



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

Campus São Gabriel

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E PROTOCOLO DE
DESINFESTAÇÃO PARA CULTIVO *IN VITRO* DE
Sanionia uncinata (Hedw.) Loeske**

MÔNICA MUNARETO MINOZZO

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E PROTOCOLO DE
DESINFESTAÇÃO NO CULTIVO *IN VITRO* DE**

***Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske**

MÔNICA MUNARETO MINOZZO

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de
Conclusão do Curso de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Pampa — UNIPAMPA,
Campus São Gabriel, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon

São Gabriel, RS, Brasil

Maio de 2013.

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E PROTOCOLO DE DESINFESTAÇÃO NO
CULTIVO *IN VITRO* DE *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske**

MÔNICA MUNARETO MINOZZO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon

Monografia submetida à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada por:

Presidente, Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon

Prof. Dr. Filipe de Carvalho Victoria

Prof. Me. Michele Heberle Lisboa

São Gabriel, Maio de 2013.

FICHA CATALOGRÁFICA

M666a Minozzo, Mônica Munareto
Análise morfológica e protocolo de desinfestação no cultivo
in vitro de *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske / Mônica Munareto
Minozzo.
20 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -- Universidade
Federal do Pampa, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2013.
"Orientação: Valdir Marcos Stefenon".

1. Antártica. 2. Musgo. 3. Amblystegiaceae. 4. Morfologia.
5. Contaminação. I. Título.

AGRADECIMENTOS

À minha família, que esteve comigo em todos momentos me apoiando, especialmente minha mãe Gilsane, pelo incentivo e esforço para que eu seguisse meus sonhos e objetivos, e ao meu pai Almir, pela confiança depositada e a segurança de poder contar com ele em qualquer momento.

Ao meu eterno orientador Dr. Cláudio de Senna Vinícius Gastal Jr. (*in memoriam*), por não ter deixado que eu desistisse, e sempre ter acreditado no meu potencial.

Aos professores que fizeram parte dessa jornada de evoluções e aprendizados, em especial ao meu orientador Dr. Valdir Marcos Stefenon que me acolheu e me fez acreditar que era possível, pela motivação e paciência.

Aos integrantes dos grupos de pesquisa NEVA (Núcleo de Estudos Vegetais da Antártica) e NCTV (Núcleo de Cultura de Tecidos Vegetais) pelo apoio e coleguismo. Em especial aos colegas Paulo Diniz da Silva, que praticamente co-orientou, por me aguentar e pelo companheirismo e disponibilidade de sempre, e Rayssa Garay Medina, pela disposição em ajudar no que fosse preciso.

Aos amigos Vinícius Lazzari, Henrique Ramos, Daniel Medeiros, Diego Rodrigues pelo companheirismo e amizade nestes anos todos. E apesar de não ter convivido durante estes 5 anos, agradeço também ao Ricardo Bisognin Dias, que foi muito importante nesta reta final, pela paciência, carinho, e apoio até quando eu não merecia.

Enfim, à todos que estiveram comigo e fizeram parte da minha vida durante todo esse tempo, inclusive aos que não citei nominalmente, deixo aqui registrado meu reconhecimento, e muito obrigada!

