

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *MONORAPHIDIUM* SP. (CCMA-UFSCAR-664) E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOESTIMULANTE NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DO TOMATE-CEREJA (*SOLANUM LYCOPERSICUM* VAR. *CERASIFORME*) VIA APLICAÇÃO FOLIAR

Giovanna Santos Rodrigues Silva

**Jaboticabal, SP
2025**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *MONORAPHIDIUM* SP. (CCMA-UFSCAR-664) E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOESTIMULANTE NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DO TOMATE-CEREJA (*SOLANUM LYCOPERSICUM* VAR. *CERASIFORME*) VIA APLICAÇÃO FOLIAR

GIOVANNA SANTOS RODRIGUES SILVA

Orientador: Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro

Coorientadora: Dra. Mayara Galatti Tedesque

Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Jaboticabal, SP

2º Semestre/2025

S586c	Silva, Giovanna Santos Rodrigues Caracterização molecular de <i>Monoraphidium</i> sp. (CCMA-UFSCAR-664) e avaliação do potencial bioestimulante na germinação e crescimento inicial do tomate-cereja (<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>) via aplicação foliar / Giovanna Santos Rodrigues Silva. -- Jaboticabal, 2025 64 p. : tabs., fotos Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Daniel Guariz Pinheiro Coorientadora: Mayara Galatti Tedesque 1. Bioestimulante. 2. Bioinsumo. 3. Chlorophyceae. 4. Filogenia molecular. 5. Microalgas. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

Giovanna Santos Rodrigues Silva

Caracterização molecular de *Monoraphidium* sp. (CCMA-UFSCAR-664) e avaliação do potencial bioestimulante na germinação e crescimento inicial do tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) via aplicação foliar

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Daniel Guariz Pinheiro

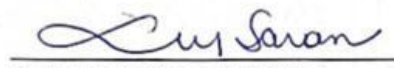
Coorientador (se houver): Dra. Mayara Galatti Tedesque

Área de Concentração: Microbiologia agropecuária

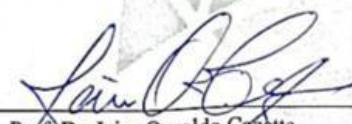
Trabalho aprovado em 16/12/2025

Banca Examinadora:


Dra. Mayara Galatti Tedesque
Centro de Aquicultura da UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. Luciana Maria Saran
UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal


Me. Douglas de Souza Graefano
Centro de Aquicultura da UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. Jairo Osvaldo Cazetta
Chefe do Departamento

AGRADECIMENTOS

Neste momento, com o coração transbordando de gratidão, busco as palavras certas para expressar o que sinto. Olhar para o caminho percorrido até aqui é refletir sobre as inúmeras bênçãos que recebi, tanto em forma de conhecimento quanto, e especialmente, em forma de pessoas. A graduação em Ciências Biológicas nasceu como um sonho meu, mas foi acolhido e apoiado por inúmeras pessoas ao meu redor. Viver essa experiência, sem dúvida, tem sido ainda melhor do que sonhar.

Sou eternamente grata a Deus, que me concedeu o dom da vida e, com Sua onisciência e onipresença, foi a âncora que me manteve firme ao longo desta caminhada e a luz que conduziu os meus passos. À Nossa Senhora Aparecida, minha intercessora fiel, que com amor e proteção me guiou até aqui. A presença Deles esteve comigo de forma inabalável, dando-me a certeza de que nunca estive só.

À minha família. Aos meus pais, Edilene e Giovani, pilares da minha vida. Tudo o que sou como ser humano devo ao amor, à dedicação, ao exemplo e aos cuidados que sempre tiveram comigo. Esta conquista, que hoje se materializa neste trabalho, é, antes de tudo, por vocês e para vocês. Obrigada pelos anos dedicados a mim e à minha educação, por nunca pouparem esforços. O amor incondicional de vocês moldou quem sou hoje, e agradeço, todos os dias, por ser filha de vocês.

À minha avó Elisabeth (*in memoriam*), sigo levando sua lembrança comigo em cada conquista. A força e o cuidado que a senhora sempre dedicou à nossa família permanecem vivos em mim. O amor transcende esse plano.

Ao meu namorado e melhor amigo, André, obrigada por ser calma nos meus dias turbulentos e o impulso que tantas vezes me fez continuar quando o cansaço parecia maior que eu. Sempre presente e paciente, entre abraços apertados e chocolates deixados na hora certa, você iluminou os meus dias e os tornou mais leves. Os propósitos que compartilhamos deram ainda mais sentido a esta conquista. Obrigada por caminhar ao meu lado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro, agradeço pela orientação atenta, pela paciência e por todo o aprendizado ao longo deste processo. Com o senhor, aprendi muito não apenas sobre bioinformática, mas

também sobre a importância de persistir diante dos desafios. Sou profundamente grata por todo o apoio.

À Dra. Mayara Galatti Tedesque, que foi muito mais do que uma coorientadora. Repito: sem você, nada disso seria possível. Obrigada por ter se tornado uma amiga, por ser a minha família e a minha casa em Jaboticabal. Nunca me cansarei de dizer o quanto admiro você. Obrigada pelos puxões de orelha, pelas risadas que aliviaram dias pesados, por cada conselho que me guiou nos dias difíceis e por celebrar comigo cada pequena vitória. Sua paciência e amor pela ciência deixaram uma marca profunda em mim. Que sorte a minha ter cruzado o seu caminho.

Ao Prof. Dr. Leonardo Susumu Takahashi, agradeço pelo apoio, pelos aprendizados e pelas contribuições que facilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

À Julia Araujo, minha dupla. Sempre tão parceira, tão presente. Admiro profundamente quem você é. Obrigada por estar comigo em cada etapa desta jornada.

Às amigas que encontrei durante a faculdade e que sei que levarei comigo para a vida: Alexia, Liliane, Martha, Pollyanna e Maria Fernanda, o nosso grupinho. Eu viveria mais cinco anos ao lado de vocês. Obrigada por terem feito todos esses anos valerem a pena. Sou imensamente grata por cada uma.

Ao técnico de laboratório Sérgio Luís Nobukuni, meu “orientador da vida”. Sua força e garra sempre me admiraram. Obrigada por cada conselho e por todo o apoio.

Aos amigos que a vida me presenteou ao longo desses últimos 10 anos: Julia Faria, Kaio Pacífico, Sophia Cruz, Ana Beatriz Silva, Giovanna Pires, Gabrielle Braga, Daniella Pires e Julia Peverari. Vocês me salvaram em tantos dias que nem imaginam. As nossas conversas, que sempre me fazem chorar de rir, e a forma como celebramos cada pequena conquista juntos tornam tudo infinitamente mais leve. Muito obrigada por serem tão incríveis pra mim.

Ao pessoal do Laboratório de Bioinformática, do Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton e do Laboratório de Tilapicultura, muito obrigada por todo o trabalho em equipe. O nosso apoio mútuo, entre churrascos,

experimentos, coletas e muito café, tornou essa caminhada muito mais leve e especial.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal e a todos os seus colaboradores, que tornam este lugar tão acolhedor, uma verdadeira segunda casa. Obrigada por proporcionarem uma oportunidade única de crescimento acadêmico e humano. Um dia, esta instituição foram para mim um sonho quase utópico, e hoje é parte da minha história.

Ao Centro de Aquicultura da UNESP - Jaboticabal, agradeço pelo suporte e pela estrutura disponibilizada.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de Iniciação Científica e pelo financiamento à pesquisa (Proc. 307895/2023-8).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS	14
2.1 Geral	14
2.2 Específicos.....	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Agricultura sustentável	15
3.2 Microalgas: diversidade e potencial biotecnológico	16
3.3 Bioinsumos vegetais: biofertilizantes e bioestimulantes.....	18
3.4 <i>Monoraphidium</i> : características e potencial agrícola.....	19
3.5 Tomate-cereja: modelo de aplicação de bioinsumos	20
3.6 Identificação molecular de microalgas: marcadores <i>18S rRNA</i> e <i>tufA</i>	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1.1 Origem da cepa.....	23
4.1.2 Condições de cultivo	23
4.1.3 Monitoramento do crescimento.....	24
4.2.1 Preparação das sementes e tratamentos.....	25
4.2.2 Condições de incubação e avaliação.....	26
4.2.3 Análise estatística.....	27
4.3.1 Condições do experimento e aplicação da biomassa	27
4.3.2 Coleta de dados	28
4.3.3 Análise estatística.....	29
4.4 Extração de DNA genômico	29
4.4.1 Extração com kit comercial (Q1).....	29
4.4.2 Extração baseada em CTAB (C1).....	29
4.4.3 Extração baseada em CTAB (C2).....	30
4.5 Amplificação por PCR	30
4.5.2 Amplificação do gene <i>tufA</i>	31
4.6.1 Gene <i>18S rRNA</i>	32
4.6.1.1 Montagem e análise da sequência.....	32
4.6.1.2 Inferência filogenética	32
4.6.2.1 Montagem e análise da sequência.....	33
4.6.2.2 Inferência filogenética	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.5 Perfil de crescimento da cepa em meio CHU12	35
5.6 Extração do DNA genômico.....	36

5.6.1 Extração em kit comercial (Q1).....	36
5.6.2 Extração baseada em CTAB 1 (C1).....	37
5.6.3 Extração baseada em CTAB 2 (C2).....	37
5.7 Integridade do DNA genômico.....	37
5.8 Análises moleculares	38
5.6 Teste de germinação na semente do tomate-cereja	41
5.6.1 Percentual de germinação (%G)	41
5.6.2 Índice de velocidade de germinação (IVG).....	42
5.6.3 Comprimento da radícula.....	44
5.6.4 Comprimento do hipocótilo	45
5.7 Teste em planta.....	46
5.7.1 Comprimento da parte aérea.....	46
5.7.2 Comprimento das raízes	47
5.7.3 Número de folhas.....	48
5.7.4 Massa seca e massa fresca	49
5.7.4.1 Parte aérea.....	49
5.7.4.2 Raiz	51
6 CONCLUSÃO.....	53
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cultivo da microalga <i>Monoraphidium</i> sp. (CCMA-UFSCar-664) em condições controladas no cepário do Laboratório de Produção de Plâncton do CAUNESP, Jaboticabal, SP. As culturas foram mantidas em fototrófico contínuo com temperatura controlada e aeração, utilizando o meio CHU ₁₂ .	22
Figura 2. Biomassa de <i>Monoraphidium</i> sp. concentrada por centrifugação em desnatadeira de leite após 10 dias de cultivo, antes do armazenamento a -18 °C.	23
Figura 3. Sementes de tomate-cereja (<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>) após embebição no tratamento T3 (20 mg L ⁻¹), distribuídas sobre papel Germitest® em placa de Petri	24
Figura 4. Plântulas de tomate-cereja (<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>) cultivadas em vasos plásticos de 410 mL com substrato de vermiculita, mantidas em casa de vegetação sob irrigação automatizada três vezes ao dia.	26
Figura 5. Curva de crescimento da cepa <i>Monoraphidium</i> sp. (CCMA-UFSCar-664) em meio CHU ₁₂ ao longo de 15 dias.	33
Figura 6. Perfil eletroforético do DNA genômico extraído pelos diferentes métodos. Q1: kit comercial, mostrou bandas intensas em baixo peso molecular, indicando fragmentação ou RNA residual; C1: protocolo CTAB 1, padrão semelhante a Q1; C2: protocolo CTAB 2, bandas nítidas em alta massa molecular, caracterizando DNA íntegro	36
Figura 7. Árvore filogenética de <i>Monoraphidium</i> sp. (CCMA-UFSCar-664) a partir da análise do gene <i>18S rRNA</i> . A árvore foi reenraizada utilizando representantes da família Hydrodictyaceae como grupo externo.	38
Figura 8. Árvore filogenética de <i>Monoraphidium</i> sp. (CCMA-UFSCar-664) a partir da análise do gene <i>tufA</i> . A árvore foi reenraizada utilizando representantes do gênero <i>Tetradasmus</i> (Scenedesmaceae) como grupo externo	39
Figura 9. Percentual de germinação de sementes de tomate-cereja (<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>) submetidas a diferentes concentrações de biomassa microalgal. T1: controle; T2: 10 mg L ⁻¹ ; T3: 20 mg L ⁻¹ ; T4: 40 mg L ⁻¹ .	41
Figura 10. Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de tomate-cereja (<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>) submetidas a diferentes concentrações de biomassa microalgal. T1: controle; T2: 20 mg L ⁻¹ ; T3: 40 mg L ⁻¹ ; T4: 40 mg L ⁻¹ .	42
Figura 11. Comprimento da radícula de sementes de tomate-cereja (<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>) submetidas a diferentes concentrações de biomassa microalgal. T1: controle; T3: 20 mg L ⁻¹ ; T4: 40 mg L ⁻¹ .	43
Figura 12. Comprimento do hipocótilo de sementes de tomate-cereja (<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>) submetidas a diferentes concentrações de biomassa microalgal. T1: controle; T2: 10 mg L ⁻¹ ; T3: 20 mg L ⁻¹ ; T4: 40 mg	

L^{-1}	44
----------------	----

Figura 13. Comprimento da parte aérea de plântulas de tomate-cereja (<i>Solanum lycopersicum</i> var. cerasiforme) cultivadas em vasos e submetidas a diferentes concentrações de biomassa microalgal. T1: controle; T2: 1,0 g L ⁻¹ ; T3: 1,5 g L ⁻¹ ; T4: 2,0 g L ⁻¹ .	45
Figura 14. Comprimento das raízes de plântulas de tomate-cereja (<i>Solanum lycopersicum</i> var. cerasiforme) cultivadas em vasos e submetidas a diferentes concentrações de biomassa microalgal. T1: controle; T2: 1,0 g L ⁻¹ ; T3: 1,5 g L ⁻¹ ; T4: 2,0 g L ⁻¹ .	46
Figura 15. Número de folhas de plântulas de tomate-cereja (<i>Solanum lycopersicum</i> var. cerasiforme) submetidas a diferentes concentrações de biomassa microalgal. T1: controle; T2: 1,0 g L ⁻¹ ; T3: 1,5 g L ⁻¹ ; T4: 2,0 g L ⁻¹ .	47
Figura 16. Massa fresca da parte aérea de plântulas de tomate-cereja (<i>Solanum lycopersicum</i> var. cerasiforme) submetidas a diferentes concentrações de biomassa microalgal. T1: controle; T2: 1,0 g L ⁻¹ ; T3: 1,5 g L ⁻¹ ; T4: 2,0 g L ⁻¹ .	48
Figura 17. Massa seca da parte aérea de plântulas de tomate-cereja (<i>Solanum lycopersicum</i> var. cerasiforme) submetidas a diferentes concentrações de biomassa microalgal. T1: controle; T2: 1,0 g L ⁻¹ ; T3: 1,5 g L ⁻¹ ; T4: 2,0 g L ⁻¹ .	49
Figura 18. Massa seca das raízes de plântulas de tomate-cereja (<i>Solanum lycopersicum</i> var. cerasiforme) submetidas a diferentes concentrações de biomassa microalgal. T1: controle; T2: 1,0 g L ⁻¹ ; T3: 1,5 g L ⁻¹ ; T4: 2,0 g L ⁻¹ .	50
Figura 19. Massa seca das raízes de plântulas de tomate-cereja (<i>Solanum lycopersicum</i> var. cerasiforme) submetidas a diferentes concentrações de biomassa microalgal. T1: controle; T2: 1,0 g L ⁻¹ ; T3: 1,5 g L ⁻¹ ; T4: 2,0 g L ⁻¹ .	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros cinéticos de crescimento da cepa <i>Monoraphidium</i> sp. (CCMA-UFSCar-664) em meio CHU ₁₂ . A fase exponencial apresentou a maior taxa de crescimento específica ($k = 1,28 \text{ div} \cdot \text{dia}^{-1}$) e o menor tempo de duplicação ($T_d = 0,78 \text{ dia}$), seguido pela fase estacionária, com redução gradual de k e aumento de T_d ao longo do cultivo.....	34
--	----

RESUMO

As microalgas verdes são microrganismos fotossintetizantes com grande potencial biotecnológico, incluindo uso como biofertilizantes e bioestimulantes na agricultura. Entre elas, o gênero *Monoraphidium* se destaca pelo rápido crescimento e pela produção de biomassa rica em compostos bioativos. Este estudo investigou o potencial bioestimulante da biomassa de *Monoraphidium* sp. (CCMA-UFSCar-664) sobre a germinação e o crescimento inicial do tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*), além de realizar a caracterização molecular da cepa. A curva de crescimento em meio CHU₁₂ permitiu determinar o ponto ideal de coleta da biomassa para os experimentos. Nos ensaios de germinação, embora o percentual germinativo não tenha apresentado diferenças significativas, algumas concentrações favoreceram o desenvolvimento inicial das plântulas, especialmente o alongamento do hipocótilo, indicando efeito bioestimulante em fases precoces. Em vasos, a aplicação foliar da biomassa resultou em maior comprimento da parte aérea e maior massa fresca de raízes em concentrações intermediárias, evidenciando seu potencial para estimular o crescimento vegetativo. Na etapa molecular, três métodos de extração de DNA foram comparados, sendo o protocolo CTAB modificado (C2) o mais eficiente, fornecendo DNA íntegro adequado para PCR. As análises de sequenciamento e filogenia, com base nos genes *18S rRNA* e *tufA*, confirmaram a identidade da cepa como pertencente ao gênero *Monoraphidium*, embora com resolução limitada em nível de espécie, reforçando a necessidade de marcadores adicionais. De modo geral, os resultados indicam que a biomassa de *Monoraphidium* sp. (CCMA-UFSCar-664) possui potencial como bioestimulante nas fases iniciais do tomate-cereja, destacando a importância de estudos complementares para aprimorar sua caracterização taxonômica e validar seu uso em maior escala.

