

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA DE OLIVEIRA AMATUSSI

ASSOCIAÇÃO DE ALGA CALCÁRIA (*Lithothamnium sp.*) E CIANOBACTÉRIA
(*Arthrosphaera platensis*) COMO BIOFERTILIZANTE NO CULTIVO DE BATATA E
CEBOLA

CURITIBA

2022

JULIANA DE OLIVEIRA AMATUSSI

ASSOCIAÇÃO DE ALGA CALCÁRIA (*Lithothamnium sp.*) E CIANOBACTÉRIA
(*Arthrospira platensis*) COMO BIOFERTILIZANTE NO CULTIVO DE BATATA E
CEBOLA

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em
Agronomia – Produção Vegetal, 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

Amatussi, Juliana de Oliveira

Associação de alga calcária (*Lithothamnium sp.*) e cianobactéria (*Arthrospira platensis*) como biofertilizante no cultivo de batata e cebola/ Juliana de Oliveira Amatussi . – 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. Adubos e fertilizantes orgânicos. 2. Batata. 3. Cebola. I. Mógor, Átila Francisco. II. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal). III. Título.



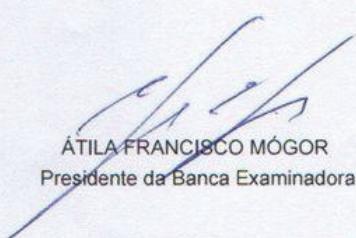
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA
(PRODUÇÃO VEGETAL) - 40001016031P6

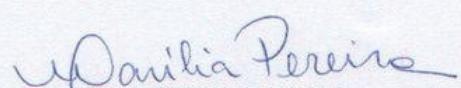
TERMO DE APROVAÇÃO

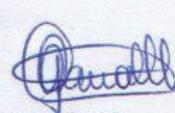
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **JULIANA DE OLIVEIRA AMATUSSI** intitulada: **ASSOCIAÇÃO DE ALGA CALCÁRIA (*Lithothamnium sp.*) E CIANOBACTÉRIA (*Arthrospira platensis*) COMO BIOFETILIZANTE NO CULTIVO DE BATATA E CEBOLA**, 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.

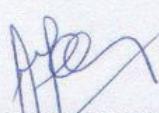
A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 16 de Dezembro de 2022.


ÁTILA FRANCISCO MÓGOR
Presidente da Banca Examinadora


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


GILDA MÓGOR
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


ADRIANA MARTINELLI SENEME
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Ao Nícolas, pela ternura.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde e pela paz que excede todo entendimento.

Ao Bruno, por me apoiar em todos os momentos.

Aos meus pais (minha base), à minha irmã e meu irmão, à minha sogra, às minhas cunhadas e cunhados, todos os meus sobrinhos e os demais integrantes da Família Nogueira, Oliveira, Andrade e Amatussi.

Ao meu orientador, Prof. Drº. Átila Francisco Mógor, pela orientação, pelo entusiasmo em passar adiante o conhecimento e pela constante inspiração na pesquisa. Agradeço pela oportunidade de estágio no início da graduação, posteriormente pela confiança durante a iniciação científica e pela orientação na pós-graduação.

Aos membros da banca examinadora. Agradeço a Prof. Drª Adriana Martinelli Seneme, a Prof. Drª Marília Pereira Machado, a Drª Gilda Mógor e ao Prof. Drº Leandro Flávio Carneiro, pelos valiosos apontamentos.

Agradeço imensamente a todos os integrantes do grupo de Biofertilizantes: vocês trouxeram a leveza nessa caminhada e elevaram o significado de parceria, companheirismo e amizade. Levarei vocês sempre comigo.

À Universidade Federal do Paraná e ao Curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal, aos professores e funcionários. A todos, obrigada pelas valiosas contribuições nessa jornada, vocês foram fundamentais para o desenvolvimento desse projeto.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudos, tornando possível a execução dessa pesquisa, especialmente por valorizar o ensino e a pesquisa.

A todos que de alguma forma colaboraram para a minha trajetória até aqui, os meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

O uso de biofertilizantes a base de algas e microalgas nas plantas pode contribuir com o aumento da produtividade de culturas agronômicas. Em função da composição destes organismos, tais como aminoácidos, proteínas, carboidratos e fitohormônios, quando aplicados em plantas, podem promover o crescimento e o desenvolvimento vegetal. Sendo assim, com o intuito de identificar o potencial da aplicação da alga calcária *Lithothamnium* sp. micronizada (*Lm*) isolada e associada à cianobactéria *Arthospira platensis* (*Spirulina plantensis*) (*Ap*) no cultivo orgânico de batata (*Solanum tuberosum*) (BRS Clara) e de duas cultivares de cebola (*Allium cepa*) (Alvará® e Perfecta®), foram instalados experimentos na área de Olericultura Orgânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR). A biomassa de *Lm* (micronizada) e a biomassa de *Ap* (lioofilizada) foram utilizadas nas seguintes concentrações: *Lm* (1,5 g L⁻¹ de *Lm*); *LAp1* (1,5 g L⁻¹ de *Lm* + 0,75 g L⁻¹ de *Ap*); *LAp2* (1,5 g L⁻¹ de *Lm* + 1,5 g L⁻¹ de *Ap*) e *Ap* (1,5 g L⁻¹ de *Ap*) e um controle, com aplicação de água. Essa pesquisa foi dividida em dois capítulos. No primeiro capítulo, para identificar a bioatividade de *Lm* e de *Ap*, foram realizados três bioensaios: expansão de hipocôtilo de tomate (*Solanum lycopersicum*), aumento das raízes nos cotilédones de pepino (*Cucumis sativus*) e enraizamento de feijão-mungo (*Vigna radiata*); também foi instalado experimento no campo para determinar os efeitos nas variáveis biométricas, bioquímicas e na produtividade de plantas de batata submetidas a aplicações via foliar. No segundo capítulo avaliou-se o efeito da aplicação via foliar de *Lm* e *Ap* no cultivo de cebola, verificando sua atuação na produtividade de duas cultivares, por meio de três experimentos: (i) aplicações foliares em plantas de cebola cultivadas em vasos em casa de vegetação; (ii) aplicações foliares em cebola cultivada em campo (primeiro ano) e (iii) aplicações foliares em cebola cultivada em campo (segundo ano) com duas frequências de aplicação (semanal e quinzenal). Como resultados, no capítulo I, os bioensaios mostraram bioatividade, com expansão de hipocôtilo de *S. lycopersicum* na concentração de *LAp2*; aumento das raízes nos cotilédones de *C. sativus* tratados com *Ap*; e enraizamento de *V. radiata* na concentração de *Lm*. No campo foi observado aumento de produtividade na batata e alterações bioquímicas no conteúdo de clorofila e açúcares. No capítulo II, a aplicação via foliar em cebola promoveu o crescimento das plantas e aumentos na produtividade de bulbos das duas cultivares. As aplicações estimularam o metabolismo da planta pelo aumento nos teores de açúcares, aminoácidos e atividade da enzima nitrato redutase nas folhas e nos bulbos, especialmente a concentração *LAp2*, no primeiro ano. No segundo cultivo de cebola (iii), *LAp1* e *LAp2* promoveram o crescimento das plantas e incremento na produtividade, promovendo mudanças bioquímicas nos teores de aminoácidos, açúcares, e na atividade da enzima nitrato redutase. Essas alterações podem estar relacionadas ao comportamento semelhante à auxina (em função do ácido húmico de *Lm*) e ao comportamento semelhante à citocinina, característico de *Ap*. Este é o primeiro relato da associação de alga calcária com cianobactéria, entretanto estudos adicionais são necessários para otimização do uso associado dessas duas espécies.

Palavras-chave: *Solanum tuberosum*. *Allium cepa*. Agricultura sustentável. Bioatividade.

ABSTRACT

The use of algae and microalgae-based biofertilizers on plants can contribute to increasing the productivity of agronomic crops. Due to the composition of these organisms, such as amino acids, proteins, carbohydrates and phytohormones, when applied to plants, they can promote plant growth and development. Thus, in order to identify the potential of the application of the calcareous algae *Lithothamnium* sp. (*Lm*) isolated and associated with the cyanobacterium *Arthrospira platensis* (*Spirulina plantensis*) (*Ap*) in the organic cultivation of potato (*Solanum tuberosum*) (BRS Clara) and two onion (*Allium cepa*) cultivars (Alvará® and Perfecta®), experiments were installed in the Organic Olericulture area of the Federal University of Paraná (UFPR). *Lm* biomass (micronized) and *Ap* biomass (freeze-dried) were used in the following concentrations: *Lm* (1.5 g L⁻¹ of *Lm*); *LAp1* (1.5 g L⁻¹ of *Lm* + 0.75 g L⁻¹ of *Ap*); *LAp2* (1.5 g L⁻¹ of *Lm* + 1.5 g L⁻¹ of *Ap*) and *Ap* (1.5 g L⁻¹ of *Ap*) and a control, with water application. This research was divided into two chapters. In the first chapter, to identify the bioactivity of *Lm* and *Ap*, three bioassays were performed: tomato (*Solanum lycopersicum*) hypocotyl expansion, root growth in cucumber (*Cucumis sativus*) cotyledons and mung bean (*Vigna radiata*) rooting; a field experiment was also installed to determine the effects on biometric and biochemical variables and on the productivity of potato plants submitted to foliar applications. In the second chapter we evaluated the effect of foliar application of *Lm* and *Ap* in onion cultivation, verifying its effect on the productivity of two cultivars, through three experiments: (i) foliar applications to onion plants grown in pots in the greenhouse; (ii) foliar applications to onion grown in the field (first year) and (iii) foliar applications to onion grown in the field (second year) with two application frequencies (weekly and biweekly). As results, in chapter I, bioassays showed bioactivity, with hypocotyl expansion of *S. lycopersicum* at the *LAp2* concentration; root increase in the cotyledons of *C. sativus* treated with *Ap*; and rooting of *V. radiata* at the *Lm* concentration. In the field, increased yields in potato and biochemical changes in chlorophyll and sugar content were observed. In Chapter II, foliar application in onion promoted plant growth and increases in bulb yield of both cultivars. The applications stimulated plant metabolism by increasing sugars, amino acids and nitrate reductase enzyme activity in leaves and bulbs, especially *LAp2* concentration, in the first year. In the second onion crop (iii), *LAp1* and *LAp2* promoted plant growth and yield increment by promoting biochemical changes in the contents of amino acids, sugars, and nitrate reductase enzyme activity. These changes may be related to auxin-like behavior (as a function of the humic acid in *Lm*) and cytokinin-like behavior, characteristic of *Ap*. This is the first report of the association of calcareous algae with cyanobacteria, however further studies are needed for optimization of the associated use of these two species.

Key-words: *Solanum tuberosum*. *Allium cepa*. Sustainable agriculture. Bioactivity.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 Representação esquemática dos eixos temáticos do Programa Nacional de Bioinsumos. Fonte: VIDAL *et al.*, 2021. 20

CAPÍTULO 1 - *Lithothamnium* sp. ISOLADA E ASSOCIADA A CIANOBACTÉRIA NA CULTURA DA BATATA

Figura 1 (a) comprimento e (b) volume da expansão de hipocótilo de *S. lycopersicum*; (c) comprimento e (d) área de cotilédones de *C. sativus*, dispostos em papel germitest previamente tratados com diferentes concentrações de *Lithothamnium* sp micronizado (*Lm*) e *A. platensis* (*Ap*). Concentrações: controle; (*Lm*) 1,5 g L⁻¹ de *Lm*; (*LAp1*) 1,5 g L⁻¹ de *Lm* + 0,75 g L⁻¹ de *Ap*; (*LAp2*) 1,5 g L⁻¹ de *Lm* + 1,5 g L⁻¹ de *Ap* e (*Ap*) 1,5 g L⁻¹ de *Ap*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,5$), pelo teste de Tukey. As barras indicam o desvio padrão..... 32

Figura 2 a) Índice relativo de clorofila de folhas de batata (55 DAP) e (b) Teor de sólidos solúveis de tubérculos de plantas (95 DAP) submetidas a aplicações foliares de soluções contendo cinco concentrações: controle; *Lm* (1,5 g L⁻¹ de *Lm*); *LAp1* (1,5 g L⁻¹ de *Lm* + 0,75 g L⁻¹ de *Ap*); *LAp2* (1,5 g L⁻¹ de *Lm* + 1,5 g L⁻¹ de *Ap*) e *Ap* (1,5 g L⁻¹ de *Ap*). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,5$), pelo teste de Tukey. As barras indicam o desvio padrão. 33

Figura 3 (a) Massa fresca de folhas, (b) massa seca de folhas, (c) área foliar e (d) massa fresca de tubérculos de plantas (55 DAP) submetidas a aplicações foliares de soluções contendo cinco concentrações: controle; *Lm* (1,5 g L⁻¹ de *Lm*); *LAp1* (1,5 g L⁻¹ de *Lm* + 0,75 g L⁻¹ de *Ap*); *LAp2* (1,5 g L⁻¹ de *Lm* + 1,5 g L⁻¹ de *Ap*) e *Ap* (1,5 g L⁻¹ de *Ap*). As

médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,5$), pelo teste de Tukey. As barras indicam o desvio padrão. 34	
Figura 4 (a) Açúcares totais, açúcares redutores e açúcares não redutores em folhas de batata (55 DAP); (b) açúcares totais em tubérculos de batata (95 DAP). As plantas foram submetidas à aplicação via foliar de cinco concentrações: controle; Lm ($1,5 \text{ g L}^{-1}$ de Lm); $LAp1$ ($1,5 \text{ g L}^{-1}$ de $Lm + 0,75 \text{ g L}^{-1}$ de Ap); $LAp2$ ($1,5 \text{ g L}^{-1}$ de $Lm + 1,5 \text{ g L}^{-1}$ de Ap) e Ap ($1,5 \text{ g L}^{-1}$ de Ap). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,5$), pelo teste de Tukey.....35	
Figura 5 (a) Número médio de tubérculos por planta (95 DAP) e (b) Produtividade ($t \text{ ha}^{-1}$) de tubérculos de plantas de batatas (95 DAP) submetidas a aplicações foliares de soluções com diferentes concentrações de <i>Lithothamnium</i> sp micronizado (Lm) e <i>Arthrospira platensis</i> (Ap). C = controle; Lm ($1,5 \text{ g L}^{-1}$ de Lm); $LAp1$ ($1,5 \text{ g L}^{-1}$ de $Lm + 0,75 \text{ g L}^{-1}$ de Ap); $LAp2$ ($1,5 \text{ g L}^{-1}$ de $Lm + 1,5 \text{ g L}^{-1}$ de Ap) e Ap ($1,5 \text{ g L}^{-1}$ de Ap). Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) conforme o teste de Tukey. As barras indicam o desvio padrão.....35	

CAPÍTULO 2 - SYNERGIC COMBINATION OF CALCAREOUS ALGAE AND CYANOBACTERIA STIMULATE METABOLIC ALTERATIONS IMPROVING PLANT GROWTH AND YIELD

Fig. 1 Y axis: Total sugar content (a), total free amino acid content (b) and Nitrate reductase enzyme activity in leaves (c). Cultivar factor (FC): 'Alvará' and 'Perfecta'. Factor treatments (FT): X axis: control, (Lm) 1.5 g L^{-1} of Lm , ($LAp1$) 1.5 g L^{-1} of $Lm + 0.75 \text{ g L}^{-1}$ of Ap , ($LAp2$) 1.5 g L^{-1} of $Lm + 1.5 \text{ g L}^{-1}$ of Ap and (Ap) 1.5 g L^{-1} of Ap . Means followed by the same letter do not differ statistically ($p < 0.05$), by Tukey's test. Error bars indicate standard deviation. Light gray = 'Alvará'; dark gray = 'Perfecta F1'. Lower case letters: between cultivars; upper case letters: between treatments.....48

- Fig. 2 Y axis: Average values of total sugar content (a), total free amino acid content in bulbs (b) and Nitrate reductase enzyme activity in leaves (c). Cultivar factor (FC): alvará and perfecta. Factor treatments (FT) X axis: control, (*Lm*) 1.5 g L⁻¹ of *Lm*, (*LAp1*) 1.5 g L⁻¹ of *Lm* + 0.75 g L⁻¹ of *Ap*, (*LAp2*) 1.5 g L⁻¹ of *Lm* + 1.5 g L⁻¹ of *Ap* and (*Ap*) 1,5 g L⁻¹ of *Ap*. Means followed by the same letter do not differ statistically (p <0.05), by Tukey's test. Error bars indicate standard deviation. Light gray = 'Alvará'; dark gray = 'Perfecta F1'. Lower case letters: between cultivars. Upper case letters: between treatments.....48
- Fig. 3 Y axis: Average commercial yield. Cultivar factor (CF): 'Alvará' and 'Perfecta F1'. Treatment factor (TF): X axis: control, *Lm* (1.5 g L⁻¹ of *Lm*), *LAp1* (1.5 g L⁻¹ of *Lm* + 0.75 g L⁻¹ of *Ap*), *LAp2* (1.5 g L⁻¹ of *Lm* + 1.5 g L⁻¹ of *Ap*) and *Ap* (1,5 g L⁻¹ of *Ap*). Means followed by the same letter do not differ statistically (p <0.05), by Tukey's test. Error bars indicate standard deviation.....49
- Fig. 4 Y axis: Length and number of leaves (a), leaf area (cm²) (b). Cultivar factor (CF): light gray = 'Alvará'; dark gray = 'Perfecta F1'. Application frequency factor (FF): weekly (dotted gray); biweekly (gray). Treatment factor (TF) (black bars): X axis: C (control), *LAp1* (1.5 g L⁻¹ of *Lm* + 0.75 g L⁻¹ of *Ap*) and *LAp2* (1.5 g L⁻¹ of *Lm* + 1.5 g L⁻¹ of *Ap*). Means followed by the same letter do not differ statistically (p <0.05), by Tukey test. Error bars indicate standard deviation. Lower case letters: between cultivars. Upper case letters: between treatments.50
- Fig. 5 Y axis: Leaf mass (a), pseudostem dry mass (b), pseudostem volume (c) and bulb fresh and dry mass (d). Application frequency factor (FF): weekly (dotted gray); biweekly (gray). Treatment factor (TF) (black bars): X axis: C (control), *LAp1* (1.5 g L⁻¹ of *Lm* + 0.75 g L⁻¹ of *Ap*) and *LAp2* (1.5 g L⁻¹ of *Lm* + 1.5 g L⁻¹ of *Ap*). Means followed by the same letter are not statistically different (p <0.05), by Tukey's test. Error bars indicate standard deviation. FF x FT interaction (a, c and d): lower case letters = between frequencies, upper case letters = between treatments.51
- Fig. 6 Y axis: Content of total sugars in bulbs (a), non-reducing sugars in bulbs (b), reducing sugars in bulbs (c) and content of total free amino acids in

leaves and bulbs (d). Cultivar factor (CF): light gray = 'Alvará'; dark gray = 'Perfecta F1'. Application frequency factor (FF): weekly (dotted gray); biweekly (gray). Treatment factor (TF) (black bars): X axis: C (control), LA_{p1} (1.5 g L^{-1} of Lm + 0.75 g L^{-1} of Ap) and LA_{p2} (1.5 g L^{-1} of Lm + 1.5 g L^{-1} of Ap). Means followed by the same letter do not differ statistically ($p < 0.05$), by Tukey's test. Error bars indicate standard deviation. FC x FF x FT interaction (a and c): lower case letters = among cultivars, upper case letters = among treatments. (b) FC x FT: lower case letters = among cultivars, upper case letters = among treatments.....53

Fig. 7 Y axis: Nitrate reductase enzyme activity in leaves. Cultivar factor (CF): light gray = 'Alvará'; dark gray = 'Perfecta F1'. Application frequency factor (FF): weekly (dotted gray); biweekly (gray). Treatment factor (TF): X axis: C (control), LA_{p1} (1.5 g L^{-1} of Lm + 0.75 g L^{-1} of Ap) and LA_{p2} (1.5 g L^{-1} of Lm + 1.5 g L^{-1} of Ap). Means followed by the same letter are not statistically different ($p < 0.05$), by Tukey's test. Error bars indicate standard deviation. FC x FF x FT interaction: lower case letters = among cultivars, upper case letters = among treatments....54

Fig. 8 Y axis: Content of total sugars in bulbs (a), non-reducing sugars in bulbs (b), reducing sugars in bulbs (c) and content of total free amino acids in bulbs (d). Cultivar factor (CF): light gray = 'Alvará'; dark gray = 'Perfecta F1'. Application frequency factor (FF): weekly (dotted gray); biweekly (gray). Treatment factor (TF): X axis: C (control), LA_{p1} (1.5 g L^{-1} of Lm + 0.75 g L^{-1} of Ap) and LA_{p2} (1.5 g L^{-1} of Lm + 1.5 g L^{-1} of Ap). Means followed by the same letter are not statistically different from each other ($p < 0.05$) by Tukey's test. Error bars indicate standard deviation. FF x FT (a, b and d): lower case letters = between frequencies, upper case letters = between treatments. (c) FC x FF x FT: lower case letters = between cultivars, upper case letters = between treatments.....55

Fig. 9 Y axis: Average yield values. Treatment factor (FT): X axis: control, LA_{p1} (1.5 g L^{-1} of Lm + 0.75 g L^{-1} of Ap) and LA_{p2} (1.5 g L^{-1} of Lm + 1.5 g L^{-1} of Ap). Means followed by the same letter do not differ statistically ($p < 0.05$), by Tukey's test. Error bars indicate standard deviation.....56

