



**OBTENÇÃO DE BIOMASSA DE BRIÓFITAS POR MEIO DA
GERAÇÃO DE PROTOPLASTOS E DA INDUÇÃO DE PROTONEMA**
**Fernando Fernandes de Carvalho Júnior¹; Marcelo Henrique Soller Ramada²; Stephan
Machado Dohms²; Maria Clara Menezes Mello³**

¹Ciências Biológicas - Universidade Católica de Brasília;

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia - Universidade Católica de
Brasília;

Farmácia - Universidade Católica de Brasília.

E-mail: fernando.fjunior@a.ucb.br; marcelo.ramada@p.ucb.br; stephan.dohms@p.ucb.br;
maria.cmello@a.ucb.br.

RESUMO

As briófitas possuem importância evolutiva e ecológica, principalmente em ambientes polares e extremos, sendo utilizadas em estudos genômicos e fitoquímicos. Entretanto, o cultivo axênico dessas plantas em laboratório é lento, dificultando a obtenção de biomassa para essas análises. Este estudo teve como objetivo otimizar a produção de biomassa de briófitas polares cultivadas in vitro, testando a fragmentação mecânica de gametófitos associada à indução de protonema como alternativa ao crescimento tradicional. Gametófitos de *Erythrodontium squarrosum*, *Bryum pseudotriquetrum*, *Pohlia cruda* e *Physcomitrium patens* foram fragmentados com ULTRA-TURRAX por 10 e 30 segundos e cultivados em meio BCDAT líquido e sólido, além de controle em BCD líquido e inóculos diretos sem fragmentação. *Bryum pseudotriquetrum* e *Pohlia cruda* apresentaram potencial regenerativo, com formação abundante de protonema, enquanto *Erythrodontium squarrosum* teve crescimento limitado. *Physcomitrium patens* contaminou em cultivo líquido, mas formou tapete protonemático denso em meio BCDAT sólido com celofane. Os testes mostraram-se promissores.

Palavras-chave: Briófitas. Ártico. Antártica. Protonema. Protoplasto. Cultivo in vitro.

INTRODUÇÃO

As briófitas são plantas terrestres avasculares, de pequeno porte, cuja absorção e transporte de água e nutrientes ocorrem por osmose e difusão célula a célula (Alves et al., 2021). Compreendendo mais de 20.000 espécies distribuídas em três clados, os antóceros, hepáticas e musgos, esse grupo representa a segunda maior linhagem vegetal e ocupa posição de destaque na compreensão da transição das plantas para o ambiente terrestre (Peralta & Yano, 2012; Vanderpoorten & Goffinet, 2009). Estão presentes em praticamente todos os ecossistemas terrestres, incluindo ambientes polares, onde dominam a macroflora em áreas livres de gelo (Câmara et al., 2019).

Além da relevância ecológica e evolutiva, as briófitas são reconhecidas como bioindicadoras de qualidade ambiental, apresentando resposta significativa à poluição por metais pesados e desempenhando papel relevante no monitoramento da qualidade da água e do ar, devido à sua sensibilidade a variações ambientais (Souza et al., 2017; Gecheva & Yurukova, 2014). Esse grupo também é reconhecido como fonte promissora de compostos bioativos, uma vez que dispõe de um arsenal bioquímico complexo para lidar com diferentes condições ambientais e interações com microrganismos (Asakawa & Ludwiczuk, 2018). O uso dessas plantas em análises genômicas, metabolômicas e fitoquímicas depende, no entanto, da disponibilidade de biomassa vegetal em quantidade suficiente, o que representa um desafio, já que o cultivo tradicional por multiplicação do gametófito é lento e demanda grande espaço laboratorial.



Alternativas descritas na literatura buscam otimizar esse processo por meio da indução da fase protonemática, forma filamentosa e altamente regenerativa que antecede o desenvolvimento do gametófito, e da geração de protoplastos, células com a parede celular removida por digestão enzimática, amplamente empregadas em protocolos de regeneração e transformação genética (Lüth et al., 2022; Neubauer et al., 2022). A suplementação do meio de cultura com di-amônio tartarato favorece a manutenção do crescimento em estágio de protonema, retardando a diferenciação em gametófito e aumentando o rendimento de biomassa regenerativa (Hohe & Reski, 2002).