PALAVRAS-CHAVE: bioestimulante; bioinsumo; Chlorophyceae; filogenia molecular; microalgas.

ABSTRACT

Green microalgae are photosynthetic microorganisms with great biotechnological potential, including their use as biofertilizers and biostimulants in agriculture. Among them, the genus *Monoraphidium* stands out for its rapid growth and the production of biomass rich in bioactive compounds. This study investigated the biostimulant potential of *Monoraphidium* sp. (CCMA-UFSCar-664) biomass on the germination and early growth of cherry tomato (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*), as well as the molecular characterization of the strain. The growth curve in CHU₁₂ medium allowed determination of the optimal biomass collection point for the experiments. In germination assays, although the germination percentage did not show significant differences, some concentrations promoted initial seedling development, especially hypocotyl elongation, indicating a biostimulant effect in early growth stages. In pot experiments, foliar application of the biomass resulted in increased shoot length and higher fresh root mass at intermediate concentrations, highlighting its potential to stimulate vegetative growth. In the molecular stage, three DNA extraction methods were compared, with the modified CTAB protocol (C2) being the most efficient, providing intact DNA suitable for PCR. Sequencing and phylogenetic analyses based on the 18S *rRNA* and *tufA* genes confirmed the strain's identity as belonging to the genus *Monoraphidium*, although with limited resolution at the species level, emphasizing the need for additional markers. Overall, the results indicate that *Monoraphidium* sp. (CCMA-UFSCar-664) biomass has potential as a biostimulant in the early stages of cherry tomato growth, highlighting the importance of complementary studies to improve taxonomic characterization and validate its use on a larger scale.

KEYWORDS: biostimulant; bioinput; Chlorophyceae; microalgae; molecular phylogeny

1. INTRODUÇÃO

As microalgas vêm ganhando destaque nas últimas décadas devido à sua versatilidade biológica, caracterizada por estrutura unicelular simples, alta eficiência fotossintética, rápida taxa de crescimento e capacidade de produzir compostos com múltiplas funções de interesse biotecnológico (Supraja; Behera; Balasubramanian, 2020). Em razão dessas características, têm sido amplamente estudadas em áreas como produção de biocombustíveis, tratamento de efluentes, obtenção de biomoléculas, bem como na indústria farmacêutica e alimentícia, além do desenvolvimento de insumos agrícolas (Gonçalves et al., 2023; Su et al., 2023).

No contexto agrícola, a biomassa microalgal tem sido aplicada tanto como biofertilizante quanto como bioestimulante. Esse potencial já é explorado em tecnologias como a primeira patente verde da Universidade Federal do Paraná, que descreve um biofertilizante à base de microalgas aplicado em alface desde as mudas até o cultivo em campo (Mógor, Gilda, 2020). Assim, seu uso surge como uma estratégia sustentável capaz de complementar e reduzir a dependência de fertilizantes químicos convencionais na agricultura moderna.

Em síntese, biofertilizantes são preparações contendo microrganismos vivos que aumentam a disponibilidade de nutrientes no solo, enquanto bioestimulantes correspondem a substâncias ou extratos capazes de modular respostas fisiológicas sem fornecer nutrientes diretamente (Miranda et al., 2024). Ambos favorecem o crescimento, a qualidade, o rendimento e a tolerância das plantas ao estresse abiótico (Rouphael; Colla, 2018), podendo ser aplicados via foliar, no solo ou em sementes, com efeitos positivos já observados em diferentes culturas, como trigo, soja e milho (Parmar et al., 2023).

Em um estudo conduzido por Bumandalai e Tserennadmid (2019), a aplicação de *Chlorella vulgaris* em sementes de tomate e pepino resultou em aumento significativo do comprimento radicular e da parte aérea das plântulas. De forma similar, a biomassa de *Scenedesmus obliquus*, aplicada diretamente

ao solo, elevou em 48,52% a massa seca de alface em comparação a plantas não fertilizadas (Díaz et al., 2024), reforçando o potencial das microalgas como insumo agrícola sustentável.

Dentre os diversos gêneros de microalgas avaliados para aplicações agrícolas, alguns têm se destacado por combinar crescimento eficiente com produção de metabólitos bioativos, sendo *Monoraphidium* um exemplo promissor (Hawrot-Paw; Koniuszy; Gałczyńska, 2020; Yu et al., 2012). Trata-se de uma microalga unicelular pertencente à família Selenastraceae, cujas células variam de aproximadamente 2 a 182 µm de comprimento e 1 a 8 µm de largura, podendo assumir diferentes formatos, como reto, semilunar ou sinuoso (Guiry, M. D., 2025), evidenciando sua variabilidade morfológica.

Além disso, estudos recentes também demonstram o potencial agrônomo do gênero. Jimenez et al. (2020) demonstraram que, quando cultivada em digestato líquido e aplicada ao solo como fertilizante de liberação lenta, a biomassa de *Monoraphidium* promoveu um aumento de 32% na biomassa seca de plantas de tomate em comparação a plantas ao controle.

Apesar dos efeitos positivos observados em tomates convencionais, não há registros de aplicações de *Monoraphidium* em tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*), tampouco de aplicações foliares. Essa variedade produz frutos pequenos e nutritivos, apreciados tanto para consumo direto quanto para processamento (Akhter et al., 2021; Narayan et al., 2022). Sua ampla distribuição, abrangendo Américas, Europa, Ásia e Oriente Médio, evidencia sua relevância econômica e alimentar (Hemming et al., 2020). Devido ao porte compacto e à alta adaptabilidade a sistemas de cultivo controlados, o tomate-cereja é um modelo experimental ideal para conduzir experimentos com manejo padronizado e avaliar com precisão os efeitos de biofertilizantes e bioestimulantes à base de microalgas.

A elevada variabilidade morfológica de *Monoraphidium* dificulta a delimitação de espécies apenas por características fenotípicas, evidenciando a necessidade de uma identificação molecular precisa (Fawley et al., 2006). Neste sentido, a análise de marcadores moleculares,

como *18S rRNA* e *tufA*, fornecem uma classificação taxonômica robusta da cepa, garantindo a reprodutibilidade de estudos aplicados e permitindo relacioná-la filogeneticamente com outras espécies de Selenastraceae.

Partindo dessa base, o presente estudo avaliou os efeitos da biomassa de *Monoraphidium* sp. (CCMA-UFSCar-664) (Bagatini; Vieira, 2022) sobre sementes e via foliar no desenvolvimento inicial de tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*), integrando a caracterização molecular ao potencial agrônomo da microalga. A hipótese deste estudo é que a cepa analisada apresente efeito bioestimulante semelhante aos observados em outras clorofíceas, o que justifica sua avaliação em condições experimentais controladas.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial da microalga como bioestimulante, investigando seus efeitos sobre a germinação e o crescimento inicial de plântulas de tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*). Além disso, realizar a identificação molecular da cepa CCMA-UFSCar-664, a fim de fornecer uma classificação filogenética mais precisa e validar sua atribuição ao gênero *Monoraphidium*.

2.2 Específicos

1. Determinar a curva de crescimento da cepa em meio CHU₁₂, avaliando densidade celular, taxa de crescimento e tempo de duplicação ao longo de 15 dias, para identificar o ponto de colheita ideal da biomassa para os ensaios subsequentes.

2. Comparar diferentes métodos de extração de DNA genômico, visando determinar aquele que proporcione melhor rendimento, pureza e integridade do DNA da cepa, assegurando material adequado para análises moleculares.

3. Realizar a identificação molecular da cepa *Monoraphidium* sp. (CCMA-UFSCar-664) por meio dos genes *18S rRNA* e *tufA*, incluindo a montagem das sequências e a construção de árvores filogenéticas, a fim de fornecer uma classificação filogenética mais precisa e acurada, esclarecendo suas relações taxonômicas com outras microalgas da mesma espécie ou gêneros relacionados.

4. Avaliar o efeito da biomassa microalgal sobre a germinação de sementes de tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*), considerando percentual de germinação, índice de velocidade de germinação, comprimento de radícula e hipocótilo, para investigar seu potencial como bioestimulante.

5. Investigar a influência da aplicação da biomassa microalgal no crescimento inicial de plântulas de tomate-cereja cultivadas em vaso, analisando altura da parte aérea, número de folhas, desenvolvimento radicular e produção de biomassa seca.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Agricultura sustentável

A agricultura sustentável representa uma abordagem crítica e em constante desenvolvimento dentro das ciências agrárias, buscando conciliar a produção de alimentos com a conservação dos recursos naturais (Ehlers, 1994). Conceitualmente, o termo, formalizado nos Estados Unidos em 1977, refere-se à capacidade de um sistema agrícola manter-se produtivo a longo prazo, otimizando o uso de recursos e garantindo a viabilidade econômica, sem provocar danos ambientais irreversíveis (Paulus; Schlindwein, 2001).

O surgimento desse modelo está diretamente ligado à crítica aos impactos da agricultura convencional intensiva, impulsionada pela Revolução Verde e pelo uso massivo de insumos químicos a partir do século XIX (Barros; Araújo, 2016). Adicionalmente, o alerta de Rachel Carson, em 1962, sobre os efeitos nocivos dos pesticidas, catalisou a conscientização global e popularizou o termo "agricultura sustentável" na década de 1970 (Walker, 1999).

A principal motivação para essa transição decorre da necessidade de mitigar os impactos negativos do uso intensivo de agrotóxicos (Da Costa Santos; Santos, 2023). Embora essenciais para o controle de patógenos que causam perdas significativas na produção mundial (Paz; Rezende; Gameiro, 2023), seu uso indiscriminado gera preocupações ambientais e de saúde pública (Ródio; Rosset; Brandalize, 2021). Segundo Panis et al. (2022), no Brasil, o cenário é ainda mais crítico, já que o país está entre os maiores consumidores globais desses insumos, superando grandes potências agrícolas.

Essa forte dependência, sobretudo em culturas de larga escala como soja e milho (Hess; Nodari, 2022), impõe um custo ambiental significativo, resultando em contaminação do solo e alterações em processos bioquímicos essenciais, como a atividade enzimática, que comprometem diretamente a ciclagem de nutrientes e a capacidade natural de degradação de poluentes (Martins, 2024). Além dos impactos ambientais, os agrotóxicos representam riscos à saúde humana. A exposição ocupacional e o consumo de alimentos

com resíduos químicos estão associados a intoxicações crônicas, efeitos no sistema nervoso, alterações endócrinas e até potencial aumento do risco de câncer (Lopes; Albuquerque, 2018), reforçando a urgência da adoção de alternativas ecologicamente equilibradas.

Nesse contexto, os bioinsumos surgem como uma alternativa tecnológica promissora para reduzir a dependência de produtos químicos (Da Silva et al., 2024). Esses produtos biológicos, que incluem microrganismos e extratos vegetais, têm demonstrado capacidade de controlar pragas, melhorar a saúde do solo e promover crescimento vegetal de forma sustentável (Da Silva et al., 2025; Singh; Kumar, 2024). Entre as diferentes classes de bioinsumos, as microalgas destacam-se como uma inovação promissora e crescente (Zhang et al., 2024), pois podem atuar simultaneamente como biofertilizantes e bioestimulantes, oferecendo uma solução multifuncional e sustentável (Gonçalves, 2021; Miranda et al., 2024).

3.2 Microalgas: diversidade e potencial biotecnológico

As microalgas constituem um grupo diverso de microrganismos unicelulares e eucarióticos, predominantemente aquáticos (Thoré et al., 2023). A maioria realiza fotossíntese, convertendo luz solar e dióxido de carbono (CO₂) em biomassa rica em compostos bioativos (Olguín et al., 2022; Sun et al., 2018). Entre os principais compostos presentes na biomassa, destacam-se proteínas, como ficobiliproteínas e enzimas; lipídios, incluindo triglicerídeos e fosfolipídios; carboidratos, como polissacarídeos e glicanos; pigmentos, como astaxantina e betacaroteno; além de ácidos graxos poli-insaturados, como o ômega-3 (Dimopoulou et al., 2025; Pulz; Gross, 2004).

As microalgas também sintetizam fitormônios, como auxinas, giberelinas, citocininas e ácido abscísico, que desempenham papéis regulatórios no crescimento e no metabolismo celular das plantas (Tarakhovskaya; Maslov; Shishova, 2007). Segundo Borowitzka (2013), essa diversidade de moléculas de alto valor confere às microalgas grande versatilidade biológica, posicionando-as como uma matéria-prima promissora para diferentes setores industriais. A biotecnologia desses

microrganismos tem se expandido rapidamente, impulsionada pela demanda por soluções sustentáveis e produtos naturais (Sarker; Kaparaju, 2024). A biomassa é amplamente explorada na produção de biocombustíveis (Gouveia; Oliveira, 2009), na indústria nutracêutica, com estudos envolvendo *Chlorella vulgaris* e *Arthrospira platensis* (Matos et al., 2020), na cosmética, como matéria-prima para produtos de *skincare* (Ganeson et al., 2024), e na farmacêutica, devido às suas propriedades terapêuticas, incluindo atividades antioxidante e anti-inflamatória (Khavari et al., 2021).

O mecanismo de cultivo dessas microalgas é um fator determinante para a qualidade e o rendimento da biomassa (Qin et al., 2023). Os sistemas podem ser abertos, como lagoas *raceway*, de baixo custo, mas com maior risco de contaminação e perda de água, ou fechados, como fotobiorreatores, que permitem controle preciso de luz, temperatura, pH e CO₂, aumentando produtividade e pureza, embora demandem maior investimento (Chanquia; Vernet; Kara, 2022).

A escolha do meio de cultura também é crucial para otimizar a produção de biomassa e modular sua composição bioquímica (Markou; Nerantzis, 2013), sendo comuns meios definidos como WC (Guillard; Lorenzen, 1972), BG-11 (Allen; Stanier, 1968) e CHU₁₂ (Chu, 1942), assim como efluentes industriais ou agroindustriais, que permitem crescimento econômico e sustentável da biomassa (Abdel-Raouf et al., 2012). Devido à variedade de sistemas de cultivo, aos diferentes meios disponíveis e à capacidade de sintetizar fitohormônios, o interesse pelas microalgas no contexto agrícola também tem crescido de forma significativa (Jurado-Flores et al., 2025).