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - *Lithothamnium* sp. ISOLADA E ASSOCIADA A CIANOBACTÉRIA NA CULTURA DA BATATA

Tabela 1 Valores médios do comprimento (cm), do volume (cm^3) e do diâmetro médio (mm) de raízes de *Vigna radiata*. Concentrações: controle; *Lm* (1,5 g L^{-1} de *Lm*); *LAp1* (1,5 g L^{-1} de *Lm* + 0,75 g L^{-1} de *Ap*); *LAp2* (1,5 g L^{-1} de *Lm* + 1,5 g L^{-1} de *Ap*) e *Ap* (1,5 g L^{-1} de *Ap*). Tratamentos com *Ap* não emitiram raízes..... 33

LISTA DE ABREVIACÕES E ACRÔNIMOS

- AH – Ácido Húmico
AIA - ácido 3-indol acético
ANOVA - Análise da Variância
BRIX – Índice Refractométrico
CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEASA - Centro Estadual de Abastecimento
DAP - Dias Após o Plantio
DAS - Days After Sowing
DAT - Days After Transplanting
DIC - Delineamento Inteiramente Casualizado
DMR - Dry Mass of Roots
DNS - Ácido 3,5-Dinitro Salicílico
EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FMR - Fresh Mass of Roots
HA - Humic Acid
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NL - Number of Leaves
NR - Enzyme Nitrate Reductase
PNB - Programa Nacional de Bioinsumos
RFM - Root Fresh Mass
SH – Substâncias Húmicas
TBCA – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TSS - Teor de Sólidos Solúveis
UFPR - Universidade Federal do Paraná

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 BIOFERTILIZANTES.....	19
2.1.1 <i>Lithothamnium sp.</i>	21
2.1.2 <i>Arthrosphaera platensis</i>.....	23
2.2 CULTURA DA BATATA.....	24
2.3 CULTURA DA CEBOLA	24
3 CAPÍTULO 1 - <i>Lithothamnium sp. ISOLADA E ASSOCIADA À Arthrosphaera platensis NA CULTURA DA BATATA.....</i>	26
3.1 RESUMO.....	26
3.2 INTRODUÇÃO	26
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.3.1 Bioensaios.....	28
3.3.2 Produção de batata	30
3.3.3 Análises bioquímicas.....	31
3.3.4 Análise estatística	31
3.4 RESULTADOS	32
3.4.1 Bioensaios.....	32
3.4.2 Experimento no campo com plantas de batata	33
3.5 DISCUSSÃO	35
3.6 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS.....	38
4 CAPITULO 2 – SYNERGIC COMBINATION OF CALCAREOUS ALGAE AND CYANOBACTERIA STIMULATE METABOLIC ALTERATIONS IMPROVING PLANT GROWTH AND YIELD	40
4.1 INTRODUCTION	41
4.2 MATERIALS AND METHODS.....	42
4.2.1 Experiment I	43
4.2.2 Experiment II	44
4.2.3 Experiment III	45
4.2.4 Biochemical analyses	46
4.3 RESULTS.....	47

4.3.1 Experiment I	47
4.3.2 Experiment II	48
4.3.3 Experiment III	49
4.4 DISCUSSION	56
4.5 CONCLUSIONS	58
REFERENCES.....	59
5 CONCLUSÕES GERAIS	63
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO GERAL

A aplicação de biofertilizantes a base de algas e microalgas pode contribuir para o desenvolvimento da agricultura em função da composição destes organismos, tais como aminoácidos, proteínas, carboidratos e fitohormônios, que, aplicados nas plantas, podem promover o crescimento e o desenvolvimento vegetal (BRASIL, 2020).

Os extratos de algas marinhas demonstram ser importantes na promoção de uma agricultura mais sustentável (SINGH *et al.*, 2016). Aplicação via foliar de *Lithothamnium* sp. promoveu aumento no enraizamento, crescimento, rendimento e qualidade dos frutos de tomate (AMATUSSI *et al.*, 2020) e no teor de nutrientes em bulbos de cebola (MÓGOR *et al.*, 2021). Esses resultados foram atribuídos à presença de ácido húmico na biomassa micronizada de *Lithothamnium* sp.

As substâncias húmicas (SH) com alto grau de polimerização podem ter comportamento similar aos fitohormônios (ZANDONADI *et al.*, 2014) e apresentar efeitos fisiológicos nas plantas ao promover o crescimento vegetal através do maior desenvolvimento da parte radicular (DAUR; BAKHASHWAIN, 2013). Recentemente, o uso de SH associada à microalgas mostrou efeito na promoção do crescimento das plantas, no aumento da produtividade (GEMIN *et al.*, 2019), assim como na qualidade pós-colheita de cebolas (GEMIN *et al.*, 2022).

As microalgas têm sido estudadas em tomate (LARA *et al.*, 2022), batata (CORDEIRO *et al.*, 2022), cebola (CORDEIRO *et al.*, 2022), alface (MÓGOR, *et al.*, 2017), beterraba (MÓGOR *et al.*, 2018) em função dos compostos bioativos, como proteínas, poliaminas, citocininas e L-aminoácidos livres presentes na biomassa. O comportamento biológico avaliado por meio de bioensaios mostrou que a atividade semelhante à citocinina, resultante da aplicação nas plantas, pode ser em função do metabolismo das poliaminas (MÓGOR *et al.*, 2022) e da presença deste fitohormônio na biomassa da microalga (PLAZA *et al.*, 2018).

Estudos com aplicações de macroalgas e microalgas nas culturas agronômicas podem contribuir para o desenvolvimento de novos insumos. O uso de microalgas de microalgas com substâncias húmicas promoveu aumento no crescimento vegetal e na produtividade (GEMIN *et al.*, 2019). Entretanto ainda não

havia sido relatada a aplicação de macroalga calcária (reconhecida fonte de ácido húmico) e cianobactéria.

Dessa forma, o objetivo dessa pesquisa foi investigar a bioatividade da biomassa da alga calcária *Lithothamnium* sp. micronizada (*Lm*) isolada e associada à cianobactéria *Arthrospira platensis* (*Spirulina plantensis*) (*Ap*), utilizada no cultivo orgânico de batata (*Solanum tuberosum*) (BRS Clara) e no cultivo de duas cultivares de cebola (*Allium cepa*) (Alvará® e Perfecta®). Essa pesquisa foi dividida em dois capítulos, apresentados a seguir:

No capítulo I, para identificar a bioatividade de *Lm* e da *Ap*, foram realizados três bioensaios com o objetivo de identificar o efeito do biofertilizante aplicado nas plantas (BRASIL, 2020), utilizando biomassa das algas de forma isolada e associada. Na sequência, foi instalado experimento no campo para determinar seus efeitos nas variáveis biométricas, bioquímicas e na produtividade de batata.

No segundo capítulo, para verificar a atuação de *Lm* e da *Ap* no cultivo de cebola, foram realizados três experimentos: (i) aplicações foliares em plantas de cebola cultivadas em vasos em casa de vegetação; (ii) e no campo (primeiro ano); (iii) no segundo ano, foi instalado um experimento no campo, adicionando o fator frequências de aplicação (semanal e quinzenal). Foram avaliadas variáveis biométricas, bioquímicas e a produtividade das plantas de cebola.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOFERTILIZANTES

Os biofertilizantes são uma classe de produtos regulamentados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), e definidos como “produto que contém princípio ativo ou agente orgânico, isento de substâncias agrotóxicas, capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre o todo ou parte das plantas cultivadas, elevando a sua produtividade, sem ter em conta o seu valor hormonal ou estimulante” (BRASIL, 2011).

Em alguns países, os biofertilizantes são conhecidos como ‘*biostimulant*’, entretanto no Brasil a legislação não prevê a utilização do termo bioestimulante.

As pesquisas com biofertilizantes estão em evidência, pois no ano de 2020 o Governo Federal, por meio do MAPA, lançou o Programa Nacional de Bioinsumos (PNB). Esse programa tem como objetivo diminuir o uso e a importação de insumos químicos e promover o desenvolvimento sustentável da agricultura (BRASIL 2020b).

O PNB é uma das cadeias emergentes do Plano Nacional de Fertilizantes (GTI-PNF). O GTI-PNF foi criado visando fortalecer políticas de incremento da competitividade da produção e da distribuição de fertilizantes no Brasil de forma sustentável, priorizando uma maior oferta tecnológica de produtos e tecnologias e aumento de produtividade (BRASIL, 2022).

O Decreto Federal nº 10.375, de 26 de maio de 2020, instituiu o Programa Nacional de Bioinsumos e o Conselho Estratégico do Programa Nacional de Bioinsumos (BRASIL 2020b). Entretanto, diferente de outrora, quando esses programas eram direcionados à agricultura orgânica, a demanda pelo uso de bioinsumos se estende às grandes áreas de produção, onde o uso de técnicas mais sustentáveis e boas práticas podem refletir em redução de custos de produção associados à diminuição do uso de insumos químicos por agricultores convencionais, porém inovadores (VIDAL *et al.*, 2021).

O PNB tem diversas áreas de atuação (Fig. 1). Os biofertilizantes se enquadram no eixo temático de produção vegetal (fertilidade do solo, nutrição de plantas e estresses abióticos) (VIDAL *et al.*, 2021).

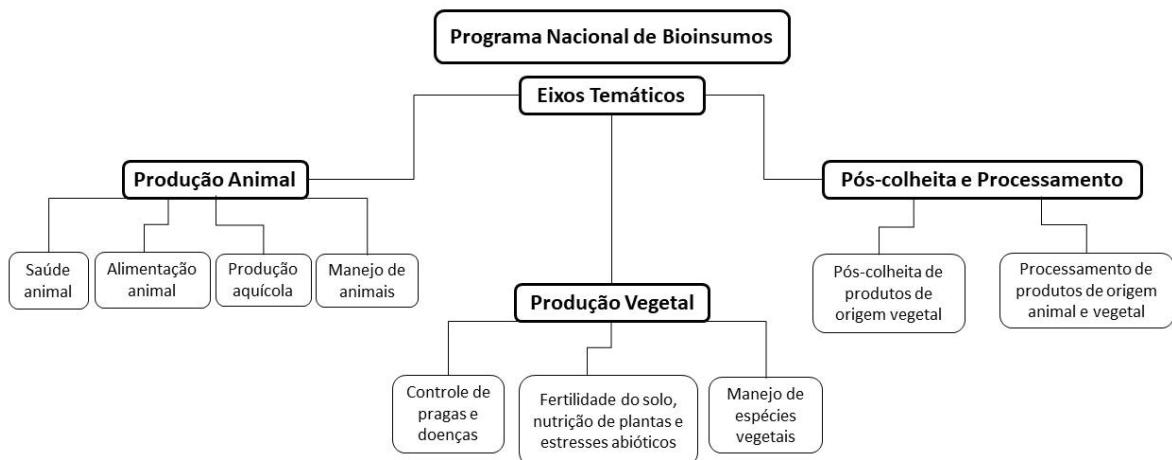


Figura 1 Representação esquemática dos eixos temáticos do Programa Nacional de Bioinsumos.
Fonte: VIDAL *et al.*, 2021.

Os biofertilizantes podem ser uma solução para esse cenário. Seus componentes, com substâncias naturais, atuam no metabolismo das plantas (BRASIL, 2020a), como por exemplo, no desenvolvimento do sistema radicular, no crescimento vegetativo, no incremento da produtividade, e ainda contribuem para as plantas superarem as condições adversas para o seu desenvolvimento, estimulando respostas aos estresses bióticos e abióticos (NARDI *et al.*, 2016; STADINIK *et al.*, 2017; STIRK *et al.*, 2014, 2013) ao estimularem respostas fisiológicas quando aplicados às plantas (MÓGOR, 2017).

Para o registro de produtos biofertilizantes, entre outras exigências, junto ao MAPA, há a necessidade da comprovação da bioatividade do produto por meio de bioensaios, definidos como “trabalho de pesquisa que tem por objetivo comprovar a bioatividade dos biofertilizantes” e a bioatividade como “efeito benéfico que o produto biofertilizante apresenta sobre o todo ou partes das plantas cultivadas” (BRASIL, 2020a).

Os bioensaios podem identificar a bioatividade, ou seja, o efeito benéfico que um biofertilizante apresenta sobre o todo ou parte das plantas (BRASIL, 2020a), avaliando variáveis biométricas e bioquímicas como resultado da ação de compostos biologicamente ativos. Preferencialmente, a condução de bioensaios deve ser realizada em condições controladas, como câmaras de crescimento, ou em ambientes protegidos, como casas de vegetação (MÓGOR; AMATUSSI; CORDEIRO, 2022).

Os extratos de algas (HUSSEIN *et al.*, 2021), os aminoácidos (MARQUES, *et al.*, 2022; RÖDER *et al.*, 2018), as substâncias húmicas (GEMIN *et al.*, 2019) e alguns extratos vegetais (MALLET *et al.*, 2014) são alguns exemplos de biofertilizantes. Eles têm um papel cada vez mais importante no aumento da produtividade, da qualidade e da sustentabilidade da produção agrícola.

As algas são utilizadas na alimentação humana, na produção animal, na indústria de cosméticos e, em função do seu potencial biotecnológico, na agricultura. As macroalgas são classificadas de acordo com sua pigmentação, em três grandes grupos: *Chlorophyta* (verdes), *Phaeophyta* (marrons) e *Rhodophyta* (vermelhas) (FREITAS *et al.*, 2022).

As macroalgas verdes pertencentes ao gênero *Ulva* estão sendo amplamente estudadas (KHAN *et al.*, 2009; HERNÁNDEZ-HERRERA *et al.*, 2014), e a sua ação nas plantas associadas aos polissacarídeos presentes na alga (PAULERT *et al.*, 2009; DE BORBA; DE FREITAS; STADNIK, 2019). A macroalga marrom *Ascophyllum nodosum* aumenta o crescimento vegetal, a produtividade agrícola, e atua como um elicitador (SHUKLA *et al.*, 2019; CARVALHO *et al.*, 2018), como por exemplo, em plantas de tomate (HERNÁNDEZ-HERRERA *et al.*, 2014; ALI *et al.*, 2016), no cultivo do feijoeiro (MÓGOR *et al.*, 2008), no cultivo da cenoura (KASEKER *et al.*, 2014).

Como exemplo de alga vermelha temos *Lithothamnium* sp. (*Rhodophyta*), que tem sido utilizada tradicionalmente como corretivo da acidez do solo (MELO; FURTINI NETO, 2003) e fonte dos nutrientes cálcio e magnésio (MELO *et al.*, 2008). Entretanto, recentemente teve seu uso via foliar testado (AMATUSSI *et al.*, 2020; MÓGOR *et al.*, 2021), e os resultados mostraram que suas propriedades estão além do cálcio e do magnésio, presentes na sua composição (MÓGOR; AMATUSSI; MÓGOR, 2022).

2.1.1 *Lithothamnium* sp.

No Brasil, os depósitos de algas calcificadas são encontrados do sul do Rio de Janeiro até a Região Amazônica, em uma extensão de aproximadamente 4.000 km. A extração é feita por processos manuais e mecânicos, então ela é lavada, desidratada e moída para utilização como fertilizante (CAVALCANTI, 2011).

Lithothamnium sp. tem na sua composição carbonato de cálcio (32%) e magnésio (2%), micronutrientes e uma fração orgânica (ESPER NETO *et al.*, 2020; MELO *et al.*, 2008; DIAS, 2001). Em função da calcificação da sua biomassa, *Lithothamnium* sp. é comumente aplicado como calcário (COSTA *et al.*, 2015; EVANGELISTA *et al.*, 2016; RODRIGUES NETO *et al.*, 2021), no feijoeiro (MELO E FURTINI NETO, 2003); com aumento da produtividade em pimentão quando aplicada via irrigação por gotejamento (EVANGELISTA *et al.*, 2016); em mudas de maracujazeiro-amarelo (MENDONÇA *et al.*, 2006); maracujazeiro-doce (SOUZA *et al.*, 2007, 2009) e incremento na parte aérea de mudas de mamoeiro (HAFLE *et al.*, 2009).

Entretanto, a aplicação via foliar de *Lithothamnium* sp micronizado, promoveu o aumento da produtividade de cebola atribuído a presença de ácido húmico (AH) com alto grau de polimerização (MÓGOR *et al.*, 2021), apresentando significativo efeito auxínico (AMATUSSI *et al.*, 2020).

Amatussi *et al.* (2020), observaram que o processo de micronização (partículas na escala dos micrômetros) de *Lithothamnium* aumentou a área específica e a disponibilidade dos AH contidos na fração orgânica da alga calcária. A aplicação via foliar foi testada em plantas de tomate após a identificação de alta bioatividade de *Lithothamnium* micronizado, em bioensaio com enraizamento da planta modelo *V. radiata*.

Em trabalhos de campo, no cultivo de cebola, foram identificadas alterações bioquímicas nas plantas em função de aplicações de *Lithothamnium* micronizado via foliar, e observado incremento do teor de nutrientes nos bulbos (MÓGOR *et al.*, 2021), tais efeitos se relacionam com o maior enraizamento promovido por *Lithothamnium*, em função da presença de ácidos húmicos.

Os AH, um dos componentes das substâncias húmicas (SH), derivam da degradação dos resíduos orgânicos no ambiente (CANELLAS *et al.*, 2008). A matéria orgânica com maior grau de humificação pode favorecer processos fisiológicos de forma similar aos fitohormônios (ZANDONADI *et al.*, 2014) e exercer efeitos fisiológicos nas plantas ao promover o crescimento vegetal através do maior desenvolvimento da parte radicular (DAUR; BAKHASHWAIN, 2013), pelo aumento da ação das enzimas H⁺-ATPases (bombas de prótons) (CANELLAS *et al.*, 2022).

O efeito fisiológico das SH nas plantas está relacionado a efeitos similares ao do hormônio auxina (CANELLAS *et al.*, 2020, 2015; ZANDONADI *et al.*, 2014). Aplicação de AH, obtido do mineral leonardita, associado a microalga, aumentou o rendimento de plantas de cebola (GEMIN *et al.*, 2019) e melhorou a qualidade pós colheita de bulbos de cebolas (GEMIN *et al.*, 2022).

2.1.2 *Arthrospira platensis*

As algas azuis, microalgas ou cianobactérias (reino Monera), são unicelulares, procariontes e autótrofas. *Arthrospira* é um gênero de cianobactérias da ordem *Oscillatoriales*, nativa da África, Ásia e América do Sul. Seu uso mais conhecido é como suplemento dietético (*Spirulina*). A *Arthrospira platensis* é considerada uma microalga devido à presença de clorofila, e em função da sua estrutura procarionte é uma bactéria (DERNER, 2006).

Dentre as inúmeras utilizações das microalgas, na agricultura, a cianobactéria *Arthrospira (Spirulina) platensis* é reconhecida pelo alto teor de proteínas na sua composição (ÇELEKLI *et al.*, 2021; ISHAQ *et al.*, 2016) e polissacarídeos (RACHIDI *et al.*, 2020). Os hidrolisados enzimáticos de *A. platensis* contêm poliaminas, podem estimular a multiplicação celular e o crescimento vegetal (MÓGOR *et al.*, 2017) e aumentar a absorção de nutrientes (PLAZA *et al.*, 2018a). Além disso, podem ser utilizadas especialmente na biofortificação dos alimentos, resultando em plantas mais nutritivas (BILLARD *et al.*, 2014; GODLEWSKA *et al.*, 2019).

A. platensis tem sido estudada quanto ao seu efeito promotor do crescimento vegetal, sendo atribuído à presença de compostos bioativos como proteínas, poliaminas, citocininas (MÓGOR *et al.*, 2017) e L-aminoácidos livres (MÓGOR *et al.*, 2018).

Experimentos com *A. platensis* foram conduzidos em diversas culturas, como beterraba (MÓGOR *et al.*, 2018), alface (MÓGOR *et al.*, 2017), espinafre vermelho (*Amaranthus dubius*) (MALA *et al.*, 2017), *Petunia x hybrida* (PLAZA *et al.*, 2018), rabanete (GODLEWSKA *et al.*, 2019). A bioatividade avaliada por meio de bioensaios mostrou que a atividade semelhante à citocinina pode ser em função do metabolismo das poliaminas (MÓGOR *et al.*, 2017) e da presença deste fitohormônio na biomassa da microalga (Trans-zeatin e Isopentenyl adenine, 191,37

e 2560,73 ng g⁻¹, respectivamente), contribuindo com o acúmulo de biomassa nas plantas tratadas (PLAZA *et al.*, 2018).

2.2 CULTURA DA BATATA

Originária da América do Sul, a batata (*Solanum tuberosum*) é uma espécie olerícola de grande importância no Brasil, sendo cultivada em todo o mundo. Seu centro de origem se estende do Peru a Bolívia, sendo essa espécie de batateira que mais produz tubérculos, considerada uma importante fonte alimentar, caracterizando-se como uma cultura de importância econômica expressiva (FILGUEIRA, 2008).

No ano de 2021, o maior produtor foi o estado de Minas Gerais, com rendimento médio de 33,1 toneladas (t) por hectare (ha). No Paraná a maior produção é da cidade de Guarapuava, com rendimento médio de 28,6 t ha⁻¹ (IBGE, 2022a). Além da sua importância econômica, é uma olerícola que está inserida na alimentação brasileira e tem importância relevante na segurança alimentar. Sua composição é de 2,04% de proteínas, 16,5% de carboidratos totais, 80,5% de água, além de outros nutrientes (TBCA, 2022).