RESUMO

ANÁLISE MORFOLÓGICA E PROTOCOLO DE DESINFESTAÇÃO NO CULTIVO *IN VITRO* DE *SANIONIA UNCINATA* (HEDW.) LOESKE

As principais formações vegetais encontradas na Antártica são compostas por briófitas, líquens, algas e duas espécies de plantas vasculares, sendo os musgos um grupo muito relevante para este continente devido à sua capacidade de sobreviver em condições ambientais extremas. Assim, o cultivo *in vitro* de musgos desta região é essencial não só para observar o desenvolvimento nessas condições como também para a conservação *ex situ* de indivíduos vivos. *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske é um musgo relativamente comum na Antártica principalmente em áreas de circulação de animais, o que torna maior as chances de serem contaminados por patógenos externos, sem deixar de considerar que os fungos e as bactérias podem ser endossimbióticos do vegetal. Este trabalho objetivou comparar as características morfológicas de três populações antárticas deste musgo e desenvolver um protocolo para desinfestação destas plantas visando obter materiais estéreis para a propagação *in vitro*. De acordo com os dados encontrados na análise morfológica baseada nas medidas de gametófitos e filídios, notou-se maior semelhança entre a População 1 e a População 2 e maior diferença destas com a População 3, supõe-se que este fato pode ter relação com a distância em que se encontram e também por serem de ilhas diferentes. Dentre os vinte e dois tratamentos testados para desinfestação, o tratamento combinando hipoclorito de sódio (NaOCl) e álcool etílico hidratado 70° INPM (CH₃CH₂OH), foi o mais efetivo até o presente estudo, apesar de ter causado um estresse na planta necessitando de mais cuidados para que esta permaneça viva. É possível aperfeiçoar e definir um protocolo de desinfestação para explantes de *Sanionia uncinata* para que se torne viável o cultivo do explante de forma asséptica.

Palavras-chave: Antártica, Musgo, Amblystegiaceae, Morfologia, Contaminação.

ABSTRACT

MORPHOLOGICAL ANALYSIS AND PROTOCOL FOR THE DISINFESTATION *IN VITRO* *SANIONIA UNGINATA* (HEDW.) LOESKE

The main vegetation types in Antarctica are composed by not of bryophytes, lichens, algae and two species of vascular plants. Mosses are a very relevant group to this continent due to its ability to survive in extreme environmental conditions. Therefore, the *in vitro* culture of mosses of this region is essential not only to observe the development in these conditions, but also to *ex situ* conservation of living individuals. *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske is a relatively common moss in Antarctica mainly in areas of animal movement, which makes it the most likely to be contaminated by external pathogens, even considering that fungi and bacteria can be endosymbiotic in plants. This study aimed to compare morphological characteristics of three Antarctic populations of this moss and to develop a protocol for the disinfestation of these plants in order to obtain sterile material for *in vitro* propagation. According to the data found in the morphological analysis based on measures of gametophytes and leaves, greater similarity was noted between the Population 1 and Population 2, and biggest difference of both to Population 3. This relationships can be related to the distance among the populations and also because they are of different islands. Among the twenty-two treatments tested for disinfestation, The combined treatment sodium hypochlorite (NaOCl) and hydrated ethanol 70° INPM (CH₃CH₂OH), was the most effective to the present study, despite having caused stress in the plants and thus requiring more care so that it remains alive. It is possible to refine and define a protocol for disinfection of *Sanionia uncinata* explants to become viable cultivation of explants aseptically.

Key-words: Antarctic, Moss, Amblystegiaceae, Morphology, Contamination.

SUMÁRIO

Resumo	6
<i>Abstract</i>	7
Sumário	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1. Coleta do material vegetal	11
2.2. Análise morfológica	12
2.3. Experimentos de desinfestação	13
2.3.1. Preparação do meio AAS ₃₀	14
2.3.2. Tratamentos realizados	14
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4. CONCLUSÕES	18
5. REFERÊNCIAS	19

1. INTRODUÇÃO

O continente Antártico é o mais meridional e um dos menores, com uma superfície de catorze milhões de quilômetros quadrados, e também o mais frio e seco, com a maior média de altitude e de maior índice de ventos fortes do planeta. A temperatura mais baixa da Terra (-89,2 °C) foi registrada na Antártica, sendo a temperatura média na costa, durante o verão, de apenas -10 °C; no interior do continente, é de -40 °C. Ventanias com velocidades de aproximadamente 100 km/h são comuns e podem durar vários dias. Na antártica o verão é curto e frio, com temperatura máxima em torno de 0°C, ocorrendo, durante este período, incessantes chuvas e precipitação acentuada de neve (Cygan, 1981, Rakusa-Suszczewski *et al.*, 1993).