A aplicação de sua biomassa tem se mostrado eficiente na melhoria do crescimento e da produtividade das culturas. Por exemplo, em tomateiros cultivados em vaso, o uso de fertilizantes à base de microalgas aumentou a massa seca, os teores de clorofila e a fertilidade do solo (Li et al., 2024). De forma similar, a pulverização foliar de *Asterarcys quadricellulare* em beterrabas elevou a produtividade, o peso seco e o teor de açúcares (Novaski et al., 2024). Esses efeitos evidenciam a capacidade biofertilizante e bioestimulante das microalgas, reforçando seu potencial

para práticas agrícolas mais sustentáveis e menos dependentes de agrotóxicos.

3.3 Bioinsumos vegetais: biofertilizantes e bioestimulantes

O primeiro biofertilizante com rizóbios, chamado Nitragin, foi produzido em 1896, marcando o início do uso sistemático de microrganismos para promover a fertilidade do solo (Friedrich Nobbe; Lorenz Hiltner, 1896). O termo “biofertilizante” pode ser interpretado de diferentes formas (El- Ghamry et al., 2018), mas de maneira geral refere-se a preparações com microrganismos benéficos, como bactérias, fungos e microalgas (Bhardwaj et al., 2014), cuja principal função é estimular o crescimento das plantas de forma sustentável, sem causar impactos ambientais prejudiciais (Mishra; Dash, 2014).

Esses microrganismos atuam liberando nutrientes de materiais orgânicos, solubilizando compostos minerais e interagindo com a microbiota do solo, favorecendo a absorção radicular e aumentando a disponibilidade de elementos essenciais, como nitrogênio, fósforo e potássio (Vessey, 2003). Estudos demonstram seu impacto prático, Schütz et al. (2018) observaram que a inoculação com biofertilizantes aumentou a produtividade das culturas em média 16,2% em relação aos controles não inoculados.

Em contraste, os bioestimulantes não se restringem à nutrição, atuando principalmente na modulação de processos fisiológicos das plantas, como aumento da germinação, desenvolvimento radicular e tolerância a estresses abióticos (Miranda et al., 2024). Esses efeitos decorrem da presença de metabólitos ativos, como fitohormônios, aminoácidos, peptídeos e polissacarídeos, que ativam vias metabólicas e hormonais nas plantas (Kaushal et al., 2023).

A biomassa microalgal apresenta dupla funcionalidade, podendo atuar tanto como biofertilizante quanto como bioestimulante (Ronga et al., 2019), dependendo da forma de aplicação e da sua composição química. Quando incorporada ao solo, pode liberar nutrientes essenciais e melhorar a fertilidade do substrato (Casto et al., 2024; Gonçalves et al., 2023). Por outro lado, quando aplicada em sementes, via extrato aquoso, ou como

pulverização foliar, seus compostos bioativos podem ser absorvidos pelas plantas e estimular respostas fisiológicas, caracterizando sua ação como bioestimulante (El-Shazoly et al., 2025; Garcia-Gonzalez; Sommerfeld, 2016). Dessa forma, embora este estudo tenha focado em bioestimulação, o potencial biofertilizante da biomassa microalgal não deve ser negligenciado em aplicações ao solo.

3.4 *Monoraphidium*: características e potencial agrícola

Dentre as diversas microalgas estudadas para aplicação bioestimulante, *Monoraphidium* destaca-se. O gênero pertence à classe Chlorophyceae, ordem Sphaeropleales e família Selenastraceae, um grupo de algas verdes de água doce amplamente distribuído em ambientes continentais (Garcia da Silva et al., 2017). *Monoraphidium* sp. é uma microalga unicelular, com comprimento 2-182 µm e largura 1-8 µm. As células apresentam formas que vão de retas a semilunares, podendo ser sigmóides ou helicoidalmente torcidas, muitas vezes com extremidades alongadas (Guiry, M. D., 2025).

Além disso, o gênero é cultivado de formas variadas, evidenciando sua versatilidade em diferentes sistemas de produção. Estudos relatam seu cultivo em sistemas fechados, como fotobiorreatores (Figuera et al., 2016), bem como em sistemas abertos, utilizando tanques rasos e de grande porte (Yang; He; Hu, 2018). Quanto aos meios de cultura empregados, *Monoraphidium* tem sido cultivado em diversos tipos, incluindo o clássico WC, descrito por Guillard e Lorenzen (1972) e utilizado em estudo por Takami et al. (2012). Além disso, também já foi cultivado em CHU₁₀ (Chu, 1942), BG-11 (Allen; Stanier, 1968) e BBM (Bischoff, 1963), nos quais Yadav et al. (2023) avaliaram seu crescimento. O gênero, segundo Guerrero-Cabrera et al. (2014), também se desenvolve em efluentes de piscicultura, demonstrando sua flexibilidade sob diferentes condições nutricionais.

Considerando sua versatilidade de cultivo e adaptabilidade nutricional, *Monoraphidium* apresenta-se como um candidato promissor a bioestimulante e biofertilizante agrícola. Estudos demonstram que sua biomassa, aplicada ao solo como fertilizante de liberação lenta em

tomateiros, promove aumento significativo da biomassa seca em relação a controles não fertilizados (Jimenez et al., 2020). Embora não existam evidências diretas sobre a produção específica de fitormônios por este gênero, microalgas da mesma classe, como *Acutodesmus obliquus* (Piotrowska-Niczyporuk et al., 2018) e *Chlorella vulgaris* (Moon et al., 2024), foram relatadas como produtoras de auxinas e citocininas ou apresentaram efeitos bioestimulantes em plantas, sugerindo que *Monoraphidium* possa apresentar comportamento semelhante. Ainda assim, persiste uma lacuna no conhecimento sobre a avaliação ampla desse gênero como bioestimulante vegetal, reforçando a relevância de futuras investigações, especialmente quanto à sua aplicação foliar.

3.5 Tomate-cereja: modelo de aplicação de bioinsumos

Diante do potencial de *Monoraphidium*, torna-se relevante avaliar sua aplicação em outras culturas agrícolas de interesse econômico, como o tomate- cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*), amplamente cultivado e consumido devido ao seu valor nutricional e comercial (Yang et al., 2023). Essa hortaliça apresenta ampla distribuição mundial, sendo cultivada em diversos continentes, como América do Norte, Europa, Ásia e América do Sul (Hemming et al., 2020). Além disso, adapta-se a diferentes sistemas produtivos, como cultivo em solo (Cipriani; Do Nascimento; Melo, 2020), estufas (Pickens et al., 2020) e outras formas de cultivo protegido (Dias et al., 2019), o que favorece sua presença em regiões com condições climáticas variadas.

Embora o ciclo do tomate-cereja varie conforme as condições de cultivo, estudos mostram que, sob manejo específico, como diferentes níveis de irrigação e uso de tela de sombreamento, já é possível observar formação de flores e frutos entre 44 e 57 dias após o transplante (Santiago et al., 2018), o que evidencia um potencial produtivo relativamente rápido. Além disso, o tomate-cereja se destaca por sua riqueza em compostos bioativos como licopeno, β -caroteno, vitamina C e antioxidantes, características que conferem elevado valor nutricional ao fruto (Lenucci et al., 2006).

Esses atributos, somados à sua adaptabilidade a diferentes sistemas

de cultivo e ampla distribuição geográfica, tornam a cultura um modelo atrativo para testar bioinsumos microbianos. Nesse contexto, a aplicação de *Monoraphidium*, em razão de seu possível potencial bioestimulante, representa uma oportunidade promissora para práticas agrícolas mais sustentáveis e eficientes.

3.6 Identificação molecular de microalgas: marcadores 18S rRNA e *tufA*

A identificação de espécies do gênero *Monoraphidium* exclusivamente com base em características morfológicas é frequentemente limitada, uma vez que o grupo apresenta ampla plasticidade fenotípica e forte sobreposição de atributos entre espécies (Lee et al., 2025).

Essa limitação é evidente em *Monoraphidium circinale* e *Monoraphidium minutum*, espécies descritas como extremamente semelhantes. Ambas possuem células estreitas, alongadas e com dimensões muito próximas, e as poucas diferenças relatadas, como variações discretas na largura ou no formato das extremidades, são tão sutis que frequentemente se sobrepõem entre isolados (Ramos et al., 2012), impedindo uma distinção morfológica confiável.

O gene 18S rRNA é amplamente utilizado na sistemática de microalgas por ser conservado, universal e adequado para análises filogenéticas em níveis mais altos, como gênero e família (Medlin et al., 1988; Adl et al., 2019). Apesar de sua resolução limitada para separar espécies muito próximas, ele é eficiente para confirmar a identidade genérica de isolados e evitar equívocos com táxons morfológicamente semelhantes (Hegewald; Hanagata, 2000), sendo por isso um dos marcadores mais empregados em estudos taxonômicos de Chlorophyceae (Khaw; Khong; Shaharuddin; Yusoff, 2020).

Já o *tufA*, que codifica o fator de alongação EF-Tu no cloroplasto (Baldauf; Manhart; Palmer, 1990), demonstrou melhor correspondência com as diferenças morfológicas entre isolados em um estudo filogenético do que as árvores baseadas em 18S rRNA, evidenciando seu superior poder discriminativo em nível de espécie (Wang et al., 2019). Esse gene tem sido

amplamente utilizado para diferenciar espécies de clorófitas, sendo especialmente útil quando o *18S rRNA* não apresenta variação suficiente para separar linhagens próximas (Kezlya, Tseprik, Kulikovskiy, 2023). Dessa forma, a combinação desses dois marcadores, *18S rRNA*, conservado, e *tufA*, mais variável, proporcionaria maior robustez à identificação molecular de microalgas de *Monoraphidium*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem e cultivo da microalga *Monoraphidium* sp. (CCMA-UFSCar-664)

4.1.1 Origem da cepa

A cepa da microalga *Monoraphidium* sp. (CCMA-UFSCar-664) foi obtida a partir da Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce da Universidade Federal de São Carlos (CCMA-UFSCar) (Bagatini; Vieira, 2022), tendo sido originalmente isolada no município de Icém, São Paulo.

4.1.2 Condições de cultivo

O cultivo foi realizado no Laboratório de Produção de Plâncton do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), em Jaboticabal, SP, em sala de cepário equipada com prateleiras vazadas, que proporcionaram condições controladas de luminosidade, temperatura e aeração para o crescimento das culturas (Figura 1).

Figura 1 - Cultivo da microalga *Monoraphidium* sp. (CCMA-UFSCar-664) em condições controladas no cepário do Laboratório de Produção de Plâncton do CAUNESP, Jaboticabal, SP. As culturas foram mantidas em fototrófico contínuo com temperatura controlada e aeração, utilizando o meio CHU₁₂.



Fonte: própria.

A microalga foi cultivada sob condições fototróficas, com iluminação fornecida por lâmpadas de LED distribuídas de forma homogênea, intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo contínuo (24 h de luz). A temperatura mantida em torno de $22 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por ar-condicionado, e a aeração foi realizada por um sistema de compressores e filtros, minimizando riscos de contaminação. Utilizou-se o meio de cultura CHU₁₂ (Chu, 1942), conforme protocolo adaptado de Sipaúba-Tavares e Rocha, 2001 (Figura 1).

4.1.3 Monitoramento do crescimento

Inicialmente, realizou-se um cultivo exploratório de 15 dias para avaliação do crescimento da cepa. Amostras de 1 mL foram coletadas diariamente em triplicata e a contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer, expressa em células $\text{mL}^{-1} \times 10^6$ (Stein, 1973). A taxa de crescimento (k) e o tempo de duplicação (Td) foram calculados conforme Stein (1973), sendo k obtida pela fórmula:

$$k = \frac{3,322}{t_2 - t_1} \log \frac{N_2}{N_1}$$

onde t_1 e t_2 representam os tempos inicial e final de contagem (em dias), e N_1 e N_2 correspondem ao número de células nos tempos t_1 e t_2 , respectivamente. O tempo de duplicação (Td) foi calculado utilizando:

$$Td = 1k^{-1}$$

onde Td representa o tempo necessário para que a população celular duplique e k é a taxa de crescimento, expressa em divisões por dia. Para obtenção de biomassa destinada à aplicação como bioestimulante, a microalga foi cultivada em frascos de 10 L durante dez dias. Ao final, a cultura foi concentrada por centrifugação utilizando uma desnatadeira de leite (Figura 2), e a biomassa obtida foi imediatamente armazenada a aproximadamente -18°C até o momento de uso.

Figura 2. Biomassa de *Monoraphidium* sp. concentrada por centrifugação em desnatadeira de leite após 10 dias de cultivo, antes do armazenamento a -18 °C.



Fonte: própria

4.2 Ensaio de germinação de sementes de tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) sob diferentes concentrações de biomassa microalgal

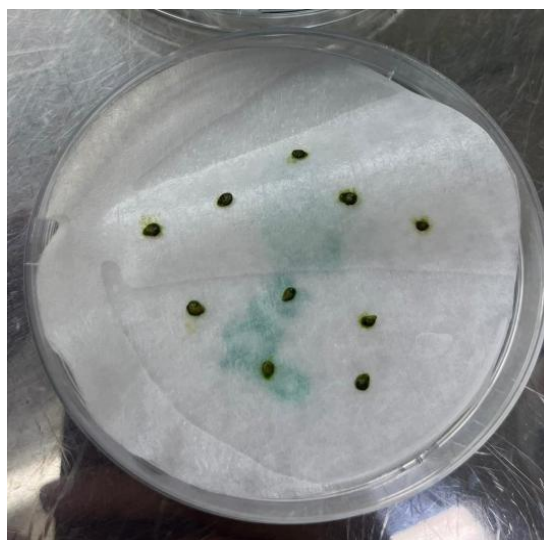
4.2.1 Preparação das sementes e tratamentos

A biomassa obtida foi utilizada nos ensaios de germinação com sementes de tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) da marca Feltrin (percentual de germinação declarado de 96%). As sementes foram submetidas

à desinfecção por meio de duas lavagens em álcool 70% (v/v), seguidas de três enxágues com água destilada autoclavada.

O ensaio foi realizado em quatro tratamentos, cada um composto por quatro repetições. O tratamento controle (T1) constituiu na aplicação apenas de água destilada autoclavada, enquanto os demais tratamentos (T2, T3 e T4) corresponderam a soluções contendo biomassa microalgal nas concentrações de 10, 20 e 40 mg L⁻¹, respectivamente. Cada repetição foi composta por 10 sementes imersas por 24 horas em 30 mL da solução correspondente. Após o período de embebição, as sementes foram transferidas para placas de Petri (90 mm x 15 mm) previamente preparadas com papel Germitest® umedecido com água destilada autoclavada (Figura 3).

Figura 3: Sementes de tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) após embebição no tratamento T3 (20 mg L⁻¹), distribuídas sobre papel Germitest® em placa de Petri.



Fonte: própria.

4.2.2 Condições de incubação e avaliação

As placas foram incubadas em câmara B.O.D. a 25 °C, sob fotoperíodo contínuo de 24 horas, por oito dias. A umidade interna foi mantida por meio da adição diária de 1 mL de água destilada autoclavada, evitando-se encharcamento e sobreposição das sementes ao longo do experimento. Durante o período, foram monitorados os parâmetros germinativos. O percentual de germinação (%G) foi calculado de acordo com Labouriau (1983), utilizando a expressão:

$$\%G = \left(\frac{N_g}{N_t} \right) \times 100$$

em que N_g corresponde ao número de sementes germinadas e N_t ao número total de sementes avaliadas. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado segundo Maguire (1962), conforme a fórmula:

$$IVG = \sum_i \left(\frac{G_i}{N_i} \right)$$

em que G_i representa o número de sementes germinadas no i -ésimo dia e N_i o número de dias decorridos desde o início da germinação. Ao final do oitavo dia, o comprimento do hipocótilo e da radícula foram mensurados com o auxílio de um paquímetro.

