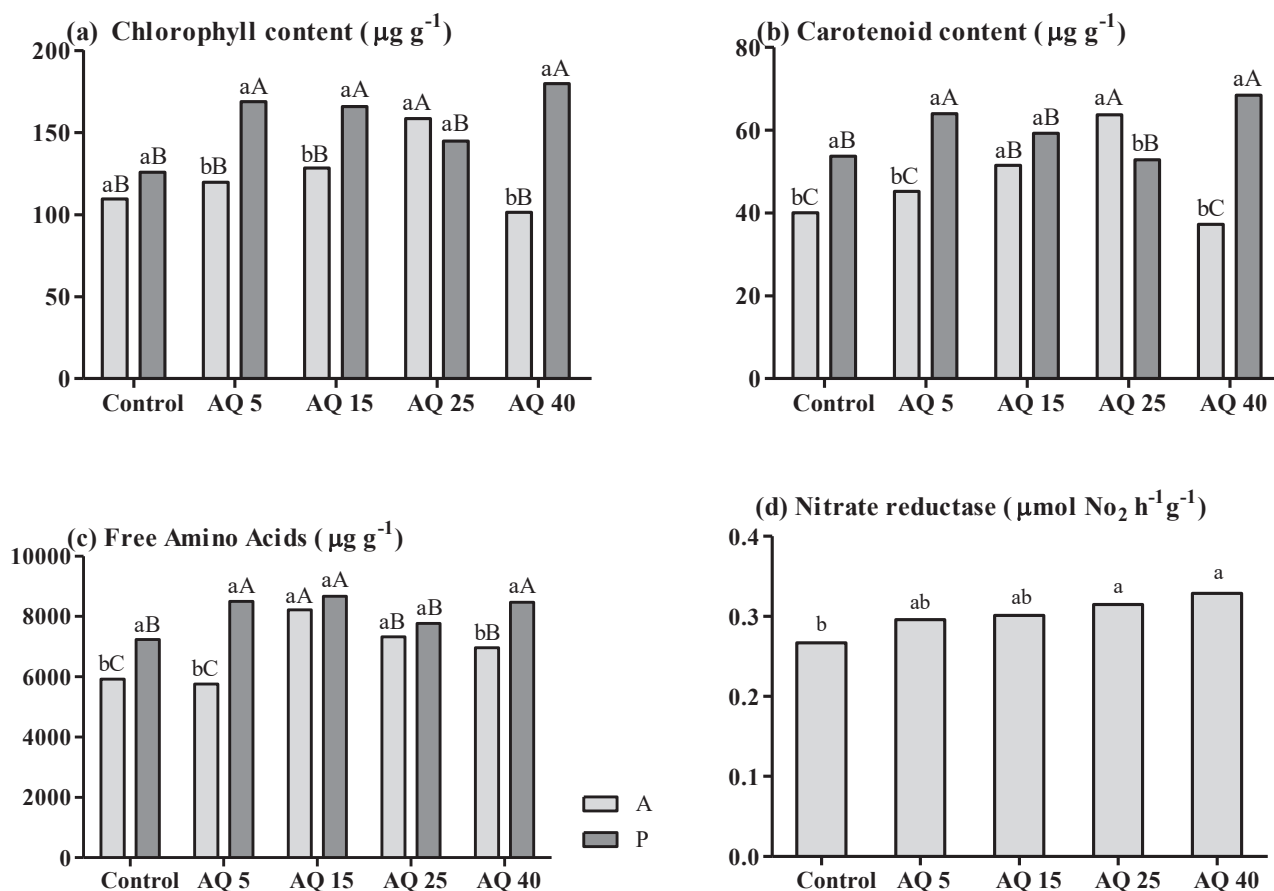


Fig 2. Chlorophyll content (a), Carotenoid content (b), Free amino acids (c) Nitrate reductase (d) in leaves of onion cultivars submitted to foliar applications of biomass suspensions of the microalgae *A. quadricellulare* at different concentrations. Treatments: 0 g.L⁻¹ (Control); 0.05 g.L⁻¹ (AQ 5); 0.15 g.L⁻¹ (AQ 15); 0.25 g.L⁻¹ (AQ 25); 0.4 g.L⁻¹ (AQ 40). Onion cultivars (A = Alvará, P = Perfecta). Lower case letters in the column: cultivars; upper case letters in the column: treatments. Averages followed by the same letter in the same column do not differ statistically among themselves ($p < 0.05$) according to Tukey's test ($n=4$).

3.2. Field Experiment

The data of commercial onion bulbs, class IV (70–90 mm) and class III (50–70 mm), showed in Alvará an interaction among classes and treatments, and a difference between treatments was observed in class IV, particularly at AQ 25 with an increase of 30.19% in this class when compared to the control. In class III, the highest means are found in treatments AQ 15 and AQ 25, with an increase of 16.83 and 11.73%.

The Perfecta showed no interaction among classes and treatments, but all treatments promoted increments in commercial bulbs in comparison to the control (Figure 3b).

Bulb fresh mass did not show an interaction among cultivar and treatment, but differences between treatments were found. The highest means of fresh mass of bulbs were observed in treatments AQ 5, AQ 15, and AQ 25, with an increase of 26, 22.56, and 24.79%, respectively, comparing to the control (Figure 3c). The same was observed for dry mass. The treatments that showed the highest means were AQ 5, AQ 15, and AQ 25, with an increase of 42.42, 49.43, and 47.5% when compared to the control dry mass (Figure 3d).

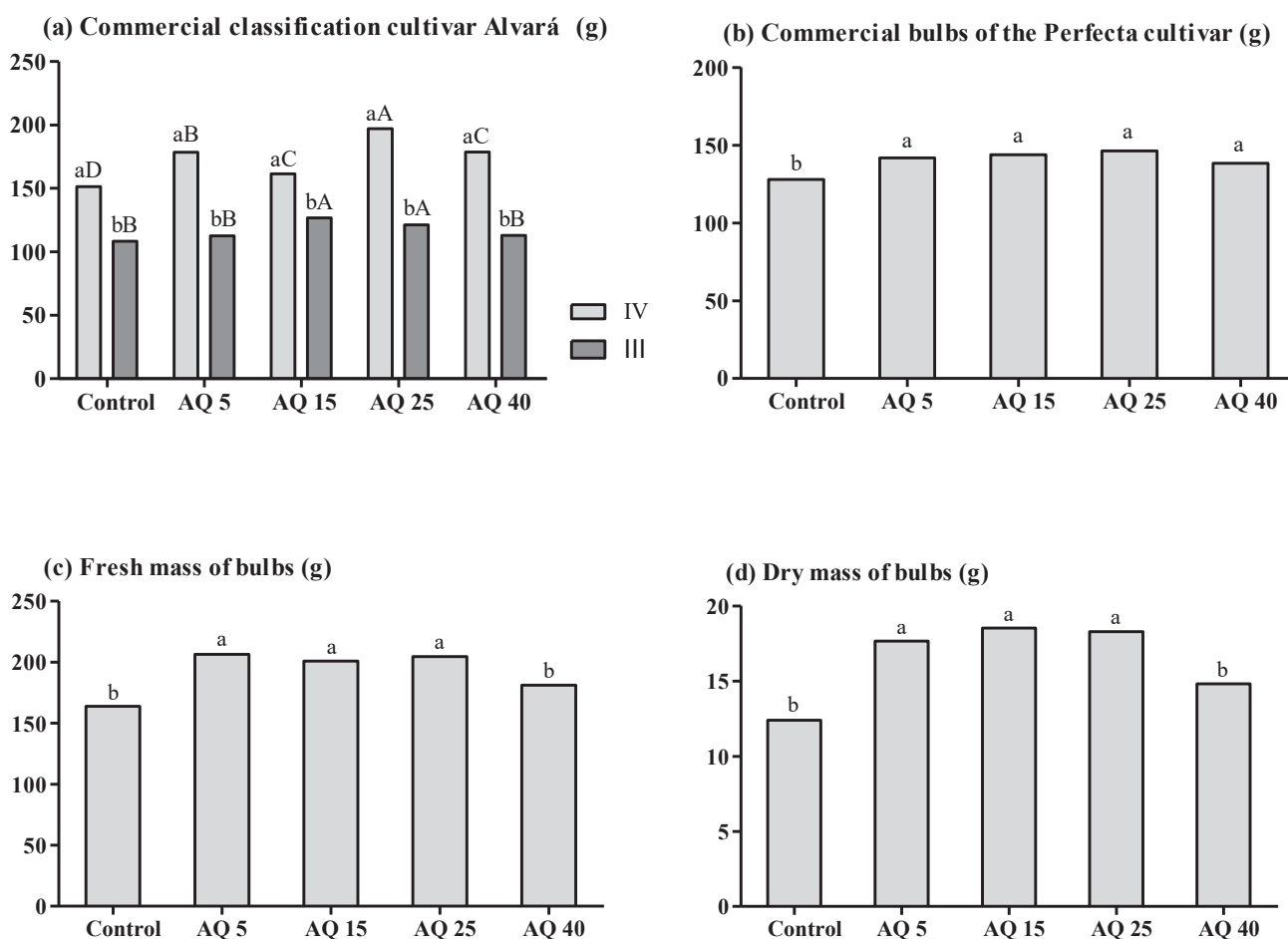


Fig 3. Classification of class III and IV bulbs of the Alvará onion cultivar (a), average classification of class III and IV bulbs of cultivar Perfecta (b), fresh mass of bulbs of the Alvará and Perfecta cultivars (c) dry mass of bulbs of the Alvará and Perfecta cultivars (d) submitted to foliar applications of biomass suspensions of the microalgae *A. quadricellulare* at different concentrations. Treatments: 0 g.L⁻¹ (Control); 0.05 g.L⁻¹ (AQ 5); 0.15 g.L⁻¹ (AQ 15), 0.25 g.L⁻¹ (AQ 25); 0.4 g.L⁻¹ (AQ 40). Class = IV e III. Columns with the same letter do not differ statistically ($p < 0.05$) by Tukey's test ($n = 4$). Capital letters = foliar treatments. Lowercase letters = classes.

As a consequence of the changes in the classification and masses of the bulbs, there were increases in onion yield with the application of the AQ treatments.

In Alvará, AQ25 promoted yield increase of 28.3%, while in Perfecta, the treatments AQ 5, AQ 15, and AQ 25 promoted yield increases by 26.36, 33.26 and 39.97%, respectively (Figure 4). These results demonstrate the effect of *A. quadricellulare* promoting higher masses of commercial bulbs.

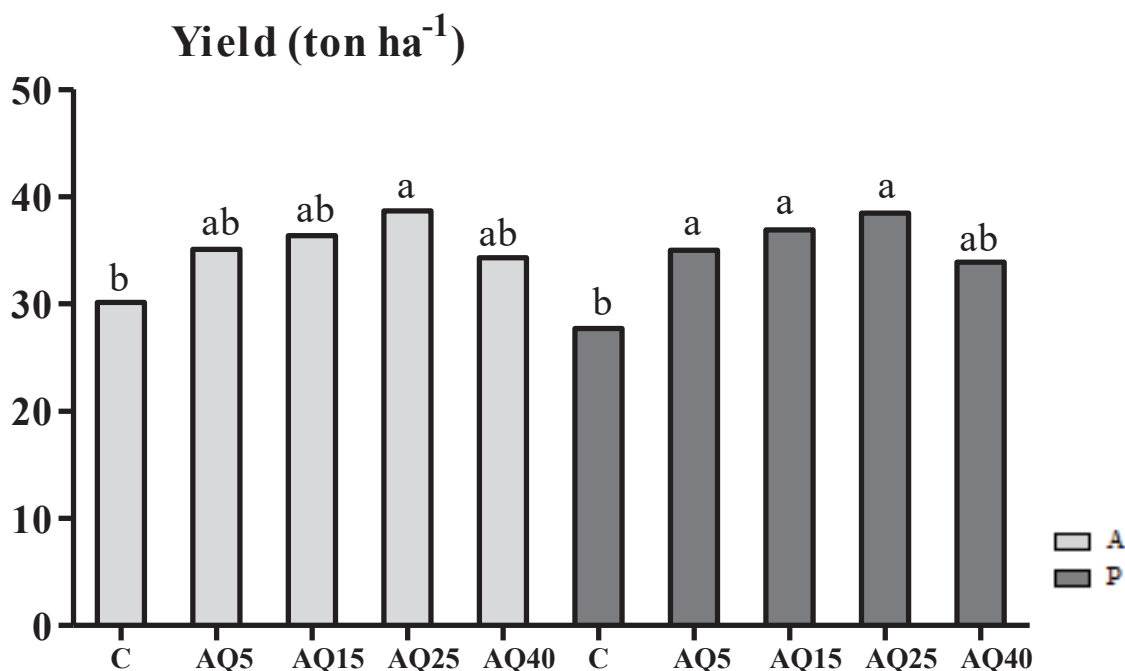


Fig 4. Yield of Alvará and Perfecta onion cultivars submitted to foliar applications of *A. quadricellulare* microalgae biomass suspensions at different concentrations. Treatments: 0 g.L⁻¹ (C); 0.05 g.L⁻¹ (AQ 5); 0.15 g.L⁻¹ (AQ 15), 0.25 g.L⁻¹ (AQ 25); 0.4 g.L⁻¹ (AQ 40). Means followed by the same letter in the same column do not differ statistically ($p < 0.05$) according to Tukey's test ($n=4$).

The yield gains are related to biochemical changes stimulated by sprays with microalga biomass, such as the contents of total free amino acid in leaves, showing an interaction among treatments and cultivars. The AQ 25 stood out in both cultivars, promoting a remarkable 124.67% increase in amino acids in Alvará and 26.79% in Perfecta (Figure 5a).

Related to amino acid metabolism, the Alvará showed higher nitrate reductase enzyme activity in leaves (57.23%). Comparing treatments, AQ 40 promoted an increase of 40.63% in this enzyme activity in Alvará, over to the control. No changes were found in Perfecta (Figure 5c).

In the bulbs, comparing cultivars, Alvará showed amino acid content 112.92% higher than Perfecta at control, indicating better aptitude of this cultivar for amino acid synthesis and accumulation in bulbs. Comparing treatments, AQ25 promoted an

increase of 18.39% in Alvará, while the treatments did not change the amino acid content in Perfecta bulbs (Figure 5d).

Comparing these results to those obtained at early bulbification stage in a pot experiment, a difference among cultivars appears regarding amino acid content and nitrate reductase activity. Perfecta presented the highest content of amino acids in leaves at early stage (Figure 2c), while Alvará at the harvest. Moreover, both cultivars had enzyme activity improved on average by AQ at early stage (Figure 2d), while only Alvará at the harvest (Figure 5c).

The outcome of the total sugars in the leaves at harvest show a 28.89% greater amount of sugars in the cultivar Perfecta compared to the Alvará. Comparing treatments, there were no significant differences among the control and the treatments AQ 5, AQ 25 and AQ 40 in Alvará, and among the control and AQ 25 and AQ 40 in Perfecta. On the other hand, AQ 15 caused a reduction in sugars in leaves of Alvará, as well as AQ 5 and AQ 15 cause reduction in Perfecta (Figure 5c).

It can be seen in the total sugar content of the bulbs that there was a higher concentration in Alvará, with 8.79% higher than Perfecta. The treatments, AQ 5, AQ 15, and AQ 40 promoted higher contents than the control in Alvará (46.05, 63.7 and 61.04%, respectively). In Perfecta, the treatments that presented the highest contents in relation to the control were AQ 5, AQ 15, and AQ 25 (45.3, 66.73 and 37.94%) (Figure 5d). These results indicate that AQ treatments stimulated the source-to-sink flow with sugar accumulation in bulbs, justifying the reduction in contents in leaves (Figure 5c.)