Essa cultura é uma solanácea anual, dicotiledônea de ciclo curto com caules aéreos e herbáceos, suas raízes têm origem na base desses caules ou hastes. Suas folhas possuem folíolos arredondados com flores hermafroditas reunidas em inflorescências no topo da planta (FILGUEIRA, 2008).

A cultivar ‘BRS Clara’ possui hábito de crescimento semiereto, porte médio, folhas moderadamente abertas e maturidade média de 100 a 105 dias. Tem baixa frequência de inflorescência, com coloração branca. Os tubérculos possuem formato oval alongado, película amarela e lisa, com moderada resistência ao esverdeamento, e resistente à requeima (*Phytophthora infestans*), com produção média de 7,23 t ha⁻¹ na primavera (PEREIRA *et al.*, 2013). Virmond *et al.* (2014) encontraram valores de 3,2 °BRIX para cultivar BRS Clara.

2.3 CULTURA DA CEBOLA

Originária do continente asiático, a cebola (*Allium cepa*) é uma espécie olerícola de grande importância no Brasil. Trata-se de um condimento cosmopolita bastante utilizado na culinária brasileira (FILGUEIRA, 2008).

No ano de 2021, o maior produtor foi o estado de Santa Catarina, com rendimento médio por hectare (ha) de 33,4 toneladas (t). No Paraná a maior produção é da cidade de Contenda, com rendimento médio 25,9 t ha⁻¹ (IBGE, 2022b).

Além da sua importância econômica, a cebola é uma olerícola que está inserida na alimentação brasileira. Sua composição é de 1,76% de proteínas, 9,21% de carboidratos totais, 88,4% de água, além de outros nutrientes (TBCA, 2022).

Essa cultura pode atingir 60 cm de altura, apresentando folhas tubulares e cerasas. Seu caule verdadeiro é um disco comprimido, na base da planta, de onde saem as folhas e as raízes. As bainhas das folhas formam o pseudocaule, cuja parte inferior é um bulbo (FILGUEIRA, 2008).

A cultivar Alvará (Bejo®) possui maturação precoce, alta produtividade e crescimento vigoroso das folhas, tendo formato arredondado, coloração intensa, boa firmeza e cerosidade, conferindo-lhe grande versatilidade quanto à época de plantio. A cultivar híbrida Perfecta (Topseed®) apresenta alto potencial produtivo, boa tolerância a doenças e excelente qualidade de bulbos, com folhas vigorosas, boa cerosidade e coloração verde escuro. Seus bulbos são uniformes, com adequada formação de escamas. Essa cultivar é um híbrido de dia curto, com boa tolerância ao pendoamento precoce e alto potencial produtivo.

Estudos com cebolas e tomates sujeitos à aplicação de substâncias húmicas, mostraram ganhos de produtividade, com maiores acúmulos de aminoácidos, açúcares e vitamina C (BETTONI *et al.*, 2016; HUSSEIN *et al.*, 2015)

Além disso, ácidos húmicos e extratos de algas aplicados em plantas podem ser considerados uma técnica de biofortificação, pois têm potencial para aumentar o teor de nutrientes (MÓGOR *et al.*, 2021) e alterar positivamente a concentração de açúcares totais, aminoácidos, proteínas e compostos fenólicos (BILLARD, *et al.*, 2014; CONSELVAN, *et al.*, 2017; DINESHKUMAR, *et al.*, 2019).

3 CAPÍTULO 1 - *Lithothamnium* sp. ISOLADO E ASSOCIADO À *Arthrosira platensis* NA CULTURA DA BATATA

3.1 RESUMO

A busca por insumos agrícolas de origem sustentável está em evidência, especialmente na cultura da batata. A alga calcária *Lithothamnium* sp. teve seu efeito biofertilizante relacionado à presença de ácido húmico e ao efeito auxínico característico das substâncias húmicas, enquanto na microalga *Arthrosira platensis*, o crescimento vegetal foi atribuído à presença de L-aminoácidos e poliaminas na sua composição. Dessa forma, neste trabalho, objetivou-se avaliar os efeitos da aplicação via foliar de *Lithothamnium* micronizado de forma isolada e também associado à *A. platensis* no cultivo de batata (*Solanum tuberosum*). Inicialmente, para avaliar a bioatividade das algas foram realizados três bioensaios: (i) com hipocótilos de *S. lycopersicum*, (ii) com cotilédones de *C. sativus*, e (iii) de crescimento radicular de *V. radiata*. Na sequência, foi realizado experimento em campo com aplicação via foliar em plantas de batata, em sistema orgânico. Os bioensaios mostraram a bioatividade da alga calcária, da microalga isolada, bem como da sua associação. No campo essas moléculas bioativas associadas aplicadas às plantas promoveram alterações biométricas e bioquímicas, incrementando a produtividade de plantas de batata, comprovando o potencial uso biofertilizante de *Lithothamnium* micronizado associado à cianobactéria na cultura da batata.

Palavras-chave: Bioatividade. Biofertilizante. *Solanum tuberosum* L. Cianobactéria.

3.2 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de insumos de base natural pode ser eficiente e contribuir para o aumento da produtividade de culturas agrícolas. A batata (*Solanum tuberosum*) é o terceiro alimento mais consumido no mundo (FAO, 2020). Além da relevância na segurança alimentar, as pesquisas relacionadas à cultura da batata são muito importantes, pois este é um cultivo bastante intensivo.

Nas últimas décadas a produção de batata aumentou significativamente, no entanto, grande parte dessa produção agrícola tem sido alcançada de forma não sustentável por meio do intenso uso de agroquímicos (BOULOMYTIS; BRESAOLA JUNIOR, 2013). Para minimizar este problema, o uso de bioinsumos sustentáveis e renováveis, como os biofertilizantes, pode estar entre as soluções necessárias no aumento da eficiência de uso dos nutrientes.

Os biofertilizantes são produtos que contém substâncias naturais e atuam no metabolismo das plantas, como no desenvolvimento do sistema radicular, no

crescimento vegetativo, no incremento da produtividade, e ainda contribuem para as plantas superarem as condições adversas para o seu desenvolvimento (BULGARI *et al.*, 2019). Os extratos de algas, os aminoácidos, as substâncias húmicas e extratos vegetais são alguns exemplos de biofertilizantes (BRASIL, 2020).

Os extratos de algas marinhas são importantes na promoção de uma agricultura mais sustentável (SINGH *et al.*, 2016) ao melhorar a eficiência do uso de nutrientes pelas plantas, aumentando tanto sua tolerância a estressores abióticos como a qualidade da cultura. (ROUPHAEL E COLLA, 2018).

A aplicação via foliar de *Lithotamnium* sp mostrou efeitos positivos no enraizamento, crescimento, rendimento e qualidade dos frutos de tomate (AMATUSSI *et al.*, 2020). Em cebolas, Mógor *et al.* (2021) observaram aumento no crescimento das plantas, no teor de nutrientes e na produtividade. A bioatividade de *Lithothamnium* micronizado foi avaliada nestes cultivos associando os efeitos da aplicação da alga à presença de ácido húmico, caracterizada por ter comportamento semelhante à auxina nas plantas.

Recentemente, o uso de substâncias húmicas associada à microalgas mostrou efeito na promoção do crescimento das plantas, no aumento da produtividade (GEMIN *et al.*, 2019), assim como na qualidade pós-colheita de cebolas (GEMIN *et al.*, 2022).

As microalgas têm sido estudadas quanto ao seu efeito promotor do crescimento vegetal. Esse efeito é atribuído à presença de compostos bioativos como proteínas, poliaminas, citocininas e L-aminoácidos livres (MÓGOR *et al.*, 2017; MÓGOR *et al.*, 2018; MAZEPKA *et al.*, 2021). Experimentos com *Arthrosphaera platensis* foram conduzidos em diversas culturas, como beterraba (MÓGOR *et al.*, 2018), alface (MÓGOR *et al.*, 2017), espinafre vermelho (*Amaranthus dubius*) (MALA *et al.*, 2017), *Petunia x hybrida* (PLAZA *et al.*, 2018) e rabanete (GODLEWSKA *et al.*, 2019). A bioatividade avaliada por meio de bioensaios mostrou que a atividade semelhante à citocinina pode ser em função do metabolismo das poliaminas (MÓGOR *et al.*, 2017) e da presença deste fitohormônio na biomassa da microalga (PLAZA *et al.*, 2018).

Entretanto, ainda não foi descrito a associação dessas diferentes moléculas no metabolismo das plantas de batata. Dessa forma, considerando a ausência de estudos associando diferentes mecanismos de ação neste cultivo e a necessidade

de encontrar novas fontes biofertilizantes, foi estudado o efeito da alga calcária *Lithothamnium* sp. micronizada (*Lm*) isolada e associada à microalga *Ap* no crescimento e na produtividade de batata.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Para determinar o efeito da aplicação via foliar de *Lithothamnium* sp. micronizado (*Lm*) e *Arthrospira platensis* (*Ap*) foram realizados três bioensaios para avaliar a bioatividade das algas em tomate (*S. lycopersicum*), pepino (*C. sativus*) e feijão-mungo (*V. radiata*), e na sequência experimento no campo para avaliar a produtividade de batata.

A amostra da alga calcária *Lithothamnium* sp. foi micronizada (AMATUSSI et al., 2020) e da cianobactéria *Arthrospira platensis* foi liofilizada (MÓGOR et al., 2017).

3.3.1 Bioensaios

Para identificar possíveis propriedades promotoras de crescimento de *Lm* e *Ap* em plantas, foram realizados três bioensaios: (i) bioensaio de expansão de hipocôtilo de *S. lycopersicum* (ZHAO et al., 1992; STIRK et al., 2002), (ii) bioensaio de cotilédones de *C. sativus* para efeito semelhante à citocinina (MÓGOR et al., 2017, ZHAO et al., 1992; STIRK et al., 2002), e (iii) bioensaio de emissão de raízes com *V. radiata* (TRIPEPI E GEORGE, 1991), para efeito semelhante à auxina (ZHAO et al., 1992). Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Biofertilizantes, na Fazenda Experimental Canguiri da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

O bioensaio de expansão de hipocôtilo de *S. lycopersicum* foi implantado em caixas plásticas gerbox, de acordo com as Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 2009). As sementes foram dispostas em papel germitest previamente umedecidos (2,5 vezes o peso do papel) em soluções com diferentes concentrações de *Lithothamnium* sp micronizado (*Lm*) e *A. platensis* (*Ap*): controle (com imersão do papel somente em água destilada); *Lm* (1,5 g L⁻¹ de *Lm*); *LAp1* (1,5 g L⁻¹ de *Lm* + 0,75 g L⁻¹ de *Ap*); *LAp2* (1,5 g L⁻¹ de *Lm* + 1,5 g L⁻¹ de *Ap*) e *Ap* (1,5 g L⁻¹ de *Ap*). O bioensaio foi conduzido em câmara de crescimento a 22º C, durante nove dias, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições. Aos nove dias

foram avaliados o comprimento e o volume dos hipocótilos de *S. lycopersicum* e os resultados foram expressos em % e cm.

Para realizar o bioensaio com cotilédones de *C. sativus*, as sementes foram previamente germinadas em vermiculita, quando os cotilédones estavam desenvolvidos foram dispostos em caixas plásticas gerbox, sob papel germitest previamente umedecidos (2,5x o peso do papel) em soluções, de acordo com as Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 2009), com diferentes concentrações de *Lithothamnium* sp micronizado (*Lm*) e *Arthrospira platensis* (*Ap*): controle (com imersão do papel somente em água destilada); *Lm* (1,5 g L⁻¹ de *Lm*); *LAp1* (1,5 g L⁻¹ de *Lm* + 0,75 g L⁻¹ de *Ap*); *LAp2* (1,5 g L⁻¹ de *Lm* + 1,5 g L⁻¹ de *Ap*) e *Ap* (1,5 g L⁻¹ de *Ap*). O bioensaio foi conduzido em câmara de crescimento a 22º C, durante nove dias, em DIC, com quatro repetições (n=4). Aos nove dias foram avaliados o comprimento e o volume dos cotilédones de *C. sativus* e os valores foram expressos em cm e cm³, respectivamente.

Para avaliação do crescimento radicular de *V. radiata*, realizou-se a semeadura em bandejas de poliestireno com 144 células, preenchidas na proporção de 1:1 com substrato comercial a base de casca de pinus (Tropstrato®) e fertilizante orgânico (Provaso®) composto por: 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. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação com irrigação por microaspersão temporizada. Dez dias após a germinação das sementes, as plântulas foram retiradas das bandejas e colocadas em microtubos contendo as seguintes soluções: controle (com aplicação de água); *Lm* (1,5 g L⁻¹ de *Lm*); *LAp1* (1,5 g L⁻¹ de *Lm* + 0,75 g L⁻¹ de *Ap*); *LAp2* (1,5 g L⁻¹ de *Lm* + 1,5 g L⁻¹ de *Ap*) e *Ap* (1,5 g L⁻¹ de *Ap*). O bioensaio foi conduzido em câmara de crescimento a 25º C com 12h de iluminação, durante nove dias, em DIC, com quatro repetições (n=8). Foram avaliados o comprimento e o diâmetro médio das raízes de *V. radiata*, e os valores foram expressos em cm e mm, respectivamente.

O comprimento, volume e diâmetro médio dos hipocótilos de *S. lycopersicum*, dos cotilédones de *C. sativus* e das raízes de *V. radiata* foram determinados, por meio do software WinRhizo Pro® (Regent Instr® Canadá), juntamente com scanner de lente dupla Epson® (modelo v700 PHOTO).

3.3.2 Produção de batata

O experimento foi conduzido na área experimental de Olericultura Orgânica da Fazenda Experimental Canguiri da Universidade Federal do Paraná – UFPR, no município de Pinhais – PR. Possui 25°23'16.2"S de latitude e 49°07'33.8"W de longitude. Essa região está sobre o primeiro planalto do estado do Paraná, a uma altitude de 920 metros. Seu relevo é ondulado à suave ondulado. O clima da região de acordo com a classificação de Köppen é temperado tipo Cfb (EMBRAPA, 2013).

A análise química do solo na camada de 0 a 20 cm, indicou os valores médios de: pH (CaCl_2) = 5,84; pH H_2O = 6,71; Al^{+3} = 0; $\text{H}+\text{Al}^{+3}$ = 2,93 cmolc dm^{-3} ; Ca^{2+} = 5,28 cmolc dm^{-3} ; Mg^{2+} = 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} .

Após preparo do solo, os sulcos de plantio foram feitos com o auxílio de um micro trator e foram aplicados 12,5 t ha^{-1} de compostos orgânicos (substrato e adubo orgânico), 50 kg ha^{-1} de termofosfato magnesiano, 50 kg ha^{-1} de sulfato de potássio e 50 kg ha^{-1} de sulfato de magnésio, espalhados homogeneousmente nos sulcos de plantio.

A área foi irrigada pelo sistema de aspersão, com o objetivo de manter a umidade do solo em 80%, com base na medida do status de água no solo por meio de um tensiômetro. O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições e as seguintes concentrações: controle (com aplicação de água); Lm (1,5 g L^{-1} de Lm); $LAp1$ (1,5 g L^{-1} de Lm + 0,75 g L^{-1} de Ap); $LAp2$ (1,5 g L^{-1} de Lm + 1,5 g L^{-1} de Ap) e Ap (1,5 g L^{-1} de Ap). Foram implantadas seis linhas de cultivo, sendo a primeira e última consideradas bordadura, e nas quatro linhas centrais foram distribuídas as 20 parcelas ($n=8$), de forma aleatória. As batatas-sementes da cultivar BRS Clara (EMBRAPA) foram dispostas em espaçamento de 0,35 m entre plantas e 0,80 m entre as linhas.

A amontoa foi realizada aos 25 dias após o plantio (DAP). As aplicações iniciaram aos 32 DAP, e ocorreram semanalmente, totalizando oito aplicações até o estádio de senescência das folhas. A taxa de aplicação foi de 400 L ha^{-1} . Na aplicação foi utilizado o pulverizador costal eletrônico Kawashima® de 10 litros, pressão constante (40 psi). Para evitar a deriva foi utilizada barreira plástica em todas as aplicações.

O índice relativo de clorofila foi medido com clorofilômetro (N-Tester[®]), que apresenta os valores médios de 30 leituras aleatórias feitas em folhas totalmente expandidas do terço médio das plantas diretamente no campo (MÓGOR *et al.* 2013). As leituras foram realizadas nas três plantas centrais de cada parcela.

A avaliação da produtividade ocorreu aos 95 DAP, com a parte aérea apresentando senescência, em três plantas centrais das parcelas. Foi quantificada a massa dos tubérculos e calculada a produtividade, com valores extrapolados para uma população de 40.000 plantas por hectare (ha). A avaliação da produtividade foi de acordo com a classificação para a cultura da batata (Classe: I > 70 mm; II-2: 50 até 70 mm; II-1: 42 até 50 mm; III: > 33 até 42 mm; IV: 28 até 33 mm e V: <28 mm). Foram consideradas apenas as classes de padrão comercial (Classe I, Classe II.1 e Classe II.2). O teor de sólidos solúveis (TSS) dos tubérculos foram determinados usando um refratômetro portátil (EEQ9030) e os valores foram expressos em °BRIX.

3.3.3 Análises bioquímicas

As coletas de material vegetal para análises bioquímicas de folhas e tubérculos de batata ocorreram aos 55 e 95 DAP. Após a coleta dos dados biométricos e de produção, as folhas e os tubérculos comerciais (classe I, classe II.1 e classe II.2) foram coletados, macerados em nitrogênio líquido e armazenados (-20° C) para análises bioquímicas. As coletas das folhas foram realizadas entre as 9 e 10h da manhã (MÓGOR; AMATUSSI; CORDEIRO, 2022).

Os açúcares totais foram quantificados segundo Maldonade *et al.* (2013), precedida de hidrólise ácida da amostra, utilizando ácido 3,5-dinitro salicílico (DNS). A curva padrão para açúcares redutores e totais foi feita com glicose (5,5 mM). Os valores foram expressos em µg de açúcares por g de material vegetal fresco.

3.3.4 Análise estatística

Todos dados foram testados quanto à sua homogeneidade e em seguida submetidos à análise de variância (ANOVA), quando significativos ($p < 0,5$) os dados foram submetidos ao teste de Tukey. Foi utilizado o software Assistat[®] 7.7 Beta (SILVA; AZEVEDO, 2016).

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Bioensaios

O comprimento e o volume dos hipocótilos de *S. lycopersicum* apresentaram o efeito bioativo da associação de *Lithothamnium* sp. micronizado associado à *A. platensis* (*Ap*) na maior concentração (*LAp2*) (Fig. 1a e 1b). Os hipocótilos de *S. lycopersicum* das sementes submetidas ao tratamento *LAp2* tiveram aumento de 15% no comprimento e de 27% no volume, em relação ao controle.

A bioatividade de *Ap* foi expressa no bioensaio de cotilédones de *C. sativus*, com 82,3% de aumento no comprimento das raízes (Fig. 1c). A área dos cotilédones não apresentou diferença significativa (Fig. 1d).

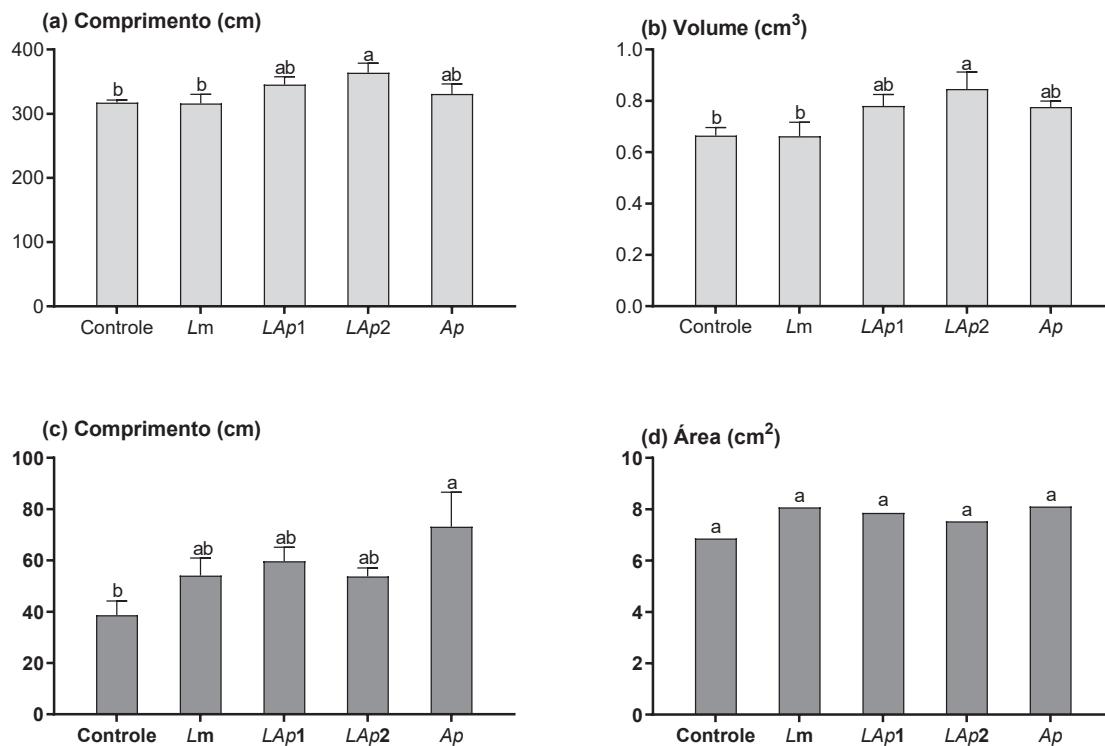


Figura 1 (a) comprimento e (b) volume da expansão de hipocótilo de *S. lycopersicum*; (c) comprimento e (d) área de cotilédones de *C. sativus*, dispostos em papel germitest previamente tratados com diferentes concentrações de *Lithothamnium* sp micronizado (*Lm*) e *A. platensis* (*Ap*). Concentrações: controle; (*Lm*) 1,5 g L⁻¹ de *Lm*; (*LAp1*) 1,5 g L⁻¹ de *Lm* + 0,75 g L⁻¹ de *Ap*; (*LAp2*) 1,5 g L⁻¹ de *Lm* + 1,5 g L⁻¹ de *Ap* e (*Ap*) 1,5 g L⁻¹ de *Ap*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,5$), pelo teste de Tukey. As barras indicam o desvio padrão.