4.2.3 Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk (Shapiro; Wilk, 1965) e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene (Levene, 1960). Todas as variáveis atenderam aos pressupostos paramétricos, exceto o comprimento do hipocótilo, que foi analisado pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Kruskal; Wallis, 1952), seguido do teste de comparações múltiplas com correção de Bonferroni (Bonferroni, 1936). As demais variáveis foram submetidas à ANOVA (Fisher, 1925) e, quando identificado efeito significativo ($p < 0,05$), aplicou-se o teste de Tukey (Tukey, 1949) para comparação das médias.

4.3 Avaliação do crescimento de plantas de tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) em vasos sob diferentes concentrações de biomassa microalgal

4.3.1 Condições do experimento e aplicação da biomassa

O experimento foi conduzido com plântulas de tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*), cultivadas em vasos plásticos de 410 mL, preenchidos com substrato de vermiculita. As plântulas foram mantidas em casa de vegetação, sob irrigação automatizada três vezes ao dia. (Figura 4).

As pulverizações foram iniciadas quando as plântulas atingiram aproximadamente 7 cm de altura, adotando-se este estágio vegetativo como adaptação do protocolo descrito para aplicação foliar de microalgas em tomate (Suchithra et al., 2022).

O bioestimulante utilizado consistiu em biomassa da microalga *Monoraphidium* sp. (CCMA-UFSCar-664), padronizada nas concentrações de 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹. O tratamento controle recebeu apenas água destilada autoclavada. As aplicações foram padronizadas com base no volume agrícola de 200 L ha⁻¹, convertido para o equivalente por planta de acordo com a densidade de plantio (Oliveira et al., 2021). O borrifador vermiculita, mantidas em casa de vegetação sob irrigação automatizada três vezes ao dia.

Figura 4 - Plântulas de tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) cultivadas em vasos plásticos de 410 mL com substrato de



Fonte: própria.

manual foi previamente calibrado, obtendo-se 1,8 mL por borrifada, totalizando 3,6 mL por planta a cada aplicação. Esse volume corresponde a aproximadamente 1,5 vez o valor teórico calculado, sendo adotado para garantir a uniformidade da dose aplicada. As aplicações foram realizadas em três etapas, com intervalos regulares de sete dias (7, 14 e 21 dias após a primeira aplicação).

4.3.2 Coleta de dados

Sete dias após a última aplicação (28º dia de cultivo), as plântulas foram colhidas, o sistema radicular cuidadosamente lavado para remoção do substrato e, antes da secagem, foram avaliados a altura da parte aérea, o comprimento das raízes e o número de folhas de cada plântula. Em seguida, foram determinadas a massa fresca e seca, sendo esta obtida após secagem em estufa a 60 °C até peso constante (Savita; Jakhar, 2018). Todos os dados foram registrados individualmente para cada planta.

4.3.3 Análise estatística

Para análise estatística dos dados, a normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk (Shapiro; Wilk, 1965) e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene (Levene, 1960). Todas as variáveis atenderam aos pressupostos paramétricos, exceto o comprimento do hipocótilo, que apresentou distribuição não normal. Portanto, essa variável foi analisada pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Kruskal; Wallis, 1952), seguido do teste de comparações múltiplas com correção de Bonferroni (Bonferroni, 1936). As demais foram submetidas à análise de variância (Fisher, 1925), e, quando detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (Tukey, 1949).

4.4 Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico da cepa *Monoraphidium* sp. (CCMA-UFSCar-664) foi realizada a partir da mesma biomassa, garantindo comparabilidade entre os métodos testados. Três abordagens distintas foram avaliadas: uma metodologia comercial e duas baseadas no detergente catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). A escolha por múltiplos protocolos foi motivada pela escassez de informações específicas sobre a espécie em estudo, de modo a identificar o procedimento mais eficiente em termos de rendimento, pureza e integridade do DNA.

A qualidade das amostras foi analisada por espectrofotometria (NanoDrop One), considerando as razões A260/280 e A260/230, e por eletroforese em gel de agarose a 1%. Para cada método de extração, foram preparadas duas amostras independentes, garantindo a reprodutibilidade dos resultados obtidos.

4.4.1 Extração com kit comercial (Q1)

A primeira extração foi realizada com o kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), seguindo rigorosamente as recomendações do fabricante. Esta condição foi designada como Q1.

4.4.2 Extração baseada em CTAB (C1)

O segundo método, designado como C1, baseou-se no protocolo

clássico de Doyle & Doyle (1987), adaptado para microalgas. A biomassa foi coletada por centrifugação em dois ciclos de 1 mL a 13.000 rpm por 10 minutos, seguida de lavagem com tampão contendo Tris-HCl 25 mM e acetato de potássio 100 mM. A lise celular foi conduzida em tampão de CTAB 2% (0,1 M Tris-HCl; 0,02 M EDTA; 1,4 M NaCl) suplementado com β -mercaptoetanol e SDS 10%, com incubação em banho-maria a 37 °C por 1 hora. A extração orgânica foi realizada com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), seguida de tratamento com RNase e nova extração para maior pureza. O DNA foi precipitado com isopropanol e acetato de sódio 3 M (pH 5,2), incubado overnight a -80 °C, centrifugado a 4 °C, lavado com etanol 80%, seco ao ar e ressuspensão em água livre de nucleases.

4.4.3 Extração baseada em CTAB (C2)

O terceiro método (C2), adaptado de Lodhi et al. (1994), utilizou aproximadamente 0,1 g de biomassa previamente macerada em nitrogênio líquido e ressuspensa em 1,0 mL de tampão de extração recém-preparado. A mistura foi incubada a 60 °C por 25 minutos e posteriormente resfriada. Após adição de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), a amostra foi homogeneizada por inversão e centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos a 4 °C.

A fase aquosa foi recuperada e submetida à precipitação com NaCl 5 M (1/10 do volume) e etanol 100% gelado (2x o volume), seguida de incubação a -80 °C por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas em etapas de 6.000 rpm e 10.000 rpm, lavadas com etanol 70%, secas e ressuspensas em 100 μ L de tampão TE. O DNA foi tratado com RNase (37 °C por 30 minutos). Em relação ao C1, o protocolo C2 difere principalmente pelo menor uso de biomassa, maceração em nitrogênio líquido e parâmetros de lise mais curtos e a temperaturas mais altas, resultando em um procedimento mais rápido e menos intensivo.

4.5 Amplificação por PCR

O DNA genômico obtido pelo método mais eficiente (C2) foi utilizado para amplificação dos genes *18S rRNA* e *tufA*, empregando primers específicos para identificação molecular da cepa CCMA-UFSCar-664.

As reações de PCR foram preparadas utilizando o kit FIREPol® Master Mix with 12.5 mM MgCl₂ (5x), que contém Taq DNA polimerase, dNTPs, tampão de reação (0,4 M Tris-HCl; 0,1 M (NH₄)₂SO₄; 0,1% Tween-20) e MgCl₂ em concentração final de 2,5 mM. Cada reação foi realizada em volume final de 20 µL, contendo 4 µL de Master Mix (5x), 0,2-0,6 µL de cada primer (10 µM), DNA molde (concentração entre 0,1 e 10 ng/µL) e água livre de nucleases para completar o volume final.

As amplificações foram conduzidas em termociclador *Eppendorf Mastercycler® Gradient*, e o tamanho e a integridade dos amplicons foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1%, preparado em tampão TBE 1x e corado com brometo de etídio. Para cada amostra, 15 µL foram aplicados no gel (11 µL do produto de PCR e 4 µL de tampão de carregamento). A corrida foi realizada utilizando marcador de peso molecular de 1 kb, assegurando a qualidade do DNA para etapas subsequentes.

4.5.1 Amplificação do gene *18S rRNA*

O gene *18S rRNA* foi amplificado utilizando primers eucarióticos universais: primer direto 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3' e primer reverso 5'-CCTTGTTACGACTTCACCTTCC-3' (Mofeed et al., 2025). A reação foi conduzida com desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 52 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto, finalizando com extensão final a 72 °C por 10 minutos.

4.5.2 Amplificação do gene *tufA*

O gene *tufA* foi amplificado com primers específicos: primer direto 5'-GGNGCNGCNCAAATGGAYGG-3' e primer reverso 5'-CCTTCNCGAATMGCRAAWCGC-3' (Guinart, 2016). O programa de termociclagem constituiu em desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, 29 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 55 °C por 45 segundos e 90 °C por 45 segundos, com etapa final de extensão a 72 °C por 7 minutos.

4.6 Sequenciamento dos genes *18S rRNA* e *tufA*

Os amplicons obtidos para os genes *18S rRNA* e *tufA* foram purificados e sequenciados pelo método Sanger, utilizando o sequenciador *SeqStudio™ Genetic Analyzer System*.

4.6.1 Gene *18S rRNA*

4.6.1.1 Montagem e análise da sequência

O basecalling dos cromatogramas foi realizado com Phred v.071220.c (Ewing; Green, 1998), implementado no *pipeline phredPhrap* do programa CONSED v.29.0 (Gordon; Abajian; Green, 1998). As sequências obtidas foram submetidas a pré-processamento para assegurar alta qualidade. Para isso, utilizou-se o programa PRINSEQ-lite v.0.20.4 (Schmieder; Edwards, 2011), aplicando poda de qualidade nas extremidades das leituras: bases com qualidade média inferior a 15 na extremidade esquerda e inferior a 20 na direita foram removidas.

A avaliação da qualidade foi realizada utilizando média móvel em uma janela deslizante de 15 bases, avançando uma base por vez, de modo a manter apenas os trechos de maior confiabilidade para análises subsequentes. Para a obtenção da sequência representativa do *18S rRNA* da cepa CCMA-UFSCar-664, as leituras das extremidades direta (F) e reversa (R) do amplicon foram concatenadas, inserindo-se 290 caracteres “N” como lacuna entre elas.

A leitura reversa foi invertida e complementada para coincidir com a orientação da leitura direta, e o tamanho da lacuna foi definido com base no alinhamento com a sequência referência AY846378.1. A montagem e inspeção das sequências foram realizadas no UGENE v.52.1 (Okonechnikov et al., 2012). A sequência final foi submetida ao BLAST, e as 100 melhores correspondências com cobertura superior a 80% foram recuperadas para alinhamento múltiplo. O alinhamento inicial foi inspecionado no UGENE para remoção de lacunas excessivas e posteriormente refinado com MAFFT v.7.520 (Katoh et al., 2002), utilizando até três iterações para otimização da qualidade do alinhamento.

4.6.1.2 Inferência filogenética

A filogenia foi construída no IQ-TREE v.3.0.1 (Wong et al., 2025), utilizando o alinhamento múltiplo resultante. O modelo de substituição nucleotídica foi selecionado automaticamente pelo ModelFinder, executado no modo MFP (ModelFinder Plus), com seleção baseada no *Bayesian Information Criterion* (BIC). O melhor modelo ajustado foi HKY+R3 (BIC = 7948.594). A robustez dos agrupamentos foi avaliada por 1000 replicatas de *ultrafast bootstrap* e pelo teste SH-aLRT (1000 replicatas). A árvore final foi visualizada e editada no iTOL v6 (Letunic; Bork, 2007), sendo reenraizada utilizando Hydrodictyaceae como grupo externo, facilitando a interpretação filogenética.

4.6.2. Gene *tufA*

4.6.2.1 Montagem e análise da sequência

As sequências do gene *tufA* foram inicialmente selecionadas na plataforma *NCBI MSASViewer* (Rangwala et al., 2021), adotando-se critérios de qualidade que incluíram cobertura mínima de 80% e parâmetros de penalidade de gaps (5 para existência de gap e 2 para extensão de gap). Apenas as sequências que atendiam a esses critérios foram baixadas para análises subsequentes.

Os identificadores dos arquivos FASTA foram então padronizados, mantendo apenas os números de acesso e as posições de início e término do alinhamento. A sequência da cepa CCMA-UFSCar-664 foi incluída no conjunto de sequências selecionadas.

Em seguida, todas as sequências foram realinhadas utilizando MAFFT, seguindo a mesma abordagem utilizada para o gene *18S rRNA*. Para padronizar o alinhamento, realizou-se poda nas extremidades das sequências, eliminando gaps localizados nas posições 1-86 (início) e 763-848 (final). A sequência HQ246367.1 foi removida por apresentar comprimento menor e ausência de correspondência com as posições iniciais do alinhamento.

Posteriormente, o alinhamento foi inspecionado e ajustado manualmente no UGENE v.52.1 (Okonechnikov et al., 2012), com pequenas edições de gaps para otimizar a correspondência entre sequências. O alinhamento múltiplo final resultou em 676 caracteres,

correspondendo ao alinhamento global utilizado para análises subsequentes.

4.6.2.2 Inferência filogenética

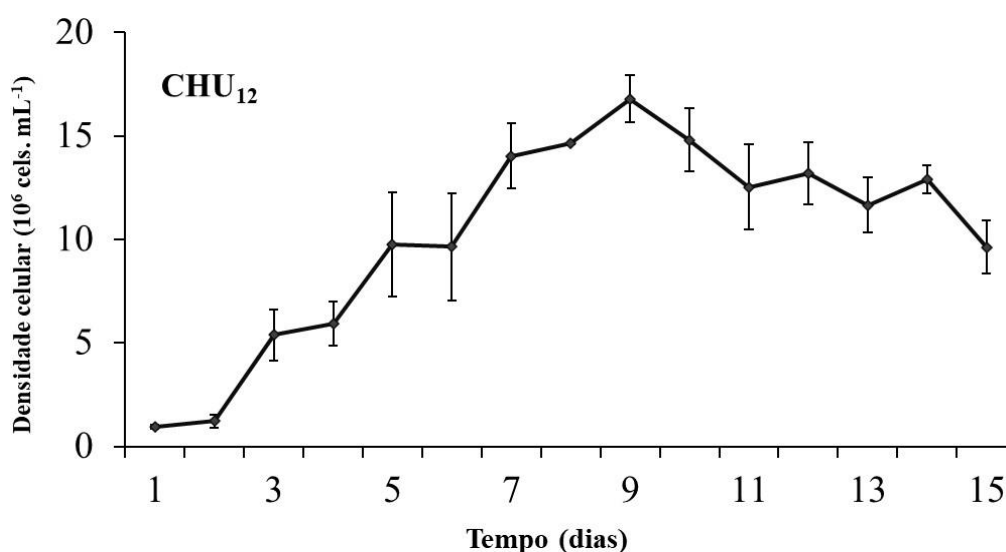
A filogenia do gene *tufA* também foi construída no IQ-TREE v.3.0.1 (Wong et al., 2025), utilizando o alinhamento múltiplo correspondente. O modelo de substituição nucleotídica foi igualmente selecionado automaticamente pelo ModelFinder, executado no modo MFP (ModelFinder Plus), que testa múltiplos modelos de acordo com o *Bayesian Information Criterion* (BIC). O melhor modelo ajustado foi HKY+R3 (BIC = 11111.034). Assim como na análise do *18S rRNA*, a robustez dos agrupamentos foi avaliada por 1000 replicatas de *ultrafast bootstrap* e pelo teste SH-aLRT (1000 replicatas). A árvore final foi visualizada e editada no iTOL v6 (Letunic; Bork, 2007), sendo reenraizada com representantes de Selenastraceae e gêneros relacionados a *Tetrademus* (Scenedesmaceae) como grupo externo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perfil de crescimento da cepa em meio CHU₁₂

O padrão de crescimento observado na Figura 5 foi compatível com o descrito para microalgas clorofíceas, incluindo espécies de *Monoraphidium*. Em cultivos em batelada, essas microalgas apresentam as fases lag, exponencial, estacionária e de senescência. No presente estudo, a fase lag ocorreu entre os dias 0 e ~2, com densidade mantida próxima de 1×10^6 células·mL⁻¹, indicando o período de adaptação fisiológica das células às condições do meio CHU₁₂, no qual ocorre reorganização metabólica e síntese inicial de componentes essenciais para a divisão celular (Richmond; Hu, 2013).