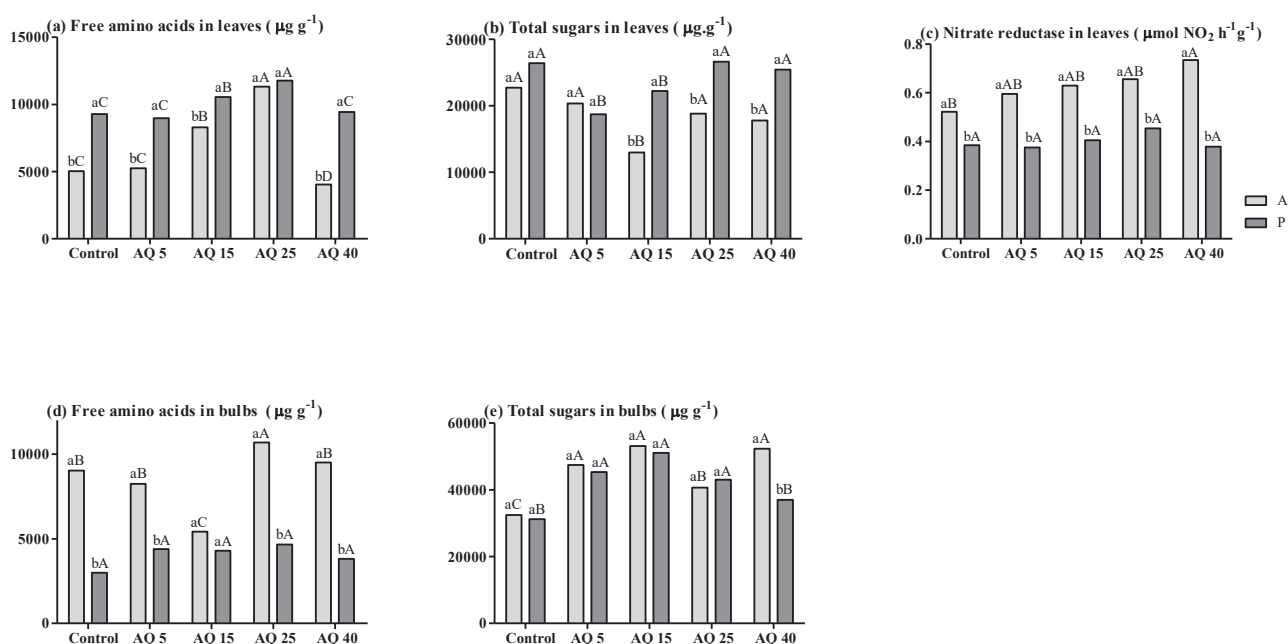


Fig 5. Free amino acids in leaves (a), Total sugars in leaves (b), Enzyme nitrate reductase activity in leaves (c), Free amino acids in bulbs (d) Total sugars in bulbs (e) in onion cultivars at 135 DAT submitted to foliar applications of biomass suspensions of the microalgae *A. quadricellulare* at different concentrations. Treatments: 0 g.L⁻¹ (Control); 0.05 g.L⁻¹ (AQ 5); 0.15 g.L⁻¹ (AQ 15); 0.25 g.L⁻¹ (AQ 25); 0.4 g.L⁻¹ (AQ 40). Low case letters in the column: cultivars; upper case letters in the column: treatments. Means followed by the same letter in the same column do not differ statistically ($p < 0.05$) according to Tukey's test ($n=4$).

4. Discussion

The productive performance of onions depends very much on the initial growth of plants right after transplanting [25]. The *Asterarcys quadricellulare* (CCAP 294/1) treatments provided greater initial plant growth, with increases in fresh mass of leaves, length and pseudostem diameter (Figure 1).

The increase in vegetable growth and biomass accumulation in the function of microalgae treatments was previously reported and related to increases in chlorophyll [7,12], in line with the rise in pigments in leaves sprayed with *A. quadricellulare*, particularly on AQ 25 in Alvará and AQ 5, AQ 15 and AQ 40 in Perfecta for chlorophyll; and on AQ 25 in the cultivar Alvará and AQ 5 and AQ 40 in Perfecta for carotenoids (Figure 2a, b).

The biomass of *Asterarcys quadricellulare* (CCAP 294/1) presents an L-free amino acids content of 90.94 mg g⁻¹. When absorbed by the plants, the free L-amino acids and peptides can be incorporated into metabolism according to the specific metabolic demands, such as for chlorophyll synthesis, or to stimulate physiological processes, therefore, acting as signaling molecules [8,26].

The microalga *Chlorella*, a Chlorophyta such as *A. quadricellulare*, also has a large number of L-amino acids in its composition, especially glutamic acid [27], which is considered to be a key amino acid in plant growth and development, as it is a precursor of other amino acids that are produced through transamination [28,29].

These possible metabolic actions of microalgae-free L-amino acid may justify the rise in the free amino acid content in onion leaves with AQ 15 sprays in Alvará and with AQ 5, AQ 15, and AQ 40 in Perfecta (Figure 2c) as an effect of *A. quadricellulare* stimulating the synthesis of amino acids in onion plants.

The role of *Asterarcys quadricellulare* (CCAP 294/1) in nitrogen assimilation can be also related to the activity of the nitrate reductase enzyme, where the AQ 25 and AQ 40 treatments showed improvement upon enzyme reaction (Figure 2d). In the assimilation of nitrate (NO₃⁻), the nitrogen from the NO₃⁻ is converted to nitrite (NO₂), a

reaction catalyzed by the nitrate reductase enzyme. Subsequently, nitrite is converted into ammonia by the nitrite reductase enzyme and finally, the ammonium is converted into amino acids by the enzymes GS and GOGAT [30] and distributed over the plant.

In general terms, it is possible to associate the greater growth and mass accumulation of onion plants with the stimulus to the synthesis of amino acids and pigments promoted by some AQ treatments.

Plants treated with intermediate concentrations of *A. quadricellulare* present the highest mass accumulation in bulbs, demonstrating greater efficiency in the production and redistribution of photoassimilates and, consequently, in a larger bulb caliber (Figure 3).

A higher caliber was found with all AQ treatments in relation to the control in cultivar Perfecta and with AQ 15 and AQ 25 in cultivar Alvará (Figure 3). The larger calibers are related to the superior accumulation of mass of the bulbs, demonstrating that the microalgae *A. quadricellulare* promoted a greater redistribution of photoassimilates when compared to the control. The use of microalgae increasing the caliber and mass of red beet hypocotyls [7] and onion bulbs [4] also were previously reported, indicating an increase in the accumulation of photoassimilates in sink organs [31].

Around 80% of the dry mass of onion bulbs is carbohydrates mainly composed of reducing sugars glucose and fructose and the non-reducing sucrose and fructooligosaccharides. Sugars are the main products of photosynthesis and their transport from the source to the sink is very important for plant growth, being transported through phloem and accumulating in the sink, resulting in a greater gain in mass, size and yield [32].

The data (Figure 5) indicate that the treatments stimulated the source-to-sink flow with sugar accumulation in bulbs, justifying the reduction in contents in leaves at harvest, confirming the effectiveness of *A. quadricellulare* in yielding and redistributing photoassimilates from source to sink during the bulb filling stages.

These results explain the achievement with AQ, with the increase in yield owned by the accumulation of mass in bulbs and consequent caliber improvement. In Alvará, AQ25 promoted yield increase of 28.3%, while in Perfecta, the treatments AQ 5, AQ 15, and AQ 25 promoted yield increases by 26.36, 33.26, and 39.97%, respectively (Figure 4).

Products with plant-stimulant action (biostimulants and biofertilizers) may improve the total content of amino acid and soluble proteins in plants, contributing to better nitrogen assimilation and stimulation of amino acid metabolism [33].

Onion plants had higher levels of amino acids with the applications of *A. quadricellulare*. Amino acids form proteins and are precursors of molecules with fundamental biological roles in plants such as hormones, nucleotides, and cell wall polymers. They also have a role in the transport of nutrients in the plant, mainly nitrogen. They are largely involved in the plant's primary and secondary metabolism, leading to the synthesis of several compounds that influence production as well as the plant's tolerance to abiotic stresses [34,35].

The performance in nitrogen assimilation was evaluated through the activity of the nitrate reductase enzyme, which increased in the AQ treatments, particularly in the cultivar Alvará (Figure 5e).

The nitrate (NO_3^-) is reduced by nitrate reductase to nitrite (NO_2^-), and then imported into the plastid and reduced by nitrite reductase to ammonium (NH_4^+). The NH_4^+ , whether taken directly from the environment or converted from NO_3^- , is assimilated by glutamine synthetase (GS) into glutamine, which provides N for virtually all cellular N-containing components directly or via glutamate [36]. Therefore, the increase in nitrate reductase synthesis may contribute to the N assimilation process.

The presence of free L-amino acid in microalgae is closely related to its plant growth promoting effect [7,37] associated to compounds with pathways derived from amino acids such as polyamines [6], besides glycosides and phytohormones [9]. The microalgae set of bioactive compounds can act as signaling molecules triggering multiple gene expression. related to growth promotion, nutrient acquisitions, and adaptation to abiotic and biotic stresses [38].

In line with previous works using microalgae, through their free L-amino acid concentration and effects on the initial growth, yield, and metabolism stimulation with biochemical improvements, the microalga *A. quadricellulare* (CCAP 294/1) can be considered as a natural input, being a new alternative to growth of onion a nature-friendly way.

5. Conclusion

The use of *A. quadricellulare* (CCAP 294/1) promoted plant growth and increases in bulbs caliber and yield of onion-stimulating plant metabolism with increases in chlorophyll, carotenoids, amino acids, and nitrate reductase enzyme activity in leaves, also free amino acids and total sugar contents in bulbs, highlighting the biomass concentration of 0.25 g L⁻¹.

Acknowledgments: To Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES)-Finance Code 001 providing Doctoral Scholarship to first author.

References

1. Abou Chehade, L.; Al Chami, Z.; De Pascali, S.A.; Cavoski, I.; Fanizzi, F.P. Biostimulants from food processing by-products: Agronomic, quality and metabolic impacts on organic tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *J. Sci. Food Agri.* **2018**, *98*, 1426–1436. [CrossRef]
2. Singh, M.; Dotaniya, M.L.; Mishra, A.; Dotaniya, C.K.; Regar, K.L.; Lata, M. Role of biofertilizers in conservation agriculture. In *Conservation Agriculture*; Springer: Singapore, 2016; pp. 113–134.
3. Renuka, N.; Guldhe, A.; Prasanna, R.; Singh, P.; Bux, F. Microalgae as multifunctional options in modern agriculture: Current trends, prospects and challenges. *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36*, 1255–1273. [CrossRef] [PubMed]
4. Gemin, L.G.; Mógor, A.F.; Amatuzzi, J.O.; Mógor, G. Microalgae associated to humic acid as a novel biostimulant improving onion growth and yield. *Sci. Hortic.* **2019**, *256*, 108560. [CrossRef]
5. Ishaq, A.G.; Matias-Peralta, H.M.; Basri, H. Bioactive compounds from green microalga-*Scenedesmus* and its potential applications: A brief review. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* **2016**, *39*, 1–15.
6. Mógor, A.F.; Ördög, V.; Lima, G.P.P.; Molnár, Z.; Mógor, G. Biostimulant properties of cyanobacterial hydrolysate related to polyamines. *J. Appl. Phycol.* **2017**, *30*, 453–460. [CrossRef]

7. Mógor, A.F.; Amatussi, J.O.; Mógor, G.; Lara, G.B. Bioactivity of cyanobacterial biomass related to amino acids induces growth and metabolic changes on seedlings and yield gains of organic red beet. *Am. J. Plant Sci.* **2018**, *9*, 966–978. [CrossRef]
8. Alvarez, A.L.; Weyers, S.L.; Goemann, H.M.; Peyton, B.M.; Gardner, R.D. Microalgae, soil and plants: A critical review of microalgae as renewable resources for agriculture. *Algal Res.* **2021**, *54*, 102200. [CrossRef]
9. Mazepa, E.; Malburg, B.V.; Mógor, G.; de Oliveira, A.C.; Amatussi, J.O.; Corrêa, D.O.; Lemos, J.S.; Ducatti, D.R.B.; Duarte, M.E.R.; Mógor, A.F.; et al. Plant growth biostimulant activity of the green microalga *Desmodesmus subspicatus*. *Algal Res.* **2021**, *59*, 102434. [CrossRef]
10. Schreiber, C.; Schiedung, H.; Harrison, L.; Briese, C.; Ackermann, B.; Kant, J.; Schrey, S.D.; Hofmann, D.; Singh, D.; Ebenhoh, O.; et al. Evaluating potential of green alga *Chlorella vulgaris* to accumulate phosphorus and to fertilize nutrient-poor soil substrates for crop plants. *J. Appl. Phycol.* **2018**, *30*, 2827–2836. [CrossRef]
11. Dineshkumar, R.; Subramanian, J.; Gopalsamy, J.; Jayasingam, P.; Arumugam, A.; Kannadasan, S.; Sampathkumar, P. The impact of using microalgae as biofertilizer in maize (*Zea mays* L.). *Waste Biomass Valor.* **2019**, *10*, 1101–1110. [CrossRef]
12. Faheed, F.A.; Abd-El Fattah, Z. Effect of *Chlorella vulgaris* as bio-fertilizer on growth parameters and metabolic aspects of lettuce plant. *J. Agric. Soc. Sci.* **2008**, *4*, 165–169.
13. Garcia-Gonzalez, J.; Sommerfeld, M. Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. *J. Appl. Phycol.* **2016**, *28*, 1051–1061. [CrossRef]
14. Singh, D.P.; Khattar, J.S.; Rajput, A.; Chaudhary, R.; Singh, R. High production of carotenoids by the green microalga *Asterarcys quadricellulare* PUMCC 5.1.1 under optimized culture conditions. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0221930. [CrossRef]
15. Ghosh, A.; Khanra, S.; Mondal, M.; Halder, G.; Tiwari, O.N.; Bhowmick, T.K.; Gayen, K. Effect of macronutrient supplements on growth and biochemical compositions in photoautotrophic cultivation of isolated *Asterarcys* sp. (BTA9034). *Energy Convers. Manag.* **2017**, *149*, 39–51. [CrossRef]
16. Faostat. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (accessed on 14 November 2021).

17. Winters, A.L.; Lloyd, J.D.; Jones, R.; Merry, R.J. Evaluation of a rapid method for estimating free amino acids in silages. *Anim. Feed. Sci. Technol.* **2002**, *99*, 177–187. [CrossRef]
18. Magné, C.; Larher, F. High sugar content interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Anal. Biochem.* **1992**, *200*, 115–118. [CrossRef]
19. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária—EMBRAPA. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos, 3rd ed.; Embrapa: Brasília, Brazil, 2013; 353p. (In Portuguese)
20. Lichtenthaler, H.K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* **1987**, *148*, 350–382. [CrossRef]
21. Lichtenthaler, H.K.; Buschmann, C. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV–VIS spectroscopy. *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* **2001**, *1*, F4.3.1–F4.3.8. [CrossRef]
22. Maldonade, I.R.; Carvalho, P.G.B.; Ferreira, N.A. Protocolo para a Determinação de Açúcares Totais em Hortaliças Pelo Método de DNS; Embrapa: Brasília, Brazil, 2013; pp. 1–4. (In Portuguese)
23. Jaworski, E.K. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, *43*, 1274–1279. [CrossRef]
24. Silva, F.A.S.; Azevedo, C.A.V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *Afr. J. Agric. Res.* **2016**, *11*, 3733–3740. [CrossRef]
25. Bettoni, M.M.; Mógor, A.F.; Kogerastki, J.F.; Pauletti, V. Onion (*Allium cepa* L.) Seedling Growth using Humic Substances. *Idesia* **2016**, *34*, 57–62. [CrossRef]
26. Rachidi, F.; Benhima, R.; Sbabou, L.; El Arroussi, H. Microalgae polysaccharides bio-stimulating effect on tomato plants: Growth and metabolic distribution. *Biotechnol. Rep.* **2020**, *25*, e00426. [CrossRef] [PubMed]
27. Lu, K.; Zhao, X.; Ho, S.H.; Ma, R.; Xie, Y.; Chen, J. Biorefining and the Functional Properties of Proteins from Lipid and Pigment Extract Residue of *Chlorella pyrenoidosa*. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 454. [CrossRef]
28. Forde, B.G.; Lea, P.J. Glutamate in plants: Metabolism, regulation, and signaling. *J. Exper. Bot.* **2007**, *58*, 2339–2358. [CrossRef] [PubMed]