Devido a estes fatores, o continente possui uma diversidade peculiar e muitos projetos e estudos vêm sendo realizados por diversos países do mundo, entre eles, o Brasil. De fato, um aumento substancial no número de publicações com contribuição brasileira tem sido observada ao longo dos últimos 30 anos (Stefenon *et al.*, 2012), com ênfase importante observado nas Ciências Biológicas. Para Pereira & Putzke (1994), estas condições, em conjunto com as impostas pelo inverno escuro e prolongado limitam a ocorrência de espécies vegetais na região, especialmente plantas com flor, uma vez que estas condições impedem o ciclo reprodutivo.

A distribuição das comunidades vegetais e as formas de vida dos musgos da Antártica, conforme Putzke *et al.* (1995), dependem principalmente da luz, uma vez que tem-se um período de verão com aproximadamente 20 horas/luz por dia e um período de inverno com apenas duas horas/dia de luz. As briófitas estão entre os grupos menos estudados de plantas, sendo que o percentual de espécies desta divisão para plantas em geral pode ser surpreendente. No Brasil, chegam a ser 5% do total de plantas conhecidas, a 20% no Chile e na Antártica chega a 25%, apesar de vastas áreas estarem basicamente recobertas por musgos.

As principais formações vegetais encontradas na Antártica são compostas por briófitas, líquens, algas e duas espécies de plantas vasculares, sendo os musgos um grupo muito relevante para este continente devido à sua capacidade de sobreviver em condições ambientais extremas. Estes musgos têm sido relatados para responder à luz ultravioleta B (UV-B) e fortes temperaturas, produzindo alguns metabolitos secundários específicos (Huttunen *et al.*, 2005) que protegem musgos de estresses ambientais, tais como UV, seca, e temperaturas elevadas foi descrito anteriormente (Rozema *et al.*, 2001).

A *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske (Amblystegiaceae) cresce à sombra parcial, em locais úmidos, como rochas molhadas, terra úmida, madeira podre, sobre as raízes das árvores ou tocos (Figura 1). Devido a estes fatores, é distribuída por uma grande área da Antártida como citado por Ochyra (1998), também na Europa, Ásia, América do Norte e Groenlândia.

Como os demais musgos polares, esta espécie possui metabólitos secundários e assim, pode ser uma importante fonte de agentes anti-oxidantes naturais, para a melhoria das aplicações medicinais e cosméticos (Bhattarai *et al.*, 2008). Isso sugere um aumento da necessidade de estudos de *S. uncinata*, a qual apresenta um potencial relevante para tolerância de radiação UV e metabólitos secundários como anti-oxidantes naturais.

Assim, o conhecimento da diversidade morfológica entre populações pode fornecer informações sobre o desenvolvimento das plantas em diferentes microambientes, enquanto o cultivo *in vitro* de musgos é essencial para observar o desenvolvimento, elucidar o papel dos primeiros estágios de desenvolvimento e para conservar indivíduos vivos *ex situ*.

Entretanto, para realizar a cultura de tecidos, onde o explante é isolado e cultivado sob condições de assepsia em um meio nutritivo artificial, é necessário um conjunto de técnicas, em especial de desinfestação dos explantes. No caso da *S. uncinata* coletada da Antártica, encontrou-se uma certa dificuldade devido este musgo ser bastante abrangente principalmente em áreas de grande circulação de animais, o que torna maior as chances de serem contaminados por patógenos externos, sem deixar de considerar que os fungos e as bactérias podem ser endossimbióticos do vegetal, sendo assim maior a dificuldade na desinfestação, já que mesmo após a realização do processo de limpeza da superfície dos explantes muitos microorganismos endógenos não são expostos aos produtos desinfestantes (Grattapaglia & Machado, 1998; Esposito-Polesi, 2011).



Figura 1. Campo de *Sanionia uncinata* em área à jusante do degelo sazonal (foto de Caio V. Z. Cipro).