Figura 5. Curva de crescimento da cepa *Monoraphidium* sp. (CCMA-UFSCar-664) em meio CHU₁₂ ao longo de 15 dias.



Fonte: própria.

A fase exponencial, típica de clorofíceas de metabolismo acelerado (Barsanti; Gualtieri, 2022), foi marcada por divisão celular contínua e elevadas taxas de crescimento, refletidas nos maiores valores de k ($1,28 \text{ div} \cdot \text{dia}^{-1}$) e no menor tempo de duplicação ($T_d = 0,78 \text{ dia}$) (Tabela 1). Entre os dias 9 e 10, o cultivo atingiu estabilização da densidade celular, caracterizando a fase estacionária, que ocorre quando nutrientes começam a se tornar limitantes e há acúmulo de metabólitos, reduzindo a taxa de divisão e mantendo o crescimento

constante.

Tabela 1. Parâmetros cinéticos de crescimento da cepa *Monoraphidium* sp. (CCMA-UFSCar-664) em meio CHU₁₂. A fase exponencial apresentou a maior taxa de crescimento específica ($k = 1,28 \text{ div} \cdot \text{dia}^{-1}$) e o menor tempo de duplicação ($T_d = 0,78 \text{ dia}$), seguido pela fase estacionária, com redução gradual de k e aumento de T_d ao longo do cultivo.

Dias do cultivo	$K \text{ (div} \cdot \text{dia}^{-1})$	$T_d \text{ (dias)}$	$\text{Div} \cdot \text{di a}^{-1}$	$\text{Div} \cdot \text{h}^{-1}$
3	1,28	0,78	1,85	44,32
6	0,68	1,46	0,98	23,54
9	0,53	1,90	0,76	18,35
12	0,35	2,85	0,50	12,12
15	0,24	4,10	0,35	8,31

Fonte: própria.

A partir do 10º dia teve início a fase de senescência, marcada pelo aumento do estresse fisiológico, depleção nutricional e perda de integridade celular, resultando na redução da densidade para cerca de $10 \times 10^6 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$ no 15º dia. Esse processo foi acompanhado pela queda da taxa de crescimento (0,68 para $0,24 \text{ div} \cdot \text{dia}^{-1}$) e pelo aumento do tempo de duplicação (1,46 para 4,10 dias), indicando redução progressiva da capacidade de multiplicação celular.

De modo geral, o cultivo seguiu o padrão clássico de crescimento microalgal e refletiu o comportamento esperado para espécies de *Monoraphidium* (Barsanti; Gualtieri, 2022; Richmond; Hu, 2013).

5.2 Extração do DNA genômico

5.2.1 Extração em kit comercial (Q1)

A extração com o kit comercial (Q1) resultou em concentrações de 339,38 ng/μL e 310,02 ng/μL, suficientes para aplicações como PCR. As razões A260/A280 (1,88) e A260/A230 (1,99-2,02) estão dentro dos valores recomendados para DNA puro ($A_{260}/A_{280} \approx 1,8$; $A_{260}/A_{230} \approx 1,8-2,2$), conforme especificado pelo fabricante do NanoDrop (Thermo Fisher

Scientific, 2025). Tais valores indicam baixa contaminação por proteínas, sais ou compostos orgânicos, confirmando a qualidade do DNA para análises moleculares posteriores.

5.2.2 Extração baseada em CTAB 1 (C1)

O protocolo CTAB 1 (C1) permitiu recuperar DNA detectável, porém com rendimento e pureza inferiores ao kit comercial. As razões A260/A280 (1,63 e 1,73) e A260/A230 (0,83 e 1,32) indicam presença de proteínas e outros contaminantes. Isso pode ter ocorrido porque as microalgas possuem paredes celulares resistentes, dificultando a lise completa, e porque resíduos de polissacarídeos e compostos fenólicos podem ter permanecido após a extração. Além disso, durante a precipitação, é comum que o DNA se agregue junto com esses contaminantes, em um fenômeno conhecido como co-precipitação, reduzindo a pureza final da amostra.

5.2.3 Extração baseada em CTAB 2 (C2)

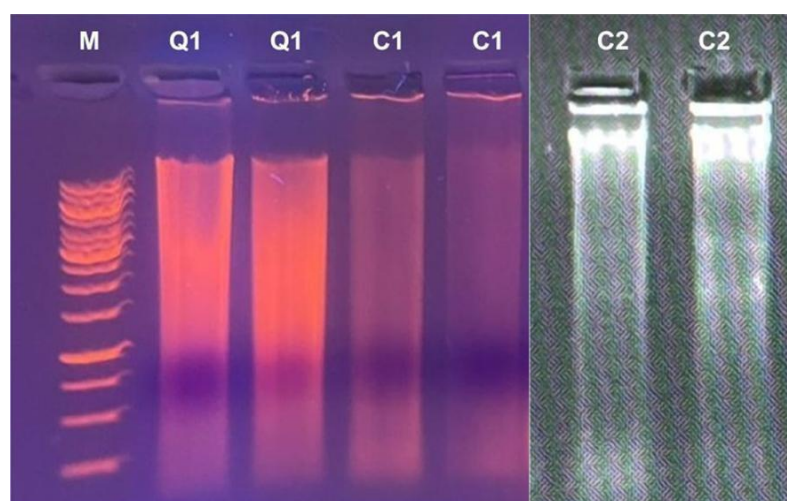
O protocolo CTAB 2 (C2) apresentou os melhores resultados entre os três testados, com concentrações de 2.092,97 ng/μL e 1.359,10 ng/μL, A260/A280 de 2,11 e 2,09 e A260/A230 de 1,93 e 1,89, indicando DNA de alta pureza e rendimento superior. Este desempenho pode ser atribuído à maceração em nitrogênio líquido, que facilitou a ruptura das paredes celulares, bem como a incubação por 60 °C por 25 minutos, que promoveu lise eficiente sem degradar o DNA. Ademais, a utilização de menor quantidade de biomassa e a precipitação controlada com NaCl e etanol gelado minimizaram a co-precipitação de contaminantes, resultando em amostras com mínima presença de proteínas e sais. Em comparação ao protocolo C1, o C2 demonstrou ser mais rápido e menos intensivo, evidenciando que ajustes nos parâmetros de lise e na preparação da amostra podem melhorar significativamente a qualidade e o rendimento do DNA em *Monoraphidium*.

5.3 Integridade do DNA genômico

A análise em gel de agarose (Figura 6) permitiu comparar a integridade do DNA obtido pelos diferentes métodos de extração. As

amostras do kit comercial (Q1) apresentaram uma banda intensa em região inferior do gel, enquanto a área correspondente ao DNA de alta massa molecular exibiu baixa intensidade. Esse padrão indica predominância de moléculas pequenas, como RNA residual ou DNA fragmentado.

Figura 6 - Perfil eletroforético do DNA genômico extraído pelos diferentes métodos. Q1: kit comercial, mostrou bandas intensas em baixo peso molecular, indicando fragmentação ou RNA residual; C1: protocolo CTAB 1, padrão semelhante a Q1; C2: protocolo CTAB 2, bandas nítidas em alta massa molecular, caracterizando DNA íntegro.



Fonte: própria.

O protocolo CTAB 1 (C1) mostrou comportamento semelhante, com sinal reduzido na região superior e maior intensidade nas regiões inferiores, sugerindo degradação ou presença de RNA não removido durante o processo de purificação.

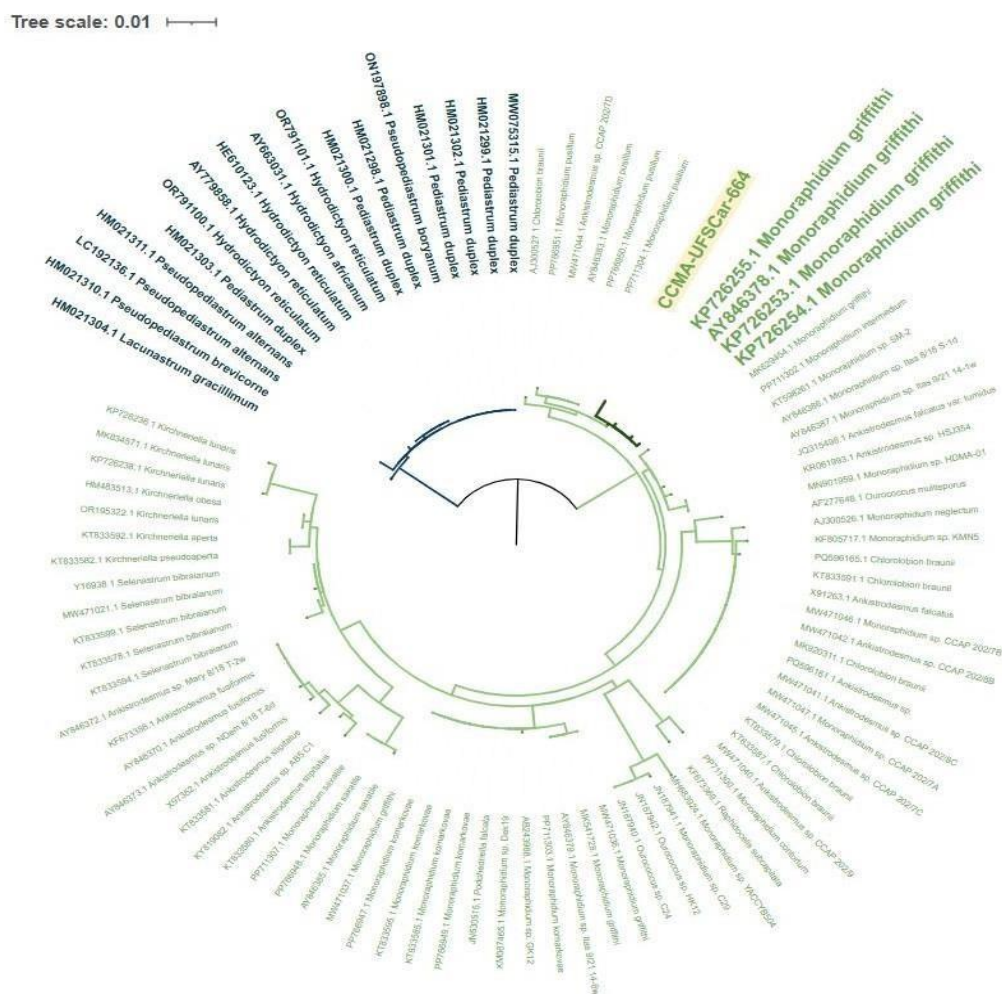
Em contraste, as amostras obtidas pelo protocolo CTAB 2 (C2) apresentaram bandas bem definidas e concentradas na região de maior massa molecular, sem formação de smear ou bandas inferiores visíveis. Esse perfil é característico de DNA genômico íntegro, indicando preservação da estrutura de alto peso molecular. Dessa forma, conforme ilustrado na Figura 6, o protocolo C2 foi o único método capaz de fornecer DNA claramente íntegro entre os avaliados.

5.4 Análises moleculares

5.4.1 Gene 18S *rRNA*

A análise filogenética baseada no gene *18S rRNA* posicionou a cepa CCMA-UFSCar-664 em um clado fortemente suportado (bootstrap = 93), juntamente com quatro cepas de *Monoraphidium griffithii* (Figura 7). A sequência obtida apresentou 99% de similaridade com *M. griffithii* strain AN7-8 (AY846378.1), indicando uma estreita relação filogenética entre essas cepas.

Figura 7. Árvore filogenética de *Monoraphidium* sp. (CCMA-UFSCar-664) a partir da análise do gene 18S *rRNA*. A árvore foi reenraizada utilizando representantes da família Hydrodictyaceae como grupo externo.



Fonte: Elaborada pelo autor, com visualização e edição no iTOL v6 (Letunic; Bork, 2007).

5.4.2 Gene *tufA*

Em contraste, a utilização do gene *tufA* como marcador molecular indicou uma relação filogenética distinta. A cepa CCMA-UFSCar-664 agrupou-se com cepas de *Monoraphidium pusillum*, formando um clado com alto suporte (bootstrap = 97) (Figura). A sequência de *tufA* apresentou

99% de similaridade com *Monoraphidium pusillum* (PP935694.1), sugerindo uma relação filogenética distinta daquela observada para o marcador 18S *rRNA*. Esses resultados evidenciam a incongruência entre os genes analisados.



Fonte: Elaborada pelo autor, com visualização e edição no iTOL v6 (Letunic; Bork, 2007).

A divergência observada entre os genes *18S rRNA* e *tufA* evidencia uma incongruência filogenética na identificação da cepa CCMA-UFSCar-664. Enquanto a análise do *18S rRNA* agrupou a cepa com *M. griffithii*, o marcador *tufA* indicou uma relação mais próxima com *M. pusillum*. A identificação de espécies no gênero *Monoraphidium* é complexa devido às semelhanças morfológicas entre espécies próximas, o que limita a

diferenciação baseada exclusivamente em características morfológicas (Lee et al., 2025).

Além disso, estudos indicam que o gene *18S rRNA* pode ser praticamente idêntico entre espécies próximas. Fawley et al. (2006), ao avaliarem a confiabilidade do conceito de morfoespécies na família Selenastraceae, demonstraram que isolados identificados como espécies distintas morfológicamente frequentemente apresentavam sequências de *18S* quase idênticas. No caso de *Monoraphidium griffithii* e *Monoraphidium pusillum*, algumas cepas apareceram no mesmo clado ou extremamente próximas na árvore filogenética do *18S rRNA*, evidenciando que esse marcador, por ser altamente conservado, apresenta baixa resolução para diferenciar espécies próximas. Esses achados reforçam a necessidade de utilizar marcadores mais variáveis em estudos filogenéticos, especialmente em gêneros com semelhanças morfológicas sutis.

Nesse contexto, a utilização de múltiplos marcadores moleculares é, portanto, fundamental. Regiões mais variáveis, como *ITS* e o gene *rbcL*, demonstram maior capacidade de discriminar espécies próximas, sendo a região *ITS* apontada como um dos marcadores mais eficazes para identificação de espécies dentro do gênero *Monoraphidium* (Garcia da Silva et al., 2017). A combinação de diferentes marcadores permite uma análise mais robusta, minimizando ambiguidades que podem surgir quando apenas genes conservados são utilizados.

Diante disso, os resultados deste trabalho reforçam que a delimitação de espécies em *Monoraphidium* não deve se basear em um único marcador molecular. Para uma identificação taxonômica robusta da cepa CCMA-UFSCar- 664, recomenda-se uma abordagem polifásica, integrando dados moleculares de maior resolução (*rbcL* e *ITS*) com caracterização morfológica e ultraestrutural detalhada.