O bioensaio de *V. radiata* avalia o comprimento de raízes adventícias (Tabela 1). As raízes das plantas tratadas com *Lm* tiveram comprimento 84% superior às raízes das plantas controle. As plantas submetidas à solução com *Ap*

isolada ou associada a *Lm* não emitiram raízes. O volume e o diâmetro médio das raízes diminuíram em relação ao controle.

Tabela 1 Valores médios do comprimento (cm), do volume (cm^3) e do diâmetro médio (mm) de raízes de *V. radiata*. Concentrações: controle; *Lm* ($1,5 \text{ g L}^{-1}$ de *Lm*); *LAp1* ($1,5 \text{ g L}^{-1}$ de *Lm* + $0,75 \text{ g L}^{-1}$ de *Ap*); *LAp2* ($1,5 \text{ g L}^{-1}$ de *Lm* + $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de *Ap*) e *Ap* ($1,5 \text{ g L}^{-1}$ de *Ap*). Tratamentos com *Ap* não emitiram raízes.

	Comprimento (cm)	Volume (cm^3)	Diâmetro médio (mm)
Controle	$97,99 \pm 3,70$	$0,73 \pm 0,06$	$0,97 \pm 0,05$
<i>Lm</i>	$180,763 \pm 20,52$	$0,69 \pm 0,12$	$0,68 \pm 0,06$

Lm = $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de *Lithothamnium* micronizado. Valores \pm desvio padrão.

3.4.2 Experimento no campo com plantas de batata

O índice relativo de clorofila (Fig. 2a) foi superior nas folhas das plantas de batata tratadas com *Lm* e *LAp2*, com aumento de 21 e 18%, respectivamente, em relação ao controle. Os maiores teores de clorofila no campo resultaram em aumento nos teores de sólidos solúveis em tubérculos das plantas na colheita (Fig. 2b), com 20% de incremento para *Lm* e 15% para *LAp2*, quando comparadas ao controle.

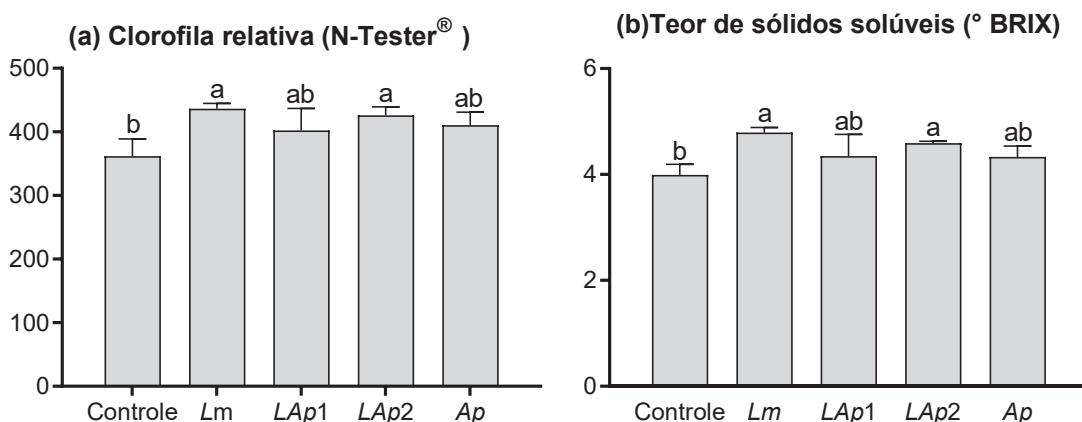


Figura 2 a) Índice relativo de clorofila de folhas de batata (55 DAP) e (b) Teor de sólidos solúveis de tubérculos de plantas (95 DAP) submetidas a aplicações foliares de soluções contendo cinco concentrações: controle; *Lm* ($1,5 \text{ g L}^{-1}$ de *Lm*); *LAp1* ($1,5 \text{ g L}^{-1}$ de *Lm* + $0,75 \text{ g L}^{-1}$ de *Ap*); *LAp2* ($1,5 \text{ g L}^{-1}$ de *Lm* + $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de *Ap*) e *Ap* ($1,5 \text{ g L}^{-1}$ de *Ap*). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,5$), pelo teste de Tukey. As barras indicam o desvio padrão.

No meio do ciclo da cultura da batata (aos 55 DAP), foi observado um incremento de 33% na massa seca das folhas (Fig. 3b) das plantas tratadas com *Lm*, em função do maior acúmulo da biomassa nas folhas, sem diferir das demais concentrações, apenas do controle. A área foliar das plantas submetidas à aplicações de *Lm* isolada e associada (*LAp1* e *LAp2*) aumentou em 52,7%, 50,2% e

68,3%, respectivamente. A massa fresca dos tubérculos (Fig. 3d) aumentou 132% nas plantas tratadas com *Lm*, quando comparada ao controle.

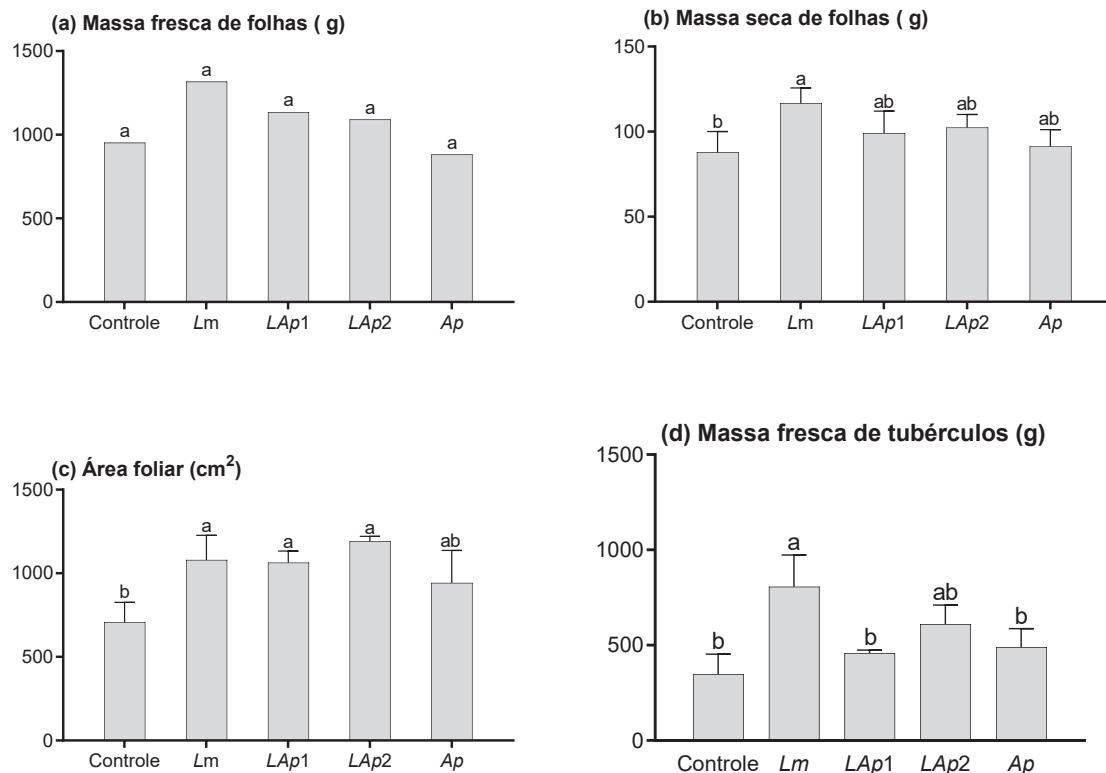


Figura 3 (a) Massa fresca de folhas, (b) massa seca de folhas, (c) área foliar e (d) massa fresca de tubérculos de plantas (55 DAP) submetidas a aplicações foliares de soluções contendo cinco concentrações: controle; *Lm* (1,5 g L⁻¹ de *Lm*); *LAP1* (1,5 g L⁻¹ de *Lm* + 0,75 g L⁻¹ de *Ap*); *LAP2* (1,5 g L⁻¹ de *Lm* + 1,5 g L⁻¹ de *Ap*) e *Ap* (1,5 g L⁻¹ de *Ap*). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,5$), pelo teste de Tukey. As barras indicam o desvio padrão.

As plantas tratadas com *Lap2* e *Ap* tiveram acúmulo de 50,2% e 38,8% de açúcares totais nas folhas (Fig. 4a). Os açúcares redutores (e.g. glicose e frutose) tiveram aumento de 44,4% nas plantas submetidas à aplicação de *Lap2*, enquanto os açúcares não redutores (e.g. sacarose) nas plantas submetidas a *Ap* foram 92,8% superiores ao controle. No momento da colheita (Fig. 4b), os tubérculos das plantas tratadas com *Lap2* apresentaram incremento de 66,3% de açúcares totais, quando comparado ao controle.

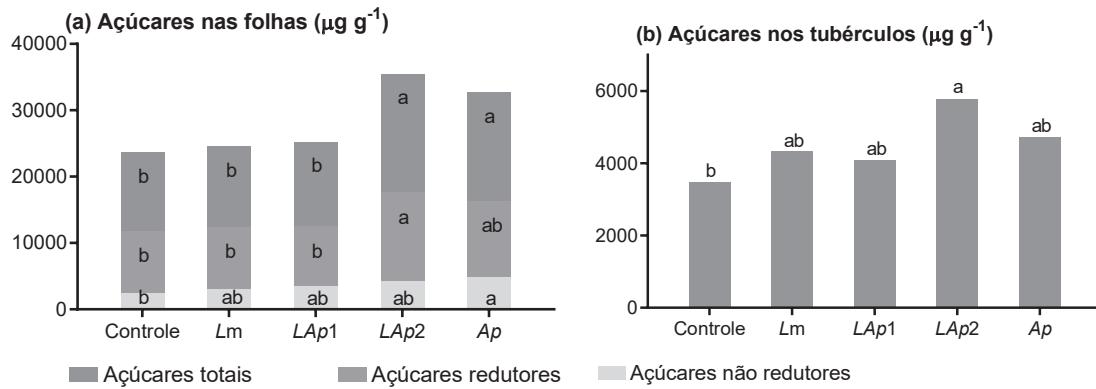


Figura 4 (a) Açúcares totais, açúcares redutores e açúcares não redutores em folhas de batata (55 DAP); (b) açúcares totais em tubérculos de batata (95 DAP). As plantas foram submetidas à aplicação via foliar de cinco concentrações: controle; Lm ($1,5 \text{ g L}^{-1}$ de Lm); LAp1 ($1,5 \text{ g L}^{-1}$ de Lm + $0,75 \text{ g L}^{-1}$ de Ap); LAp2 ($1,5 \text{ g L}^{-1}$ de Lm + $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de Ap) e Ap ($1,5 \text{ g L}^{-1}$ de Ap). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,5$), pelo teste de Tukey.

No momento da colheita, foi observado aumento de 40% e 38% no número de tubérculos (Fig. 5a) nas plantas tratadas com LAp2 e Ap, respectivamente. A produtividade de batata (Fig. 5b), nas plantas submetidas à LAp2 foi 82% superior, com aumento equivalente a 7,6 t, quando comparada ao controle.

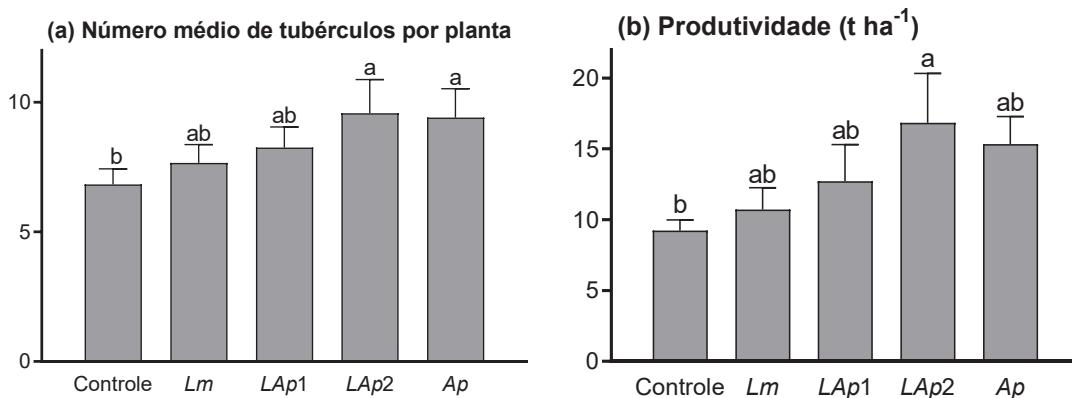


Figura 5 (a) Número médio de tubérculos por planta (95 DAP) e (b) Produtividade (t ha^{-1}) de tubérculos de plantas de batatas (95 DAP) submetidas a aplicações foliares de soluções com diferentes concentrações de *Lithothamnium* sp micronizado (Lm) e *Arthrospira platensis* (Ap). C = controle; Lm ($1,5 \text{ g L}^{-1}$ de Lm); LAp1 ($1,5 \text{ g L}^{-1}$ de Lm + $0,75 \text{ g L}^{-1}$ de Ap); LAp2 ($1,5 \text{ g L}^{-1}$ de Lm + $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de Ap) e Ap ($1,5 \text{ g L}^{-1}$ de Ap). Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) conforme o teste de Tukey. As barras indicam o desvio padrão.

3.5 DISCUSSÃO

A bioatividade da associação de Lm e Ap estimulando a expansão dos hipocótilos do tomate foi observada na concentração de LAp2, com aumento de 15%

no comprimento e de 27% no volume (Fig. 1a e 1b). Esse aumento pode ser atribuído à presença de substâncias bioativas presentes nas microalgas (PLAZA *et al.*, 2018; MÓGOR *et al.*, 2017; STIRK *et al.*, 2013).

Em cotilédones de *C. sativus*, *Ap* aumentou em 83,2% no comprimento das radículas, sendo essa bioatividade de *Ap* também observada por Mógor *et al.* (2017). A aplicação de *Lm* não apresentou bioatividade no bioensaio de efeito citocinínico (Fig. 1c).

O enraizamento das plantas no bioensaio de *V. radiata* tratadas com *Lm* foram 84% superior ao controle (Tabela 1). *Lm* teve seu efeito atribuído à presença de ácido húmicos (AH), que aplicado nas plantas podem apresentar bioatividade semelhante à auxina (AMATUSSI *et al.*, 2020). As soluções com a presença de *Ap* não promoveram emissão de raízes em *V. radiata*, confirmado o observado por Mógor *et al.* (2017) utilizando a mesma espécie.

No experimento em campo, as folhas das plantas de batata tratadas com *Lm* e *LAp2* tiveram maior índice relativo de clorofila (Fig. 2a). Os maiores teores de clorofila no campo resultaram em aumento nos teores de sólidos solúveis (TSS) em tubérculos das plantas no momento da colheita (Fig. 2b), com 20% de incremento para *Lm* e 15% para *LAp2*, quando comparadas ao controle. O TSS, também conhecido como °BRIX, pode ser utilizado como uma medida indireta do teor de açúcares (principalmente sacarose).

As variáveis biométricas avaliadas no início da tuberização demonstraram a efetividade de *Lm* no crescimento inicial das plantas, com destaque para o acúmulo de biomassa nas folhas e tubérculos (Fig. 3b) e na área foliar, isolada e associada a *Ap* (*LAp1* e *LAp2*). Amatussi *et al.* (2020) avaliaram o crescimento inicial de plantas de tomate com uso de *Lm* e verificaram aumentos em massa seca de folhas. A associação de ácido húmico com microalga aumentou o crescimento inicial de plantas de cebola em função do maior enraizamento, característico do efeito auxínico das substâncias húmicas (GEMIN *et al.*, 2019).

Os resultados obtidos no experimento em campo demonstraram que a associação de *Lm* a *Ap* promoveram aumento nos teores de açúcares (Fig. 4a). A associação *LAp2* estimulou o transporte fonte-dreno, resultando em maior produtividade de batata. Os açúcares presentes nas folhas foram translocados para os tubérculos (*LAp2*) e, consequentemente, promoveram maior rendimento no

momento da colheita (Fig. 5b). Estes estímulos à translocação de fotoassimilados da fonte (folhas) para o dreno (tubérculos) são muito importantes para o crescimento das plantas e incremento na produtividade.

O efeito sinérgico entre a alga calcária e a cianobactéria, em *LAp2*, com a presença de AH em *Lithothamnium*, com evidente efeito auxínico (Tabela 1), as possíveis alterações das poliaminas com uso de *A. platensis* estimulando o crescimento de plantas (MÓGOR et al., 2017), associado ao comportamento citocinínico da aplicação da biomassa de *Ap* (Fig 1c), podem ter contribuído para o crescimento vegetal da planta de batata.

Assim como em trabalhos anteriores, com uso de microalga associada à substâncias húmicas (GEMIN et al., 2019), a sinergia de diferentes mecanismos de ação neste trabalho foi eficiente no aumento produtivo das plantas. O efeito no crescimento de plantas com uso de *Lithothamnium* micronizado (MÓGOR et al., 2021; AMATUSSI et al., 2020) e de *Arthospira platensis* (MÓGOR et al., 2017), quando associadas pode ser um composto bioativo que promove o crescimento, e aumento da produtividade de batata. Plaza et al. (2018) observaram que a aplicação foliar de *Ap* hidrolisado aumentaram a concentração foliar de nutrientes (P, K, Ca e Mg), o que pode contribuir para o desenvolvimento da planta.

Assim, por meio de bioensaios experimento a campo, foi identificado que as aplicações foliares da associação de *Lithothamnium* sp micronizado e *A. platensis* foram sinérgicos, promovendo o crescimento das plantas, melhorando o conteúdo de açúcares nas folhas e nos bulbos e a produtividade de batata.

3.6 CONCLUSÃO

A bioatividade de *Lithothamnium* micronizado (*Lm*) e da cianobactéria *Arthospira platensis* (*Ap*) foi identificada em *S. lycopersicum*, *C. sativus* e *V. radiata*. Aplicações foliares da associação de *Lm* e *Ap* (*LAp*) permitiram identificar diferentes mecanismos de ação, aumentando o crescimento das plantas de batata, estimulando seu metabolismo e rendimento.

A combinação de *LAp2* (1,5 g L⁻¹ de *Lm* + 1,5 g L⁻¹ de *Ap*) aumentou o rendimento dos tubérculos. A associação *LAp2* pode ser um potencial biofertilizante para promover ganhos de produção de batata de forma sustentável.

REFERÊNCIAS

- AMATUSSI, J.O.; MÓGOR, A.F.; MÓGOR, G., LARA, G. B. Novel use of calcareous algae as a plant biostimulant. *Journal of Applied Phycology*, v. 32, p. 2023-2030, 2020.
- BOULOMYTIS, V. T. G. e BRESAOLA JUNIOR, R. Problemática no uso da terra e no manejo agrícola da bataticultura em Bueno Brandão, MG. *Sociedade & Natureza [online]*. v. 25, n. 2. 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 61, de 8 de julho de 2020a. Estabelece as regras sobre definições, exigências, especificações, garantias, tolerâncias, registro, embalagem e rotulagem dos fertilizantes orgânicos e dos biofertilizantes, destinados à agricultura. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 8 jul. de 2020.
- BULGARI, R.; FRANZONI, G.; Ferrante, A. Biostimulants Application in Horticultural Crops under Abiotic Stress Conditions. *Agronomy* 2019, 9, 306.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos, 3rd ed.; Embrapa: Brasília, Brazil, 2013; 353p.
- GEMIN, L. G.; MÓGOR, Á. F.; AMATUSSI, J. D. O.; MÓGOR, G. Microalgae associated to humic acid as a novel biostimulant improving onion growth and yield. *Scientia Horticulturae*, 256, 108560. 2019.
- GEMIN, L. G. MÓGOR, Á. F.; AMATUSSI, J. D. O.; LARA, G. B.; MÓGOR, G.. Organic onion growth, yield and storage improved by foliar sprays of microalgae and fulvic acid as a natural biofertilizer. *Bioscience Journal*. 2022, 38, e38045.
- MALA, R. et al. Agronomic Biofortification of Amaranthus dubius with Macro Nutrients and Vitamin A. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 225. 012214. 2017.
- MALDONADE, I. R.; DE CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A. Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS. *Embrapa Hortaliças-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*. 2013. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/81580/1/cot-85.pdf>.
- 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. Plant growth biostimulant activity of the green microalga *Desmodesmus subspicatus*. *Algal Research*, 59, 102434. 2021.
- MÓGOR, G.; AMATUSSI, J.O.; CORDEIRO, E.C.N. Bioensaios e determinações bioquímicas na avaliação da bioatividade de biofertilizantes. In: Mógor AF; Mógor, G. (Org.) Aminoácidos, extratos de algas, extratos vegetais e substâncias húmicas como biofertilizantes. Pecege Editora, Piracicaba, SP. 2022. 101p.