Este trabalho objetivou retratar melhor a *S. uncinata* considerando as variações existentes em três diferentes locais do continente Antártico, para analisar a hipótese da existência de ligação entre as populações da espécie em regiões distintas da Antártica, levando em consideração a distância entre os pontos e também entre ilhas, ou seja, entre dois pontos da Ilha Elefante e um da Ilha Nelson, e realizar o cultivo *in vitro*, em uma câmara de fotoperíodo, para que se possa continuar os trabalhos mesmo durante o período em que não há expedições para coleta de material na Antártica. Objetivou-se também realizar um protocolo de desinfestação das amostras, garantindo a viabilidade da mesma.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta do material vegetal

As amostras foram coletadas durante a expedição Antártica realizada pelos pesquisadores do projeto INCT-APA no verão austral 2012/2013, em três pontos diferentes, sendo Refúgio Goeldi na Ilha Elefante (População 1), Glaciar Sultan também da Ilha Elefante (População 2) e P25 da Ilha Nelson (População 3) do Continente Antártico. A coleta consistiu na retirada de gametófitos inteiros e as plantas foram acondicionadas em sacos plásticos contendo sílica gel. As análises foram realizadas no Centro Interdisciplinar de Pesquisas em Biotecnologia – CIPBiotec, no Campus São Gabriel da Universidade Federal do Pampa.

2.2. Análise morfológica

Como parâmetro para realizar a análise morfológica comparativa, foram utilizados o comprimento de 30 gametófitos de cada população e o comprimento de 20 filídios de 15 destes gametófitos. A medição dos gametófitos (Figura 2) foi realizada com auxílio do paquímetro, já para medição dos filídios (Figura 3) fez-se necessário a utilização do programa Motic Imagens 2.0 Plus ML, com a forma de arco e linear para adequar-se melhor na forma de foice característica desta espécie. Após, foram realizados testes estatísticos de comparação de médias como Teste-T e ANOVA para melhor comparação, utilizando-se o Microsoft Office Excel 2007.

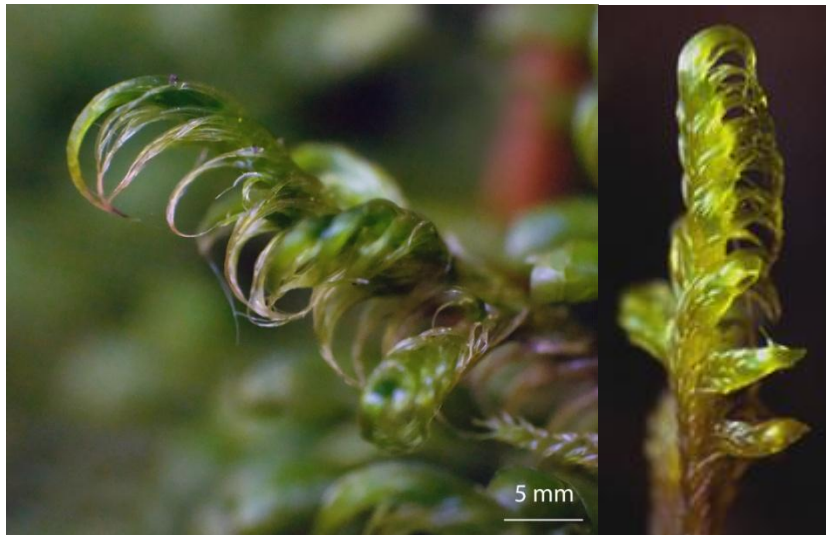


Figura 2. Gametófitos com filídios de *Sanionia uncinata*.



Figura 3. Filídios fotografados com o programa Motic Imagens 2.0 Plus ML.