29. Röder, C.; Mógor, A.F.; Szilagyi-Zecchin, V.J.; Gemin, L.G.; Mógor, G. Potato yield and metabolic changes by use of biofertilizer containing L-glutamic acid. *Com. Sci.* **2018**, *9*, 211–218. [CrossRef]
30. Taiz, L.; Zeiger, E. *Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal*; Artmed Editora: Brasília, Brazil, 2017; 888p. (In Portuguese)
31. Kholssi, R.; Marks, E.A.N.; Miñón, J.; Montero, O.; Debdoubi, A.; Rad, C. Biofertilizing Effect of *Chlorella sorokiniana* Suspensions on Wheat Growth. *J. Plant Growth Regul.* **2018**, *38*, 644–649. [CrossRef]
32. Zhang, C.; Zhang, H.; Zhan, Z.; Liu, B.; Chen, Z.; Liang, Y. Transcriptome analysis of sucrose metabolism during bulb swelling and development in onion (*Allium cepa* L.). *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1425. [CrossRef]
33. Nardi, S.; Pizzeghello, D.; Schiavon, M.; Ertani, A. Plant biostimulants: Physiological responses induced by protein hydrolyzedbased products and humic substances in plant metabolism. *Sci. Agric.* **2016**, *73*, 18–23. [CrossRef]
34. Hilderandt, T.M.; Nesi, A.N.; Araújo, W.L.; Braun, H.P. Amino acid catabolism in plants. *Mol. Plant* **2015**, *8*, 1563–1579. [CrossRef]
35. Pratelli, R.; Pilot, G. Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. *J. Exp. Bot.* **2014**, *65*, 5535–5556. [CrossRef]
36. Zhou, Y.; Kishchenko, O.; Stepanenko, A.; Chen, G.; Wang, W.; Zhou, J.; Pan, C.; Borisjuk, N. The Dynamics of NO₃⁻ and NH₄⁺ Uptake in Duckweed Are Coordinated with the Expression of Major Nitrogen Assimilation Genes. *Plants* **2022**, *11*, 11. [CrossRef]
37. Kapoore, R.V.; Wood, E.E.; Llewellyn, C.A. Algae biostimulants: A critical look at microalgal biostimulants for sustainable agricultural practices. *Biotechnol. Adv.* **2021**, *49*, 107754. [CrossRef]
38. Barone, V.; Baglieri, A.; Stevanato Broccanello, C.; Bertoldo, G.; Bertaggia, M.; Cagnin, M.; Pizzeghello, D.; Moliterni, V.M.C.; Mandolino, G.; Fornasier, F.; et al. Root morphological and molecular responses induced by microalgae extracts in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *J. Appl. Phycol.* **2018**, *30*, 1061–1071. [CrossRef]

4 CAPÍTULO 3 – MICROALGA *Asterarcys quadricellulare* ESTIMULA METABOLISMO DE AMINAS BIOATIVAS COM AUMENTO DE PRODUTIVIDADE EM CEBOLA

RESUMO

Uma agricultura mais sustentável, com uso de fontes naturais que promovam o crescimento de plantas e melhorem a produtividade tem sido buscada. Os biofertilizantes tem sido estudados com essa proposta, e as microalgas estão dentro desse grupo, possuindo em sua composição moléculas bioativas capazes de estimular o crescimento vegetal. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da microalga *Asterarcys quadricellulare* (CCAP 294/1) na produção de cebola, verificando sua ação no metabolismo, produtividade e resposta metabolômica. Foram utilizadas duas cultivares de cebola (Alvará e Perfecta), duas concentrações de biomassa (0,15 e 0,25 g L⁻¹) e duas frequências de pulverização (semanal e quinzenal). Foram realizadas pulverizações foliares de AQ em campo, determinando efeitos no crescimento e produtividade nas plantas, assim como respostas bioquímicas nas folhas e bulbos e posteriormente avaliação metabolômica de substâncias presentes nas folhas e bulbos, verificadas por meio de HPLC. O uso de *A. quadricellulare* promoveu o crescimento das plantas e ganho de produtividade, promovendo mudanças bioquímicas nos teores de aminoácidos, açúcares e na atividade da enzima nitrato redutase, assim como melhora no conteúdo de espermina em folhas, espermidina em bulbos, triptamina em folhas e bulbos, 5-hidroxitriptofano em bulbos e serotonina em bulbos, podendo seu efeito estar relacionado ao metabolismo das poliaminas e das auxinas.

Palavras-chave: *Allium cepa* L. Sinalização. Poliaminas.

1. Introdução

A cultura da cebola (*Allium cepa* L.) é cultivada em todos os continentes, exceto Antártida, sendo apreciada basicamente por todas as culturas do mundo, por seu sabor e atributos que melhoram a saúde (HAVEY, 2018). Ela possui grande importância econômica, figurando entre as hortaliças mais relevantes do mundo. Os três maiores produtores mundiais de cebola são China (24,77 milhões de toneladas), Índia (22,07 milhões de toneladas) e Estados Unidos (3.28 milhões de toneladas) (FAOSTAT, 2021). A cebola pode ser consumida fresca, processada e industrializada, dando origem a diversos produtos que são usados na alimentação humana (COSTA & RESENDE, 2007).

Pesquisas visando melhorar as práticas culturais e aumentar a produtividade para o cultivo da cebola são fundamentais, devido a sua importância econômica. Inúmeros fatores interferem na produção de cebola, alguns deles como uso de

sementes de qualidade e produção associada a tecnologias (PANNACCI et al., 2020), nutrição adequada (OKADA et al., 2020), fatores abióticos como radiação solar, luminosidade e disponibilidade de água (ESMAEILZADH, 2020), entre outros. Em alguns países, a produtividade média dessa cultura é muito baixa (GHOSH et al., 2018). Sendo assim, pesquisas que promovam o melhor crescimento e desenvolvimento da cultura devem ser constantemente atualizadas.

Nesse contexto, os produtos biofertilizantes ganham relevância, pois podem contribuir para o crescimento e aumento da produtividade das plantas (SINGH et al., 2016; RENUKA et al., 2018). Essas substâncias podem promover ainda alterações no metabolismo vegetal dependendo de sua fonte. As microalgas são potenciais produtos biofertilizantes, pois são organismos autotróficos unicelulares fotossintetizantes, sendo fontes de recursos renováveis, produzindo biomassa e outros compostos de interesse que podem ser usados na alimentação humana e animal, produtos farmacêuticos e cosméticos, geração de energia e muitas outras (MORRIS et al., 2008; BOROWITZKA, 2013; CAVALCANTI, et al., 2014; SINGH et al., 2016; RONGA et al., 2019), assim como na agricultura.

Na agricultura, as microalgas tem sido estudadas quanto ao seu efeito promotor do crescimento vegetal ligado ao seu uso como biofertilizante (GARCIA-GONZALEZ & SOMMERFELD, 2016; MÓGOR et al., 2018; GEMIN et al., 2019; EL-NAGGAR et al., 2020), sendo atribuído à presença de compostos bioativos como polissacarídeos, poliaminas, citocininas e L-aminoácidos livres (RAJESHWARI & RAJASHEKHAR 2011; STIRK et al., 2013; ISHAQ et al., 2016; MÓGOR et al., 2017; MÓGOR et al., 2018; RENUKA., 2018; ALVAREZ et al., 2021; MAZEPA et al., 2021).

A microalga chorophyta *Asterarcys quadricellulare* (AQ), apresenta alto teor de proteínas e polissacarídeos em sua composição (GHOSH et al., 2017), sendo sua biomassa uma potencial fonte biofertilizante. Desta forma, neste trabalho pesquisamos o efeito da microalga AQ no crescimento e produtividade de plantas de cebola, bem como em variáveis bioquímicas nas folhas e bulbos e posteriormente avaliação metabolômica de substâncias presentes nas folhas e bulbos.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção da biomassa dos tratamentos

Para a obtenção da biomassa da microalga *A. quadricellulare*, sua extração foi realizada em sistema mixotrófico e seca por atomização (Spray dryer), obtendo-se um pó fino de cor esverdeada, característico das algas verdes e fornecido pela empresa Alltech® Crop Sciences – Brasil. A concentração de aminoácidos livres na biomassa foi de 90,94 mg g⁻¹, equivalendo a 9% em massa, determinada usando 0,1 mg da biomassa seca diluída em 1,7 mL de etanol a 80% para preparar um extrato do qual 1,0 mL foi diluído em água destilada (WINTERS, 2002) e a reação colorimétrica foi realizada (MAGNÉ & LARHER, 1992).

2.2. Condução do experimento no campo

Os tratamentos foram baseados em um experimento anterior (CORDEIRO et al., 2022 a), visando avaliar também a frequência de aplicação (semanal e quinzenal), sendo este experimento implantado no campo, em agosto de 2019. A biomassa de *Asterarcys quadricellulare* (AQ) foi suspensa nas seguintes concentrações: 150 e 250 g L⁻¹. De cada suspensão foi retirada uma alíquota de 1 mL L⁻¹ e diluída em água destilada, induzindo os tratamentos e produzindo soluções equivalentes às concentrações de biomassa de 0,15 g L⁻¹ (AQ 15) e 0,25 g L⁻¹ (AQ 25)

O estudo foi conduzido na área de Olericultura da orgânica da Estação Experimental Canguiri da UFPR, localizada no município de Pinhais – PR, pertencendo ao Primeiro Planalto Paranaense, com latitude 25°23'30" sul e longitude 49°07'30" oeste, a uma altitude média de 920 m. De acordo com a classificação de Koppen o clima da região é temperado, úmido mesotérmico, tipo cfb, com precipitação anual entre 1400 e 1800 mm e chuvas bem distribuídas.

Foram utilizadas para o experimentos duas cultivares de cebola. A cultivar Alvará (Bejo®), de maturação precoce, alta produtividade, folhas mais vigorosas, com boa cerosidade, o que lhe confere grande versatilidade quanto à época de plantio. Seu ciclo dura de 130 a 150 dias e seu semeio é indicado entre maio e junho. A cultivar híbrida Perfecta (Topseed®), com alto potencial produtivo, boa tolerância a doenças e excelente qualidade de bulbo, folhas vigorosas, com boa cerosidade e coloração verde-escuro. É um híbrido de dia curto, com boa tolerância ao pendoamento

precoce. Seu ciclo é de 130 a 150 dias, com época de semeio indicada para a região sul de abril a julho.

A análise química do solo no ano de 2018 na camada de 0 a 20 cm, indicou os valores médios de: pH (CaCl₂) = 5,84; pH H₂O = 6,71; Al³⁺ = 0; H+Al³⁺ = 2,93 cmolc dm⁻³; Ca²⁺ = 5,28 cmolc dm⁻³; Mg²⁺ = 3,05 cmolc dm⁻³; K⁺ = 1,32 cmolc dm⁻³; P (Mehlich) = 49,0 mg dm; S = 33,49 mg dm⁻³; C = 26 g.dm⁻³; %; V% = 76,7 e CTC = 12,58 cmolc dm⁻³. A irrigação por aspersão foi usada com o objetivo de manter a umidade do solo em 80%, sendo verificado com auxílio de um tensiômetro.

Uma semana antes do transplante das mudas foi realizado o preparo do solo com a incorporação de 8 t.ha⁻¹ de composto orgânico com os seguintes valores médios: C = 30,3 g kg⁻¹; N = 30,3 g kg⁻¹; P = 8,5 g kg⁻¹; K = 6,6 g kg⁻¹; Ca = 8,1 g kg⁻¹; Mg = 4,1 g kg⁻¹. A fertilização do solo e das plantas foram realizados de acordo com a regulamentação brasileira para agricultura orgânica.

As mudas de cebola das cultivares Alvará e Perfecta foram transplantadas em canteiros com dimensão de 1,20 x 24 m, espaçamento de 30 cm entre linhas e 10 cm entre plantas, distribuídas em quatro linhas de plantio, equivalente a uma população de plantas de 230.000 por hectare.

O experimento foi realizado em arranjo fatorial triplo 2 (cultivar) x 3 (doses) x 2 (frequência), e quatro repetições totalizando 48 parcelas, com duas cultivares (Alvará e Perfecta), três doses (testemunha, AQ 15 e AQ 25), duas frequências (7 e 15 dias).

Foi realizada uma coleta de material vegetal no início da bulbificação, aos 120 DAT. Foram avaliados a altura das plantas (cm), número de folhas, área foliar (cm²), volume do pseudocaule (cm³), a massa fresca e a massa seca (g) das folhas, do pseudocaule e dos bulbos. A área foliar e o volume do pseudocaule foram obtidos com a utilização do software WinRhizo Pro® (Regent Instr® Canadá). Aos 135 DAT, foi realizado a coleta final para avaliação da produtividade.

2.3. Análises Bioquímicas

Após a coleta os materiais foram congelados e posteriormente macerados em nitrogênio líquido para obtenção de um pó fino. As leituras foram feitas em espectrofotômetro e os valores expressos em µg.g⁻¹ de massa fresca de folhas e bulbos.

Para a extração dos açúcares totais e redutores foi utilizada a metodologia proposta por Maldonado et al. (2013), com modificações. As amostras foram obtidas por meio da realização de hidrólise ácida e após a reação com ácido dinitrosalicílico (DNS). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm e os valores expressos em μg de açúcares por g de material vegetal fresco.

Para a extração dos aminoácidos livres totais de folhas e bulbos foi seguida a metodologia de Winters et al. (2002) e para a reação colorimétrica a metodologia de Magné & Larher (1992). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm e os resultados expressos em μg de aminoácidos livres totais por g de material vegetal.

A determinação da atividade da enzima nitrato redutase das folhas seguiu a metodologia proposta por Jaworski (1971), com modificações. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm e os valores expressos em μmol de $\text{NO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de material vegetal.

2.4. Análises por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As amostras foram homogeneizadas em 3 mL de ácido perclórico a 5% (HClO_4), mantidos em banho ultrassônico por 30 min e centrifugadas a 6000 rpm por 10 min (5°C). Em 200 μL do sobrenadante foram adicionados 400 μL de cloreto de dansila ($2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ acetona) e 200 μL da solução saturada de carbonato de sódio.

Após a agitação as amostras permaneceram no escuro por uma hora em temperatura de 60°C , foram adicionados 200 μL de prolina (99%) ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ em água ultrapura). A mistura foi mantida em temperatura ambiente por 60 minutos e foi usado tolueno (1000 μL) para extrair as poliaminas (Pas) aderidas. As amostras foram agitadas em vórtex por 1 minuto e os sobrenadantes foram retirados e submetidos à secagem com N_2 e suspensos em 1 mL de acetonitrila grau de HPLC (ensaio 99,9%).

Posteriormente, a mistura foi mantida em banho ultrassônico por 1 min e centrifugada por 5 min a 4000 g (4°C). O sobrenadante foi filtrado (0,22 μm) antes da injeção em HPLC. A separação cromatográfica foi realizada usando um Sistema Dionex Thermo Scientific Ultimate 3000 (Thermo Fisher Informações Científicas; Santa Clara, CA, EUA) acoplado a uma bomba quaternária, um amostrador automático (modelo 3000RS) e um detector de arranjo de diodo (DAD—3000RS).

Vinte microlitros de amostra foram injetados, e os dados cromatográficos foram coletados e processados usando o software Chromeleon 7 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha), a um fluxo de 0,7 mL min⁻¹ usando um Ace 5 C18 (Tecnologias Avançadas de Cromatografia, Aberdeen, Reino Unido) coluna (4,6 mm x 250 mm, tamanho de partícula de 5 µm) a 25 °C.

A detecção foi ajustada para 225 nm, e a integração e calibração do pico foram realizadas entre 225 e 300 nm. O gradiente cromatográfico foi estabelecido para uma mistura de solventes (A) 100% acetonitrila e (B) 50% acetonitrila, como segue: 0–2 min 40% A + 60% B; 2–4 min 60% A + 40% B; 4–8 min 65% A + 35% B; 8–12 min 85% A + 15% B; 12–15 min 95% A + 5% B; 15–21 min 85% A + 15% B; 21–22 min 75% A + 25% B; 22–25 min 40% A + 60% B. A identificação e quantificação de 5-hidroxitriptofano, triptamina, putrescina, histamina, serotonina, tiramina, espermidina e espermina foram baseados em seus tempos de retenção, em comparação com os padrões de cada composto. Os resultados foram expressos como µg g⁻¹ de peso seco (DIAMANTE et al., 2019).