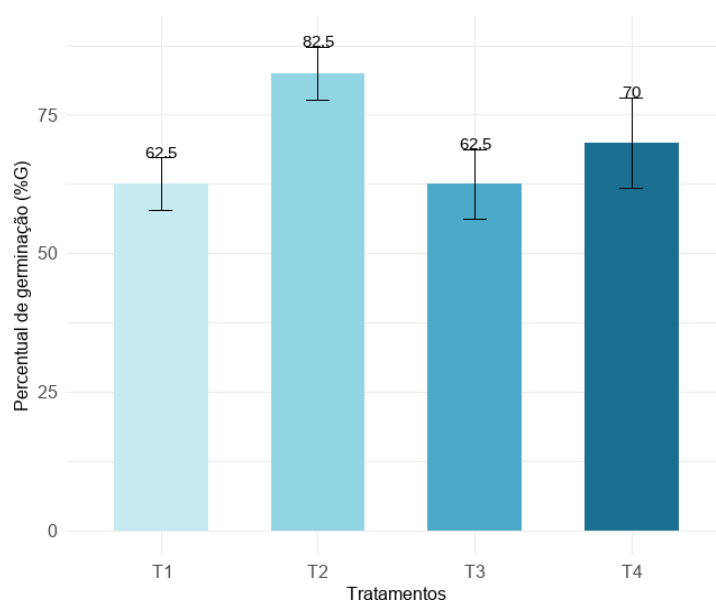
5.6 Teste de germinação na semente do tomate-cereja

5.6.1 Percentual de germinação (%G)

A análise de variância (ANOVA) não indicou diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$). Apesar disso, observa-se que T2 (10 mg

L⁻¹) apresentou a maior média de germinação (82,5%), seguido de T4 (70%), ambas superiores ao controle (T1, 62,5%). O tratamento T3 (20 mg L⁻¹) exibiu média idêntica à do controle, indicando que nenhuma das concentrações testadas de biomassa microalgal reduziu a germinação (Figura 9).

Figura 9 - Percentual de germinação (%G) de sementes de tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) submetidas a diferentes concentrações de biomassa microalgal. T1: controle; T2: 10 mg L⁻¹; T3: 20 mg L⁻¹; T4: 40 mg L⁻¹.



Fonte: própria, elaborada no RStudio.

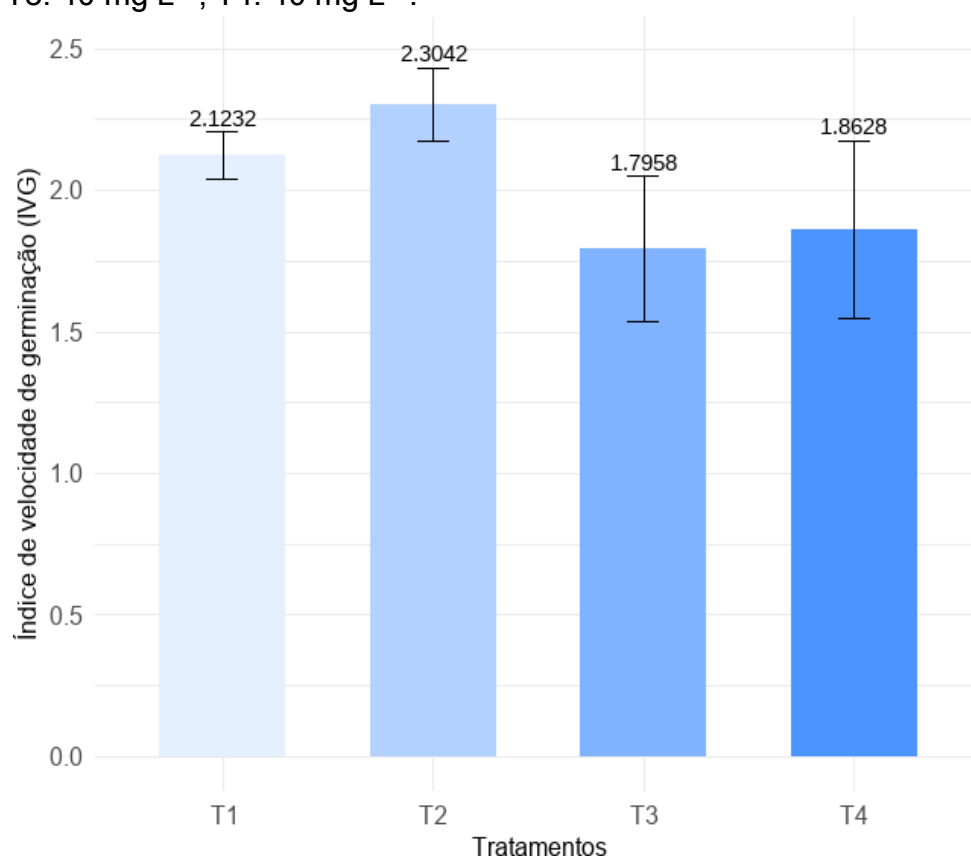
A ausência de significância estatística sugere que o percentual de germinação é um parâmetro altamente variável, influenciado por fatores internos da semente e pelas condições experimentais, tornando seus incrementos menos consistentes do que aqueles observados em estádios posteriores do desenvolvimento (Bulgari et al., 2015). Dessa forma, os valores obtidos sugerem apenas uma tendência de aumento em alguns tratamentos, sem evidências suficientes para concluir que há diferenças relevantes entre eles (Figura 9).

5.6.2 Índice de velocidade de germinação (IVG)

O índice de velocidade de germinação (IVG) também não

apresentou diferença estatística entre os tratamentos, conforme indicado pela ANOVA ($p = 0,383$). Ainda assim, observa-se um padrão semelhante ao verificado no percentual de germinação: T2 (10 mg L^{-1}) apresentou a maior média de IVG (aproximadamente 2,30), seguido pelo controle T1 (aproximadamente 2,12). Já os tratamentos T3 (aproximadamente 1,80) e T4 (aproximadamente 1,86) exibiram valores mais baixos (Figura 10).

Figura 10. Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de tomate- cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) submetidas a diferentes concentrações de biomassa microalgal. T1: controle; T2: 20 mg L^{-1} ; T3: 40 mg L^{-1} ; T4: 40 mg L^{-1} .



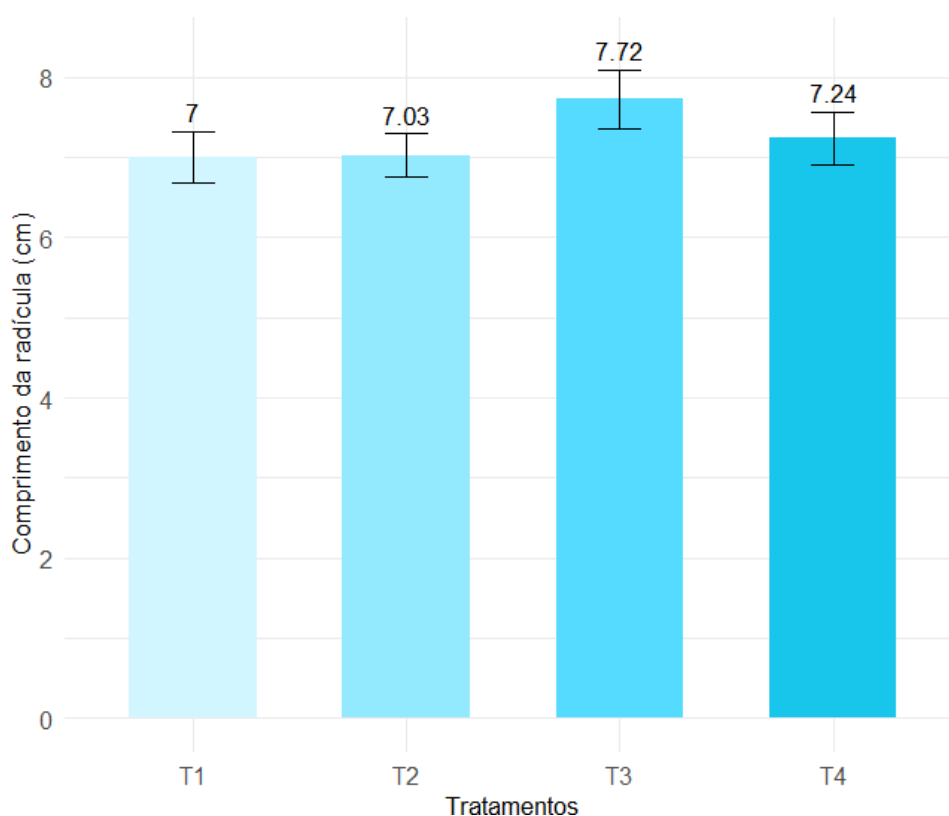
Fonte: própria, elaborada no RStudio.

Embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa, observou-se uma tendência de aceleração da germinação em T2, refletida pelo maior índice de velocidade de germinação. Esse efeito pode estar associado à presença de compostos bioativos na biomassa microalgal, como fitohormônios e polissacarídeos, que já foram relatados como capazes de acelerar a emergência radicular e cotiledonar em sementes (Garcia-Gonzalez; Sommerfeld, 2016).

5.6.3 Comprimento da radícula

Embora o tratamento T3 (20 mg L⁻¹) tenha apresentado o maior comprimento médio de radícula (aproximadamente 7,72 cm), seguido por T4 (aproximadamente 7,24 cm), essas diferenças não foram significativas em relação ao controle (aproximadamente 7,00 cm), conforme o *p*-valor de 0,361 (Figura 11).

Figura 11. Comprimento da radícula de sementes de tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) submetidas a diferentes concentrações de biomassa microalgal. T1: controle; T3: 20 mg L⁻¹; T4: 40 mg L⁻¹.



Fonte: própria, elaborada no RStudio.

Essa ausência de efeito estatístico sugere que o alongamento radicular nas primeiras etapas da germinação é predominantemente controlado por processos internos da semente, como mobilização de reservas, turgor e regulação hormonal, e tende a ser pouco sensível a variações externas moderadas durante esse período inicial (Bewley;

Bradford; Hilhorst, 2012).

Além disso, o período de embebição adotado (24 h) pode não ter sido suficiente para que diferenças decorrentes da exposição à biomassa microalgal se manifestassem de forma robusta no crescimento da radícula, já que respostas morfológicas nessa fase geralmente emergem de forma gradual. A leve tendência de maiores valores em T3 e T4 não superou a variabilidade natural do parâmetro, o que explica a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.

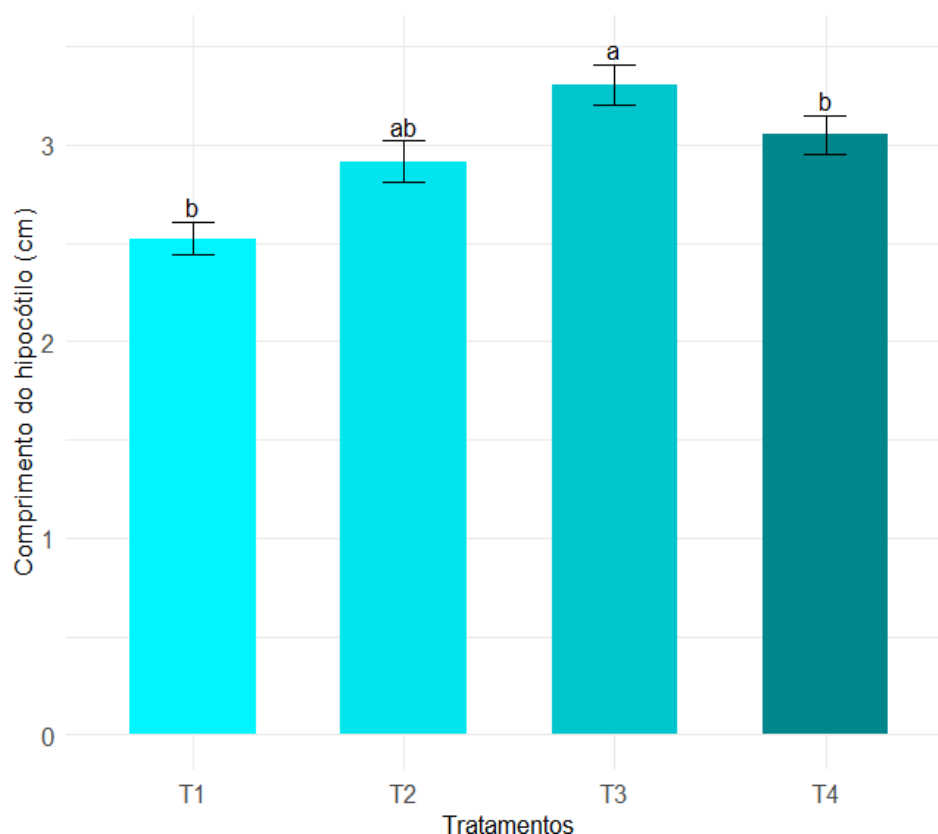
5.6.4 Comprimento do hipocótilo

O teste de Kruskal-Wallis indicou diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,001$), demonstrando que o comprimento do hipocótilo foi influenciado pela aplicação da biomassa microalgal (Figura 12). O pós-teste de Dunn mostrou que o tratamento T3 apresentou o maior comprimento médio, diferindo significativamente do controle (T1) e de T2. O tratamento T4 também exibiu média superior ao controle, embora sem diferença significativa em relação a T3. O controle apresentou o menor comprimento médio, enquanto T2 manteve valores intermediários, não diferindo estatisticamente de T1.

Estruturas da parte aérea inicial, como o hipocótilo, são mais sensíveis a estímulos externos do que o sistema radicular nos primeiros estágios de germinação (Bewley; Bradford; Hilhorst, 2012; González et al., 2013). Compostos bioativos presentes na biomassa microalgal, incluindo auxinas, citocininas e polissacarídeos, podem estimular o alongamento do hipocótilo, promovendo maior crescimento nesta fase inicial (El-Shazoly et al., 2025; Garcia- Gonzalez; Sommerfeld, 2016).

Dessa forma, os resultados indicam que T3 e T4 favoreceram o alongamento inicial do hipocótilo, sugerindo um efeito positivo da biomassa microalgal nesta etapa do desenvolvimento, mesmo que não tenham impactado significativamente o crescimento radicular.

Figura 12. Comprimento do hipocótilo de sementes de tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) submetidas a diferentes concentrações de biomassa microalgal. T1: controle; T2: 10 mg L⁻¹; T3: 20 mg L⁻¹; T4: 40 mg L⁻¹.



Fonte: própria, elaborada no RStudio.

5.7 Teste em planta

5.7.1 Comprimento da parte aérea

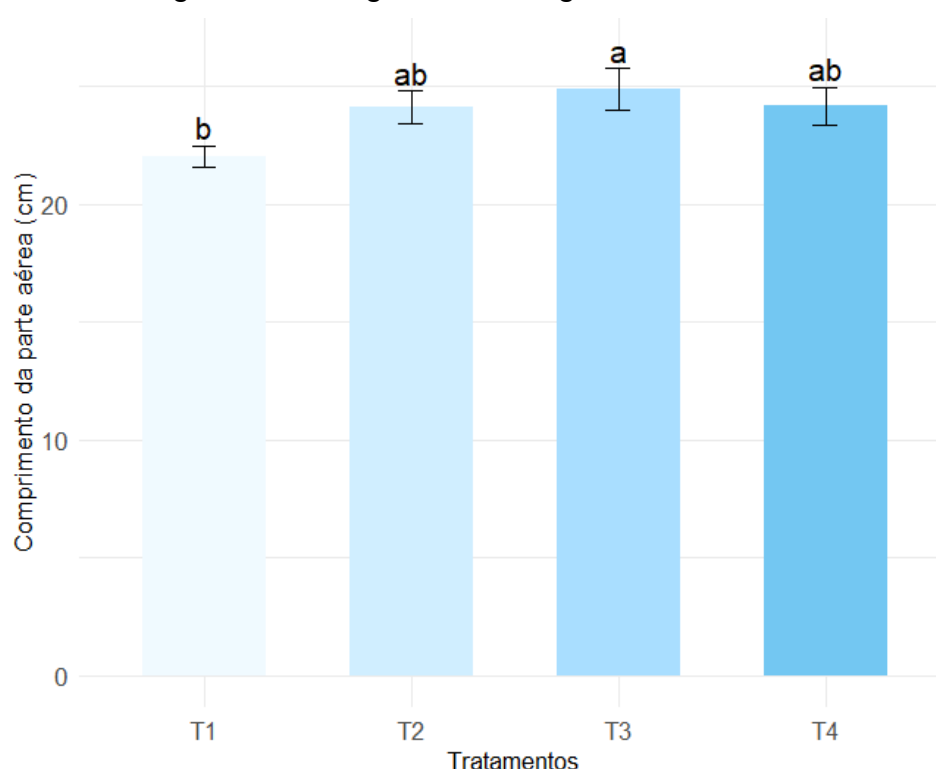
O comprimento da parte aérea das plântulas apresentou tendência de aumento com a aplicação foliar de biomassa microalgal ($p = 0,0516$). T3 apresentou a maior média, enquanto T1 teve a menor, com T2 e T4 valores intermediários; o teste de Tukey indicou diferença apenas entre T3 e T1 (Figura 13).