2.3. Experimentos de desinfestação

Os gametófitos foram selecionados de forma aleatória e lavados com água destilada para a retirada do excesso de material orgânico agregado e, em seguida, cortados em explantes menores para realizar os tratamentos com agentes químicos específicos para a desinfestação. Para os vinte e dois tratamentos realizados foram utilizados como agentes desinfetantes, isolados ou em combinação, o hipoclorito de sódio (NaOCl), álcool etílico hidratado 70° INPM (CH₃CH₂OH), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), tetraciclina e amoxicilina, variando a concentração e o tempo de acordo com o desinfetante em questão. Em cada tratamento, foram colocados cinco explantes por placa, sendo três placas por tratamento, totalizando 15 explantes por tratamento, incluindo o tratamento controle respectivo. E em cada placa verteu-se 15 ml de meio AAS₃₀ (Da Silva, 2012) previamente preparado.

Após, estas placas ficaram na câmara de fotoperíodo a 27°C com luminosidade de 16 horas (Figura 4) e analisadas durante 30 dias, para os fatores de sobrevivência do explante, contaminação fúngica e contaminação bacteriana de cada explante.

Estes resultados foram analisados com testes estatísticos de Qui-quadrado, com auxílio do programa Microsoft Office Excel 2007, comparando cada tratamento com seu respectivo controle em relação a contaminação dos patógenos.

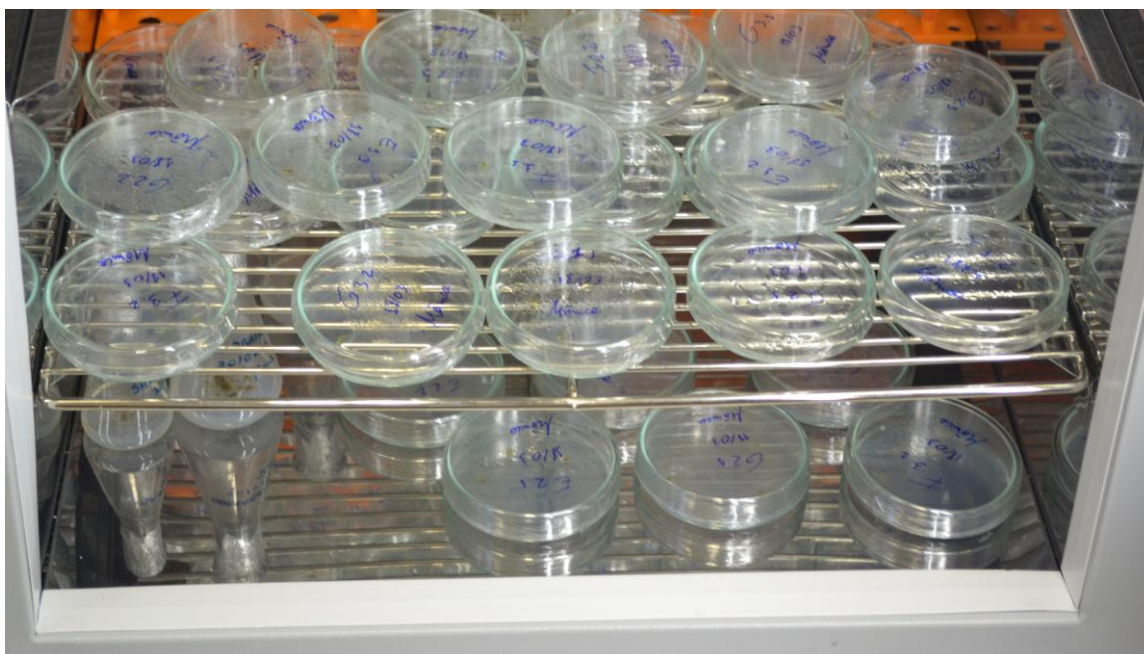


Figura 4. Placas de Petri na câmara de fotoperíodo com alguns dos tratamentos realizados.