2.5. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e sua homogeneidade testada pelo teste de Bartlett. Os resultados que apresentaram significância foram comparados pelos testes de Tukey e Scott Knott ao nível de 5% de significância. As análises estatísticas foram processadas pelo programa Assistat, versão 7.6 Beta (SILVA & AZEVEDO, 2016).

3. Resultados

Nos resultados biométricos de massa fresca de folhas, massa seca de folhas, massa fresca do pseudocaule e massa seca do pseudocaule não houve diferença na interação dos fatores, apenas para tratamentos. Na massa fresca de folhas houve um aumento de 7,76% em AQ25 em relação a testemunha, para massa seca de folhas AQ25 teve um incremento de 32,86% sobre a testemunha. Na massa fresca de pseudocaule AQ15 e AQ25 apresentaram 25,06% e 41,91% de aumento sobre a testemunha e na massa seca de pseudocaule houve incremento de 37,14 % em AQ25 sobre a testemunha.

Quando se avaliou massa fresca e seca de bulbos houve interação tripla (cultivar x tratamento x frequência). Para massa fresca de bulbos na cultivar Alvará o

tratamento AQ25 quinzenal apresentou um aumento de 77,75% sobre a testemunha, na cultivar Perfecta, houve incremento em AQ15 e AQ25 quinzenal de 97 e 118% sobre a testemunha. Para massa seca de bulbos não houve diferença na cultivar Alvará e na cultivar Perfecta destaque para o tratamento quinzenal de AQ15 e AQ25, com incremento de 104% e 119% sobre a testemunha respectivamente (Fig 1).

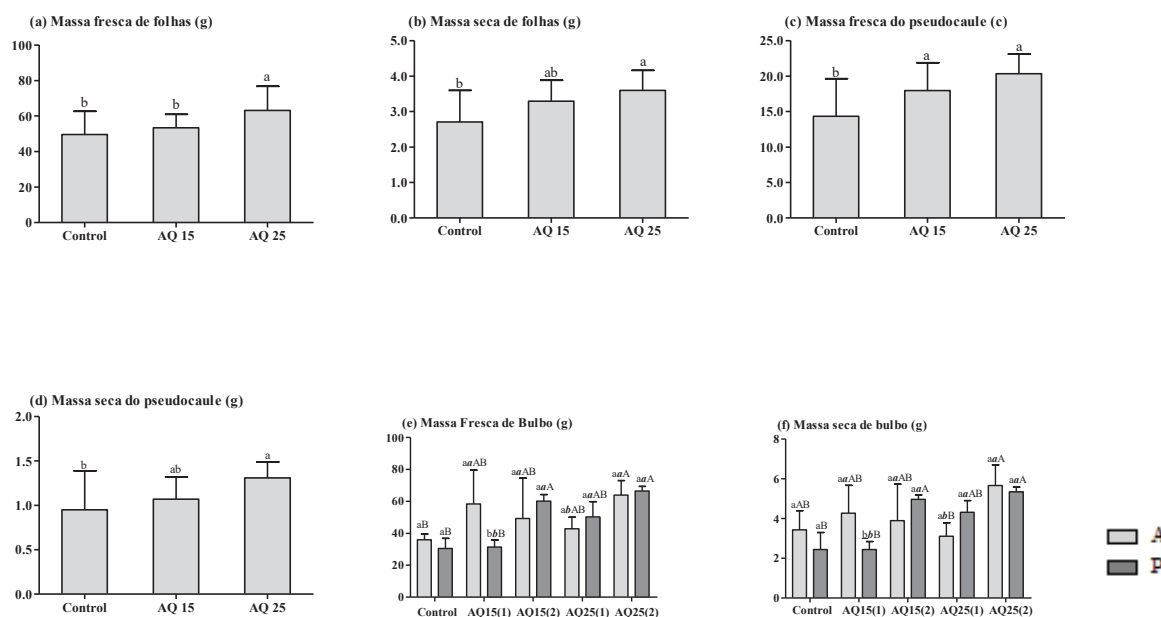


Fig 1. Massa fresca de folhas (a), massa seca de folhas (b), massa fresca do pseudocaule (c), massa seca do pseudocaule (d), massa fresca de bulbos (e) e massa fresca de bulbos (f) de cebola cultivadas organicamente (cultivares Alvará e Perfecta) submetidas a aplicações foliares na dose de 1 mL.L⁻¹ de suspensões da biomassa da microalga *A. quadricellulare* com diferentes concentrações. Cultivares de cebola (cinza claro: Alvará; cinza escuro: Perfecta). Tratamentos: 0 mL.L⁻¹ (control); 0,15 mL.L⁻¹ (AQ 15) e 0,25 mL.L⁻¹ (AQ 25); (1): 7 dias; (2): 15 dias. Letras minúsculas: cultivar; letras maiúsculas: tratamentos; letras em negrito e itálico: frequências. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (p < 0,05) conforme o teste de Tukey (n=4).

Para a variável comprimento de pseudocaule houve interação tripla, sem diferença entre tratamentos na cultivar Alvará e na cultivar Perfecta destaque para AQ25 quinzenal, com incremento de 29% sobre a testemunha. Quando avaliou-se diâmetro de pseudocaule houve interação cultivar x tratamento, para a cultivar Alvará não houve diferença entre tratamentos e em Perfecta houve incremento de 26 e 33,76% nos tratamentos AQ15 e AQ 25 em relação à testemunha. No volume de pseudocaule houve somente diferença entre tratamentos, com incremento de 23,31 e 43% em AQ15 e AQ25 sobre a testemunha respectivamente. Para diâmetro de bulbos houve interação tripla sem diferença para a cultivar Alvará e com destaque para AQ15 e AQ25 quinzenal na cultivar Perfecta, que apresentaram um incremento de 43,91 e 46% sobre a testemunha respectivamente (Fig 2).

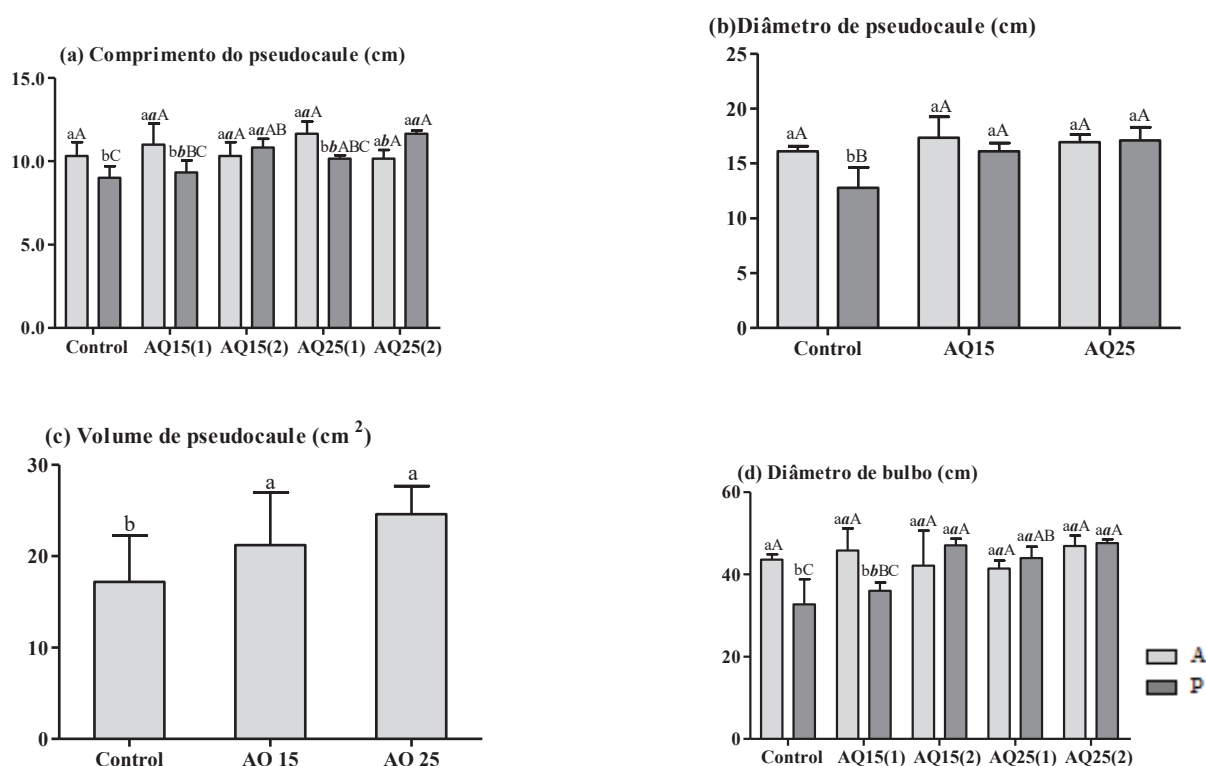


Fig 2. Comprimento do pseudocaule (a), diâmetro do pseudocaule (b), volume do pseudocaule (c) e diâmetro de bulbos (d) de cebola cultivadas organicamente (cultivares Alvará e Perfecta) submetidas a aplicações foliares na dose de 1 mL.L⁻¹ de suspensões da biomassa da microalga *A. quadricellulare* com diferentes concentrações. Cultivares de cebola (cinza claro: Alvará; cinza escuro: Perfecta). Tratamentos: 0 mL.L⁻¹ (control); 0,15 mL.L⁻¹ (AQ 15) e 0,25 mL.L⁻¹ (AQ 25); (1): 7 dias; (2): 15 dias. Letras minúsculas: cultivar; letras maiúsculas: tratamentos; letras em negrito e itálico: frequências. Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si (p < 0,05) conforme o teste de Tukey (n=4).

Na variável número de folhas houve diferença apenas entre tratamentos, onde AQ15 e AQ25 apresentaram incremento de 8,54 e 13,83% em relação a testemunha. Para comprimento de folhas houve interação entre tratamento x frequência com destaque para AQ25 nas duas frequências, tendo um incremento de 10,35% semanalmente e de 10,78% quinzenalmente sobre a testemunha. Quanto a área foliar houve diferença apenas entre tratamentos, com um aumento de 19,75 e 25,9% em AQ15 e AQ25 sobre a testemunha (Fig 3).

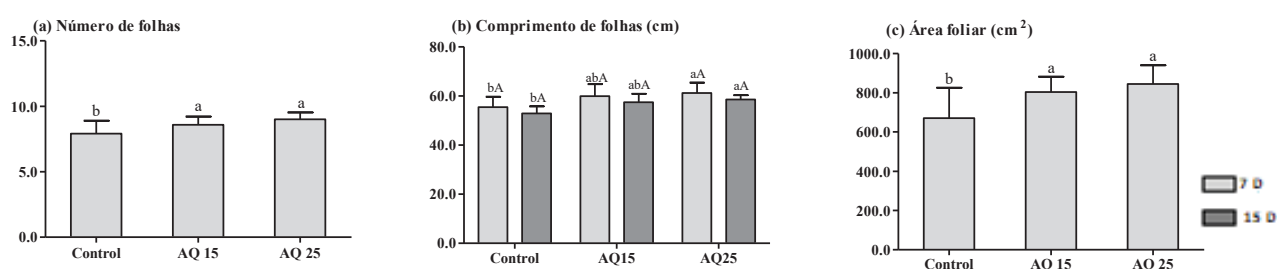


Fig 3. Número de folhas (a), Comprimento de folhas (b) e área foliar (c) de cebola cultivadas organicamente (cultivares Alvará e Perfecta) submetidas a aplicações foliares na dose de 1 mL.L⁻¹ de suspensões da biomassa da microalga *A. quadricellulare* com diferentes concentrações. Frequências (cinza claro: semanal; cinza escuro: quinzenal). Tratamentos: 0 mL.L⁻¹ (control); 0,15 mL.L⁻¹ (AQ 15) e 0,25 mL.L⁻¹ (AQ 25). Letras minúscula: tratamentos; letras maiúsculas: frequências. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) conforme o teste de Tukey ($n=4$).

Na avaliação de açúcares totais nas folhas houve diferença somente para tratamentos, com aumento em AQ15 sobre a testemunha de 13,36%. Nos açúcares redutores não houve diferença entre os tratamentos na cultivar Alvará, em Perfecta AQ15 semanal teve melhor resultado, com aumento de mais de 200% em relação à testemunha. Quanto aos L-aminoácidos livres totais nas folhas houve somente diferença entre tratamentos, onde AQ15 apresentou um incremento de 37% sobre a testemunha e AQ25 um aumento de 21% em relação à testemunha. Nos L-aminoácidos livres totais nos bulbos houve interação cultivar x tratamento. Na cultivar Alvará houve um incremento de 26% em AQ15 em relação à testemunha. Em Perfecta houve um aumento de 43% no tratamento AQ25 sobre a testemunha. Quanto a atividade da enzima nitrato redutase houve apenas diferença entre tratamentos, com um aumento de 23,79 e 18,61% na atividade enzimática em AQ15 e AQ25 quando comparadas com a testemunha (Fig 4).

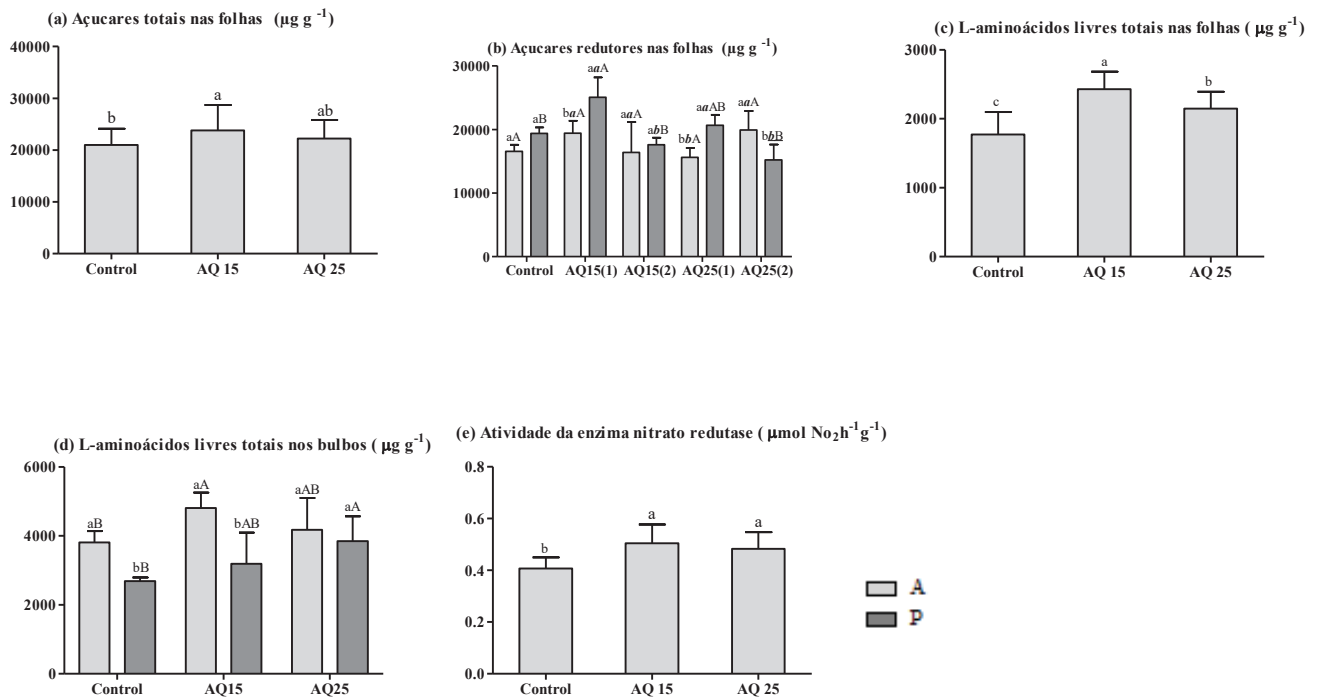


Fig 4. Açúcares totais nas folhas (a), Açúcares redutores nas folhas (b), L-aminoácidos nas folhas (c), L-aminoácidos nos bulbos (d) e atividade da enzima nitrato redutase (e) de cebola cultivadas organicamente (cultivares Alvará e Perfecta) submetidas a aplicações foliares na dose de 1 mL.L^{-1} de suspensões da biomassa da microalga *A. quadricellulare* com diferentes concentrações. Cultivares de cebola (cinza claro: Alvará; cinza escuro: Perfecta). Tratamentos: 0 mL.L^{-1} (control); $0,15 \text{ mL.L}^{-1}$ (AQ 15) e $0,25 \text{ mL.L}^{-1}$ (AQ 25); (1): 7 dias; (2): 15 dias. Letras minúsculas: cultivar; letras maiúsculas: tratamentos; letras em negrito e itálico: frequências. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) conforme o teste de Tukey ($n=4$).