MÓGOR, A. F.; ÖRDÖG, V.; LIMA, G. P. P.; MOLNÁR, Z.; MÓGOR, G. Biostimulant properties of cyanobacterial hydrolysate related to polyamines. *Journal of Applied Phycology*. V.30, 453–460. 2017.

MÓGOR A. F., AMATUSSI J. O., MÓGOR G., GEMIN L. G. Biostimulant action of *Lithothamnium* sp. promoting growth, yield, and biochemical and chemical changes on onion. *Journal of Applied Phycology*, 33:1905–1913. 2021.

MÓGOR, A. F.; BARBIZAN, T.; PAULETTI, V.; OLIVEIRA, J.; BETTONI, M. M. Teores de clorofila em cultivares de tomateiro submetidas a aplicações foliares de magnesio. *Pesq Agropec Trop* 43:363–369. 2013.

MÓGOR, Á. F.; de OLIVEIRA AMATUSSI, J.; MÓGOR, G.; DE 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. *American Journal of Plant Sciences*, 9(05), 966. 2018.

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

ROUPHAEL Y. E COLLA G. Synergistic Biostimulatory Action: Designing the Next Generation of Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Front. Plant Sci.* 9:1655. 2018.

SINGH, M., DOTANIYA; M. L., MISHRA; A., DOTANIYA, C. K.; REGAR, K. L.; LATA, M. Role of biofertilizers in conservation agriculture. In *Conservation agriculture* (pp. 113-134). Springer, Singapore. 2016.

STIRK, W.A.; ÖRDÖG, V.; NOVÁK, O.; ROLČÍK, J.; BÁLINT, M.S.P.; STADEN, J. V. Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains. *J. Phycol.* 49, 459-467, 2013.

STIRK, W. A.; ORDOG, V.; VAN STADEN, J.; JAGER K. Cytokinin and auxin like activity in Cyanophyta and microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 14:215–221. 2002.

TRIPEPI, R.R.; GEORGE, M.W. Identification of bacteria infecting seedlings of mung bean used in rooting bioassays. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 116, 80-84, 1991.
Doi: <https://doi.org/10.21273/JASHS.116.1.80>.

ZHAO, Z.R.; WU, Z.L.; HUANG, G.Q., LI, G.R. (1992) An improved disk bioassay for determining activities of plant growth regulators. *J Plant Growth* 11:209

4 CAPITULO 2 – SYNERGIC COMBINATION OF CALCAREOUS ALGAE AND CYANOBACTERIA STIMULATE METABOLIC ALTERATIONS IMPROVING PLANT GROWTH AND YIELD

Journal of Applied Phycology
<https://doi.org/10.1007/s10811-022-02873-1>



Synergic combination of calcareous algae and cyanobacteria stimulate metabolic alterations improving plant growth and yield

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

Received: 20 August 2022 / Revised and accepted: 10 November 2022
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2022

¹Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, CEP: 80035-050, Curitiba, Brazil.

ABSTRACT

The use of natural bioactive sources to promote plant growth and crop yield gains, such as those obtained from algae, are in evidence as a sustainable agriculture practice. In this sense, recently the calcareous alga *Lithothamnium* sp. had its bioactive plant growth promoting effect related to the presence of high degree of humification humic acid with pronounced auxin-like effects, while the cyanobacterium *Arthospira platensis* (*Spirulina plantensis*) has the plant growth promoting effect attributed to a pool of bioactive molecules, such as the free L-amino acids and polyamines. To explore the effect of algae sources combinations as plant biostimulants, the aim of this work was to evaluate the effects of foliar application of micronized *Lithothamnium* (*Lm*) associated with *A. platensis* (*Ap*) dried biomass in onion (*Allium cepa*) metabolism, growth and yield. For that, adopting an step by step approach three experiments were conducted: (i) foliar application to onion plants grown in pots in greenhouse comparing algae sources alone and combined, (ii) foliar application to onion plants in the field under organic system testing algae sources combinations (first season), and (iii) foliar application in the field comparing doses and frequencies of selected combinations (second season). The association of algae sources promoted growth and biochemical changes, thus pigment contents, total

sugars, amino acids and nitrate reductase enzyme activity were improved, increasing the onion yield by two seasons in a nature friendly way.

Keywords: *Lithothamnium* sp.; *Arthrospira platensis*; *Alliun cepa*; biofertilizer; biostimulant, organic agriculture.

4.1 INTRODUCTION

The rise in the demand for food from nature friendly production systems imposes the necessity to develop new biofertilizers and biostimulants. The biostimulants may contribute to sustainable agriculture (Bayona-Morcillo et al. 2020) due to its composition, such as protein hydrolysates (Colla et al. 2015), humic substances (Gemin et al. 2019), seaweed extracts (Ariole et al. 2015), calcareous algae (Mógor et al. 2021) and microalgae (Colla and Rousphael 2020). In this sense, the combination of algae sources could show synergistic biostimulatory action, helping to design the next generation of plant biostimulants for sustainable agriculture (Rousphael and Colla 2018).

Among the most used algae in agriculture is *Lithothamnium* sp. - calcareous algae, rhodophyte - found in marine deposits, which has calcium carbonate, magnesium, micronutrients (Esper Neto et al. 2020) and, if subjected to micronization, may contain humic acid (HA) in its composition (Amatassi et al. 2020). Depending on the calcification of its biomass, *Lithothamnium* sp. is commonly applied as limestone (Rodrigues Neto et al., 2021). However, the foliar application of micronized *Lithothamnium* sp. promoted plant growth and yield gains attributed to the presence of a bioactive HA with a high degree of polymerization, showing a significant auxin-like effect (Amatassi et al. 2020, Mógor et al. 2021).

The physiological effect of HA in plants is related to effects similar to those of the hormone auxin (Zandonadi et al. 2014; Canellas et al. 2015, 2020).

Also the microalgae have been reported as efficient sources of biofertilizers and biostimulants due to the presence of bioactive molecules in their composition, such as glycosides and the cytokinin zeatin identified in the green microalgae (Chlorophyta) *Desmodesmus subspicatus* (Mazepa et al. 2021), or polyamines and amino acids in *Asterarcys quadricellulare* (Mógor et al. 2022; Cordeiro et al. 2022a) and also in the blue-green algae (Cyanophyta) *Arthrospira platensis* (*Spirulina*

platensis) (Mógor et al. 2017; Mógor et al. 2018).

Among the numerous species of microalgae, the cyanobacterium *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* has in its composition a high content of proteins (Ishaq et al. 2016; Çelekli et al. 2021) and polysaccharides (Trabelsi et al. 2009; Rachidi et al. 2020). The *A. platensis* enzymatic hydrolysates contain polyamines, such as spermine, which may stimulate cell multiplication and plant growth when applied to plants (Mógor et al. 2017). Foliar application of *A. platensis* can increase nutrient uptake (Plaza et al. 2018), resulting in more nutritious plants, which is related to food biofortification (Billard et al. 2014; Godlewska et al. 2019).

In addition, the application of microalgae associated with other natural bioactive sources can also be exploited to promote plant growth, as the increase in onion yield of plants subjected to the application of the microalgae *Scenedesmus subspicatus* associated with HA obtained from the mineral leonardite (Gemin et al. 2019), combination that also improved bulbs storage and biofortification (Gemin et al. 2022).

Therefore, considering the potential synergistic biostimulatory action of the combination with calcareous algae and cyanobacterium, the aim of this work was to evaluate the effects of foliar application on onion (*Allium cepa*) plants grown under organic production system by two seasons, of solutions containing *Lithothamnium* sp. micronized, an acknowledged source of humic acid, and *A. platensis* dried biomass, an acknowledged source of proteins, amino acids and polyamines.

4.2 MATERIALS AND METHODS

The *Lithothamnium* sp. sample was obtained off the coast of Espírito Santo State, Brazil (20°19'10" S – 40°20'16" W). After micronization (mechanical breakage, caused by the friction between the particles to sizes between 1 to 10 µm), the sample was provided by Valeagro Comércio Importação & Exportação / NaturVita Bioagroindustria (Petrolina, State of Pernambuco, Brazil).

The cyanobacterium *Arthrospira* *platensis* strain was provided by the "Elizabeth Aidar" Microalgae Collection of the Fluminense Federal University (Niterói, State of Rio de Janeiro – Brazil). The Axenic autotrophic cultivation of *A. platensis* was carried out in a semi-continuous system in a photobioreactor (Reichert et al. 2006) using a culture medium (Zarrouk, 1966) at the Department of Crop Sciences of

the Federal University of Paraná (Curitiba, Paraná State - Brazil). After 45-day cultivation, the biomass was separated from the culture medium by centrifugation, attaining 0.95 g L^{-1} DW (Dry Weight) and was freeze-dried kept a temperature of 50 °C for 24 hours (oven) and at – 50 °C, under a vacuum of 1×10^{-6} mBAR, for 20 hours. The freeze-dried powder was added to spraying solutions, so allowing the cells disruption (Stirk et al. 2020).

The experiments were carried out in the Biofertilizers Lab. and Organic production Research Area of the Federal University of Paraná, located in the municipality of Pinhais, Paraná State, Brazil, at $25^{\circ}23'30''$ S and $49^{\circ}07'30''$ W, at an average altitude of 920 meters. The climate in the region is a Cfb-type temperate climate (Temperate oceanic climate or subtropical highland climate; coldest month averaging above 0 °C or –3 °C, all months with average temperatures below 22 °C and at least four months averaging above 10 °C) (Köppen).

For determination of the effect of foliar application of solutions containing *Lithothamnium* sp. micronized (Lm) separately and associated with *Arthrosphaera platensis* (Ap), in terms of growth, development, biochemical alterations, and yield, three experiments were carried out.

4.2.1 Experiment I

It was carried out in greenhouse using pots with a capacity of three liters, filled (in a proportion of 1:1) with commercial substrate based on composted pine bark (Tropstrato®) and organic compost (Provaso®), with: 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} .

At 60 days after sowing (DAS) in nursery beds, the seedlings were transplanted to the pots (experiment I) and simultaneously to the field (experiment II). The seedlings had four leaves, an average pseudostem diameter of approximately 4 mm, showing adequate development. The pots were arranged on benches, with four pots and two plants in each pot, for repetition.

A completely randomized design was used, with two onion (*Allium cepa*) hybrid cultivars (Alvará ® and Perfecta F1 ®), each treatment with four replications (n=4) under a double factorial arrangement (two cultivars x five treatments). A localized irrigation system with a drip tape was used, aiming to maintain the humidity at 80%, controlled with the aid of a tensiometer. The pots contained 2 cm of expanded

vermiculite on the surface so that there was no contact of foliar sprayed solutions with the substrate.

Four concentrations of *Lithothamnium* sp. micronized (*Lm*) associated or not with *Arthrospira platensis* (*Ap*) were weekly applied, as well the control sprayed with distilled water. The applications (n=8) of the treatments were carried out using a 10-liter Kawashima® electronic sprayer at constant pressure (40 psi). The volume of application varied as a function of plant growth, from 20 mL (first to fourth application) to 36 mL (fifth to eighth application) per pot.

The *Lithothamnium* sp. (micronized powder) sample was suspended in distilled water at a concentration of 1.5 g L⁻¹ (Amatussi et al. 2020) before being sprayed on leaves. The sample of *Arthrospira platensis* (freeze-dried powder) was suspended in distilled water at a concentration of 0.75 g L⁻¹ and 1.5 g L⁻¹ (Mógor et al. 2018) before being sprayed to the leaves of onion plants. Five treatments were established: Control, *Lm* (1.5 g L⁻¹ of *Lm*), *LAp1* (1.5 g L⁻¹ of *Lm* + 0.75 g L⁻¹ of *Ap*), *LAp2* (1.5 g L⁻¹ of *Lm* + 1.5 g L⁻¹ of *Ap*) and *Ap* (1.5 g L⁻¹ of *Ap*).

After eight applications with a weekly interval, at 90 days after transplanting (DAT) at the beginning of bulbification, leaf material from two plants was collected for biometric and biochemical analysis. Data on plant height determined with a ruler from the base of the pseudostem to the tip of the most expanded leaf (cm), number of leaves, pseudostem diameter determined with digital caliper (mm), fresh and dry mass (g) of the aerial part, and roots (g) using precision scales were obtained. Mass was quantified on a precision scale. The dry mass was quantified after drying in a forced-air circulation oven at 65°C until reaching a constant value. The biochemical analyzes are described below.

4.2.2 Experiment II

To observe the influence of *Lithothamnium* sp. (*Lm*) associated or not with *A. platensis* (*Ap*) on the yield of onion bulbs, experiment II was implemented in the field under organic system in August 2018. A completely randomized design was used with two onion cultivars (Alvará® and Perfecta®) where each treatment had four replications (n=4). The treatments, application frequency, and seedling preparation were the same as described in experiment I.

The chemical analysis of the soil in 0-20 cm layer showed the following mean values: 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 treatments were distributed in beds previously fertilized and prepared seven days before seedling transplanting. Soil preparation was carried out with the incorporation of eight tons per hectare of organic compost with the following mean 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.

The spacing adopted in the experiment was 10 cm between plants and 30 cm between rows, each plot with 40 plants. There were 10 foliar applications of the treatments, with an application volume corresponding to 400 L ha⁻¹.

At harvest, at 135 days after transplanting (DAT), the bulbs were classified according to their diameter (I < 35 mm; II = 35 - 50 mm; III = 50 - 70 mm, and IV = 70 - 90 mm) and their masses were quantified. Yield was extrapolated as a function of the spacing adopted in the experiment (230,000 plants per hectare).

4.2.3 Experiment III

To evaluate the application frequency (weekly and fortnightly) experiment III was implemented in the field, in August 2019. This experiment used the same design, the same population of plants, the same number of replications (n=4), and the same cultivars used in experiment II.

Applications were performed at two frequencies (weekly and fortnightly), resulting in a triple factorial arrangement (two cultivars x two frequencies x three treatments). The treatments of *Lm* and *Ap* associated (*LAp1* = 1.5 g L⁻¹ of *Lm* + 0.75 g L⁻¹ of *Ap* and *LAp2* = 1.5 g L⁻¹ of *Lm* + 1.5 g L⁻¹ of *Ap*), in addition to the control, with water application were applied.

Plant material was collected at the beginning of bulbing, at 120 DAT. Plant height (cm), number of leaves, leaf area (cm²), pseudostem volume (cm³), fresh and dry mass (g) of leaves, pseudostem, and bulbs were evaluated. Leaf area and pseudostem volume were obtained using WinRhizo Pro® software (Regent Instr® Canada). At 135 DAT, the final collection was performed to evaluate yield, as described in experiment II.

4.2.4 Biochemical analyses

Subsequent to the collection of biometric (Experiment I) and yield (Experiment II and III) data, leaves and commercial bulbs (type III and type IV) were collected, macerated in liquid nitrogen and stored (-20° C) for biochemical analyses. Leaf collections were performed between 9 and 10 am.

Analysis of chlorophyll-a (Ch-a), chlorophyll-b (Ch-b) and carotenoids (C), extraction of pigments in the leaves was performed according to Lichtenthaler (1987). The absorbance readings were taken at 663, 647 and 470 nm. The formulas described by Lichtenthaler and Buschmann (2001), were applied, the values were expressed as µg of chlorophyll per g of fresh plant material.

Total sugars were quantified according to Maldonade et al. (2013), preceded by acid hydrolysis of the sample using 3,5-dinitro salicylic acid (DNS). The standard curve for reducing and total sugars was made with glucose (5.5 mM). The values were expressed as µg of sugars per g fresh plant material.

For the analysis of total free amino acids, the amino acids were extracted according to Winters et al. (2002) and the colorimetric reaction with absorbance reading done at 570 nm, according to Magné and Larher (1992). The standard curve was made with glutamine (2 mM). The values were expressed in µg g fresh plant material.

The analysis of phenolic compounds was by the Prussian Blue method (Price and Butler 1977). The absorbance reading was performed at 700 nm, the standard curve performed with gallic acid (0.01 M) in methanol. The values were expressed in µg g fresh plant material.

Nitrate Reductase enzyme activity of leaves was done according to (Jaworski 1971). Reading was performed in a spectrophotometer at 540 nm and values expressed as µ mol of NO₂ h⁻¹ g⁻¹ plant material.

All data were tested for homogeneity and then submitted to analysis of variance, when significant ($p < 0.05$) the data were submitted to Tukey's test. Assistat® 7.7 Beta software (Silva and Azevedo 2016) was used.

4.3 RESULTS

4.3.1 Experiment I

The number of leaves (NL) did not differ between cultivars and there was no interaction between treatments and cultivars. When comparing the treatments, only *LAp2* (1.5 g L^{-1} of *Lm* + 1.5 g L^{-1} of *Ap*) differed from the control, with an increase of 16% (Table 1). There were no changes in plant height depending on the treatments, only among the cultivars, where 'Alvará' was superior to 'Perfecta F1'.

The *Lm* application increased root fresh mass (FMR) by 33% (Table 1). The application of the association of calcareous algae in the highest *Ap* concentration (*LAp2*), increased by 52% the FMR, in the cultivar 'Alvará'. The *Lm* application increased the dry mass of the roots by 57%, while the application of *LAp2* promoted an increase of 124% in relation to the control, showing synergic effect of the algal sources combination.

Table 1. Mean values of the number of leaves, fresh mass and dry mass of roots of plants of two onion cultivars ('Alvará' and 'Perfecta F1') submitted to foliar applications of five treatments, kept in pots.

	Control	<i>Lm</i>	<i>LAp1</i>	<i>LAp2</i>	<i>Ap</i>
(a) NL	$7.12 \pm 0.75 \text{ b}$	$7.31 \pm 0.71 \text{ ab}$	$7.62 \pm 0.70 \text{ ab}$	$8.25 \pm 0.81 \text{ a}$	$7.93 \pm 0.85 \text{ ab}$
(b) FMR (g)					
Alvará	$22.19 \pm 1.39 \text{ aC}$	$29.47 \pm 4.00 \text{ aAB}$	$23.06 \pm 2.03 \text{ aBC}$	$33.76 \pm 3.72 \text{ aA}$	$27.53 \pm 2.4 \text{ aABC}$
Perfecta	$22.73 \pm 4.21 \text{ aA}$	$23.25 \pm 2.65 \text{ bA}$	$20.71 \pm 3.18 \text{ aA}$	$19.35 \pm 2.78 \text{ bA}$	$21.33 \pm 2.06 \text{ bA}$
(c) DMR (g)					
Alvará	$1.58 \pm 0.09 \text{ aC}$	$2.48 \pm 0.4 \text{ aB}$	$1.86 \pm 0.14 \text{ aBC}$	$3.54 \pm 0.79 \text{ aA}$	$1.96 \pm 0.15 \text{ aBC}$
Perfecta	$1.61 \pm 0.34 \text{ aA}$	$1.41 \pm 0.31 \text{ bA}$	$1.41 \pm 0.18 \text{ aA}$	$1.15 \pm 0.17 \text{ bA}$	$1.38 \pm 0.13 \text{ bA}$

NL = number of leaves; FMR = fresh mass of roots; DMR = dry mass of roots. Treatments factor (T): Control, *Lm* = 1.5 g L^{-1} of *Lm*; *LAp1* = 1.5 g L^{-1} of *Lm* + 0.75 g L^{-1} of *Ap*; *LAp2* = 1.5 g L^{-1} of *Lm* + 1.5 g L^{-1} of *Ap*; *Ap* = 1.5 g L^{-1} of *Ap*. Means followed by the same letter do not differ statistically ($p < 0.5$) by Tukey test (\pm standard deviation). (a) Cultivar factor (FC): ns; Treatment factor (FT): *; FC X FT: ns. (b) FC: **; FT: *; FC X FT: **. (c) FC: **; FT: **; FC X FT: **. ANOVA: ns: not significant; * significant at $p \leq 0.05$, **= significant at $p \leq 0.01$.

At 90 days the cultivar 'Alvará' presented lowest levels of sugars in the leaves (Fig. 1a). The cultivar 'Perfecta F1' presented higher values of sugars in the leaves than the control at concentrations *LAp1* and *LAp2*, with an increase of 34 and 30%, respectively. Application of *LAp1*, in the cultivar 'Perfecta F1', increased the content of total free amino acids (Fig. 1a) by 21%. The activity of the enzyme nitrate reductase (NR) showed an interaction between cultivars and treatments (Fig. 1c). The *Lm*-treated plants showed higher NR activity, with an increase of 24%, in cultivar

'Alvará'. The NR activity in the 'Perfecta F1' cultivar increased by 46%, 45%, 52%, and 45% when *Lm*, *LAp1*, *LAp2*, and *Ap* were applied, respectively.