2.3.1. Preparação do meio AAS₃₀

Segundo Da Silva *et al.* (2012), o meio AAS₃₀ é uma alternativa eficiente, rápida e simples para identificar a presença de contaminação em explantes previamente ao seu cultivo em meios específicos. Para preparar um litro de meio AAS₃₀ foram utilizados 6,5g de ágar (Vertec), 30g de sacarose e um litro de água destilada com cozimento em placa aquecedora com agitação, seguido de autoclavagem durante 17 minutos sob temperatura de 121° C e pressão de 1,2 atm. Após, o meio foi levado para a câmara de fluxo laminar onde foi vertido em placas de Petri para cultivo dos explantes.

2.3.2. Tratamentos realizados

Foram realizados vinte e dois tratamentos, divididos por grupos de acordo com os agentes desinfetantes utilizados e a data em que foram realizados, sendo que para cada grupo instalou-se um tratamento controle, onde as amostras apenas foram lavadas com água destilada e inoculadas no mesmo meio.

Tratamento 1: imersão dos explantes em hipoclorito de sódio (NaOCl) em três concentrações diferentes: A = 0,625%, B= 0,312%, C=0,156%, e para cada concentração, três tempos: T1 = 1 minuto, T2 = 3 minutos, T3 = 5 minutos.

Tratamento 2: imersão dos explantes em álcool etílico hidratado 70° INPM (CH₃CH₂OH) (E), em três tempos: T1 = 20 segundos, T2 = 40 segundos e T3 = 60 segundos.

Tratamento 3: imersão dos explantes em peróxido de hidrogênio (H₂O₂), em duas concentrações diferentes G = 1,5% e F = 3%, cada uma em três tempos, sendo T1 = 5 minutos, T2 = 10 minutos, T3 = 15 minutos.

Tratamento 4: 0,02 mg/mL adicionado ao meio de cultivo do antibiótico tetraciclina (I).

Tratamento 5: 0,02 mg/mL adicionado ao meio de cultivo do antibiótico amoxicilina (J).

Com base nos dados encontrados nos tratamentos realizados com os primeiros três grupos (A, B, C, E, F, G), com o hipoclorito de sódio (NaClO), o álcool etílico hidratado 70° INPM (CH₃CH₂OH) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), realizou-se tratamentos combinados (H) de hipoclorito de sódio à 0,625% e álcool 70% sendo este realizado em dois tempos: H1 = 3 minutos de hipoclorito de sódio 0,625% e após imersão com 40 segundos de álcool 70%, e, H2 = 15 minutos de hipoclorito de sódio 0,625% e após com 5 minutos de álcool 70%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise morfológica comparativa, a População 1 teve média dos gametófitos de 1,716 cm e média dos seus filídios, de 1,849 mm. Na População 2 a média dos gametófitos foi de 1,760 cm e dos filídios 1,344 mm. Já na População 3 a média dos gametófitos foi de 2,186 cm e dos filídios, 2,979 mm.

Referente aos gametófitos, foi encontrado (Tabela 1) diferença significativa para a População 3, em relação às populações 1 e 2.

Tabela 1. Resumo do teste Anova: fator único para análise de gametófitos.

Grupo	Contagem	Soma	Média(cm)	Variância
População1	30	51,5	1,716667 a	0,062816
População2	30	52,8	1,76 a	0,030069
População3	30	65,6	2,186667 b	0,23223

Já com o Teste-t: duas amostras em par para médias, para os gametófitos foram encontrados os seguintes valores para p :

$$\text{Pop1 e Pop2} = 0,478827$$

$$\text{Pop2 e Pop3} = 0,000108$$

$$\text{Pop1 e Pop3} = 0,00000193$$

Para os filídios (Tabela 2), foi encontrado $p = 6,59 \times 10^{-21}$ no teste Anova: fator único.

Tabela 2. Resumo do teste Anova: fator único para análise de filídios.

Grupo	Contagem	Soma	Média(mm)	Variância
População1	15	27,7492	1,849946 a	0,063031
População2	15	20,0208	1,33472 a	0,044287
População3	15	44,68895	2,979263 b	0,078919

E com o Teste-T: duas amostras em par para médias, para os filídios foram encontrados os seguintes valores para p :

Pop1 e Pop2 = 0,0000929

Pop2 e Pop3 = 0,0000000000679

Pop1 e Pop3 = 0,000000172

De acordo com os dados encontrados, notou-se maior semelhança entre a População 1 e a População 2 e maior diferença destas com a População 3, supõe-se que este fato pode ter relação com a distância em que se encontram e também por serem de ilhas diferentes.

