ESTABELECIMENTO DE MEIO DE CULTURA, SEM SUPLEMENTAÇÃO DE ÁGAR, PARA BRIÓFITAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Bruna Mota Bernardes [1]

Mônica Munareto Minozzo [2]

Sara Navarrete Bohi Goulart [3]

Filipe De Carvalho Victoria [4]

Maria Victória Magalhães de Vargas [5]

Resumo:

A superdivisão Bryophyta é o grupo de maior sucesso entre as plantas, destacando-se por número de espécies, diversidade de habitats e distribuição geográfica, pois são encontradas em todos os continentes. Dentro deste grupo encontram-se antóceros, hepáticas e musgos, e este último localizado dentro do Filo Bryophyta. A simplicidade de desenvolvimento dos musgos aliada à facilidade para aplicação de abordagens genéticas faz com que estes sejam amplamente utilizados em estudos de processos biológicos e moleculares em plantas. O musgo Physcomitrium acutifolium Broth., da família Funariaceae, é nativo do Rio Grande do Sul, em regiões de Floresta Atlântica do Brasil. Em vista disso, o objetivo do presente trabalho foi determinar o meio de cultura líquido ideal, para melhor crescimento, regeneração e desenvolvimento do musgo Physcomitrium acutifolium Broth. em culturas in vitro com temperatura, luz e agitação controladas. As amostras de Physcomitrium acutifolium Broth foram retiradas dos cultivos pré-estabelecidos no laboratório Núcleo de Estudos da Vegetação Antártica (N.E.V.A.) localizado na Unipampa, Campus são Gabriel, onde estavam mantidas em uma estufa de fotoperíodo com 8h luz e 16h escuro, e temperatura controlada de 20ºC. Os meios de cultivo testados foram KNOP e BCD, em tréplicas, sendo o KNOP+ME o meio pré-estabelecido e que gera um bom crescimento para esta espécie quando utilizado em meio sólido. Sem suplementação de ágar, os meios foram colocados em erlenmayers e vedados com papel filtro, gase, papel pardo e barbante e, posteriormente, autoclavados. Foi separado um gametófito de um indivíduo dos cultivos in vitro, este foi fragmentado para que facilitasse a observação da geração de biomassa, e inoculado nos meios de cultivo dentro de uma câmara de fluxo laminar. Após isso, os cultivos foram colocados em uma mesa agitadora com cerca de 6/7 rpm e mantidos em uma estufa de fotoperíodo. O tempo de avaliação foi de 7 dias, nos quais foram observados se havia contaminação, oxidação e crescimento da planta. Com este trabalho, podemos concluir que o meio KNOP líquido com agitação constante possui um grau de aproveitamento similar ao do meio KNOP+ME sólido já que os resultados foram semelhantes, porém o KNOP líquido apresentou os

mesmos resultados em um menor espaço de tempo. Em uma perspectiva futura, os testes em comparação de eficiência dos meios de cultura serão aperfeiçoados, pesando as plantas ao final do experimento para uma melhor noção da geração de biomassa e utilizando outros meios de cultura.

Palavras-chave: Briófitas; Cultivo; Biotecnologia

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

ESTABELECIMENTO DE MEIO DE CULTURA, SEM SUPLEMENTAÇÃO DE ÁGAR, PARA BRIÓFITAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

[1] Aluno de graduação. bruna.motaber@gmail.com. Autor principal

[2] Aluno de Pós-Graduação. monica.m.minozzo@gmail.com. Co-autor

[3] Aluno de Graduação. bohisara98@gmail.com. Co-autor

[4] Docente. filipevictoria@unipampa.edu.br. Orientador

[5] Aluno de Pós-Graduação. mariavictoriamagalhaes@gmail.com. Co-orientador

ESTABELECIMENTO DE MEIO DE CULTURA, SEM SUPLEMENTAÇÃO DE ÁGAR, PARA BRIÓFITAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

1.INTRODUÇÃO

A superdivisão *Bryophyta* é o grupo de maior sucesso entre as plantas, destacando-se por número de espécies, diversidade de habitats e distribuição geográfica, pois são encontradas em todos os continentes (TUBA et al., 2008). São plantas caracterizadas por um ciclo de vida com alternância de gerações, sendo a fase gametofítica dominante, produtora de gametas, e a fase diploide produz esporos haploides por meiose (VANDERPOORTEN e GOFFINET, 2009; COVE, 2005). Se diferem das plantas vasculares por não possuírem raízes, folhas e nem um sistema vascular, e consequentemente, podem estar delimitadas a ambientes sombreados com alta umidade (SAXENA, 2004). Dentro deste grupo encontram-se antóceros, hepáticas e musgos, e este último localizado dentro do Filo *Bryophyta*. Este filo possuí aproximadamente 13.000 espécies e é o segundo filo mais diverso entre as plantas terrestres (GOFFINET et al., 2008). A simplicidade de desenvolvimento dos musgos aliada à facilidade para aplicação de abordagens genéticas faz com que estes sejam amplamente utilizados em estudos de processos biológicos e moleculares em plantas (COVE, D. 2005). Em contrapartida, existe uma gama de meios de cultura para o cultivo de briófitas, o que faz com que a determinação de um meio ideal, com ou sem a suplementação de ágar e, que gere bons resultados principalmente referente a geração de biomassa, seja essencial e sirva como base pra outros projetos.