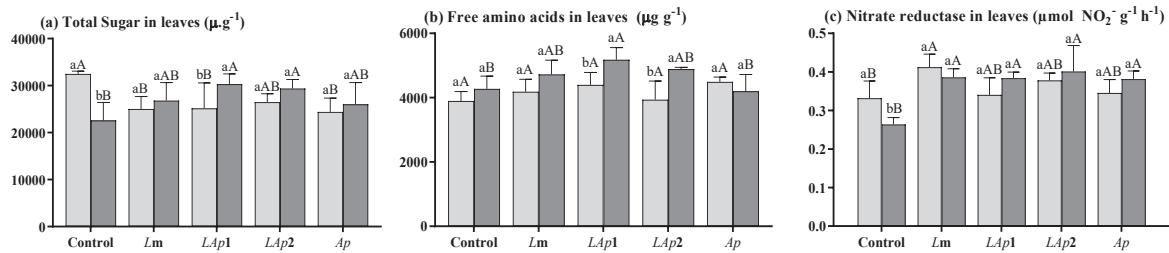


Fig. 1 Y axis: Total sugar content (a), total free amino acid content (b) and Nitrate reductase enzyme activity in leaves (c). Cultivar factor (FC): 'Alvará' and 'Perfecta'. Factor treatments (FT): X axis: control, (*Lm*) 1.5 g L^{-1} of *Lm*, (*LAp1*) 1.5 g L^{-1} of *Lm* + 0.75 g L^{-1} of *Ap*, (*LAp2*) 1.5 g L^{-1} of *Lm* + 1.5 g L^{-1} of *Ap* and (*Ap*) 1.5 g L^{-1} of *Ap*. Means followed by the same letter do not differ statistically ($p < 0.05$), by Tukey's test. Error bars indicate standard deviation. Light gray = 'Alvará'; dark gray = 'Perfecta F1'. Lower case letters: between cultivars; upper case letters: between treatments.

4.3.2 Experiment II

At the point of harvest, plants subjected to application with *LAp2* accumulated 20% more total sugars in the bulbs (Fig. 2a). Furthermore, plants subjected to *LAp1* application had the content of total free amino acids (Aa) increased by 40% and application of *LAp2* increased by 45% (Fig. 2b). NR activity (Fig. 2c), in cultivar 'Perfecta F1', was increased by 33%, 45% and 53% with the application of *LAp1*, *LAp2*, and *Ap*, respectively

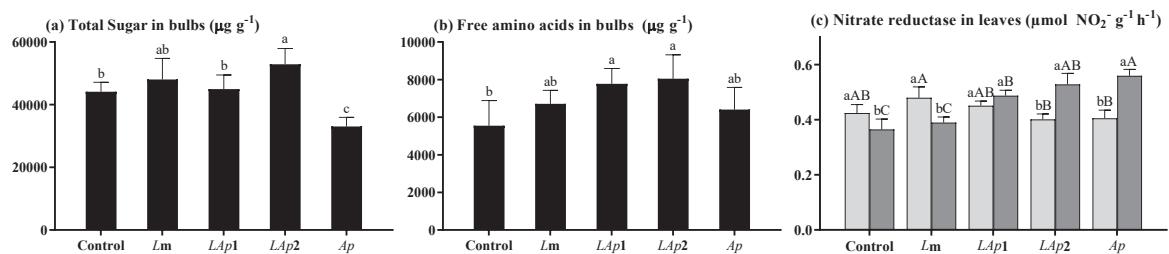


Fig. 2 Y axis: Average values of total sugar content (a), total free amino acid content in bulbs (b) and Nitrate reductase enzyme activity in leaves (c). Cultivar factor (FC): alvará and perfecta. Factor treatments (FT) X axis: control, (*Lm*) 1.5 g L^{-1} of *Lm*, (*LAp1*) 1.5 g L^{-1} of *Lm* + 0.75 g L^{-1} of *Ap*, (*LAp2*) 1.5 g L^{-1} of *Lm* + 1.5 g L^{-1} of *Ap* and (*Ap*) 1.5 g L^{-1} of *Ap*. Means followed by the same letter do not differ statistically ($p < 0.05$), by Tukey's test. Error bars indicate standard deviation. Light gray = 'Alvará'; dark gray = 'Perfecta F1'. Lower case letters: between cultivars. Upper case letters: between treatments.

The *LAp2* applications promoted an increase in commercial onion bulbs (classes III and IV - 50 mm to 90 mm), increasing yield by up to 20 % in relation to the control (Fig. 3), corresponding to an increase of 4 t ha⁻¹.

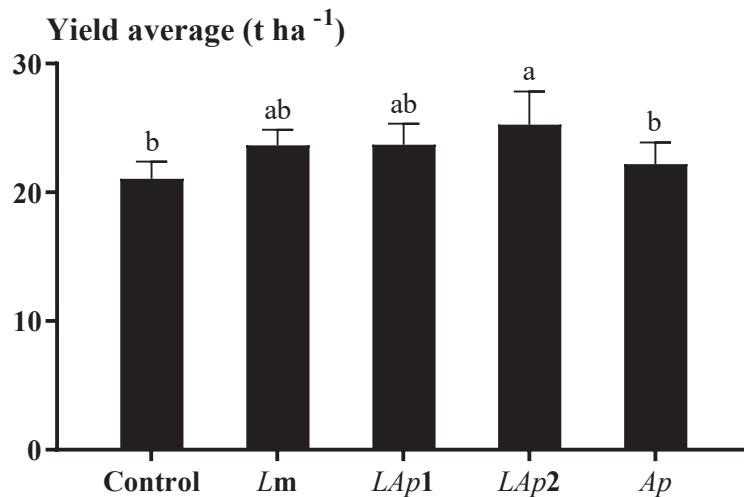


Fig. 3 Y axis: Average commercial yield. Cultivar factor (CF): 'Alvará' and 'Perfecta F1'. Treatment factor (TF): X axis: control, *Lm* (1.5 g L⁻¹ of *Lm*), *LAp1* (1.5 g L⁻¹ of *Lm* + 0.75 g L⁻¹ of *Ap*), *LAp2* (1.5 g L⁻¹ of *Lm* + 1.5 g L⁻¹ of *Ap*) and *Ap* (1,5 g L⁻¹ of *Ap*). Means followed by the same letter do not differ statistically ($p < 0.05$), by Tukey's test. Error bars indicate standard deviation.

4.3.3 Experiment III

The length of leaves (Fig. 4a) of plants treated with *LAp1* and *LAp2* increased by 11% and 12%, regardless of the cultivar and the applied frequency. The number of leaves of plants that received *LAp1* was increased by 13%. In the weekly application, the leaf area (Fig. 4b) of plants treated with *Lap1* and *Lap2* was higher in the 'Alvará' cultivar by 49% and 43%, respectively. While the leaf area of cultivar 'Perfecta F1' was increased by 57% and 47% in the *LAp1* and *LAp2* biweekly application.

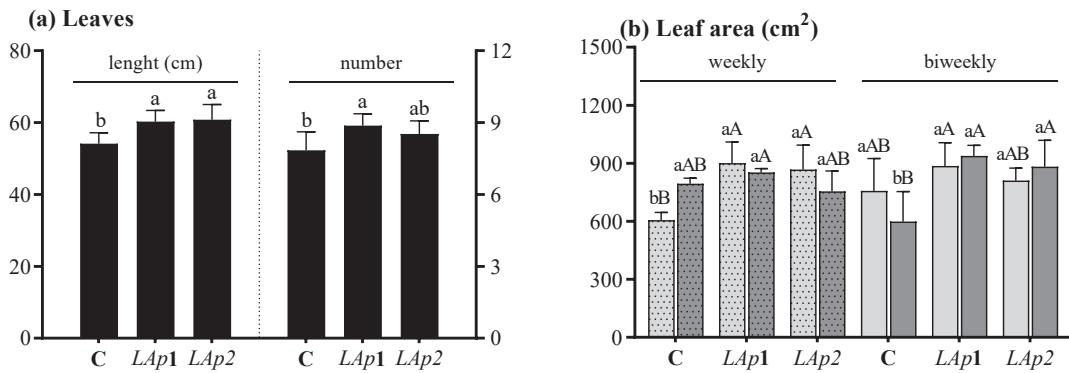


Fig. 4 Y axis: Length and number of leaves (a), leaf area (cm^2) (b). Cultivar factor (CF): light gray = 'Alvará'; dark gray = 'Perfecta F1'. Application frequency factor (FF): weekly (dotted gray); biweekly (gray). Treatment factor (TF) (black bars): X axis: C (control), LAP1 (1.5 g L⁻¹ of Lm + 0.75 g L⁻¹ of Ap) and LAP2 (1.5 g L⁻¹ of Lm + 1.5 g L⁻¹ of Ap). Means followed by the same letter do not differ statistically ($p < 0.05$), by Tukey test. Error bars indicate standard deviation. Lower case letters: between cultivars. Upper case letters: between treatments.

The dry mass of the leaves (Fig. 5a) was superior to the control at 41% and 28% when LAP1 and LAP2 were applied weekly. The application of LAP1 increased the dry mass of onion pseudostems (Fig. 5b) by 24%, regardless of the cultivar and the applied frequency. The volume of the pseudostems (Fig. 5c) of the plants treated with LAP1 was superior to the control in the weekly (41%) and fortnightly (34%) frequencies, while the plants treated with LAP2 had the volume of the pseudostems increased by 44%, in the fortnightly application.

At the beginning of the bulb development, the gain in fresh mass of onion bulbs (Fig. 5d) was increased in plants that received LAP1 application, on a weekly (90%) and fortnightly (50%) frequency. The application of LAP2 resulted in an increment 63% higher than the control when the application occurred weekly. In the dry mass, the LAP1 application promoted an increase of 105% and 43% in the weekly and the biweekly frequencies, respectively. Plants submitted to the LAP2 application had the dry mass of the bulbs increased by 56% when the application was performed on a weekly basis.

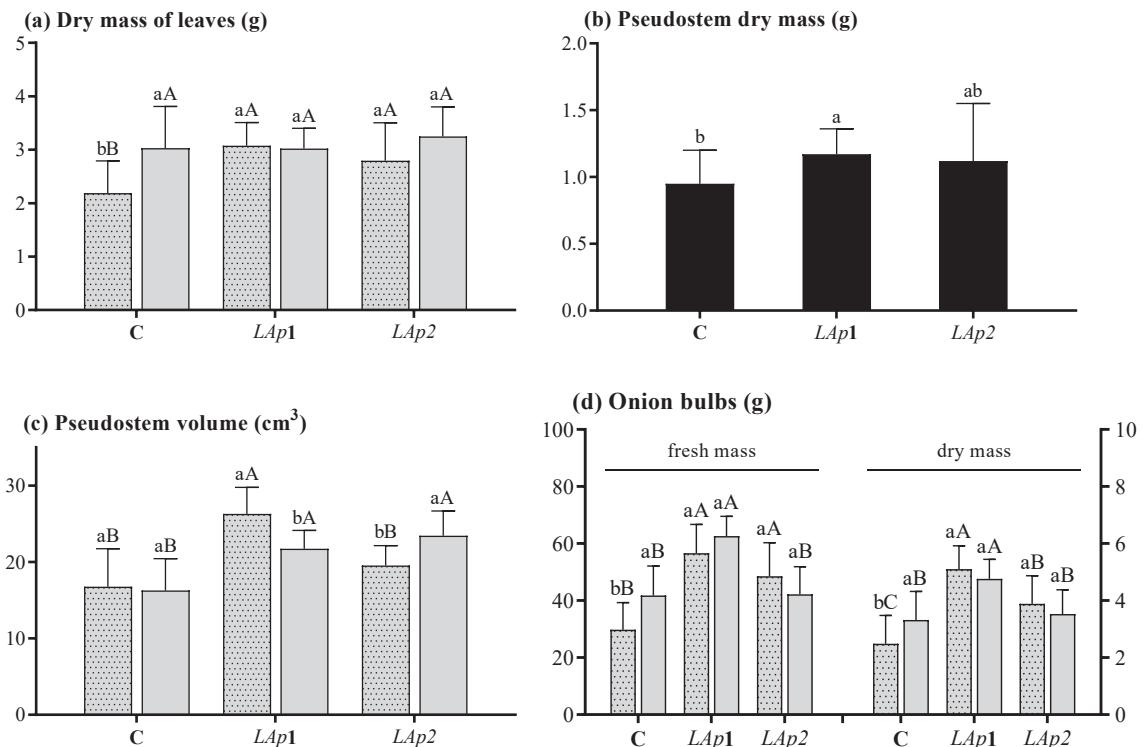


Fig. 5 Y axis: Leaf mass (a), pseudostem dry mass (b), pseudostem volume (c) and bulb fresh and dry mass (d). Application frequency factor (FF): weekly (dotted gray); biweekly (gray). Treatment factor (TF) (black bars): X axis: C (control), LAP1 (1.5 g L^{-1} of Lm + 0.75 g L^{-1} of Ap) and LAP2 (1.5 g L^{-1} of Lm + 1.5 g L^{-1} of Ap). Means followed by the same letter are not statistically different ($p < 0.05$), by Tukey's test. Error bars indicate standard deviation. FF x FT interaction (a, c and d): lower case letters = between frequencies, upper case letters = between treatments.

In the quantification of pigments (Table 2), the levels of chlorophylls *a* and *b* were higher than the control in both frequencies when LAP2 concentration was applied. While the LAP1 concentration was superior to the control only in the fortnightly frequency. The content of total chlorophyll and carotenoids was higher than the control when LAP1 and LAP2 were applied fortnightly.

Table 2 Chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, total chlorophyll and carotenoid content ($\mu\text{g g}^{-1}$) of onion leaves, submitted to control, *LAp1* and *LAp2* application.

($\mu\text{g g}^{-1}$)	Control	<i>LAp1</i>	<i>LAp2</i>
Chlorophyll-a			
Weekly	0.17 \pm 0.021 aB	0.19 \pm 0.023 aAB	0.20 \pm 0.025 aA
Biweekly	0.11 \pm 0.015 bB	0.19 \pm 0.032 aA	0.18 \pm 0.014 bA
Chlorophyll-b			
Weekly	0.087 \pm 0.011 aB	0.086 \pm 0.012 aB	0.111 \pm 0.026 aA
Biweekly	0.058 \pm 0.011 bB	0.091 \pm 0.013 aA	0.089 \pm 0.006 bA
Total chlorophyll			
Weekly	0.267 \pm 0.033 aA	0.273 \pm 0.035 aA	0.298 \pm 0.029 aA
Biweekly	0.177 \pm 0.026 bB	0.282 \pm 0.043 aA	0.276 \pm 0.017 aA
Carotenoid			
Weekly	0.100 \pm 0.013 aA	0.097 \pm 0.018 aA	0.113 \pm 0.019 aA
Biweekly	0.056 \pm 0.007 bB	0.111 \pm 0.014 aA	0.105 \pm 0.011 aA

Interaction between the factors: frequency of application (weekly and biweekly) and treatments (Control, *LAp1* = 1.5 g L⁻¹ of *Lm* + 0.75 g L⁻¹ of *Ap*, *LAp2* = 1.5 g L⁻¹ of *Lm* + 1.5 g L⁻¹ of *Ap*). Means followed by the same letter do not differ statistically ($P \leq 0.05$), by Tukey's test (\pm standard deviation). Uppercase letters = compare lines (treatments). Lower case letters compare columns (frequency).

The content of total sugars in the leaves (Fig. 6a), in the weekly application, was higher than the control in the cultivar 'Alvará'. On the other hand, in the biweekly application, the two cultivars ('Alvará' and 'Perfecta F1') had an increase in the total sugar content. The non-reducing sugars (Fig. 6b) were higher than the control in both cultivars, regardless of the application frequency. The content of reducing sugars (Fig. 6c) was higher than the control at weekly frequency for cultivar 'Alvará' and biweekly for cultivar 'Perfecta F1'. Applications of *LAp* concentrations decreased the content of total free amino acids (Aa) by 8% in the leaves and promoted an increase of 22% of Aa in the bulbs (Fig. 6d).

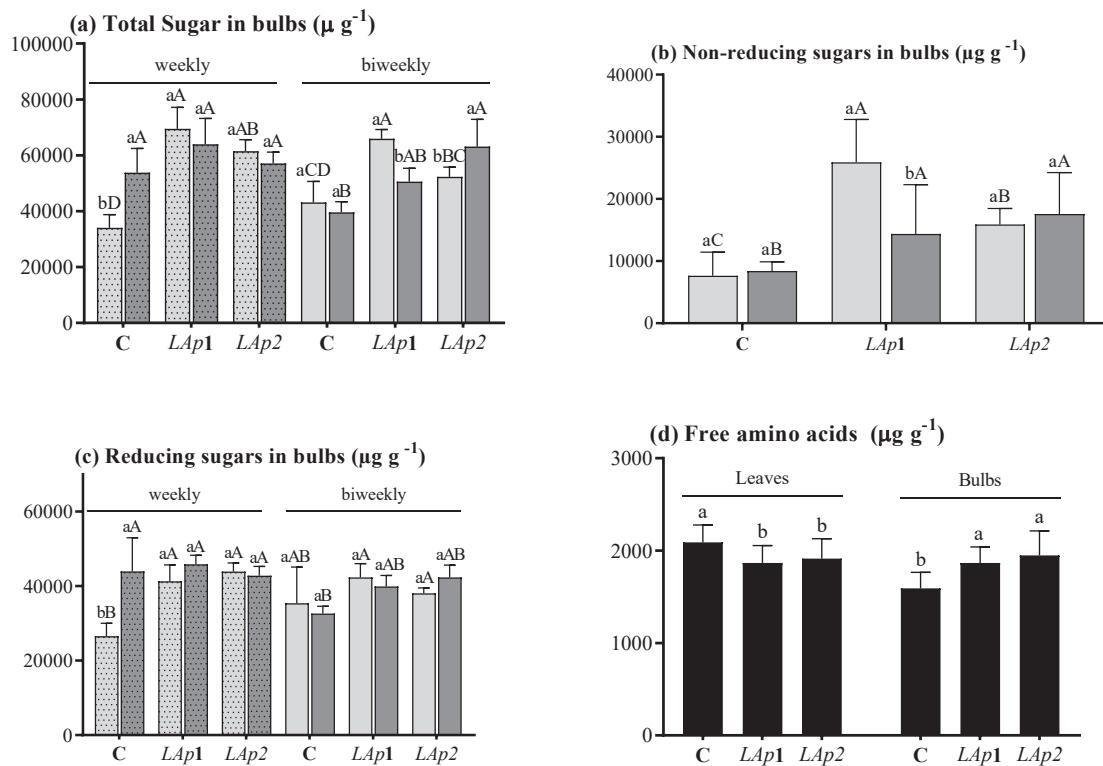


Fig. 6 Y axis: Content of total sugars in bulbs (a), non-reducing sugars in bulbs (b), reducing sugars in bulbs (c) and content of total free amino acids in leaves and bulbs (d). Cultivar factor (CF): light gray = 'Alvará'; dark gray = 'Perfecta F1'. Application frequency factor (FF): weekly (dotted gray); biweekly (gray). Treatment factor (TF) (black bars): X axis: C (control), LAp1 (1.5 g L^{-1} of Lm + 0.75 g L^{-1} of Ap) and LAp2 (1.5 g L^{-1} of Lm + 1.5 g L^{-1} of Ap). Means followed by the same letter do not differ statistically ($p < 0.05$), by Tukey's test. Error bars indicate standard deviation. FC x FF x FT interaction (a and c): lower case letters = among cultivars, upper case letters = among treatments. (b) FC x FT: lower case letters = among cultivars, upper case letters = among treatments.

An interaction among cultivar, frequency, and treatments was found in the activity of the enzyme Nitrate Reductase (Fig.7). The concentrations of LAp applied to cultivar 'Perfecta F1' were higher than the control in both application frequencies, while in 'Alvará' cultivar, the increase in enzyme activity was higher than the control in the weekly LAp1 application.

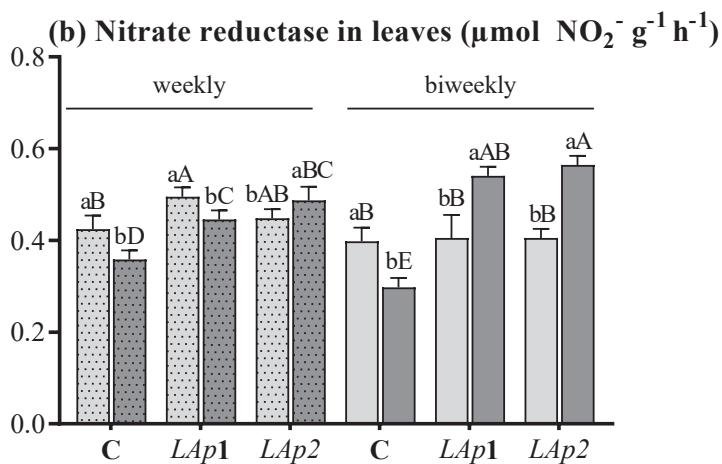


Fig. 7 Y axis: Nitrate reductase enzyme activity in leaves. Cultivar factor (CF): light gray = 'Alvará'; dark gray = 'Perfecta F1'. Application frequency factor (FF): weekly (dotted gray); biweekly (gray). Treatment factor (TF): X axis: C (control), *LAp1* (1.5 g L^{-1} of *Lm* + 0.75 g L^{-1} of *Ap*) and *LAp2* (1.5 g L^{-1} of *Lm* + 1.5 g L^{-1} of *Ap*). Means followed by the same letter are not statistically different ($p < 0.05$), by Tukey's test. Error bars indicate standard deviation. FC x FF x FT interaction: lower case letters = among cultivars, upper case letters = among treatments.