Para os testes de desinfestação, encontrou-se diferenças estatisticamente significativas considerando o valor de qui-quadrado ($p < 0,05$) nos tratamentos com hipoclorito de sódio (NaOCl) (Tabela 3) e álcool etílico hidratado 70° INPM (CH₃CH₂OH) (Tabela 4), os demais os agentes de limpeza não obtiveram efeito na desinfestação.

Visto que, os tratamentos com peróxido de hidrogênio (Tabela 5) não foram eficazes para desinfestação fúngica e bacteriana, baseado nas observação diárias e comprovado com o teste qui-quadrado, todos os explantes contaminados, assim como o tratamento com tetraciclina, apesar deste ser considerado um bactericida, não conseguiu diminuir a contaminação bacteriana nesta espécie. E o tratamento com o antibiótico amoxicilina 0,02 mg/mL misturado ao meio de cultivo obteve $p = 0,0463$, ou seja, não significativo estatisticamente.

Tabela 3. Valor de *p* nos tratamentos com hipoclorito de sódio (NaOCl).

	1 (1min)	2 (3min)	3 (5min)
A (0,625%)	0,0463	0,0002*	0,0028
B (0,3125%)	0,0463	0,008	0,0028
C (0,1562%)	0,1953	0,008	0,0009

*Valor em vermelho não teve significância estatística.

Tabela 4. Valor de *p* nos tratamentos com álcool etílico hidratado 70° INPM (CH₃CH₂OH).

	1 (20seg)	2 (40seg)	3 (60seg)
E (70%)	0,0678	0,0009*	TC

*Valor em vermelho não teve significância estatística. TC = todos explantes contaminados.

Tabela 5. Tratamentos com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) obtiveram todos explantes contaminados.

	1 (5min)	2 (10min)	3 (15min)
G (1,5%)	TC	TC	TC
F (3%)	TC	TC	TC

TC = todos explantes contaminados.

Tabela 6. Tratamentos combinados com hipoclorito de sódio (NaOCl) 0,625% e álcool 70%.

	1 (3min NaClO 0,625% + 40s álcool 70%)	2 (15min NaClO 0,625% + 5min álcool 70%)
H	0,0201*	0,00001*

Em geral, os tratamentos que continham hipoclorito de sódio foram os mais eficientes, tanto para diminuição de contaminação superficial por bactérias, como para desinfestação fúngica, ressaltado no tratamento A2 que não teve ocorrência de contaminação por fungos, este resultado se repete no tratamento E2, com álcool, apesar de ser o único que teve valor significativo dentre os tratamentos com este agente

desinfetante, este também não teve contaminação fúngica, por isso foram escolhidos para fazer tratamentos combinados (Tabela 6).

O tratamento H1 considerado como ideal sendo o resultado de A2+E2, e o H2 com hipoclorito de sódio a 0,625% durante 5 minutos e álcool a 70% durante 5 minutos como um extremo para testar a resistência da planta aos agentes, ambos foram muito efetivos, mas com o tratamento com maior tempo de ação dos agentes desinfetantes obteve-se a maior desinfestação, porém a planta precisou de mais tempo para recuperação do dano causado.

4. CONCLUSÃO

De acordo com os dados encontrados na análise morfológica, notou-se maior semelhança entre a População 1 e a População 2 e maior diferença destas com a População 3, supõe-se que este fato pode ter relação com a distância em que se encontram e também por serem de ilhas diferentes. Assim, é notável a relevância de prosseguir com pesquisas para confirmar as hipóteses já levantadas. O próximo passo será realizar a análise molecular para equiparar com os dados já existentes.