A espécie de musgo utilizada como modelo é a *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp, pertencente à família *Funariaceae*, cujo genoma já sequenciado possibilita comparações com demais musgos (RESKI et al., 1994; RESKI; FRANK, 2005), facilitando o entendimento de sua arquitetura corporal relativamente simples e adequação para manipulação genética (COVE, 2005; COVE et al., 2006; RENSING et al., 2008). O musgo *Physcomitrium acutifolium Broth*., também da família *Funariaceae*, é nativo do Rio Grande do Sul, em regiões de Floresta Atlântica do Brasil, abrangendo os estados do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul. Presente em ambientes de altitude de 0-200 m, que possuem clima úmido, com chuvas distribuídas quase uniformemente ao longo do ano, está na lista de espécies vulneráveis (VU) (COSTA et al., 2011; COSTA et al., 2005). Este possui rápido desenvolvimento para realização dos testes de cultivo in vitro em laboratório e possibilita a posterior comparação genômica com o organismo modelo *Physcomitrella patens*, podendo se tornar o musgo modelo tropical. Estudos filogenéticos baseado em análises de sequências de DNA do cloroplasto mostraram que o gênero *Physcomitrium* está intimamente ligado ao *Physcomitrella* (Goffinet e Cox 2000; Goffinet et al., 2007; Werner et al., 2007).

A cultura de tecido vegetal, é uma ferramenta importante, tanto básica como para estudos aplicados, bem como em aplicações comerciais e para o conhecimento de diversas respostas das plantas à estresses, sob o cuidado do cultivo axênico, não influenciando nos resultados obtidos. É a cultura asséptica de células, tecidos, órgãos e seus componentes sob condições in vitro físicas e químicas definidas. A base teórica para planta cultura de tecidos

foi proposta por Gottlieb Haberlandt em 1902 com o seu experimento sobre cultura de células isoladas (THORPE, 2007).

Em vista disso, o objetivo do presente trabalho foi determinar o meio de cultura líquido ideal, para melhor crescimento, regeneração e desenvolvimento do musgo *Physcomitrium acutifolium* Broth. em culturas *in vitro* com temperatura, luz e agitação controladas, buscando também a formação de biomassa que ajudará na realização de trabalhos futuros.

2.METODOLOGIA

As amostras de *Physcomitrium acutifolium* Broth foram retiradas dos cultivos pré-estabelecidos no laboratório Núcleo de Estudos da Vegetação Antártica (N.E.V.A.) localizado na Unipampa, Campus São Gabriel, onde estavam mantidas em uma estufa de fotoperíodo com meio KNOP+ME (RESKI e ABEL, 1985), 8h luz e 16h escuro, e temperatura controlada de 20ºC.

Os meios de cultura testados foram KNOP (RESKI e ABEL, 1985) e BCD (AHSTON e COVE, 1977), em tréplicas, tendo também o KNOP+ME (RESKI e ABEL, 1985) como o pré-estabelecido e que gera um bom crescimento para esta espécie quando utilizado em meio sólido. Sem suplementação de ágar, os meios foram colocados em erlenmayers e vedados com papel filtro, gase, papel pardo e barbante e, posteriormente, autoclavados.

Foi separado um gametófito de um indivíduo dos cultivos in vitro, este foi fragmentado para que facilitasse a observação da geração de biomassa, e inoculado nos meios dentro de uma câmara de fluxo laminar. Após isso, foram vedados, colocados em uma mesa agitadora com cerca de 7 rpm e mantidos em uma estufa de fotoperíodo com temperatura de cerca de 20ºC, 8h luz e 16h escuro. O tempo de avaliação foi de 7 dias, nos quais foram observados se houveram contaminações, oxidação e crescimento dos gametófitos. Foram realizadas medições com paquímetro ao final do tempo de avaliação.

3.RESULTADOS & DISCUSSÃO

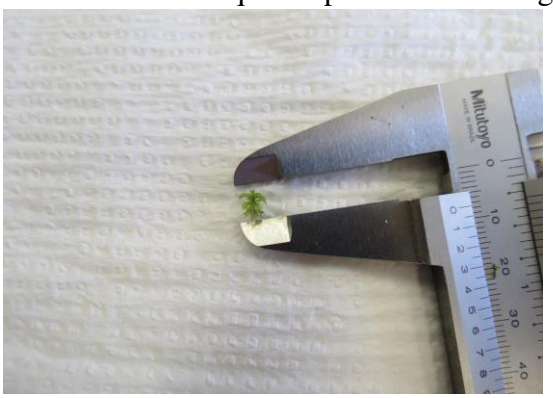
As tréplicas dos meios foram analisadas conforme a ocorrência ou não de oxidação, contaminação e crescimento.

Figura 1: Controle em meio KNOP+ME sólido sem agitação



Fonte: Autor, 2018

Figura 2: Meio KNOP líquido após 7 dias com agitação



Fonte: Autor, 2018

Figura 3: Meio BCD líquido após 7 dias com agitação



Fonte: Autor, 2018

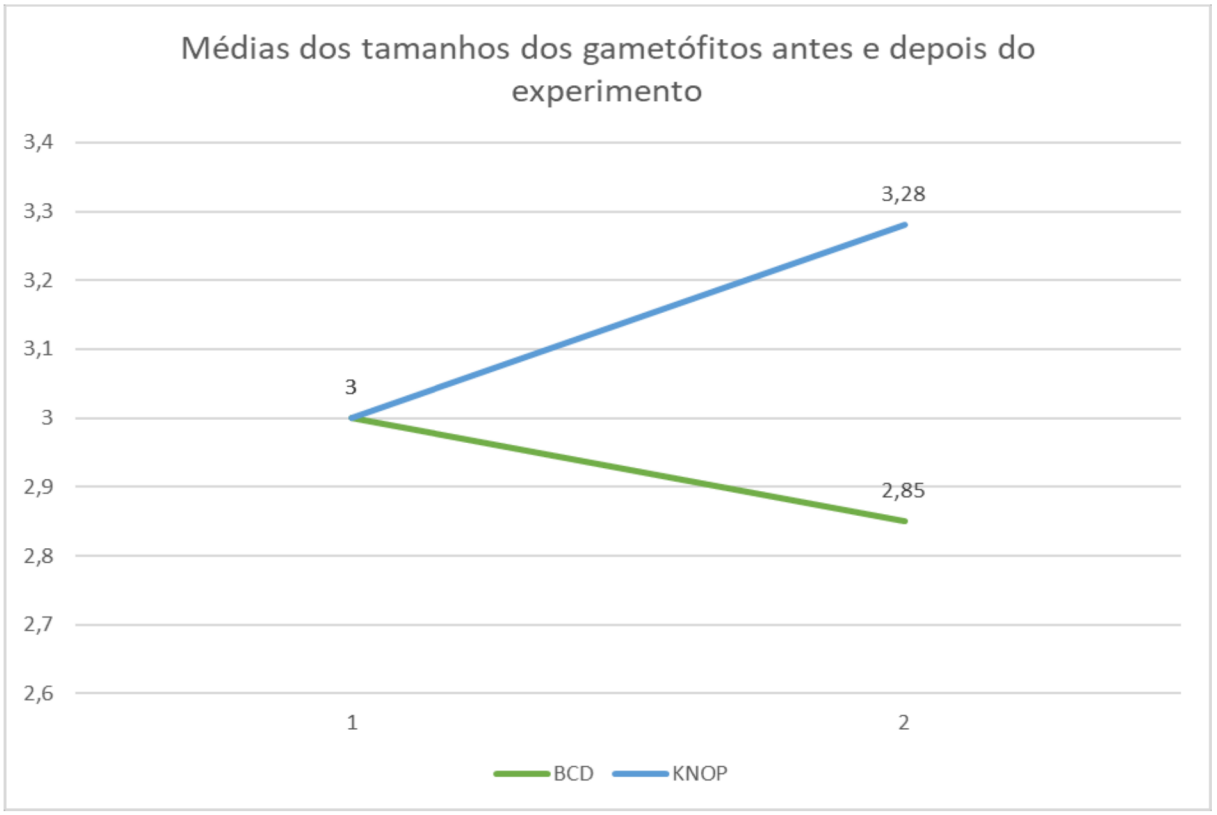
Como resultados, obtivemos que os indivíduos submetidos ao meio KNOP líquido não apresentaram contaminações, porém uma das tréplicas apresentou oxidação total. Quanto ao crescimento, a média geral de tamanho após o experimento foi de 3,28mm, maior que a média de tamanho de gametófito do grupo controle que era de 3mm, o que nos mostra que o meio KNOP líquido com constante agitação é uma opção favorável, pois houve um bom crescimento que pode vir a gerar mais biomassa em menos tempo de cultivo em comparação ao utilizado no controle (KNOP+ME sem agitação e em meio sólido).

Quanto aos cultivos em meio BCD, também não houveram contaminações e em apenas uma das tréplicas ocorreu oxidação total. A média de crescimento foi de 2,85mm sendo pouco produtivo em comparação com os resultados oriundos do teste com meio KNOP, já que desenvolvimento no BCD não foi tão considerável.

Essa diferença de crescimento pode ser explicada pela desigualdade de nutrientes presentes em cada meio, no qual o KNOP possui uma maior variedade do que o BCD. Como por exemplo, o meio BCD não possui nitrato em sua composição que é fundamental para a fixação de nitrogênio, crescimento e sobrevivência da planta. Já o meio utilizado no grupo controle possui uma adição de micronutrientes no KNOP o que acaba sendo propicio ao melhor desenvolvimento da planta também. Entretanto, o KNOP e sua gama de nutrientes associada a agitação constante conferiram em uma melhoria nos resultados do que os encontrados no grupo controle.

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o teste T de Student, no qual o valor de p para o meio KNOP foi 0,86 e para o BCD 0,15 que quando comparados ao grau de significância de 0,05 confirma os dados apresentados anteriormente, já que, quando o valor de p é maior que o de significância não podemos rejeitar a hipótese nula que, no caso, é a melhor eficiência do meio KNOP.

Gráfico 1: Médias dos tamanhos dos gametófitos antes e depois do experimento



Fonte: Autor, 2018

4.CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este trabalho, podemos concluir que o meio KNOP líquido com agitação constante possui um grau de aproveitamento similar ao do meio KNOP+ME sólido já que os resultados foram semelhantes, porém o KNOP líquido apresentou os mesmos resultados em um menor espaço de tempo. Em uma perspectiva futura, os testes em comparação de eficiência dos meios de cultura para briófitas serão aperfeiçoados, pesando as plantas ao final do experimento para uma melhor noção da geração de biomassa e utilizando outros meios de cultura.

REFERÊNCIAS

ASHTON, N. W., and Cove, D. J. (1977) The isolation and preliminar characterisation of auxotrophic and analogue resistant mutants in the moss *Phiscomitrella patens* Molecular and General Genetics 154, 87-95.

COSTA, D. P. et al. Synopsis of the Brazilian moss flora: checklist, distribution and conservation. Nova Hedwigia, v. 93, n. 3, p. 277–334, 1 nov. 2011.

COSTA, D. P.; ET AL. Diversidade e Importância das Espécies de Briófitas na Conservação dos Ecossistemas do Estado do Rio De Janeiro. Rodriguésia, v. 56, n. 87, p. 13–49, 2005.

COVE D, Bezanilla M, Harries P, Quatrano R. 2006. Mosses as model systems for the study of metabolism and development. Annual Review of Plant Biology 57, 497–520.

COVE D. 2005. The moss Physcomitrella patens. Annual Review of Genetics 39, 339–358.

COVE, D. The Moss Physcomitrella patens. Annu. Rev. Genes, v. 39, p. 339-358, 2005.

GOFFINET, B., and C. J. Cox. 2000. Phylogenetic relationships among basal-most arthrodontous mosses with special emphasis on the evolutionarysignificance of the Funariineae. Bryologist 103:212–223.

GOFFINET, B., N. J. Wickett, O. Werner, R. M. Ros, A. J. Shaw, and C. J. Cox.2007. Distribution and phylogenetic significance of the 71-kb inversionin the plastid genome in Funariidae (Bryophyta). Ann. Bot. 99:747–753.

GOFFINET, B.; BUCK, W.R.; SHAW, A.J. Bryophyte Biology. Cambridge University. Press, New York, p. 55-138, 2008.

RENSING SA, Lang D, Zimmer AD, et al. 2008. The Physcomitrella genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. Science 319, 64–69.

RESKI, R. et al. Genome analysis of the moss Physcomitrella patens (Hedw.) BSG. Molecular and General Genetics MGG, v. 244, n. 4, p. 352–359, 1994.

RESKI, R.; FRANK, W. Moss (Physcomitrella patens) functional genomics—gene discovery and tool development, with implications for crop plants and human health. Briefings in functional genomics & proteomics, v. 4, n. 1, p. 48–57, 2005.

SAXENA, D.K. Uses of bryophytes. Resonance, v.9, p. 56-65, 2004.

THORPE, T. A.. History of plant tissue culture. Molecular biotechnology, 37(2), 169-180, 2007.

TUBA, Z.; SLACK, N.G.; STARK, L.R. Bryophyte ecology and climate change. Cambridge University Press, New York, 2011.

WERNER, O., R. M. Ros, and B. Goffinet. 2007. A reconsideration of thesystematic position of Goniomitrium (Funariaceae) based on chloroplastsequence markers. Bryologist 110:108–114.