At harvest, the application of *LAp1* promoted an increase of 17% in the level of total sugars in the bulbs (Fig. 8) when the application occurred every two weeks, while the application of *LAp2* promoted an increase of 18% in the concentration of sugars in the bulbs on a weekly frequency. The content of non-reducing sugars (Fig. 8b) increased by 81% in plants treated with *LAp2*, at a weekly frequency. The fortnightly application of *LAp1* promoted an increase of 60% in the non-reducing sugar content. The fortnightly applications of *LAp1* and *LAp2* promoted an increase in the content of reducing sugars, of 28% and 33% in the cultivar 'Alvará', respectively, and a decrease of 59% in the cultivar 'Perfecta F1', in the *LAp2* treatment. The amino acid content in the bulbs showed an increase of 34% in plants treated with *LAp2* at a weekly frequency, and in the fortnightly application of the *LAp1* concentration, an increase of 30% was observed in relation to the control.

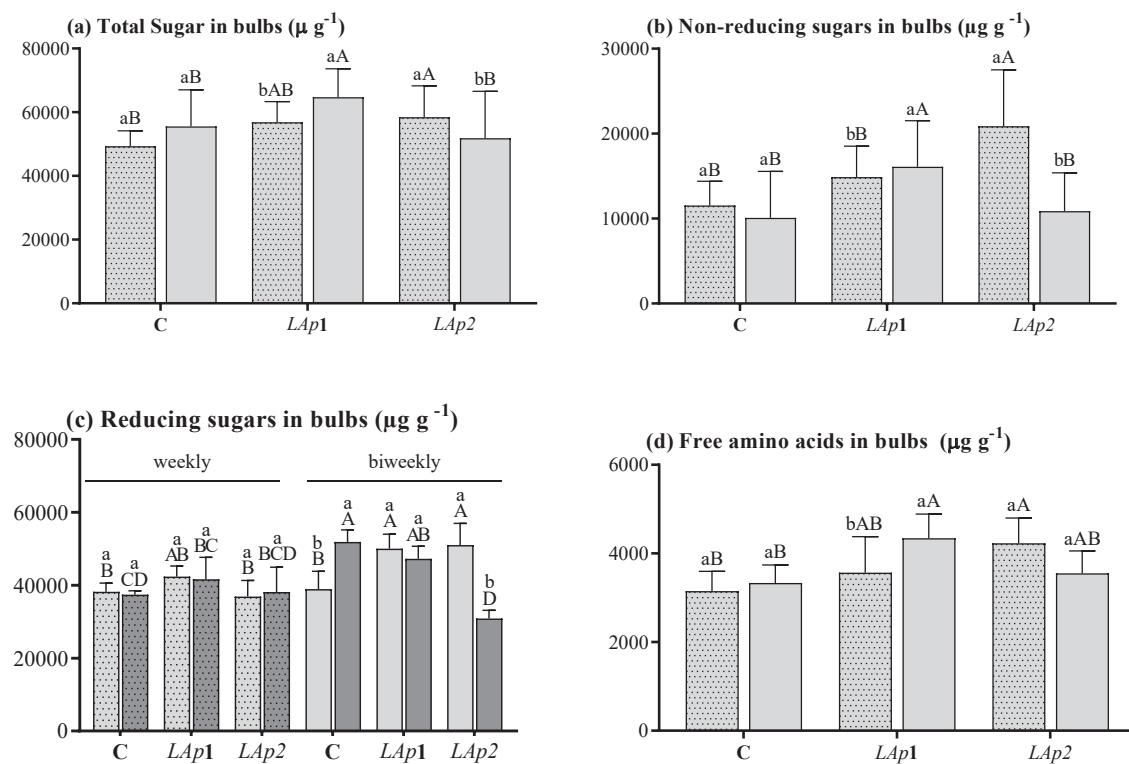


Fig. 8 Y axis: Content of total sugars in bulbs (a), non-reducing sugars in bulbs (b), reducing sugars in bulbs (c) and content of total free amino acids in bulbs (d). Cultivar factor (CF): light gray = 'Alvará'; dark gray = 'Perfecta F1'. Application frequency factor (FF): weekly (dotted gray); biweekly (gray). Treatment factor (TF): X axis: C (control), *LAp1* (1.5 g L^{-1} of *Lm* + 0.75 g L^{-1} of *Ap*) and *LAp2* (1.5 g L^{-1} of *Lm* + 1.5 g L^{-1} of *Ap*). Means followed by the same letter are not statistically different from each other ($p < 0.05$) by Tukey's test. Error bars indicate standard deviation. FF x FT (a, b and d): lower case letters = between frequencies, upper case letters = between treatments. (c) FC x FF x FT: lower case letters = between cultivars, upper case letters = between treatments.

The *LAp1* and *LAp2* foliar applications promoted an increase in onion yield by 14% and 11%, respectively, regardless of cultivar and frequency. These values corresponded to an increase of 4.88 and 4 t ha^{-1} , respectively.

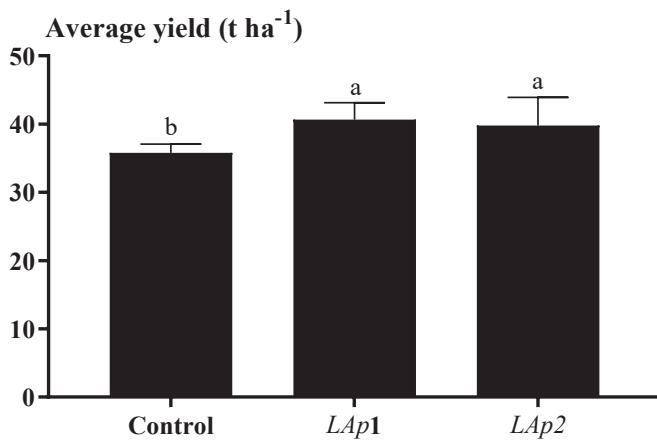


Fig. 9 Y axis: Average yield values. Treatment factor (FT): X axis: control, *LAp1* ($1.5\ g\ L^{-1}$ of *Lm* + $0.75\ g\ L^{-1}$ of *Ap*) and *LAp2* ($1.5\ g\ L^{-1}$ of *Lm* + $1.5\ g\ L^{-1}$ of *Ap*). Means followed by the same letter do not differ statistically ($p < 0.05$), by Tukey's test. Error bars indicate standard deviation.

4.4 DISCUSSION

The association of *Lithothamnium* sp. and *Arthrospira platensis* (*LAp*) presented metabolic effects related to the algal sources combination. The changes in biometric and biochemical variables, and yield gains, may have occurred due to signaling pathways that microalgae can activate in plants (Deviram et al. 2020), resulting in a higher rate of cell division or elongation (Billard et al. 2014; Shahrajabian et al. 2021) probably triggered by free amino acids found in *A. platensis* biomass (Mógor et al. 2018, Ronga et al. 2019) allied to the high auxin-like bioactivity of HA found in *Lithothamnium* (*Lm*) (Amatussi et al. 2020).

The *Lm* application increased the dry mass of onion roots by 57%, while the application of *LAp2* promoted an increase of 124% in relation to the control, showing synergic effect of the algal sources combination, indicating the stimuli to the source-to-sink flow, effect previously reported by Gemin et al. (2019), combining a chlorophyta microalgae with HA obtained from Leonardite mineral.

The results at the bulbs development indicate that there was an accumulation of biomass in the plants that received sprays with *LAp* (Tab. 1). At harvest, results showed that *LAp2* treatment resulted in 20% more accumulation in total sugar content (Fig. 2a) that significantly increased non-reducing sugars (sugars translocated in the phloem), in the weekly application. On the other hand, the increase in reducing sugars (e.g. glucose, fructose) occurred in the *LAp* - fortnightly

application (Fig.8).

According to Bettoni et al. (2016) foliar sprays using HA results in increases of bulb fresh and dry mass by improving total soluble sugars in plans, with yield gains, as also found in this work, taking into account that the calcareous algae micronization process increases the HA availability (Mogor et al 2021), allied to the composition of *A. platensis*, an microalgae rich in bioactive compounds (Ishaq et al. 2016; Mógor et al. 2017; Rachidi et al. 2020; Çelekli et al. 2021) explaining, at less in part, these stimuli in carbon metabolism improving sugar content and resulting in greater onion biomass accumulation and yield.

The results of the *LAp1* and *LAp2* applications improving the content of total free amino acids (Aa) by 40 and 45% respectively (Fig. 2b) indicate the synergy in the algal sources association related to Nitrogen acquisition. The increase in Aa content in onion plants subjected to *Lm* foliar applications could be associated with a greater Nitrogen uptake, which may occur due to the effect of HA on the increase of adventitious roots (Canellas et al. 2015, Mogor et al. 2021) and the activity of the enzyme nitrate reductase (NR) (Zandonadi et al. 2007, Mora et al. 2010)that contribute to the N assimilation process, as presented in Fig. 1c, 2c and 7, with increments in NR activity in onion plants. The activity of NR, an enzyme that reduces nitrate to nitrite, was superior in plants treated with *Lm*, in cultivar 'Alvará'. In 'Perfecta F1', the treatments with the association (*LAp1* and *LAp2*) and algae sources separately (*Lm* and *Ap*) were higher than to the control (Fig. 1c). The application of biostimulants containing HA can regulate important enzymes, such as NR (Mora et al. 2010, Zandonadi et al. 2014), as well as *Ap* applications have already been associated with increased activity of NR, carotenoids, chlorophylls and proteins (Rachidi et al. 2020), as also found in this work.

Foliar application with microalgae has already been reported to influence the translocation of photoassimilates and increase the caliber and mass of onion bulbs (Cordeiro et al. 2022b), red beet hypocotyl (Mógor et al. 2018), potato tubers (Cordeiro et al. 2022a), and tomato (Lara et al. 2022). The data (Fig. 6) indicate that the applications stimulated the source-to-sink flow with sugars and amino acid accumulation in bulbs, justifying the reduction of the contents in leaves at harvest, confirming the effectiveness of the *LAp* association.

These stimuli to the translocation of photoassimilates from the source (leaf) to the sink (bulbs), providing an increase in the diameter of the bulbs, was well characterized by the yield gains over two seasons (Fig.3 and 9).

An increase in onion bulb yield after the application of HA associated with microalgae biomass has already been reported (Gemin et al. 2019), relating the gain in yield to the increase in the efficiency of carbon metabolism, as also verified in the present work, by improves on total chlorophyll and carotenoids contents in leaves under biweekly *LAp* sprays (Tab.2) and sugars improvements at different time collections by *LAp* (Fig.2,6 and 8).

These findings show the complexity of the mechanisms of action of both algal sources and the need to understand which phenological stage is the most suitable for application and the concentration of maximum efficiency. Thus, through three experiments, were identified that the foliar sprays with the association of micronized *Lithothamnium* sp and *Arthrospira platensis* was synergic, promoting plant growth, improving the pigments content, total free amino acids, and NR activity in the leaves, also total free amino acids and total sugar content in the bulbs and increase the yield of onion by two seasons over the algal sources applied separately.

4.5 CONCLUSIONS

The foliar sprays of the association of micronized *Lithothamnium* sp calcareous alga and *Arthrospira platensis* (*LAp*) allowed uniting different mechanisms of action, increasing plant growth, stimulating plant metabolism increasing yield. Although some variables were dependent on application frequency or cultivar, the both combinations of *LAp* (*LAp1* and *LAp2*) increased yield for both cultivars and at both application frequencies. Therefore, biweekly application is a more economical option to promote onion yield gains in a nature friendly way.

Acknowledgments

The Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the scholarship granted (Code 001) to the first author.

REFERENCES

- Amatucci JO, Mógor ÁF, Mógor G, de Lara GB (2020) Novel use of calcareous algae as a plant biostimulant. *J Appl Phycol* 32:2023–2030. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02077-5>
- Arioli T, Mattner SW, Winberg PC (2015) Applications of seaweed extracts in Australian agriculture: past, present and future. *J Appl Phycol* 27:2007–2015. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0574-9>.
- Bayona-Morcillo PJ, Plaza BM, Gómez-Serrano C, Rojas E, Jiménez-Becker S (2020) Effect of the foliar application of cyanobacterial hydrolysate (*Arthrospira platensis*) on the growth of Petunia x hybrida under salinity conditions. *J Appl Phycol* 32:4003–4011. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02192-3>
- Bettoni MM, Mogor AF, Pauletti V, Goicoechea N, Aranjuelo I, Garmendia I (2016). Nutritional quality and yield of onion as affected by different application methods and doses of humic substances. *Journal of Food Composition and Analysis* v. 51, p. 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.06.008>
- Billard V, Etienne P, Jannin L, Garnica M, Cruz F, Garcia-Mina JM, Yvin JC, Ourry A (2014) Two biostimulants derived from algae or humic acid induce similar responses in the mineral content and gene expression of winter oil seed rape (*Brassica napus* L.). *J Plant Growth Regul* 33:305–316. <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9372-2>
- Canellas LP, Canellas NOA, Silva ILES, Olivares FL, Piccolo A (2020) Plant chemical priming by humic acids. *Chem Biol Technol Agric* 7:12. <https://doi.org/10.1186/s40538-020-00178-4>
- Canellas LP, Olivares FL, Aguiar NO, Jones DL, Nebbioso A, Mazzei P, Piccolo A (2015) Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Sci Hortic (Amsterdam)* 196:15–27. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.013>
- Çelekli A, Gün D, Bozkurt H (2021) Bleaching of olive pomace oil with *Spirulina platensis* as an eco-friendly process. *Algal Res* 54:102210. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102210>
- Colla, G.; Nardi, S.; Cardarelli, M.; Ertani, A.; Lucini, L.; Canaguier, R.; Rouphael, Y. Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture, *Scientia Horticulturae*, v. 196, 2015, p.28-38, doi. 10.1016/j.scienta.2015.08.037
- Colla G, Rouphael Y (2020) Microalgae: New Source of Plant Biostimulants. *Agronomy* 10:1240. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091240>
- Cordeiro ECN, Mógor ÁF, Amatucci JO, Mogor G, Marques HMC, de Lara GB (2022a) Microalga biofertilizer improves potato growth and yield, stimulating amino acid metabolism. *J Appl Phycol* 34:385–394. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02656-0>

Cordeiro ECN, Mógor ÁF, Amatussi JO, Mógor G, de Lara GB, Marques HMC (2022b) Microalga Biofertilizer Triggers Metabolic Changes Improving Onion Growth and Yield. *Horticulturae* 8:223. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8030223>

Deviram G, Mathimani T, Anto S, Ahamed TS, Ananth DA, Pugazhendhi A (2020) Applications of microalgal and cyanobacterial biomass on a way to safe, cleaner and a sustainable environment. *J Clean Prod* 253:119770. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119770>

Esper Neto M, Zampar ÉJDO, Cordioli VR, Cassim BMAR, Dias GAR, Inoue TT, Batista MA (2020) Biogenic and common lime characterization in granular and powder forms and their application in sowing furrows for soybean crops. *Commun Soil Sci Plant Anal* 51:1382–1390. <https://doi.org/10.1080/00103624.2020.1781157>

Gemin LG, Mógor ÁF, Amatussi JO, Mógor G (2019) Microalgae associated to humic acid as a novel biostimulant improving onion growth and yield. *Sci Hortic* (Amsterdam) 256:108560. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108560>

Gemin, LG, Mógor ÁF, Amatussi JO, De Lara GB, Mógor G (2022) Organic onion growth, yield and storage improved by foliar sprays of microalgae and fulvic acid as a natural biofertilizer. *Bioscience Journal.* 38, e38045. <https://doi.org/10.14393/BJ-v38n0a2022-58854>

Godlewska K, Michalak I, Pacyga P, Baśladyńska S, Chojnacka K (2019) Potential applications of cyanobacteria: *Spirulina platensis* filtrates and homogenates in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* 35:80. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2653-6>

Ishaq AG, Peralta M, Basri HM (2016) Bioactive Compounds from Green Microalga – *Scenedesmus* and its Potential Applications: A Brief Review. *Agric Sci* 39:1–16

Jaworski EG (1971) Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 43:1274–1279. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(71\)80010-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(71)80010-4)

Lara GB de, Mógor Á, Amatussi JO, Cordeiro ECN, Marques HMC, Mógor G (2022) Microalga improve the growth, yield, and contents of sugar, amino acid, and protein of tomato. *Ciência e Agrotecnologia* 46:. <https://doi.org/10.1590/1413-7054202246023821>

Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods Enzymol* 148:350–382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)

Lichtenthaler HK, Buschmann C (2001) Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Curr Protoc Food Anal Chem* 1:F4.3.1-F4.3.8. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>

Magné C, Larher F (1992) High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Anal Biochem* 200:115–118. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90285-F](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90285-F)

Maldonade I, R., Patrícia GBC, A. Ferreira N (2013) Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS. Comun Tec 1–4

Mazepa E, Malburg B V., Mógor G, de Oliveira AC, Amatussi JO, Corrêa DO, Lemos JS, Ducatti DRB, Duarte MER, Mógor ÁF, Noseda MD (2021) Plant growth biostimulant activity of the green microalga *Desmodesmus subspicatus*. Algal Res 59:102434. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102434>

Mógor AF, Amatussi JO, Mógor G, Gemin LG (2021) Biostimulant action of *Lithothamnium* sp. promoting growth, yield, and biochemical and chemical changes on onion. J Appl Phycol 33:1905–1913. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02394-3>

Mógor ÁF, Amatussi JO, Mógor 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 09:966–978. <https://doi.org/10.4236/ajps.2018.95074>

Mógor ÁF, Ördög V, Lima GPP, Molnár Z, Mógor G (2017) Biostimulant properties of cyanobacterial hydrolysate related to polyamines. J Appl Phycol 30:453–460. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1242-z>

Mógor G, Mógor ÁF, Lima GPP, Oliveira RA, Bespalhok JCF (2022) Metabolic Changes in Sugarcane Bud Sprouting Stimulated by Microalga *Asterarcys quadricellulare*. Sugar Tech 24:930–940. <https://doi.org/10.1007/s12355-022-01111-9>

Mora V, Bacaicoa E, Zamarreño AM, Aguirre E, Garnica M, Fuentes M, García-Mina, JM (2010) Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. J Plant Physiol 167:633–642. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.11.018>

Plaza BM, Gómez-Serrano C, Acién-Fernández FG, Jimenez-Becker S (2018) Effect of microalgae hydrolysate foliar application (*Arthrospira platensis* and *Scenedesmus* sp.) on Petunia x hybrida growth. J Appl Phycol 30:2359–2365. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1427-0>

Price ML, Butler LG (1977) Rapid Visual Estimation and Spectrophotometric Determination of Tannin Content of Sorghum Grain. J Agric Food Chem 25:1268–1273. <https://doi.org/10.1021/jf60214a034>

Rachidi F, Benhima R, Sbabou L, El Arroussi H (2020) Microalgae polysaccharides bio-stimulating effect on tomato plants: Growth and metabolic distribution. Biotechnol Reports 25:e00426. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00426>

Reichert CC, Reinehr CO, Costa JAV (2006) Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. Brazilian J Chem Eng 23:23–28. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322006000100003>

- Rodrigues Neto J, Pereira DP, Torres JLR, Carvalho FJ, Charlo HCO (2021) Potassium sources and calcium and magnesium doses in carrot crop fertilization. *Hortic Bras* 39:127–132. <https://doi.org/10.1590/s0102-0536-20210201>
- Ronga D, Biazz E, Parati K, Carminati D, Carminati E, Tava A (2019) Microalgal Biostimulants and Biofertilisers in Crop Productions. *Agronomy* 4: 192. <https://doi.org/10.3390/agronomy9040192>
- Rouphael Y, Colla G (2018) Synergistic biostimulatory action: Designing the next generation of plant biostimulants for sustainable agriculture. *Front Plant Sci* 871:1655. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.01655/BIBTEX>
- Shahrajabian MH, Chaski C, Polyzos N, Petropoulos SA (2021) Biostimulants application: A low input cropping management tool for sustainable farming of vegetables. *Biomolecules* 11
- Silva F de AS e, Azevedo CAV de (2016) The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *African J Agric Res* 11:3733–3740. <https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11522>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.10.012>
- Tarakhovskaya ER, Maslov YI, Shishova MF (2007) Phytohormones in algae. *Russ. J. Plant Physiol.* 54:163–170
- Trabelsi L, M'sakni NH, Ben Ouada H, et al (2009) Partial characterization of extracellular polysaccharides produced by cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Biotechnol Bioprocess Eng* 14:27–31. <https://doi.org/10.1007/s12257-008-0102-8>
- Winters AL, Lloyd JD, Jones R, Merry RJ (2002) Evaluation of a rapid method for estimating free amino acids in silages. *Anim Feed Sci Technol* 99:177–187. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(02\)00112-8](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(02)00112-8)
- Zandonadi DB, Canellas LP, Façanha AR (2007) Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. *Planta* 225:1583–1595. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0454-2>
- Zandonadi DB, Santos MP, Medici LO, Silva J (2014) Ação da matéria orgânica e suas frações sobre a fisiologia de hortaliças. *Hortic Bras* 32:14–20. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362014000100003>
- Zarrouk C (1966) Contribution a l'étude d'une cyanobactérie: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setchell et Gardner). PhD thesis, University of Paris, France.