Nos experimentos de desinfestação, é notável a dificuldade de conseguir um protocolo para tal sem que danifique a planta e para que esta possa ser cultivada posteriormente. Entretanto, apesar de fragilizar bastante o material vegetal, o tratamento combinado com maior concentração de químicos (H2) foi o mais efetivo até o presente estudo, considera-se a realização de mais estudos, é possível aperfeiçoar e definir um protocolo de desinfestação para explantes de *S. uncianta* para que se torne viável o cultivo *in vitro* da mesma em câmara de germinação, permitindo a continuidade dos estudos com as amostras coletadas na Antártica.

5. REFERÊNCIAS

BHATTARAI, H. D.; PAUDEL, B.; LEE, H. S.; LEE, Y. K.; YIM, J. H. Antioxidant Activity of *Sanionia uncinata*, a Polar Moss Species from King George Island, Antarctica. *Phytother. Res.* 22, 1635–1639, 2008.

CYGAN, B. Characteristics of meteorological conditions at the Arctowski Station during the summer season of 1979/1980. *Pol Polar Res* 2:35-46. 1981.

DA SILVA, P. D.; RISPOLI, R. G.; MINOZZO, M. M.; JOBIM, L. H.; STEFENON, V. M. AAS₃₀: Um meio para identificação *in vitro* de explantes livres em *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). 63º Congresso Nacional de Botânica. Joinville, SC, Brasil, 2012.

ESPOSITO-POLESI, N. P. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v.9, n.4, p.533-541, out/dez 2011.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. ; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultivo de tecidos e transformação de plantas. Brasília: Setor Produção de Informação/Embrapa-Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia; 1998. v.1, p.183-260.

HUTTUNEN, S.; LAPPALAINEN, N.M.; TURUNEN, J. UV-absorbing compounds in subarctic herbarium bryophytes. *Environ Pollut* 133: 303–314. 2005.

MEDINA, R. G.; VICTORIA, F.; PEREIRA, A. B.; STEFENON, V. M. Genetic and morphological differentiation among natural populations of *Polytrichum juniperinum* Hedw. from South America and Antarctica. 57º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia , SP, Brasil, 2011.

OCHYRA, R.; BEDNAREK-OCHYRA, H.; LEWIS-SMITH, R.I. 170 years of research of the Antarctic moss flora. In: Głowacki P, Bednarek J. (eds), *Polish Polar Studies*. Institute of Geophysics of the Polish Academy of Sciences, Warszawa, 159–177. 1998.

PEREIRA, A. B.; PUTZKE, J. Floristic composition of Stinker Point, Elephant Island, Antarctica. *Kor. J. Polar Res.* 5(2): 37-47. 1994.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L.; PEREIRA, A.B. Moss communities of Rip Point in Northern Nelson Island, South Shetland Islands, Antarctica. *Polar Biology*, 2: 20-40. 1995.

RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. MIETUS, M.; PIASECKI, J. Weather And Climate. In: Rakusa-Suszczewski, S. (ed.) *The maritime Antarctic coastal ecosystem of Admiralty Bay*. Warsaw, Polskiej Akademii Nauk, p.19–25. 1993.

ROZEMA, J.; NOORDIJK, A.J.; BROEKMAN, R.A.; VAN BEEM, A.; MEIJKAMP, B.M.; DE BAKKER, N.V.J.; VAN DE STAAIJ, J.W.M.; STROETENGA, M.; BOHNCKE, S.J.P.; KONERT, M.; KARS, S.; PEAT, H.; SMITH, RIL.; CONVEY, P. Polyphenolic compounds in pollen and spores of Antarctic plants as indicators of solar UV-B. *Plant Ecol* 154: 11–26. 2001.

STEFENON, V.M.; ROESCH, L.F.W.; PEREIRA, A.B. Thirty years of Brazilian research in Antarctica: ups, downs and perspectives. *Scientometrics* (on line first). doi: 10.1007/s11192-012-0809-3. 2012.