



OBTENÇÃO DE BIOMASSA DE BRIÓFITAS DO CERRADO POR MEIO DA GERAÇÃO DE PROTOPLASTOS E DA INDUÇÃO DE PROTONEMA

Fernanda Gonçalves Silva Araujo¹, Stephan Macho Dohms²

¹Medicina Veterinária - Universidade Católica de Brasília;

²Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia – Universidade Católica de Brasília.

E-mail: fernanda.saraujo@a.ucb.br; stephan.dohms@p.ucb.br

RESUMO

As briófitas apresentam importância evolutiva e ecológica, sendo estudadas como fontes de informações ambientais e de potencial biotecnológico. Apesar disso, são negligenciadas devido às limitações relacionadas à associação com microrganismos e à disponibilidade de biomassa. Nesse contexto, o cultivo *in vitro*, em condições axênicas, possibilita a ampliação de biomassa e a realização de análises fitoquímicas e obtenção de extratos vegetais, permitindo investigar metabólitos de interesse biológico e biotecnológico. O presente estudo objetiva ampliar a obtenção de biomassa de briófitas provenientes do Cerrado mediante diferentes metodologias. Será avaliada a eficácia da produção de protoplastos e indução de protonema como estratégias promotoras do crescimento. Os protoplastos serão obtidos por digestão enzimática da parede celular com Driselase, enquanto a indução de protonema será realizada a partir dos protoplastos e tecidos de gametófitos previamente lesionados. Ao final, será comparada a biomassa obtida pelos protocolos testados com a do cultivo tradicional, identificando a estratégia de maior rendimento.

Palavras-chave: Musgos. Cultivo axênico. Driselase.

INTRODUÇÃO

As briófitas (antóceros, hepáticas e musgos) são plantas terrestres avasculares e constituem o segundo maior grupo vegetal, estando ausentes apenas no meio marinho. Ocupam habitats diversos e seletivos, como áreas de alta salinidade, solos contaminados por mineração, além de regiões com períodos intensos de seca como o Cerrado (Costa & Peralta, 2015; Li et al., 2015; Câmara et al., 2019). Devido à sua fisiologia, são resilientes, podendo atuar no biomonitoramento da qualidade do ar, da água e dos impactos climáticos (Gecheva & Yurukova, 2014; Zanatta et al., 2020). Somado a isso, as briófitas desempenham importantes papéis ecológicos em muitos ecossistemas, principalmente relacionados à proteção do solo contra erosão e à recuperação de áreas degradadas, sendo atuantes na sucessão ecológica destes ambientes, além de contribuírem para a formação de solos como espécies pioneiras, reciclagem de nutrientes, produção de biomassa e fixação de carbono. Apesar da limitada complexidade estrutural quando comparada às plantas vasculares, os musgos possuem um arsenal bioquímico robusto para lidar com diferentes condições ambientais, auxiliando na resposta e tolerância a fatores ambientais. Entre as espécies mais estudadas destaca-se *Physcomitrium patens*, que apresenta características favoráveis à manipulação e ao cultivo axênico *in vitro*, consolidando-se como importante modelo experimental para estudos fisiológicos e de respostas a estresses bióticos e abióticos (Decker & Reski, 2012). Além disso, os musgos representam uma fonte pouco explorada de compostos bioativos, podendo revelar metabólitos com potencial antioxidante, antimicrobiano e alelopático (Asakawa & Ludwiczuk, 2018; Chen et al., 2018). No entanto, a utilização das briófitas em estudos moleculares, fisiológicos e na exploração biotecnológica exige uma quantidade considerável de biomassa (Murthy et al., 2014). Dessa forma, uma das alternativas é o estabelecimento de cultivos axênicos e a micropropagação *in vitro*, visando à obtenção de biomassa de qualidade e em quantidade



suficiente para estas finalidades (Murthy et al., 2014). Nesse contexto, a micropropagação *in vitro* é uma importante estratégia para superar limitações relacionadas à disponibilidade de biomassa, sazonalidade e impactos ambientais decorrentes de sucessivas coletas (Murthy et al., 2014). A otimização do crescimento, especialmente durante a fase protonemática, tem sido investigada como alternativa para aumentar a produção de biomassa. Lüth et al. (2023) demonstraram que a otimização do cultivo de protonemas possibilita a obtenção de material suficiente para a produção de protoplastos e seu armazenamento a longo prazo em diferentes espécies.

Procedimentos utilizando diamônio tartarato foram descritos na literatura, sendo observado que a adição desse composto ao meio de cultura faz com que o musgo cresça predominantemente no estágio de cloronema (Hohe & Reski, 2002). Hohe e Reski (2002) perceberam que o rendimento de protoplastos foi aumentado seis vezes pela suplementação do meio com 460 mg/L de diamônio tartarato. Schween et al. (2003) constataram que os protoplastos de *P. patens* cultivados em um meio contendo 2,5 mmol/L de diamônio tartarato tiveram maior taxa de sobrevivência se comparados aos cultivados em meio com 5 mmol/L desse composto, além de observarem que essa taxa também aumenta quando os protoplastos são cultivados em meio sólido em vez de meio líquido ou meio sólido com celofane. Para contornar o crescimento lento e o alto custo da manutenção *in vitro* de espécies antárticas e do Cerrado a partir da fase gametofítica, este projeto visa otimizar a produção de biomassa via geração de protoplastos e indução de protonema.

