



ESTABELECIMENTO DE CULTURA DE TECIDOS AXÊNICOS IN VITRO DE MUSGO VISANDO A AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Alice C.S.I. Delgado¹; Stephan Machado Dohms².

¹Medicina Veterinária – Universidade Católica de Brasília;

²Ciências Genômicas e Biotecnologia – Universidade Católica de Brasília.

E-mail: alice.delgado@a.ucb.br; stephan.dohms@p.ucb.br.

RESUMO

As briófitas são plantas amplamente distribuídas, incluindo ambientes extremos como o Cerrado. Apesar da limitação estrutural, possuem um arsenal bioquímico robusto, produzindo metabólitos secundários frente a estresses bióticos e abióticos. Esses componentes são fundamentais na descoberta de novos agentes farmacológicos, como antimicrobianos, antioxidantes e antitumorais. Apesar disso, poucos estudos do potencial biológico de briófitas são relatados para espécies nativas do Cerrado. Limitações quanto à identificação e à disponibilidade de biomassa contribuem para o número discreto de pesquisas. Ambos os problemas podem ser contornados pelo reabastecimento de material vegetal por meio do cultivo axênico in vitro. Dessa forma, este trabalho propõe a descontaminação de clones de uma espécie de musgo do Cerrado a ser selecionada e a seleção de um clone capaz de produzir maior quantidade de biomassa em meio líquido, visando à obtenção de material biológico de qualidade para analisar suas aplicabilidades biotecnológicas e na pesquisa básica.

Palavras-chave: Briófitas. Cerrado. Axênico.

INTRODUÇÃO

As briófitas são plantas terrestres que surgiram durante o período geológico Cambriano-Ordoviciano (Morris et al., 2018), sendo consideradas as plantas mais antigas habitando a Terra por cerca de 472 milhões de anos. São plantas de pequeno porte, avasculares e estruturalmente simples comparadas aos demais grupos vegetais (Asakawa, 2013). Estas plantas possuem notória importância ecológica, onde algumas espécies podem ser empregadas como bioindicadoras de poluição por metais pesados, acidez e partículas radioativas, por reter nutrientes e metais pesados (Tuba et al., 2011). Diversos estudos têm demonstrado uma grande diversidade química de metabólitos secundários e bioativos, podendo apresentar atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica, antioxidante, citotóxica, alelopática, entre outras (Asakawa et al., 2013; Chen et al., 2018). Mesmo sendo o segundo maior grupo vegetal e com potenciais de interesse devido à diversidade fitoquímica, há uma notável subvalorização de briófitas para estes estudos, sobretudo em espécies nativas do Brasil. Apenas duas publicações brasileiras são registradas, ambas sobre a possibilidade das briófitas albergar substâncias químicas com poder antibiótico (Pinheiro et al., 1989; Vidal et al., 2012), onde nenhuma pesquisa foi registrada no Cerrado brasileiro. Além disso, quando avaliamos o trabalho que tem sido realizado pelo NuBBE, não há nenhum registro de compostos bioativos provenientes de briófitas, demonstrando como este grupo é pouco explorado como fonte de novas moléculas em nosso país (Pilon et al., 2017). No Cerrado, por exemplo, apesar de ser considerado um dos maiores hotspots de biodiversidade mundial (BFG, 2021; Myers et al., 2000), a aplicação de briófitas em estudos de bioprospecção por novas moléculas bioativas ainda permanece como um tema a ser explorado. Acredita-se que o número limitado de estudos envolvendo briófitas esteja relacionado a pouca disponibilidade de biomassa quando comparado a fanerógamas. Além disso,



outros fatores como a ampla associação de espécies existentes em uma mesma amostra e a presença de microrganismos endo- e epifíticos (Asakawa et al., 2013; Peters et al., 2019), também pode contribuir para este cenário. Neste contexto, os problemas mencionados podem ser contornados pelo reabastecimento de material vegetal por meio da técnica de cultivo axênico *in vitro* (resupply) (Atanasov et al., 2015), prática amplamente difundida e promissora para o estudo destas plantas (Pereira, 2019). Dessa forma, este trabalho propôs a descontaminação de clones de uma espécie de musgo do Cerrado que foi selecionada, e futuramente a seleção de um clone que seja capaz de produzir uma maior quantidade de biomassa em meio líquido, visando a obtenção de material biológico de qualidade para analisar suas aplicabilidades no campo biotecnológico.