Quanto a produtividade de bulbos não houve interação entre os fatores, apenas diferença entre tratamentos, com um incremento de 19 % em AQ15 e 14% em AQ25 sobre a testemunha (Fig 5).

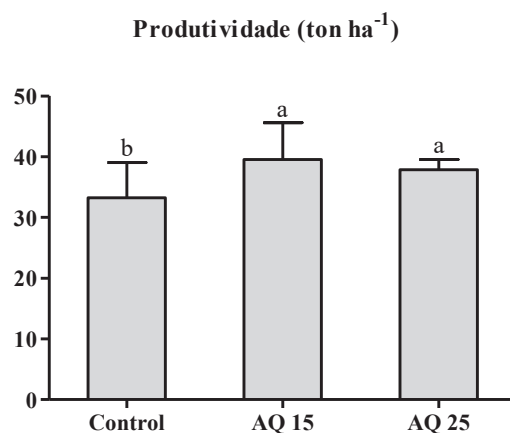


Fig 5. Produtividade média de cebola cultivadas organicamente (cultivares Alvará e Perfecta) submetidas a aplicações foliares na dose de 1 mL.L^{-1} de suspensões da biomassa da microalga *A. quadricellulare* com diferentes concentrações. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) conforme o teste de Scott Knott ($n=4$).

Na avaliação das análises realizadas por HPLC para triptamina nas folhas houve interação entre tratamentos x cultivares, onde para a cultivar Alvará houve um aumento dessa substância de 40,1% em AQ25 quando comparada com a testemunha, em Perfecta, AQ15 e testemunha não diferiram entre si. Quanto a quantidade de putrescina nas folhas ocorreu interação tratamentos x cultivares, em Alvará AQ15 e testemunha não diferiram entre si e em Perfecta AQ15 apresentou um incremento de 23,46% sobre a testemunha (Fig 6).

Para espermidina nas folhas houve diferença apenas entre tratamentos, onde AQ15 e testemunha não apresentaram diferenças entre si. Quando se avaliou a quantidade de espermina nas folhas houve interação tripla, na cultivar Alvará AQ25 semanal se destacou com um incremento de 37,67% quando comparada com a testemunha e na cultivar Perfecta AQ15 semanal teve um aumento de 48,57% sobre a testemunha (Fig 6.)

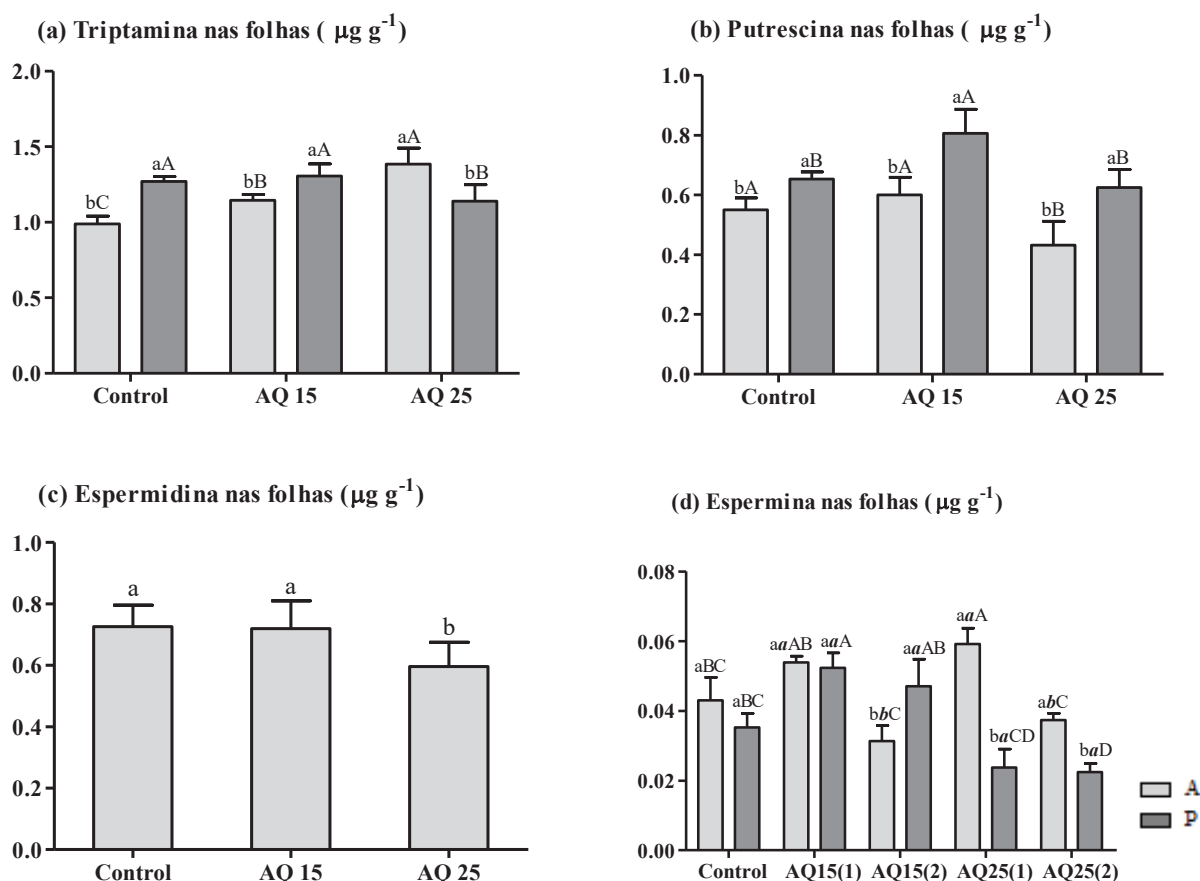


Fig 6. Triptamina(a), putrescina (b), espermidina (c) e espermina (d) nas folhas de cebola cultivadas organicamente (cultivares Alvará e Perfecta) submetidas a aplicações foliares na dose de 1 mL.L^{-1} de suspensões da biomassa da microalga *A. quadricellulare* com diferentes concentrações. Cultivares de cebola (cinza claro: Alvará; cinza escuro: Perfecta). Tratamentos: 0 mL.L^{-1} (control); $0,15 \text{ mL.L}^{-1}$ (AQ 15)

e 0,25 mL.L⁻¹ (AQ 25); (1): 7 dias; (2): 15 dias. Letras minúsculas: cultivar; letras maiúsculas: tratamentos; letras em negrito e *itálico*: frequências. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) conforme o teste de Tukey ($n=4$).

Quando se analisou as amostras de bulbos por HPLC, aquelas que apresentaram diferença significativa tiveram interação tripla. Para 5-hidroxitriptofano nos bulbos na cultivar Alvará houve destaque para AQ15 quinzenal, com um incremento de 24,68% sobre a testemunha, na cultivar Perfecta AQ15 quinzenal e AQ25 semanal apresentaram 36,9 e 28,51% acima da testemunha (Fig 7).

Quanto a quantidade de triptamina nos bulbos, na cultivar Alvará AQ25 quinzenal apresentou incremento de 5,74% sobre a testemunha e em Perfecta AQ15 quinzenal apresentou aumento de 38,78% quando comparada com a testemunha. Na quantidade de putrescina nos bulbos para a cultivar Alvará AQ15 semanal e quinzenal não apresentaram diferença quando comparadas com a testemunha, em Perfecta AQ15 quinzenal teve um incremento de 15,53% acima das testemunha (Fig 7).

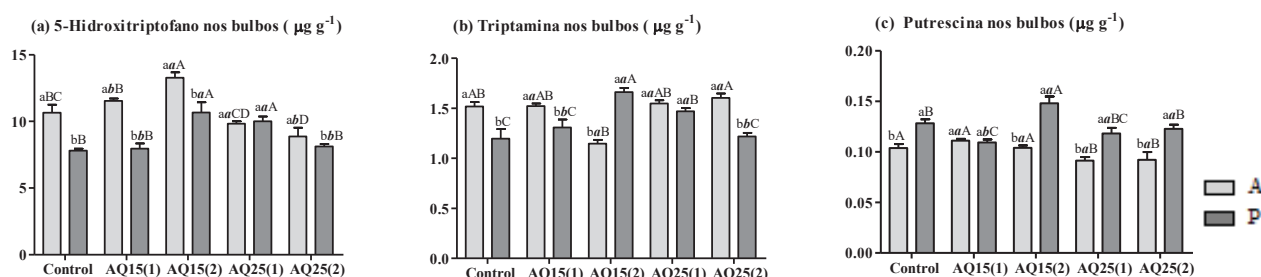
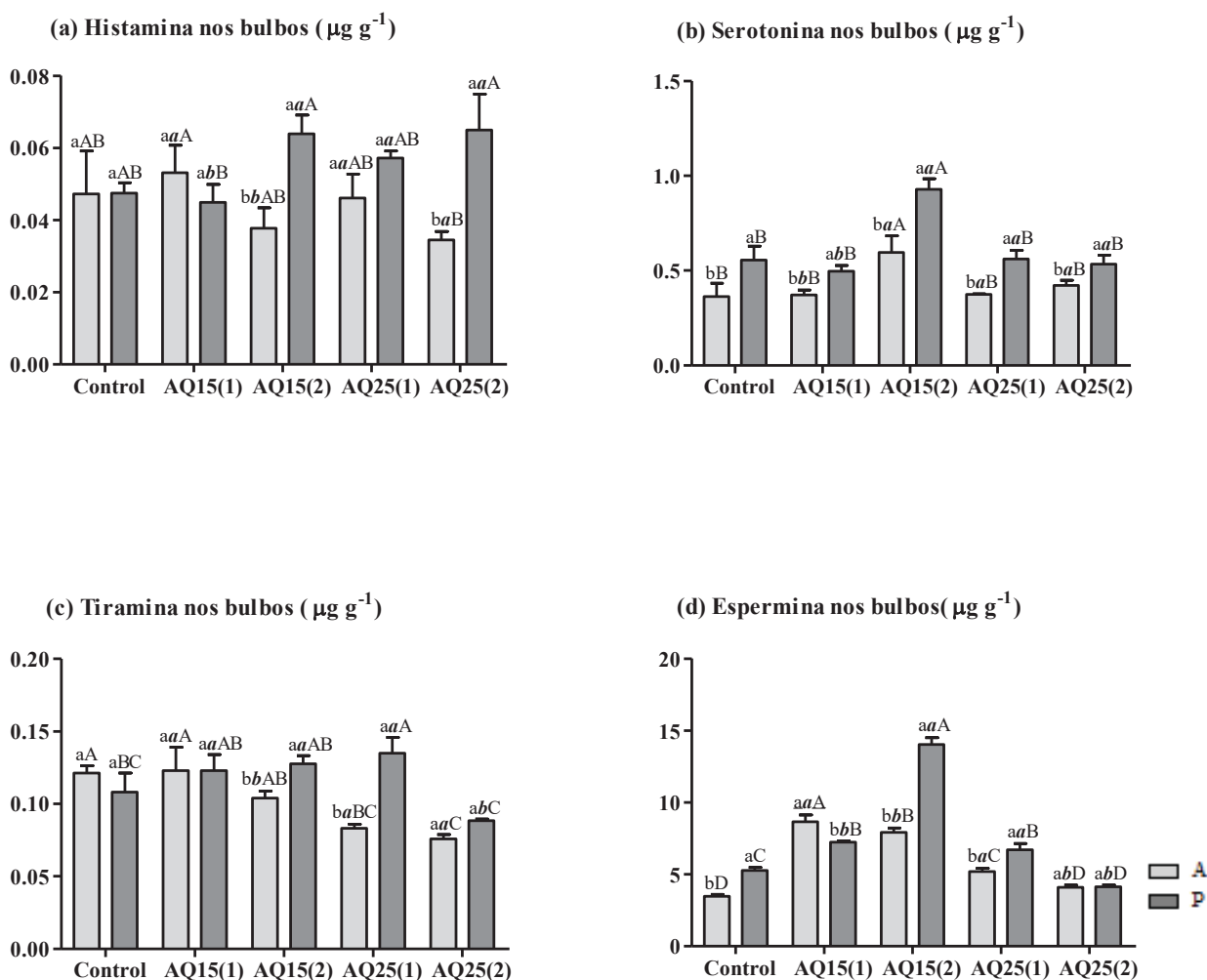


Fig 7. 5-hidroxitriptofano (a), triptamina (b) e putrescina (c) nos bulbos de cebola cultivadas organicamente (cultivares Alvará e Perfecta) submetidas a aplicações foliares na dose de 1 mL.L⁻¹ de suspensões da biomassa da microalga *A. quadricellulare* com diferentes concentrações. Cultivares de cebola (cinza claro: Alvará; cinza escuro: Perfecta). Tratamentos: 0 mL.L⁻¹ (control); 0,15 mL.L⁻¹ (AQ 15) e 0,25 mL.L⁻¹ (AQ 25); (1): 7 dias; (2): 15 dias. Letras minúsculas: cultivar; letras maiúsculas: tratamentos; letras em negrito e *itálico*: frequências. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) conforme o teste de Tukey ($n=4$).

Nos teores de histamina nos bulbos para a cultivar Alvará houve aumento de 12,5% em AQ15 semanal em relação à testemunha, na cultivar Perfecta houve aumento nos tratamentos AQ15 e AQ25 quinzenal de 34,81 e 36,92% respectivamente. Quanto ao nível de serotonina nos bulbos houve destaque para o

tratamento AQ15 quinzenal em ambas as cultivares, com incremento de 64,11% em Alvará e de 67,49% em Perfecta sobre a testemunha (Fig.8).

Nos teores de tiramina para a cultivar Alvará não houve diferença entre AQ15 semanal e a testemunha, para Perfecta AQ25 semanal apresentou um incremento de 24,67% quando comparado com a testemunha. Quanto à espermina, houve maior teor na cultivar Alvará em AQ15 semanal e quinzenal, com incremento de 148,68 e 127,73% sobre a testemunha e em Perfecta destaque para AQ15 semanal e quinzenal, bem como AQ25 semanal, com aumento de 37,6; 167,12 e 27,55%



respectivamente em relação à testemunha (Fig.8).

Fig 8. Histamina (a), serotonina (b), tiramina (c) e espermina (d) nos bulbos de cebola cultivadas organicamente (cultivares Alvará e Perfecta) submetidas a aplicações foliares na dose de 1 mL.L^{-1} de suspensões da biomassa da microalga *A. quadricellulare* com diferentes concentrações. Cultivares de cebola (cinza claro: Alvará; cinza escuro: Perfecta). Tratamentos: 0 mL.L^{-1} (control); $0,15 \text{ mL.L}^{-1}$ (AQ 15) e $0,25 \text{ mL.L}^{-1}$ (AQ 25); (1): 7 dias; (2): 15 dias. Letras minúsculas: cultivar; letras

maiúsculas: tratamentos; letras em negrito e itálico: frequências. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) conforme o teste de Tukey ($n=4$).

4. Discussão

As respostas de crescimento da planta de cebola até a bulbificação são muito importantes e podem impactar diretamente a produção dessa cultura (BETTONI et al., 2016). As variáveis biométricas avaliadas antes da bulbificação demonstraram a ação dos tratamentos com AQ no crescimento das plantas, com destaque para o crescimento de folhas, bulbos e pseudocaules (Fig. 1, 2 e 3). Cordeiro et al. (2022 a) avaliaram o crescimento inicial de plantas de cebola com uso de *A. quadricellulare* e verificaram também aumentos em massa fresca de folhas, comprimento e diâmetro de pseudocaule.

Conforme Zhang et al. (2016) em torno de 80% da massa seca dos bulbos de cebola são compostos principalmente por açúcares redutores glicose e frutose e os não redutores sacarose e frutooligossacarídeos. Esses compostos são os principais saldo da fotossíntese, sendo seu transporte da fonte para o dreno muito importante para o crescimento plantas, sendo transportados via floema e se acumulando nos drenos, ocasionando maior incremento de massa, tamanho e rendimento.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que os tratamentos AQ15 e AQ25 promoveram um aumento nos teores de açúcares totais e redutores nas folhas (Fig 4. a e b). Esses açúcares presentes nas folhas foram translocados para o dreno (bulbos) e consequentemente promoveram um maior rendimento (Fig. 5).