5 CONCLUSÕES GERAIS

A aplicação da alga calcária *Lithothamnium* micronizado, reconhecida fonte de ácido húmico (AH), indicaram resultados eficientes na promoção do enraizamento de plantas de *V. radiata*, e a aplicação de *Arthrospira platensis* promoveu maior diferenciação celular em cotilédones de pepino. A associação destes diferentes mecanismos de ação, alga calcária e cianobactéria, potencializaram a germinação de tomate (*LAp2*).

O crescimento inicial de batata foi aumentado pela aplicação de *Lm*. A aplicação de *LAp2* promoveu maior translocação de açúcares da fonte para o dreno, aumentando a produtividade de batata no campo.

No crescimento inicial de plantas de cebola conduzidas em vaso, *Lm* e *LAp2* aplicados via foliar incrementaram 57% e 124%, respectivamente, na massa seca de raízes. Além disso, as aplicações aumentaram a atividade da enzima nitrato redutase (NR).

No campo, as plantas submetidas à aplicação com *LAp2* acumularam 20% a mais de açúcares totais nos bulbos (Fig. 2a), ocasionando um aumento na produtividade de 20%. A aplicação via foliar da associação de *LAp* influenciou os teores dos pigmentos, açúcares, aminoácidos, atividade da NR e, consequentemente, no incremento na produtividade. No segundo ano de cultivo no campo, a aplicação de *LAp1* promoveu aumento de 17% de açúcares totais nos bulbos quando a aplicação ocorreu quinzenalmente, enquanto a aplicação de *LAp2* promoveu incremento de 18% na concentração de açúcares nos bulbos na frequência semanal. A aplicação via foliar de *LAp1* e *LAp2* promoveram o aumento da produtividade de cebolas em 14% e 11 % respectivamente, independente da cultivar e da frequência aplicada.

Assim, a aplicação via foliar da associação da alga calcária *Lithothamnium* sp. micronizado e *A. platensis* (*LAp*) pode ser considerada um potencial biofertilizante. A bioatividade de *Lithothamnium* está associada à presença de substâncias húmicas na alga e ao seu efeito auxínico, enquanto *A. platensis* apresentou concentração significativa de aminoácidos. Além disso, considerando todos os resultados obtidos neste trabalho, a aplicação de *LAp* em plantas de batata e cebola propiciou identificar diferentes mecanismos de ação, aumentando o

crescimento das plantas, influenciando na fisiologia vegetal, especialmente por meio do metabolismo do N, e, consequentemente, no aumento da produtividade.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As pesquisas associando diferentes algas e microalgas ainda são incipientes. Todavia, há um potencial imenso devido as moléculas identificadas nessas algas e microalgas aplicadas na agricultura de forma isolada. O uso de *Lithothamnium* sp micronizado aplicado via foliar na agricultura é recente, com os primeiros trabalhos em 2020 e 2021, anteriormente era um produto utilizado principalmente como corretivo de acidez e na alimentação animal. Quanto à cianobactéria *A. platensis*, seu uso é associado ao seu alto conteúdo proteico, especialmente na suplementação alimentar.

Devido às baixas concentrações utilizadas nesta pesquisa, a aplicação de *Lithothamnium* sp micronizado (*Lm*) deve ter uma compreensão além do cálcio e do magnésio, como uma fonte de moléculas bioativas que no seu conjunto promovem alterações no metabolismo vegetal. Possivelmente em *Lm* isso se deve a presença de ácido húmico altamente bioativo e pela presença de poliaminas em *A. platensis*.

Foram observadas melhorias na atividade da enzima nitrato redutase em plantas de cebola, e consequentemente assimilação de nitrogênio. Essas respostas encontradas sobre *Lm* e *Ap* aplicadas de forma isoladas e associadas mostraram incremento nos teores de açúcares, aminoácidos e pigmentos, bem como bioatividades similares aos efeitos da auxina e da citocinina nas plantas.

A associação da alga calcária e cianobactéria pode ser considerada como potencial biofertilizante para plantas de interesse agronômico.

Estudar a associação dessas algas contribuiu para entender como diferentes mecanismos de ação podem atuar de formas diferentes nos estádios fenológicos das plantas. A partir disso, evidencia-se a importância da continuidade das pesquisas com essas algas, como detalhamento na atuação dessas moléculas dentro das células por meio de microscopia eletrônica, e identificação dos genes que atuam na sinalização, assim como entender a atuação da associação de *Lm* e *Ap* em outras culturas de interesse agronômico.

REFERÊNCIAS

- ALI N., FARRELL A., RAMSUBHAG A., JAYARAMAN J. The effect of *Ascophyllum nodosum* extract on the growth, yield and fruit quality of tomato grown under tropical conditions. *Journal of Applied Phycology*, v. 28, p. 1353–1362, 2016.
- AMATUSSI, J. O.; MÓGOR, A. F.; LARA, G.B.;MÓGOR, G. Novel use of calcareous algae as a plant biostimulant. *Journal of Applied Phycology*, v. 32, p. 2023-2030, 2020.
- BETTONI, M. M. et al. Nutritional quality and yield of onion as affected by different application methods and doses of humic substances. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 51, p. 37-44, 2016.
- BILLARD V, ETIENNE P, JANNIN L, GARNICA M, CRUZ F, GARCIA-MINA JM, YVIN JC, OURRY A. Two biostimulants derived from algae or humic acid induce similar responses in the mineral content and gene expression of winter oil seed rape (*Brassica napus* L.). *J Plant Growth Regul* 33:305–316. 2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 61, de 8 de julho de 2020a. Estabelece as regras sobre definições, exigências, especificações, garantias, tolerâncias, registro, embalagem e rotulagem dos fertilizantes orgânicos e dos biofertilizantes, destinados à agricultura. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 8 jul. de 2020.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020 (2020b). Institui o Programa Nacional de Bioinsumos e o Conselho Estratégico do Programa Nacional de Bioinsumos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 26 mai. de 2020.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 46, de 6 de outubro de 2011. Estabelece o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção, bem como as listas de substâncias e práticas permitidas para uso nos Sistemas Orgânicos de Produção. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 6 out. de 2011.
- BRASIL. Decreto 4.954 de 14 de janeiro de 2004. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Altera o Anexo ao Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004, que aprova o Regulamento da Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, ou biofertilizantes, remineralizadores e substratos para plantas destinados à agricultura. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 14 jan. de 2004.
- CANELLAS, L. P.; TEIXEIRA J. L. R. L.; DOBBSS, L. B.; SILVA, C. A.; MÉDICI, L. O.; ZANDONADI, D. B. E FAÇANHA, A. R. Humic acids crossinteractions with root and organic acids. *Annals of Applied Biology*, v. 153, p. 157-166, 2008.
- CANELLAS, L. P. et al. Plant chemical priming by humic acids. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 7, n. 12, p. 1-17, 2020.

CANELLAS, L. P. et al. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, v. 196, p. 15-27, 2015.

CANELLAS, L.P.; OLIVARES, F.L.; SILVA, R.M.; CANELLAS, N.A.; MÓGOR, A.F. Substâncias húmicas como Biofertilizantes. In: Mógor AF; Mógor, G. (Org.) Aminoácidos, extratos de algas, extratos vegetais e substâncias húmicas como biofertilizantes. Pecege Editora, Piracicaba, SP. 2022. 174p.

CARVALHO, M. E. A. et al. Is seaweed extract an elicitor compound? Changing proline content in drought-stressed bean plants. *Comunicata Scientiae*, v. 9, n. 2, p. 292-297, 2018.

CAVALCANTI, V.M.M. Plataforma continental: a última fronteira da mineração brasileira. DNPM, Brasília, DF. 2011. 104 p. Gilberto, T.M. Granulados bioclásticos – algas calcárias. Dias. *Brazilian Journal of Geophysics*, 18(3), 2000.

ÇELEKLI A., GÜN D., BOZKURT H. Bleaching of olive pomace oil with Spirulina platensis as an eco-friendly process. *Algal Res* 54:102210. 2021.

CONSELVAN, G. B.; PIZZEGHELLO, D.; FRANCIOSO, O.; DI FOGGIA, M.; NARDI, S.; & CARLETTI, P. Biostimulant activity of humic substances extracted from leonardites. *Plant and Soil*, 420(1-2), 119-134, 2017.

CORDEIRO E. C. N., MÓGOR Á. F., AMATUSSI J. O., MOGOR G., MARQUES H. M. C., DE LARA G. B. Microalga biofertilizer improves potato growth and yield, stimulating amino acid metabolism. *Journal of Applied Phycology* 34:385–394. 2022a

CORDEIRO E. C. N., MÓGOR Á. F., AMATUSSI J. O., MÓGOR G., DE LARA G. B., MARQUES H. M. C. Microalga Biofertilizer Triggers Metabolic Changes Improving Onion Growth and Yield. *Horticulturae* 8:223. 2022b

COSTA AC, RAMOS JD, DOS REIS SILVA FO, ET AL (2015) Adubação orgânica e Lithothamnium no cultivo da pitaia vermelha. *Semin Agrar* 36:77–88. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n1p77>

DAUR, I.; BAKHASHWAIN, A. A. Effect of humic acid on growth and quality of maize fodder production. *Pakistan Journal of Botany*, v. 45, n. 1, p. 21-25, 2013.

DE BORBA, M. C.; DE FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J. Ulvan enhances seedling emergence and reduces Fusarium wilt severity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Crop Protection*, v. 118, p. 66-71, 2019.

DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural* [online]. 2006, v. 36, n. 6 pp. 1959-1967. Epub 06 Nov 2006.

DIAS, G. T. M. Granulados bioclásticos: algas calcárias. *Revista Brasileira de Geofísica*, v. 18, n. 3, p. 307-318, 2001.

DINESHKUMAR, R.; SUBRAMANIAN, J.; ARUMUGAM, A.; AHAMED RASHEEQ, A.; SAMPATHKUMAR, P. Exploring the microalgae biofertilizer effect on onion cultivation by field experiment. *Waste and Biomass Valorization*, 11(1), 77-87. 2019.

ESPER NETO M., ZAMPAR ÉJDO, CORDIOLI V.R., et al. Biogenic and Common Lime Characterization in Granular and Powder Forms and Their Application in Sowing Furrows for Soybean Crops. *Commun Soil Sci Plant Anal* 51:1382–1390. 2020.

EVANGELISTA A.W.P., SÁ A.R.M., ALVES J., JOSÉ C., DERBLAI L., WILSON M., E SOUZA J.L.M. DE. Irrigation and lithothamnium fertilization in bell pepper cultivated in organic system. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 20, n. 9, p. 830-835. 2016.

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

FREITAS, M.B; PAULERT, R. ; RIBEIRO,C. F.; BORBA,M. C.; ALINE C. VELHO, A.C. E STADNIK, M.J. Extratos de macroalgas marinhas como biofertilizantes. In: Mógor AF; Mógor, G. (Org.) Aminoácidos, extratos de algas, extratos vegetais e substâncias húmicas como biofertilizantes. Pecege Editora, Piracicaba, SP. 2022. 174p.

GEMIN, L. G. et al. Microalgae associated to humic acid as a novel biostimulant improving onion growth and yield. *Scientia Horticulturae*, v. 256, 2019.

GEMIN, L. G. MÓGOR, Á. F.; AMATUSSI, J. D. O.; LARA, G. B.; MÓGOR, G.. Organic onion growth, yield and storage improved by foliar sprays of microalgae and fulvic acid as a natural biofertilizer. *Bioscience Journal*. 2022, 38, e38045.

GODLEWSKA, K. et al. The effect of plant-derived biostimulants on white head cabbage seedlings grown under controlled conditions. *Sustainability*, v. 11, n. 5317, 2019.

HAFLE, O. M.; SANTOS, V. A. D.; RAMOS, J. D., CRUZ, M. D. C.; MONTEIRO D, E MELO, P. C. Produção de mudas de mamoeiro utilizando Bokashi e Lithothamnium. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 31, n. 1, p. 245-251. 2009.

HERNÁNDEZ-HERRERA, R. M. et al. Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Applied Phycology*, v. 26, n. 1, p. 619–628, 2014.

HUSSEIN, M. H. et al. Seaweed extracts as prospective plant growth bio-stimulant and salinity stress alleviator for *Vigna sinensis* and *Zea mays*. *Journal of Applied Phycology*, v. 33, n. 2, 2021.

HUSSEIN, N. M. et al. Effect of two plant extract and four aromatic oils on *Tuta absoluta* population and productivity of tomato cultivar gold stone. *Journal of Plant Protection and Pathology*, v. 6, n. 6, p. 969-985, 2015.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (2022a). Produção Agrícola de batata. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/batata/pr>

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (2022b). Produção Agrícola de cebola. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/cebola/pr>

ISHAQ, A. G; MATIAS-PERALTA H. M.; BASRI, H. (2016). Bioactive compounds from green microalga-*Scenedesmus* and its potential applications: a brief review. *Pertanika J Trop Agric Sci* 39:1–16.

KASEKER J. F., BASTOS M. C., CONSALTER R. L., E MÓGOR Á. F. Alteração do crescimento e dos teores de nutrientes com utilização de fertilizante organomineral em cenoura. *Revista Ceres*, v. 61, n. 6, p. 964-969. 2014.

KHAN, W. et al. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 28, n. 4, p. 386-399, 2009.

LARA, G.B.; MÓGOR, Á; AMATUSSI, J.O.; CORDEIRO, E.C.N.; MARQUES, H.M.C., MÓGOR, G. Microalga improve the growth, yield, and contents of sugar, amino acid, and protein of tomato. *Ciência e Agrotecnologia* 46:. 2022

MALA, R. et al, (2017). Agronomic Biofortification of Amaranthus dubius with Macro Nutrients and Vitamin A. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 225. 012214. 10.1088/1757-899X/225/1/012214.

MALLET, A. C. T. et al. Chemical characterization of the Allium sativum and Origanum vulgare essential oils and their inhibition effect on the growth of some food pathogens. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 16, n. 4, p. 804-811, 2014.

MARQUES, H. M. C.; CORDEIRO, E. C. . N.; AMATUSSI, J. de O.; LARA, G. B. de; MÓGOR, G.; NEDILHA, L. C. B. M.; MÓGOR, Átila F. Mitigation of water restriction effects on soybean with biofertilizer: metabolic and stomatal conductance changes. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 11, p. e11101119377, 2022.

MELO, P.C.; FURTINI NETO, A.E. Avaliação do *Lithothamnium* como corretivo da acidez do solo e fonte de nutrientes para o feijoeiro. *Revista Ciência e Agrotecnologia*, v. 27, n. 03, p. 508-519. 2003.

MELO T. V., FERREIRA R. A., OLIVEIRA V. C., CARNEIRO J. B. A., MOURA A. M. A., SILVA C. S., HURTADO NERY V. L. Calidad del huevo de codornices utilizando harina de algas marinas y fosfato monoamonico. *Archivos de Zootecnia*, v. 57, n. 219, p.313-319. 2008.

MENDONCA, V.; ORBES, M. Y.; ARRUDA, N. A. A.; RAMOS, J. D.; TEIXEIRA, G. A.; SOUZA, H. A. Qualidade de mudas de maracujazeiro-amarelo formadas em substratos com diferentes níveis de *Lithothamnium*. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 30, p. 900-906. 2006.

MÓGOR, A.F., AMATUSSI, J.O., MÓGOR, GEMIN, L. G. Biostimulant action of Lithothamnium sp. promoting growth, yield, and biochemical and chemical changes on onion. *Journal of Applied Phycology*, 33: 1905–1913, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02394-3>

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

MÓGOR, A. F. et al. Bioestimulant properties of cyanobacterial hydrolysate related to polyamines. *Journal of Applied Phycology*, v. 30, n. 2, p. 453-460, 2017.

MÓGOR, A. F.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D.; MÓGOR, G. Aplicação foliar de extrato de alga, ácido L-glutâmico e cálcio em feijoeiro. *Scientia Agraria*, v. 9, n. 4, p.431-437. 2008.

MÓGOR, A.F. Biofertilizantes e bioestimulantes: no que diferem? “Esclarecimento importante para o setor produtivo”. p. 31. Anuário brasileiro de tecnologia em nutrição vegetal. Abisolo – Associação brasileira das indústrias de tecnologia em nutrição vegetal. 2018.

MÓGOR, A.F.; AMATUSSI, J.O.; MÓGOR, G. *Lithothamnium*: além do cálcio e magnésio. p. 74. Anuário brasileiro de tecnologia em nutrição vegetal. Abisolo – Associação brasileira das indústrias de tecnologia em nutrição vegetal. 2022.

MÓGOR, G.; AMATUSSI, J.O.; CORDEIRO, E.C.N. Bioensaios e determinações bioquímicas na avaliação da bioatividade de biofertilizantes. In: Mógor AF; Mógor, G. (Org.) Aminoácidos, extratos de algas, extratos vegetais e substâncias húmicas como biofertilizantes. Pecege Editora, Piracicaba, SP. 2022. 174p.

NARDI, S. et al. Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. *Scientia Agricola*, v. 73, n. 1, p. 18-23, 2016.

PAULERT, R. et al. Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Plant Diseases and Protection*, v. 116, n. 6, p. 263-270, 2009.

PEREIRA AS; BERTONCINI O; SILVA GO; CASTRO CM; GOMES CB; HIRANO E; BORTOLETTO AC; MELO PE; MEDEIROS CAB; TREPTOW RO; DUTRA LF; LOPES CA; NAZARENO NRX; LIMA MF; CASTRO LAS; KROLOW ACR; SUINAGA FA; REISSER JUNIOR C. 2013. BRS Clara: cultivar de batata para mercado fresco, com resistência à requeima. *Horticultura Brasileira* 31: 664-668.

PLAZA, B.M.; GÓMEZ-SERRANO C.; ACIÉN-FERNÁNDEZ F.G.; JIMENEZ-BECKER, S. (2018) Effect of microalgae hydrolysate foliar application (*Arthrospira platensis* and *Scenedesmus* sp.) on *Petunia x hybrida* growth. *Journal of Applied Phycology*, 30:2359–2365.

RACHIDI, F. et al. Microalgae polysaccharides bio-stimulating effect on tomato plants: growth and metabolic distribution. *Biotechnology Reports*, v. 25, p. 1-8, 2020.

RÖDER, C. et al. Potato yield and metabolic changes by use of biofertilizer containing L-glutamic acid. *Comunicata Scientiae*, v. 9, n. 2, p. 211-218, 2018.

RODRIGUES NETO J., PEREIRA D.P., TORRES J.L.R., et al (2021) Potassium sources and calcium and magnesium doses in carrot crop fertilization. *Hortic Bras* 39:127–132.

SHUKLA, P. S. et al. *Ascophyllum nodosum*-based biostimulants: sustainable applications in agriculture for the stimulation of plant growth, stress tolerance, and disease management. *Frontiers in Plant Science*, v. 10, p. 655, 2019.

SINGH, J.S., et al. Cyanobacteria: a precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 529, 2016.

SOUZA, H. A.; MENDONÇA, V.; RAMOS, J. D.; FERREIRA, E. A.; ALENCAR, R. D. Doses de *lithothamnium* e diferentes substratos na produção de mudas de maracujazeiro doce. *Revista Caatinga*, Mossoró, v. 20, n. 4, p. 24-30. 2007.

SOUZA, H. A.; RAMOS, J. D.; MELO, P. C.; HAFLE, O. M.; RODRIGUES, H. C. A.; SANTOS, V. A. Evaluation of doses and acidity corrector products in biometrics characteristics in production of passion fruit seedlings. *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 31, n. 4, p. 607-612. 2009.

STADNIK, M.J.; ASTOLFI, P.; DE FREITAS, M.B. Bioestimulantes: uma perspectiva global e desafios para a América Latina. In: Simpósio Latino-Americano sobre Bioestimulantes na Agricultura. Anais [...]. Florianópolis, SC: CCA-UFSC, 2017. p.18-21.

STIRK, W. A. et al. Abscisic acid, gibberellins and brassinosteroids in Kelpak®, a commercial seaweed extract made from *Ecklonia maxima*. *Journal of Applied Phycology*, v. 26, n. 1, p. 561-567, 2014.

STIRK, W.A.; ÖRDÖG, V.; NOVÁK, O.; ROLČÍK, J.; BÁLINT, M.S.P.; STADEN, J. V. Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains. *J. Phycol.* 49, 459-467, 2013.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA). Universidade de São Paulo (USP). Food Research Center (FoRC). Versão 7.2. São Paulo, 2022.

VIDAL, M.C.; AMARAL, D.F.S.; NOGUEIRA, J.D.; MAZZARO, M.A.T.; LIRA, V.M.C.; Bioinsumos: a Construção de um Programa Nacional pela Sustentabilidade do Agro Brasileiro. *Economic Analysis of Law Review (EALR)*, V. 12, nº 3, p. 557-574, Set-Dez, 2021

VIRMOND, E.P.; KAWAKAMI, J.; VONCIK, K.S.; CÓRDOVA, K.R.V.; SLOMPO, P.J.H. Características físico-químicas de cultivares de batata sob cultivo orgânico. Ambiência Guarapuava (PR) v.10 n.1 p. 31 - 42 Jan./Abr. 2014

ZANDONADI, D. B.; SANTOS, M. P.; MEDICI, L. O.; SILVA, J. Ação da matéria orgânica e suas frações sobre a fisiologia de hortaliças. *Horticultura Brasileira*, v. 32, p. 14-20. 2014.