OBJETIVO

Este estudo tem como objetivo geral estabelecer culturas axênicas de uma espécie de musgo do Cerrado, visando selecionar os melhores clones para a obtenção de material vegetal voltado à avaliação de seu potencial biotecnológico. Para isso, os objetivos específicos compreendem realizar o pré-cultivo de 10 a 20 clones da espécie selecionada, proceder com a descontaminação de cinco destes clones e estabelecer o cultivo axênico em meio sólido. Adicionalmente, busca-se selecionar os três clones com maior capacidade de geração de biomassa em meio sólido e líquido e, por fim, obter biomassa vegetal suficiente em meio líquido a partir do clone de melhor desempenho.

MÉTODO

Processamento Primário e Estabelecimento do Pré-cultivo: O material vegetal foi coletado conforme (Yano, 1984), lavado com água destilada e os gametófitos limpos foram transferidos para tubos Falcon. Uma fração foi destinada à identificação taxonômica e depósito no Herbário da UnB. O pré-cultivo (não-axênico) seguiu (Dohms et al., 2026): em capela de segurança biológica, 10 a 20 gametófitos foram secos em papel filtro, dispostos em placas de Petri com meio BCD (Ashton & Cove, 1977) e mantidos em câmara climatizada (20 °C e fotoperíodo de 16h) por 4 a 8 semanas. Os gametófitos secundários foram subcultivados para aumentar a biomassa, sendo os cinco clones mais produtivos selecionados após 4 semanas. **Descontaminação dos Gametófitos Selecionados:** Os cinco clones foram imersos em dicloroisocianurato de sódio (NaDCC) nas concentrações de 0,1%, 0,5%, 0,7% e 1% (p/v) por 2 minutos e repassados para o meio inicial. Realizaram-se inspeções visuais por 2 a 4 semanas para verificar contaminações. Havendo crescimento vegetal, fracionou-se o material para os meios LB e BCD + 1% sacarose (p/v), acompanhando-o por 30 dias para controle de contaminação. Os clones viáveis seguiram para as etapas subsequentes. **Seleção de Clones e Análise de Crescimento:** A seleção de clones com maior biomassa seguirá (Heck et al., 2020). A porção superior de cada clone (1-2 mm) está sendo separada mecanicamente, repicada para novas placas e acompanhada por quatro semanas. Semanalmente, estão sendo feitos registros fotográficos que serão convertidos em imagens binárias para cálculo da área por contagem de pixels no ImageJ (v.1.51f), além da avaliação fenotípica. **Estabelecimento de Cultivos Axênicos Líquidos e Análise Estatística:** O cultivo líquido seguirá (Heck et al., 2020): três gametófitos dos clones selecionados serão inoculados em 35 mL de meio BCD líquido (erlenmeyers de 100 mL), observados por 6 a 8 semanas e submetidos à mensuração de peso fresco e seco em triplicata. O subcultivo ocorrerá a cada 4 semanas para manter a propagação. Os dados de biomassa e crescimento serão tabulados e submetidos aos testes de ANOVA One-way com pós-teste de Bonferroni no GraphPad Prism (v.5.0) para avaliar as variações entre amostras e clones.

RESULTADOS



Durante o desenvolvimento do projeto foram realizadas as fases de coleta, processamento primário, pré-cultivo e subcultivo do material vegetal, conforme o cronograma. As coletas de seis novas espécies ocorreram no horto da Universidade Católica de Brasília (15°51'40.3"S 48°01'47.2"O) para garantir a integridade dos gametófitos e a viabilidade do cultivo in vitro, com amostras depositadas no Herbário UB aguardando certificação do número de tombamento. Os gametófitos foram submetidos ao pré-cultivo não axênico em diferentes meios, onde os explantes em meio BCD apresentaram crescimento satisfatório, emissão de gametófitos secundários, expansão do protonema e tecidos ativos, corroborando a literatura (Ashton & Cove, 1977; Pereira, 2019). Os subcultivos foram realizados para aumentar a biomassa, manter a viabilidade e selecionar clones vigorosos, ressaltando que a identificação taxonômica será feita após a descontaminação. Após o pré-cultivo, procedeu-se à descontaminação dos gametófitos das espécies PMC003, PMC006B, PMC006, PMC007, PMC007B e PMC005 com NaDCC (0,1%, 0,5% e 0,7%), totalizando 14 tentativas (duas para PMC007 e PMC006, e uma para as demais). As espécies PMC003, PMC007B e PMC006 apresentaram ausência de fungos ou bactérias após 30 dias. Devido à disponibilidade de biomassa, o gametófito original de PMC003 foi fracionado e transferido para os meios LB e BCD + sacarose 1%, permanecendo 30 dias em estufa para avaliação de contaminação. Concomitantemente, outros clones de PMC003 foram descontaminados, demonstrando boa avaliação fenotípica, não sendo observada nenhuma contaminação ao final do período, o que permitiu o subcultivo da placa para aumentar a biomassa. A seleção dos clones para PMC003 foi iniciada e encontra-se em avaliação, ao passo que as coletas PMC005, PMC003B, PMC007 e PMC006B oxidaram, morreram ou não se descontaminaram eficientemente nas concentrações testadas. Dessa forma, estabeleceu-se que os cinco clones derivados de PMC003 e em fase de seleção serão utilizados para o restante da metodologia.