O uso de microalgas tem sido eficiente no aumento produtivo de plantas. Mógor et al. (2018) usaram biomassa de *Arthrospyra platensis* em beterraba, e tiveram um aumento do calibre e da massa de hipocótilos, assim como Gemin et al. (2019) com uso de microalga associada à ácido húmico obteve incremento em bulbos de cebola. O uso da microalga *Asterarcys quadricellulare* também aumentou o calibre, massa e bulbos de cebola (CORDEIRO et al., 2022 a). Esse resultado foi observado também no presente trabalho, com maior produtividade em bulbos de cebola tratados com *A. quadricellulare* (Fig. 5).

As plantas com uso da microalga apresentaram maiores teores de aminoácidos nas folhas com os tratamentos AQ15 e AQ25. Nos bulbos, a cultivar Alvará teve maiores teores no tratamento AQ15 e em Perfecta AQ25 se destacou em relação

aos demais (Fig 4. c e d).O uso de biofertilizantes pode melhorar o conteúdo de aminoácidos e proteínas solúveis em plantas e como resultado contribuir para a melhor assimilação de nitrogênio, bem como estimular o metabolismo dos aminoácidos (NARDI et al., 2016), como observado nesse estudo.

Os aminoácidos formam proteínas e são precursores de moléculas com funções biológicas essenciais para as plantas, como hormônios, nucleotídeos e polímeros da parede celular. Atuam também no transporte de nutrientes na planta. Essas substâncias agem no metabolismo primário e secundário das plantas, levando a síntese de diversos compostos que influenciam na produção, assim como a tolerância da planta a estresses abióticos (PRATELLI & PILOT, 2014; HILDERANDT et al., 2015).

Os resultados obtidos com uso de AQ, em relação ao seu conteúdo de L-aminoácidos livres, indicam que essa microalga pode sinalizar para a cadeia de assimilação de aminoácidos, assim como promover um maior acúmulo de aminoácidos das plantas, contribuindo assim para o seu crescimento, assimilação de nutrientes e consequentemente maior produção.

A assimilação de nitrogênio nas plantas de cebola foi avaliado por meio da atividade da enzima nitrato redutase, que aumentou nos tratamentos com AQ (Fig 4. e) Esses resultados foram verificados também para batata com uso de AQ 25 (CORDEIRO et al., 2022 b).

No metabolismo do nitrogênio, o nitrato NO_3^- é reduzido a nitrito NO_2^- pela ação da enzima nitrato redutase (PRATELLI & PILOT, 2014), posteriormente é reduzido a NH_4^+ e finalmente em nitrogênio amida da glutamina (TAIZ & ZEIGER, 2017). Dessa forma, o aumento da síntese da enzima nitrato redutase pode contribuir para o processo de assimilação de nitrogênio.

Os resultados obtidos antes da bulbificação, assim como as respostas bioquímicas de aumento de açúcares, aminoácidos, bem como da enzima nitrato redutase justificam o rendimento final da cultura, onde os tratamentos AQ15 e AQ25 tiveram um aumento de produtividade de 19 e 14% respectivamente quando comparados com o controle (Fig 5).

Buscando promover uma agricultura mais sustentável, o estudo com uso de microalgas tem interesse na identificação das substâncias que são sintetizadas por esses organismos (SINGH et al., 2016), como poliaminas (INCHAROENSAKDI et al.,

2010; MÓGOR et al., 2017) e aminoácidos (MÓGOR et al., 2018), capazes de promover o crescimento das plantas.

As poliaminas (PAs) são aminas alifáticas, das quais a biossíntese ocorre através da descarboxilação dos aminoácidos L-arginina e L-ornitina, estando as PAs presentes em todas as células vegetais e seus níveis mudam conforme o desenvolvimento da planta ocorre (VERA-SIRERA et al., 2010).

A putrescina é catalisada em espermidina e espermina pelas enzimas espermidina sintase e espermina sintase, e sua atividade e distribuição são reguladas conforme o tipo de tecido e estágio de desenvolvimento da planta (FAZILATI & FORGHANI, 2015). Desta forma, as PAs participam de vários processos metabólicos, como multiplicação e diferenciação celular nas plantas (SRIVASTAVA et al., 2013).

A espermina e espermidina estão associadas ao desenvolvimento e a promoção de crescimento das plantas, enquanto a putrescina relaciona-se a senescência vegetal (XIE et al., 2014; ANWAR et al., 2015; AHMED et al., 2017). Quando se avaliou o conteúdo de espermina nas folhas verificou-se um aumento significativo dessa PA nos tratamentos com AQ nas duas cultivares de cebola (Fig. 6.f), nos bulbos isso ocorreu para espermidina (Fig. 8.d), podendo essa resposta ter contribuído para o crescimento das plantas e conseqüentemente para um maior desempenho produtivo.

Mudanças nas respostas de PAs com uso de microalgas estimulando o crescimento de plantas com aumentos de espermidina e espermina, sendo relacionados as PAs e ao aumento no conteúdo de aminoácidos livres na biomassa de microalgas também foram relatados em plantas de alface, com uso de *Arthrospira platensis* (MÓGOR et al., 2017) e cana-de-açúcar com uso de *Asterarcys quadricellulare* (MÓGOR et al., 2022).

O triptofano é um aminoácido aromático derivado do corismato pela rota do ácido chiquimico, sendo precursor das auxinas. Esse aminoácido é convertido em 5-hidroxitriptofano por meio da triptofano hidroxilase, que dá origem à serotonina (5-hidroxitriptamina) e a triptamina (ERLAND & SAXENA, 2019). Essas aminas compartilham papéis com a auxina no crescimento e desenvolvimento das plantas (PELAGIO-FLORES et al., 2011; ARNAO & HERNANDEZ-RUIZ, 2018). Os resultados de 5-hidroxitriptofano em folhas (fig 7. a), triptamina em folhas e bulbos (Fig 6. a; Fig 7. b) e serotonina em bulbos (Fig 8. b) foram aumentados com AQ,

podendo indicar que o crescimento de plantas de cebola podem estar relacionados também ao efeito auxínico.

Assim como em trabalhos anteriores usando microalgas, o efeito no crescimento de plantas com uso de L-aminoácidos livres na biomassa (MÓGOR et al., 2018; CORDEIRO et al., 2022 a; CORDEIRO et al., 2022 b; MÓGOR et al., 2022) ratificam que o teor de L-aminoácido livre de AQ (90,94 mg g⁻¹) pode ser um composto bioativo que desencadeia o metabolismo das PAs e consequentemente o crescimento e produção de plantas de cebola, como constatado no presente trabalho.

5. Conclusão

O uso de *A. quadricellulare* (CCAP 294/1) promoveu o crescimento de planta e ganho de produtividade em cebola, com mudanças bioquímicas nos teores de aminoácidos, açúcares e na atividade da enzima nitrato redutase, assim como melhora no conteúdo de espermina em folhas, espermidina em bulbos, triptamina em folhas e bulbos, 5-hidroxotriptofano em bulbos e serotonina em bulbos, podendo seu efeito estar relacionado ao metabolismo das PAs e das auxinas.

Referências

- AHMED, S.; ARIYARATNE, M.; PATEL, J.; HOWARD, A. E.; KALINOSKI, A.; PHUNTUMART, V.; MORRIS, P. F. (2017). Altered expression of polyamine transporters reveals a role for spermidine in the timing of flowering and other developmental response pathways. *Plant Science*, 258, 146-155. Doi: 10.1016/j.plantsci.2016.12.002.
- ALVAREZ, A. L.; WEYERS, S. L.; GOEMANN, H. M.; PEYTON, B. M.; GARDNER, R. D. (2021). Microalgae, soil and plants: A critical review of microalgae as renewable resources for agriculture. *Algal Research*, 54, 102200. Doi: 10.1016/j.algal.2021.102200.
- ANWAR, R.; MATTOO, A. K.; HANDA, A. K. (2015). Polyamine interactions with plant hormones: crosstalk at several levels. *Polyamines*, 267-302. Doi: 10.1007/978-4-431-55212-3_22.

- ARNAO, M. B.; J. HERNÁNDEZ-RUIZ. (2018). Melatonin and its relationship to plant hormones. *Annals of Botany*, 121, 195–207. Doi: 10.1093/aob/mcx114.
- BETTONI, M. M.; MÓGOR, Á. F.; KOGERASTKI, J. F.; PAULETTI, V. (2016). Onion (*Allium cepa* L.) seedling growth using humic substances. *Idesia*, 34(2), 57-62. Doi: 10.4067/S0718-34292016005000008
- BOROWITZKA, M. A (2013). High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology* 25: 743–756. Doi: 10.1007/s10811-013-9983-9.
- CAVALCANTI, V. F.; LEAL, B. E. S.; PRADO, M. R., SAKUMA, A. C.; PEGORARO, L. A.; RAMOS, L. P. (2014). Cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* em fotobiorreator de placas planas e produção de ésteres por transesterificação in situ. *Revista Brasileira de Energias Renováveis*, 3(4). Doi: 10.5380/rber.v3i4.38616.
- CORDEIRO, E. C. N.; MÓGOR, Á. F.; de OLIVEIRA AMATUSSI, J.; MÓGOR, G.; de LARA, G. B.; MARQUES, H. M. C. (2022 a). Microalga Biofertilizer Triggers Metabolic Changes Improving Onion Growth and Yield. *Horticulturae*, 8(3), 223. Doi: doi.org/10.3390/horticulturae8030223.
- CORDEIRO, E. C. N.; MÓGOR, Á. F., AMATUSSI, J. O., MÓGOR, G.; MARQUES, H. M. C.; de LARA, G. B. (2022 b). Microalga biofertilizer improves potato growth and yield, stimulating amino acid metabolism. *Journal of Applied Phycology*, 34(1), 385-394. Doi: 10.1007/s10811-021-02656-0.
- COSTA, N. D.; de RESENDE, G. M. (2007). Cultivo da cebola no Nordeste.
- DIAMANTE, M. S.; BORGES, C. V.; SILVA, M. B.; MINATEL, I. O.; CORRÊA, C. R.; GOMEZ, H. A.; LIMA, G. P. P. (2019). Bioactive amines screening in four genotypes of thermally processed cauliflower. *Antioxidants* 8(8): 311. Doi: 10.3390/antiox8080311.
- EL-NAGGAR, N.E., HUSSEIN, M.H.; SHAABAN-DESSUUKI, S.A.; DALAL, R. S. (2020). Production, extraction and characterization of *Chlorella vulgaris* soluble polysaccharides and their applications in AgNPs biosynthesis and biostimulation of plant growth. *Scientific Reports* 10: 3011. Doi: 10.1038/s41598-020-59945-w.

- ERLAND, L. A.; SAXENA, P. (2019). Auxin driven indoleamine biosynthesis and the role of tryptophan as an inductive signal in *Hypericum perforatum* (L.). Plos one, 14(10), e0223878. Doi: 10.1371/journal.pone.0223878
- ESMAEILZADEH, S.; ASGHARIPOUR, M. R.; KHOSHNEVISAN, B. (2020). Water footprint and life cycle assessment of edible onion production - A case study in Iran. Horticultural Science, 261, 108925. Doi: 10.1016/j.scienta.2019.108925.
- FAZILATI, M.; FORGHANI, A. H. (2015). The role of polyamine to increasing growth of plant: As a key factor in health crisis. International Journal of Health System and Disaster Management, 3(2), 89–94. Doi: 10.4103/2347-9019.151316.
- FAOSTAT. (2021). FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 13 set. 2021.
- GARCIA-GONZALEZ, J.; SOMMERFELD, M. (2016). Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. J. Appl. Phycol. 28, 1051-1061. Doi: 10.1007/s10811-015-0625-2.
- GEMIN, L. G.; MÓGOR, Á. F.; AMATUSSI, J. D. O.; MÓGOR, G. (2019). Microalgae associated to humic acid as a novel biostimulant improving onion growth and yield. Scientia Horticulturae, 256, 108560. Doi: 10.1016/j.scienta.2019.108560.
- GHOSH, D. K.; BISWAS, L. K. N. B.; DAS, S., KARTICK, C. S; BANDYOPADHYAY, A. (2018). Minimizing mother bulb requirement through mechanical option: a cost friendly approach of onion seed production. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 7, 2646-2655. Doi: 10.20546/ijcmas.2018.707.311.
- GHOSH A.; KHANRA S.; MONDAL M. (2017) Effect of macronutrient supplements on growth and biochemical compositions in photoautotrophic cultivation of isolated *Asterarcys* sp. (BTA9034). Energy Convers Manag, 149, 39–51. Doi: 10.1016/j.enconman.2017.07.015.
- HAVEY, M. J. (2018). Onion breeding. Plant breeding reviews, 42, 39-85.

HILDEBRANDT, T. M.; NESI, A. N.; ARAÚJO, W. L.; BRAUN, H. P. (2015). Amino acid catabolism in plants. *Molecular plant*, 8(11), 1563-1579. Doi: 10.1016/j.molp.2015.09.005.

INCHAROENSAKDI, A.; JANTARO, S.; RAKSAJIT, W.; MÄENPÄÄ, P. (2010). Polyamines in cyanobacteria: biosynthesis, transport and abiotic stress response. *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, 1, 23-32.

ISHAQ, A. G; MATIAS-PERALTA H. M.; BASRI, H. (2016). Bioactive compounds from green microalga-*Scenedesmus* and its potential applications: a brief review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 39, 1–16.

JAWORSKI, E. K. (1971). Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and biophysical research communications*, 43(6), 1274-1279.

MAGNÉ, C.; LARHER, F. (1992). High sugar content interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Analytical biochemistry*, 200(1), 115-118.

MALDONADE, I. R.; CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A. (2013) Protocolo para a Determinacao de Acucares Totais em Hortalicas pelo Metodo de DNS. Comunicado Tecnico 85, Embrapa.

MAZEPA, E.; MALBURG, B. V.; MÓGOR, G.; de OLIVEIRA, A. C.; AMATUSSI, J. O.; CORRÊA, D. O.; LEMOS, J. S.; DUCATTI, D. R. B.; DUARTE, M.E. R.; MÓGOR, A. F. (2021). Plant growth biostimulant activity of the green microalga *Desmodesmus subspicatus*. *Algal Research*, 59, 102434. Doi: 10.1016/j.algal.2021.102434.

MÓGOR, G.; MÓGOR, Á. F.; LIMA, G. P. P.; de OLIVEIRA, R. A., BESPALHOK FILHO, J. C. (2022). Metabolic Changes in Sugarcane Bud Sprouting Stimulated by Microalga *Asterarcys quadricellulare*. *Sugar Tech*, 24(3), 930-940. Doi: 10.1007/s12355-022-01111-9.

MÓGOR, Á. F.; de OLIVEIRA AMATUSSI, J.; MÓGOR, G.; DE LARA, G. B. (2018). Bioactivity of cyanobacterial biomass related to amino acids induces growth and metabolic changes on seedlings and yield gains of organic red beet. *American Journal of Plant Sciences*, 9(05), 966. Doi: 10.4236/ajps.2018.95074.