O crescimento da parte aérea pode ser atribuído ao contato direto dos bioativos da microalga com a epiderme das folhas e do caule, estimulando divisão e expansão celular (Bulgari et al., 2015; Garcia-Gonzalez; Sommerfeld, 2016). Diferentemente do hipocótilo, cujo alongamento ocorre rapidamente a partir do tecido embrionário, o crescimento do caule e folhas é mais gradual e depende da absorção foliar

de compostos bioativos.

Mesmo não sendo significativo ao nível de 5%, os resultados sugerem que a aplicação foliar de biomassa microalgal favoreceu o desenvolvimento da parte aérea das plântulas.

Figura 13. Comprimento da parte aérea de plântulas de tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) cultivadas em vasos e submetidas a diferentes concentrações de biomassa microalgal. T1: controle; T2: 1,0 g L⁻¹; T3: 1,5 g L⁻¹; T4: 2,0 g L⁻¹.



Fonte: própria, elaborada no RStudio.

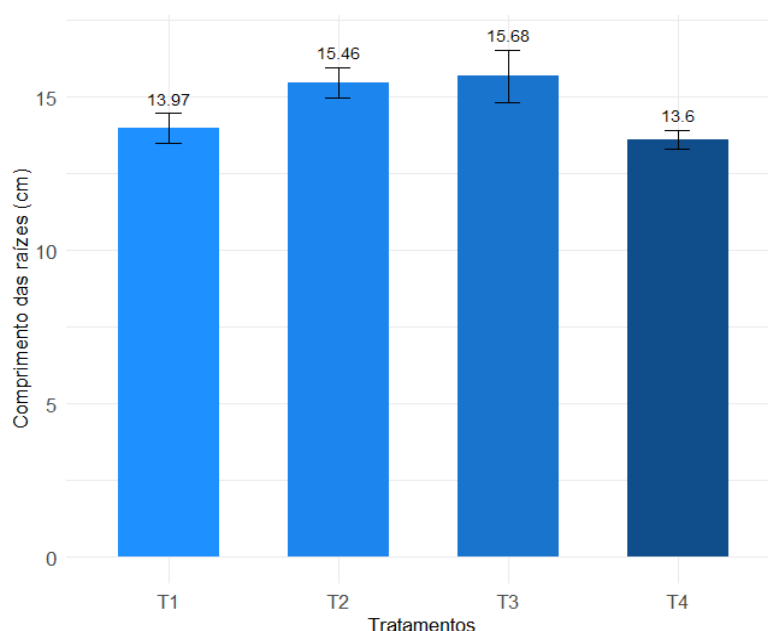
5.7.2 Comprimento das raízes

Os dados do comprimento das raízes das plântulas de tomate-cereja apresentaram normalidade, mas não atenderam à homocedasticidade, sendo analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. O teste indicou diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,03512$). Entretanto, o pós-teste de Dunn com correção de Bonferroni não identificou diferenças significativas entre pares de tratamentos (Figura 14), sugerindo que, embora haja variação global entre os grupos, não foi possível determinar quais tratamentos se diferenciam especificamente.

A ausência de diferenças claras entre os tratamentos pode estar

relacionada ao controle limitado de fatores ambientais, como intensidade de luz, temperatura, disponibilidade de água e volume do vaso, que influenciam o crescimento radicular. Além disso, o desenvolvimento das raízes nas primeiras fases é mais lento e menos responsivo a estímulos externos imediatos, e um período experimental mais longo poderia ter permitido observar efeitos mais consistentes da aplicação de biomassa microalgal no comprimento radicular.

Figura 14. Comprimento das raízes de plântulas de tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* var. cerasiforme) cultivadas em vasos e submetidas a diferentes concentrações de biomassa microalgal. T1: controle; T2: 1,0 g L⁻¹; T3: 1,5 g L⁻¹; T4: 2,0 g L⁻¹.

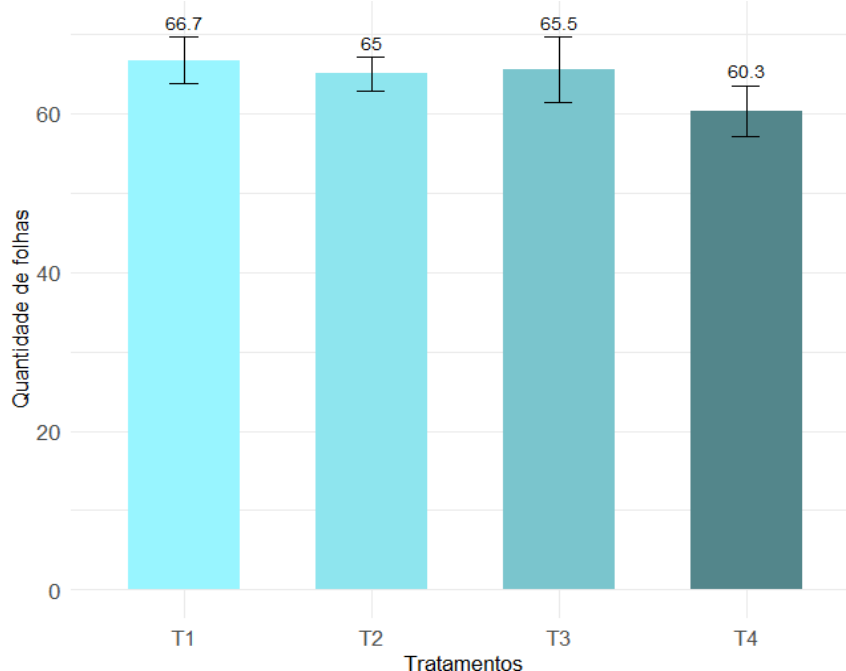


Fonte: própria, elaborada no RStudio.

5.7.3 Número de folhas

Os dados apresentaram normalidade e homocedasticidade, e a ANOVA não indicou diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,515$) (Figura 15). A ausência de efeito pode estar relacionada ao início tardio das pulverizações, realizadas quando as plântulas atingiram aproximadamente 7 cm de altura.

Figura 15. número de folhas de plântulas de tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* var. cerasiforme) submetidas a diferentes concentrações de biomassa microalgal. T1: controle; T2: 1,0 g L⁻¹; T3: 1,5 g L⁻¹; T4: 2,0 g L⁻¹.



Fonte: própria, elaborada no RStudio.

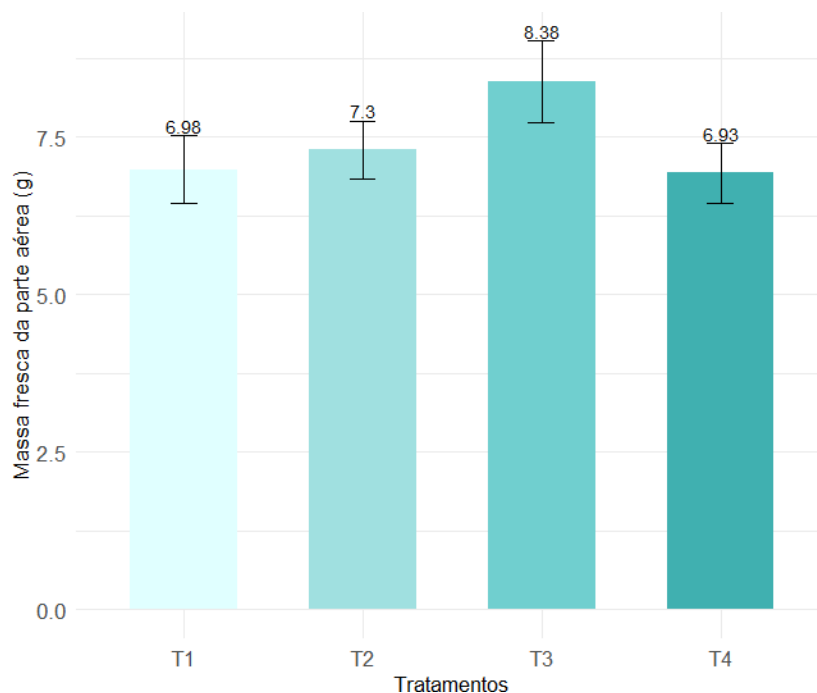
5.7.4 Massa seca e massa fresca

5.7.4.1 Parte aérea

A aplicação de biomassa microalgal não promoveu diferenças significativas na massa fresca na massa seca da parte aérea das plântulas de tomate-cereja. Os dados apresentaram normalidade e homocedasticidade.

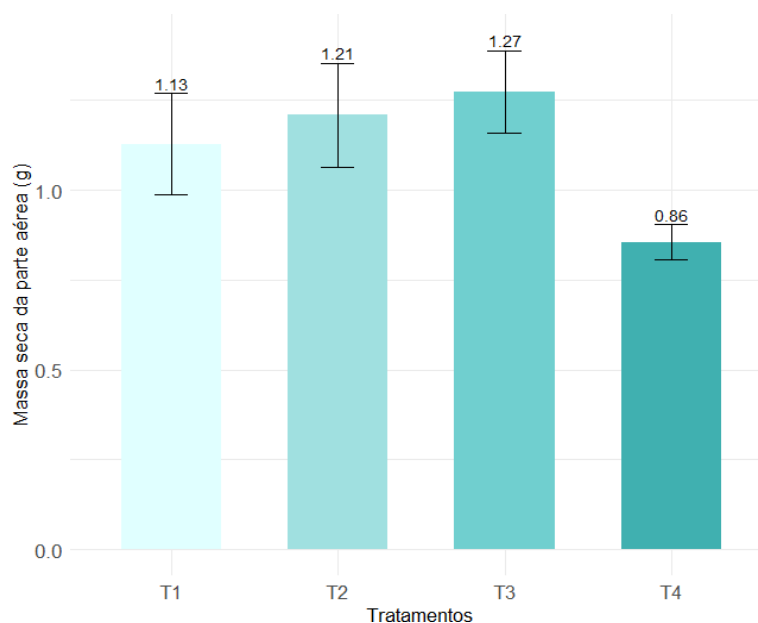
Para a massa fresca, a ANOVA indicou $p = 0,21$ (Figura 16), enquanto para a massa seca $p = 0,0828$ (Figura 17). A massa fresca, altamente sensível a variações momentâneas de hidratação e transpiração, pode ter apresentado alta variabilidade fisiológica entre as plântulas, mascarando efeitos sutis do tratamento. A massa seca, refletindo o acúmulo gradual de biomassa, apresentou uma leve tendência de aumento ($p < 0,1$), mas sem diferença significativa. A ausência de efeito mais consistente pode estar relacionada ao controle limitado de fatores ambientais, como intensidade de luz, temperatura e quantidade de água por vaso. Um período experimental mais longo poderia ter permitido que os efeitos da aplicação foliar se manifestassem de forma mais clara na biomassa da parte aérea.

Figura 16. Massa fresca da parte aérea de plântulas de tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* var. cerasiforme) submetidas a diferentes concentrações de biomassa microalgal. T1: controle; T2: 1,0 g L⁻¹; T3: 1,5 g L⁻¹; T4: 2,0 g L⁻¹.



Fonte: própria, elaborada no RStudio.

Figura 17. Massa seca da parte aérea de plântulas de tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* var. cerasiforme) submetidas a diferentes concentrações de biomassa microalgal. T1: controle; T2: 1,0 g L⁻¹; T3: 1,5 g L⁻¹; T4: 2,0 g L⁻¹.

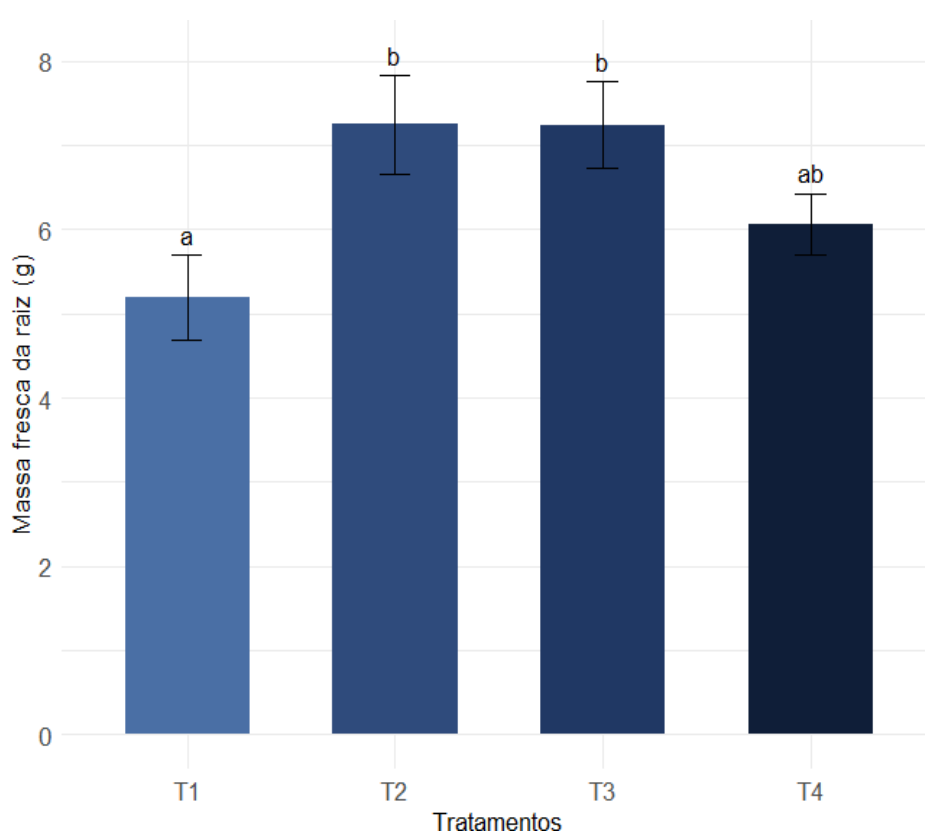


Fonte: própria, elaborada no RStudio.

5.7.4.2 Raiz

A aplicação de biomassa microalgal promoveu diferenças significativas na massa fresca das raízes das plântulas de tomate-cereja (ANOVA, $p = 0,0149$), com T2 ($1,0 \text{ g L}^{-1}$) e T3 ($1,5 \text{ g L}^{-1}$) apresentando médias superiores ao controle (T1) (Figura 18).

Figura 18. Massa fresca das raízes de plântulas de tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) submetidas a diferentes concentrações de biomassa microalgal. T1: controle; T2: $1,0 \text{ g L}^{-1}$; T3: $1,5 \text{ g L}^{-1}$; T4: $2,0 \text{ g L}^{-1}$.