Diante da necessidade de otimizar a obtenção de biomassa das espécies de interesse do grupo de pesquisa BRIOTECH, este trabalho teve como objetivo avaliar a fragmentação mecânica de gametófitos de musgos polares, do Cerrado brasileiro e linhagem padrão global associada à indução de protonema como alternativa ao método tradicional de crescimento de briófitas cultivadas em condições axênicas.

OBJETIVO

Otimizar a obtenção de biomassa de briófitas cultivadas em condições axênicas, avaliando a fragmentação mecânica de gametófitos associada à indução de protonema como alternativa ao método tradicional de crescimento vegetativo.

MÉTODO

Foram utilizadas quatro espécies de musgos mantidas em cultivo axênico no laboratório do grupo BRIOTECH: *Erythrodontium squarrosum* (Cerrado), *Bryum pseudotriquetrum* e *Pohlia cruda* (Antártica) e *Physcomitrium patens* (linhagem Grandsen). A micropropagação desses cultivos foi realizada em meio BCD sólido e líquido, com repiques a cada quatro semanas, mantendo-se os frascos a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 de escuro.

Para a indução de protonema, 30 gametófitos de cada espécie foram fragmentados com o auxílio de um dispersor ULTRA-TURRAX estéril, em dois tempos de tratamento (10 e 30 segundos), e transferidos para meio BCDAT líquido (meio BCD suplementado com di-amônio tartarato), permanecendo em cultivo por nove meses. Como controle, gametófitos de *B. pseudotriquetrum* fragmentados por 30 segundos foram cultivados em meio BCD líquido, sem o suplemento.

Para *P. patens*, avaliou-se também o cultivo em meio BCDAT sólido com papel celofane, utilizando 15 gametófitos fragmentados por 30 segundos, com micropropagações a cada quatro semanas ao longo de dois meses. Paralelamente, inóculos líquidos de todas as espécies foram realizados diretamente em meio BCD, sem fragmentação prévia, para comparação com o crescimento gametofítico padrão do grupo. Os resultados foram avaliados de forma qualitativa e visual, considerando o desenvolvimento protonemático, a coloração da biomassa e a ocorrência de contaminações.

RESULTADOS

A espécie *Erythrodontium squarrosum* apresentou resistência considerável ao processo de fragmentação mecânica com o ULTRA-TURRAX, mesmo sob potência máxima. No tratamento de 10 segundos, observou-se pouca diferenciação em protonema, provavelmente devido à baixa fragmentação do tecido nesse intervalo de tempo. Já no tratamento de 30 segundos, os fragmentos menores apresentaram maior formação protonemática, enquanto os fragmentos maiores geraram poucas ramificações. De forma geral, entre as quatro espécies avaliadas, *E. squarrosum* foi a que demonstrou desenvolvimento mais limitado.



Bryum pseudotriquetrum foi a espécie que apresentou melhor desempenho após o procedimento de fragmentação. Tanto no tratamento de 10 segundos quanto no de 30 segundos, houve rápido crescimento protonemático e geração expressiva de biomassa verde, com aspecto saudável e homogêneo. Entretanto, no frasco submetido a 30 segundos, ocorreu contaminação fúngica a partir do segundo mês de cultivo, atribuída possivelmente à vedação inadequada do recipiente; após esse episódio, os frascos das demais espécies passaram a ser vedados de forma mais rigorosa, o que evitou novas contaminações.

Pohlia cruda também demonstrou boa resposta ao procedimento, apresentando resiliência à fragmentação com o ULTRA-TURRAX. Ambos os frascos (10 e 30 segundos) geraram protonema viável, com coloração verde saudável, embora em quantidade e tamanho menores quando comparados aos de *B. pseudotriquetrum*. Esses resultados indicam que a espécie tolerou bem o processo mecânico e foi capaz de regenerar tecido protonemático com sucesso, mesmo com resposta mais modesta que a espécie de melhor desempenho.

Em relação a *Physcomitrium patens*, os cultivos líquidos fragmentados apresentaram contaminação precoce já na segunda semana de cultivo, o que levou ao descarte dos frascos e impossibilitou a avaliação do protocolo líquido para essa espécie. De maneira geral, durante o período de cultivo em meio BCDAT líquido, não foi observada diferenciação significativa dos tecidos em gametófitos entre as espécies avaliadas, mantendo-se predominantemente o crescimento na fase protonemática, o que confirma o efeito esperado da suplementação com di-amônio tartarato.