- MÓGOR, A. F.; ÖRDÖG, V.; LIMA, G. P. P.; MOLNÁR, Z.; MÓGOR, G. (2017). Biostimulant properties of cyanobacterial hydrolysate related to polyamines. *Journal of Applied Phycology*, 30, 453–460. Doi: 10.1007/s10811-017-1242-z.
- MORRIS, H. J.; ALMARALES, A.; CARRILLO, O.; BERMÚDEZ, R. C. (2008). Utilisation of *Chlorella vulgaris* cell biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. *Bioresource Technology*, 99(16), 7723-7729. Doi: 10.1016/j.biortech.2008.01.080.
- NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; SCHIAVON, M.; ERTANI, A. (2016) Plant biostimulants: Physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. *Scientia Agricola*, 73, 18–23. Doi: 10.1590/0103-9016-2015-0006.
- OKADA, H. T.; ABEDIN, A.; YAMAMOTO, T.; HAYASHI, M.; HOSOKAWA, M. (2020). Production of low-potassium onions based on mineral absorption patterns during growth and development. *Scientia Horticulturae*, 267, 109252. Doi: 10.1016/j.scienta.2020.109252.
- PANNACCI, E.; FARNESELLI, M.; GUIDUCCI, M.; TEI, F. (2020). Mechanical weed control in onion seed production. *Crop protection*, 135, 105221. Doi: 10.1016/j.cropro.2020.105221.
- PELAGIO-FLORES, R.; ORTÍZ-CASTRO, R.; MÉNDEZ-BRAVO, A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; LÓPEZ-BUCIO, J. (2011). Serotonin, a tryptophan-derived signal conserved in plants and animals, regulates root system architecture probably acting as a natural auxin inhibitor in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 52(3), 490-508. Doi: 10.1093/pcp/pcr006.
- PRATELLI, R.; PILOT, G. (2014). Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. *Journal of Experimental Botany*, 65 (19), 5535–5556. Doi:10.1093/jxb/eru320.
- RAJESHWARI, K. R.; M. RAJASHEKHAR. (2011). Biochemical composition of seven species of cyanobacteria isolated from diferente aquatic habitats of Western Ghats, southern India. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(5), 849–857. Doi: 10.1590/S1516-89132011000500001.

- RENUKA, N.; GULDHE, A.; PRASANNA, R.; SINGH, P.; BUX, F. (2018). Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges. *Biotechnology advances*, 36(4), 1255-1273. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.04.004.
- RONGA D, BIAZZI E, PARATI K. (2019) Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions. *Agronomy* 9:1–22. Doi: 10.3390/agronomy9040192.
- SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. (2016). The Assistat software version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *African Journal of Agricultural Research*, 11, 3733–3740. Doi: 10.5897/AJAR2016.11522.
- SINGH, M., DOTANIYA; M. L., MISHRA; A., DOTANIYA, C. K.; REGAR, K. L.; LATA, M. (2016). Role of biofertilizers in conservation agriculture. In *Conservation agriculture* (pp. 113-134). Springer, Singapore. Doi: 10.1007/978-981-10-2558-7_4.
- SRIVASTAVA, A. K.; RAI, A. N.; NEILAN, B. A. (Eds.). (2013). *Stress biology of cyanobacteria: molecular mechanisms to cellular responses*. CRC Press.
- STIRK, W.A.; ORDOG, V.; NOVAK, O.; ROLČIK, J.; BALINT, M. S. P.; VAN STADEN, J. (2013) Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains. *Journal of Applied Phycology*, 49:459–467. Doi: 10.1111/jpy.12061.
- TAIZ, L.; and ZEIGER, E. (2017). *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. 6, 888.
- VERA-SIRERA, F.; MINGUET, E. G.; SINGH, S. K.; LJUNG, K.; TUOMINEN, H.; BLÁZQUEZ, M. A.; CARBONELL, J. (2010). Role of polyamines in plant vascular development. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(7), 534–539. Doi: doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.01.011.
- WINTERS, A.L.; LLOYD, J. D.; JONES, R.; MERRY, R. J. (2002). Evaluation of a rapid method for estimating free amino acids in silages. *Animal Feed Science and Technology*, 99, 177–187. Doi: 10.1016/s0377-8401(02)00112-8.
- XIE, S. S.; WU, H. J.; ZANG, H. Y.; WU, L. M.; ZHU, Q. Q.; GAO, X. W. (2014). Plant growth promotion by spermidine-producing *Bacillus subtilis* OKB105. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(7), 655-663. Doi: 0.1094/MPMI-01-14-0010-R.
- ZHANG, C.; ZHANG, H.; ZHAN, Z.; LIU, B.; CHEN, Z., LIANG, Y. (2016). Transcriptome analysis of sucrose metabolism during bulb swelling and development

in onion (*Allium cepa* L.). *Frontiers in plant science*, 7, 1425. Doi: 10.3389/fpls.2016.01425.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existem diversas pesquisas demonstrando que o uso de microalgas na agricultura como um produto biofertilizante, se tornou uma alternativa sustentável, proporcionando o agricultor ganhos na produtividade. Porém, o uso da microalga *Asterarcys quadricellulare* na agricultura é recente, com os primeiros trabalhos publicados nessa área em 2022. O que se sabia sobre essa microalga era a sua caracterização, bem como seu alto conteúdo proteico e de carboidratos e algumas técnicas de cultivo. Outras respostas descobertas sobre AQ foram que pode ser destinada para a alimentação humana, como fonte de biomassa para biocombustíveis, devido a sua composição lipídica e de aminoácidos.

Por meio deste trabalho, verificou-se que a biomassa de *A. quadricellulare* pode atuar no crescimento e produção de plantas de batata e cebola, desde o seu estágio inicial, até em respostas bioquímicas em seu metabolismo, assim como em respostas metabolômicas quando usada como biofertilizante com aplicações foliares. Assim, essa microalga se torna uma alternativa de uso para uma agricultura mais sustentável e ecologicamente correta, melhorando também o desempenho produtivo.

Devido às baixas concentrações utilizadas no presente trabalho, a aplicação da biomassa dessa microalga deve ser compreendida como uma maneira de fornecer moléculas bioativas às plantas. Essas moléculas podem desencadear sinalizações que alteram o metabolismo vegetal. Isso pode ser explicado em AQ pela presença do ácido glutâmico e arginina, que são os aminoácidos de maior porcentagem em sua composição. Esses aminoácidos estão ligados a diversas atividades no metabolismo vegetal, tais como assimilação de nitrogênio – que pudemos verificar que foi melhorada por meio da atividade da enzima nitrato redutase nas plantas de batata e cebola; crescimento vegetal e ser precursor da síntese de poliaminas, que está relacionado a processos biológicos importantes de crescimento e desenvolvimento das plantas e que também foram verificados nos tratamentos com AQ nas culturas avaliadas.

Essas respostas encontradas sobre AQ mostraram que essa microalga proporcionou melhora nos teores de açúcares, aminoácidos, pigmentos, poliaminas, bem como substâncias que promovem respostas auxínicas na planta. Essa

biomassa pode ser considerada uma fonte natural, podendo ser utilizada em novos trabalhos de cunho agronômico.

Essa pesquisa ajudou a esclarecer o potencial da biomassa da microalga *Asterarcys* no âmbito agronômico. Porém, abriu-se uma infinidade de novas possibilidades de estudos com AQ, como detalhes em sua composição, desempenho genético – com identificação de genes que desencadeiam a sinalização de AQ no metabolismo vegetal; o entendimento das rotas metabólicas desencadeadas nas plantas por AQ, o estudo em outras culturas, com outras concentrações e formas de aplicação entre outras possibilidades que podem ser estudadas.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), 257-275. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>.
- ABOU CHEHADE, L.; AL CHAMI, Z.; DE PASCALI, S.A.; CAVOSKI, I.; FANIZZI, F.P. (2018). Biostimulants from food processing by-products: Agronomic, quality and metabolic impacts on organic tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98, 1426–1436. Doi: 10.1002/jsfa.8610.
- ALVAREZ, A. L.; WEYERS, S. L.; GOEMANN, H. M.; PEYTON, B. M.; GARDNER, R. D. (2021). Microalgae, soil and plants: A critical review of microalgae as renewable resources for agriculture. *Algal Research*, 54, 102200. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102200>.
- BALAJI, S; KALAIVANI, T.; SUSHMA, B.; VARNEETHA PILLAI, C.; SHALINI, M.; RAJASEKARAN, C. (2015). Characterization of sorption sites and differential stress response of microalgae isolates against tannery effluents from Ranipet industrial area—an application towards phycoremediation. *International Journal of Phytoremediation*, 21, 1-27. Doi:10.1080/15226514.2015.1115960.
- BARONE, V.; PUGLISI, I.; FRAGALÁ, F.; PIERO, A. R.; GIUFFRIDA, F.; and BAGLIERI, A. (2019). Novel bioprocess for the cultivation of microalgae in hydroponic growing system of tomato plants. *Journal of Applied Phycology*, 31, 465 – 470. Doi: 10.1007/s10811-018-1518-y.
- BOROWITZKA, M. A (2013). High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology* ,25, 743–756. Doi: Borowitzka, Michael A. (2013). High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*, 25(3), 743–756. Doi: 10.1007/s10811-013-9983-9.
- BRASIL. (2020). Instrução Normativa Nº 61, de 8 de julho de 2020. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-61-de-8-de-julho-de-2020-266802148>.

BRASIL. (2003). Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Presidência da República - Casa Civil, Brasília, 23 de dezembro de 2003. Available at: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/2003/L10.831.htm>. Acesso em: 21 jun. 2022.

CASTRO, P. R. C.; CAMPOS, G. R.; CARVALHO, M. E. A. (2019). Biorreguladores e bioestimulantes agrícolas. Piracicaba: ESALQ, 74 p.

CASTRO, P. R. C.; CARVALHO, M. E. A.; MENDES, A. C. C. M.; ANGELINI, B. G. (2017) Manual de estimulantes vegetais: nutrientes, biorreguladores, bioestimulantes, bioativadores, fosfitos e biofertilizantes na agricultura tropical. Agronomica Ceres, Piracicaba.

CAVALCANTI, V. F.; LEAL, B. E. S.; PRADO, M. R., SAKUMA, A. C.; PEGORARO, L. A.; RAMOS, L. P. (2014). Cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* em fotobiorreator de placas planas e produção de ésteres por transesterificação in situ. *Revista Brasileira de Energias Renováveis*, 3(4). Doi: <http://dx.doi.org/10.5380/rber.v3i4.38616>.

CHACÓN, T. L. (2010). Efecto de la aplicación de soluciones de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* sobre el contenido de compuestos funcionales en germinados de brócoli (*Brassica oleracea* var *italica*). Magister en diseño y gestión de procesos, Facultad de Ingeniería, Universidad de la Sabana, Bogotá DC, Colombia.

CHAUDHARY, R.; KHATTAR, J. I. S. (2019). Optimization of culture conditions for lipid production by microalga *Asterarcys quadricellulare* and evaluation of lipids for biodiesel production. Optimization.

COSTA, N. D.; LEITE, D. L.; SANTOS, C. A. F.; CANDEIA, J. A.; VIDIGAL, S. M. (2002). Cultivares de cebola. *Informe Agropecuário* 23, 20-27.

DE JONG, H. (2016). Impact of the Potato on Society. *American Journal of Potato Research*, 93, 415- 429.

DEVAUX, A.; GOFFART, J. P.; PETSAKOS, A.; KROMANN, P.; GATTO, M.; OKELLO, J.; SUAREZ, V.; HAREAU, G. (2020). Global Food Security, Contributions from Sustainable Potato Agri-Food Systems. *The potato crop*, 3-35.

DINESHKUMAR, R.; SUBRAMANIAN, J.; ARUMUGAM, A.; AHAMED RASHEEQ, A.; SAMPATHKUMAR, P. (2020). Exploring the microalgae biofertilizer effect on onion cultivation by field experiment. *Waste and Biomass Valorization*, 11(1), 77-87. Doi: 10.1007/s12649-018-0466-8.

DINESHKUMAR, R.; SUBRAMANIAN, J.; GOPALSAMY, J.; JAYASINGAM, P.; ARUMUGAM, A.; KANNADASAN, S.; SAMPATHKUMAR, P. (2019). The impact of using microalgae as biofertilizer in maize (*Zea mays* L.). *Waste and Biomass Valorization*, 10, 1101–1110. Doi: 10.1007/s12649-017-0123-7.

DOMINGUES, C. H. C. (2011). Contribuição à análise de agregação de valor na pequena produção agrícola: o caso dos produtos orgânicos. Campinas: UNICAMP. Disponível em: <www.prp.unicamp.br > pibic > congressos > xixcongresso > paineis>. Acesso em: 23 jun. 2022.

DU JARDIN, P. (2015) Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3–14. Doi: 10.1016/j.scienta.2015.09.021.

EL ARROUSSI, H., BENHIMA, R., ELBAOUCHI, A., SIJILMASSI, B., EL MERNISSI, N., AAFSAR, A., MEFTAH-KADMIRI, I.; BENDAOU, N.; SMOUNI, A. (2018). *Dunaliella salina* exopolysaccharides: a promising biostimulant for salt stress tolerance in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Applied Phycology*, 30(5), 2929-2941. Doi: 10.1007/s10811-017-1382-1.

EL BALLA, M. M. A; HAMID, ABDELBAĞI A; ABDELMAGEED, A. H. A. (2013). Effects of time of water stress on flowering, seed yield and seed quality of common onion (*Allium cepa* L.) under the arid tropical conditions of Sudan. *Agricultural Water Management*, 121, 149-157. Doi: 10.1016/j.agwat.2013.02.002.

FAHEED, F.A.; FATTAH A. Z. Effect of *Chlorella vulgaris* as bio-fertilizer on growth parameters and metabolic aspects of lettuce plant. *Journal of Agriculture and Social Science*, v. 4, n. 4, p. 165-169, 2008. Doi:

FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Download Data. 41 Disponível em:< <http://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>>. Acesso em: 20 junho. 2022.

FERNANDES, A. M. Crescimento, produtividade, acúmulo e exportação de nutrientes em cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.). 2010. 148f. Dissertação

(Mestrado em Agronomia/Agricultura) Faculdade de Ciências Agrômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

FERREIRA, M.G.; ALVES, F. M.; NICK, C. (2018) A cultura. In: Nick C, Borém A (Eds.) Cebola do plantio à colheita, 9-18.

FILGUEIRA, F.A.R. (2008). Novo manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3ª edição - Viçosa, MG: Editora UFV.

FORDE, B. G.; LEA, P. J. (2007). Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signaling. *Journal of Experimental Botany*. 58, 2339–2358. Doi: 10.1093/jxb/erm121.

GARCÍA, J. M. R.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; SEVILLA, J. M. F. (2012). Development of a process for the production of L-amino acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 112, 164-170. Doi: doi:10.1016/j.biortech.2012.02.094.

GARCIA-GONZALEZ, J.; SOMMERFELD, M. (2016). Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. *Journal of Applied Phycology*, 28, 1051-1061. Doi: 10.1007/s10811-015-0625-2.

GEMIN, L. G.; MÓGOR, Á. F.; AMATUSSI, J. D. O.; MÓGOR, G. (2019). Microalgae associated to humic acid as a novel biostimulant improving onion growth and yield. *Scientia Horticulturae*, 256, 108560. Doi: 10.1016/j.scienta.2019.108560.

GHOSH A.; KHANRA S.; MONDAL M. (2017) Effect of macronutrient supplements on growth and biochemical compositions in photoautotrophic cultivation of isolated *Asterarcys* sp. (BTA9034). *Energy Convers Manag* 149:39–51. Doi: 10.1016/j.enconman.2017.07.015.

HEGEWALD, E.; WOLF, M., KELLER, A.; FRIEDL, T., and KRIENITZ, L. (2010). ITS2 sequence-structure phylogeny in the *Scenedesmaceae* with special reference to *Coelastrum* (Chlorophyta, Chlorophyceae), including the new genera *Comasiella* and *Pectinodesmus*. *Phycologia*, 49(4), 325-335. Doi: 10.2216/09-61.1.

HILDEBRANDT, T. M.; NESI, A. N.; ARAÚJO, W. L.; BRAUN, H. P. (2015). Amino acid catabolism in plants. *Molecular plant*, 8(11), 1563-1579. Doi:10.1016/j.molp.2015.09.005.

HONG, J. W.; KIM, S. A.; CHANG, J. W. (2012). Isolation and description of a Korean microalga, *Asterarcys quadricellulare* KNUA020, and analysis of its biotechnological potential. *Algae*, 27, 197–203. Doi: 10.4490/algae.2012.27.3.197.

HUSSAIN A.; HASNAIN, S. (2011). Phytostimulation and biofertilization in wheat by cyanobacteria. *Journal of Industrial Microbiology*, 38, 85-92. Doi: 10.1007/s10295-010-0833-3.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (2022). Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>. Acesso em 15 de jun. 2022.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (2017). Produção Agrícola, 2017. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1612>. Acesso em: 15 de jun. 2022.

ISHAQ, A. G; MATIAS-PERALTA H. M.; BASRI, H. (2016) Bioactive compounds from green microalga-*Scenedesmus* and its potential applications: a brief review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 39, 1–16.