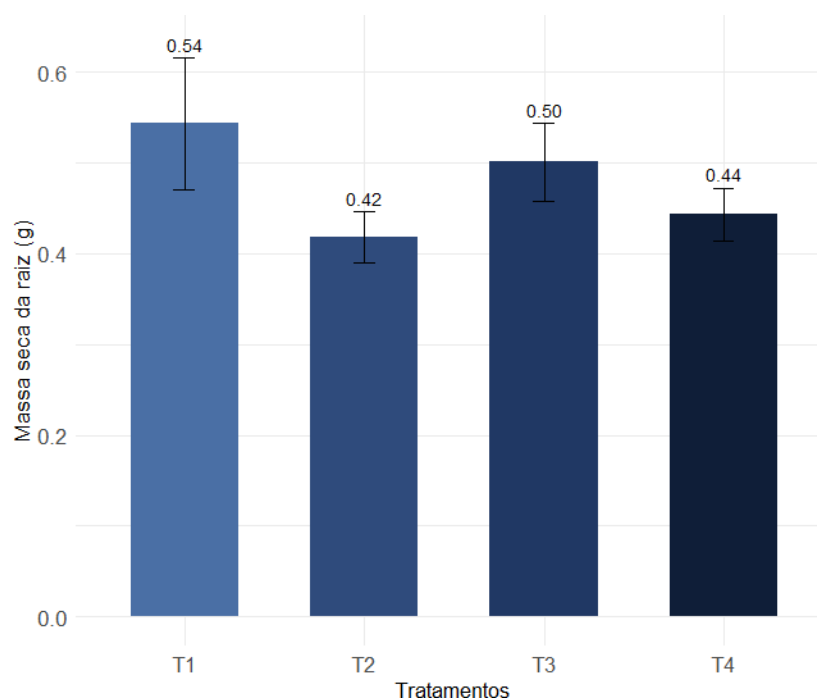


Fonte: própria, elaborada no RStudio.

Esse aumento na massa fresca sugere que concentrações intermediárias da biomassa microalgal podem ter favorecido a hidratação e o desenvolvimento inicial das raízes.

Por outro lado, a massa seca das raízes não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 19), indicando que, embora a biomassa microalgal possa ter promovido maior turgidez e hidratação, isso não se traduziu em aumento efetivo da produção de tecido radicular.

Figura 19. Massa seca das raízes de plântulas de tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) submetidas a diferentes concentrações de biomassa microalgal. T1: controle; T2: 1,0 g L⁻¹; T3: 1,5 g L⁻¹; T4: 2,0 g L⁻¹.



Fonte: própria, elaborada no RStudio.

A variabilidade observada tanto na massa fresca quanto na massa seca pode ter sido influenciada por fatores ambientais, como intensidade de luz, temperatura, disponibilidade de água e volume do vaso. Além disso, erros experimentais, como variações na pesagem, manipulação das amostras e pequenas diferenças na retirada de água superficial das raízes antes da secagem, podem ter contribuído para a dispersão dos dados. Um período experimental mais longo, maior número de repetições e condições ambientais mais controladas poderiam evidenciar melhor o efeito da biomassa microalgal sobre o crescimento radicular das plântulas.

6. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a curva de crescimento em meio CHU₁₂ evidenciou a adequada adaptação da cepa CCMA-UFSCar-664, permitindo determinar o ponto ótimo de coleta, a biomassa disponível para os experimentos subsequentes, bem como sua taxa de crescimento e tempo de duplicação ao longo de 15 dias.

Na avaliação do efeito da biomassa microalgal sobre a germinação de sementes de tomate-cereja, verificou-se que, embora o percentual de germinação (%G) e o índice de velocidade de germinação (IVG) não tenham diferido significativamente entre os tratamentos, algumas concentrações favoreceram o alongamento do hipocótilo, indicando efeito positivo no desenvolvimento inicial das sementes.

Nos experimentos com plântulas, a aplicação de biomassa microalgal promoveu incrementos no crescimento da parte aérea e na massa fresca das raízes, principalmente em concentrações intermediárias, reforçando o potencial bioestimulante da cepa. Estudos futuros poderiam se beneficiar de maior duração experimental, avaliação até o estágio de frutificação, ampliação da escala dos ensaios e do número de repetições por tratamento, além da aplicação direta da cepa no solo.

Em relação aos procedimentos moleculares, o protocolo de extração C2 apresentou maior eficiência, fornecendo DNA de melhor integridade para PCR e sequenciamento. A identificação molecular com os marcadores *18S rRNA* e *tufA* confirmou a alocação da cepa no gênero *Monoraphidium*, embora sem resolução em nível de espécie, evidenciando a necessidade de marcadores complementares em estudos futuros.

De modo geral, este trabalho atingiu seus objetivos, demonstrando que a cepa CCMA-UFSCar-664 representa uma alternativa promissora para aplicações agronômicas e abre caminhos para aprimoramentos metodológicos e avaliações em maior escala.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Raouf, N.; Al-Homaidan, A. A.; Ibraheem, I. B. M. Microalgae and wastewater treatment. ***Saudi Journal of Biological Sciences***, v. 19, n. 3, p. 257-275, 2012.

Adl, S. M.; Bass, D.; Lane, C. E.; Lukeš, J.; Schoch, C. L.; Smirnov, A.; Agatha, S.; Berney, C.; Brown, M. W.; Burki, F.; Cárdenas, P.; Čepička, I.; Chistyakova, L.; Del Campo, J.; Dunthorn, M.; Edvardsen, B.; Eglit, Y.; Guillou, L.; Hampl, V.; Heiss, A. A.; Hoppenrath, M.; James, T. Y.; Karnkowska, A.; Karpov, S.; Kim, E.; Kolisko, M.; Kudryavtsev, A.; Lahr, D. J. G.; Lara, E.; Le Gall, L.; Lynn, D. H.; Mann, D. G.; Massana, R.; Mitchell, E. A. D.; Morrow, C.; Park, J. S.B; Pawlowski, J. W.; Powell, M. J.; Richter, D. J.; Rueckert, S.; Shadwick, L.; Shimano, S.; Spiegel, F. W.; Torruella, G.; Youssef, N.; Zlatogursky, V.; Zhang, Q. Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. ***Journal of Eukaryotic Microbiology***, v. 66, n. 1, p. 4-119, 2019.

Allen, M. M.; Stanier, R. Y. Selective isolation of blue-green algae from water and soil. ***Microbiology***, v. 51, n. 2, p. 203-209, 1968.

Bagatini, I. L.; Vieira, A. A. H. The Culture Collection of Freshwater Microalgae from the Federal University of São Carlos (CCMA-UFSCar), Brazil. ***SILnews***, n. 80, 07 jun. 2022.

Baldauf, S. L.; Manhart, J. R.; PALMER, J. D. Different fates of the chloroplast *tufA* gene following its transfer to the nucleus in green algae. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, v. 87, n. 14, p. 5317-5321, 1990.

Barros, E. P.; Araújo, A. Agroecologia e transdisciplinaridade: considerações acerca da crítica agroecológica ao enfoque técnico-científico da Revolução Verde. ***Revista Ciências Sociais em Perspectiva***, v. 15, n. 28, p. 83-95, 2016.

Barsanti, L.; Gualtieri, P. ***Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology***. CRC Press, 2022. 392 p.

Bewley, J. D.; Bradford, K.; Hilhorst, H.; Nonogaki, H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. New York: Springer, 2012. 392 p.

Bhardwaj, D.; Ansari, M. W.; Sahoo, R. K.; Tuteja, N. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 66, 2014.

Bischoff, H. C. **Phycological Studies IV**. Austin: University of Texas, 1963. 95 p.

Bonferroni, C. Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità. **Pubblicazioni del R. Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze**, v. 8, p. 3-62, 1936.

Borowitzka, M. A. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 3, p. 743-756, 2013.

Bulgari, R.; Cocetta, G.; Trivellini, A.; Vernieri, P. A. O. L.; Ferrante, A. Biostimulants and crop responses: a review. **Biological Agriculture & Horticulture**, v. 31, n. 1, p. 1-17, 2015.

Bumandalai, O.; Barnett, A.; Bulgan, B.; Lkhagva, O. Effect of *Chlorella vulgaris* as a biofertilizer on germination of tomato and cucumber seeds. **International Journal of Aquatic Biology**, v. 7, n. 2, p. 95-99, 2019.

Castro, I. M. P.; Gomes, R. P.; Silva, A. L.; Pereira, T. F.; Santos, J. H. C.; Vieira, M. A. C.; Amaral, A. C. The effects of microalgae use as a biofertilizer on soil and plant before and after its anaerobic (co-) digestion with food waste. **Science of the Total Environment**, v. 934, p. 173301, 2024.

Chanquia, S. N.; Vernet, G.; Kara, S. Photobioreactors for cultivation and synthesis: Specifications, challenges, and perspectives. **Engineering in Life Sciences**, v. 22, n. 12, p. 712-724, 2022.

Chu, S. P. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae: part I. Methods and culture media. **The Journal of Ecology**, p. 284-325, 1942.

Cipriani, D. S.; do Nascimento, S. C.; Melo, G. L. Mulch as a technique to improve the production of cherry tomato in conventional planting system. **Revista Sítio Novo**, v. 4, n. 3, p. 88-96, 2020.

Da Costa Santos, J.; Santos, M. I. G. Consequências do uso de agrotóxicos na agricultura: uma revisão bibliográfica. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 10, p. e111121043556, 2023.

Da Silva, A. F. G.; Barbosa, K. D. A.; Silva, A. F.; Cruz, J. E. Potencial dos bioinsumos para a agricultura sustentável: uma análise a partir de suas características, conceitos e vantagens. **Revista Mirante** (ISSN 1981-4089), v. 17, n. 2, p. 250-265, 2024.

Da Silva, J. M.; Dalbon, V. A.; Alves, A. C.; Ataíde, C. B.; Dos Santos, T. M. C.; Costa, M. E. L.; Montaldo, Y. C. Bioinputs in Sustainable Agriculture: Benefits, Challenges, and Pathways for Resilient Farming Systems. **Asian Journal of Research in Crop Science**, v. 10, n. 2, p. 85-97, 2025.

Díaz, L. E.; Gonzalez, J. D.; Morales-Gonzalez, M. P.; Garzón-Castro, C. L. Harnessing the power of microalgae consortia for sustainable crop production: case study on lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Applied Phycology**, v. 36, n. 6, p. 3273-3286, 2024.

Dias, N. D. S.; Diniz, A. A.; Moraes, P. L. D. D.; Pereira, G. D. S.; Sá, F. V. D. S.; Souza, B. G. D. A.; Ferreira Neto, M. Yield and quality of cherry tomato fruits in hydroponic cultivation. **Biosci. J. (Online)**, p. 1470-1477, 2019.

Dimopoulou, M.; Kolonas, A.; Stagos, D.; Gortzi, O. A Review of the Sustainability, Chemical Composition, Bioactive Compounds, Antioxidant and Antidiabetic Activity, Neuroprotective Properties, and Health Benefits of Microalgae. **Biomass**, v. 5, n. 1, p. 11, 2025.

Doyle, J. J.; Doyle, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, 1987, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.

Ehlers, E. M. O que se entende por agricultura sustentável. **São Paulo**, 1994.

El-Ghamry, A.; Mosa, A. A.; Alshaal, T.; El-Ramady, H. Nanofertilizers vs. biofertilizers: new insights. **Environment, Biodiversity and Soil Security**, v. 2, n. 2018, p. 51-72, 2018.

El-Shazoly, R. M.; Yousef, S.; Hifney, A. F.; Abdel-Wahab, D. A. Effectiveness of Algae as a Low-Cost Alternative Input to Stimulate Sesamum Indicum L. Growth and Productivity for Sustainable Purposes. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 25, n. 3, p. 8006-8025, 2025.

Ewing, B.; Green, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

Fawley, M. W.; Dean, M. L.; Dimmer, S. K.; Fawley, K. P. Evaluating the morphospecies concept in the Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta) 1. **Journal of Phycology**, v. 42, n. 1, p. 142-154, 2006.

Figuera, A.; Reyes, Y.; González, R.; Paula, R.; Basto, L.; Aranda, D. Monitoring the CO₂ consumption of *Monoraphidium* sp. microalgae: Characterization of algal biomass produced. **Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal**, v. 7, n. 2, p. 4, 2016.

Fisher, R. A. **Statistical methods for research workers**. Londres: Oliver & Boyd, 1934.

Nobbe, F.; Hiltner, L. **Inoculation of the soil for cultivating leguminous plants**. US570813A, 1896.

Ganeson, Y.; Paramasivam, P.; Palanisamy, K. M.; Govindan, N.; Maniam, G. P. LCMS and FTIR profiling of microalga *Chlorella* sp. for cosmetics and skin care applications. **Cleaner Water**, v. 2, p. 100028, 2024.

Garcia da Silva, T.; Bock, C.; Sant'Anna, C. L.; Bagatini, I. L.; Wodniok, S.; Vieira, A. A. H. Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae): *rbcL*, *18S rDNA* and *ITS-2* secondary structure enlightens traditional taxonomy, with description of two new

genera, *Messastrum* gen. nov. and *Curvastrum* gen. nov. **Fottea**, v. 17, n. 1, p. 1-19, 2017.

Garcia-Gonzalez, J.; Sommerfeld, M. Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. **Journal of applied phycology**, v. 28, n. 2, p. 1051-1061, 2016.

Gonçalves, A. L. The use of microalgae and cyanobacteria in the improvement of agricultural practices: a review on their biofertilising, biostimulating and biopesticide roles. **Applied Sciences**, v. 11, n. 2, p. 871, 2021.

Gonçalves, J.; Freitas, J.; Fernandes, I.; Silva, P. Microalgae as biofertilizers: a sustainable way to improve soil fertility and plant growth. **Sustainability**, v. 15, n. 16, p. 12413, 2023.

González, A.; Castro, J.; Vera, J.; Moenne, A. Seaweed oligosaccharides stimulate plant growth by enhancing carbon and nitrogen assimilation, basal metabolism, and cell division. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 2, p. 443-448, 2013.

Gordon, D.; Abajian, C.; Green, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998.

Gouveia, L.; Oliveira, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 269-274, 2009.

Guerrero-Cabrera, L.; Rueda, J. A.; García-Lozano, H.; Navarro, A. K. Cultivation of *Monoraphidium* sp., *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. algae in Batch culture using Nile tilapia effluent. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 455-460, 2014.

Guillard, R. R.; Lorenzen, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllide c. **Journal of Phycology**, v. 8, n. 1, 1972.

Guinart, C. tufA gene as molecular marker for freshwater Chlorophyceae. **Algae**, 2016.

Guiry, M. D.; Guiry, G. M. **AlgaeBase**. Disponível em: <https://www.algaebase.org/>. Acesso em: 10 dez. 2025.

Hawrot-Paw, M.; Koniuszy, A.; Gałczyńska, M. Sustainable production of *Monoraphidium* microalgae biomass as a source of bioenergy. **Energies**, v. 13, n. 22, p. 5975, 2020.

Hegewald, E.; Bock, C.; Krienitz, L. A phylogenetic study on Scenedesmaceae with the description of a new species of Pectinodesmus and the new genera Verrucodesmus and Chodatodesmus (Chlorophyta, Chlorophyceae). **Fottea**, v. 13, n. 2, p. 149-164, 2013.

Hemming, S. Feije de Zwart, A.; Elings, A.; Petropoulou, A.; Righini, I. Cherry tomato production in intelligent greenhouses—sensors and AI for control of climate, irrigation, crop yield, and quality. **Sensors**, v. 20, n. 22, p. 6430, 2020.

Hess, S. C.; Nodari, R. O. Agrotóxicos no Brasil: panorama dos produtos aprovados entre 2019 e 2022. **Ambientes em Movimento**, v. 2, n. 2, 2022.

Jimenez, R.; Markou, G.; Tayibi, S.; Barakat, A.; Chapsal, C.; Monlau, F. Production of microalgal slow-release fertilizer by valorizing liquid agricultural digestate: growth experiments with tomatoes. **Applied Sciences**, v. 10, n. 11, p. 3890, 2020.

Jurado-Flores, A.; Heredia-Martínez, L. G.; Torres-Cortes, G.; Díaz-Santos, E. Harnessing microalgae and cyanobacteria for sustainable agriculture: mechanistic insights and applications as biostimulants, biofertilizers and biocontrol agents. **Agriculture**, 2025.

Katoh, K.; Misawa, K.; Kuma, K. I.; Miyata, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 14, p. 3059-3066, 2002.

Kaushal, P.; Ali, N.; Saini, S.; Pati, P. K.; Pati, A. M. Physiological and molecular insight of microbial biostimulants for sustainable agriculture. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1041413, 2023.