No experimento controle, realizado com *B. pseudotriquetrum* em meio BCD líquido sem suplementação, observou-se pouco crescimento, uma vez que os fragmentos se diferenciaram rapidamente em gametófitos e cresceram de forma lenta, em nítido contraste com o desenvolvimento mais intenso obtido em meio BCDAT, reforçando a importância do suplemento para a manutenção da fase protonemática.

No cultivo em meio BCDAT sólido, utilizando *P. patens*, houve abundante formação de protonema sob o papel celofane, formando um "tapete" verde homogêneo ao longo das micropropagações realizadas a cada quatro semanas, o que demonstra boa adaptação desse organismo modelo a esse tipo de protocolo, mesmo diante da inviabilidade do cultivo líquido fragmentado.

Por fim, os inóculos líquidos realizados diretamente em meio BCD, sem qualquer fragmentação prévia, resultaram em crescimento gametofítico satisfatório para todas as quatro espécies avaliadas, confirmando a viabilidade do método tradicional já utilizado pelo grupo. Contudo, esse crescimento exigiu um tempo consideravelmente maior para a produção de biomassa em quantidade significativa, quando comparado aos protocolos de fragmentação com indução de protonema, sobretudo os observados para *B. pseudotriquetrum* e *P. cruda*.

Os resultados foram avaliados de maneira qualitativa e visual, com base no desenvolvimento protonemático, na coloração da biomassa gerada, na resistência das espécies à fragmentação e na ocorrência de contaminações ao longo do cultivo.

CONCLUSÃO

Os resultados indicam que a fragmentação mecânica de gametófitos associada ao cultivo em meio BCDAT constitui estratégia eficiente para induzir e expandir a fase protonemática de musgos cultivados in vitro, especialmente para *Bryum pseudotriquetrum* e *Pohlia cruda*, que apresentaram elevado potencial regenerativo. *Physcomitrium patens* respondeu melhor ao cultivo sólido com celofane, enquanto *Erythrodontium squarrosum* demandou ajustes metodológicos adicionais. O protocolo mostrou-se promissor como alternativa ao método tradicional de crescimento, contribuindo para a otimização da obtenção de biomassa no contexto do grupo BRIOTECH, com



potencial para subsidiar etapas futuras de isolamento de protoplastos e análises genômicas e metabolômicas.

REFERÊNCIAS

- Alves, M. H., Silva, L. B., & Pereira, T. F. (2021). Briófitas, plantas avasculares. In *Manual prático de botânica criptogâmica* (pp. 13–40). <https://doi.org/10.5151/9786555500899-01>.
- Asakawa, Y., & Ludwiczuk, A. (2018). Chemical constituents of bryophytes: Structures and biological activity. *Journal of Natural Products*, 81, 641–660.
- Câmara, P. E. A. S. et al. (2019). New insights into the species diversity of *Bartramia* Hedw. (Bryophyta) in Antarctica. *Antarctic Science*, 31, 208–215.
- Gecheva, G. M., & Yurukova, L. D. (2014). Water pollutant monitoring with aquatic bryophytes: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 2(1), 49–61.
- Hohe, A., & Reski, R. (2002). Optimisation of a bioreactor culture of the moss *Physcomitrella patens* for mass production of protoplasts. *Plant Science*, 163(1), 69–74. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00059-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00059-6)
- Lüth, V. M. et al. (2022). Protonema induction, transient transformation, and protoplast regeneration in the peat moss *Sphagnum papillosum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 152, 201–206. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02384-4>
- Neubauer, A. et al. (2022). Step-by-step protocol for the isolation and transient transformation of hornwort protoplasts. *Applications in Plant Sciences*, 10(2). <https://doi.org/10.1002/aps3.11456>
- Peralta, D. F., & Yano, O. (2012). Checklist de briófitas (Antocerotophyta, Bryophyta e Marchantiophyta) do estado de São Paulo. *Biota Neotropica*, 11, 157–160. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032011000500011>
- Pettinari, G. et al. (2022). Autophagy modulates growth and development in the moss *Physcomitrium patens*. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1052358.
- Souza, E. F., Nobrega, M. A. S., & Pontes, M. S. (2017). Musgo como bioindicadores de metais pesados no ambiente. *Acta Biomedica Brasiliensia*, 8(2), 13–22.
- Vanderpoorten, A., & Goffinet, B. (2009). *Introduction to bryophytes*. Cambridge University Press.

Financiamento: Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal. Universidade Católica de Brasília.