KAN, C. C.; CHUNG, T. Y.; JUO, Y. A., HSIEH M. H. (2015). Glutamine rapidly induces the expression of key transcription factor genes involved in nitrogen and stress responses in rice roots. *BMC genomics*, 16(1), 1-15. Doi: DOI 10.1186/s12864-015-1892-7.

KANTER, R.; WALLS, H. L.; TAK, M.; ROBERTS, F.; WAAGE, J. A. (2015). Conceptual framework for understanding the impacts of agriculture and food system policies on nutrition and health. *Food Security, Netherlands*, 4, 767–777. Doi: DOI 10.1007/s12571-015-0473-6.

KURTZ, C.; ERNANI, P. R.; PAULETTI, V., MENEZES JUNIOR; F. O., VIEIRA NETO, J. (2013). Produtividade e conservação de cebola afetadas pela adubação nitrogenada no sistema de plantio direto. *Horticultura Brasileira*, 31, 559-567. Doi: 10.1590/s0102-05362013000400009.

LARA, G. B. D., MÓGOR, Á., AMATUSSI, J. D. O., CORDEIRO, E. C. N., MARQUES, H. M. C., MÓGOR, G. (2022). Microalga improve the growth, yield, and contents of sugar, amino acid, and protein of tomato. *Ciência e Agrotecnologia*, 46. Doi: 10.1590/1413-7054202246023821.

LEITE, D. L. (2014). Produção de Sementes de Cebola. Embrapa Clima temperado, Pelotas -RS v. 142.

LIANG, Z. H. O. U.; MU, T. H., ZHANG; R. F., SUN, Q. H.; XU, Y. W. (2019). Nutritional evaluation of different cultivars of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) from China by grey relational analysis (GRA) and its application in potato steamed bread making. *Journal of integrative agriculture*, 18(1), 231-245. Doi: 10.1016/S2095-3119(18)62137-9.

LIN, H. Y.; LIN, H. J. (2019). Polyamines in microalgae: something borrowed, something new. *Marine Drugs*, 17, 1. Polyamines in microalgae: something borrowed, something new. Doi: 10.3390/md17010001.

LOURENÇO, V. A.; SCHNEIDER, S.; GAZOLLA, M. (2017). A agricultura orgânica no Brasil: um perfil a partir do censo agropecuário 2006. *Extensão Rural*, Santa Maria, 24(1), 42-61.

LU, K., ZHAO, X., HO, S.H., MA, R., XIE, Y., and CHEN, J. (2019). Biorefining and the Functional Properties of Proteins from Lipid and Pigment Extract Residue of *Chlorella pyrenoidosa*. *Marine Drugs*. 17, 8, 1 – 14. Doi: 10.3390/md17080454.

MADAIL, J. C. M.; BELARMINO, L. C.; BINI, D. A. (2011). Evolução da produção e mercado de produtos orgânicos no Brasil e no Mundo. *Revista Científica Ajes*, 2 (3), 1- 9.

MADEIRA, N. R.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; GIORDANO, L. B. (2008). Contribuição portuguesa à produção e ao consumo de hortaliças no Brasil: uma revisão histórica. *Horticultura Brasileira*, 26, 428-432. Doi: 10.1590/S0102-05362008000400002.

MAJUMDAR, R., BARCHI, B., TURLAPATI, S. A., GAGNE, M., MINOCHA, R., LONG, S., & MINOCHA, S. C. (2016). Glutamate, ornithine, arginine, proline, and polyamine metabolic interactions: the pathway is regulated at the post-transcriptional level. *Frontiers in plant Science*, 7, 78. Doi: 10.3389/fpls.2016.00078.

MAZEPA, E.; MALBURG, B. V.; MÓGOR, G.; de OLIVEIRA, A. C.; AMATUSSI, J. O.; CORRÊA, D. O.; LEMOS, J. S.; DUCATTI, D. R. B.; DUARTE, M..E. R.; MÓGOR, A. F. (2021). Plant growth biostimulant activity of the green microalga *Desmodesmus subspicatus*. *Algal Research*, 59, 102434. Doi: 10.1016/j.algal.2021.102434.

MEHTA, I. (2017). Origin and history of onions. IOSR Journal Of Humanities And Social Science, 22(9), 7-10.

MELO, P. C. T. (2007). Produção de sementes de cebola em condições tropicais e subtropicais. São Paulo: USP.

MÓGOR, G., MÓGOR, Á. F., LIMA, G. P. P., de OLIVEIRA, R. A., BESPALHOK FILHO, J. C. (2022). Metabolic Changes in Sugarcane Bud Sprouting Stimulated by Microalga *Asterarcys quadricellulare*. Sugar Tech, 24(3), 930-940. Doi: 10.1007/s12355-022-01111-9.

MÓGOR A. F.; MÓGOR, G. (2022). Aminoácidos, extratos de algas, extratos vegetais e substâncias húmicas como: Biofertilizantes. Piracicaba, São Paulo: Pecege Editora. 93p.

MÓGOR, Á. F.; de OLIVEIRA AMATUSSI, J.; MÓGOR, G.; DE LARA, G. B. (2018). Bioactivity of cyanobacterial biomass related to amino acids induces growth and metabolic changes on seedlings and yield gains of organic red beet. American Journal of Plant Sciences, 9(05), 966. Doi: 10.4236/ajps.2018.95074.

MÓGOR, A. F.; ÖRDÖG, V.; LIMA, G. P. P.; MOLNÁR, Z.; MÓGOR, G. (2017). Biostimulant properties of cyanobacterial hydrolysate related to polyamines. Journal of Applied Phycology, 30, 453–460. Doi: 10.1007/s10811-017-1242-z.

MORRIS, H. J.; ALMARALES, A.; CARRILLO, O.; BERMÚDEZ, R. C. (2008). Utilisation of *Chlorella vulgaris* cell biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. Bioresource Technology, 99(16), 7723-7729. Doi: 10.1016/j.biortech.2008.01.080.

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; SCHIAVON, M.; ERTANI, A. (2016) Plant biostimulants: Physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. Scientia Agricola, 73, 18–23. Doi: 10.1590/0103-9016-2015-0006.

NAVARRE, R.; PAVEK, M. J. (Eds.). (2014). The potato: botany, production and uses. CABI.

NOSEDA, M. D. (2021). Plant growth biostimulant activity of the green microalga *Desmodesmus subspicatus*. *Algal Research*, 59, 102434. Doi: 10.1016/j.algal.2021.102434.

OHYAMA, T.; OHTAKE, N.; SUEYOSHI, K.; ONO, Y.; TSUTSUMI, K.; UENO, M.; TANABATA, S.; SATO, T.; TAKAHASHI, Y. (2017). Amino acid metabolism and transport in soybean plants. *Amino Acid-New Insights and Roles in Plant and Animal*, 171-196. Doi: 10.5772/intechopen.68992

OLIVEIRA, O.; GIANESELLA, S.; SILVA, V.; MATA, T.; CAETANO, N. (2017). Lipid and carbohydrate profile of a microalga isolated from wastewater. *Energy Procedia*, 136, 468–473. Doi: 10.1016/j.egypro.2017.10.305.

OLIVEIRA, V. R.; LEITE, D. L.; SANTOS, C. A. F.; COSTA, N. D.; MELO, P. C. T. (2004). Sistema de produção de cebola (*Allium cepa* L.): Cultivares. Brasília: Embrapa/CNPB.

OLIVEIRA, V.R.; BOITEUX, L. S. Cultivo da cebola (*Allium cepa* L.). (2003). Série sistemas de cultivo, Embrapa Hortaliças, Brasília-DF. Versão eletrônica (www.cnph.embrapa.br).

OSMAN, M. E. H.; EL-SHEEKH, M. M.; EL-NAGGAR, A. H.; GHEDA, S. F. (2010). Effect of two species of cyanobacteria as biofertilizers on some metabolic activities, growth, and yield of pea plant. *Biology and fertility of soils*, 46(8), 861-875. Doi: 10.1007/s00374-010-0491-7.

ÖZDEMİR, S.; SUKATAR, A.; OZTEKIN. (2016). Production of *Chlorella vulgaris* and its effects on plant growth, yield and fruit quality of organic tomato grown in greenhouse as biofertilizer. *Tarim Bilimleri Dergisi*, 22(4), 596-605.

PALMA, M. S., MÓGOR, Á. F., MÓGOR, G., de OLIVEIRA AMATUSSI, J., MICHELON, T. B., PANOBIANCO, M. (2022). Microalga added to Bradyrhizobium inoculant improve soybean tolerance to salt stress. *Journal of Applied Phycology*, 1-17. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-022-02810-2>.

PLAZA, B. M.; GÓMEZ-SERRANO, C.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, F. G.; and JIMENEZBECKER, S. (2018). Effect of microalgae hydrolysate foliar application (*Arthrospira platensis* and *Scenedesmus* sp.) on *Petunia x hybrida* growth. *Journal of Applied Phycology*, 30(4), 2359-2365. Doi: 10.1007/s10811-018-1427-0.

PRATELLI, R.; PILOT, G. (2014). Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. *Journal of Experimental Botany*, 65 (19), 5535–5556. Doi:10.1093/jxb/eru320.

RACHIDI, F.; BENHIMA, R.; SBABOU, L.; EL ARROUSSI, H. (2020). Microalgae polysaccharides bio-stimulating effect on tomato plants: Growth and metabolic distribution. *Biotechnology reports*, 25, e00426. Doi: 10.1016/j.btre.2020.e00426.

RAMPAZZO, A. (2020). Cenário atual da cultura da batata e os principais desafios. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/colunistas/cenarioatualdaculturadabatataeosprincipaisdesafios_442481.html. Acesso em: 05 jun. 2022.

REGANOLD, J. P., and WACHTER, J. M. (2016). Organic agriculture in the twenty-first century. *Nature plants*, 2(2), 1-8. Doi: 10.1038/nplants.2015.221.

REICHLING, J. (2018). Plant-microbe interactions and secondary metabolites with antiviral, antibacterial and antifungal properties. *Annual Plant Reviews Volume 39: Functions and Biotechnology of Plant Secondary compounds*.

RENUKA, N.; GULDHE, A.; PRASANNA, R.; SINGH, P.; BUX, F. (2018). Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges. *Biotechnology advances*, 36(4), 1255-1273. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.04.004.

RÖDER, C.; MÓGOR, Á. F.; SZILAGYI-ZECCHIN, V. J. (2018) Potato yield and metabolic changes by use of biofertilizer containing L-glutamic acid. *Comunicata Scientiae*, 9, 211–218. Doi: 10.14295/CS.v9i2.2564.

ROMANOWSKA-DUDA, Z. B.; GRZESIK, M.; KALAJI, H. M. (2010). Phytotoxkit test in growth assessment of corn as an energy plant fertilized with sewage sludge. *Environmental Protection Engineering*, 36(1), 73.

RONGA D, BIAZZI E, PARATI K. (2019) Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions. *Agronomy*, 9, 1–22. Doi: 10.3390/agronomy9040192.

SAFI, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; PONTALIER, P.; VACA-GARCIA, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella*

vulgaris: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 35, 265-278. Doi: 10.1016/j.rser.2014.04.007.

SANGAPILLAI, K.; MARIMUTHU, T. (2019). Isolation and selection of growth medium for freshwater microalgae *Asterarcys quadricellulare* for maximum biomass production. Water Science and Technology, 80 (11), 2027–2036. Doi: 10.2166/wst.2020.015.

SAVCI, S. (2012). An Agricultural Pollutant: Chemical Fertilizer. International Journal of Environmental Science and Development, 3, 73-80. Doi: 10.7763/IJESD.2012.V3.191.

SCHREIBER, C.; SCHIEDUNG, H.; HARRISON, L.; BRIESE, C.; ACKERMANN, B.; KANT, J.; SCHREY, S.D.; HOFMANN, D.; SINGH, D.; EBENHOH, O. (2018). Evaluating potential of green alga *Chlorella vulgaris* to accumulate phosphorus and to fertilize nutrient-poor soil substrates for crop plants. Journal of Applied Phycology, 30, 2827–2836. Doi: 10.1007/s10811-018-1390-9.

SHANAN, N. T.; HIGAZY, A. M. (2009). Integrated biofertilization management and cyanobacteria application to improve growth and flower quality of *Matthiola incana*. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 5(6), 1162-1168.

SILVA, M. C. C.; FONTES, P. C. R. (2008). Nutrição - Manejo integrado a adubação nitrogenada na cultura da batata. Associação Brasileira de batata. 21.

SINGH, D.P.; KHATTAR, J.S.; RAJPUT, A.; CHAUDHARY, R.; SINGH, R. (2019). High production of carotenoids by the green microalga *Asterarcys quadricellulare* PUMCC 5.1.1 under optimized culture conditions. Plos One v.14, n.9, e0221930. Doi: 10.1371/journal.pone.0221930.

SINGH, M., DOTANIYA, M. L., MISHRA, A., DOTANIYA, C. K.; REGAR, K. L.; LATA, M. (2016). Role of biofertilizers in conservation agriculture. In Conservation agriculture (pp. 113-134). Springer, Singapore. Doi: 10.1007/978-981-10-2558-7_4.

SOUZA, R. J. de; ASSIS, R. P.; ARAÚJO, J. C. (2015). Cultura da cebola: tecnologias de produção e comercialização. Lavras: Ed. UFLA.

- STADNIK, M. J.; ASTOLFI, P.; FREITAS, M. B. DE. (2017). Bioestimulantes: uma perspectiva global e desafios para a América latina. Anais do I Simpósio Latinoamericano sobre Bioestimulantes na Agricultura, v. 01, p. 18-23.
- STIRK, W. A; ORDOG, V.; NOVAK, O.; ROLČIK, J.; BALINT, M. S. P.; VAN STADEN, J. (2013) Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains. Journal of Applied Phycology, 49, 459–467. Doi: 10.1111/jpy.12061.
- SUCIU, N. A.; FERRARI, F.; and TREVISAN, M. (2018). Organic and conventional food: Comparison and future research. Trends in Food Science and Technology, 84, 49-51. Doi: 10.1016/j.tifs.2018.12.008.
- TAIZ, L.; and ZEIGER, E. (2017). Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6, 888.
- TARRAF, S.; TALAAT, I. M.; EL-SAYED, A. E. K.; and BALBAA, L. K. (2015). Influence of foliar application of algae extract and amino acids mixture on fenugreek planted in sandy and clay soils. Nusantara Bioscience, 7, 33-37. Doi: 10.13057/nusbiosci/n070106.
- TEGEDER, M. (2014). Transporters involved in source to sink partitioning of amino acids and ureides: Opportunities for crop improvement. Journal of Experimental Botany, 65, 1865–1878. Doi: 10.1093/jxb/eru012.
- VAPZA (2019). O que são alimentos orgânicos e quais os seus benefícios? Rev. Vapzacom você, 23/05/2019. Disponível em: <vapza.com.br > blog > o-que-sao-alimentos-organicos-e-quais-os-seus...> Acesso em: 19 jun. 2022.
- VARSHNEY, P., BEARDALL, J., BHATTACHARYA, S., and WANGIKAR, P. P. (2018). Isolation and biochemical characterisation of two thermophilic green algal species-*Asterarcys quadricellulare* and *Chlorella sorokiniana*, which are tolerant to high levels of carbon dioxide and nitric oxide. Algal research, 30, 28-37. Doi: 10.1016/j.algal.2017.12.006.
- VASCONCELOS, B. M. F.; GONÇALVES, A. A. (2013). Macroalgas e seus usos: alternativas para as indústrias brasileiras. Revista Verde, v. 8, n. 5, p. 125-140. 2013.
- XUPENG, B. C., SONG, X., and XURAN, F. (2017). Amino Acid Changes during Energy Storage Compounds Accumulation of Microalgae under the Nitrogen

Depletion. New Insights and Roles in Plant and Animal. 9, 197-208. Doi: 10.5772/intechopen.68540.

ZAYADAN, B. K., GABALLAH, M. M., SALEH, M. M. (2014). Bioremediation of Al-Sayyadin Lagoon polluted water using wild and mutante strains of microalgae. African Journal of Microbiology Research, 8, 26, 2522-2533. Doi: 10.5897/AJMR2014.6787.

ZHAO, Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. Annual Review of Plant Biology v. 61, p. 49–64.