CONCLUSÃO

De modo geral, os resultados obtidos nesta fase sustentaram a continuidade do projeto conforme o cronograma proposto e indicaram condições favoráveis para o avanço das etapas subsequentes. Ademais, os resultados parciais demonstraram que a descontaminação utilizando NaDCC permitiu a obtenção de clones viáveis para os espécimes PMC003, PMC007b e PMC006. A validação da cultura axênica no meio com sacarose confirma a eliminação de contaminantes externos. Como próximos passos, os explantes viáveis plaqueados estão sendo acompanhados semanalmente por meio de registros fotográficos, os quais serão convertidos em imagens binárias para o cálculo da área por contagem de pixels no programa ImageJ (versão 1.51f). Essa mensuração digital permitirá selecionar estatisticamente, com o auxílio do programa GraphPad Prism, os três clones de maior crescimento vegetativo (Heck et al., 2020).

REFERÊNCIAS

- Asakawa, Y. (2013). Phytochemical and biological studies of bryophytes. *Phytochemistry*, 91, 52–80.
- Ashton, N. W., & Cove, D. J. (1977). The isolation and preliminary characterisation of auxotrophic and analogue resistant mutants of the moss, *Physcomitrella patens*. *Molecular Genetics and Genomics*, 154(1), 87–95.
- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E. H., Rollinger, J. M., Schuster, D., Breuss, J. M., Bochkov, V., Mihovilovic, M. D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V. M., Stuppner, H., & Bauer, R. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1582–1614.



- BFG (The Brazil Flora Group). (2021). Coleção Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Chen, F., Ludwig-Müller, J., & Wang, W. (2018). Terpenoid secondary metabolites in bryophytes: Chemical diversity, biosynthesis and biological functions. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 37(2-3), 210–231.
- Dohms, S. M., Bravo, I. L. F., Mendes, T. P., Maria, M. K., Mello, M. C. M., Braga, I. P. O., Nishitani, G. M., Maciel, A. J. M., Lourenço, A. L. P., Peixoto, L. F., & Ramada, M. H. S. (2026). Optimized surface decontamination of gametophores for axenic in vitro culture of the moss *Warnstorfia sarmentosa* (Wahlenb.) Hedenäs, with application to other polar mosses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 166, Artigo 74.
- Heck, M. A., van Gessel, N., Hartman, S., van der Weele, C. M., & Reski, R. (2020). Axenic in vitro cultivation of 19 peat moss (*Sphagnum* L.) species as a resource for basic biology, biotechnology, and paludiculture. *New Phytologist*, 229(2), 861–876.
- Morris, J. L., Puttick, M. N., Clark, J. W., Edwards, D., Kenrick, P., Pressel, S., Wellman, C. H., Yang, Z., Schneider, H., & Donoghue, P. C. J. (2018). The timescale of early land plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(10), E2274–E2283.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A. B., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853–858.
- Pereira, C. G. (2019). Propagação in vitro de musgos do Cerrado (Tese de doutorado, Universidade de Brasília).
- Peters, K., Gorzolka, K., Bruelheide, H., & Neumann, S. (2019). Chemical diversity and classification of secondary metabolites in nine bryophyte species. *Metabolites*, 8(4), 9105–9117.
- Pilon, A. C., Valli, M., Dametto, A. C., Pinto, M. E. F., Freire, R. T., Castro-Gamboa, I., Silva, D. H. S., & Bolzani, V. S. (2017). NuBBE(DB): An updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. *Scientific Reports*, 7(1), Article 7215.
- Pinheiro, M. F. S. L., Regina, C. L. B., & Vasconcelos, R. (1989). Contribuição ao estudo de Briófitas como fontes de antibióticos. *Acta Amazonica*, 19, 139–145.
- Tuba, Z., Slack, N. G., & Stark, L. R. (Eds.). (2011). *Bryophyte ecology and climate change*. Cambridge University Press.
- Vidal, C. A. S., Sousa, E. O., Rodrigues, F., Campos, A., Lacerda, S., & Da Costa, J. G. (2012). Phytochemical screening and synergistic interactions between aminoglycosides, selected antibiotics and extracts from the bryophyte *Octoblepharum albidum* Hedw. (Calympereaceae). *Archives of Biological Sciences*, 64(3), 913–920.
- Yano, O. (1984). Briófitas. In O. Fidalgo & V. L. Bononi (Eds.), *Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico* (pp. 27–30). Instituto de Botânica.

Financiamento: Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal.