

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

KARINE ELISE JANNER

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA *IN VITRO* DE
POLYTRICHUM JUNIPERINUM HEDW. SUBMETIDO AO ESTRESSE POR
FERRO**

São Gabriel

2014

KARINE ELISE JANNER

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA *IN VITRO* DE
POLYTRICHUM JUNIPERINUM HEDW. SUBMETIDO AO ESTRESSE POR
FERRO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Biotecnologia
da Universidade Federal do Pampa, como
requisito parcial para obtenção do Título
de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Filipe de Carvalho
Victoria

São Gabriel

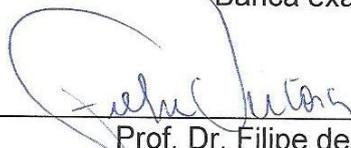
KARINE ELISE JANNER

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA *IN VITRO* DE
POLYTRICHUM JUNIPERINUM WEDW. SUBMETIDO AO ESTRESSE POR
FERRO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Biotecnologia
da Universidade Federal do Pampa, como
requisito parcial para obtenção do Título
de Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 24/01/14

Banca examinadora:



Prof. Dr. Filipe de Carvalho Victoria
Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Antártico de Pesquisas
Ambientais - INCT-APA - Unipampa
Orientador



Biol. Rafael Pia Matielo Lemos
Unipampa



Prof. Dr. Antônio Batista Pereira
Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Antártico de Pesquisas Ambientais -
INCT-APA - Unipampa

Dedico este trabalho aos meus pais,
que nunca mediram esforços para a
conquista dos meus sonhos.

AGRADECIMENTO

A Deus, por iluminar meu caminho.

Aos meus queridos e amados pais, Siegrid e Nilton Janner pelo amor, incentivo e incondicional apoio na realização deste sonho. Ao meu irmão Márcio, pelo incentivo, representando para mim durante toda minha formação escolar um exemplo de dedicação e conquista dos sonhos. Ao meu irmão Eduardo, pelo companherismo, apoio, paciência, suportando meus momentos de estresse sempre amenizando de forma divertida. Com certeza, vocês são meu exemplo de vida, superação e o meu porto seguro. Amo muito vocês.

Ao Drº Filipe de Carvalho Victoria, pelos ensinamentos durante todo o processo de elaboração desse trabalho, orientação, motivação e paciência.

A todos os professores da Unipampa que participaram da minha formação por todo o conhecimento transmitido.

A todos os integrantes amigos do NEVA (Núcleo de Estudo da Vegetação Antártica), pelo companherismo, incentivo e pelo auxílio durante esses três anos de coleguismo. Ao técnico e amigo Rafael Matielo pela atenção e auxílio com a última parte deste trabalho.

A todos meus amigos, alguns apesar de se encontrar mais distantes, mas sempre incentivando a conquista desse sonho. Em especial, a colega e amiga Sibeles Bolson pelo companherismo e apoio, presente em todos os momentos dessa trajetória acadêmica. Ao amigo Rodrigo Paidano, pela ajuda prestada, sempre muito atencioso.

A Márcio José Lord de Freitas, pelo carinho, incentivo, paciência e auxílio na realização desse trabalho.

Muito Obrigada!

Que a nossa força interior seja notável e que o exterior seja apenas um detalhe. Que a fé conduza cada um de nós, e que haja determinação e os desejos puros dos nossos corações sejam realizados, sempre deixando um espaço reservado, para o nosso sonhar.

Filipe Silva (Adaptado autor).

RESUMO

Os mecanismos de alterações em resposta a deficiência e toxidez por ferro são descritos apenas para plantas de linhagem superior, e geralmente de importância econômica, sendo estes estudos ainda carentes para plantas da linhagem mais antiga de plantas terrestres. Este trabalho teve como objetivo avaliar as alterações morfológicas e alterações na variabilidade genética de *Polytrichum juniperinum* Hedw. em resposta a tratamentos utilizando diferentes concentrações de Fe-EDTA *in vitro*. Além de testar a transferência de marcadores EST-SSR entre *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. e *P. juniperinum* para a utilização dos primers transferidos com sucesso na avaliação genotípica das amostras submetidas a diferentes concentrações de ferro. Para a caracterização morfológica, o musgo foi cultivado em tratamentos contendo 0ml.L⁻¹, 5ml.L⁻¹, 10ml.L⁻¹ e 50ml.L⁻¹ de Fe-EDTA. Nos 40 e 45 dias, os cultivos foram avaliados. No segundo estudo, as alterações na variabilidade genotípica de *P. juniperinum* submetido aos diferentes tratamentos foi avaliada utilizando regiões SSR e ISSR. Os resultados indicam que a espécie é sensível a concentrações elevadas de ferro, tendo reduzido o número de gametófitos regenerados ou até inibindo estes, além de causar alterações na coloração dos explantes. Na deficiência do metal, a planta teve desenvolvimento normal indicando que a ausência do metal não é fator limitante para seu desenvolvimento. A partir do fenograma obtido foi possível observar que o tratamento controle diferiu dos demais indicando que a planta teve sua variabilidade genotípica alterada, a qual sugere-se que a espécie sob condições de estresse, pode estar expressando genes atuantes na estratégia I e II de regulação da homeostase de ferro. Dessa forma, este estudo sugere que a espécie vegetal *P. juniperinum* pode sofrer alterações morfológicas e genotípicas pela alta concentração de ferro em solos que estão sob poluição por metais pesados, inclusive o solo Antártico. Também pode ser utilizada como planta bioindicadora de locais com pouco ferro disponível, além de um modelo para estudos moleculares que envolvem processos de homeostase por ferro.

Palavras-chave: Marcadores moleculares, microsatélites, musgos, metais pesados.

ABSTRACT

The mechanisms of changes in response to iron deficiency and toxicity are described only by plants for superior strain, and usually of economic importance, and these studies still lacking for most plants of ancient lineage of land plants. This work aimed to evaluate the morphological changes and the genetic variability of *Polytrichum juniperinum* Hedw. in response to the treatment using various concentrations of Fe-EDTA *in vitro*. In addition to testing the transfer of EST-SSR markers between *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. and *P. juniperinum* for the use of primers successfully transferred in genotypic evaluation of samples subjected to different concentrations of iron. For the morphological characterization, the moss was grown in treatments containing 0ml.L⁻¹ 5ml.L⁻¹ 10ml.L⁻¹ and 50ml.L⁻¹ of the Fe-EDTA. In the 40 and 45 days, crops were evaluated. In the second study, alterations in the genetic variability of *P. juniperinum* subjected to different treatments was assessed using SSR and ISSR regions. The results indicated that the species is sensitive to high concentrations of iron, reducing the number of gametophytes regenerated or even inhibiting these and causing changes in color of the explants. In the deficiency of the metal, the plant had normal development indicating that the absence of the metal is not a limiting factor for its development. Starting from the phenogram obtained was observed that the control treatment differed from the others indicating that the plant had alteration in its genetic variability, which can be inferred that the species under stress conditions may be expressing genes involved in strategy I and II regulation of the iron homeostasis. Thus, this study suggests that plant species *P. juniperinum* can undergo morphological and genotypic changes by the high concentration of iron in soils that are under heavy metal pollution, including the Antarctic soil. Can also be used as a bioindicator of sites with little available iron, and a model for molecular studies involving processes of iron homeostasis.

Keywords: Molecular markers, microsatellites, mosses, heavy metals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Detalhe da espécie <i>Polytrichum juniperinum</i> Hedw. A representa o detalhe do gametófito e, B o detalhe do esporófito.	15
Figura 2 - Mapa do Rio Grande do Sul com a localização da cidade de Barão do Triunfo.	28
Figura 3 - Esporófitos de <i>P. juniperinum</i> imersos em hipoclorito de sódio a 2% por 5 minutos.....	30
Figura 4 - A e B, crescimento protonemal após 15 dias de cultivo.....	30
Figura 5 - Frascos de vidro onde foram repicados os explantes de <i>P. juniperinum</i> . .	31
Figura 6 - Imagem do cultivo nos diferentes tratamentos mantidos em placas de petri.	32
Figura 7 - Cultivo de <i>P. juniperinum</i> . A: crescimento após 43° dias de cultivo em condições de controle. B: detalhe do crescimento dos gametófitos no tratamento I após 45° dia de cultivo. C: tratamento I, após 35° dias, D: cultivo após 45° dia no tratamento II. E: tratamento III, após 45° dia de cultivo. F: tratamento III, após 35 dias.....	39
Figura 8 - Comparação da coloração dos explantes mantidos em placas de petri após 5 semanas de cultivo. Sendo, respectivamente, A e B (controle e tratamento I). A e C (controle e tratamento II), A e D (controle e tratamento III).	42
Figura 9 - Gel de agarose a 3%, utilizando o marcador 50bp.	44
Figura 10 - Gel de poliacrilamida à 6,5% com amplificações dos primers SSR 8, 11, 48. Foi utilizado o marcador 50bp.	46
Figura 11 - Gel de agarose à 3% com amplificação dos primers 1, 2, 4, 9,10, 11. Foi utilizado o marcador 50bp.	48
Figura 12 - Fenograma da relação cofenética dos tratamentos/variabilidade.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferentes concentrações de Fe-EDTA para cada tratamento para o volume de 1 litro de meio MS (Murashige e Skoog, 1962).....	31
Tabela 2 - Primers utilizados para a transferência de <i>EST-SSR</i> entre <i>Physcomitrella patens</i> (Hedw.) Bruch & Schimp. e <i>Polytrichum juniperinum</i> Hedw.	34
Tabela 3 - Primers utilizados para a amplificação de regiões <i>ISSR</i> em <i>P. juniperinum</i>	35
Tabela 4 - Tabela indicando para cada réplica dos tratamentos a presença (+) ou ausência (-) de gametófitos.	38
Tabela 5 - Teste de Tukey aplicado a relação entre o número de gametófitos de acordo com o tratamento, após 45 dias de cultivo.	40
Tabela 6 - Relação de bandas monomórficas e polimórficas entre os primers <i>SSR</i> associados ao tratamento.	47
Tabela 7 - Relação da amplificação dos primers <i>ISSR</i> polimórficos em resposta ao tratamento.	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	<i>Polytrichum juniperinum</i>	15
2.1	Cultivo <i>in vitro</i> de <i>P. juniperinum</i>	16
2.2	Poluição antrópica e presença de musgos em locais contaminados com metais pesados.....	17
2.3	Ferro em plantas.....	19
2.4	Ferro em soluções nutritivas.....	20
2.5	Dinâmica do Ferro no solo.....	20
2.6	Toxidez por Ferro e alterações morfológicas.....	21
2.7	Musgos como modelo para estudos de processos biológicos.....	23
2.8	Marcadores moleculares.....	23
2.9	Marcadores Microssatélites (SSR).....	24
2.10	Marcador baseado em SSR: <i>Inter-SSR Amplification</i> (ISSR).....	25
2.11	Regiões <i>EST</i> e a transferência de marcadores.....	25
3	OBJETIVO DO ESTUDO.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1	Avaliação morfológica protonemal.....	28
4.1.1	Coleta do material vegetal.....	28
4.1.2	Preparação do meio de cultura.....	29
4.1.3	Protocolo de desinfecção para <i>P. juniperinum</i>	29
4.1.4	Cultivo e tratamentos realizados.....	30
4.2	Transferência de marcadores <i>EST-SSR</i> entre <i>Physcomitrella patens</i> (Hedw.) Bruch & Schimp. e <i>P. juniperinum</i>	33
4.2.1	Seleção das regiões <i>EST-SSR</i> e transferência <i>in sílico</i>	33
4.2.2	Transferência de marcadores <i>EST-SSR</i>	33

4.3	Avaliação de alteração na variabilidade em resposta ao estresse por ferro	35
4.3.1	Seleção de primers.....	35
4.3.2	Extração de DNA.....	35
4.3.3	Análise Molecular	36
4.3.4	Corrida eletroforética	36
4.3.5	Análise dos amplicons.....	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	Avaliação morfológica protonemal	38
5.1.1	Monitoramento dos cultivos	38
5.1.2	Parâmetros de avaliação	38
5.1.2.1	Presença/Ausência de gametófitos.....	38
5.1.2.2	Número de gametófitos.....	40
5.2	Transferência de marcadores EST-SSR entre <i>Physcomitrella patens</i> Brid. e <i>Polytrichum juniperinum</i> Hedw.	44
5.3	Avaliação de alterações na variabilidade genotípica em resposta ao estresse por ferro	46
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
7	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

Os metais pesados constituem um dos poluentes mais tóxicos à vida. Estes ocorrem naturalmente na crosta terrestre, no entanto as atividades humanas têm introduzido altas cargas desses elementos no ambiente pela contaminação das águas e solo. A poluição por metais pesados pode ter origem apartir do despejo de poluentes no solo e, pela circulação atmosférica, uma das fontes da poluição observada no continente Antártico (SANTOS et al., 2004). A entrada de metais pesados pode ter origem de fontes de poluição locais e globais. Como fontes locais pode-se destacar a incineração de lixo, pinturas, uso de combustíveis fósseis e despejo de esgoto *in natura*, enquanto que a poluição global está relacionada com partículas em suspensão na atmosfera, as quais transportam elementos provenientes de latitudes mais baixas.

A nutrição mineral é um dos fatores mais importantes envolvidos no crescimento e desenvolvimento das plantas. Muitos metais são essenciais para o crescimento de todos os tipos de organismos, mas são requeridos em baixas concentrações, alguns deles, têm papel relevante na nutrição de plantas, enquanto outros exercem efeitos deletérios sobre vários componentes da biosfera (KABATA-PENDIAS e PENDIAS, 2001). Quando encontrados em quantidades elevadas podem causar estresse a flora (SANTOS, 1998). O ferro como micronutriente é essencial para as plantas, uma vez que participa de reações metabólicas essenciais, tais como fotossíntese e respiração (TAIZ e ZEIGER, 2004).

O ferro é também um dos metais mais versáteis na biologia, sendo conhecido como um metal de transição, já que é capaz de receber e doar elétrons, ou seja, caracteriza-se pela facilidade em mudar seu estado de oxidação, permitindo sua participação em numerosas reações envolvendo a transferência de elétrons (HELL e STEPHAN, 2003). A planta absorve o íon de ferro na forma de íon férrico, mas em solos com pH baixo, como por exemplo, os solos do interior do continente Antártico (AISLABIE et al., 2003), ocorre a reação de solubilização e redução do íon férrico (Fe^{3+}) para íon ferroso (Fe^{2+}). Dessa maneira, ocorre toxidez indireta, pois as plantas presentes em tais locais vão absorver uma menor quantidade de outros elementos que também são essenciais para o seu crescimento e manutenção. O estresse

ocorre devido ao ferro estar muito disponível (KOZLOWSKI, 1976). O metabolismo do Ferro é um mecanismo complexo sob um balanço homeostático, representando dois problemas principais para as plantas, a deficiência como consequência de problemas de solubilidade, e toxicidade devido ao excesso de solubilidade em condições anaeróbicas devido a quantidade elevada do metal (SANTOS e COSTA de OLIVEIRA, 2007). Em altas concentrações este micronutriente pode causar alterações morfológicas e genótípicas podendo levar a planta à morte.

As briófitas podem ter potencial biomonitor para a presença de metais no ambiente (CAKRABORTTY, 2006), o que exige o conhecimento da morfologia e alterações do genoma desta em resposta a diferentes concentrações do metal. Os mecanismos de sobrevivência de uma briófita ainda são pouco claros e apenas parcialmente descritos em locais onde há concentrações baixas e elevadas de metais pesados.

Neste contexto, este estudo tem como objetivo caracterizar as alterações morfológicas e alterações do genoma em uma espécie de briófita da família das Polytrichaceae submetida a diferentes concentrações de Fe-EDTA *in vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Polytrichum juniperinum*

A família Polytrichaceae Schwägr. (Bryophyta) compreende 19 gêneros e 150-200 espécies, sendo amplamente distribuída por todo o Planeta. A maior diversidade está no Sudeste Asiático e na América do Sul (HYVÖNEN, 2012). *P. juniperinum* (Figura 1) é um dos representantes das Polytrichaceae. Musgo cosmopolita adaptado a ambientes abertos, secos e solos arenosos, crescendo sobre uma variedade de turfeiras, especialmente em habitats drenados (VAN der VELDE, 2003).

Figura 1- Detalhe da espécie *Polytrichum juniperinum* Hedw. A representa o detalhe do gametófito, e B detalhe do esporófito.



Fonte: (A) Foto de Karine Janner, 2013, (B) Maria Alice de Rezende, 2004.

Na Antártica, *P. juniperinum* está presente sobre o solo, húmus e solo rochoso, sobre saliências rochosas e afloramentos, geralmente em ambientes abertos (OCHYRA, 1998). É uma das três espécies da família Polytrichaceae bem distribuída na Antártica Marítima. Segundo Ochyra (1998), desempenha um papel importante na vegetação terrestre neste bioma como constituinte essencial das

comunidades de subformação de turfeiras de musgos, bem como musgos fruticosos e subformações de turfeiras de líquens.

2.1 Cultivo *in vitro* de *P. juniperinum*

O cultivo *in vitro* de briófitas é essencial não só para observar o desenvolvimento celular e molecular, mas também para elucidar o papel dos primeiros estágios de desenvolvimento, e conservar indivíduos vivos *ex situ*. Vários trabalhos referentes ao cultivo *in vitro* de briófitas já foram realizados, cultura *in vitro* de *Rhodobryum giganteum* (Schwägr.) Arn., micropropagação de *Bryum argenteum* Hedw., cultivo de musgo epífito *Tayloria rudolphiana* (Garov.) Bruch & Schimp., desenvolvimento de métodos para iniciação de cultivo de briofitas, além do cultivo de outros diversos musgos (SABOVLJEVIC et al., 2003; ROWNTREE, 2006; CHEN et al., 2009; LIANG, 2010; MARTÍNEZ, 2011;).

Silva et al., (2006) realizaram um estudo sobre a morfogênese protonemática de briófitas ocorrentes em Mata Atlântica do estado de Pernambuco, utilizando apenas os esporos das espécies. Barriquello (2009) realizou um estudo da fenologia reprodutiva do musgo *Octoblepharum albidum* Hedw. na Amazônia Meridional, mas até o presente momento não tinha registro do cultivo *in vitro* de matrizes amazônicas de espécies de briófitas, onde há uma importante proporção da diversidade do grupo (GRADSTEIN et al. 2001) sendo este, um estudo pioneiro nesta região do Brasil.

O cultivo *in vitro* de espécies habitantes de locais extremos é uma alternativa para o estudo e avaliação do comportamento do musgo em condições *in vitro*, mimetizando o ambiente natural da onde foi coletado. Assim Victoria et al. (2011) avaliaram o estabelecimento do desenvolvimento de *P. juniperinum* sob condições de cultivo axênico a partir de esporos de espécimes coletadas na natureza. Ocorreu o desenvolvimento, tanto de protonema quanto de gametófitos, utilizando o meio básico MS sem reguladores de crescimento.

2.2 Poluição antrópica e presença de musgos em locais contaminados com metais pesados

Investigações realizadas nos últimos anos forneceram dados sobre o aumento da poluição da atmosfera (PARKIN et al., 1970; JUDA e CHRÓŚCIEL, 1974; STERN, 1976; MITRA, 1979; PERRY e WALKER, 1979; LISICIN, 1983; BEZBORODOVA e EREMEEV, 1984), que devido à circulação de massas de ar em grande escala permitem que as partículas de poluição possam ser distribuídas rapidamente, por todo o Planeta (ZIGALOVSKAJA et al., 1974) e também nas áreas polares.

Pecherzewski (1984), aponta que tendo em conta o permanente aumento da poluição atmosférica e as áreas de urbanização se imagina o perigo para a biosfera, incluindo águas oceânicas e regiões polares, se faz necessário um alerta, para continuar as pesquisas referentes a poluição atmosférica na região da Antártica, que foi até agora geralmente considerada como uma região não poluída. Assim se faz de interesse crescente a determinação de metais pesados, pois estes podem ajudar a avaliar a contribuição da ação antropogênica e das fontes naturais sobre a atmosfera inferindo na concentração desses metais (BOUTRON, 1979). Durante os últimos anos, numerosos dados de boa qualidade têm sido publicados sobre a ocorrência de vários metais pesados no solo antártico (Pb, Cd, Cu e Zn) (GÖRLACH et al., 1992). Ocorrências de espécies de briófitas na distribuição de metais pesados na Baía do Almirantado, foram constatadas pelas pesquisas realizadas pelo grupo Criosolos/PROANTAR (SCHAEFER et al, 2004), e servem de ponto de partida na avaliação da resposta das espécies de plantas terrestres ao estresse por metais pesados.

Além da poluição antropogênica, elevado teor de metais pesados podem ocorrer naturalmente no solo antártico. Nesses locais, uma vegetação azonal com tolerância a metais pesados, incluindo musgos podem ser observados. No entanto, os mecanismos de sobrevivência são ainda pouco claros e apenas parcialmente descritos (PILON et al., 2009). A concentração elevada desses metais pesados acumulados no solo podem constituir um dos poluentes mais tóxicos para os organismos em um ambiente (PONNAMPERUMA, 1972) .

A maioria dos estudos sobre vegetação Antártica são restritos a ecologia, fisiologia e história de vida de musgos e líquens (OCHYRA, 1998). O padrão dentro da vegetação está aparentemente relacionado aos fatores ambientais, como disponibilidade de água, exposição ao vento e à estabilidade do substrato, porém a concentração em excesso de minerais encontrada nas colônias de pinguins é decisiva para a distribuição de espécies vegetais. Impactos decorrentes da presença humana também na Antártica têm sido registrados por diversos autores. Na Baía do Almirantado, Harris et al. (1991) descreveram os impactos ambientais em campos de musgos e locais de nidificação de aves, causados pela presença de pesquisadores que permanecem nas estações científicas e refúgios, e por turistas que anualmente visitam as praias da região.

Em um estudo sobre monitoramento apresentado por Braun et al. (2012) na Ilha Rei George, na Região de Fildes foi demonstrado uma variedade de impactos ambientais devido à concentração de estações e a ampla gama de atividades humanas. Com a implementação do Protocolo de Madrid em 1998, algumas melhorias foram feitas em relação a gestão de resíduos, óleos ou esgoto, porém a cooperação insuficiente entre os diversos intervenientes presentes na região levou a impactos cumulativos quantificáveis que exigem uma forma mais abrangente e em larga escala de gestão.

Alguns musgos especializados como *Mielichhoferia elongata* (Hoppe & Hornsch.) Nees & Hornsch., *Pohlia drummondii* (Müll. Hal.) A.L. Andrews e *Scapania undulata* (L.) Dumort. são conhecidos por crescerem em locais poluídos por metais pesados (URL, 1956). Martensson e Berggren (1954) relatam a existência de algumas briófitas que acumulam cobre (Cu) e são conhecidas como “coppermosses”. Sassmann (2010) evidenciou que o musgo modelo de estudos, *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp., ainda não foi relatado em locais com altas concentrações de metais pesados.

Devido a capacidade que algumas espécies de musgos tem em sobreviver a elevados níveis de estresse biótico e abiótico, bem como acumular poluentes nocivos na biomassa (por exemplo, metais pesados), eles são usados como bioindicadores. Algumas briófitas são utilizadas para controlar as concentrações de

poluentes como dióxido de enxofre no ar (FRAHM, 1998) e também como indicadores de poluição ambiental por metais pesados (ACETO et al., 2003).

2.3 Ferro em plantas

A nutrição mineral é um dos fatores mais importantes envolvidos no crescimento e desenvolvimento de plantas. Os nutrientes se caracterizam em macro e micronutrientes, classificados dessa forma de acordo com a exigência nutricional da planta para cada elemento (VIEIRA, 1999). Além dos macronutrientes (C, H, O, N, P, S, K, Ca, Mg), as plantas precisam também de pequenas quantidades de micronutrientes (B, Cl, Cu, Mn, Fe, Zn, Mo), e algumas também precisam de Si, Co e Se (HANSCH e MENDEL, 2009). Em contraste com os macronutrientes, os micronutrientes são apenas necessários em quantidades muito pequenas, enquanto a disponibilidade em altas concentrações resulta em efeitos prejudiciais.

Entre os micronutrientes, o ferro é de grande importância devido a sua utilização em vários processos fundamentais. É um elemento essencial para todos os organismos vivos, incluindo as plantas, pois é parte integrante de diversas enzimas que participam de processos metabólicos como fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio, síntese de clorofila, entre outros (TAIZ e ZEIGER, 2004).

O ferro representa um dos metais mais versáteis na biologia, conhecido como metal de transição, se caracterizando pela facilidade em mudar seu estado de oxidação, permitindo sua participação em numerosas reações envolvendo a transferência de elétrons. As suas funções são baseadas na reação redox reversível dos íons de ferro Fe^{+2} (ferroso) e Fe^{+3} (férico), na sua habilidade de formar complexos octaédricos com vários ligantes e por variar seu potencial redox em resposta a diferentes ligantes (HELL e STEPHAN, 2003).

2.4 Ferro em soluções nutritivas

Um problema significativo das soluções nutritivas é a disponibilidade de ferro, especialmente em altas concentrações. Quando fornecido na forma de um sal inorgânico como FeSO_4 ou $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$, o ferro pode precipitar da solução como hidróxido de ferro. Fosfatos de ferro insolúveis serão formados se sais fosfatos estiverem presentes. A precipitação do ferro na solução torna-o fisicamente indisponível à planta, a não ser que sais de ferro sejam adicionados com frequência. Pesquisadores mais antigos abordaram o problema adicionando ferro junto com ácido cítrico ou tartárico. Compostos como esses são chamados de quelantes, pois formam complexos solúveis com cátions, como ferro e cálcio, nos quais o cátion é retido por forças iônicas, e não por ligantes covalentes. Cátions que formam quelatos são, então, fisicamente mais disponíveis às plantas (SIEVERS e BAILAR, 1962). Soluções nutritivas mais modernas usam os produtos químicos ácido etilendiaminotetracético (EDTA) ou ácido dietileno-triaminopentacético (DTPA ou ácido pentético) como agentes quelantes (TAIZ e ZEIGER, 2004).

2.5 Dinâmica do Ferro no solo

O ferro é um dos elementos mais abundantes na crosta terrestre (MURAD e FISCHER, 1988). Embora seja tão abundante, ele é considerado um dos elementos mais limitantes ao crescimento e desenvolvimento das plantas, principalmente quando depositado no solo devido à poluição (BECANA et al., 1998).

O metabolismo do ferro é um mecanismo complexo sob um balanço homeostático, representando dois problemas principais para as plantas, a deficiência como consequência de problemas de solubilidade e, toxicidade devido ao excesso de solubilidade em condições anaeróbicas e de baixo pH (SANTOS e COSTA de OLIVEIRA, 2007). As plantas necessitam de mecanismos para absorver o ferro do solo e atender a demanda para o crescimento e desenvolvimento, e também evitar a toxicidade pelo excesso do metal, pois ambas situações podem ser responsáveis

por disfunções nutricionais que afetam a fisiologia das plantas (PONNAMPERUMA, 1972).

O ferro pode ocorrer nas formas divalente (íon ferroso - Fe^{2+}) ou trivalente (íon férrico - Fe^{3+}). A disponibilidade do ferro para as plantas depende fundamentalmente da solubilidade dos minerais presentes no solo (HELL e STEPHAN, 2003). De acordo com Guerinot e Yi (1994), o principal problema da disponibilidade do ferro não é a abundância, mas a solubilidade dos óxidos de ferro, devido a mesma ser extremamente baixa em ambientes aeróbicos em pH neutro e alcalino.

Na Antártica, por exemplo, segundo Aislabie (2003), o pH do solo pode variar de fracamente ácido (pH 6,0) em solos do interior, a alcalino, geralmente na região costeira (pH 9,0). Becana et al. (1998) afirmam que em solos de pH abaixo do neutro e em condições anaeróbicas, ocorre a solubilização e redução do Fe^{3+} à Fe^{2+} , liberando o mesmo para a solução do solo aumentando a disponibilidade de ferro em níveis que podem ser tóxicos às plantas presentes nesse ambiente. Nesse caso de teor elevado de metais pesados no solo, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa para tolerar o excedente de micronutrientes ou de metais não-essenciais que conduziria a efeitos tóxicos. Este mecanismo tem sido descrito como homeostase de metais e é comum a todas as plantas superiores (KRÄMER e CLEMENS, 2005), porém ainda não descrito em plantas basais.

Em geral, há duas estratégias principais que as plantas se utilizam para trabalhar com níveis elevados de metais, prevenção e tolerância (RÖMHELD, 1987). Em musgos, até o momento nenhuma dessas estratégias foram descritas, pois o sistema radicular dos musgos é rudimentar e, segundo um estudo realizado por Rother et al. (2006) genes responsáveis por quelatos metálicos ainda não foram identificados no genoma de *P. patens*.

2.6 Toxidez por Ferro e alterações morfológicas

O aumento nas quantidades do íon ferroso (Fe^{2+}) no solo, devido ao pH baixo pode ser tóxico às plantas que tem seu habitat nesse local (PONNAMPERUMA,

1972). A toxidez por ferro, ocasionada por este aumento da concentração do íon ferroso na solução do solo pode causar efeitos adversos às plantas. As desordens nutricionais associadas com a toxicidade de ferro têm sido divididas em toxidez direta e indireta (VAHL, 1999).

O efeito tóxico do ferro pode ocorrer por absorção excessiva (toxidez direta ou bronzeamento), causando o aparecimento de pontos castanho-escuro nas pontas das folhas ou por precipitação sobre as raízes das plantas (toxidez indireta ou alaranjamento), formando uma crosta de óxido férrico, que reduz a absorção de outros nutrientes pela planta (HOWELER, 1973). A toxidez direta é verificada pelas folhas apresentando pontuações castanho-escuras, e decorre da absorção e utilização excessiva de ferro, causando a morte das células onde ele é depositado (VAHL, 1999).

Já a toxidez indireta pelo ferro se caracteriza pelas folhas apresentarem uma coloração alaranjada, que evolui do ápice para a base, em virtude da deposição de precipitados sobre as raízes em consequência dos altos teores desse elemento na solução do solo, formando uma crosta de óxido férrico, que reduz a absorção, transporte e/ou utilização de outros nutrientes pela planta, como P, K, Ca e Mg (MEURER, 2000).

Segundo Ponnampuruma et al. (1972) os primeiros sintomas do excesso de ferro nas plantas são o bronzeamento das folhas, retardo no crescimento, baixa produtividade, esterilidade das espiguetas e, em casos mais severos, morte da planta. Se a toxidez ocorrer nos estágios iniciais de desenvolvimento, a planta pode sofrer severo retardamento no crescimento. Quanto mais tarde, o crescimento vegetativo não é muito afetado, mas no caso da gramínea, *Oryza sativa* L., o rendimento dos grãos é reduzida devido à produção de panículas pequenas e com alta proporção de espiguetas estéreis (YOSHIDA, 1981).

Sousa et al. (2006) comentam que a intensidade dos sintomas causados pela toxidez por ferro é determinada em virtude das diferentes condições de pH e do conteúdo e reatividade dos óxidos de ferro presentes no solo, sendo verificados teores críticos no solo que variam de 30 mgL⁻¹ a concentrações acima de 500 mgL⁻¹.

2.7 Musgos como modelo para estudos de processos biológicos

O uso potencial dos musgos como modelo para estudos de processos biológicos em plantas é devido ao padrão relativamente simples de desenvolvimento dessas plantas, conveniência para análises de linhagens celulares, resposta similar do grupo aos fatores de crescimento e estímulos ambientais como os encontrados em outras plantas terrestres, e a facilidade para aplicação de abordagens genéticas, resultante da dominância da geração gametofítica no ciclo de vida dessas plantas. No momento, houve um crescente aumento das pesquisas utilizando as briófitas em estudos moleculares (COVE et al., 1997). Segundo Glime (2007), os botânicos contemporâneos estão considerando as briófitas como fontes de genes para a modificação de plantas agrícolas para poder enfrentar os variados estresses fisiológicos do mundo atual.

Uma das espécies mais estudadas é *P. patens*. Modificações pré-determinadas específicas e altamente precisas em qualquer sequência do genoma desta espécie de musgo é possível atualmente por meio de transgênese (SCHAEFER et al., 1991).

2.8 Marcadores moleculares

Segundo Varshney (2005), os marcadores moleculares são definidos como sendo “marcadores genéticos baseados num conjunto de marcadores que podem detectar polimorfismo de DNA em nível de um loco específico e no nível completo de DNA”. As diferentes classes de marcadores moleculares podem diferir com respeito a características importantes como: abundância genômica, nível de polimorfismo detectado e informação genética, especificidade dos locos, reprodutibilidade, requerimentos técnicos, e investimento financeiro. Eles são utilizados para a genotipagem de organismos, detecção de variabilidade genética, identificação de híbridos, testes de paternidade, diagnósticos genéticos, mapeamento genético e seleção assistida por marcadores moleculares (VARSHNEY et al., 2005).

Segundo Joshi (2004), atualmente diversos marcadores moleculares estão disponíveis e são capazes de acessar a variabilidade e diversidade em nível molecular.

2.9 Marcadores Microssatélites (SSR)

Os genomas eucariotos são densamente povoados por seqüências simples repetidas, as quais consistem de um a seis nucleotídeos repetidos em tandem, os chamados microssatélites. As seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo seleção de primers específicos que amplificam, via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos (BORÉM e CAIXETA, 2009).

Diferentes estudos tem demonstrado que os microssatélites são amplamente distribuídos no genoma das plantas superiores. Morgante e Olivieri (1993) analisaram os dados dos bancos EMBL e *GenBank* e estimaram a freqüência de um microssatélite, considerando di e trinucleotídeos, a cada 50 kb. Porém quando este trabalho foi desenvolvido, a disponibilidade de seqüências nos bancos de dados era pequena.

Com o aumento das informações de sequencias de DNA, novas estimativas de freqüência dos microssatélites foram obtidas. Cardle et al. (2000), analisando seqüências disponíveis de DNA genômico e de *ESTs* (Expressed Sequence Tags) de diferentes espécies vegetais, demonstraram que no genoma das plantas é encontrado um microssatélite a cada 6-7 kb. No entanto, a estimativa de abundância de microssatélites depende dos critérios adotados na pesquisa, dependendo das variações no número de unidades repetitivas, além de variações de freqüência de microssatélites em diferentes espécies.

Segundo Borém e Caixeta (2009), independente da origem da variação e do elemento repetitivo, cada microssatélite constitui um loco genético altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo. Essa natureza altamente informativa, combinada com a especificidade e rapidez da tecnologia de PCR, fazem

desses marcadores uma eficiente ferramenta para estudos de genes eucariotos, além da detecção de variabilidade genética.

Creste et al. (2004) utilizaram marcadores SSR para investigar a variabilidade genética e o relacionamento genético entre 58 genótipos de bananeira, incluindo 49 diplóides (selvagens e cultivados) e nove triplóides. Os diplóides apresentaram grande variabilidade genética. A partir do dendrograma, foi possível observar a formação de dois grandes grupos, um constituído pelos genótipos diploides e outro com triplóides. Entretanto, não foi possível separar os diplóides selvagens dos cultivados.

2.10 Marcador baseado em SSR: *Inter-SSR Amplification* (ISSR)

Para esta técnica, repetições de di ou trinucleotídeos marcados e ancorados com dois ou quatro nucleotídeos em uma das extremidades são usadas como primers para PCR. Isso permite a amplificação de apenas parte das regiões amplificadas pelo marcador, aumentando a reprodutibilidade, que é uma das limitações do uso de algumas técnicas baseadas em PCR (BORÉM e CAIXETA, 2009; ZIETKIEWICZ et al., 1994).

2.11 Regiões *EST* e a transferência de marcadores

Prosdocimi et al. (2002), afirmam que muitas vezes, ao invés de ser realizado o seqüenciamento genômico de um organismo eucarioto, prefere-se realizar o seqüenciamento só das regiões gênicas, utilizando informações oriundas de RNA mensageiro (mRNA). Dessa forma é realizada uma biblioteca de cDNA, representando o conjunto de mRNAs de uma célula, que são clonados em vetores plasmidiais. As sequencias dos cDNA presentes em tais vetores são então seqüenciados a partir de suas extremidades 5' ou 3' produzindo pequenas seqüências que irão representar pedaços dos genes expressos no momento da

extração do mRNA da célula em questão. Esses pedaços seqüenciados representam etiquetas de genes expressos, ou *ESTs* (Expressed Sequence Tags) e uma análise dos genes expressos é uma abordagem bastante utilizada na tentativa de entender o funcionamento do metabolismo dos mais diversos organismos.

Segundo Sim et al., (2009) em um trabalho realizado transferindo marcadores *EST-SSR* entre cereais e uma gramínea, durante as duas últimas décadas, um largo número de *ESTs* foram gerados nos bancos de dados públicos. Essas sequências são um excelente recurso para o desenvolvimento de marcadores moleculares.

3 OBJETIVO DO ESTUDO

O presente estudo objetivou avaliar as alterações morfológicas e na variabilidade genotípica de *Polytrichum juniperinum* Hedw. decorrentes do cultivo *in vitro* a diferentes concentrações de Ferro-EDTA.

- Inferir sobre as principais alterações morfológicas em situações de deficiência e toxidez por ferro.

- Testar a transferência de marcadores *EST-SSR* entre *Physcomitrella patens* e *Polytrichum juniperinum* para a aplicação no experimento com material dos tratamentos.

- Caracterizar as alterações na variabilidade genotípica de *P. juniperinum* em resposta ao estresse por ferro *in vitro*.

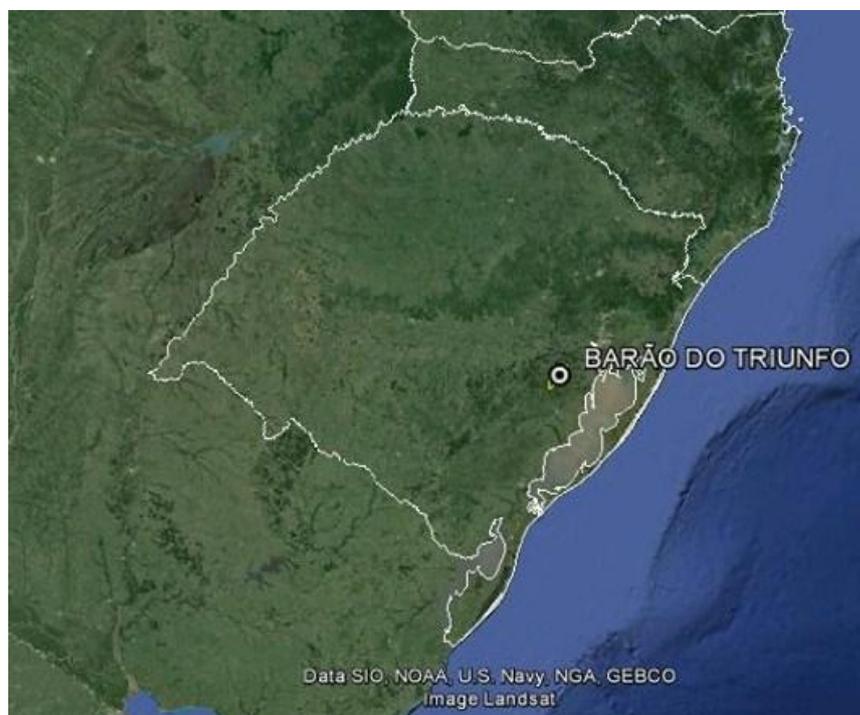
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Avaliação morfológica protonemal

4.1.1 Coleta do material vegetal

As amostras de *P. juniperinum* foram coletadas no interior da cidade de Barão do Triunfo - Rio Grande do Sul - Brasil, por pesquisadores do Núcleo de Estudos da Vegetação Antártica-NEVA, no inverno do ano 2012.

Figura 2 - Mapa do Rio Grande do Sul com a localização da cidade de Barão do Triunfo.



Fonte: Google Earth, adaptado pelo autor, 2013.

A coleta consistiu na retirada de gametófitos inteiros com esporófito viável, sendo as plantas acondicionadas em sacos plásticos contendo sílica gel, para o transporte até o Núcleo de Estudos da Vegetação Antártica localizado na Unipampa *Campus-SG* e, posteriormente as amostras foram processadas em estufa de secagem à 35° C.

4.1.2 Preparação do meio de cultura

A preparação do meio de cultivo para *P. juniperinum*, bem como o monitoramento foi realizado no Núcleo de Estudos da Vegetação Antártica, no *Campus* São Gabriel da Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA.

O meio MS (Murashige e Skoog, 1962) foi utilizado para o cultivo *in vitro* de *P. juniperinum*. Para a preparação de 1 litro, o meio MS foi suplementado com sacarose (30 g.L⁻¹), mio-inositol (100 mg.L⁻¹) e solidificado com ágar (7 g.L⁻¹), autoclavado por 20 minutos a 121° C e 1 atm.

4.1.3 Protocolo de desinfecção para *P. juniperinum*

A desinfecção dos esporófitos foi realizada como descrito por Cvetic et al. (2007) por meio da imersão em 2% de hipoclorito de sódio comercial (NaClO) durante 5 minutos (Figura 3), e posteriormente lavados cuidadosamente em água destilada. Em capela de fluxo laminar, o meio MS foi vertido em placas de Petri de 3,45 cm de largura e 1,50 de profundidade. Após o resfriamento do meio, o opérculo foi retirado e os esporos lançados no meio nutritivo.

Figura 3 - Esporófitos de *P. juniperinum* imersos em hipoclorito de sódio a 2% por 5 minutos.

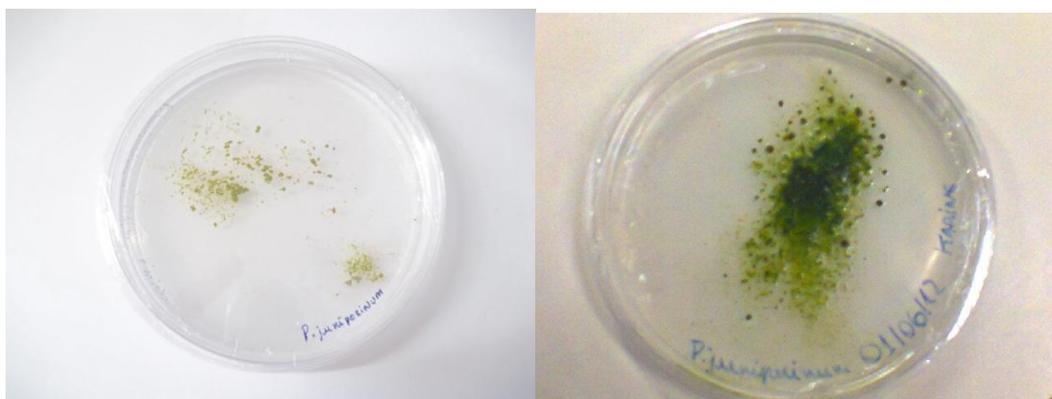


Fonte: autor, 2013.

4.1.4 Cultivo e tratamentos realizados

Ao longo de 15 dias de cultivo, houve o desenvolvimento do tecido protonemal (Figura 4). Pequenos tufos de 0,5 cm de tecido protonemal foram transferidos para cada um dos três tratamentos e o controle, com meio MS alterando apenas as concentrações de Fe-EDTA (Tabela 1).

Figura 4 - A e B, crescimento protonemal após 15 dias de cultivo.



Fonte: autor, 2013.

Tabela 1 - Diferentes concentrações de Fe-EDTA para cada tratamento para o volume de 1 litro de meio MS (Murashige e Skoog, 1962).

TRATAMENTO	VOLUME
Controle	5 ml.L ⁻¹
Tratamento I	0 ml.L ⁻¹
Tratamento II	10 ml.L ⁻¹
Tratamento III	50 ml.L ⁻¹

Fonte: autor, 2012

Os tratamentos foram os seguintes: Controle (5 ml.L⁻¹ de Fe-EDTA), Tratamento I (0 ml.L⁻¹ de Fe-EDTA), Tratamento II (10 ml.L⁻¹ de Fe-EDTA) e Tratamento III (50 ml.L⁻¹ de Fe-EDTA). Para cada tratamento foram feitas cinco réplicas, mantidas em estufa de fotoperíodo à 25° C (Figura 5) em frascos de vidro com 10 cm de comprimento e tampa plástica apropriados para cultivo.

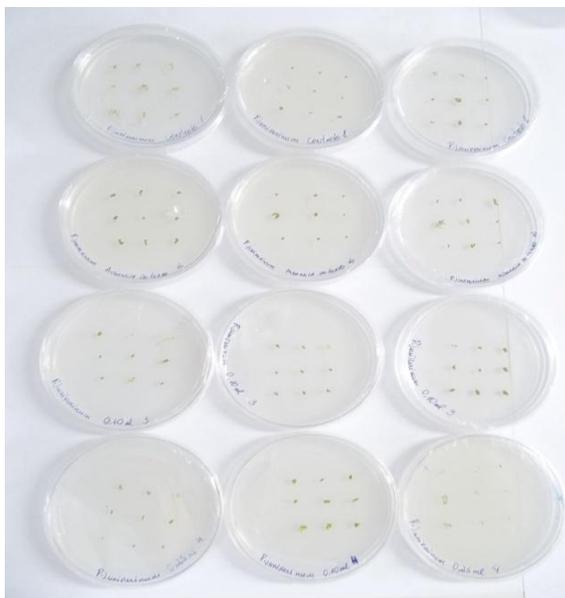
Figura 5 - Frascos de vidro onde foram repicados os explantes de *P. juniperinum*.



Fonte: autor, 2013.

Para uma segunda avaliação, após 15 dias de formação do protonema, o mesmo foi transferido para placas de petri, sendo que para cada tratamento se utilizou três réplicas (Figura 6).

Figura 6 - Imagem do cultivo nos diferentes tratamentos mantidos em placas de petri.



Fonte: autor, 2013.

A partir da repicagem do protonema para os tratamentos controle, I, II, e III, as réplicas foram monitoradas observando o surgimento do primeiro gametófito. Após o 40º dia, com o surgimento dos primeiros gametófitos, as réplicas foram analisadas mensurando as seguintes variáveis: presença/ausência de gametófitos, número de gametófitos, e coloração dos explantes.

A avaliação do cultivo se deu nos 40 e 45 dias, pois segundo Victoria et al. (2011b) os primeiros brotos de gametófito surgem entre o 20-40 dias de cultivo em cultura livre de reguladores. Para tanto, não se utilizou reguladores de crescimento, pois segundo o estudo realizado pelo mesmo autor, para a melhor regeneração dos gametófitos não há necessidade de uso de reguladores de crescimento, pois tratamentos utilizando reguladores não apresentam diferença no desenvolvimento dos gametófitos.

Os metais quelados têm sido usados no vasto campo experimental para permitir o aumento da absorção do metal pela planta, pois aumenta a sua acumulação em diferentes espécies de plantas segundo Alkorta et al., (2004). Neste

trabalho foi utilizado EDTA como agente quelante para absorção do metal na forma de quelato, ou seja, a molécula se torna fisicamente mais disponível a planta.

Para o cultivo em placas de Petri, os explantes foram monitorados durante cinco semanas, e mantidos em estufa de fotoperíodo à 25°C para análise do crescimento e observação da coloração da planta.

4.2 Transferência de marcadores *EST-SSR* entre *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. e *P. juniperinum*

4.2.1 Seleção das regiões *EST-SSR* e transferência *in silico*

Os primers foram gerados a partir de uma busca de regiões *EST-SSR* no genoma de *P. patens* por Victoria et al., (2011a) utilizando o software *SSRLocator* (VICTORIA et al., 2011a; JANNER et al., 2011).

4.2.2 Transferência de marcadores *EST-SSR*

O DNA utilizado para este experimento foi extraído de material vegetal de *P. juniperinum* oriundo da cidade de Canela - Rio Grande do Sul - Brasil, localizada na encosta inferior do Nordeste do Rio Grande do Sul. Foram utilizados 50 pares de primers como descritos na tabela 2. Para a reação de PCR, utilizando 2 µl de DNA de *P. juniperinum*; 1,25 µl dos primers contínuo e reverso; 2,75 µl de água MiliQ® e 6,25 µl do Mix contendo oligonucleotídeos iniciadores, *Taq* DNA Polimerase, *dNTP* mix, MgCl, tampão de enzima. O programa de amplificação consistiu no *SSRTouch* com temperatura inicial para desnaturação de 95°C por 5 minutos, com 30 ciclos de 94° C por 30 segundos, 62° C por 1 minuto (esta temperatura é reduzida a cada ciclo, de 50° C até 62°C), 72° C por 30 segundos. A extensão foi feita a 72° C por 10 minutos. A amplificação do produto foi obtida em gel de agarose corado com GelRed™ (Uniscience), utilizando marcador de 50 bp.

Tabela 2 - Primers utilizados para a transferência de *EST-SSR* entre *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. e *Polytrichum juniperinum* Hedw.

<i>Locus</i>	Primer 5' - 3'	Temperatura de anelamento	<i>Locus</i>	Primer 5' - 3'	Temperatura de anelamento
<i>PHYSSR1F</i>	ACCAGTATTAACCGCCTCCC	62.4°C	<i>PHYSSR26F</i>	CGTCGCACAACAGATGACTT	60.4°C
<i>PHYSSR1R</i>	GTGGAATCATTTTTGCGGAC	58.4°C	<i>PHYSSR26R</i>	GGTTGAATGCGGAACAGAGT	60.4°C
<i>PHYSSR2F</i>	GATCGTGTTTTGACGGAGGT	60.4°C	<i>PHYSSR27F</i>	GGCATGCTGAGGAAAATGAT	58.4°C
<i>PHYSSR2R</i>	GGCCACTTTAACAACCCCTGA	60.4°C	<i>PHYSSR27R</i>	AGCATTGCCCTCTCCTTCTT	60.4°C
<i>PHYSSR3F</i>	ACGGTTGGTAAGCTTGATG	60.4°C	<i>PHYSSR28F</i>	CTCGAAACCAACACCCATT	58.4°C
<i>PHYSSR3R</i>	TGTTGGTGGTGACGAGAGACGAG	62.4°C	<i>PHYSSR28R</i>	GCAACTGAAGCGAAAGGAAC	60.4°C
<i>PHYSSR4F</i>	AAGAGCCAGGGGCTTATGAT	60.4°C	<i>PHYSSR29F</i>	ACGAGAGGACTAACGGTTGC	62.4°C
<i>PHYSSR4R</i>	AATGGCCTGAGAGAGCTTTGAA	58.4°C	<i>PHYSSR29R</i>	GTCGAGGAGGAGAGGAGAGG	66.6°C
<i>PHYSSR5F</i>	GAAATGGGCAGAGCATCAAT	58.4°C	<i>PHYSSR30F</i>	CACACCGCAAGTTCAAATG	58.4°C
<i>PHYSSR5R</i>	CGGCTTTCATAGCATCCATT	58.4°C	<i>PHYSSR30R</i>	GGGTTGCTGTAGAGTCTCGC	64.5°C
<i>PHYSSR6F</i>	GGGAAAAGGAAGAAAGACG	60.4°C	<i>PHYSSR31F</i>	GTACCTGACTGCACCACCCT	64.5°C
<i>PHYSSR6R</i>	TTAATCCGAGTCCCTCATGC	60.4°C	<i>PHYSSR31R</i>	GGAAGGTTTGGTTTGTGGAA	58.4°C
<i>PHYSSR7F</i>	CCCCCTTCTAACTGCGTGTA	62.4°C	<i>PHYSSR32F</i>	AGATATCGAAATCATCGCCG	58.4°C
<i>PHYSSR7R</i>	ATGCAGAGCTAGAACCCGAC	62.4°C	<i>PHYSSR32R</i>	GCAATCGAATAGTGAAATGA	57.1°C
<i>PHYSSR8F</i>	TGGAGGAGGAGAAAGCAAGA	60.4°C	<i>PHYSSR33F</i>	TTCCAGTAGGCAGCAAAGT	60.4°C
<i>PHYSSR8R</i>	CGACAAAGCCAAAAGGATAA	58.4°C	<i>PHYSSR33R</i>	GGTGTGGCAATGTAGACCT	62.4°C
<i>PHYSSR9F</i>	GAACCAAAGTTGCAAACGGT	58.4°C	<i>PHYSSR34F</i>	TACCCTGTACGTCCCCATA	62.4°C
<i>PHYSSR9R</i>	ACAGCAACAGCAACAGCAAC	60.4°C	<i>PHYSSR34R</i>	TTCCGTGTCTGCACTTTGAG	60.4°C
<i>PHYSSR10F</i>	CTGGGTTTCATGTACATTGC	60.4°C	<i>PHYSSR35F</i>	TCACCAGCTAACCTCCATCC	62.4°C
<i>PHYSSR10R</i>	GATTCCAGTCTTTGCTCGC	60.4°C	<i>PHYSSR35R</i>	AGGACGGTGTGTGCGAGAGT	62.4°C
<i>PHYSSR11F</i>	TAATTCGGTGAACGGAGGAG	60.4°C	<i>PHYSSR36F</i>	AGGGTCGTAGTTGTCGTTGG	62.4°C
<i>PHYSSR11R</i>	GACAGACAGACAGCCCAAT	62.4°C	<i>PHYSSR36R</i>	CTCGATTCCCTTGACGAGAAGC	62.4°C
<i>PHYSSR12F</i>	CATCATCGCATCATCGAATC	58.4°C	<i>PHYSSR37F</i>	GACAGGGTTTGGAAACGTAGG	62.4°C
<i>PHYSSR12R</i>	CCGAATACTCCTCCCTCCTC	64.5°C	<i>PHYSSR37R</i>	AGAGACACACCCACTCCCAC	64.5°C
<i>PHYSSR13F</i>	CAGAGACGGGGCTTTAACAC	62.4°C	<i>PHYSSR38F</i>	TCCGTTCTTCACTCCAATC	60.4°C
<i>PHYSSR13R</i>	CTTGGTCTACGACGACGACA	62.4°C	<i>PHYSSR38R</i>	TGAGGAACATGAAACCCACA	58.4°C
<i>PHYSSR14F</i>	CTTACGGGTGTGCCTTTTGT	60.4°C	<i>PHYSSR39F</i>	GCAGTAATTTTGTGGTGGGG	60.4°C
<i>PHYSSR14R</i>	CTCCTTCCCAATTCTCCTC	62.4°C	<i>PHYSSR39R</i>	GGTGGCAAAGAGATGAAGAA	58.4°C
<i>PHYSSR15F</i>	TGCAGCAGCCTTGTCTTCTA	60.4°C	<i>PHYSSR40F</i>	TGGCGTACCACCTCCATGATA	60.4°C
<i>PHYSSR15R</i>	TGCACCTCAACTCAGATTGC	60.4°C	<i>PHYSSR40R</i>	TGTGTCACATGGGGTGGTAG	62.4°C
<i>PHYSSR16F</i>	AACACTTCGGCGATTTTGTG	58.4°C	<i>PHYSSR41F</i>	AAAAGGATGCTGGCTTCAAAC	56.3°C
<i>PHYSSR16R</i>	CCCGCTCTTCTGATTCTCTG	62.4°C	<i>PHYSSR41R</i>	TGAAAGGTTCTGGCATTTC	58.4°C
<i>PHYSSR17F</i>	CGTGTGAGCTCAGTTACGA	62.4°C	<i>PHYSSR42F</i>	AGGAGCACAACTTTGTGCT	60.4°C
<i>PHYSSR17R</i>	CCCATTTCCACGTCAATTCT	58.4°C	<i>PHYSSR42R</i>	GATCCAACGTGCCATTTAG	60.4°C
<i>PHYSSR18F</i>	TGACTCGAGAACCGTCTTTT	60.4°C	<i>PHYSSR43F</i>	AGCAACTTCCGCTTGGTCTA	60.4°C
<i>PHYSSR18R</i>	AGGGCTTTGGCCACCTAGTT	60.4°C	<i>PHYSSR43R</i>	TACCGCTCTGTGCACTGTTT	62.4°C
<i>PHYSSR19F</i>	AAATTGCTCACCAGCGAGAT	58.4°C	<i>PHYSSR44F</i>	TATTCTCGACCAGCCGTTTC	60.4°C
<i>PHYSSR19R</i>	ACATTGGAATCCTTCATCGC	58.4°C	<i>PHYSSR44R</i>	GGATAACCAAGCAGAGCGAG	62.4°C
<i>PHYSSR20F</i>	AGCCCCCTTTTGTGCTGACT	60.4°C	<i>PHYSSR45F</i>	CACGTCTCCAACAACAACG	60.4°C
<i>PHYSSR20R</i>	AGCTCTCCGTCTCAAAACGA	60.4°C	<i>PHYSSR45R</i>	TCTCAGGCAGAGAATCCCA	60.4°C
<i>PHYSSR21F</i>	TTCATGAAGAAGTGCTTCGTCC	60.4°C	<i>PHYSSR46F</i>	TCACCTGGAGCACTTGTGAG	62.4°C
<i>PHYSSR21R</i>	CACCACAAGGTCAAGATCCC	62.4°C	<i>PHYSSR46R</i>	CATTGCGTTAAATCCCCTACT	58.4°C
<i>PHYSSR22F</i>	GTCCCTTGTGATGTGGTGT	62.4°C	<i>PHYSSR47F</i>	AAGGTTGCGAGCTTGAATGT	58.4°C
<i>PHYSSR22R</i>	CAACAGCGTCAACGTCATCT	60.4°C	<i>PHYSSR47R</i>	GCGAGTGGGTATCATCAGGT	62.4°C
<i>PHYSSR23F</i>	TGTGAGTCTGTCTTGTGCG	62.6°C	<i>PHYSSR48F</i>	TCTCCCTCTCCCCGCTATGTA	62.4°C
<i>PHYSSR23R</i>	TGCAATGGATCACCTGAAAA	56.3°C	<i>PHYSSR48R</i>	CGGATCCTGCATGAAAACCT	58.4°C
<i>PHYSSR24F</i>	GAGCTTGGCCGTGTAACAT	60.4°C	<i>PHYSSR49F</i>	CAAGGGCAGCTTGTATGTGA	60.4°C

Cont. Tabela 2.

<i>PHYSSR24R</i>	TCAAAATCTGCGCAACAAAG	56.3°C	<i>PHYSSR49R</i>	CAGGGACGTGGTTTGAGTTT	60.4°C
<i>PHYSSR25F</i>	AGGAGGAGGAAGGCTTCAAA	60.4°C	<i>PHYSSR50F</i>	TCCATCACCTGCAACAAT	58.4°C
<i>PHYSSR25R</i>	AACACCATGCCACATACCAC	60.4°C	<i>PHYSSR50R</i>	GGACCAGTGATTGAAATGGC	60.4°C

Fonte: autor, 2013.

4.3 Avaliação de alteração na variabilidade em resposta ao estresse por ferro

4.3.1 Seleção de primers

Os primers utilizados nessa avaliação foram sequências ISSR e SSR, no qual as sequências são descritas na tabela 3. Os primers SSR utilizados foram testados em *P. juniperinum* conforme a transferência de *EST-SSR* acima descrita, e escolhidos destes apenas três que continham ampliações mais claras.

Tabela 3 - Primers utilizados para a amplificação de regiões ISSR em *P. juniperinum*.

Locus	Sequencia 5' - 3'	Temperatura de anelamento
ISSR1	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAA	53.5°C
ISSR2	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAC	52.8°C
ISSR4	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAT	52.3°C
ISSR9	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA	53.0°C
ISSR10	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGC	55.3°C
ISSR11	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGG	55.1°C

Fonte: autor, 2011.

4.3.2 Extração de DNA

O DNA de *P. juniperinum* submetido aos diferentes tratamentos foi extraído com Qiagen Dneasy Plant Mini Kit conforme protocolo de instruções do fabricante. Utilizou-se 50 mg de tecido oriundo do gametófito e/ou tecido protonemal. O DNA foi purificado e conservado à -20° C.

4.3.3 Análise Molecular

A análise molecular realizou-se através de reações em cadeia da polimerase (PCR), na qual foram analisados 3 locos SSR, e 6 locos ISSR. A reação conteve volume final 12 µl, utilizando 6,25 µl de MIX contendo oligonucleotídeos iniciadores, *Taq* DNA Polimerase, dNTP mix, MgCl, tampão de enzima. Além de 2µl de DNA, 1,25µl de cada primer e 2,75µl de água MiliQ®.

O programa de PCR utilizado para as regiões SSR foi SSRTouch começando por 95° C por 5 minutos, com 30 ciclos de 94° C por 30 segundos, 62° C por 1 minutos (esta temperatura é reduzida a cada ciclo, de 50°C até 62°C), 72° C por 30 segundos. A extensão foi feita a 72° C por 10 minutos.

O programa para as regiões ISSR utilizou 95° C por 2 minutos, a amplificação com 30 ciclos de 50°C por 30 segundos, 75° C por 2 minutos, 95° C por 1 minuto. A extensão foi feita a 72° C por 7 minutos.

4.3.4 Corrida eletroforética

A avaliação foi realizada utilizando géis de poliacrilamida à 6,5%, e também de agarose a partir do produto de PCR. A solução contendo 7,5 ml poliacrilamida 40%, 200 µl de APS (persulfato de amônia) à 2%, 30 µL de TMED, 22 ml de TBE à 0,5%. A solução foi vertida em suporte de acrílico vertical, montada com placas de vidro e pentes para a formação de poços para posterior aplicação das amostras. Também foram utilizados géis de agarose a 3% como descrito na pesquisa acima. Após a polimerização do gel, adicionou-se tampão TBE 0,5% na cuba eletroforética

e aplicou-se 3 μ L do produto de PCR com 1,5 μ L do corante GelRed®. Foi utilizado 2 μ l do marcador de peso molecular (ladder) 50 pb (Concentração: 0,05 μ g/ μ l) para identificação do tamanho dos produtos de PCR amplificados. Para a corrida eletroforética se utilizou uma voltagem de 150 Volts, na qual os fragmentos de DNA eletronegativos migram por repulsão do pólo negativo para o pólo positivo da cuba eletroforética. Após aproximadamente 60 minutos de corrida eletroforética o resultado foi visualizado por transiluminação com luz ultravioleta.

4.3.5 Análise dos amplicons

Os dados de presença/ausência de bandas obtidos na análise de SSR e ISSR de *P. juniperinum* permitiram avaliar a alteração na variabilidade genotípica com o auxílio do programa computacional NTSYS pc 2.1 (ROHLF, 2000). Para a avaliação dos amplicons associados a resposta ao tratamento foi criada uma matriz na qual foi computada para análise no programa, na qual foi construído um fenograma pelo método UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação morfológica protonemal

5.1.1 Monitoramento dos cultivos

As concentrações de Fe-EDTA para cada tratamento foram estipuladas de maneira que se pudesse facilitar a observação mais evidente de alterações na planta. A planta varia seu aspecto comparando as réplicas e, quanto a realização de tratamentos mais fracionados poderia haver dúvida na análise de cada tratamento, tornando confuso o resultado e sem significado para a avaliação.

5.1.2 Parâmetros de avaliação

5.1.2.1 Presença/Ausência de gametófitos

Foram realizadas duas avaliações em cada réplica no 40° dia e 45° dia de cultivo de presença/ausência de gametófitos regenerados (Tabela 4).

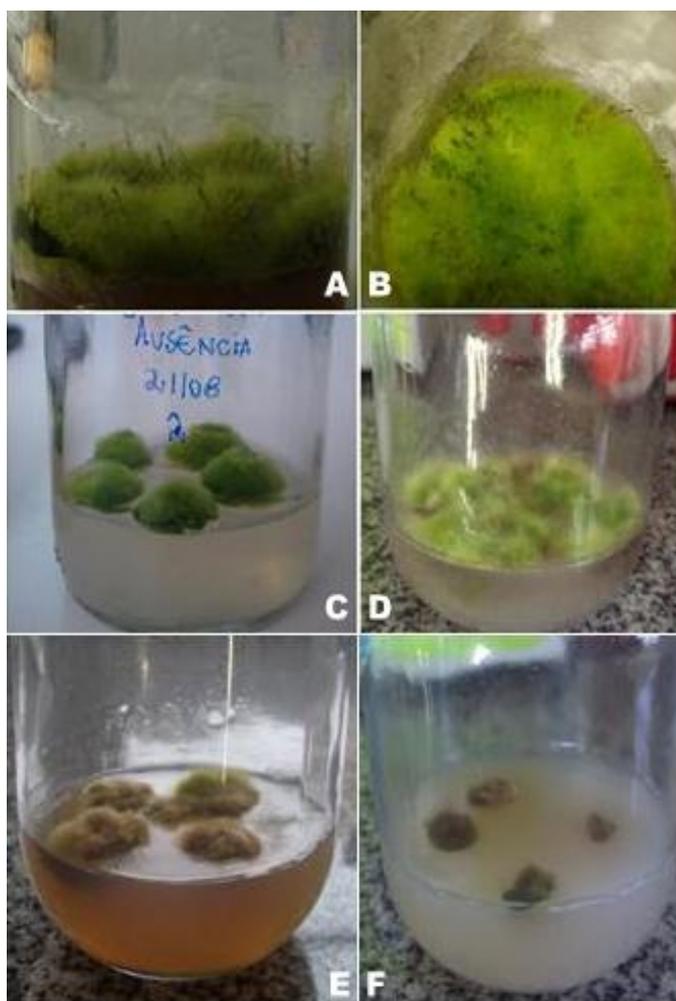
Tabela 4 - Tabela indicando para cada réplica dos tratamentos a presença (+) ou ausência (-) de gametófitos.

MONITORAMENTO	CONTROLE					TRATAMENTO I					TRATAMENTO II					TRATAMENTO III				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
Avaliação I	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Avaliação II	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: autor, 2013.

No controle, a partir da repicagem do protonema, a briófitas se desenvolveu apresentando gametófitos no 40º dia de cultivo (Figura 7A). No tratamento I, os gametófitos emergiram igualmente como no controle desenvolvendo-se bem (Figura 7B e 7C). Na réplica 3 não ocorreu o desenvolvimento da planta e, na réplica 5 houve um retardo no desenvolvimento. Para os tratamentos II e III, a briófitas não apresentou gametófitos, apenas desenvolveu o explante com certo retardo, o que indica que sob condições de estresse, *P. juniperinum* tende a formar apenas o protonema em vez do desenvolvimento normal da planta, se mostrando bastante sensível a concentrações elevadas de ferro (Figura 7D, 7E e 7F).

Figura 7 - Cultivo de *P. juniperinum*. **A**: crescimento no 43º dias de cultivo em condições de controle. **B**: detalhe do crescimento dos gametófitos no tratamento I no 45º dia de cultivo. **C**: tratamento I, no 35º dias, **D**: cultivo no 45º dia no tratamento II. **E**: tratamento III, no 45º dia de cultivo. **F**: tratamento III, no 35 dias.



5.1.2.2 Número de gametófitos

Para a análise do número de gametófitos, efetuou-se análise de variância e a comparação de médias pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Sisvar® (FERREIRA, 2000). Conforme o teste de Tukey, na comparação das médias é possível observar que os tratamentos seguidos da mesma letra não difere entre si, ao nível de significância a 5%. A tabela a seguir representa a variação do número de gametófitos em relação a cada tratamento (Tabela 5).

Tabela 5 - Teste de Tukey aplicado a relação entre o número de gametófitos de acordo com o tratamento, após 45 dias de cultivo.

Controle	Tratamento I	Tratamento II	Tratamento III
32,8 a	42,0 a	0,0 b	0,0 b

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

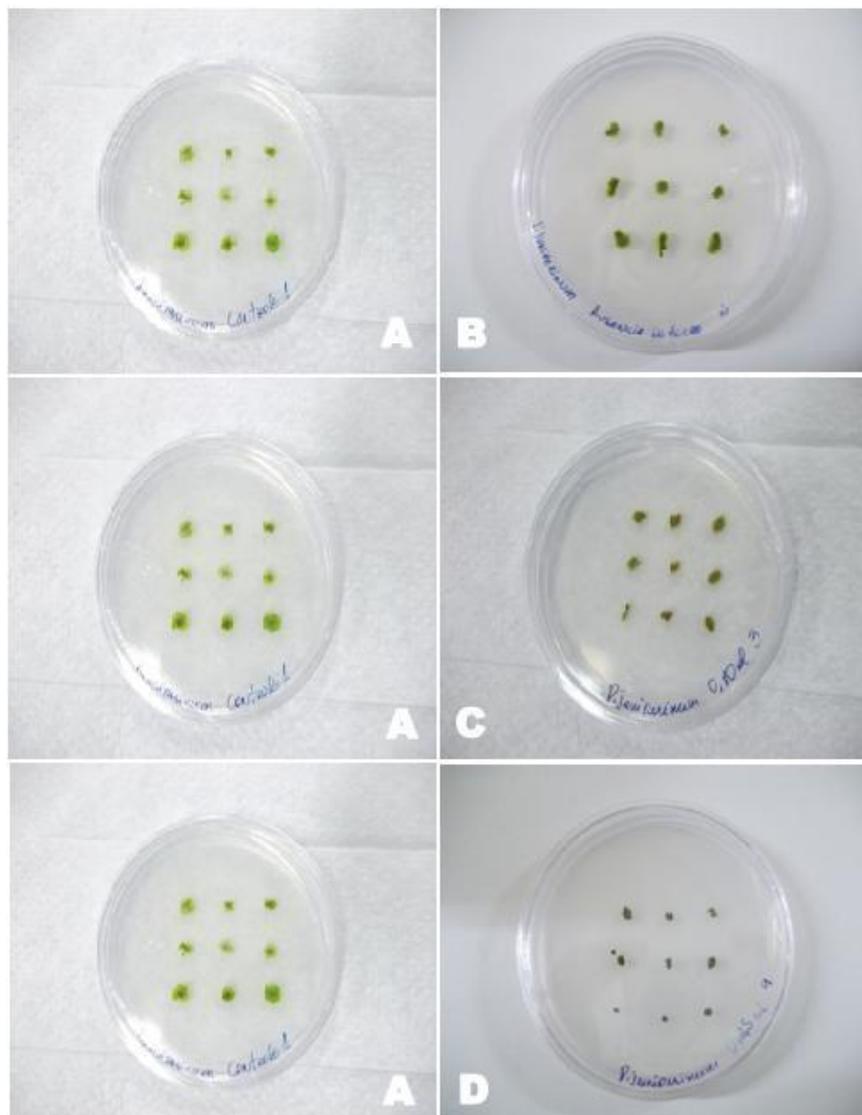
Fonte: Autor, 2013.

Pode-se observar que não houve aumento significativo do número de gametófitos entre o período de tempo das duas avaliações. Porém em relação a variação do número de gametófitos entre os tratamentos houve alteração. Sendo que na ausência do metal foi observado um maior número de gametófitos em relação ao controle. Porém estatisticamente tais valores não diferem entre si, indicando que a deficiência de ferro na fisiologia de *P. juniperinum* não é elemento limitante para a emergência de gametófitos *in vitro*.

5.1.2.3 Coloração dos explantes

Os tratamentos II e III demonstraram alterações na coloração do explante se comparado ao controle e tratamento I. Para o tratamento II, os explantes demonstraram a borda escurecida a partir da 5ª semana de cultivo. Sendo que no tratamento III o explante que teve seu desenvolvimento bastante afetado, apresentou coloração bastante escura, caracterizado por um bronzeamento do protonema (Figura 8). Também houve um escurecimento do meio de cultura devido a precipitação do metal, por este estar em quantidade elevada no meio de cultura conforme mostra a figura 7E.

Figura 8 - Comparação da coloração dos explantes mantidos em placas de petri após 5 semanas de cultivo. Sendo, respectivamente, **A** e **B** (controle e tratamento I), **A** e **C** (controle e tratamento II), **A** e **D** (controle e tratamento III).



Fonte: autor, 2013.

Em plantas da linhagem basal são poucos ou quase inexistentes os relatos de estudos avaliando o aspecto morfológico de musgos quanto a deficiência e toxicidade de metais pesados *in vitro* ou *in vivo*. Porém musgos como *Mielichhoferia elongata* (Hoppe & Hornsch.) Nees & Hornsch., *Pohlia drummondii* (Müll. Hal.) A.L. Andrews e *Scapania undulata* (L.) Dumort. são conhecidos por crescerem em locais poluídos com altas concentrações por metais pesados, sem alterações na sua morfologia (URL,1956).

Em *P. patens*, Sassmann (2010) realizou um estudo para avaliar as alterações fisiológicas na planta *in vitro* à diferentes concentrações de metais pesados observando que o musgo consegue tolerar altas concentrações de cobre e zinco acumulando esses metais no seu tecido. Quanto a concentrações elevadas de Ferro, a planta não apresentou respostas metabólicas, sugerindo que esta planta possa ser sensível ao metal. Nesse trabalho, a fim de avaliar o aspecto morfológico de *P. juniperinum* à diferentes concentrações de Fe-EDTA, foi observado que o musgo é sensível a concentrações a partir de 10 ml.L^{-1} ($37,2 \text{ g.L}^{-1}$) *in vitro*, apresentando como principais alterações em sua morfologia a ausência de gametófitos, alterações na coloração e retardo no desenvolvimento dos explantes. Quanto a deficiência induzida *in vitro*, o musgo não apresenta alterações, tendo seu desenvolvimento normal apresentando gametófitos a partir do 40º dia de cultivo.

Segundo Pathirana et al. (2002), a indução de calos em certa cultivar de arroz (RoM1) sob estresse por Fe-EDTA *in vitro* à concentrações de 27,8, 55,6 e 83,4 mgL^{-1} $\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ diminui significativamente, sendo que a altura e produção de sementes em plantas produzidas a partir de calos sob tais condições foram expressivamente reduzidos. Em dicotiledonias, Pestana et al., (2012) observaram que a deficiência de ferro induzida em *Fragaria L.* *in vitro* apresentou clorose férrica na plântula bem como alterações na morfologia externa da raiz. A clorose surge em folhas mais jovens, caracterizando-se pelo aparecimento de um fino reticulado no qual apenas as nervuras permanecem verdes, devido a baixa mobilidade do ferro na planta.

Assim, *P. juniperinum* não se mostra tolerável ao Ferro quando se avalia a morfologia. Sassmann (2012) reporta que *P. patens* não se apresenta tão sensível a nível fisiológico a metais como Cd, Cu, Zn, porém quanto ao ferro em sua fisiologia, a planta parece ser sensível a altas concentrações, assim como o observado no presente estudo.

P. juniperinum parece não necessitar do ferro no seu desenvolvimento, pois na deficiência do elemento, o musgo não alterou a morfologia. Esse resultado pode ser corroborado por Sassmann (2012), que obteve um efeito ligeiramente positivo no acúmulo de biomassa em *P. patens* na deficiência de metais como Zn, Cu, Cd,

sendo que em concentrações elevadas desses metais, neste mesmo estudo houve um decréscimo da biomassa.

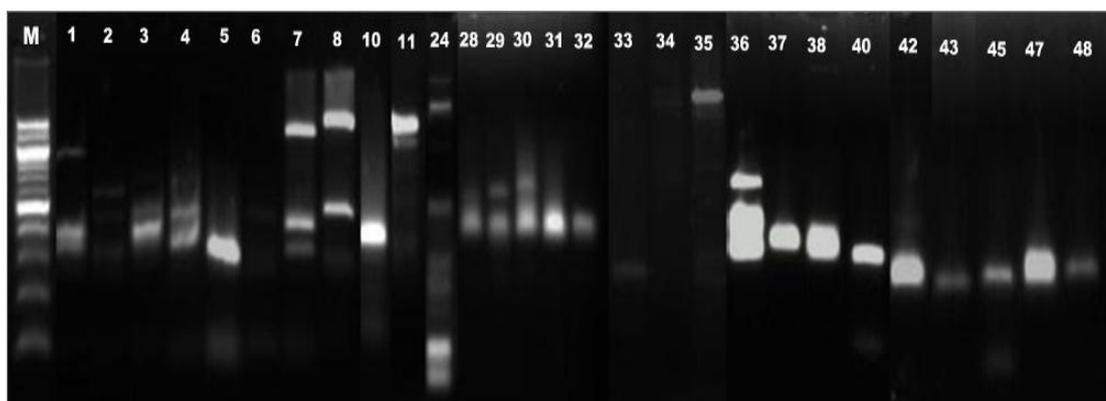
A alteração na coloração dos protonemas de *P. juniperinum* sob condições de ferro em excesso, pode indicar alterações na maquinaria celular. Para Martinez-Abaigar et al. (2011), a exposição a metais pesados pode causar aumento de danos celulares associados a outros fatores de estresse abiótico, como por exemplo exposição a radiação UV. Estes metais atuam em diversos mecanismos similares, como a produção de espécies reativas de oxigênio, dano no DNA, ou alterações fotosintéticas (Otero et al., 2006).

Estes resultados sugerem a utilização de *P. juniperinum* como espécie bioindicadora de áreas com ferro pouco disponível ou mesmo ausente, pois esta demonstrou ser sensível a grandes concentrações deste metal.

5.2 Transferência de marcadores EST-SSR entre *Physcomitrella patens* Brid. e *Polytrichum juniperinum* Hedw.

A partir dos 50 pares de primers *EST-SSR* prospectados em bancos de *EST* de *Physcomitrella patens* foi obtido 28 pares (56%) com ampliações positivas em DNA extraído de *P. juniperinum*. A figura 9 mostra a amplificação dos primers 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 24, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 40, 42, 43, 45, 46, 47, de regiões *EST-SSR* em *P. juniperinum*.

Figura 9 - Gel de agarose a 3%, utilizando o marcador 50bp.



Fonte: autor, 2013.

P. juniperinum representante da Classe Polytrichopsida obteve satisfatória porcentagem de amplificação de regiões *EST-SSR* de *Physcomitrella patens* apesar da espécie ser representante da Classe Bryopsida, podendo indicar uma elevada taxa de conservação de sequências entre as duas espécies. Esta evidência necessita ser confirmada através do sequenciamento das regiões amplificadas em *P. juniperinum*.

Este resultado se comparado a Thiel et al. (2003) que mostrou alta taxa de transferência de *EST-SSR* entre *Hordeum vulgare* L. e *Oryza sativa* L., ambas da família Poaceae e representantes de linhagem recente de plantas terrestres, foi obtido 40% de transferência. Tal resultado pode indicar que regiões *SSR* são conservadas no genoma de musgos. Nesse estudo utilizando espécies de classes distintas obteve-se uma porcentagem de amplicons considerável, na pesquisa mencionada acima, os representantes da linhagem superior de plantas e pertencentes a mesma família possuem uma menor taxa de transferência de marcadores *EST-SSR*.

Assim, pode-se inferir que apesar da possibilidade de transferência diminuir com o aumento da distância filogenética (VARSHNEY et al., 2005), o genoma de musgos pode possuir alta taxa de conservação de sequências repetidas entre classes distintas. O resultado aqui apresentado, difere de iniciativas anteriores sobre a transferibilidade de *EST-SSR* inter-espécie para inúmeras plantas das linhagens mais recentes em plantas terrestres, incluindo *Triticum aestivum* L., *Hordeum vulgare*, *Festuca arundinaceae*, *Oryza sativa*, *Medicago truncatula* Gaertn. e *Pinus taeda* L. onde a possibilidade de transferência diminuiu com o aumento da distância filogenética na qual o sucesso da taxa de transferência diferia de 96% a 40% (THIEL et al., 2003; SAHA et al., 2004; VARSHNEY et al., 2005).

Os primers que obtiveram amplificação para o presente estudo foram transferidos com sucesso, sendo alguns deles utilizados para a avaliação de variabilidade em resposta aos tratamentos com ferro em *P. juniperinum*, porém estudo posterior é necessário a realização de sequenciamento de tais regiões para se inferir que fragmentos estão sendo amplificados e validar a transferência de *EST-SSR* entre espécies representativas de linhagens basais das plantas terrestres.

5.3 Avaliação de alterações na variabilidade genotípica em resposta ao estresse por ferro

Dos 28 primers EST-SSR transferidos para *P. juniperinum*, foram escolhidos os primers PHYSSR8F/8R, PHYSSR11F/11R, PHYSSR48F/48R (Figura 10) para a avaliação de alteração na variabilidade utilizando o DNA da espécie cultivada in vitro submetida aos tratamentos com diferentes doses de ferro.

Figura 10 - Gel de poliacrilamida à 6,5% com amplificações dos primers SSR 8, 11, 48. Foi utilizado o marcador 50bp.



Fonte: autor, 2013.

Da análise de SSR utilizando três primers foi obtido um total de 16 amplificações, sendo encontrada apenas uma banda monomórfica no primer *PHYSSR11F/11R* (25% do total de bandas). O controle apresentou o menor número de amplificações (Tabela 6).

Tabela 6 - Relação de bandas monomórficas e polimórficas entre os primers SSR associados ao tratamento.

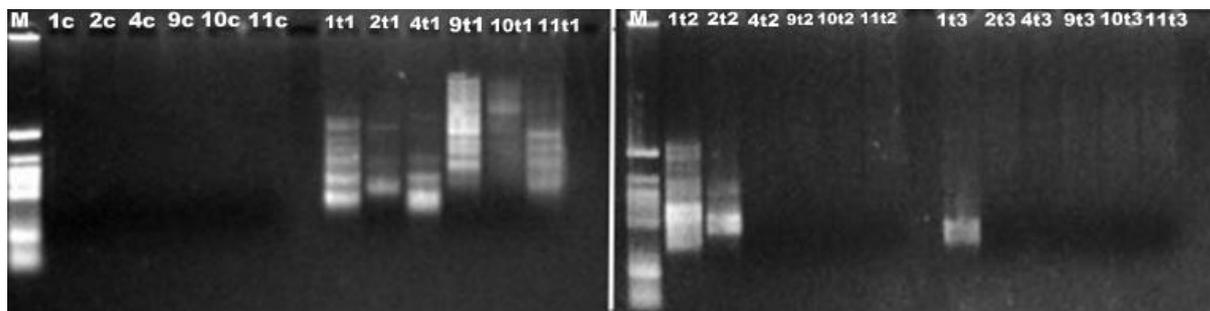
Primers + tratamentos	Nº bandas monomórficas	Nº bandas polimórficas
SSR 8F/8R + Controle	0	0
SSR 8F/8R + tratamento I	0	2
SSR 8F/8R + tratamento II	0	1
SSR 8F/8R + tratamento III	0	1
SSR 11F/11R + Controle	1	0
SSR 11F/11R + tratamento I	1	0
SSR 11F/11R + tratamento II	1	0
SSR 11F/11R + tratamento III	1	0
SSR 48F/48R + Controle	0	0
SSR 48F/48R + tratamento I	0	1
SSR 48F/48R + tratamento II	0	4
SSR 48F/48R + tratamento III	0	3

Fonte: autor, 2013.

O baixo número de bandas monomórficas entre o controle e os demais tratamentos evidencia o potencial da técnica de microssatélite para detecção da alteração na variabilidade genotípica em resposta aos tratamentos. Segundo Tanksley et al., (1989) os marcadores moleculares tem sua utilidade baseada em encontrar fortes ligações entre genes de interesse. Tais ligações permitem a inferência da presença do gene desejado através da identificação do marcador.

Entre os primers SSR utilizados neste estudo, para dois deles não foi encontrada função anotada, porém quanto a anotação em relação a função da região em que os primers SSR estariam amplificando, *PHYSSR8F-R* tem sua função anotada. A região que contém este microssatélite tem sua expressão em condições de má formação de protonema, e caulídios em *P. patens*. Tal função pode estar relacionada a danos na maquinaria causada pelo ferro, como já citado acima, o ferro pode causar danos no DNA, esses danos são refletidos no fenótipo e conseqüentemente no genótipo da planta. Nesse estudo, é provável que tal região não tem sua expressão a condições de cultivo controle.

Figura 11 - Gel de agarose à 3% com amplificação dos primers 1, 2, 4, 9,10, 11. Foi utilizado o marcador 50bp.



Fonte: autor, 2013.

Para a análise de ISSR foram obtidos um total de 17 amplificações (Figura 11), na qual 11 do total foram do tratamento I (64,70%) e, o restante dos tratamentos II e III. O tratamento controle não apresentou amplificações nesta análise (Tabela 7).

Tabela 7 - Relação da amplificação dos primers ISSR polimórficos em resposta ao tratamento.

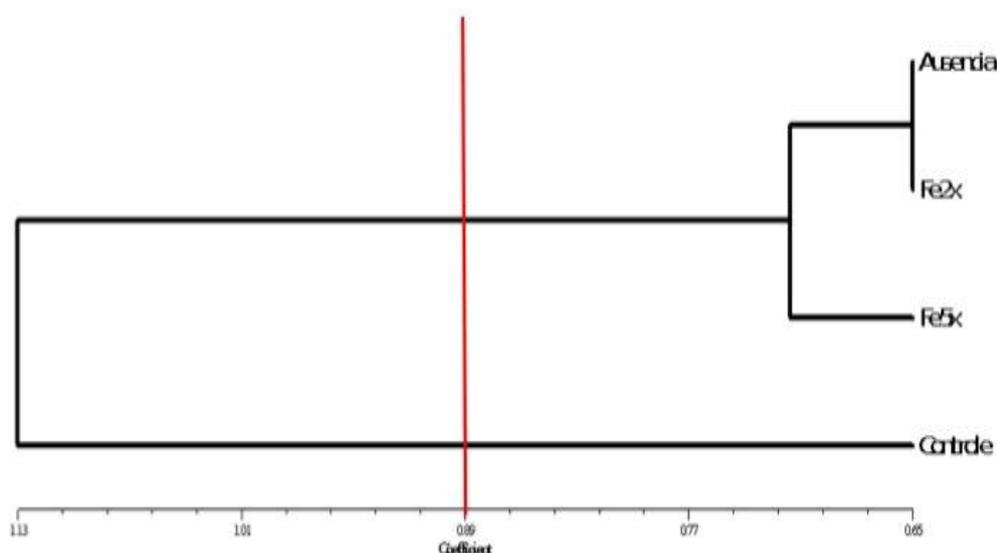
Primers	Controle	Tratamento I	Tratamento II	Tratamento III
ISSR 1	0	3	2	1
ISSR 2	0	2	3	0
ISSR 4	0	3	0	0
ISSR 9	0	2	0	0
ISSR 10	0	0	0	0
ISSR 11	0	1	0	0

Fonte: Autor, 2013.

Através da análise dos dados pode-se observar que o tratamento controle obteve uma baixa ou inexistente expressão de alelos nas regiões SSR e ISSR. Porém o tratamento I, II, e III mantiveram um padrão de amplificação, com um ou até quatro alélos expressos. A ausência de amplificação dos primers do tratamento controle pode estar associado a condição de fonte de ferro (5 ml.L^{-1}) a qual *P. juniperinum* foi submetido, sugerindo que estas regiões não se expressam nesta condição fisiológica.

A partir do fenograma baseado no método de agrupamento UPGMA foi possível observar que o tratamento controle apresentou maior diferença genética em comparação aos demais tratamentos (Figura 12). A taxa de polimorfismo dos tratamentos com distintas concentrações de ferro mostrou diferenças significativas em comparação com o tratamento controle. Assim pode-se afirmar que a planta reagiu ao tratamento, sugerindo que a ausência e as maiores concentrações deste metal, a variabilidade genotípica é alterada.

Figura 12 - Fenograma da relação cofenética dos tratamentos/variabilidade.



Fonte: autor, 2013.

Os locos SSR já foram descritos estarem associados ou envolvidos com genes responsáveis por processos metabólicos e celulares. Segundo a análise de Victoria et al., (2011a) com a comparação das sequências do genoma de *P. patens*, as sequências que continham SSR incluíram associação com genes responsáveis por processos metabólicos. A expressão de genes envolvidos em processos metabólicos pode incluir genes responsáveis pela quelação do ferro e redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} , ou seja, atuante tanto na estratégia I e II das plantas.

Os genes NAS (*Nicotianamina sintase*) estão envolvidos tanto na estratégia I e II das plantas superiores, atuando na síntese de Nicotianamina, precursora e essencial na síntese dos ácidos mugineicos. A NA pode se ligar a vários metais, dentre eles Fe^{2+} e Fe^{3+} , mas não é secretada, sugerindo uma provável participação no transporte intra e intercelular de metais em espécies tanto da estratégia I como da II. Fitosideróforos são liberados na rizosfera das raízes de plantas sob deficiência de ferro, com o objetivo de aumentar a absorção de ferro. Também em outro estudo (PICH et al., 2001) com plantas de tomate e ervilha foi relatado que a concentração de NA aumenta em resposta ao incremento na absorção do nutriente, indicando que este composto pode desempenhar uma importante função na tolerância ao excesso de ferro.

No presente estudo existe a probabilidade de genes NAS estar sendo expressos nas condições de deficiência de ferro e toxidez por ferro. Tal evidência pode estar de acordo com o estudo realizado por Victoria et al., (2012) no qual em uma análise *in silico* foram encontrados homólogos de NAS no genoma de *P. patens*. Porém, para a confirmação de tal hipótese é necessário fazer uso das ferramentas da engenharia genética. O sequenciamento das regiões adjacentes às microssatélites irá propiciar a manipulação das sequências e, a partir do nocaute ou inativação do gene associado ao SSR, será possível inferir sobre a ativação e inativação de tal gene no genoma de *P. juniperinum*, seu real efeito sobre a fisiologia na expressão de um caráter específico, e se existem outros genes ou proteínas envolvidas no transporte de ferro em musgos, por exemplo, genes FRO, proteínas ferritina e genes ZIP/IRT. Também será necessário avaliar a expressão dos outros 25 primers restantes da transferência de marcadores, no DNA da planta submetida aos tratamentos e, a partir daí fazer uma análise no banco de dados sobre as possíveis funções das regiões amplificadas. Tanto o excesso quanto a deficiência de ferro são prejudiciais ao crescimento vegetal, a caracterização da expressão destes genes em *P. juniperinum* contribuirá na elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na homeostasia de ferro nas plantas basais.

Do ponto de vista da biologia molecular, muitos aspectos ainda não foram elucidados, principalmente com plantas da linhagem basal, tais como o número e o efeito de genes envolvidos na expressão de um caráter específico, localização, e função fisiológica de cada.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com a análise morfológica de *Polytrichum juniperinum* submetido a diferentes concentrações de Fe-EDTA *in vitro*, a espécie se mostrou sensível a concentrações acima de 10 mL.L⁻¹ de Fe-EDTA, observando ausência do número de gametófitos e escurecimento do explante. Quanto a situação de deficiência de ferro, a planta não apresentou alterações, tendo seu desenvolvimento normal, indicando que a deficiência de ferro na fisiologia de *P. juniperinum* não é elemento limitante para a emergência de gametófitos *in vitro*. Assim, pode-se inferir que *P. juniperinum* pode ser utilizado como planta bioindicadora de áreas pobres em ferro.

Para a análise de alteração na variabilidade genética, foi observado que a espécie teve sua variabilidade genotípica alterada pela toxidez e deficiência por ferro. Para tal análise foi necessário a transferência de marcadores *EST-SSR* entre *Physcomitrella patens* Hedw. e *P. juniperinum*, sendo transferido com sucesso 56% do total de primers. Tal resultado pode indicar que apesar da possibilidade de transferência diminuir com o aumento da distância filogenética o genoma de musgos pode possuir alta taxa de conservação de sequências repetidas entre classes distintas. Além disso, também observou-se que a utilização de marcadores *SSR* e *ISSR* tornam-se uma técnica eficiente para avaliar a alteração de variabilidade genotípica. A partir da análise do fenograma, foi observado que o tratamento controle diferiu dos demais indicando que a variabilidade genética foi alterada sob condições de estresse em *P. juniperinum*.

Neste trabalho não se obteve amplificações do tratamento controle, o que pode indicar, que genes responsivos ao estresse por metais como os da família gênica *NAS*, podem estar atuando tanto na estratégia I e II de absorção de metais. Contudo, percebe-se a carência de estudos utilizando plantas basais do ponto de vista molecular, assim este trabalho necessita de continuidade, e a partir das ferramentas da engenharia genética, buscar analisar o efeito na expressão de um caráter específico sobre a fisiologia de *P. juniperinum* sob deficiência e toxidez por ferro, e se existem outros genes ou proteínas envolvidas no transporte de ferro em musgos.

7 REFERÊNCIAS

ACETO, M., ABOLLINO, O., CONCA, R., MALANDRINO, M., MENTASTI, E., & SARZANINI, C. **The use of mosses as environmental metal pollution indicators.** Chemosphere, v. 50, n. 3, p. 333-342, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653502005337#>>. Acesso em out. de 2013.

AISLABIE, J.M., BALKS, M.R., FOGHT, J.M., & WATERHOUSE, E.J. **Hydrocarbon spills on Antarctic soils: effects and management.** Environmental science & technology, v. 38, n. 5, p. 1265-1274, 2003. Disponível em:<<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/es0305149> >. Acesso em out. de 2013.

AISLABIE, J. M., BALKS, M. R., FOGHT, J. M., & WATERHOUSE, E. J. **Chelate-enhanced phytoremediation of soils polluted with heavy metals.** Reviews in Environmental Science and Biotechnology, v. 3, n. 1, p. 55-70, 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1023%2FB%3A95B.0000040057.45006.34>>. Acesso em nov. de 2013.

BARRIQUELLO, I.M. **Fenologia reprodutiva e crescimento em populações do musgo *Octoblepharum albidum* Hedw. (Octoblepharaceae) no Parque Ecológico Municipal Leopoldo Linhares Fernandes, Alta Floresta (MT), Amazônia Meridional.** Alta Floresta: Universidade do Estado de Mato Grosso, 63p. 2009.

BECANA, M.; MORAN, J. F.; ITURBE-ORMAETXE, I. **Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection.** Plant and Soil, v. 201, n. 1, p. 137-147, 1998. Disponível

em:< <http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1004375732137>>. Acesso em out. de 2013.

BEZBORODOVA. A. e W. H. EREMEEV. **Fiziko-chimiceskije aspekty vzaimodejstviya okeana i atmosfery.** — Izd. Kiiev : Naukova Dumka. 190 pp. 1984.

BORÉM, A. e CAIXETA, E.T. **Marcadores Moleculares.** 2º Edição. Viçosa:UFV, 2009.

BOUSTRON, C. **Reduction of contamination problems in sampling of Antarctic snows for trace element analysis.** Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam: Analítica química Acta, v.106, pp.127-130. 1979. Disponível em:<<http://www.abebooks.com/REDUCTION-CONTAMINATION-PROBLEMS-SAMPLING-ANTARCTIC-SNOWS/1102612515/bd>>. Acesso em out. de 2013.

BRAUN, C., MUSTAFA, O., NORDT, A., PFEIFFER, S., & PETER, H. U. **Environmental monitoring and management proposals for the Fildes Region, King George Island, Antarctica.** Polar Research, v. 31, 18206, 2012. Disponível em: <<http://www.polarresearch.net/index.php/polar/article/view/18206>. > Acesso em out. de 2013.

CARDLE, L., RAMSAY, L., MILBOURNE, D., MACAULAY, M., MARSHALL, D., & WAUGH, R. **Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants.** Genetics, v. 156, n. 2, pp. 847-854, 2000. Disponível em: < <http://www.genetics.org/content/156/2/847.short>>. Acesso em out. de 2013.

CHAKRABORTTY, Sharmistha; PARATKAR, Govind Tryambakro. **Biomonitoring of trace element air pollution using mosses**. *Aerosol and Air Quality Research*, v. 6, n. 3, pp. 247-258, 2006. Disponível em:< http://www.aaqr.org/Doi.php?id=2_AAQR-06-09-OA-0002>. Acesso em nov. de 2013.

CHEN, Y. Y., LOU, Y. X., GUO, S. L., & CAO, T. **Successful tissue culture of the medicinal moss *Rhodobryum giganteum* and factors influencing proliferation of its protonemata**. In: *Annales Botanici Fennici.*, nº6, 2009, p. 516-524. **Anais:** Successful tissue culture of the medicinal moss *Rhodobryum giganteum* and factors influencing proliferation of its protonemata. Finnish Zoological and Botanical Publishing Board. 2009, pp. 516-524. Disponível em:<<http://cabdirect.org/abstracts/20103029452.html>>. Acesso em out. de 2013.

COVE, David J.; KNIGHT, Celia D.; LAMPARTER, Tilman. **Mosses as model systems**. *Trends in Plant Science*, v. 2, n. 3, pp. 99-105, 1997. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136013859610056X>>. Acesso em out. de 2013.

CRESTE, S., NETO, A. T., VENCOVSKY, R., DE OLIVEIRA SILVA, S., & FIGUEIRA, A. **Genetic diversity of Musa diploid and triploid accessions from the Brazilian banana breeding program estimated by microsatellite markers**. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v. 51, n. 7, pp. 723-733, 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1023/B:GRES.0000034578.37951.c4#close>>. Acesso em nov. 2013.

FERREIRA, D. F. **Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0**. In: 45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, SP, 2000. p.255-258. **Anais:** Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. UFSCar. 2000. p.255-258. Disponível em:< <http://www.dex.ufla.br/~danielff/software.htm>>. Acesso em nov. de 2013.

FRAHM, Jan-Peter. **Moose als Bioindikatoren**. 1ª edição. Wiesbaden: Quelle & Meyer, 1998. Disponível em: < <http://tocs.ulb.tu-darmstadt.de/59115386.pdf>>. Acesso em set. de 2013.

GLIME, Janice. M. **Utilidad economica y etnica de las briofitas**. Pp. 59, 2007. Disponível em: < http://www.musgosdechile.cl/glime_usos_espanol_2ed.pdf>. Acesso em dez. de 2013.

GÖRLACH, U.; BOUTRON, C. F. **Variations in heavy metals concentrations in Antarctic snows from 1940 to 1980**. Journal of atmospheric chemistry, v. 14, n. 1-4, pp. 205-222, 1992. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF00115234>>. Acesso em out. de 2013.

GRADSTEIN, S. R.; SALAZAR-ALLEN, N.; CHURCHILL, S.P. **Guide to the Bryophytes of Tropical America. Memoirs of the New York Botanical Garden**, v.86, pp.577, 2001. Disponível em: <http://www.nhbs.com/guide_to_the_bryophytes_of_tropical_america_tefno_116651.html>. Acesso em out. de 2013.

GUERINOT, Mary Lou; YI, Ying. **Iron: nutritious, noxious, and not readily available**. Plant Physiology, v.104, nº3, pp. 815-820. 1994. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC160677/>>. Acesso em out. de 2013.

HANSCH, R. e MENDEL, R. R. **Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl)**. Current Opinion In Plant Biology v.12, nº3, pp. 259-266, 2009. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526609000429>>. Acesso em out. 2013.

HARRIS, Colin M. **Environmental effects of human activities on King George Island, South Shetland Islands, Antarctica.** Polar Record, v.27, n°162, pp. 193-204, 1991. Disponível em: <<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract;jsessionid=4737D64A5EE81867B970E7089AE3C2D4.journals?fromPage=online&aid=5413184>>. Acesso em out. de 2013.

HELL, Rüdiger; STEPHAN, Udo W. **Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants.** Planta, v. 216, n°. 4, pp. 541-551, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12569395>>. Acesso em out. de 2013.

HOWELER, R. H. **Iron-induced orange disease of rice in relation to physico-chemical changes in a flooded oxisol.** Soil Science Society of America Journal, v. 37, n°. 6, pp. 898-903, 1973. Disponível em: <http://soilslab.cfr.washington.edu/SSSAJ/SSAJ_Abstracts/data/contents/a037-06-0898.pdf>. Acesso em out. de 2013.

HYVÖNEN, Jaakko. **Polytrichaceae.** Plant Biology, P.O. Box 65 e Botanical Museum, Finnish Museum of Natural History, P.O. Box 7. Disponível em: <http://www.anbg.gov.au/abrs/Mosses_online/Polytrichaceae.pdf>(2012). Acesso em out. 2013.

JANNER K. E., BOLSON S., ALBUQUERQUE M. P., PEREIRA A. B., STEFENON V. M., COSTA DE OLIVEIRA, A., VICTORIA F.C. **Transfêrencia de marcadores EST-SSR entre *Physcomitrella patens* Brid. E *Polytrichum juniperinum* Hedw.** In: Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, UNIPAMPA-

Campus Uruguaiana, RS, 2011. **Anais:** Transfêrencia de marcadores *EST-SSR* entre *Physcomitrella patens* Brid. E *Polytrichum juniperinum* Hedw. v.3, n°2, 2011. Disponível em:< <http://seer.unipampa.edu.br/index.php/siepe/article/view/3340>>. Acesso em set. de 2013.

JOSHI, S. K.; SHARMA, S.N.; SINGHANIA, D.L.; SAIN, R.S. **Combining ability in the F1 and F2 generations of diallel cross in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell).** Heredity, New York, v. 141, pp. 115-121, 2004. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15660971>>. Acesso em out. de 2013.

JUDA J. and S. CHRÓŚCIEL. **Ochrona powietrza atmosferycznego.** — Wyd. Nauk.-Techn: Warszawa, pp. 448, 1974.

KABATA-PENDIAS, Alina.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants.** 3^oed. Boca Raton: CRC Press, pp. 413, 2001. Disponível em:< <http://books.google.com/books?hl=ptBR&lr=&id=Nowwb0xl9fYC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Trace+elements+in+soils+and+plants.&ots=JGjLfe79xw&sig=X1N2HAaYLkAgRY8qxbvFvACijl#v=onepage&q=Trace%20elements%20in%20soils%20and%20plants.&f=false>>. Acesso em out. de 2013.

KOZŁOWSKI, T. T. **Plant responses to flooding of soil.** BioScience, v. 34, n° 3, pp. 162-167, 1976. Disponível em:< <http://www.jstor.org/discover/10.2307/1309751?uid=2129&uid=2&uid=70&uid=4&sid=21103176931361>>. Acesso em out. de 2013.

KRÄMER, Ute e CLEMENS, Stephan. **Functions and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants.** Topics in Current Genetics v.14, pp. 216-271, 2005.

LIANG, Shu-Feng; SUN, Yue; ZHU, Rui-Liang. ***In vitro* micropropagation of *Bryum argenteum* Hedw.** Cryptogamie, Bryologie, v. 31, n°. 3, pp. 233-239, 2010. Disponível em:< <http://tiantong.ecnu.edu.cn/download/SCI/2010/10.pdf>>. Acesso em out. de 2013.

LISICIN A. P. **Processy okeanskoi sedimentacii.** — Izd. Nauka: Moskva, pp. 391, 1983.

MARTENSSON, O. e BERGGREN, A. **Some notes on the ecology of the "coppermosses".** Oikos. v.5, n°1, pp. 99-100. 1954.

MARTÍNEZ-ABAIGAR, J. e Núñez-Oliveira, E. **Aquatic bryophytes under Ultraviolet Radiation.** In: Tuba, Z., Slack, N.G. e Stark, L. R. (eds). Bryophyte Ecology and Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, pp 115-148, 2003. Disponível em:< http://www.limnetica.com/Limnetica/Limne25/L25a081_Ultraviolet_radiation_aquatic_bryophytes.pdf>. Acesso em jan. de 2014.

MARTÍNEZ, K. e PRICE, M. **Brood cells in the rare, epiphytic moss *Tayloria rudolphiana* (Garov.) Bruch et Schimp. (Splachnaceae).** Cryptogamie, Bryologie, Paris, v. 32, n°.1, pp. 3-12, 2011. Disponível em:< <http://www.bioone.org/doi/abs/10.7872/cryb.v32.iss1.2011.003>>. Acesso em out. de 2013.

MEURER, E. J. **Fundamentos de química do solo.** Porto Alegre: Gênese:, 174p, 2000.

MITRA A. P. **Human influence on atmospheric environment.** New Delhi: Monogr. National Physical Labor, pp. 400, 1979.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. **PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics.** The Plant Journal, v.3, nº1, pp.175-182, 1993. Disponível em:<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-313X.1993.t01-9-00999.x/abstract>>. Acesso em nov. de 2013.

MURAD, Enver; FISCHER, Walter R. **The geobiochemical cycle of iron.** In: Iron in soils and Clay Minerals. Springer Netherlands, pp. 1-18, 1987. Disponível em:<http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-009-4007-9_1>. Acesso em out. 2013.

OCHYRA, R. **The moss flora of King George Island, Antarctica.** Polish Academy of Sciences, W. Szafer Institute of Botany, Cracow, 278 pag; 1998.

OTERO, S., NÚÑEZ-OLIVEIRA, E., MARTÍNEZ-ABAIGAR, J., TOMÁS, R., ARRÓNIZ-CRESPO, M. E BEAUCOURT, N. **Effects of cadmium and enhanced UV radiation on the physiology and the concentration of UV-absorbing compounds of the aquatic liverwort *Jungermannia exsertifolia* subsp. *cordifolia*.** Photochemistry and Photobiology, v.5, nº8, pp 760-769. 2006. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16886092>>. Acesso em jan. de 2014.

PARKIN, D. W., PHILLIPS, D. R., SULLIVAN, R. A. L., & JOHNSON, L. **Airborne dust collections over the North Atlantic.** Journal of Geophysical Research, v.75, nº9, pp. 1782-1793, 1970. Disponível em:<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1029/JC075i009p01782/abstract>>. Acesso em out. de 2013.

PATHIRANA, R., WIJITHAWARNA, W. A., JAGODA, K., & RANAWAKA, A. L. **Selection of rice for iron toxicity tolerance through irradiated caryopsis culture.** Plant cell, tissue and organ culture, v.70, n°1, pp. 83-90, 2002.

PEÇHERZEWSKI K. **O stanie zapylenia powietrza w rejonie Zatoki Gdańskiej i Południowego.** Bałtyku: Prace MIR, 1984.

PERRY A. H. e J. M. WALKER. **The ocean-atmosphere system.** London, New York: Longman, pp. 267,1979.

PECHERZEWSKI, Kazimierz. **Air pollution and natural sedimentation from the atmosphere in the region of the Admiralty Bay (South Shetland Island).** Polish Polar Research. Institute of Oceanografy, University of Gdansk, Czolgistow, Poland. V.46, pp. 81-378., 1987. Disponivel em: <http://www.polish.polar.pan.pl/ppr08/1987_2_145-151.pdf>. Acesso em out. de 2012.

PESTANA, M., GAMA, F., SAAVEDRA, T., PINTO, J. C., ABADIA, A., VARENNES, A. D., & CORREIA, P. J. **A caraterização e correção da deficiência de ferro em plantas de morangueiro: novas abordagens.** In: Actas Portuguesas de Horticultura n°20, IV Colóquio Nacional da Produção de Pequenos Frutos. Pag.29-34, 2012. Disponivel em: <<https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/5709>>. Acesso em nov. de 2013.

PICH, A., MANTEUFFEL, R., HILLMER, S., SCHOLZ, G., & SCHMIDT, W. **Fe homeostasis in plant cells: does nicotianamine play multiple roles in the regulation of cytoplasmic Fe concentration.** Planta, v. 213, pp. 967-976, 2001.

PILON, M., COHU, C. M., RAVET, K., ABDEL-GHANY, S. E., & GAYMARD, F. **Essential transition metal homeostasis in plants.** *Current opinion in plant biology*, v. 12, n°. 3, pp. 347-357, 2009. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526609000363>>. Acesso em out. de 2013.

PONNAMPERUMA, F. N. **The chemistry of submerged soils.** NY and London: Academic Press, vol. 24, 1972. Disponível em:<http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/pnaaa956.pdf>. Acesso em out. de 2013.

PROSDOCIMI, F., COUTINHO, G., NINNECW, E., SILVA, A. F., DOS REIS, A. N., MARTINS, A. C., ... & CAMARGO FILHO, F. **Bioinformática: manual do usuário.** *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 29, pp. 12-25, 2002. Disponível em:<<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio29/bioinf.pdf>>. Acesso em out. 2013.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1.** New York: Exeter Software, 83 pag, 2000.

ROMHELD, V. **Different strategies for iron acquisition in higher plants.** *Physiologia Plantarum*, v. 70, 321-234, 1987.

ROTHER, M., KRAUSS, G. J., GRASS, G., & WESENBERG, D. **Sulphate assimilation under Cd²⁺ stress in *Physcomitrella patens*—combined transcript, enzyme and metabolite profiling.** *Plant, cell & environment*, v.29, n°9, pp. 1801-1811, 2006. Disponível em:<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3040.2006.01557.x/full>>. Acesso em out. de 2013.

ROWNTREE, J. K. **Development of novel methods for the initiation of in vitro bryophyte cultures for conservation.** Plant cell, tissue and organ culture, v.87, n°2, pp. 191-201, 2006. Disponível em:< <http://link.springer.com/article/10.1007/s11240-006-9154-7#page-1>>. Acesso em out. de 2013.

SABOVLJEVIC, Marko; BIJELOVIC, Aneta; DRAGICEVIC, Ivana. **In vitro culture of mosses: *Aloina aloides* (KF Schultz) Kindb., *Brachythecium velutinum* (Hedw.) BS & G., *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid., *Eurhynchium praelongum* (Hedw.) BS & G. and *Grimmia pulvinata* (Hedw.) Sm.** Turk. J. Bot, v.27, pp. 441-446, 2003. Disponível em:<<http://journals.tubitak.gov.tr/botany/issues/bot-03-27-6/bot-27-6-2-0202-4.pdf>>. Acesso em out. de 2013.

SANTOS, I.R., SCHAEFER, C.E., SILVA-FILHO, E.V., ALBUQUERQUE, M., ALBUQUERQUE-FILHO, M.R. Contaminantes antrópicos em ecossistemas antárticos: estado-de-arte. In: SCHAEFER, C.E., FRANCELINO, M.R., SIMAS, F.B., ALBUQUERQUE-FILHO, M.R. (eds.) **ecossistemas costeiros e monitoramento ambiental da antártica marítima: baía do almirantado, ilha rei george.** Viçosa: NEPUT, pp. 95–106, 2004.

SANTOS, L. S. e COSTA DE OLIVEIRA, A. **Rice iron metabolism: from source to solution.** Journal of crop Science and Biotechnology, v.10, pp.64-72, 2007. Disponível em:< <http://www.croplibio.org/contribute/paperfiles/64-72.pdf>>. Acesso em set. de 2013.

SANTOS, H. P; LHAMBY, J. C. B; WOBETO, C. **Efeito de culturas de inverno em plantio direto sobre a soja cultivada em rotação de culturas.** Pesquisa agropecuária brasileira, v.33, n°3, pp.289-295, 1998. Disponível em:< <http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/viewFile/4846/6969>>. Acesso em out. de 2013.

SCHAEFER D.G., BISZTRAY G., ZRYD J.P. **Genetic transformation of the moss *Physcomitrella patens***. In: Bajaj Y.P.S. Biotechnology in Agriculture and Forestry, v.29, Plant Protoplasts and genetic Engineering V, Berlin: Springer Verlag, Heidelberg, pp. 349-364, 1991. Disponível em:<http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-09366-5_24#page-1>. Acesso em out. de 2013.

SCHAEFER, C. E. G. R.; ALBUQUERQUE-FILHO, M. R.; SIMAS, F. N. B.; COSTA, L. M.; PEREIRA, V. V.; GUERRA, M. B. B. GOMES, M. R. M. Indicadores biogeoquímicos de metais pesados e elementos maiores em solos e coberturas vegetais na Península Keller, Antártica. **In: SCHAEFER, C. E.; FRANCELINO, M. R.; SIMAS, F. N. B.; ALBUQUERQUE FILHO, M. R. Ecossistemas costeiros e monitoramento ambiental da Antártica Marítima. Baía do Almirantado, Ilha Rei George.** Viçosa, Minas Gerais, p59-64, 2004,

SASSMANN, Stefan. **Heavy metal tolerance and localization in the moss *Physcomitrella patens***. Diplomarbeit, University of Vienna. Fakultät für Lebenswissenschaften. 77 pag. 2010. Disponível em:<<http://othes.univie.ac.at/9121/>>. Acesso em out. de 2013.

STERN, A. S. **Air pollution**. New York, San Francisco, London: Academic Press. 684 pp, 1976.

SIEVERS, R. E. e J. C. BAILAR. **Some metal chelates of ethylenediaminetetraacetic acid, diethylenetriaminepentaacetic acid, and triethylenetetraminehexaacetic acid.** Inorg. Chem., v.1, n°1, pp.174, 1962.

SILVA, A. S. M.; SIMABUKURO, A.; PÔRTO, K. C. **Morfogênese protonemática de briófitas ocorrentes em Remanescentes de Floresta Atlântica do estado de Pernambuco, Brasil.** Boletim do Instituto de Botânica, São Paulo, v.18, pp. 213-227, 2006.

SIM, S. C., YU, J. K., JO, Y. K., SORRELLS, M. E., & JUNG, G. **Transferability of cereal EST-SSR markers to ryegrass.** Genome, v. 52, n°5, pp. 431-437, 2009. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19448723>>. Acesso em out. de 2013.

SOUSA, R.O; CAMARGO, F. A. O. **Solos alagados** - Reações de REDOX. In: MEURER, E.J (3°Ed.) **Fundamentos de química do solo.** Porto Alegre: Editora Evangraf, pp.185-211, 2006.

TAIZ, L. e ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 3°ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TANKSLEY, S. D., YOUNG, N. D., PATERSON, A. H., & BONIERBALE, M. W. **RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science.** Biotechnology, v.7, pp. 257-264, 1989. Disponível em:< <http://www.nature.com/nbt/journal/v7/n3/abs/nbt0389-257.html>>. Acesso em jan. de 2013.

THIEL, T., MICHALEK, W., VARSHNEY, R., & GRANER, A. **Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.).** Theoretical and applied genetics, v.106, n°3, pp. 411–422, 2003. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12589540>>. Acesso em out. de 2012.

URL, Walter. **Über Schwermetall-, zumal Kupferresistenz einiger Moose.** Protoplasma, v. 46, nº. 1, pp. 768-793, 1956. Disponível em:< <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF01248913#page-1>>. Acesso em set. de 2013.

VAHL, L.C. Fertilidade de solos de várzea. In: GOMES, A.S., PAULETTO, E.A., (Eds.) **Manejo do solo e da água em áreas de várzea.** Pelotas: Embrapa Clima temperado. pp.119-162, 1999.

VAN DER VELDE, M.; BIJLSMA, R. **Phylogeography of five *Polytrichum* species within Europe.** Biological Journal of Linnean Society, London, v. 78, nº. 2, pp. 203-213, 2003. Disponível em:< <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1095-8312.2003.00151.x/abstract?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false>>. Acesso em out. de 2013.

VARSHNEY, R.K.; GRANER, A; SORRELS, M.E. **Genomics-assisted breeding for crop improvement.** Trends in Plant Science, v.10, nº.12, pp. 621-630, 2005. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138505002554>>. Acesso em nov. de 2013.

VICTORIA, F. D. C., BERVALD, C. M. P., DA MAIA, L. C., DE SOUSA, R. O., PANAUD, O., & DE OLIVEIRA, A. C. **Phylogenetic relationships and selective pressure on gene families related to iron homeostasis in land plants.** Genome, v. 55, nº. 12, pp. 883-900, 2012. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23231606>>. Acesso em out. de 2013.

VICTORIA, F.C; MAIA, L.C; OLIVEIRA, A. C. **In sílico comparative analysis of SSR markers in plants.** BMC Plant Biology, nº11, pp.15, 2011a. Disponível em:< <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/11/15>>. Acesso em set. de 2013.

VICTORIA, F.C.; OLIVEIRA, A.C.; PETERS, J.A. **Establishment of the moss *Polytrichum juniperinum* Hedw. under axenic conditions.** Bioscience Journal, Uberlandia, v. 27, nº. 4, p. 673-676, 2011b. Disponível em:< <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/8168>>. Acesso em out. de 2012.

VIEIRA, N.R.A.; SANTOS, A.B.; SANT'ANA, E.P. **A cultura do arroz no Brasil.** Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 633 pag, 1999.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. **Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification.** Genomics, v. 20, pp.176-183, 1994. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8020964>>. Acesso em out. de 2013.

ŽIGALOVSKAJA T. N.. E. P. Machonko e A. I. Šilina. **Mikroelementy v priridnyh vodah i atmosfere.** — Trudy Inst. Eksper. Meteorol., v.41, pp. 1-183, 1974.

YOSHIDA, S. **Fundamentals of rice crop science.** Phillippines: The international rice research institute, 269 pag, 1981.