OBJETIVO

Examinar a viabilidade dos protoplastos gerados a partir de gametófitos de diferentes espécies. Estabelecer um comparativo entre os métodos de fragmentação de gametófitos, levando em consideração a regeneração e formação de protonema. Investigar as semelhanças e diferenças na geração de protonemas nas plantas cultivadas em meio de cultura suplementado com diamônio tartarato em comparação às plantas em meios de cultura não suplementados. Avaliar comparativamente o crescimento entre o cultivo em BCDAT sólido e em BCDAT sólido embebido com diamônio tartarato. Observar o estágio de crescimento das plantas em BCDAT, avaliando a formação de protonema ou o desenvolvimento de outras estruturas, como o gametófito. Comparar a resposta das diferentes espécies frente ao contato com diamônio tartarato. Avaliar a viabilidade do estabelecimento de micropropagação das espécies-alvo no estágio de protonema por meio do cultivo em BCDAT. Comparar a taxa de crescimento em cultivo líquido a partir de protonema e a partir de gametófito.

MÉTODO

Para a micropropagação dos cultivos obtidos, foram utilizadas as espécies *Fabronia ciliaris* var. *polycarpa* e *Entodontopsis leucostega*, coletadas no Cerrado e mantidas em meio BCD sólido, com renovação a cada duas semanas. A espécie *Physcomitrium patens* foi utilizada como controle experimental. Para a indução de protonemas, aproximadamente 10 gametófitos de cada espécie foram submetidos à fragmentação manual ou mecânica, utilizando-se ULTRA-TURRAX, sendo avaliados o dano decorrente dos diferentes métodos de fragmentação e a capacidade de regeneração dos fragmentos em protonema. Posteriormente, metade dos fragmentos foi cultivada em meio BCDAT sólido suplementado com celofane, durante oito semanas, a 25 °C e sob fotoperíodo de 12 horas, realizando-se registros fotográficos semanais para o acompanhamento da formação de protonemas. A outra metade dos fragmentos foi cultivada em meio BCDAT sólido com celofane, embebido em 10 mL de solução de AT a 50 mM, sob as mesmas condições de temperatura, fotoperíodo e período de cultivo, com o objetivo de inibir a diferenciação dos protonemas em caulonema e gametófitos. Por



fim, os protonemas regenerados foram submetidos à micropropagação em meio BCDAT sólido suplementado com celofane, durante oito semanas, com renovação do meio a cada quatro semanas e acompanhamento semanal da expansão da biomassa.

RESULTADOS

As etapas iniciais foram concluídas com a micropropagação *in vitro* de *Fabronia ciliaris* var. *polycarpa* e *Entodontopsis leucostega* em meio BCD sólido, com obtenção de biomassa axênica para os ensaios de indução. O período de micropropagação foi superior ao previsto para *Physcomitrium patens*, em razão das características de regeneração e crescimento das espécies. Na indução de protonema, a resposta ao estresse mecânico variou conforme o método: a fragmentação por ULTRA-TURRAX, especialmente por 30 segundos, mostrou-se prejudicial para as espécies, causando danos celulares e comprometendo a regeneração do tecido. Em contrapartida, a fragmentação manual manteve a integridade estrutural do tecido e a viabilidade dos explantes. No meio BCDAT, suplementado com diamônio tartarato, não foi observado crescimento de tecido protonemático, mas sim indução e desenvolvimento direto de novos botões gametofíticos, indicando possível efeito espécie-específico do suplemento e sua insuficiência para impedir a diferenciação em caulonema e gametófitos nas condições testadas. Por fim, as etapas subsequentes do projeto não puderam ser concluídas integralmente, decorrido da interrupção das atividades laboratoriais.

CONCLUSÃO

O cultivo axênico *in vitro* demonstrou-se viável para *Fabronia ciliaris* var. *polycarpa* e *Entodontopsis leucostega* do Cerrado, fornecendo biomassa inicial saudável para os ensaios de indução. A fragmentação manual destacou-se como o método de escolha, visto que o ULTRA-TURRAX foi nocivo às espécies estudadas, demonstrando que as respostas celulares ao estresse físico de ruptura dependem da espécie e briófitas nativas exigem protocolos adaptados. Embora as etapas de crescimento líquido tenham sido interrompidas pelas obras laboratoriais na UCB, os resultados fundamentam e viabilizam a renovação do projeto, estruturando uma sólida base científica para o escalonamento e bioprospecção dessas briófitas.

REFERÊNCIAS

- 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.
- Chen, F., et al. (2018). Terpenoid secondary metabolites in bryophytes: Chemical diversity, biosynthesis and biological functions. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 37, 210–231.
- Costa, D. P., & Peralta, D. F. (2015). Bryophytes diversity in Brazil. *Rodriguésia*, 66, 1063–1071.
- Decker, E. L., & Reski, R. (2012). Glycoprotein production in moss bioreactors. *Plant Cell Reports*, 31, 453–460.
- 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.



- Li, X., et al. (2015). Characterization of reference genes for RT-qPCR in the desert moss *Syntrichia caninervis* in response to abiotic stress and desiccation/rehydration. *Frontiers in Plant Science*, 6, Artigo 38.
- Lüth, V. M., et al. (2023). Protonema induction, transient transformation, and protoplast regeneration in the peat moss *Sphagnum papillosum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 152, 201–206.
- Murthy, H. N., Lee, E.-J., & Paek, K.-Y. (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: Strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118, 1–16.
- Schween, G., et al. (2003). Effects of nutrients, cell density and culture techniques on protoplast regeneration and protonema development in a moss, *Physcomitrella patens*. *Journal of Plant Physiology*, 160(2), 209–212.
- Zanatta, F., et al. (2020). Bryophytes are predicted to lag behind future climate change despite their high dispersal capacities. *Nature Communications*, 11, Artigo 5601.

Financiamento: Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal.