



Programa de Pós-Graduação em Botânica - UnB

Propagação *in vitro* de Musgos do Cerrado

Carla Gomes Pereira

Brasília, DF

2019



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Botânica - UnB

Propagação *in vitro* de Musgos do Cerrado

Carla Gomes Pereira

Orientadora: Dra. Conceição Eneida dos Santos Silveira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica – UnB, vinculada ao Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Botânica

Brasília, DF

Junho de 2019

Carla Gomes Pereira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutora em Botânica.

Aprovada em:

Dra. Conceição Eneida dos Santos Silveira

(Orientadora) - Universidade de Brasília

Dr. Marcelo Henrique Soller Ramada

(Membro externo) - Universidade Católica de Brasília

Dra. Lucia Helena Soares e Silva

(Membro interno) - Universidade de Brasília

Dra. Micheline Carvalho Silva

(Membro interno) - Universidade de Brasília

Dr. Eduardo Toledo de Amorim

(Suplente) - Universidade de Brasília

Brasília - DF

Junho de 2019

Com imensa gratidão, à minha família, que tem me apoiado em minhas escolhas e aos amigos, pelo incentivo ao trabalho.

Dedico

Agradecimentos

À minha família, por compreender a minha dedicação a esse trabalho. Ao meu esposo, Robson por me apoiar nas minhas escolhas e ao meu filho por aceitar as minhas ausências.

À professora Eneida, não só pela orientação, mas por ter despendido parte do seu tempo para me ensinar cultura de tecido, pela oportunidade de realizar esse trabalho e pela amizade, dedicação e momentos de descontração em nossos encontros. Também por montar o laboratório de cultivo para que os experimentos pudessem ser transferidos, por seu suporte financeiro e esforço físico na montagem e organização dos laboratórios e do Sistema de Biorreator, além de seu grande empenho para resolver todos os problemas frequentes.

Ao professor Dr. Luiz Alfredo, também meu orientador, por me aceitar e por oportunizar a realização desse trabalho, com a montagem da sala de crescimento para a prática de ensaios de pré-aclimatização e com suporte financeiro, além do seu esforço físico para a conclusão da obra.

Às Dras. Conceição Eneida, Micheline Carvalho, Lúcia Helena e Sara e ao Dr. Jonny Everson e Luiz Alfredo, pelas revisões, correções e grandes contribuições do texto.

Aos colegas do laboratório de Criptógamas da Universidade de Brasília, Allan Laid, Amanda leal, Amanda Marinho, Ana Gabriela, Bárbara Guedes, Daiane, Diego Knop, Eduardo Amorim, Júlia Mundim, Marcos, Tamara Dantas, Tamara Poliana e Osvanda Moura, por contribuir em coletas e identificações. Especialmente à professora Graça Machado, professora notável que sempre me apoiou e me ajudou a despertar o amor pela ciência sem deixar de lado a didática, por sua amizade, inspiração, incentivo e convite para as coletas. Aos Drs. Paulo Câmara e Micheline Carvalho por ceder espaço, bibliografia especializada no laboratório de Criptógamas para manuseio e identificação das briófitas, além de suas diversas contribuições e agradável participação nas coletas.

Aos curadores do laboratório de Cultura de Tecidos, professor Sérgio Figueirêdo, e de Fisiologia Vegetal da Universidade de Brasília, professor Thomaz, por permitirem a utilização dos espaços nos laboratórios, bem como o uso dos equipamentos dos mesmos.

Ao Fábio, técnico da fisiologia vegetal, por seu apoio técnico.

Aos Drs. Eduardo Amorim e Eduardo Barbosa, por suas contribuições de enorme valor na organização e análise estatística dos dados.

Ao casal Dr. Hugo e Dra. Patrícia pelas orientações na montagem do Biorreator.

Ao Vinícius Olenca, por sua ajuda valiosa na montagem do Biorreator.

Aos colegas do Herbário UB que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento desse trabalho. Principalmente à Jéssica, à Josemília e ao André por me ajudarem com sistema de informação do herbário, BRAHMS.

À CAPES, pela bolsa de doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação da Universidade de Brasília, pelo apoio à realização do curso e pelo apoio financeiro.

À Fundação de Apoio à Pesquisa de Distrito Federal - FAPDF, pelo apoio financeiro para participação em evento internacional.

Obrigada!

SUMÁRIO

| | |
|--|--------------|
| ÍNDICE DE TABELAS | xi |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | xiii |
| LISTA DE ABREVIACÕES | xviii |
| Resumo | 1 |
| Abstract | 2 |
| 1. Introdução geral..... | 3 |
| 2. Objetivo Geral..... | 4 |
| 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 4 |
| 3. Revisão de Literatura | 5 |
| 3.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS BRIÓFITAS..... | 5 |
| 3.2. USOS DAS BRIÓFITAS..... | 6 |
| 3.3. IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA..... | 7 |
| 3.4. CULTIVO DE BRIÓFITAS..... | 8 |
| 4. Aspectos metodológicos gerais | 11 |
| 5. Referências Bibliográficas..... | 12 |

CAPÍTULO I

Estabelecimento indireto aumenta as chances de propagação *in vitro* de musgos do Cerrado – Um novo método

| | |
|--|-----------|
| Resumo | 21 |
| Abstract | 22 |
| 1. Introdução | 23 |
| 2. Material e métodos..... | 25 |
| 2.1. COLETA E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL | 25 |
| 2.2. MEIO E CONDIÇÕES DE CULTIVO | 25 |
| 3. Resultados e discussão | 27 |
| 4. Conclusão..... | 38 |

| | |
|---|-----------|
| Referências Bibliográficas | 39 |
|---|-----------|

CAPÍTULO II

Sistemas de cultivo *in vitro* do musgo *Bryum argenteum* Hedw. (Bryaceae)

| | |
|--|-----------|
| Resumo | 45 |
| Abstract | 46 |
| 1. Introdução | 47 |
| 2. Material e métodos..... | 49 |
| 2.1. PREPARAÇÃO DO MATERIAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO | 49 |
| 2.2. SISTEMAS DE CULTIVO | 51 |
| 2.2.1. CULTIVO EM MEIO SEMISSÓLIDO (MSS)..... | 51 |
| 2.2.2. CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO SOB AGITAÇÃO (MLA) | 51 |
| 2.2.3. CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO ESTACIONÁRIO (MLE) | 52 |
| 2.2.4. CULTIVO EM BIORREATOR DE IMERSÃO PERMANENTE (BIPER) | 53 |
| 2.2.4.1. MONTAGEM DO SISTEMA BIPER | 53 |
| 2.2.4.2. CULTIVO NO SISTEMA BIPER | 53 |
| 2.3. ANÁLISE DE DADOS..... | 54 |
| 3. Resultados..... | 55 |
| 3.1. ESTABELECIMENTO E DESENVOLVIMENTO | 55 |
| 3.2. CULTIVO EM MEIO SEMISSÓLIDO (MSS)..... | 55 |
| 3.3. CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO SOB AGITAÇÃO (MLA) | 56 |
| 3.4. CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO ESTACIONÁRIO (MLE)..... | 60 |
| 3.5. CULTIVO EM BIORREATOR DE IMERSÃO PERMANENTE (BIPER) | 61 |
| 4. Discussão..... | 64 |
| 5. Conclusão..... | 69 |
| 6. Referências Bibliográficas..... | 69 |

Capítulo III

Efeito de reguladores de crescimento no ganho de biomassa e na morfologia de *Isopterygium tenerifolium* Mitt. (Pylaisiadelphaceae) cultivado *in vitro*

| | |
|-----------------------|-----------|
| Resumo | 77 |
| Abstract | 78 |

| | |
|--|-----------|
| 1. Introdução | 79 |
| 2. Material e métodos..... | 81 |
| 2.1. PREPARAÇÃO DO MATERIAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO | 81 |
| 2.2. CULTIVO EM MEIO SEMI-SÓLIDO (MSS) | 82 |
| 2.3. CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO SOB AGITAÇÃO (MLA) | 83 |
| 2.4. ANÁLISES MORFOLÓGICAS..... | 83 |
| 2.5. ANÁLISE DE DADOS..... | 84 |
| 3. Resultados | 84 |
| 3.1. CULTIVO EM MEIO SEMI-SÓLIDO (MSS) | 85 |
| 3.2. CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO SOB AGITAÇÃO (MLA) | 88 |
| 3.3. ANÁLISES MORFOLÓGICAS..... | 88 |
| 4. Discussão | 92 |
| 5. Conclusão..... | 96 |
| 6. Referências Bibliográficas..... | 97 |

CAPÍTULO IV

Propagação clonal *ex situ* de musgos do Cerrado em diferentes substratos

| | |
|---|------------|
| Resumo | 104 |
| Abstract | 105 |
| 1. Introdução | 106 |
| 2. Material e métodos..... | 108 |
| 2.1. COLETA E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL | 108 |
| 2.2. CULTIVO <i>IN VITRO</i> | 108 |
| 2.3. PROPAGAÇÃO CLONAL <i>EX SITU</i> | 109 |
| 2.3.1. PRÉ-ACLIAMATIZAÇÃO | 109 |
| 2.3.2. ACLIAMATIZAÇÃO | 109 |
| 2.4. ANÁLISE DE DADOS..... | 110 |
| 3. Resultados | 111 |
| 3.1. SOBREVIVÊNCIA..... | 111 |
| 3.2. COLONIZAÇÃO..... | 111 |
| 3.3. DESENVOLVIMENTO DAS ESPÉCIES CULTIVADAS <i>EX SITU</i> | 113 |

| | |
|---|------------|
| 4. Discussão | 119 |
| 5. Conclusão..... | 124 |
| 6. Referências Bibliográficas..... | 125 |
| Considerações finais..... | 131 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Introdução Geral | 3 |
| Tabela 1: Principais reguladores de crescimento e os efeitos citados para briófitas (Liang <i>et al.</i> , 2010; Sabovljević <i>et al.</i> , 2014; Erdağ <i>et al.</i> , 2015; Glime, 2017)..... | 10 |
| Tabela 2: Espécies e famílias estudadas..... | 11 |
| Capítulo I | 21 |
| Tabela 1: Porcentagem de explantes de dez espécies de musgos desenvolvidos com e sem contaminação após desinfestação com solução de hipoclorito de sódio (alvejante comercial com 2% de cloro ativo, NaClO), em três tratamentos: concentração de 1% por 5 min (1%-5'), 1% por 10 min (1%-10'), e 2% por 2 min (2%-2'), cultivados <i>in vitro</i> por 10 dias, em meio Knop..... | 29 |
| Tabela 2: Relação de espécies de musgos desenvolvidos com ou sem contaminação após tratamentos de desinfestação (solução de hipoclorito de sódio x tempo de exposição) e cultivados <i>in vitro</i> por 10 dias, em meio Knop..... | 30 |
| Tabela 3: Caracterização das espécies de musgos e respostas observadas durante o estabelecimento e o cultivo <i>in vitro</i> em meio Knop. (AG) Ápice dos gametófitos, (GF) Gametângios feminino, (GM) gametângios masculinos, (AF) Axilas dos filídios, (SC) Local de seção do caulídio, (AFd) Axila dos filídios destacados, (ARd) Axila dos ramos destacados, (LF) Lâmina do filídio, (CA) Crescimento apical, (R) Ramificações..... | 35 |
| Capítulo II | 45 |
| Tabela 1: Biomassa de <i>Bryum argenteum</i> cultivado nos sistemas: semissólido (MSS), por 30 dias, líquido sob agitação (MLA), por 45 dias, biorreator de imersão permanente (BIPER), por 45 dias e líquido estacionário (MLE), por 45 dias, contendo meio Knop sem sacarose (Contr), com sacarose (Sac), ácido giberélico (AG ₃), 6-benzilaminopurina (BAP), ácido indol-3-acético (AIA) em diferentes concentrações e combinações. Cultivo em placa de Petri (p), cultivo em frasco de PET (P) e troca de meio a cada 15 dias (T). Diâmetro inicial das colônias = 0,3 cm; Biomassa inicial = 0,2 mg para MLA, MLE e BIPER. | 57 |
| Capítulo III | 77 |
| Tabela 1: Influência comparativa do ganho de biomassa de <i>Isopterygium tenerifolium</i> cultivados em meio Knop semi-sólido (MSS) e meio Knop líquido sob agitação (MLA), com e sem sacarose, contendo AG ₃ (ácido giberélico), BAP (6-benzilaminopurina), AIA (ácido indol-3-acético) e combinações, em diferentes concentrações, após 30 e 45 dias de cultivo, respectivamente. Diâmetro inicial das colônias = 0,3 cm; Biomassa inicial = 0,2 mg..... | 87 |

| | |
|--|-----|
| Capítulo IV | 104 |
| Tabela 1: Sobrevivência de inóculos de nove espécies de musgos cultivados <i>ex situ</i> em diferentes substratos nas etapas de pré-aclimatização e aclimatização, após 45 dias de cultivo. (n = 15)..... | 112 |
| Tabela 2: Valores para o teste de significância <i>Kruskal-Wallis</i> (*KW) e de comparação múltipla por meio do pós teste de <i>Dunn</i> (<i>Dunn</i>) para a colonização de nove espécies de musgos, cultivados <i>ex situ</i> , em diferentes substratos. (n = 15) | 113 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Introdução Geral | 3 |
| Figura 1: Gametófito de um musgo da família Pottiaceae e suas respectivas estruturas..... | 5 |
| Capítulo I | 21 |
| Figura 1: Porcentagens de desenvolvimento de explantes de dez musgos do Cerrado, desinfestados com solução de hipoclorito de sódio (NaClO), em três tratamentos: concentração de 1% por 5 min (1%-5'), 1% por 10 min (1%-10'), e 2% por 2 min (2%-2'), cultivados <i>in vitro</i> por 10 dias. As barras representam o erro padrão. (a) amostra pré-cultivada; (b) espécie coletada em 2015 e (c) espécie coletada em 2017..... | 28 |
| Figura 2: Estabelecimento do cultivo <i>in vitro</i> de musgos. Estabelecimento direto (A-C) e Estabelecimento indireto (A, D-G e C). (A) Os explantes desenvolvidos sem contaminação foram transferidos; (B) Ao final do 1º subcultivo, os explantes estabelecidos foram repicados e transferidos; (C) Propagação da espécie. (A) Os explantes desenvolvidos com contaminação foram transferidos, e (D e E) subcultivados até que os explantes crescessem para regiões não contaminadas e, (F) suficientemente para serem repicados e subcultivados; (G) Explantes estabelecidos sem nenhuma contaminação visível observada nas placas; (C) Propagação da espécie..... | 31 |
| Figura 3: Estabelecimento indireto de <i>Bryum argenteum</i> (A-H) e <i>Isopterygium tenerifolium</i> (I-L). (A) Colônia de explantes contaminados no 3º subcultivo (seta); (B) Contaminação parcial (seta) no 4º subcultivo; (C) Contaminação parcial (seta) no 5º subcultivo com 24 dias; (D) Contaminação parcial (seta) no 5º subcultivo com 35 dias, mostrando o crescimento de protonemas externo ao meio com contaminação (asterisco); (E) Desenvolvimento do gametófito ereto, externamente ao meio com contaminação (seta) no 5º subcultivo com 24 dias; (F) Crescimento do gametófito próximo à contaminação (setas); (G) Fragmento apical do gametófito se desenvolvendo sem contaminação no 6º subcultivo com 11 dias; (H) <i>Bryum argenteum</i> estabelecido no 6º subcultivo com 34 dias; (I) <i>Isopterygium tenerifolium</i> crescendo, externamente ao meio contaminado (seta) no 3º subcultivo com 40 dias; (J) Crescimento do gametófito próximo à contaminação (setas); (K) Fragmento apical do gametófito sem contaminação no 4º subcultivo com 40 dias; (L) <i>Isopterygium tenerifolium</i> estabelecido livre de contaminação no 5º subcultivo com 40 dias... | 33 |

| | | |
|--------------------------|---|----|
| Figura 4: | Estruturas desenvolvidas em musgos do Cerrado cultivados <i>in vitro</i> . (A) Brotos em <i>Bryum argenteum</i> (7); (B) Protonemas apicais em <i>Fissidens flaccidus</i> (5); (C) Protonemas no local de seção do caulídio (seta) em <i>Vitalia cuspidifera</i> (20); (D) Arquegônio (seta) de <i>Bryum argenteum</i> (10); (E) Anterídio (seta) de <i>Isopterygium tenerifolium</i> (13); (F) Crescimento apical a partir de fragmento do ápice (seta) em <i>Bryum coronatum</i> (13); (G) Protonemas na lâmina do filídio de <i>Leucobryum crispum</i> (20); (H) Colônia de protonemas de <i>Bryum argenteum</i> com botões gametofíticos (24); (I) Colônia de protonemas de <i>Pogonatum pensilvanicum</i> com gametóforos jovens (130); (J) Colônia de gametófitos de <i>Sphagnum platyphylloides</i> (55); (K) Tubérculos (seta) na axila dos filídios de <i>Bryum coronatum</i> (100); (L) Tubérculos (seta) nos caulonemas de <i>Bryum densifolium</i> (150); (M) Gemas protonêmicas de <i>Bryum argenteum</i> em segmentação (seta) (300); (N) Colônia de protonemas formadas a partir da germinação de gemas protonêmicas de <i>Bryum argenteum</i> (32); (O) Gemas no ápice de protonema de <i>Barbula indica</i> (100); (P) Regeneração de <i>Leucobryum crispum</i> a partir do ápice dos filídios (42). (Números em parênteses = dias de cultivo, sem troca de meio de cultura) | 38 |
| Capítulo II | | 45 |
| Figura 1: | Biorreator de imersão permanente (BIPER). (a) Frasco de PET montado com filtros; (b) Sistema de biorreator composto por 15 frascos..... | 54 |
| Figura 2: | Desenvolvimento de <i>Bryum argenteum</i> em meio Knop. (a) Brotos (cabeça de seta) e protonemas (seta) formados no ápice do gametófito (7); (b) Protonemas formados na axila dos filídios (seta) (11); (c) Protonemas a partir do caulídio, na axila dos filídios retirados (cabeça de seta) e no local de segmentação apical (seta) (7); (d) Protonemas no local de segmentação basal (seta) do caulídio (10); (e) Fragmento apical com colônia inicial de protonemas (10); (f) Colônia de protonemas (24); (g) Botão gametofítico (20); (h) Gametófitos desenvolvidos (37). (Números em parênteses = dias de cultivo) | 56 |
| Figura 3: | Influência dos reguladores de crescimento sobre o aumento do diâmetro das colônias de <i>Bryum argenteum</i> , cultivados em meio Knop semi-sólido (MSS), com e sem sacarose, e diferentes concentrações de ácido giberélico (AG ₃), 6-benzilaminopurina (BAP), ácido indol-3-acético (AIA) e combinações, após 30 dias de cultivo. (***) Representa a diferença e (---) a semelhança estatística entre os tratamentos com significância p < 0,05, na primeira linha (1 ^a L) em relação ao controle (Contr), na segunda linha (2 ^a L) em relação ao tratamento com sacarose (Sac) e na terceira linha (3 ^a L) entre as concentrações de cada grupo de regulador de crescimento. (n = 25)..... | 58 |
| Figura 4: | Influência dos reguladores de crescimento no ganho de biomassa de <i>Bryum argenteum</i> , cultivado em meio Knop líquido sob agitação (MLA), com e sem sacarose, e diferentes concentrações de ácido giberélico (AG ₃), 6-benzilaminopurina (BAP), ácido indol-3-acético (AIA) e combinações, após 45 dias de cultivo. (***) Representa a diferença e (---) a semelhança estatística entre os tratamentos com significância p < 0,05, na primeira linha (1 ^a L) em relação ao controle (Contr) e na segunda linha (2 ^a L) entre as concentrações de cada grupo de regulador de crescimento. (n = 5) | 59 |

| | |
|--|----|
| Figura 5: Desenvolvimento de <i>Bryum argenteum</i> no sistema líquido (MLA) após 45 dias de cultivo. (a) Meio Knop com adição de AG ₃ a 0,1 µM; (b) Botão gametofítico no meio com adição de AG ₃ /BAP a 0,1 µM; (c) Gametófito jovem no meio sem adição de reguladores ou sacarose; (d) Meio Knop sem reguladores de crescimento ou sacarose; (e) Meio Knop com sacarose..... | 60 |
| Figura 6: Biomassa de <i>Bryum argenteum</i> cultivado em três sistemas de cultivo. a) Sistema MLA (meio líquido sob agitação), com o cultivo em frascos contendo 180 mL de solução e combinações de sacarose (Sac), ácido giberélico (AG ₃) e 6-benzilaminopurina (BAP); b) Sistema MLE (meio líquido estacionário); c) Sistema BIPER (Biorreator de imersão permanente). Controle sem sacarose (Contr), solução com sacarose (Sac), cultivo em placa de Petri contendo 10 mL de solução (p), cultivo em frasco de PET contendo 1000 mL de solução (P) e troca de meio a cada 15 dias (T). (***) Representa a diferença e (---) a semelhança estatística entre os tratamentos com significância p < 0,05, na primeira linha (1 ^a L) em relação ao tratamento Contr do sistema MLA, (2 ^a L) em relação ao tratamento Sac do sistema MLA e (3 ^a L) entre os tratamentos de cada sistema. (n = 5)..... | 61 |
| Figura 7: Características de <i>Bryum argenteum</i> cultivado no sistema MLE (meio líquido estacionário) e no sistema BIPER (Biorreator de imersão permanente). (a) Aspecto morfológico, (b) Quantidade de protonemas e (c) Quantidade de gametófitos, foram avaliados de forma qualitativa, onde foram atribuídos valores aos conceitos: Ruim = 1, Regular = 2, Bom = 3, Ótimo = 4); (d) Volume e (e) pH da solução, aferidos ao final de cada período de cultivo. Volume e pH iniciais, respectivamente, 1000 mL e 5,7. Os tratamentos Contr_P (solução sem sacarose) e Sac_P (solução com sacarose) foram cultivados por 45 dias corridos e o tratamento Contr_T, o meio foi trocado a cada 15 dias. (n = 5). Barra de erros = ± SE..... | 63 |
| Figura 8: Cultivo <i>in vitro</i> de <i>B. argenteum</i> no sistema BIPER. Unidade de BIPER com biomassa em solução de Knop (a) com adição de sacarose (Sac_P), em 20 dias de cultivo; (b) com adição de sacarose (Sac_P), após 45 dias de cultivo; (c) sem adição de sacarose e com trocas quinzenais (Contr_T), após 45 dias de cultivo... | 63 |
| Capítulo III | 77 |
| Figura 1: Caracteres morfológicos (Filídio <i>in situ</i>). (a) Comprimento (1,85 mm); (b) Largura (0,62 mm) | 84 |
| Figura 2: Desenvolvimento de <i>Isopterygium tenerifolium in vitro</i> . (a) Formação de protonema, em cultivos de 6 dias, a partir de gametângios (seta), (b) do anterídio (seta), (c) do ápice do caulídio e (d) no local de seção do segmento de caulídio; (e) Desenvolvimento de protonemas no ápice de ramos e surgimento de broto (seta) na axila do filídio; (f) Broto desenvolvido (seta), dando origem a um novo ramo; (g) Colônia de segmentos do gametófito com 30 dias de cultivo; (h) Gametófito jovem com desenvolvimento iniciado a partir de protonema..... | 85 |

| | |
|---|-----|
| Figura 3: Influência dos reguladores de crescimento no aumento do diâmetro das colônias de <i>Isopterygium tenerifolium</i> , cultivados em meio Knop semi-sólido (MSS), com e sem sacarose, contendo diferentes concentrações de AG ₃ (ácido giberélico), BAP (6-benzilaminopurina), AIA (ácido indol-3-acético) e combinações, após 30 dias de cultivo. (***) Representa a diferença e (---) a semelhança estatística entre os tratamentos com significância $p < 0,05$, na primeira linha (1ª L) em relação ao controle (Contr), na segunda linha (2ª L) em relação ao tratamento com sacarose (Sac) e na terceira linha (3ª L) entre as concentrações de cada grupo de regulador de crescimento. (n = 25)..... | 86 |
| Figura 4: Influência dos reguladores de crescimento no ganho de biomassa de <i>Isopterygium tenerifolium</i> , cultivado em meio Knop líquido sob agitação (MLA). (a) Contendo AG ₃ (ácido giberélico), BAP (6-benzilaminopurina), AIA (ácido indol-3-acético), sem adição de sacarose e (b) com adição de sacarose, ambos em diferentes concentrações e combinações, após 45 dias de cultivo. (***) Representa a diferença e (---) a semelhança estatística entre os tratamentos com significância $p < 0,05$, na primeira linha (1ª L) em relação ao controle (Contr) e na segunda linha (2ª L), entre as concentrações de cada grupo de regulador de crescimento. (n = 5)..... | 89 |
| Figura 5: Aspecto morfológico de <i>Isopterygium tenerifolium</i> cultivado em meio líquido sob agitação (MLA). (a-d) Plantas frescas. (e-i) Plantas em lâminas semipermanentes. (a) Planta em solução de Knop; (b) Gametófito, com início de brotação (seta); (c) Gametófito em AIA a 0,1 µM, com rizóides desenvolvidos (seta); (d) Biomassa produzida em BAP a 0,1 µM, com botões gametofíticos; (e) Ápice do gametófito em AG ₃ a 0,1 µM; (f) Filídio em AIA a 0,5 µM; (g) Botão gametofítico em BAP a 0,5 µM; (h) Filídio com desenvolvimento anormal em AG ₃ /BAP a 0,5 µM e (i) Células da lâmina do filídio em Sac/AG ₃ a 0,1 µM..... | 90 |
| Figura 6: Influência dos reguladores de crescimento na produção de brotações de <i>Isopterygium tenerifolium</i> cultivado em meio líquido sob agitação (MLA). (a) Contendo AG ₃ (ácido giberélico), BAP (6-benzilaminopurina), AIA (ácido indol-3-acético), sem adição de sacarose e (b) com adição de sacarose, ambos em diferentes concentrações e combinações, após 45 dias de cultivo. (***) Representa a diferença e (---) a semelhança estatística entre os tratamentos com significância $p < 0,05$, na primeira linha (1ª L) em relação ao controle (Contr) e na segunda linha (2ª L) entre as concentrações de cada grupo de regulador de crescimento. (n = 3)..... | 91 |
| Figura 7: Influência dos reguladores de crescimento nas dimensões dos filídios de <i>Isopterygium tenerifolium</i> cultivado em meio líquido sob agitação (MLA). (a) Contendo AG ₃ (ácido giberélico), BAP (6-benzilaminopurina), AIA (ácido indol-3-acético), sem adição de sacarose e (b) com adição de sacarose, ambos em diferentes concentrações e combinações, após 45 dias de cultivo. (n = 15). Barra de erros = ± SE..... | 92 |
| Capítulo IV | 104 |
| Figura 1: Propagação <i>ex vitro</i> de musgo. (a) Cultivo em recipientes fechados em condições controladas durante a pré-aclimatização; (b) Recipiente contendo substrato; (c) Cultivo em diferentes substratos na casa de vegetação durante a aclimatização; (d) Coleta de dados após cada período de cultivo..... | 110 |

- Figura 2:** Cultivo *ex vitro* de nove espécies de musgos em diferentes substratos. **As** = aspecto morfológico; **Pr** = desenvolvimento de protonemas; **Ga** = desenvolvimento de gametófitos; **Di** = diâmetro das colônias; **Al** = altura do maior gametófito. Eixo vertical (**Y**), de 0 a 3 para As, Pr e Ga = conceito (Ruim = 0; regular = 1; Bom = 2; Ótimo = 3) e de 0 a 4 para Di e Al = valores em cm. Barra de erros = \pm SE. (n = 15)..... 114
- Figura 3:** Propagação *ex vitro* de musgos. (a, c, f, g, i, j) Pré-aclimatização (45 dias de cultivo) e (b, d, e, h, k, l) Aclimatização (45 dias de cultivo). **(a)** *Barbula indica* em areia e **(b)** bioplant, com a formação gametófitos e protonemas (asterisco); **(c)** *Bryum argenteum* em solo, com a formação de colônias de gametófitos e protonemas (asterisco), **(d)** em bioplant/areia, e **(e)** em bioplant, mostrando propágulos concentrados na borda do recipiente (setas); **(f)** *Bryum coronatum* em areia, com a formação de gametófitos e protonemas (asterisco), **(g)** em bioplant/solo, com a formação de gametófitos e protonemas (asterisco), **(h)** em bioplant/solo; **(i)** *Bryum densifolium* com a formação de gametófitos (setas) e a colonização de protonemas (asterisco), **(j)** em solo, com a formação de gametófitos e **(k)** brotos secundários originados de caulídios primários (seta), **(l)** em bioplant, com a formação de novos brotos..... 117
- Figura 4:** Propagação *ex vitro* de musgos. (a, b, d, f, g, i, k) Pré-aclimatização (45 dias de cultivo) e (c, e, h, j, l) Aclimatização (45 dias de cultivo). **(a)** *Isopterygium tenerifolium* em areia e **(b)** bioplant/solo mostrando gametófitos com orientação ereta e **(c)** bioplant/solo, com gametófitos prostrados ao substrato. **(d)** *Leucobryum crispum* em solo, com desenvolvimento de protonemas no ápice do filídio (seta) e **(e)** solo, com formação de novos brotos. **(f)** *Pogonatum pensilvanicum* em areia, **(g)** em bioplant/solo, com formação de protonemas e gametófitos (setas) e **(h)** em bioplant/solo com formação de gametófitos. **(i)** *Sphagnum platyphylloides* em vermiculita, com desenvolvimento de ramos (seta) e **(j)** em bioplant/solo. **(k)** *Vitalia cuspidifera* em areia e **(l)** em solo, com colônias pouco desenvolvidas (setas)..... 118
- Figura 5:** Musgos cultivados em bioplant e aclimatizados em casa de vegetação. **(a)** *Bryum coronatum*, mostrando a colonização total da superfície do substrato (4) e **(b)** colônia com altura de 2 cm (seta) (4); **(c)** *Bryum densifolium* (7); **(d)** *Isopterygium tenerifolium* com esporófitos (4-5). (Números entre parênteses = meses de cultivo) 119

LISTA DE ABREVIACOES

ABA - cido Abscísico

AIA - cido Indolil-3-Acético

AIB - cido Indol-3-Butírico

AG₃ - cido Giberélico

AG₃/AIA – Giberelina (AG₃) + cido Indolil-3-Acético

AG₃/BAP - Giberelina (AG₃) + 6-Benzilaminopurina

BAP - 6-Benzilaminopurina

BIPER - Biorreator de imersão permanente

Contr – Controle

MLA - Meio líquido sob agitao

MLE - Meio líquido estacionário

MS - Murashige e Skoog

MSS - Meio semi-sólido

PET - Politereftalato de Etila

PVC - Cloreto de Vinila

Sac – Sacarose

Sac/AG₃ – Sacarose + Giberelina (AG₃)

Sac/AIA – Sacarose + cido Indolil-3-Acético

Sac/BAP – Sacarose + 6-Benzilaminopurina

Sac/AG₃/BAP – Sacarose + Giberelina (AG₃) + 6-Benzilaminopurina

Resumo

Os musgos têm sido estudados por suas características fisiológicas, ecológicas e potencialmente econômica. A cultura de tecidos tem sido cada vez mais utilizada como ferramenta para estudos nas mais diversas áreas, como a criopreservação e biorremediação. Além disso, a cultura *in vitro* é a maneira mais eficiente para a produção em grande quantidade musgos e o aperfeiçoamento dessas técnicas, subsidiará novos estudos briotecnológicos. O objetivo desse estudo foi estabelecer e propagar espécies de musgos por meio de culturas axênicas iniciadas de fragmentos de gametófitos, em que foram investigados métodos acessíveis de cultivo *in vitro* e o efeito de reguladores de crescimento no desenvolvimento de algumas espécies. Dez espécies de musgos (*Barbula indica*, *Bryum argenteum*, *Bryum coronatum*, *Bryum densifolium*, *Fissidens flaccidus*, *Isopterygium tenerifolium*, *Leucobryum crispum*, *Vitalia cuspidifera*, *Sphagnum platyphylloides*, *Pogonatum pensilvanicum*) foram estabelecidas e propagadas *in vitro* com sucesso. Todas as espécies foram submetidas ao Estabelecimento Indireto, nova metodologia para o resgate de explantes parcialmente contaminados e cultivados em condições assépticas. *B. argenteum* foi cultivado em quatro sistemas de cultivo: meio semi-sólido (MSS); líquido sob agitação (MLA); líquido estacionário (MLE) e biorreator de imersão permanente (BIPER), onde o ganho de biomassa e o efeito dos reguladores de crescimento foram mais eficientes nos cultivos em soluções líquidas, especialmente no cultivo com adição de sacarose no BIPER, no qual o índice de multiplicação aumentou 1.738 vezes. No cultivo de *I. tenerifolium*, os reguladores de crescimento influenciaram na morfologia dos filídios e a adição de sacarose ao meio intensificou os efeitos do ácido giberélico, o qual induziu a formação de brotos e aumentou as dimensões dos filídios. Em nove espécies cultivadas *in vitro*, foram realizadas a propagação clonal *ex situ*, em diferentes substratos. A propagação foi conduzida em duas etapas. A primeira etapa, pré-aclimatização foi realizada em sala de crescimento com condições controladas e a segunda, a aclimatização foi realizada em casa de vegetação. A pré-aclimatização foi relevante para o crescimento de musgos ainda em estágio inicial de desenvolvimento. A aclimatização favoreceu a colonização de gametófitos e o aumento da densidade das colônias. Os substratos Bioplant e bioplant/solo apresentaram os melhores resultados para *B. argenteum*, *B. coronatum* e *I. tenerifolium* cultivadas em casa de vegetação.

Palavras chaves: biorreator, conservação, cultivo, gametófito, sacarose.

Abstract

Mosses have been studied for their physiological, ecological, and potentially economic characteristics. Tissue culture has been increasingly used as a tool for studies in various areas, such as cryopreservation and bioremediation. Also, *in vitro* culture is the most efficient way to produce large quantities of moss, and the improvement of these techniques will support new biotechnological studies. This study aimed to establish and propagate moss species through axenic cultures initiated from gametophyte fragments, in which accessible *in vitro* cultivation methods and the effect of growth regulators on the development of some species were investigated. Ten species of moss (*Barbula indica*, *Bryum argenteum*, *Bryum coronatum*, *Bryum densifolium*, *Fissidens flaccidus*, *Isopterygium tenerifolium*, *Leucobryum crispum*, *Vitalia cuspidifera*, *Sphagnum platyphylloides*, *Pogonatum pensilvanicum*) were successfully established and propagated *in vitro*. All species were submitted to the Indirect Establishment, a new methodology for the rescue of partially contaminated explants cultivated under aseptic conditions. *B. argenteum* was grown in four cultivation systems: semi-solid medium (MSS); stirring liquid (MLA); stationary liquid (MLE) and permanent immersion bioreactor (BIPER), where the biomass gain and the effect of growth regulators were more efficient in liquid solution crops, especially in the sucrose addition in BIPER, in which the multiplication increased by 1,738 times. In the cultivation of *I. tenerifolium*, growth regulators influenced the morphology of the branch leaves and the addition of sucrose to the medium intensified the effects of gibberellic acid, which induced bud formation and increased the branch dimensions. In nine *in vitro* cultivated species, *ex situ* clonal propagation was performed on different substrates. Propagation was conducted in two steps. The first stage, pre-acclimatization was performed in a growth room under controlled conditions, and the second stage, acclimatization, was performed in a greenhouse. Pre-acclimatization was relevant for the growth of mosses still in the early stage of development. The acclimatization favored the colonization of gametophytes and the increase of colony density. The substrates Bioplant and bioplant/soil showed the best results for *B. argenteum*, *B. coronatum*, and *I. tenerifolium* grown in a greenhouse.

Keywords: bioreactor, conservation, cultivation, gametophyte, sucrose.

1. Introdução geral

As briófitas (hepáticas, antóceros e musgos) são plantas de pequeno porte, avasculares e estruturalmente simples na escala evolutiva. Apresentam como característica singular o gametófito dominante e de vida livre, podendo habitar os mais diversos ambientes, como florestas e regiões desérticas bem como e em diferentes substratos, como rochas, solos, concretos e troncos de árvores (Costa *et al.*, 2010; Tuba *et al.*, 2011). Algumas espécies são definidas como organismos extremófilos, por sua capacidade de se desenvolver em regiões extremamente secas ou frias, apesar de uma grande quantidade de espécies crescerem, preferencialmente, em locais úmidos (Gradstein *et al.*, 2001; Shaw, 2009; Costa *et al.*, 2010).

Classificadas como plantas poiquilohídricas, por apresentar estado de hidratação controlada pelo ambiente externo, as briófitas são constituídas, predominantemente, por células clonais com propriedades totipotentes, ou seja, com capacidade de se desdiferenciarem ao estado meristemático (Cuming, 2009; La Farge *et al.*, 2013). Elas também são excelentes bioindicadoras ambientais, pois além de absorverem nutrientes de célula à célula, ainda podem adsorver alguns contaminantes presentes no meio ambiente, o que as habilitam para estudos de mudanças climáticas (Tuba *et al.*, 2011). Da mesma forma, podem ser utilizadas para biorremediação de ambientes ecologicamente degradados (González & Pokrovsky, 2014) e também para a reciclagem de metais nobres, como demonstrado por Itouga e Nakatsuka (2012), em que protonemas de musgo recuperaram ouro e platina de águas residuais. Além disso, Radu *et al.* (2015) cultivaram musgos como forração em jardins, apontando para um potencial cultural, econômico e estético desses vegetais (Jones & Rosentreter, 2006; Glime, 2007; Anderson *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2010).

Musgos (Bryophyta) e hepáticas (Marchantiophyta) têm sido estudadas visando ampliar o conhecimento de suas propriedades medicinais (Asakawa, 2007; Fernández & Serrano, 2009; Alam *et al.*, 2015; Mishra *et al.*, 2014). Em algumas hepáticas, podem ser isolados compostos químicos que demonstram influências benéficas na terapia contra o câncer, como as marchantinas (éteres bis-bibenzílico cíclicos) (Dey & Mukherjee, 2015) e no tratamento contra a AIDS, como as perrottetinas F e as paleatinas (éteres bis-bibenzílico acíclicos), além das marchantinas (Asakawa *et al.*, 2013). Adicionalmente, algumas briófitas também têm demonstrado apresentar atividade alelopática (interferência positiva ou negativa no desenvolvimento de determinadas plantas), resultado da produção de compostos como terpenos e flavonóides (Basile *et al.*, 2003; Glime, 2007).

Para a produção de culturas renováveis e a síntese de novos compostos (Reski, 1998; Duckett *et al.*, 2004; Decker & Reski, 2007; Decker *et al.*, 2014), dentre outras utilizações que visem a exploração comercial dos musgos, é necessário que métodos sustentáveis de propagação sejam adaptados às diferentes espécies do grupo.

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica amplamente empregada na propagação comercial e industrial de plantas, movimentando bilhões de dólares em todo o mundo (Teixeira & Cid, 2010; Cruz-Cruz *et al.*, 2013). Em briófitas, esse método tem sido cada vez mais utilizado como ferramenta em estudos, como desenvolvimento celular, genético e molecular, na morfogênese do crescimento de briófitas, criopreservação, análise genética, pesquisas referentes à conservação de espécies raras e ameaçadas, para a sua conservação e posterior reintrodução na natureza (Reski, 1998; Duckett *et al.*, 2004; Decker & Reski, 2007; Decker *et al.*, 2014).

De acordo com Marko *et al.* (2001), a cultura *in vitro*, é a maneira mais eficiente para a produção em grande quantidade de briófitas. O aperfeiçoamento dessas técnicas subsidiará novos estudos biotecnológicos (biotecnologia de briófitas), ampliando o número de espécies estudadas. Até o momento poucas espécies, como *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid., *Funaria hygrometrica* Hedw. e, principalmente, *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. são utilizadas na grande maioria das pesquisas realizadas (Duckett *et al.*, 2004). Contudo, ainda que as briófitas tenham mostrado um grande potencial comercial, apenas 5% das espécies já foram submetidas às técnicas de propagação *in vitro*, o que revela a necessidade de realização de pesquisas para o aperfeiçoamento e exploração de mais espécies (Duckett *et al.*, 2004; Alam *et al.*, 2015).

2. Objetivo Geral

Estabelecer e propagar espécies de musgos, por meio de culturas axênicas iniciadas a partir de fragmentos de gametófitos, em que foram investigados métodos acessíveis de cultivo e o efeito de reguladores de crescimento no desenvolvimento de algumas espécies.

2.1. Objetivos específicos

- Estabelecer métodos de desinfestação de musgos a partir de fragmentos de gametófitos;
- Comparar os diferentes sistemas de cultivo: meio semi-sólido e meio líquido para as espécies: *Bryum argenteum* Hedw. e *Isopterygium tenerifolium* Mitt.;

- Avaliar o efeito dos sistemas de cultivo em relação ao ganho de biomassa de *Bryum argenteum* Hedw.;
- Avaliar o efeito dos reguladores de crescimento no ganho de biomassa de *Bryum argenteum* Hedw.;
- Avaliar o efeito dos reguladores de crescimento no desenvolvimento morfológico de *Isopterygium tenerifolium* Mitt.;
- Comparar diferentes substratos para o desenvolvimento das espécies estudadas em casa de vegetação.

3. Revisão de Literatura

3.1. Características gerais das Briófitas

As briófitas (*latu sensu*), representam o segundo maior grupo de plantas, em número de espécies, atrás apenas das angiospermas (Goffinet *et al.*, 2009). Tem origem parafilética e são classificadas em três divisões: Anthocerotophyta (antóceros), Marchantiophyta (hepáticas) e Bryophyta (musgos) (Shaw & Goffinet, 2009).

O número de espécies de briófitas já descritas mundialmente é cerca de 18 mil, formando um grupo bastante diversificado (Shaw & Goffinet, 2009). A brioflora do Brasil compreende 1.567 espécies (15 antóceros, 664 hepáticas e 888 musgos), distribuídas em 118 famílias e 417 gêneros, sendo que dentre essas 21,5% são endêmicas (Briófitas, Flora do Brasil 2020, em construção). O bioma Cerrado apresenta uma diversidade de 478 espécies de briófitas e dessas, 63 são endêmicas (Costa & Peralta, 2015).

Os musgos (Bryophyta) possuem estruturas mais especializadas dentre as briófitas. Eles são compostos por gametófito (formado por rizóide, caulídio e filídio) (Fig. 1), que compreende a planta propriamente dita, sendo a fase haplóide e dominante, e o esporófito (formado por pé, seta e cápsula), que é a estrutura produtora de esporos, sendo a parte diplóide e de curta duração da planta (Gradstein & Costa, 2003; Goffinet *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2010).

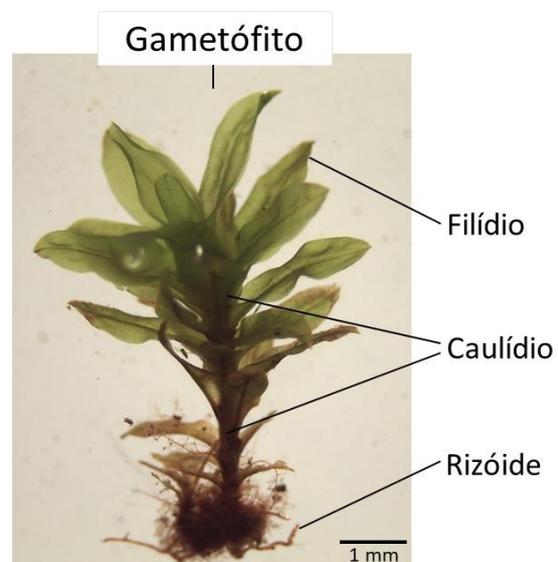


Figura 1: Gametófito de um musgo da família Pottiaceae e suas respectivas estruturas.

O grupo mais numeroso e conhecido dentre as briófitas são os musgos (Bryophyta), que por sua vez são separados, comumente, em dois grupos, os acrocárpicos e os pleurocárpicos, os quais são distinguidos de acordo com a ramificação do caulídio e a localização do esporófito. Enquanto os acrocárpicos são plantas que crescem formando tufos, apresentando caulídeos eretos com pouca ou nenhuma ramificação, e os esporófitos se desenvolvendo na parte terminal do caulídio; os pleurocárpicos crescem formando tapetes, apresentando caulídios rastejantes e com muitas ramificações e esporófitos que se desenvolvem na parte lateral do caulídio (Gradstein *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2010).

A reprodução pode ser sexuada, por produção de gametas, e assexuada, por propagação vegetativa (Costa *et al.*, 2010). Segundo Silva & Silva (2013), as características reprodutivas das briófitas estão relacionadas às variações ambientais, o que pode ajudar a esclarecer as razões do seu sucesso reprodutivo. Com isso, algumas espécies têm maiores índices de estabelecimento e colonização a partir de diásporos vegetativos (During & Tooren, 1987, Goffinet *et al.*, 2009), ou seja, produzem vários tipos de estruturas reprodutivas vegetativas especiais para reprodução assexuada e dispersão, também sendo chamadas de fragmentos clonais (Luizi-Ponzo *et al.*, 2006). Tanto esporos quanto os propágulos de briófitas são estruturas que podem ser facilmente dispersas pelo vento, água ou por animais (Cuming, 2009; Goffinet *et al.*, 2009).

Após a germinação dos esporos, bem como o desenvolvimento dos fragmentos, é formado o protonema, que é um filamento multicelular, clorofilado e ramificado. A fase protonemática pode ser subdividida em cloronema e caulonema. O cloronema é a fase inicial do desenvolvimento, e apresenta células curtas com paredes transversais perpendiculares, numerosos cloroplastos e paredes celulares incolores. Já o caulonema, tem o seu desenvolvimento posterior ao cloronema, apresenta células longas com paredes transversais oblíquas e, geralmente, acastanhadas e cloroplastos menos distribuídos. Nesta fase ocorre a formação dos botões gametofíticos e subsequentemente os gametóforos (Goffinet *et al.*, 2008; Goffinet *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2010; Glime, 2017).

3.2. Usos das briófitas

As briófitas são extremamente ricas em compostos secundários como terpenos, fenóis, éteres fenólicos, alquilfenóis, taninos, flavonóides, glicosídeos (saponinas), ácidos graxos, compostos aromáticos, dentre outros (Zinsmeister *et al.*, 1991; Marko *et al.*, 2001; Sawant, 2014). Esses compostos também apresentam propriedades medicinais, e frequentemente novas

moléculas são identificadas (Marko *et al.*, 2001; Asakawa, 2007; Fernández & Serrano, 2009). Essa diversidade bioquímica se traduz em compostos biologicamente ativos, permitindo inclusive a produção de fármacos de estrutura molecular complexa. Estudos com base em atividades biológicas, encontradas nas briófitas, comprovam ações antifúngicas, antibióticas e antivirais (Sabovljević *et al.*, 2010; Deora & Guhil, 2015), anti-inflamatória, antialérgica (Asakawa, 2007), anticancerígena (Morantes *et al.*, 2007; Dey & Mukherjee, 2015), antioxidante (Lopez *et al.*, 2007; Bhattarai *et al.*, 2008) e alelopáticas (Basile *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2009).

Ainda, em termos de pesquisa básica, as briófitas, por sua estrutura simples e curto período para seu desenvolvimento em comparação às angiospermas, são utilizadas como modelos experimentais para estudos fisiológicos e genéticos (Reski, 1998; Wood *et al.*, 2000; Glime, 2007), tal como feito com o musgo *Physcomitrella patens*, cujo genoma completo foi descrito em 2008 (Wood *et al.*, 2000; Zimmer *et al.*, 2013).

As principais utilidades comerciais para os musgos estão concentradas na horticultura. Essas plantas apresentam propriedades favoráveis para serem utilizadas para condicionamento do solo, por sua capacidade de armazenamento de água, proporcionando aeração e retenção de partículas poluentes (Anderson *et al.*, 2010; Alam & Sharma, 2015). Também, os musgos têm despertado interesse de paisagistas por se estabelecerem nas telhas das casas formando um telhado verde, que além de conferir beleza às edificações, promovem isolamento térmico das casas contra altas temperaturas comuns no verão, poluição sonora e contribuem para diminuir a poluição do ar (Studlar & Peck, 2009; Alam & Sharma, 2015; Radu *et al.*, 2015).

A turfa, material vegetal úmido e esponjoso em decomposição, composto principalmente por musgos do gênero *Sphagnum*, pode ser usado como combustível, com indicação como possível substituto ao petróleo (Hinrichsen, 1981), na construção civil (Saxena & Harinder, 2004) e no tratamento de derramamento de óleo na água (Viraraghavan & Mathavan, 1988).

3.3. Importância ecológica

As briófitas apresentam resistência biológica relevante na ecologia terrestre de ambientes extremos (Gradstein *et al.*, 2001; Shaw, 2009; La Farge *et al.*, 2013). Estudos, por meio de cultura *in vitro* demonstram a capacidade de reativação fotossintética de briófitas subglaciais de ambientes polares, depois de dezenas de anos, o que revela a resistência de

briófitas a condições extremas e a sua capacidade de recolonização (La Farge *et al.*, 2013; Stark *et al.*, 2017).

Algumas espécies de briófitas são adaptadas a ambientes urbanos, o que pode ser bastante eficiente para os estudos quanto ao entendimento, monitoramento e bioremediação relativos aos impactos demográficos recentemente mais comuns, como a poluição atmosférica, o desmatamento e o impacto causado por atividades de mineração (Tuba *et al.*, 2011; Itouga *et al.*, 2013; Beike *et al.*, 2014; González & Pokrovsky, 2014). O pequeno porte desses vegetais e a capacidade de retenção de água os tornam colonizadores de substratos hostis, como o concreto (casmófito), troncos vivos (corticícola), troncos mortos (epixícola), rochas (rupícola) e solos (terrícola), bem como a grande habilidade de propagação vegetativa (Alvarez & Soria, 1995; Bates, 2000; Gradstein *et al.*, 2001; Goffinet *et al.*, 2009; Hugonnot & Celle, 2012).

Devido às suas características morfológicas e fisiológicas, as briófitas apresentam habilidade de retenção de nutrientes e de metais pesados, atuando, assim, como bioindicadoras de poluição por metais pesados, acidez e partículas radioativas (Martins & Boaventura, 2004; Tuba *et al.*, 2011). O caráter de colonizadores pioneiros foi estudado por Frahm, (2004) e por Glime (2007), que realizaram semeadura de esporos e fragmentos de briófitas em terra nua, a fim de criar um obstáculo à erosão do solo. Em particular, espécies do gênero *Sphagnum* são mais utilizadas para estudos relacionados ao biomonitoramento tanto da água, quanto do ar (Martins & Boaventura, 2004; Alam & Sharma, 2015). A eficiência de clones de *Sphagnum palustre* L., cultivados *in vitro*, para acumular metais presentes no ar de áreas urbanas, industriais e agrícolas, foi demonstrada por Capozzi *et al.* (2017).

3.4. Cultivo de Briófitas

A utilização do cultivo *in vitro* como ferramenta para estudos da morfologia do desenvolvimento de briófitas tem sido promissor, pois oferecem excelentes oportunidades para o estudo dos processos da morfogênese dos protonemas, tais como polaridade, forma e divisão das células (Goode *et al.*, 1992; Cove *et al.*, 2006; Pressel *et al.*, 2008), germinação de esporos (Schnepf *et al.*, 1982; Awasthi *et al.*, 2012b), regeneração de fragmentos (Segreto *et al.*, 2010; Hugonnot & Celle, 2012), estudos de gemas (Ligrone *et al.*, 1996; Ashton & Raju, 2001; Rowntree *et al.*, 2007) e efeito de fitohormônios (Schumaker & Dietrich, 1998; Sabovljević *et al.*, 2014).

O cultivo no campo pode ser realizado na forma de plantações por meio da semeadura de esporos ou de fragmentos vegetativos diretamente no solo (Miles & Longton, 1990).

Também, é possível usar amostras coletadas em ambientes naturais e fazê-las crescer em estufas ou casas de vegetação (Anderson *et al.*, 2010). Para a produção em larga escala, há cultivos em sistemas fechados (Tacoronte *et al.*, 2009), em câmaras de crescimento (La Farge *et al.*, 2013), em placas de Petri com parte do substrato de origem da planta (Ignatov *et al.*, 2015) e cultivos em substratos artificiais (Haughian & Frego, 2015).

No entanto, a utilização de briófitas em grandes áreas, como no emprego ornamental em centros urbanos (Studlar & Peck, 2009; Radu *et al.*, 2015), ainda é limitado devido ao crescimento muito lento das colônias transplantadas. Essa característica mostra a necessidade do desenvolvimento de métodos alternativos de produção de briófitas, em larga escala, para a realização do plantio em grandes áreas (Anderson *et al.*, 2010).

O cultivo *in vitro* de briófitas, realizada de forma axênica, é fundamental não só para estudos nas áreas de biologia celular, molecular e do desenvolvimento, como também na promoção de métodos mais eficientes de propagação em larga escala e subsequentemente a exploração comercial e industrial dessas plantas (Schneider *et al.*, 1967; Duckett *et al.*, 2004; Vujičić *et al.*, 2011; Cuvertino-Santoni & Montenegro, 2013).

Uma das vantagens de se cultivar briófitas é que o seu desenvolvimento pode ser obtido tanto a partir do esporo, quanto do gametófito ou parte dele (Duckett *et al.*, 2004). Outra vantagem importante do cultivo dessas plantas é que elas podem ser cultivadas em diversos tipos de substratos, como areia, turfa (Beike *et al.*, 2010), vermiculita (Liang *et al.*, 2010) e solo (Awasthi *et al.*, 2012a).

A desinfestação do gametófito é uma fase limitante na propagação *in vitro* de briófitas, justamente por sua simbiose com microrganismos diversos, enquanto os esporos são mais fáceis de desinfestar. Ainda assim, devido às condições ambientais, algumas espécies não são oportunamente encontradas férteis, ou seja, com esporófito desenvolvido. Para essas espécies, obter a reprodução assexuada é uma alternativa importante para a dispersão e conservação (Duckett *et al.*, 2004; Löbel & Rydin, 2010). Vanderpoorten e Hallingbäck (2009) obtiveram sucesso ao cultivar espécies raras a partir de gametófitos e reintroduzir em seu ambiente natural. Também, segundo Rowntree *et al.* (2007), a produção *in vitro* de propágulos assexuados, sob tratamentos específicos, promoveu a formação de propágulos de repouso especializados e capazes de resistir a condições ambientais extremas, como o stress da dessecação.

As briófitas podem ser propagadas tanto em meio semi-sólido quanto em meio líquido com sistema de cultura submersa, sendo os meios de cultivo mais comuns os de Knop (Knop, 1865) e MS (Murashige & Skoog, 1962), modificados ou não (Hohe & Reski, 2002; Rowntree

et al., 2007; Beike *et al.*, 2010). No entanto, o meio Knop tem se mostrado mais eficiente no cultivo *in vitro* de briófitas, como demonstrado no estudo de Liang *et al.* (2010), que constataram maior produção de protonemas e maior rendimento de biomassa na produção de *Bryum argenteum*.

Durante o ciclo de desenvolvimento das briófitas, a fase de protonema é a mais importante para produção em massa, por sua facilidade em propagar-se vegetativamente e por sua maior estabilidade ao longo do tempo (Hohe *et al.*, 2002; Decker & Reski, 2004; Duckett *et al.*, 2004; Itouga *et al.*, 2013).

A composição do meio nutritivo é de grande importância para o cultivo, assim como os reguladores de crescimento (auxinas, citocininas, giberelinas e ácido abscísico), os quais influenciam diversos efeitos fisiológicos e conseqüentemente nos resultados obtidos nas culturas (Tabela 1). De todo modo, a maioria dos estudos de cultivo *in vitro*, de briófitas, versa sobre a espécie *Physcomitrella patens* (Sabovljević *et al.*, 2014).

Tabela 1: Principais reguladores de crescimento e os efeitos citados para briófitas (Liang *et al.*, 2010; Sabovljević *et al.*, 2014; Erdağ *et al.*, 2015; Glime, 2017).

| Classe de reguladores de crescimento | | Efeito |
|---|------------------------------|---|
| Auxinas | Ácido Indol-3-acético (AIA) | Transporte de cálcio, alongamento celular, diferenciação do protonema, alongamento do caulídio, estimulação da formação de rizóide, alongamento da seta e inibição ou formação de botões gametofíticos, dependendo da concentração. |
| | Ácido indol-3-butírico (AIB) | Inibição do crescimento do protonema. |
| Citocininas | C-aminopurina (BAP) | Aumento da produção e desenvolvimento anormal de botões gametofíticos, atraso do envelhecimento, aumento do cálcio nas células. |
| Ácido giberélico (AG₃ – AG₇) | | Desenvolvimento, promoção do crescimento, efeito positivo no desenvolvimento do anterídio, diminuição da produção de arquegônio e redução do tempo para o surgimento de gametófitos. |
| Ácido Abscísico (ABA) | | Tolerância à dessecação, inibição de botões gametofíticos e controle da resposta à citocinina. |

Os biorreatores compreendem um equipamento para o cultivo sob o regime de imersão temporária ou permanente de tecido vegetal cultivável em meio líquido, sob condições de crescimento padronizado e controlado (Decker & Reski, 2004). As principais vantagens da micropropagação em sistemas de biorreator é a produção de material vegetal homogêneo, confiável, com alto grau de pureza e de rendimento (Reski *et al.*, 2018). E ainda, se forem

adicionados ao sistema, aeração e reguladores de crescimento, o rendimento pode aumentar em até 9 vezes a produção diária de musgos (Hohe & Reski, 2002; Itouga *et al.*, 2013).

Em diversas pesquisas, o musgo produzido em biorreatores tem sido reconhecido como um grande potencial para extração de compostos bioquímicos (Michelfelder *et al.*, 2017) para a indústria biofarmacêutica (Reski *et al.*, 2015) de cosméticos (Henes *et al.*, 2018) ou com interesse crescente para a biorremediação de ambientes contaminados por metais (Itouga *et al.*, 2013) e para o biomonitoramento do ar (Beike *et al.*, 2014).

4. Aspectos metodológicos gerais

Briófitas podem ser propagadas *in vitro* em solução nutritiva simples de sais inorgânicos, na presença de luz e adição de dióxido de carbono (Decker e Reski, 2004). Adicionalmente, a desinfestação do tecido do gametófito tem sido realizada com a utilização de hipoclorito de sódio, porém, para livrar o tecido de todos os contaminantes, algumas vezes, é necessário a aplicação de altas concentrações, o que frequentemente mata a planta, ou quando a concentração utilizada de hipoclorito é baixa, a esterilização muitas vezes não é eficaz (Sabovljević *et al.*, 2012; Vujičić *et al.*, 2011).

No presente trabalho, o desenvolvimento da maioria das espécies foi similar nas soluções minerais de Knop e de MS, bem como em suas diluições. Contudo, com base nos resultados iniciais, na simplicidade no preparo da solução e no baixo custo, o meio Knop, assim como o hipoclorito como agente desinfestante em concentrações e tempos de imersão diferentes, foram utilizados na propagação das espécies estudadas.

Tabela 2: Espécies e famílias estudadas.

| Espécies | Famílias |
|---|--------------------|
| <i>Barbula indica</i> (Hook.) Spreng. | Pottiaceae |
| <i>Bryum argenteum</i> Hedw. | Bryaceae |
| <i>Bryum coronatum</i> Schwägr. | Bryaceae |
| <i>Bryum densifolium</i> Brid. | Bryaceae |
| <i>Fissidens flaccidus</i> Mitt. | Fissidentaceae |
| <i>Isopterygium tenerifolium</i> Mitt. | Pylaisiadelphaceae |
| <i>Leucobryum crispum</i> Müll. Hal. | Leucobryaceae |
| <i>Pogonatum pensilvanicum</i> (Bartram ex Hedw.) P. Beauv. | Polytrichaceae |
| <i>Sphagnum platyphylloides</i> Warnst. | Sphagnaceae |
| <i>Vitalia cuspidifera</i> (Mitt.) P.E.A.S. Câmara, Carv.-Silva & W.R. Buck | Sematophyllaceae |

Todas as espécies pesquisadas foram estabelecidas, a partir de fragmentos dos gametófitos e mantidas em subcultivos para os estudos subsequentes. A espécie *Bryum argenteum* foi estudada acerca dos efeitos de diferentes reguladores de crescimento e de diferentes sistemas de cultivo, tais como: meio semi-sólido, meio líquido e biorreator de imersão permanente. *Isopterygium tenerifolium* também foi estudado acerca dos efeitos de diferentes reguladores de crescimento no cultivo em meio semi-sólido e no meio líquido, com relação a capacidade de desenvolvimento *in vitro*, ao ganho de biomassa e aos aspectos morfológicos. *Barbula indica*, *Bryum argenteum*, *B. coronatum*, *B. densifolium*, *Isopterygium tenerifolium*, *Leucobryum crispum*, *Pogonatum pensilvanicum*, *Sphagnum platyphylloides* e *Vitalia cuspidifera*, foram subcultivadas *in vitro* e propagadas *ex situ*, nos substratos: bioplant, areia, vermiculita, solo, bioplant/areia e bioplant/solo.

5. Referências Bibliográficas

- Alam, A. & Sharma, V. 2015. Horticultural Importance of Bryophytes: A Review. **International Journal of Horticulture**, 5(19), 1-9.
- Alam, A., Shrama, V., Rawat, K. K. & Verma, P. K. 2015. Bryophytes-the ignored medicinal plants. **SMU Medical Journal**, 2(1), 299-315.
- Alvarez, M. E. R. & Soria, A. 1995. Los briófitos y el medio urbano. **Agricultura: Revista agropecuaria**, (751), 96-101.
- Anderson, M., Lambrinos, J. & Schroll, E. 2010. The potential value of mosses for stormwater management in urban environments. **Urban ecosystems**, 13(3), 319-332.
- Asakawa, Y. 2007. Biologically active compounds from bryophytes. **Pure and Applied Chemistry**, 79(4), 557-580.
- Asakawa, Y., Ludwiczuk, A. & Hashimoto, T. 2013. Cytotoxic and antiviral compounds from bryophytes and inedible fungi. **Journal of Pre-Clinical and Clinical Research**, 7(2).
- Ashton, N. W. & Raju, M. V. 2001. Development and germination of rhizoidal gemmae of *Bryum violaceum*. **Cryptogamie Bryologie**, 22(1), 3-11.

- Awasthi, V., Nath, V. & Asthana, A. K. 2012a. *In Vitro* Regeneration and Micropropagation of Some Liverworts from Vegetative Ex Plants. **National Academy Science Letters**, **35**(1), 7-12.
- Awasthi, V., Nath, V., Pande, N. & Asthana, A. K. 2012b. Morphogenetic studies and *in vitro* propagation of two mosses: *Philonotis thwaitesii* Mitt. and *Brachythecium plumosum* (Hedw.) BSG. **Taiwania**, **57**(1), 27-36.
- Bhattarai, H. D., Paudel, B., Lee, H. S., Lee, Y. K. & Yim, J. H. 2008. Antioxidant activity of *Sanionia uncinata*, a polar moss species from King George Island, Antarctica. **Phytotherapy research**, **22**(12), 1635-1639.
- Basile, A., Giordano, S. & López-Sáez, J. A. R. Castaldo-Cobianchini. 2003. Effects of seven pure flavonoids from mosses on germination and growth of *Tortula muralis* Hedw. (Bryophyta) and *Raphanus sativus* L. (Magnoliophyta). **Phytochemistry**, **62**, 1145-1151.
- Bates, J. W. 2000. Mineral nutrition, substratum ecology, and pollution. pp. 299-356. *In.*: A. J. Shaw & B. Goffinet (ed). **Bryophyte Biology**. Cambridge University Press. 2 Ed. 535 p.
- Beike, A. K., Horst, N. A. & Rensing, S. A. 2010. Axenic bryophyte *in vitro* cultivation. **Journal of Endocytobiosis and Cell Research**, **102**, 108.
- Beike, A. K., Spagnuolo, V., Lüth, V., Steinhart, F., Ramos-Gomez, J., Krebs, M., Adamo, P., Rey-Asensio, A. I., Fernandez, J. A., Giordano, S., Decker, E. L. & Reski, R. 2014. Clonal *in vitro* propagation of peat mosses (*Sphagnum* L.) as novel green resources for basic and applied research. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, **120**(3), 1037-1049.
- Briófitas *in* Flora do Brasil 2020 em construção. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB128472>>. Acesso em: 27 Mar. 2018.
- Capozzi, F., Adamo, P., Di Palma, A., Aboal, J. R., Bargagli, R., Fernandez, J. A., Lopez Mahia, P., Reski, R., Tretiach, M., Spagnuolo, V. & Giordano, S. 2017. *Sphagnum palustre*

- clone vs native *Pseudoscleropodium purum*: A first trial in the field to validate the future of the moss bag technique. **Environmental Pollution**, **225**, 323-328.
- Costa, D. P. da, Almeida J. S. dos S., Dias, N. dos S., Gradstein, S. R. & Churchil, S. P. 2010. **Manual de Briologia**. Editora Interciência.
- Costa, D. P. & Peralta, D. F. 2015. Bryophytes diversity in Brazil. **Rodriguésia**, **66**(4): 2015
- Cove, D., Bezanilla, M., Harries, P. & Quatrano, R. 2006. Mosses as model systems for the study of metabolism and development. **Annu. Rev. Plant Biol.**, **57**, 497-520.
- Cuming, A. 2009. Mosses as model organisms for developmental, cellular, and molecular biology. pp. 199–236. *In.*: A. J. Shaw & B. Goffinet (ed). **Bryophyte Biology**. Cambridge University Press. 2 Ed. 535 p.
- Cuvertino-Santoni, J. & Montenegro, G. 2013. Bioprospecting a tool to conserve Chilean bryophytes. **Gayana Bot**, **70**, 1.
- Cruz-Cruz, C. A., González-Arno, M. T. & Engelmann, F. 2013. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity. **Resources**, **2**(2), 73-95
- Decker, E. L. & Reski, R. 2004. The moss bioreactor. **Current Opinion in Plant Biology**, **7**(2), 166-170.
- Decker, E. L. & Reski, R. 2007. Moss bioreactors producing improved biopharmaceuticals. **Current Opinion in Biotechnology**, **18**(5), 393-398.
- Decker E. L., Parsons J. & Reski R. 2014. Glyco-engineering for biopharmaceutical production in moss bioreactors. **Front. Plant Sci.** **5**:346.
- Deora, G. S. & Guhil, N. 2015. Phytochemical analysis and antifungal activity of moss *Bryum cellulare* against some phytopathogenic fungi. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, **6**(2), 688.
- Dey, A. & Mukherjee, A. 2015. Therapeutic potential of bryophytes and derived compounds against cancer. **Journal of Acute Disease**, **4**(3), 236-248.

- Duckett, J. G., Burch, J., Fletcher, P. W., Matcham, H. W., Read, D. J., Russell, A. J. & Pressel, S. 2004. *In vitro* cultivation of bryophytes: a review of practicalities, problems, progress and promise. **Journal of Bryology**, **26**(1), 3-20.
- During, H. J. & Van Tooren, B. F. 1987. Recent developments in bryophyte population ecology. **Trends in ecology & evolution**, **2**(4), 89-93.
- Erdağ, B., Bağdatlı, M. N., Kuzu, İ. & Emek, Y. 2015. Early Developmental Stages of *Homalothecium sericeum* (Hew.) Schimp (Brachytheciaceae) under *in vitro* Conditions. **American International Journal of Biology**, **3**(1).
- Fernández, E. G. & Serrano, A. M. V. 2009. Atividade biológica das Briófitas. **Âmbito Cultural Edições**. 190 p.
- Frahm, J. P. 2004. Recent developments of commercial products from bryophytes. **The Bryologist**, **107**(3), 277-283.
- Goffinet B., Buck, W. R. & Shaw, J. A. 2008. Morphology, anatomy and classification of the Bryophyte. pp. 55-138, *In.*: A. J. Shaw & B. Goffinet (ed). **Bryophyte Biology**. Cambridge University Press. 2 Ed. 535 p.
- Goffinet, B., Buck W. R. & Shaw A. J. 2009. Morphology and classification of the Bryophyta. pp. 55-138, *In.*: A. J. Shaw & B. Goffinet (ed). **Bryophyte Biology**. Cambridge University Press. 2 Ed. 535 p.
- González, A. G. & Pokrovsky, O. S. 2014. Metal adsorption on mosses: toward a universal adsorption model. **Journal of colloid and interface science**, **415**, 169-178.
- Goode, J. A., Duckett, J. G. & Stead, A. D. 1992. Protonemal morphogenesis of the moss *Tetraphis pellucida* Hedw. in culture and in the wild. **Annals of botany**, **70**(6), 519-530.
- Glime, J. A. 2007. Economic and Ethnic Uses of Bryophytes. pp. 14–41. *In.*: Flora of North America. Editorial Committee, (eds.) Flora of North American North of Mexico. v. 27, **Bryophytes: Mosses**, part 1. Oxford University Press. New York.
- Glime, J. M. 2017. Bryophyte Ecology. Ebook sponsored by Michigan Technological University and the G-1 International Association of Bryologists.

- Gradstein, S. R., Churchill, S. & Salazar, N. 2001. Guide to the Bryophytes of Tropical America, **Editorial Board**, New York, EEUU, 2-32.
- Gradstein, S. R. & Costa, D. P. 2003. The hepaticae and anthocerotae of Brazil, *In: Memoirs of the New York Botanical Garden* **87**, 1-273
- Hauglian, S. R. & Frego, K. A. 2015. Synthetic logs for controlled culture of epixylic bryophytes: log physical properties, surface moisture, and *Dicranum flagellare* Growth. **Evansia**, **32**(4), 158-170.
- Henes, B., Züllli, F., Niederkrüger, H., Schaaf, A., Frischmuth, T., Decker, E. L. & Reski, R. 2018. The magic of moss. **Soap Perfum Cosmet**, **91**, 64-66.
- Hinrichsen, D. 1981. Peat power: Back to the bogs. **Ambio**, 240-242.
- Hohe, A. & Reski, R. 2002. Optimisation of a bioreactor culture of the moss *Physcomitrella patens* for mass production of protoplasts. **Plant Science**, **163**(1), 69-74.
- Hugonnot, V. & Celle, J. 2012. Asexual reproduction by leaf fragmentation in *Mnium stellare* Hedw. **Journal of Bryology**, **34**(1), 67-70.
- Ignatov, M. S., Spirina, U. N., Maslova, E. V., Ivanov, O. V. & Ignatova, E. A. 2015. On the leaf development in *Oedipodium griffithianum* (Oedipodiopsida, Bryophyta). **Arctoa: Journal of Bryology**, **24**: 431-451.
- Itouga M. & Nakatsuka S. 2012. Sustainable gold adsorbent material. **Gold 2012, the 6th international conference on gold science, technology and its applications**. Pp.100.
- Itouga M., Komatsu Y., Sakakibara H. & Kawakami S. 2013. Moss protonemata for metal recovery. **Resources Processing** **60**: 84-89.
- Jones, P. R. & Rosentreter, R. 2006. Gametophyte fragment growth of three common desert mosses on artificial and natural substrates. **The bryologist**, **109**(2), 166-172.
- Knop, W. 1865. Quantitative Untersuchungen über die Ernährungsprozesse der Pflanze. **Die Landwirtschaftlichen Versuchs-Stationen**, **7**, 93-107.

- La Farge, C., Williams, K. H. & England, J. H. 2013. Regeneration of Little Ice Age bryophytes emerging from a polar glacier with implications of totipotency in extreme environments. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, *110*(24), 9839-9844.
- Liang, S. F., Sun, Y. & Zhu, R. L. 2010. *In vitro* micropropagation of *Bryum argenteum* Hedw. **Cryptogamie. Bryologie**, *31*(3), 233-239.
- Ligrone, R., Duckett, J. G. & Gambardella, R. 1996. Development and liberation of cauline gemmae in the moss *Aulacomnium androgynum* (Hedw.) Schwaegr. (Bryales): an ultrastructural study. **Annals of botany**, *78*(5), 559-568.
- Löbel, S. & Rydin, H. 2010. Trade-offs and habitat constraints in the establishment of epiphytic bryophytes. **Functional ecology**, *24*(4), 887-897.
- Lopez, P. A., Rojano, B. A. & Echeverri, T. L. 2007. Actividad antioxidante en musgos. **Scientia Et Technica**, *1*(33).
- Luizi-Ponzo, A. P. (coord.), Bastos, C. J. P., Costa, D. P., Pôrto, K. C., Câmara, P. E. A. S., Lisboa, R. C. L. & Villas Bôas-Bastos, S. 2006. **Glossarium Polyglottum Bryologiae: Versão Brasileira do Glossário Briológico**. Ed. UFJF. 114 p
- Marko, S., Aneta, B. & Dragoljub, G. 2001. Bryophytes as a potential source of medicinal compounds. **Pregledniclanak-Review**, *21*, 17-29.
- Martins, R. & Boaventura, R. 2004. Briófitas aquáticas como bioindicadores da poluição de águas superficiais por metais pesados. *XI SILUBESA-Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*.
- Michelfelder, S., Parsons, J., Bohlender, L. L., Hoernstein, S. N., Niederkrüger, H., Busch, A., ... & Frischmuth, T. 2017. Moss-produced, glycosylation-optimized human factor H for therapeutic application in complement disorders. **Journal of the American Society of Nephrology**, *28*(5), 1462-1474.
- Miles, C. J. & Longton, R. E. 1990. The role of spores in reproduction in mosses. **Botanical Journal of the Linnean Society**, *104*(1-3), 149-173.

- Mishra, R., Pandey, V. K. & Chandra, R. 2014. Potential of bryophytes as therapeutics. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, *5*(9), 3584-3593.
- Morantes, J., Prieto, C., Linares, E., Rincón, J. & Aristizábal, F. 2007. Análisis y fitoquímico de actividad biológica del musgo *Polytrichum juniperinum*. **Rev Acad Colomb Cienc Exact Fís Nat**, *31*, 473-479.
- Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia plantarum**, *15*, 473-497.
- Pressel, S., Ligrone, R. & Duckett, J. G. 2008. Cellular differentiation in moss protonemata: a morphological and experimental study. **Annals of botany**, *102*(2), 227-245.
- Radu, D. M., Trautz, D. & Cantor, M. 2015. Moss: Decorative and Ecological Potential in Landscape. **ProEnvironment/ProMediu**, *8*(21).
- Reski, R. 1998. Development, genetics and molecular biology of mosses. **Botanica Acta**, *111*(1), 1-15.
- Reski, R., Bae, H. & Simonsen, H. T. 2018. *Physcomitrella patens*, a versatile synthetic biology chassis. **Plant Cell Reports**, 1-9.
- Reski, R., Parsons, J. & Decker, E. L. 2015. Moss-made pharmaceuticals: from bench to bedside. **Plant biotechnology journal**. *13*(8), 1191-1198.
- Rowntree, J. K., Duckett, J. G., Mortimer, C. L., Ramsay, M. M. & Pressel, S. 2007. Formation of specialized propagules resistant to desiccation and cryopreservation in the threatened moss *Ditrichum plumbicola* (Ditrichales, Bryopsida). **Annals of botany**, *100*(3), 483-496.
- Sabovljević, A., Soković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Vujičić, M., Pejin, B. & Sabovljević, M. 2010. Comparison of extract bio-activities of *in-situ* and *in vitro* grown selected bryophyte species. **African Journal of Microbiology Research**, *4*(9), 808-812.
- Sabovljević, M. S., Papp, B., Sabovljević, A., Vujičić, M., Szurdoki, E. & Segarra-Moragues, J. G. 2012. *In vitro* micropropagation of rare and endangered moss *Entosthodon hungaricus* (Funariaceae) **Bioscience Journal**, *28*(4).

- Sabovljević, M., Vujičić, M. & Sabovljević, A. 2014. Plant growth regulators in bryophytes. **Botanica Serbica**, **38**(1), 99-107.
- Saxena, D. K. & Harinder. 2004. Uses of bryophytes. **Resonance**, **9**(6), 56-65.
- Sawant, U. J. 2014. Review of bryophytes with special reference to eco-physiological studies, mineral elements, allelopathy and uses. **Indian Journal of Advances in Plant Research (IJAPR)**, **1**(1) 10-23.
- Schneider, M. J., Voth, P. D. & Troxler, R. F. 1967. Methods of propagating bryophyte plants, tissues, and propagules. **Botanical Gazette**, 169-174.
- Schnepf, E., Hrdina, B. & Lehne, A. 1982. Spore germination, development of the microtubule system and protonema cell morphogenesis in the Moss, *Funaria hygrometrica* effects of Inhibitors and of Growth Substances. **Biochemie und Physiologie der Pflanzen**, **177**(6), 461-482.
- Schumaker, K. S. & Dietrich, M. A. 1998. Hormone-induced signaling during moss development. **Annual review of plant biology**, **49**(1), 501-523.
- Segreto, R., Hassel, K., Bardal, R. & Stenøien, H. K. 2010. Desiccation tolerance and natural cold acclimation allow cryopreservation of bryophytes without pretreatment or use of cryoprotectants. **The Bryologist**, **113**(4), 760-769.
- Sharma, A., Bargali, K. & Pande, N. 2009. The allelopathic potential of bryophyte extract on seed germination and seedling growth of *Bidens biternata*. **Nature Sci**, **7**, 30-38.
- Shaw, A. J. 2009. Bryophyte species and speciation. **Bryophyte Biology**. Cambridge University Press.
- Shaw, A. J. & B. Goffinet (ed) 2009. **Bryophyte Biology**. Cambridge University Press. 2 Ed. 535 p.
- Silva, L. T. & Silva, A.G. 2013. Sistemas de reprodução em Briófitas: pequenas plantas com grande sucesso reprodutivo. **Natureza on line**, **11**(4), 155-160.
- Stark, L. R., Greenwood, J. L. & Brinda, J. C. 2017. Desiccated *Syntrichia ruralis* shoots regenerate after 20 years in the herbarium. **Journal of Bryology**, **39**(1), 85-93.

- Studlar, S. M. & Peck, J. E. 2009. Extensive green roofs and mosses: reflections from a pilot study in Terra Alta, West Virginia. **Evansia**, **26**(2), 52-63.
- Tacoronte, B.M., León, Y., Olivo, A. & Vielma, M. 2009. Crecimiento *in vitro* de musgos del bosque nublado andino de Venezuela. **Revista Forestal Latino americana**, **24**(2), 69-89.
- Teixeira, J. B. & Cid, L. P. B. 2010. Biorreatores para produção de mudas em larga escala. pp. 157- 176. *In*: Cid, L. P. B., Ed. Técnico. 2010. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Embrapa informações tecnológicas. Brasília, DF, 303 p.
- Tuba, Z., Slack, N.G., Stark, L.R. 2011. Bryophyte Ecology and Climate Change. **Cambridge University Press**.
- Vanderpoorten, A. & Hallingbäck, T. 2009. Conservation biology of bryophytes. pp. 487-534, *In*: A. J. Shaw & B. Goffinet (ed). **Bryophyte Biology**. Cambridge University Press. 2 Ed. 535 p.
- Viraraghavan, T. & Mathavan, G. N. 1988. Treatment of oil-in-water emulsions using peat. **Oil and Chemical Pollution**, **4**(4), 261-280.
- Vujičić, M., Sabovljević, A. & Sabovljević, M. 2011. Axenically culturing the bryophytes: Establishment and propagation of the moss *Hypnum cupressiforme* Hedw. (Bryophyta, Hypnaceae) in *in vitro* conditions. **Botanica Serbica**, **35**, 71-77.
- Wood, A. J., Oliver, M. J. & Cove, D. J. 2000. Bryophytes as model systems. **The Bryologist**, **103**(1), 128-133.
- Zimmer, A. D., Lang, D., Buchta, K., Rombauts, S., Nishiyama, T., Hasebe, M., Peer, Y. V., Rensing, S. A. & Reski, R. 2013. Reannotation and extended community resources for the genome of the non-seed plant *Physcomitrella patens* provide insights into the evolution of plant gene structures and functions. **BMC Genomics**, **14**(1), 498.
- Zinsmeister, H. D., Becker, H. & Eicher, T. 1991. Bryophytes, a source of biologically active, naturally occurring material? **Angewandte Chemie International Edition in English**, **30**(2), 130-147.

CAPÍTULO I

Estabelecimento indireto aumenta as chances de propagação *in vitro* de musgos do Cerrado – Um novo método

Resumo

A brioflora do Cerrado é composta por 478 espécies catalogadas, o que representa cerca de 31% de todas as briófitas brasileiras conhecidas. O uso de técnicas de micropropagação é crucial para a conservação de espécies de musgo ameaçadas e para o reestabelecimento da natureza. Este estudo teve como objetivo estabelecer culturas *in vitro* de fragmentos de gametófitos de dez espécies de musgos do Cerrado. Após a desinfestação com álcool e solução de hipoclorito de sódio, explantes de musgo foram cultivados em placas de Petri contendo meio Knop. As espécies *Bryum argenteum*, *B. coronatum*, *Isopterygium tenerifolium*, *Leucobryum crispum*, *Pogonatum pensilvanicum* e *Vitalia cuspidifera* foram sucessivamente estabelecidas com taxa de eficiência variando de 1 a 31,2%. No entanto, não foram obtidas culturas assépticas para as espécies *Barbula indica*, *Bryum densifolium*, *Fissidens flaccidus* e *Sphagnum platyphylloides*. Mesmo assim, alguns explantes contaminados dessas espécies foram capazes de se desenvolverem e crescerem. Assim, todas as dez espécies foram submetidas as técnicas de resgate para estabelecer culturas em condições assépticas, a partir de explantes parcialmente contaminados (estabelecimento indireto). Consequentemente, o estabelecimento indireto resultou em maiores porcentagens de desenvolvimento de explantes, o que aumentou o estabelecimento de culturas *in vitro* para a maioria das espécies testadas. Este fato é especialmente importante para fins de conservação, principalmente para espécies cujo material é sensível ou escasso. Portanto, o estabelecimento indireto como nova metodologia de cultivo *in vitro* foi uma forma viável de propagação das espécies de briófitas listadas nesta pesquisa.

Palavras chaves: briófitas, conservação, cultivo, gametófito, resgate.

Indirect establishment increases the chances of *in vitro* propagation of Cerrado mosses – A new method

Abstract

The bryoflora of the Cerrado is composed of 478 catalogued species, which is about 31% of all known Brazilian bryophytes. The use of micropropagation techniques is crucial for the conservation of endangered moss species and for the reestablishment in nature. This study aimed to establish *in vitro* cultures of gametophyte fragments of ten species of Cerrado mosses. After disinfestation with alcohol and commercial bleach, moss explants were grown in Petri dishes containing Knop medium. The species *Bryum argenteum*, *B. coronatum*, *Isopterygium tenerifolium*, *Leucobryum crispum*, *Pogonatum pensilvanicum* and *Vitalia cuspidifera* were successively established with efficiency rate ranging from 1 to 31.2%. However, no aseptic cultures were obtained for the species *Barbula indica*, *Bryum densifolium*, *Fissidens flaccidus* and *Sphagnum platyphylloides*. Even though, a few contaminated explants of these species were able to develop and grow. Thus, all ten species were submitted to rescue techniques to establish cultures in aseptic conditions, from partially contaminated explants (indirect establishment). Consequently, the indirect establishment resulted in higher percentages of explant development, which enhanced the establishment of *in vitro* cultures for the species tested. This fact is especially important for conservation purposes, mainly for species whose material is sensitive or scarce. Therefore, indirect establishment as an *in vitro* culture methodology was a viable form of propagating the bryophyte species listed in this research.

Keywords: bryophytes, conservation, cultivation, gametophyte, rescue.

1. Introdução

A brioflora do Brasil compreende 1.524 espécies (11 antóceros, 633 hepáticas e 880 musgos), onde o Cerrado representa uma diversidade de 478 espécies, com 63 sendo classificadas como briófitas endêmicas (Costa & Peralta, 2015). Este domínio fitogeográfico é considerado um *hotspot* para a conservação, não só pela sua riqueza, mas também pela sua vulnerabilidade à pressão antrópica (Myers, 2000). O Cerrado está severamente ameaçado devido à agropecuária, a urbanização e ao turismo desordenado, o que impacta negativamente sobre as briófitas (Söderström, 2006). Assim, muitas briófitas nativas se encontram ameaçadas de extinção e a identificação dessas espécies é crucial para preservação. Contudo, o aperfeiçoamento e a implementação de ações estratégicas que visem garantir a subsistência dessas espécies a longo prazo também é de suma importância para a biologia da conservação (Söderström, 2006; Costa *et al.*, 2016).

É importante registrar que as briófitas (musgos, hepáticas e antóceros) representem o segundo maior grupo de plantas, com cerca de 18 mil espécies (Goffinet & Shaw, 2009). Além disso, essas plantas têm demonstrado grande potencial comercial, como o paisagismo (Frahm, 2004; Anderson, 2010), ecológico (Bates, 2000; Martins & Boaventura 2004; Tuba *et al.*, 2011) e biotecnológico (Reski, 1998; Decker & Reski, 2004; Cuvertino-Santoni & Montenegro, 2013). Não obstante, as briófitas têm sido negligenciadas em iniciativas de conservação por serem consideradas plantas de pouca importância e de difícil identificação (Goffinet *et al.*, 2009; Glime, 2017).

Algumas técnicas de conservação têm sido usadas em briófitas. A conservação *in situ* é a mais comum, mesmo sem comprovação de que seja a mais eficiente, em se tratando de conservação de briófitas (Söderström, 2006). Entretanto, a conservação *ex situ*, por meio de culturas axênicas, pode ser aplicada com sucesso para a conservação a longo prazo, bem como para estudos celulares, genéticos, moleculares, morfogênicos, ecológicos, micropropagação, criopreservação e reintrodução (Duckett *et al.*, 2004). Por exemplo, Ros *et al.* (2013) testaram o cultivo *in vitro* para quatro espécies de musgos tolerantes à dessecação com subsequente criopreservação, resultando em ótima taxa de sobrevivência.

É fato que o uso de técnicas de cultura de tecidos em musgos não é novidade. Existem diversos estudos que mostram a eficiência dessas técnicas principalmente na área da conservação de espécies raras e ameaçadas de extinção (Reski, 1998; Duckett *et al.*, 2004). Além disso, a cultura de tecidos também tem sido aplicada no desenvolvimento de métodos mais eficientes de propagação para exploração comercial e industrial dessas plantas (Duckett *et al.*, 2004; Cuvertino-Santoni & Montenegro, 2013). Como exemplo, pode-se citar o cultivo em larga escala de *Sphagnum palustre* em biorreatores, para a produção padronizada e sustentável de material para o biomonitoramento da

qualidade do ar (Beike *et al.*, 2014), com o uso da técnica denominada de “Moss Bag” (Capozzi *et al.*, 2016). Essa técnica tem sido aplicada com eficiência comparável em outras espécies do gênero *Sphagnum* L. e na espécie *Hypnum cupressiforme* Hedw. (Ares *et al.*, 2012), *Pseudoscleropodium purum* (Hedw.) Fleisch. (Capozzi *et al.*, 2017) e *Sphagnum Junghuhnianum* Dozy & Molk. (Hu *et al.*, 2018). Adicionalmente, Liang *et al.* (2010) descreveram o desenvolvimento de procedimentos de micropropagação para *Bryum argenteum* com intuito de melhorar a produção e a aplicação comercial na ecologização de ambientes.

O cultivo *in vitro* de briófitas apresenta como vantagem a possibilidade de se iniciar culturas a partir de estruturas sexuais (esporos) ou estruturas vegetativas (fragmentos do gametófito e gemas) (Duckett *et al.*, 2004). Esse fato é de particular importância para aquelas espécies que não são oportunamente encontradas férteis (Longton & Miles, 1982; Löbel & Rydin, 2010). Além disso, a produção *in vitro* de propágulos assexuados, sob tratamentos específicos, pode promover a formação de propágulos de repouso especializados e capazes de resistir a condições ambientais extremas, como o stress da dessecação (Pressel *et al.*, 2007; Rowntree *et al.*, 2007).

Para o estabelecimento de culturas axênicas de briófitas, enquanto os esporófitos são mais facilmente desinfestados (Sabovljević *et al.*, 2003), a desinfestação do gametófito ou parte dele é uma fase bastante limitante, pela fragilidade dos tecidos constitutivos e pela simbiose com microrganismos diversos (Duckett *et al.*, 2004). Contudo, uma vez obtido o estabelecimento *in vitro* da espécie, fase considerada a mais problemática em muitas briófitas, o cultivo dessas plantas segue relativamente fácil (Rowntree *et al.*, 2011). A disponibilidade de material gametofítico de espécies ameaçadas em quantidades suficientes para iniciar a cultura *in vitro*, quando esporos não estão disponíveis, também é um fator limitante para o estabelecimento, visto que os protocolos para o cultivo *in vitro* são, muitas vezes, específicos para cada espécie (Sarasan *et al.*, 2006; Tacoronte *et al.*, 2009).

Além disso, trabalhos que visam o cultivo de plantas não ameaçadas de extinção, também são importantes para aplicações na conservação de espécies de ocorrência rara (Sarasan *et al.*, 2006). Assim, os protocolos a serem usados para o estabelecimento de culturas *in vitro*, visando a conservação *ex situ*, precisam ser aplicáveis a diferentes espécies e que apresentem maior taxa de sucesso para briófitas com material limitado (Rowntree *et al.*, 2006). Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi estabelecer culturas *in vitro*, iniciadas de fragmentos dos gametófitos de dez espécies de musgos do cerrado.

2. Material e métodos

2.1. Coleta e preparação do material vegetal

As plantas com parte do substrato, foram coletadas em áreas de vegetação do Cerrado e no perímetro urbano de Brasília – DF, Brasil, entre os anos de 2015 e 2017 e acondicionadas em sacos de papel, de acordo com Yano (1984). Foram utilizadas 10 espécies de musgos: *Barbula indica* (Hook.) Spreng., *Bryum argenteum* Hedw., *Bryum coronatum* Schwägr., *Bryum densifolium* Brid., *Fissidens flaccidus* Mitt., *Isopterygium tenerifolium* Mitt., *Leucobryum crispum* Müll. Hal., *Vitalia cuspidifera* (Mitt.) P.E.A.S. Câmara, Carv.-Silva & W.R. Buck, *Sphagnum platyphylloides* Warnst., *Pogonatum pensilvanicum* (Bartram ex Hedw.) P. Beauv., os quais os vouchers estão depositados no Herbário UB sob os números *Pereira, C.G. 503; 499/587; 501; Silva, C.F.S. 31B; Pereira, C.G. 501; 509; 583; 560; 541 e 526*, respectivamente.

A identificação das espécies foi realizada no laboratório de criptógamas da Universidade de Brasília – UnB. Gametófitos de cada espécie foram separados e lavados em água corrente por 2 min. e em água estéril por mais 2 min. Preferencialmente, foram utilizados os fragmentos mais jovens dos gametófitos, tais como, ápices, filídios, partes de caulídios e novos brotos.

Para *Barbula indica*, *Bryum argenteum* e *Pogonatum pensilvanicum*, em função de suas peculiaridades, foram realizados pré-cultivos, visando a produção de gametófitos aptos à desinfestação superficial. O procedimento de pré-cultivo consistiu no cultivo, em condições não assépticas, de uma porção de cada amostra, com parte do substrato em potes transparentes com capacidade para 250 mL, contendo substrato comercial (Bioplant® plus, Nova Ponte, Brasil) ou vermiculita, ambos autoclavados e hidratados com água estéril. Em seguida, os potes foram fechados e mantido em local com luz e temperatura ambientes (cerca de 25 °C) até o desenvolvimento de gametófitos. A hidratação foi realizada a cada 30 dias, intervalo em que o crescimento dos gametófitos foi avaliado. Após o período de cultivo (variável para cada espécie), os gametófitos com 0,5 a 1 cm foram coletados e submetidos à desinfestação com solução de hipoclorito de sódio (alvejante comercial com 2% de cloro ativo, NaClO) e a posterior inoculação.

2.2. Meio e condições de cultivo

A inoculação dos explantes, assim como os subcultivos, foram realizados em meio Knop (Knop, 1865), com modificações, preparado com: 0,8 g/L de nitrato de cálcio [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$]; 0,2 g/L de nitrato de potássio (KNO_3); 0,2 g/L de fosfato monopotássico (KH_2PO_4) e 0,2 g/L de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e água ultra pura. A solidificação das soluções foi realizada com a adição de 7,5 g/L de ágar, após a diluição e o ajuste do pH para $5,7 \pm 0,1$. Os meios foram autoclavados a 121 °C e 1,3 atm por 20 min. Aproximadamente 15 mL de meio foram vertidos em

placas de Petri (90 x 15 mm).

Os explantes foram previamente desinfestados em álcool a 70%, por 5 segundos e em solução de hipoclorito de sódio (alvejante comercial com 2% de cloro ativo, NaClO), em três tratamentos: 1% por 5 min, 1% por 10 min e 2% por 2 min (1%-5', 1%-10' e 2%-2'), com 3 enxagues em água estéril para cada tratamento. Os tratamentos de desinfestação foram aplicados às espécies conforme a disponibilidade e a sensibilidade do material coletado. Para as espécies com maior disponibilidade de material, foram realizados os três tratamentos, enquanto que para as espécies coletadas em menor quantidade, foi realizado apenas um dos tratamentos. Foram inoculados 8 explantes por placa. O número de explantes inoculados foi definido de acordo com a quantidade e a qualidade do material obtido nas coletas. O total de explantes, assim como os tratamentos realizados em cada espécie estão descritos na Tabela 1.

Posteriormente à inoculação, todas as placas foram vedadas com plástico filme de PVC e mantidas em sala de crescimento, com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de aproximadamente $41 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Os explantes foram avaliados no 5º e no 10º dia de cultivo após a inoculação, onde foram classificados como: desenvolvidos sem contaminação e desenvolvidos com contaminação. Foram considerados desenvolvidos os explantes que apresentaram crescimento apical, brotamento ou crescimento de protonemas. Os explantes que não apresentaram desenvolvimento em 10 dias de cultivo foram desconsiderados.

Na primeira avaliação (5º dia de cultivo), todos os explantes que apresentaram algum desenvolvimento, tanto os explantes descontaminados quanto os contaminados foram transferidos para novas placas (placas de subcultivo). As placas de inoculação foram novamente vedadas e cultivadas por mais 5 dias. Na segunda avaliação (10º dia de cultivo), os explantes que apresentaram desenvolvimento foram transferidos para placas de subcultivo e os demais foram descartados.

Considerou-se o estabelecimento *in vitro* quando, após a desinfestação, pelo menos um explante tenha se desenvolvido, sem a presença visível de microrganismos. As subculturas foram baseadas em explantes desenvolvidos que após um período de cultivo, cresceram sem sinais de contaminação, formando colônias aptas para propagação em subcultivos subsequentes.

Considerou-se o estabelecimento das culturas *in vitro* quando, após a desinfestação, pelo menos um explante havia sido desenvolvido sem a presença visível de microrganismos. As subculturas foram baseadas em explantes desenvolvidos, sem sinais de contaminação e formando colônias adequadas para propagação em subculturas subsequentes.

3. Resultados e discussão

A figura 1 mostra a eficiência dos tratamentos de desinfestação com solução de hipoclorito, variando de 1% a 19% no tratamento com NaClO a 1% por 5 min; de 2,5% a 9% no tratamento com NaClO a 1% por 10 min e de 3,5% a 31,2% no tratamento com NaClO a 2% por 2 min. O uso de hipoclorito na desinfestação de fragmentos de gametófitos de briófitas mostrou variar de acordo com a espécie e com outros parâmetros (Sabovljević *et al.*, 2003). Isso é consistente com os resultados obtidos nesta investigação. Note que quase 50% das espécies testadas não foram desinfestadas com sucesso utilizando baixas concentrações de hipoclorito (Fig. 1). Liang *et al.* (2010) observaram que a eficiência da esterilização está diretamente relacionada à concentração e ao tempo de imersão dos explantes nas soluções desinfectantes, como demonstrado em *Bryum argenteum*, cuja a maior eficiência de desinfestação foi observada com a utilização de concentrações mais altas de NaClO (5%). No presente estudo, de maneira geral, os explantes tratados com maior concentração de NaClO (2%) tiveram melhores índices de desinfestação (Tabela 1), com cinco das seis espécies testadas estabelecidas (80%), representando uma média percentual de 7,7% do total de explantes desenvolvidos (Tabela 2). A única exceção foi *Bryum densifolium* que não apresentou descontaminação com NaClO (2%) (Tabela 1). Além disso, o maior percentual de descontaminação foi observado com *Isopterygium tenerifolium*, que teve 19% de explantes desenvolvidos sem contaminação aparente no tratamento com NaClO (1%) por 5 min (Tabela 1).

Adicionalmente, Sabovljević *et al.* (2002) observaram que a eficiência da desinfestação depende da morfologia do gametófito de cada espécie, como também da posição e da densidade dos filídios. Algumas dessas características morfológicas também puderam ser verificadas como limitantes para a desinfestação, como em *Barbula indica* que apresentam filídios muito próximos, encurvados quando secos e frequentemente com a presença de gemas nas axilas (Sharp *et al.*, 1994); em *Bryum argenteum* com filídios ovalados, de base côncava e estreitamente unido e sobreposto ao caulídio, o que, normalmente, interferiu negativamente na desinfestação (Sharp *et al.*, 1994); em *Fissidens flaccidus* de filídios com laminas vaginantes e em *Sphagnum platyphylloides* que apresentam células vazias que contém pequenas aberturas (leucocistos) (Costa *et al.*, 2010). Esses aspectos morfológicos, juntamente com o fato de as espécies terem sido coletadas diretamente do solo, do pavimento cimentado e das rochas, também contribuíram para dificultar o procedimento de desinfestação, uma vez que não foi possível remover totalmente esses substratos agregados às amostras.

Em seis das 10 espécies estudadas, foi observado o estabelecimento direto a partir do 1º subcultivo: *B. argenteum*, *B. coronatum*, *I. tenerifolium*, *L. crispum*, *P. pensilvanicum* e *V.*

cuspidifera. O percentual de explantes estabelecidos nestas condições variou entre as espécies e entre os tratamentos. Contudo, de forma geral, a desinfestação com NaClO a 2% por 2 min foi mais efetiva em relação ao número de espécies estabelecidas, (cinco) (Fig. 1). A metodologia utilizada para a obtenção do estabelecimento do cultivo *in vitro*, aqui denominado de estabelecimento direto é demonstrado na figura 2 (A, B e C).

As demais espécies: *Barbula indica*, *Bryum densifolium*, *Fissidens flaccidus* e *Sphagnum platyphylloides* não apresentaram desenvolvimento sem contaminação (Tabela 1). Entretanto, apesar da contaminação, observou-se que alguns explantes haviam se desenvolvido, cuja eficiência foi de 3,1% (*F. flaccidus*) a 28,4% (*S. platyphylloides*). Ademais, é importante salientar que, em todas as dez espécies estudadas, ocorreu o desenvolvimento de explantes contaminados. Comparado com explantes não contaminados, o desenvolvimento de explantes contaminados foi bastante variável. No entanto, explantes contaminados tiveram taxas de desenvolvimento mais elevadas do que os não contaminados quando o tratamento desinfetante foi com NaClO a 1 % por 10 min (1,5 a

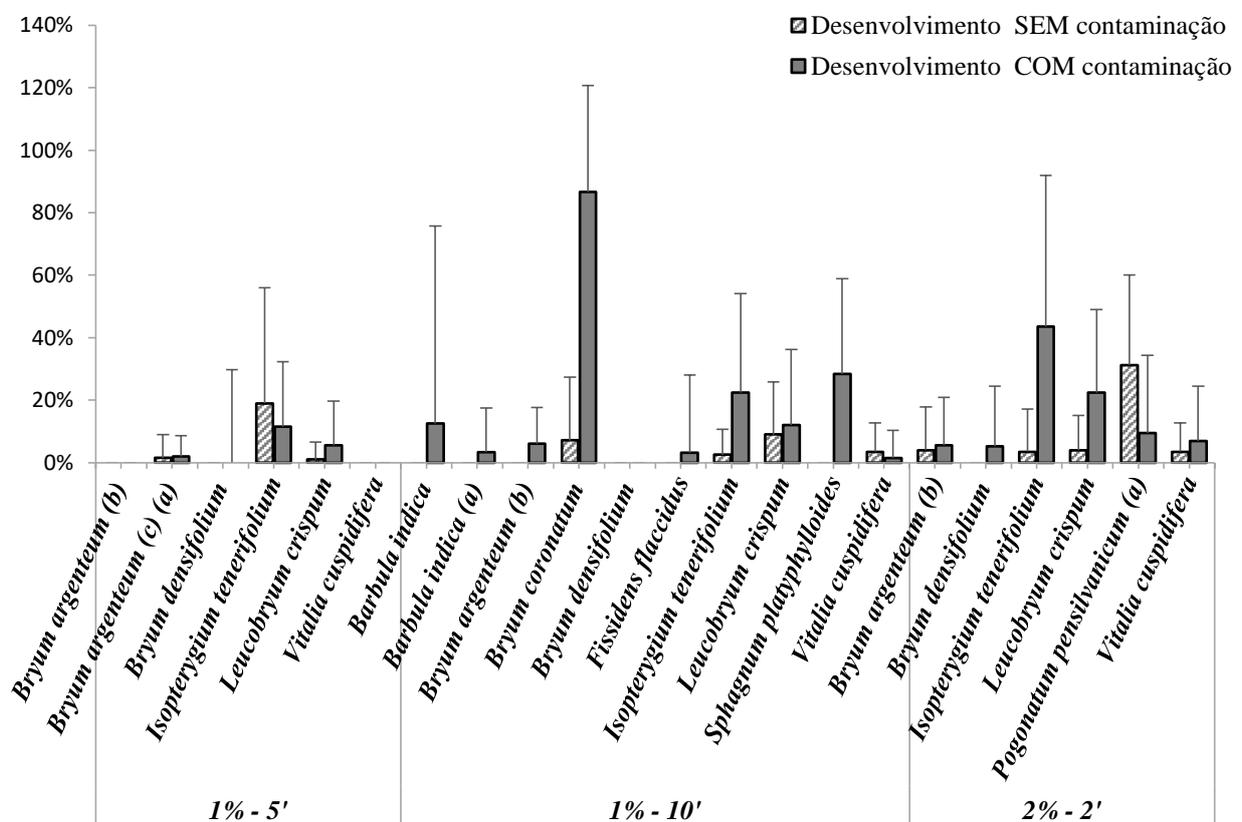


Figura 1: Porcentagens de desenvolvimento de explantes de dez musgos do Cerrado, desinfestados com solução de hipoclorito de sódio (NaClO), em três tratamentos: concentração de 1% por 5 min (1%-5'), 1% por 10 min (1%-10'), e 2% por 2 min (2%-2'), cultivados *in vitro* por 10 dias. As barras representam o erro padrão. (a) amostra pré-cultivada; (b) espécie coletada em 2015 e (c) espécie coletada em 2017.

86,7%) e com NaClO a 2% por 2 min (5,2 a 43,5%). Diferentemente, o tratamento com NaClO a 1% por 5 min mostrou menor taxa de desenvolvimento de explantes contaminados (2 a 14,6%) do que aqueles sem contaminação (19%). Além disso, o desenvolvimento de explantes não contaminados e contaminados em culturas de *S. platyphylloides*, *I. tenerifolium* e *Bryum coronatum* foi de 0 e 28,4%, 3,5% e 43,5% e 7,1% e 86,7%, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1: Porcentagem de explantes de dez espécies de musgos desenvolvidos com e sem contaminação após desinfestação com solução de hipoclorito de sódio (alvejante comercial com 2% de cloro ativo, NaClO), em três tratamentos: concentração de 1% por 5 min (1%-5'), 1% por 10 min (1%-10'), e 2% por 2 min (2%-2'), cultivados *in vitro* por 10 dias, em meio Knop.

| Espécies | Número de Explantes | Tratamento NaClO-tempo | Explantes Desenvolvidos SEM contaminação | Explantes Desenvolvidos COM contaminação |
|---|---------------------|------------------------|--|--|
| <i>Barbula indica</i> | 40 | 1%-10' | 0 | 5 (12,5%) |
| <i>Barbula indica</i> ^a | 88 | 1%-10' | 0 | 3 (3,4%) |
| <i>Bryum argenteum</i> ^b | 200 | 1%-5' | 0 | 0 |
| | 200 | 1%-10' | 0 | 12 (6%) |
| | 200 | 2%-2' | 8 (4%) | 11 (5,5%) |
| <i>Bryum argenteum</i> ^{c, a} | 200 | 1%-5' | 3 (1,5%) | 4 (2%) |
| <i>Bryum coronatum</i> | 56 | 1%-10' | 4 (7,1%) | 48 (86,7%) |
| | 96 | 1%-5' | 0 | 14 (14,6%) |
| <i>Bryum densifolium</i> | 96 | 1%-10' | 0 | 0 |
| | 96 | 2%-2' | 0 | 5 (5,2%) |
| | 32 | 1%-10' | 0 | 1 (3,1%) |
| <i>Fissidens flaccidus</i> | 200 | 1%-5' | 38 (19%) | 23 (11,5%) |
| | 200 | 1%-10' | 5 (2,5%) | 45 (22,5%) |
| | 200 | 2%-2' | 7 (3,5%) | 87 (43,5%) |
| <i>Isopterygium tenerifolium</i> | 200 | 1%-5' | 2 (1%) | 11 (5,5%) |
| | 200 | 1%-10' | 18 (9%) | 24 (12%) |
| | 200 | 2%-2' | 8 (4%) | 45 (22,5%) |
| <i>Leucobryum crispum</i> | 32 | 2%-2' | 10 (31,2%) | 3 (9,4%) |
| | 88 | 1%-10' | 0 | 25 (28,4%) |
| | 200 | 1%-5' | 0 | 0 |
| <i>Pogonatum pensilvanicum</i> ^a | 200 | 1%-10' | 8 (4%) | 3 (1,5%) |
| | 200 | 2%-2' | 7 (3,5%) | 14 (7%) |
| | 200 | 2%-2' | 7 (3,5%) | 14 (7%) |
| <i>Sphagnum platyphylloides</i> | 88 | 1%-10' | 0 | 25 (28,4%) |
| <i>Vitalia cuspidifera</i> | 200 | 1%-5' | 0 | 0 |
| | 200 | 1%-10' | 8 (4%) | 3 (1,5%) |
| | 200 | 2%-2' | 7 (3,5%) | 14 (7%) |

^a Amostra pré-cultivada.

^b Espécie coletada em 2015.

^c Espécie coletada em 2017.

Tabela 2: Relação de espécies de musgos desenvolvidos com ou sem contaminação após tratamentos de desinfestação (solução de hipoclorito de sódio x tempo de exposição) e cultivados *in vitro* por 10 dias, em meio Knop.

| | Tratamento | Número de Espécies | Número de Espécies Desenvolvidas | Média Percentual de Explantos Desenvolvidos |
|---|------------|--------------------|----------------------------------|---|
| Desenvolvimento SEM contaminação | 1%-5' | 6 | 3 (50%) | 3,6% |
| | 1%-10' | 10 | 4 (40%) | 2,4% |
| | 2%-2' | 6 | 5 (80%) | 7,7% |
| Desenvolvimento COM contaminação | 1%-5' | 6 | 3 (50%) | 5,6% |
| | 1%-10' | 10 | 9 (90%) | 1,7% |
| | 2%-2' | 6 | 6 (100%) | 15,5% |

Embora a maioria das espécies trabalhadas sejam consideradas de ampla ocorrência no Brasil, todas foram submetidas às técnicas de resgate de explantes desenvolvidos com contaminação, com a finalidade de recuperar e estabelecer o cultivo *in vitro* de pelo menos um explante em condições assépticas, dado que, segundo Rowntree *et al.* (2011), explantes cultivados nestas condições e em desenvolvimento, podem ser propagados em subcultivos subsequentes. A técnica de resgate foi inicialmente introduzida, embora não tenha sido oportunamente explanada, por Rowntree *et al.* (2006), no qual eles descreveram o resgate de material vegetal de culturas parcialmente contaminados, utilizando Dicloroisocianurato de sódio (NaDCC) e PPMTM (Plant Cell Technology, Inc., Washington, EUA) como agentes esterilizantes, aumentando a taxa de sucesso de 28% para 52% no estabelecimento *in vitro* de plantas raras. Entretanto, um método similar, testado em outras plantas, como em *Thamnobryum alopecurum* e *Hypnum cupressiforme*, não apresentou sucesso (Vujičić *et al.*, 2011; Sabovljević *et al.*, 2012).

O protocolo para as técnicas de resgate foi esquematizado na figura 2 (A, D-G e C), o qual foi denominado de estabelecimento indireto, visto que não segue o caminho habitual para o estabelecimento *in vitro* de briófitas para a obtenção de culturas em condições assépticas. Dessa forma, o estabelecimento indireto consistiu no emprego de técnicas de resgate dos explantes desenvolvidos que, após passarem pela desinfestação, não descontaminaram adequadamente, permanecendo parcialmente contaminados. Esse procedimento foi constituído de sucessivos subcultivos dos explantes desenvolvidos com contaminação, onde nos 2 primeiros subcultivos, de 5 a 10 dias cada, os explantes foram transferidos integralmente para novas placas e nos demais subcultivos, de 30 a 40 dias cada, parte dos explantes desenvolvidos, já na forma de colônias, foram transferidos visando retirar o material mais limpo possível, ou seja, sem contaminação visível. Após cada transferência e os subsequentes subcultivos, a presença de contaminação foi minimizada, proporcionando a assepsia gradual das culturas até o estabelecimento do cultivo *in vitro* da espécie.

A figura 3 mostra o estabelecimento indireto de culturas de *Bryum argenteum* e de

Isopterygium tenerifolium. Essas espécies foram submetidas ao tratamento de desinfestação, o que não resultou em descontaminação adequada. Entretanto, apesar da contaminação parcial, os explantes mostraram capacidade de desenvolvimento e crescimento (Fig. 3A-F e I-J). Assim, as técnicas de resgate foram aplicadas, e após sucessivos subcultivos, protonemas (Fig. 3C e D), gametófitos jovens (Fig. 3E) ou ramos de gametófitos alongados (Fig. 3I), que cresceram sem contaminação visível foram separados e cuidadosamente transferidos para novas placas (Fig. 3G e K) e subcultivadas até que não houvesse contaminação (Fig. 3H e L).

O tempo e os números de subcultivos necessários para a obtenção do estabelecimento indireto variou entre as espécies, assim como também entre outros fatores, como o ambiente, o hábito de crescimento e o tipo de amostra, não sendo verificada relação paramétrica entre os fatores de crescimento naturais e as respostas observadas em condições de cultivo *in vitro* (Tabela 3).

Barbula indica, *Bryum argenteum* e *P. pensilvanicum* foram submetidas ao procedimento

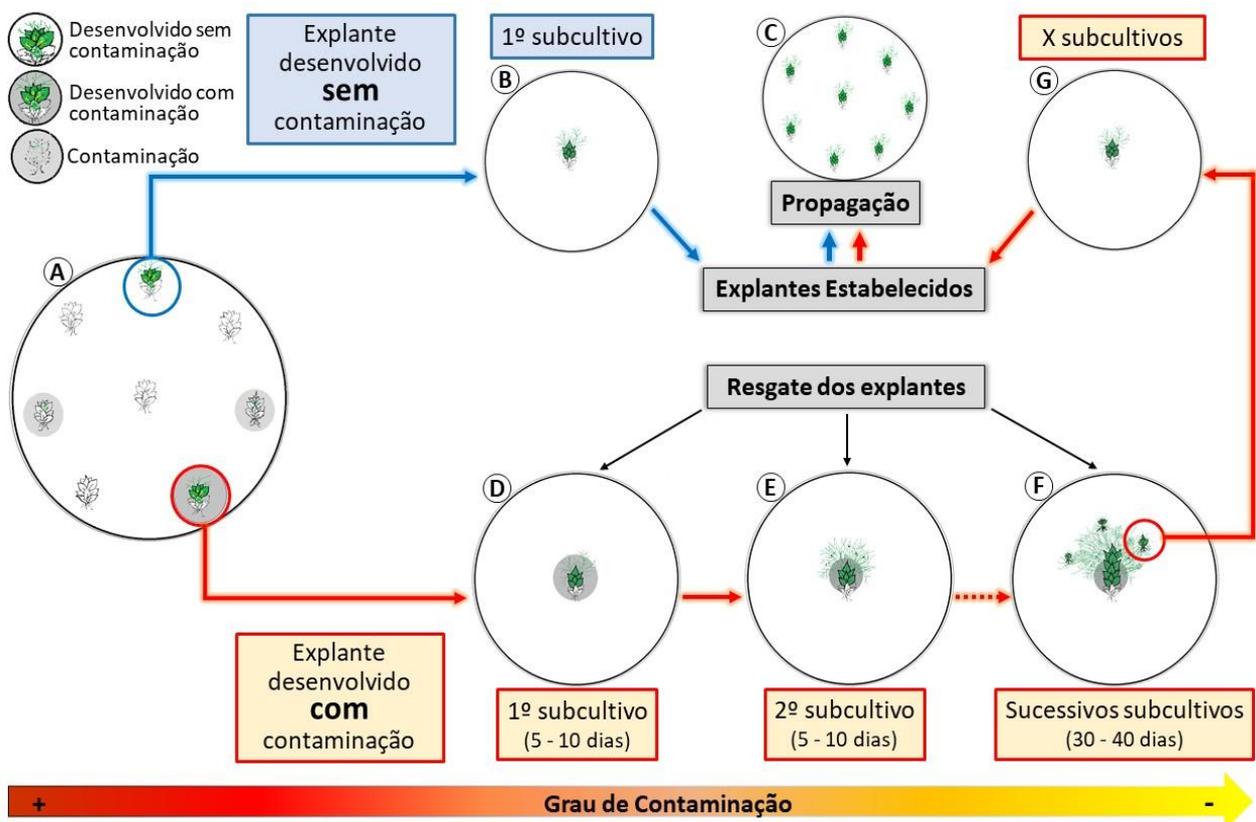


Figura 2: Estabelecimento do cultivo *in vitro* de musgos. Estabelecimento direto (A-C) e Estabelecimento indireto (A, D-G e C). (A) Os explantes desenvolvidos sem contaminação foram transferidos; (B) Ao final do 1º subcultivo, os explantes estabelecidos foram replicados e transferidos; (C) Propagação da espécie. (A) Os explantes desenvolvidos com contaminação foram transferidos, e (D e E) subcultivados até que os explantes crescessem para regiões não contaminadas e, (F) suficientemente para serem replicados e subcultivados; (G) Explantes estabelecidos sem nenhuma contaminação visível observada nas placas; (C) Propagação da espécie.

de pré-cultivo, etapa antecedente ao processo de desinfestação. O pré-cultivo foi realizado com a finalidade de diminuir a quantidade de agentes contaminantes, como no caso de *Barbula indica* (1%-10'), que não apresentou desenvolvimento sem contaminação e em *Bryum argenteum* (1%-5'), que não apresentou desenvolvimento, tanto sem contaminação quanto com contaminação. Assim como também em função de características inerentes à *P. pensilvanicum*, que foi coletado em estágio de desenvolvimento com gametófitos diminutos e insuficientes para serem submetidos ao processo de desinfestação, caso em que essa espécie foi cultivada até o desenvolvimento de novos gametófitos aptos a serem desinfestados.

Rowntree *et al.* (2006) constataram que briófitas coletadas de ambientes em condições de pré-culturas podem reduzir o nível de contaminação após a desinfestação, em comparação às briófitas submetidas aos procedimentos de desinfestação logo após a coleta em ambiente natural. Em nossos experimentos, essa diminuição pode ser constatada para a espécie *Bryum argenteum* na condição de pré-cultivo, submetida ao tratamento (1%-5'), que apresentou desenvolvimento sem contaminação em três dos 200 explantes inoculados, enquanto que essa espécie cultivada no mesmo tratamento, mas inoculada fresca não apresentou nenhum desenvolvimento. Quando considerado o desenvolvimento com contaminação, na mesma condição e tratamento, o número de explantes desenvolvidos também aumentou de nenhum para quatro.

Os explantes de *Pogonatum pensilvanicum*, em razão da disponibilidade limitada de gametófitos, uma vez que essa espécie apresenta como característica o tamanho do gametófito reduzido (2-3 mm), filídios rudimentares e protonemas persistentes (Sharp *et al.*, 1994), foram submetidos ao tratamento de desinfestação apenas após o pré-cultivo de 9 meses (Tabela 3), período em que novos gametófitos se desenvolveram, chegando à 8 mm de comprimento, os quais foram coletados e desinfestados. A condição de pré-cultivo para essa espécie se mostrou bastante eficiente, em relação à produção de material vegetal (gametófitos) susceptível ao tratamento de desinfestação, visto que a partir do material vegetal produzido em condições naturais (gametófitos rudimentares e protonemas), não foi possível selecionar explantes com qualidade para serem submetidos ao tratamento de desinfestação, dado que, após testes realizados preliminarmente com o material disponível não se obteve nenhuma resposta satisfatória. Também foi observado que o percentual de explantes desenvolvidos sem contaminação para essa espécie foi relativamente alta (31,2%). Esse foi o maior índice de explantes desenvolvidos sem contaminação alcançado em todas as espécies trabalhadas (Tabela 1). E por fim, os explantes que apresentaram desenvolvimento com contaminação (9,4%) necessitou de menos subcultivos e de menos tempo para o estabelecimento de culturas assépticas, 3 subcultivos em 50 dias de cultivo, em relação às demais espécies (Tabela 3).



Figura 3: Estabelecimento indireto de *Bryum argenteum* (A-H) e *Isopterygium tenerifolium* (I-L). (A) Colônia de explantes contaminados no 3º subcultivo (seta); (B) Contaminação parcial (seta) no 4º subcultivo; (C) Contaminação parcial (seta) no 5º subcultivo com 24 dias; (D) Contaminação parcial (seta) no 5º subcultivo com 35 dias, mostrando o crescimento de protonemas externo ao meio com contaminação (asterisco); (E) Desenvolvimento do gametófito ereto, externamente ao meio com contaminação (seta) no 5º subcultivo com 24 dias; (F) Crescimento do gametófito próximo à contaminação (setas); (G) Fragmento apical do gametófito se desenvolvendo sem contaminação no 6º subcultivo com 11 dias; (H) *Bryum argenteum* estabelecido no 6º subcultivo com 34 dias; (I) *Isopterygium tenerifolium* crescendo, externamente ao meio contaminado (seta) no 3º subcultivo com 40 dias; (J) Crescimento do gametófito próximo à contaminação (setas); (K) Fragmento apical do gametófito sem contaminação no 4º subcultivo com 40 dias; (L) *Isopterygium tenerifolium* estabelecido livre de contaminação no 5º subcultivo com 40 dias.

Para a espécie *Barbula indica*, o cultivo dos explantes na condição de pré-cultivo não foi relevante, visto que apesar de ocorrer somente o desenvolvimento com contaminação para ambas as condições de cultivo, o tratamento com a amostra pré-cultivada apresentou uma queda de 12,5% de explantes desenvolvidos, na amostra fresca, para 3,4% (Tabela 1). Mesmo com taxas de sucesso para o estabelecimento de culturas *in vitro* de *Barbula indica* sendo baixas, é de grande importância o aprimoramento de técnicas de cultivo dessa espécie. Nos estudos de Viet *et al.* (2010), essa espécie é considerada confiável para fins de biomonitoramento atmosférico, como a deposição de metais pesados no ar, em regiões de clima subtropicais e tropicais, mas que por ser uma planta acrocárpica, com menos de 1 cm de altura e de forte adesão ao substrato, condições que limitam

consideravelmente as análises, é necessário utilizar mecanismos para minimizar a influência do substrato. Desse modo, seria fundamental a utilização de *Barbula indica* cultivadas e propagadas com a finalidade de biomonitoramento e, possivelmente, com uma planta matriz controle podendo ser inserida em substratos mais adequados para esse tipo de análise, como paredes, telhados e troncos de árvores, sugeridos por Viet *et al.* (2010) em ambientes de interesse para estudos relacionado ao monitoramento da qualidade do ar, por exemplo.

Todas as espécies estudadas apresentaram protonemas como forma de desenvolvimento inicial. *Bryum argenteum*, *Bryum coronatum*, *I. tenerifolium*, *V. cuspidifera* e *S. platyphylloides* também apresentaram o desenvolvimento de brotos a partir do explante inoculado, além de protonemas (Fig. 4A). O desenvolvimento inicial para a maioria das espécies foi observado a partir de estruturas como ápice dos gametófitos (Fig. 4B) e ou da axila dos filídios, estando ou não o filídio destacado do caulídio. *Bryum argenteum*, *Bryum coronatum* e *V. cuspidifera* desenvolveram protonemas a partir do local de seção do caulídio (Fig. 4C). Também foi observado o desenvolvimento de protonemas em estruturas de reprodução sexuada em *Bryum argenteum*, no gametângio feminino (arquegônio) e em *Isopterygium tenerifolium*, principalmente no gametângio masculino (anterídio) (Fig. 4D-E). *Bryum argenteum*, *Bryum coronatum* e *S. platyphylloides* apresentaram crescimento apical (Fig. 4F). Apenas em *L. crispum* foi observado o desenvolvimento de protonemas a partir do filídio (lâmina, base e ápice) (Fig. 4G) (Tabela 3).

Com poucas exceções, a principal forma de crescimento e formação de colônias ocorreu a partir do desenvolvimento de protonemas (Fig. 4H), com uma grande variação de desenvolvimento de botões gametofíticos de acordo com cada espécie, em até 30 dias de cultivo. Após esse período, a maioria das espécies apresentam gametófitos mais desenvolvidos e em maior quantidade, como nos casos de *P. pensilvanicum* (Fig. 4I) e de *V. cuspidifera*, em que os botões gametofíticos surgiram em culturas com mais de 1 mês de cultivo, sendo que em 3 meses, os gametófitos alcançaram 1,5 mm de comprimento e em 6 meses, desenvolveram estruturas de reprodução (arquegônios e anterídios). Em *Bryum argenteum* também foi observado a formação de estruturas de reprodução após o quarto mês de cultivo. Apenas *Barbula indica* não desenvolveu botões gametofíticos em nenhum momento.

Tabela 3: Caracterização das espécies de musgos e respostas observadas durante o estabelecimento e o cultivo *in vitro* em meio Knop. (AG) Ápice dos gametófitos, (GF) Gametângios feminino, (GM) gametângios masculinos, (AF) Axilas dos filídios, (SC) Local de seção do caulídio, (AFd) Axila dos filídios destacados, (ARd) Axila dos ramos destacados, (LF) Lâmina do filídio, (CA) Crescimento apical, (R) Ramificações.

| Espécies | Fatores Naturais de Crescimento | | Tipo de Amostra | Estabelecimento | Forma de Crescimento (em 30 dias) | Forma de desenvolvimento inicial/ Estrutura de desenvolvimento | Crescimento (em 30 dias) */**/** | Subcultivos/ Tempo para EI | Propágulos/ Período de Surgimento | Período máximo de cultivo |
|-------------------------------------|---------------------------------|------------------------|-----------------------------------|-------------------|-----------------------------------|--|----------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| | Ambiente | Hábito | | | | | | | | |
| <i>Barbula indica</i> | Urbano, cimento, sombreado | Acrocárpico/ Dioico | Fresca e Pré-cultivada (120 dias) | Indireto | Somente, protonemas | Protonemas/AG | 10/0/0 | 5/105 dias | Gemas/ 3 meses | < 1 ano |
| <i>Bryum argenteum</i> ^a | Urbano, cimento, sombreado | Acrocárpico/ Dioico | Fresca | Direto e Indireto | Predominantemente, protonemas | Protonemas/AG, GF, AF, SC Brotos/AG, AFd | 10/15/1 | 6/135 dias | Gemas protonêmicas/ 4 meses | < 1 ano |
| <i>Bryum argenteum</i> ^b | Urbano, cimento, sombreado | Acrocárpico/ Dioico | Pré-cultivada (7 dias) | Direto e Indireto | Predominantemente, protonemas | Protonemas/AG, AFd Brotos/AG, AFd | 10/15/1 | 6/135 dias | Gemas protonêmicas/ 4 meses | < 1 ano |
| <i>Bryum coronatum</i> | Urbano, solo, sombreado | Acrocárpico/ Dioico | Fresca | Direto e Indireto | Protonemas e gametófitos | Protonemas/AG, SC Brotos/AG, CA | 9/20/2 | 4/80 dias | Tubérculos/ 4 meses | < 1 ano |
| <i>Bryum densifolium</i> | Mata, solo, sombreado | Acrocárpico/ Dioico | Fresca | Indireto | Predominantemente, protonemas | Protonemas/AFd | 15/6/5 | 6/135 dias | Tubérculos/ 4 meses | < 1 ano |
| <i>Fissidens flaccidus</i> | Urbano, solo, sombreado | Acrocárpico/ Monoico | Fresca | Indireto | Predominantemente, protonemas | Protonemas/AG | 14/10/1,5 | 5/105 dias | - | 9 meses |
| <i>Isopterygium tenerifolium</i> | Campo aberto, solo, ensolarado | Pleurocárpico/ Monoico | Fresca | Direto e Indireto | Predominantemente, gametófitos | Protonemas/AG, GF, GM, AFd, ARd, SC - Brotos/AF | 12/8(R)/5 | 5/135 dias | - | < 1 ano |
| <i>Leucobryum crispum</i> | Mata, solo, sombreado | Acrocárpico/ Dioico | Fresca | Direto e Indireto | Protonemas e gametófitos | Protonemas/AG, AF, AFd, LF | 10/7/3 | 5/105 dias | - | 8 meses |
| <i>Pogonatum pensilvanicum</i> | Mata, solo, ensolarado | Acrocárpico/ Dioico | Pré-cultivada (9 meses) | Direto e Indireto | Protonemas e gametófitos | Protonemas/AF | 10/15/2 | 3/50 dias | - | 6 meses |
| <i>Sphagnum platyphylloides</i> | Lagoa, encharcado, ensolarado | Acrocárpico/ Dioico | Fresca | Indireto | Predominantemente, gametófitos | Brotos/AG, CA | 8/2(R)/8 | 6/135 dias | - | 10 meses |
| <i>Vitalia cuspidifera</i> | Mata, rocha, sombreado | Pleurocárpico/ Monoico | Fresca | Direto e Indireto | Protonemas e gametófitos | Protonemas/AG, AFd, ARd, SC - Brotos/AF | 8/0/0 | 5/105 dias | - | 6 meses |

^a Espécie coletada em 2015; ^b Espécie coletada em 2017.

(*) Diâmetro médio da colônia em milímetros; (**) Número de Botões gametofíticos desenvolvidos ou de ramificações desenvolvidas; (***) Altura média dos Gametófitos em milímetros; (EI) Estabelecimento Indireto.

Isopterygium tenerifolium e *S. platyphylloides* (Fig. 4J) apresentaram como forma de crescimento a formação de colônias de gametófitos, por meio de ramificações livres e crescimento apical. O desenvolvimento de plantas tal como ocorre na natureza, com formação e predomínio de suas respectivas estruturas (filídios e caulídios), durante todo o período de cultivo, apresenta grandes vantagens em estudos relativos à morfologia de musgos. Sabovljević *et al.* (2010), investigaram o efeito de giberelinas (AG₃ e AG₇) no crescimento e multiplicação de protonemas de *B. argenteum* em condições *in vitro* e comprovaram o efeito positivo na morfogênese dessa espécie, contudo, também levantaram uma problemática em relação a origem do aumento no crescimento dos protonemas da espécie estudada, se foi devido à expansão celular ou divisão celular. Com isso, musgos que mantenham suas características morfológicas durante a propagação *in vitro* podem ajudar a responder perguntas como essa, bem como podem ser bastante úteis em estudos com interesse para a conservação ou em biomonitoramento da qualidade do ar, como já realizado a nível internacional, através da técnica do “Moss Bag”, com as espécies *Pseudoscleropodium purum* (Hedw.) M. Fleisch, nativa (Capozzi *et al.*, 2016) e *Sphagnum palustre* L. clonada (Capozzi *et al.*, 2017).

Contudo, a fase de protonema é considerada a mais importante, visto que amplia as chances de sucesso no estabelecimento de briófitas, e é a mais usada para pesquisas com aplicações briotecnológicas (biotecnologia de briófitas) (Beike *et al.*, 2010), bem como para bioprospecção, por sua maior facilidade em propagar-se vegetativamente, o que favorece a produção em massa, e por sua maior estabilidade ao longo do tempo (Decker & Reski, 2004; Duckett *et al.*, 2004; Cuvertino-Santoni & Montenegro, 2013).

Espécies da família Bryaceae desenvolveram propágulos assexuados em culturas envelhecidas, a partir de aproximadamente 120 dias de cultivo. Em *Bryum coronatum* e *Bryum densifolium* foi observado o desenvolvimento de tubérculos morfológicamente similares na axila dos filídios (Fig. 4K) e nos caulonemas (Fig. 4L). A formação de propágulos vegetativos não está descrita na literatura para *Bryum densifolium*, sendo esses resultados inéditos para a espécie. Segundo Spence (2014), estruturas vegetativas são especialmente importantes para a identificação de espécies da família Bryaceae e, em condições de cultivo *in vitro*, podem favorecer a formação desses propágulos. A produção de gemas vegetativas são mecanismos importantes para o sucesso na dispersão, principalmente para espécies que revelam limitações no desenvolvimento de esporófitos, bem como a dispersão e germinação dos esporos, em condições naturais, como demonstrado no estudo para *B. coronatum* (Egunyomi, 1982).

Em *Bryum argenteum* ocorreu a formação de células esféricas a partir dos filamentos de

protonemas, denominadas gemas protonêmicas, também descritas no trabalho de Pressel *et al.* (2007). Essas estruturas podem ser produzidas em resposta à desidratação do meio de cultura, constituindo uma importante estratégia de tolerância à dessecação. Mas, em plantas crescidas em condições naturais, são difíceis de serem observadas (Duckett *et al.*, 2001).

Segundo Ares *et al.* (2014) a formação de gemas protonêmicas também foram verificadas em culturas de meio líquido, apesar de ser apenas em meios contaminados, mas com a vantagem ecológica de ocorrer a produção em menor tempo de cultivo, cerca de 1 mês. De fato, em nossos estudos, essas gemas também foram observadas em culturas de meio líquido para *B. argenteum* (dados não publicados), contudo, em culturas assépticas envelhecidas, a partir de 4 meses de cultivo. Além disso, tanto em culturas de meio sólido como de meio líquido, foram observadas gemas protonêmicas em segmentação (Fig. 4M), sem a formação de Tmena (células de abscisão). E ainda, quando essas estruturas foram transferidas para novos meios de cultura, ocorreu a germinação com a produção de filamentos de protonemas e, conseqüentemente a formação de colônias de protonemas de forma similar às de origem (Fig. 4N). A regeneração de gemas protonêmicas de espécies de *Bryum* também foram relatadas nos trabalhos de Pressel *et al.* (2007), contudo, para *B. argenteum*, esses resultados são inéditos.

Outra espécie que também apresentou o desenvolvimento de propágulos vegetativos foi *Barbula indica*, onde foi observado a formação de gemas surgindo diretamente do ápice de protonema (Fig. 4O), visto que nesta espécie não ocorreu a produção de gametófitos, em nenhuma circunstância. De acordo com Duckett *et al.* (2004), tanto em condições naturais quanto em condições de cultivo, a produção de gemas está relacionada a disponibilidade de nutrientes disponível no meio, enquanto que tubérculos, são estruturas produzidas em resposta à ausência de nutrientes.

Algumas espécies conseguiram manter a viabilidade por mais de um ano sem a necessidade de troca de meio ou de tratamentos diferenciados. Apesar de o aspecto morfológico de algumas espécies depois de meses no mesmo meio de cultivo não demonstrar viabilidade, por estar ressecada ou com aparência de morta, logo após a troca de meio de cultura ocorreu a regeneração a partir de brotamentos ou desenvolvimento de protonemas, que pôde surgir de qualquer estrutura do explante transplantado, como observado em *Leucobryum crispum* que desenvolveu protonemas a partir do ápice dos filídios (Fig. 4P).



Figura 4: Estruturas desenvolvidas em musgos do Cerrado cultivados *in vitro*. (A) Brotos em *Bryum argenteum* (7); (B) Protonemas apicais em *Fissidens flaccidus* (5); (C) Protonemas no local de seção do caulídio (seta) em *Vitalia cuspidifera* (20); (D) Arquegônio (seta) de *Bryum argenteum* (10); (E) Anterídio (seta) de *Isopterygium tenerifolium* (13); (F) Crescimento apical a partir de fragmento do ápice (seta) em *Bryum coronatum* (13); (G) Protonemas na lâmina do filídio de *Leucobryum crispum* (20); (H) Colônia de protonemas de *Bryum argenteum* com botões gametofíticos (24); (I) Colônia de protonemas de *Pogonatum pensilvanicum* com gametóforos jovens (130); (J) Colônia de gametófitos de *Sphagnum platyphylloides* (55); (K) Tubérculos (seta) na axila dos filídios de *Bryum coronatum* (100); (L) Tubérculos (seta) nos caulonemas de *Bryum densifolium* (150); (M) Gemas protonêmicas de *Bryum argenteum* em segmentação (seta) (300); (N) Colônia de protonemas formadas a partir da germinação de gemas protonêmicas de *Bryum argenteum* (32); (O) Gemas no ápice de protonema de *Barbula indica* (100); (P) Regeneração de *Leucobryum crispum* a partir do ápice dos filídios (42). (Números em parênteses = dias de cultivo, sem troca de meio de cultura).

4. Conclusão

O estabelecimento indireto foi possível para todas as espécies testadas e provou ser uma alternativa possível para espécies com baixa disponibilidade de material. Portanto, o estabelecimento indireto é proposto como uma metodologia viável para o estabelecimento de culturas *in vitro* de briófitas, por apresentar taxas percentuais de desenvolvimento predominantemente maiores, podendo ser utilizado para potencializar o estabelecimento de briófitas mais sensíveis ou escassas. Este novo método ajudará a ampliar o uso comercial,

conservacionista e biotecnológico de briófitas de interesse ecológico, que inclui espécies ameaçadas de extinção.

Assim, esta técnica também pode ser aplicada para alcançar o estabelecimento de espécies de interesse conservacional, o que pode ajudar a obter micropropagação em larga escala para reintroduzi-las ao seu ambiente natural.

O aperfeiçoamento e a estruturação de estratégias que propicie o aumento da taxa de sucesso no estabelecimento *in vitro* de espécies de briófitas, como as que necessitam de serem cultivadas a partir do gametófito, é uma prática fundamental e de inestimável significância para estimular o desenvolvimento de novas pesquisas a cerca desse grupo de plantas reconhecidamente promissoras.

Agradecimentos

À CAPES, pela bolsa de doutorado concedida à autora. À Universidade de Brasília pelo suporte financeiro. Aos colegas do laboratório de Criptógamas da Universidade de Brasília, por suas contribuições e momentos de alegrias. Especialmente aos Drs. Paulo Câmara, Graça Machado e Denise Costa, pela concessão do espaço, pelos convites em suas expedições e pela identificação do *Sphagnum platyphylloides*, respectivamente. E também ao Caio Felipe S. Silva, pela coleta do *Bryum densifolium*.

Referências Bibliográficas

- Anderson, M., Lambrinos, J. & Schroll, E. 2010. The potential value of mosses for stormwater management in urban environments. **Urban ecosystems**, *13*(3), 319-332.
- Ares, A., Aboal, J. R., Carballeira, A., Giordano, S., Adamo, P. & Fernández, J. A. 2012. Moss bag biomonitoring: a methodological review. **Science of the Total Environment**, *432*, 143-158.
- Ares, A., Duckett, J. G. & Pressel, S. 2014. Asexual reproduction and protonemal development *in vitro* in *Fontinalis antipyretica* Hedw. **Journal of Bryology**, *36*(2), 122-133.
- Bates, J. W. 2000. Mineral nutrition, substratum ecology, and pollution. pp. 299-356. *In.*: A. J. Shaw & B. Goffinet (ed). **Bryophyte Biology**. Cambridge University Press. 2 Ed. 535

p.

Beike, A. K., Horst, N. A. & Rensing, S. A. 2010. Axenic bryophyte *in vitro* cultivation. **Journal of Endocytobiosis and Cell Research**, 102, 108.

Beike, A. K., Spagnuolo, V., Lüth, V., Steinhart, F., Ramos-Gomez, J., Krebs, M., Adamo, P., Rey-Asensio, A. I., Fernandez, J. A., Giordano, S., Decker, E. L. & Reski, R., 2014. Clonal *in vitro* propagation of peat mosses (*Sphagnum* L.) as novel green resources for basic and applied research. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 120(3), 1037-1049.

Capozzi, F., Giordano, S., Aboal, J. R., Adamo, P., Bargagli, R., Boquete, T., Di Palma, A., Real, C., Reski, R., Spagnuolo, V., Steinbauer, K., Tretiach, M., Varela, Z., Zechmeister, H. & Fernandez, J. A., 2016. Best options for the exposure of traditional and innovative moss bags: a systematic evaluation in three European countries. **Environmental Pollution**, 214, 362-373.

Capozzi, F.; Adamo, P.; Di Palma, A.; Aboal, J. R.; Bargagli, R.; Fernandez, J. A.; Lopez Mahia, P.; Reski, R.; Tretiach, M.; Spagnuolo, V. & Giordano, S. 2017. *Sphagnum palustre* clone vs native *Pseudoscleropodium purum*: A first trial in the field to validate the future of the moss bag technique. **Environmental Pollution**, 225, 323-328.

Costa, D. P. da, Almeida J. S. dos S., Dias, N. dos S., Gradstein, S. R. & Churchil, S. P. 2010. **Manual de Briologia**. Editora Interciência.

Costa, D. P. & Peralta, D. F. 2015. Bryophytes diversity in Brazil. **Rodriguésia**, 66(4): 2015

Costa, M. L. M., Bajgielman, T., Pereira, T. S., Maurenza, D., Amaro, R., Dalcin, E. C. & Maunder, M. (Orgs.) 2016. Estratégia nacional para a conservação ex situ de espécies ameaçadas da flora brasileira. **Centro Nacional de Conservação da Flora - CNCFlora**: Jardim Botânico do Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson, Rio de Janeiro. 24 p.

Cuvertino-Santoni, J. O. R. G. E. & Montenegro, G. 2013. Bioprospecting a tool to conserve Chilean bryophytes. **Gayana Bot**, 70, 1.

Decker, E. L. & Reski, R. 2004. The moss bioreactor. **Current Opinion in Plant Biology**, 7(2),

166-170.

- Duckett, J. G., Goode, J. A. & Matcham, H. W. 2001. Studies of protonemal morphogenesis in mosses. VIII. The gemmiferous protonemata of *Orthodontium* and *Dicranoweisia*. **Journal of bryology**, **23**(3), 181-193.
- Duckett, J. G., Burch, J., Fletcher, P. W., Matcham, H. W., Read, D. J., Russell, A. J. & Pressel, S. 2004. *In vitro* cultivation of bryophytes: a review of practicalities, problems, progress and promise. **Journal of Bryology**, **26**(1), 3-20.
- Egunyomi, A. 1982. Dispersal mechanisms of *Bryum coronatum* in Nigeria. **Lindbergia**, 89-92.
- Frahm, J. P. 2004. Recent developments of commercial products from bryophytes. **The Bryologist**, **107**(3), 277-283.
- Glime, J. M. 2017. Bryophyte Ecology. EBook sponsored by Michigan Technological University and the G-1 International Association of Bryologists.
- Goffinet, B. & Shaw A. J. (ed). 2009. **Bryophyte Biology**. Cambridge University Press. 2 Ed. 535 p.
- Goffinet, B., Buck W. R. & Shaw A. J. 2009. Morphology and classification of the Bryophyta. pp. 55-138, *In.*: A. J. Shaw & B. Goffinet (ed). **Bryophyte Biology**. Cambridge University Press. 2 Ed. 535 p.
- Hu, R., Yan, Y., Zhou, X., Wang, Y. & Fang, Y. 2018. Monitoring Heavy Metal Contents with *Sphagnum Junghuhnianum* Moss Bags in Relation to Traffic Volume in Wuxi, China. **International journal of environmental research and public health**, **15**(2), 374.
- Knop, W. 1865. Quantitative Untersuchungen über die Ernährungsprozesse der Pflanze. Die Landwirtschaftlichen Versuchs-Stationen, 7, 93-107.
- Liang, S. F., Sun, Y. & Zhu, R. L. 2010. *In vitro* micropropagation of *Bryum argenteum* Hedw. **Cryptogamie. Bryologie**, **31**(3), 233-239.
- Löbel, S. & Rydin, H. 2010. Trade-offs and habitat constraints in the establishment of epiphytic

bryophytes. **Functional ecology**, *24*(4), 887-897.

Longton, R.E. & Miles, C.J., 1982. Studies on the reproductive biology of mosses. **Journal of the Hattori Botanical Laboratory**. *52*, 219–239.

Martins, R. & Boaventura, R. 2004. Briófitas aquáticas como bioindicadores da poluição de águas superficiais por metais pesados. *XI SILUBESA-Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*.

Myers, N., Mittermeier, R. A., Fonseca, G. A. B. & Kente, J. 2000. Biodiversity Hotspots for Conservation Priorities. **Nature**, *403*:853-858.

Pressel, S., Matcham, H. W. & Duckett, J. G. 2007. Studies of protonemal morphogenesis in mosses. XI. *Bryum* and allied genera: a plethora of propagules. **Journal of Bryology**, *29*(4), 241-258.

Reski, R. 1998. Development, genetics and molecular biology of mosses. **Botanica Acta**, *111*(1), 1-15.

Ros, R. M., Werner, O. & Pérez-Álvarez, J. R. 2013. *Ex situ* conservation of rare and threatened Mediterranean bryophytes. **Fl. Medit**, *23*, 223-235.

Rowntree, J. K. 2006. Development of novel methods for the initiation of *in vitro* bryophyte cultures for conservation. **Plant cell, tissue and organ culture**, *87*(2), 191-201.

Rowntree, J. K., Duckett, J. G., Mortimer, C. L., Ramsay, M. M. & Pressel, S. 2007. Formation of specialized propagules resistant to desiccation and cryopreservation in the threatened moss *Ditrichum plumbicola* (Ditrichales, Bryopsida). **Annals of botany**, *100*(3), 483-496.

Rowntree, J. K., Pressel, S., Ramsay, M. M., Sabovljević, A. & Sabovljević, M. 2011. *In vitro* conservation of European bryophytes. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, *47*(1), 55-64.

Sabovljević, M. S., Bijelović, A. & Dragičević, I. Č. 2002. Effective and easy way of establishing *in vitro* culture of mosses, *Bryum argenteum* Hedw. and *Bryum capillare* Hedw. (*Bryaceae*). **Archives of Biological Sciences**, *54*(1-2), 7-8.

- Sabovljević, M., Bijelović, A. & Dragičević, I. Č. 2003. *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. **Turkish journal of botany**, 27(6), 441-446.
- Sabovljević, A., Sabovljević, M. & Grubišić, D. 2010. Gibberellin influence on the morphogenesis of the moss *Bryum argenteum* Hedw. in *in vitro* conditions. **Archives of Biological Sciences**, 62(2), 373-380.
- Sabovljević, A., Vujičić, M., Skorić M., Bajić-Ljubičić, J. & Sabovljević M. 2012. Axenically culturing the bryophytes: Establishment and propagation of the pleurocarpous moss *Thamnobryum alopecurum* Nieuwland ex Gangulee (Bryophyta, Neckeraceae) in *in vitro* conditions. **Pakistan Journal of Botany** 44: 339-344.
- Sarasan, V., Cripps, R., Ramsay, M. M., Atherton, C., McMichen, M., Prendergast, G. & Rowntree, J. K. 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants—progress in the past decade. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 42(3), 206-214.
- Sharp, A. J., Crum, H. & Eckel, P. 1994. The Moss Flora of Mexico. **Memoirs of The New York Botanical Garden** 69(1-2): 1-1113.
- Söderström, L. 2006. Conservation biology of bryophytes. **Lindbergia**, 24-32.
- Spence, J. R. 2014. A guide to identification of Bryaceae with an emphasis on North American species, Version 3. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/268278609>>. Acessado em: 23 de junho de 2018.
- Tacoronte, B. M., León, Y., Olivo, A. & Vielma, M. 2009. Crecimiento *in vitro* de musgos del bosque nublado andino de Venezuela. **Revista Forestal Latino americana**, 24(2), 69-89.
- Tuba, Z., Slack, N.G. & Stark, L.R. 2011. Bryophyte Ecology and Climate Change. **Cambridge University Press**.
- Viet, H. N., Frontasyeva, M. V., Thi, T. M. T., Gilbert, D. & Bernard, N. 2010. Atmospheric heavy metal deposition in Northern Vietnam: Hanoi and Thainguyen case study using

the moss biomonitoring technique, INAA and AAS. **Environmental Science and Pollution Research**, *17*(5), 1045-1052.

Vujičić, M., Sabovljević, A. & Sabovljević, M. 2011. Axenically culturing the bryophytes: Establishment and propagation of the moss *Hypnum cupressiforme* Hedw. (Bryophyta, Hypnaceae) in *in vitro* conditions. **Botanica Serbica**, *35*, 71-77.

Yano, O. 1984. Briófitas. pp: 27-30, *In*: O. Fidalgo & Bononi V. L. R. (coords.). **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico**. Instituto de Botânica, São Paulo, Manual.

CAPÍTULO II

Sistemas de cultivo *in vitro* do musgo *Bryum argenteum* Hedw. (Bryaceae)

Resumo

Bryum argenteum Hedw. é um musgo cosmopolita reconhecido por sua cor prateada. Essa espécie tem sido alvo de estudos para propagação sob condições controladas. Assim, técnicas de cultivo têm sido aprimoradas visando a produção de plantas de *B. argenteum* em larga escala para exploração dos seus benefícios ecológicos. Este estudo teve como objetivo cultivar *Bryum argenteum* estabelecido *in vitro*, a partir de fragmentos de gametófitos, comparando o ganho de biomassa em relação aos efeitos de reguladores de crescimento em meio semissólido (MSS) e líquido (líquido sob agitação (MLA), líquido estacionário (MLE) e biorreator de imersão permanente (BIPER) com e sem sacarose. Após o estabelecimento de colônias de protonemas, explantes foram propagados nos quatro sistemas de cultivo. Nos sistemas MSS e MLA foram testados a adição de Ácido giberélico (AG₃), Ácido indol-3-acético (AIA) e 6-Benzilaminopurina (BAP), nas respectivas concentrações 0,01; 0,1; 0,5 e 1 µM, de forma isolada ou combinada. Em todos os sistemas foram testados o efeito da sacarose. Os resultados mostraram que todos os reguladores de crescimento induziram o aumento do ganho de biomassa. Adicionalmente, os meios líquidos resultaram em um ganho de biomassa mais expressivo, com destaque para o sistema BIPER. No sistema BIPER com sacarose, a propagação *in vitro* de *B. argenteum* alcançou um aumento de biomassa de 1.738 vezes em um período de 45 dias de cultivo.

Palavras chaves: biorreator, Bryophyta, citocinina, giberelina, sacarose.

***In vitro* culture systems of moss *Bryum argenteum* Hedw. (Bryaceae)**

Abstract

Bryum argenteum Hedw. is a cosmopolitan moss recognized for its silvery color. This species has been the subject of studies for propagation under controlled conditions. Thus, cultivation techniques have been enhanced to produce large-scale *B. argenteum* plants to exploit their ecological benefits. This study aimed to cultivate *Bryum argenteum* established *in vitro* from gametophyte fragments, comparing the biomass gain in relation to the effects of growth regulators in semi-solid (MSS), stirring liquid (MLA), stationary liquid (MLE) and permanent immersion bioreactor (BIPER) in Knop medium, with or without sucrose. After the establishment of protonemata colonies, the explants were propagated in these four cultivation systems. In the MSS and MLA systems the addition of gibberellins (GA₃), indole-3-acetic acid (IAA) and 6-benzylaminopurine (BAP) at of 0.01; 0.1; 0.5 and 1 μM, alone or in combinations of these substances. The results showed that all growth regulators induced the increase of biomass gain. Additionally, the liquid media were more efficient in terms of biomass gain, especially the BIPER system. Also, the BIPER system with sucrose led to a biomass increase of 1,738-fold in 45 days of cultivation.

Keywords: bioreactor, Bryophytes, cytokinin, gibberellin, sucrose.

1. Introdução

O cultivo *in vitro* de briófitas tem sido, progressivamente, utilizado como ferramenta em pesquisas de diferentes campos das ciências biológicas, como a genética (Reski, 1998; Jing *et al.*, 2002) e a conservação (Duckett *et al.*, 2004; Rowntree *et al.*, 2011). Métodos de propagação visando a exploração comercial para a produção de culturas renováveis e síntese de novos compostos, já são uma realidade nesse grupo de plantas (Decker & Reski, 2007; Decker *et al.*, 2014).

A cultura de tecidos vem sendo considerada o método mais eficaz para a produção de grande quantidade de musgos, como em *Bryum argenteum* (Sabovljević *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2010). Com isso, a otimização da propagação *in vitro* para a produção de musgo, em larga escala, por meio de biorreatores, tem crescido para esse grupo de plantas (Henes *et al.*, 2018; Reski *et al.*, 2018). A produção massiva de musgos tem sido utilizada para a produção de biofármacos (Decker & Reski, 2007; Reski *et al.*, 2015), de bioprospecção (Cuvertino-Santoni & Montenegro, 2013), de biotecnologia (manipulação genética) (Beike *et al.*, 2010; Duckett *et al.*, 2004; Niederkrüger *et al.*, 2014) e a produção de cosméticos (Henes *et al.*, 2018). Além disso, musgos também são usados para o biomonitoramento de metais pesados (Stanković *et al.*, 2018) e também para biorremediação de ambientes contaminados por esses poluentes (Itouga *et al.*, 2013, 2017).

Entretanto, a obtenção de grandes quantidades de algumas briófitas *in situ* é inviabilizada pela lenta recuperação natural nos locais utilizados para extrativismo (Peck & Muir, 2001; Tacoronte *et al.*, 2009). Desta forma, estudos que propõem o desenvolvimento de tecnologias para produção de musgos, como *Bryum argenteum* Hedw., para uso ecológico, tem sido o objeto de várias pesquisas. Jones e Rosentreter (2006), por meio do cultivo de fragmentos de *B. argenteum*, constataram que a reintrodução dessa espécie tem se mostrado eficiente para a restauração de ambientes degradados. Adicionalmente, Liang *et al.* (2010) investigaram métodos de micropropagação *in vitro* de *B. argenteum* e a sua posterior reintrodução em solo.

O emprego de biorreatores, sistema que possui aeração controlada dentro do recipiente (Teixeira & Cid, 2010), no cultivo *in vitro* de musgos tem potencializado a produtividade e o interesse em briófitas, por manter as condições de crescimento do material vegetal confiáveis e com alto grau de pureza (Hohe *et al.*, 2000; Hohe *et al.*, 2002). Estudos relacionados ao cultivo de biomassa em escala tem sido realizado com *Physcomitrella patens*, por exemplo, espécie

com potencial para a produção de biofármacos (Decker & Reski, 2004; Lucumi *et al.*, 2005; Decker & Reski, 2007; Decker *et al.*, 2014), usada para a produção de proteínas terapêuticas humanas (Reski *et al.*, 2015; Michelfelder *et al.*, 2017) por meio de engenharia genômica (Reski *et al.*, 2018). Esses dados mostram como a produção de musgos em escala pode ser de grande interesse econômico.

Bryum argenteum é um musgo acrocárpico dioico, que cresce formando tufo de aproximadamente 1 cm de altura, que apresenta coloração característica de verde-esbranquiçado a prateada, especialmente no ápice dos filídios, e seus gametófitos semelhantes a fios prateados (Sharp *et al.*, 1994). Essas características facilitam sua identificação no campo, principalmente quando cresce entre outras plantas. A espécie apresenta ampla distribuição pelo Brasil e também no mundo (Câmara, 2008; Bordin & Yano, 2009). Considerada cosmopolita, com grande capacidade de dispersão a longas distâncias, *B. argenteum* é encontrada em diversos habitats e em condições extremas, como baixas umidades e altas temperaturas (Pisa *et al.*, 2014). Contudo ocorre, preferencialmente, em ambientes antropizados, sendo encontrada em substratos variados, como solo e cimento (Sharp *et al.*, 1994).

O cultivo *in vitro* de *B. argenteum* é comumente realizado em meios sólidos, onde fatores como efeitos de reguladores de crescimento e açúcares foram avaliados (Sabovljević *et al.*, 2005; Sabovljević *et al.*, 2010; Bijelović *et al.*, 2004). Além disso, a capacidade de tolerância dessa espécie a metais pesados já foi investigada em meio sólido (Shaw *et al.*, 1989, 1990). Embora mais limitado, existem estudos sobre o cultivo *in vitro* de *B. argenteum* em soluções líquidas, principalmente, visando a sua propagação para fins comerciais (Liang *et al.*, 2010), ornamentação e ecologização de ambientes (Glime, 2017). *B. argenteum* também tem despertado interesse farmacológico por sua atividade antimicrobiana (Sabovljević *et al.*, 2006), antifúngica (Deora & Guhil, 2018) e antibacteriana (Karpiński & Adamczak, 2017).

O interesse em estabelecer métodos mais eficientes e com melhores índices de custo benefício para o cultivo de *B. argenteum* está diretamente relacionado à sua capacidade ecológica na recuperação de ambientes degradados (Jones & Rosentreter, 2006). Outros fatores que são levados em consideração são o controle da erosão do solo (Liang *et al.*, 2010), uso em telhados verdes (Studlar & Peck, 2009; Prince 2016) e em jardins urbanos, que podem melhorar a qualidade do ar atmosférico em centros urbanos (Anderson *et al.*, 2010; Radu *et al.*, 2015). Ainda, *B. argenteum* produz moléculas biologicamente ativas, como glicosídeos, flavonóides, esteróides e terpenóides, com atividades antifúngica e antibiótica (Sabovljević *et al.*, 2006; Chandra *et al.*, 2017; Deora & Guhil, 2018), testada em bactérias Gram-positivas (*Enterococcus*

faecalis, *Staphylococcus aureus*, e *Streptococcus pyogenes*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) (Karpiński & Adamczak, 2017). Estas substâncias podem justificar suas propriedades etnofarmacológicas, reconhecida pela medicina popular, que também indica o uso como antipirético (Chandra *et al.*, 2017).

B. argenteum é indicada para biomonitoramento de metais poluentes (Shaw *et al.*, 1989, 1990), presentes no ar atmosférico, águas fluviais e solo, em decorrência de atividades como mineração. Estudos referentes à produção de musgos visando a biorremediação em ambientes degradados por metais pesados são relevantes nesse momento (Fernández & Carballeira, 2000; Capozzi *et al.*, 2016; Itouga *et al.*, 2017). Métodos eficientes de propagação de *B. argenteum* pode contribuir para soluções de desastres ambientais como aqueles causados pela atividade mineradora que recentemente impactaram o estado de Minas Gerais, Brasil.

Este estudo teve como objetivo cultivar *Bryum argenteum* estabelecido *in vitro*, a partir de fragmentos de gametófitos, comparando o ganho de biomassa em relação aos efeitos de reguladores de crescimento em meio semissólido e líquido (líquido sob agitação, líquido estacionário e biorreator de imersão permanente) com e sem sacarose.

2. Material e métodos

2.1. Preparação do material e condições de cultivo

Bryum argenteum Hedw. foi coletado em ambiente urbano, Asa Norte, Brasília – DF, Brasil, sobre cimento, em uma rala camada de solo, em local pouco sombreado (15°46'08"S e 47°51'58"W), no mês de dezembro de 2016, de acordo com as técnicas descritas para material briológico de Yano (1984). As plantas foram identificadas no laboratório de criptógamas da Universidade de Brasília – UnB, com o auxílio de microscópio estereoscópico, microscópio óptico e literatura especializada. Exemplares da amostra estudada foram depositadas no Herbário UB, sob o número de registro Pereira, C.G. 587.

Para o estabelecimento, fragmentos mais jovens do gametófito foram selecionados e lavados abundantemente em água corrente. Em seguida foram submetidos ao procedimento de desinfestação, no qual pequenas porções de material foram mergulhadas em álcool a 70% por 5 segundos e em solução de hipoclorito de sódio (NaClO, alvejante comercial, com 2 a 2,5% de cloro ativo), na concentração de 2% por 2 min, e enxaguado 3 vezes em água estéril. Em cada placa, contendo meio solidificado, foram inoculados os fragmentos de gametófitos, que consistiam de filídios, caulídios, ápices, rizóides, brotos e gametófitos inteiros. As placas foram

vedadas com filme plástico de PVC e cultivadas em sala de crescimento por 10 dias. Os explantes descontaminados e com desenvolvimento foram transferidos para novas placas e subcultivados por aproximadamente 30 dias, para formação de colônias. Subsequentemente, pequenas porções das colônias foram utilizadas como inóculos iniciais, nos experimentos seguintes.

O estabelecimento e a multiplicação dos explantes foram feitos em meio semissólido (MSS), meio líquido sob agitação (MLA), meio líquido estacionário (MLE) e biorreator de imersão permanente (BIPER), utilizando-se solução de Knop (Knop, 1865), contendo: $0,8 \text{ g.L}^{-1}$ de nitrato de cálcio [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$]; $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de nitrato de potássio (KNO_3); $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de fosfato monopotássico (KH_2PO_4) e $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e água ultra pura. Todas as soluções tiveram o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e então autoclavadas a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min. Os meios semissólidos foram solidificados com $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ágar. A sacarose, quando utilizada, foi acrescida 10 g.L^{-1} .

Para os estudos relacionados aos efeitos dos reguladores de crescimento, inóculos de *Bryum argenteum* estabelecidos e subcultivados, foram transferidos para os recipientes dos respectivos sistemas de cultivo. Foram testados três reguladores: ácido giberélico (AG_3), ácido indol-3-acético (AIA) e 6-benzilaminopurina (BAP) e combinações de AG_3/AIA e AG_3/BAP , em partes iguais, nas mesmas concentrações. Também foi avaliado o efeito de uma fonte de carbono, em cada sistema de cultivo. Os tratamentos realizados com apenas solução de Knop foram denominados Contr (controle) e os tratamentos realizados com solução de Knop adicionado de sacarose foram denominados Sac (sacarose).

Os experimentos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 h de luz e intensidade luminosa de aproximadamente $41 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Ao final de cada período de cultivo em meio líquido, as plantas foram desidratadas para a obtenção do peso seco das colônias de cada tratamento. Para tanto as colônias foram colocadas em placas de Petri, forradas com papel filtro e acondicionadas em ambiente com temperatura controlada de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, com o propósito de manter suas características morfológicas. Após a estabilização foi registrado o peso seco de cada amostra.

2.2. Sistemas de cultivo

2.2.1. Cultivo em meio semissólido (MSS)

Explantos de *Bryum argenteum* medindo aproximadamente 0,3 cm de diâmetro foram inoculados em novas placas de Petri contendo MSS adicionados ou não de reguladores de crescimento em suas respectivas concentrações e combinações. Esse sistema de cultivo foi organizado em 22 tratamentos. Os tratamentos 1 e 2 foram representados por: Contr e Sac e os tratamentos de 3 a 22 por: AG₃, AIA, BAP, AG₃/AIA e AG₃/BAP nas concentrações 0,01; 0,1; 0,5 e 1 µM cada (Tabela 1). Após a transferência dos explantes, as placas foram vedadas com plástico filme de PVC e cultivados em sala de crescimento por 30 dias.

O experimento foi inteiramente casualizado, com cinco explantes por placa em cinco repetições, totalizando 25 explantes para cada tratamento. O efeito dos reguladores de crescimento, bem como da sacarose no desenvolvimento de *B. argenteum* em condições de cultivo em MSS foi avaliado de forma quantitativa, usando a medida do diâmetro da colônia após o período de cultivo, como descrito por Erdağ *et al.* (2015).

As medições foram realizadas com auxílio de microscópio estereoscópico e régua, e para cada colônia de explante a região de inserção do inóculo transplantado foi considerada como ponto central do seguimento de reta para a aferição do diâmetro da sua circunferência.

2.2.2. Cultivo em meio líquido sob agitação (MLA)

Explantos de *Bryum argenteum* pesando aproximadamente 0,2 mg foram transferidos para frascos de vidro com capacidade para 400 mL, contendo 180 mL de solução nutritiva. No sistema de cultivo MLA, o experimento foi organizado em duas etapas consecutivas. Primeiramente, foram realizados 22 tratamentos como aqueles descritos para o sistema MSS. Adicionalmente, foi realizado outro experimento com o objetivo de avaliar o efeito da sacarose combinada com reguladores de crescimento, em diferentes interações. Essa segunda etapa do sistema MLA foi organizada em 3 tratamentos: Sac/AG₃ a 0,1; Sac/BAP a 0,1 e Sac/AG₃/BAP a 0,1 µM, respectivamente. Para efeito de comparação, os tratamentos Contr e Sac, realizados na primeira etapa desse sistema, foram utilizados nas análises e representações gráficas. Após a transferência dos explantes, cada frasco foi vedado com duas camadas de plástico filme de PVC e cultivados sob agitação de 50 rpm em sala de crescimento por 45 dias.

O experimento foi inteiramente casualizado, com cinco repetições (frascos) para cada tratamento. O efeito dos reguladores de crescimento, bem como da sacarose no desenvolvimento de *B. argenteum*, em condições de cultivo no sistema MLA foi avaliado de forma quantitativa, usando a biomassa do peso seco após o período de cultivo.

2.2.3. Cultivo em meio líquido estacionário (MLE)

O efeito do volume da solução de cultivo no desenvolvimento e no ganho de biomassa de *B. argenteum* foi avaliado usando o sistema MLE em dois tipos de recipientes de cultivo: placas de Petri translúcidas fabricadas com poliestireno (90 x 15 mm), contendo 10 mL de solução nutritiva e frascos translúcidos fabricado com politereftalato de etila (PET), com capacidade para 5 L contendo 1000 mL de solução.

Os frascos de cultivo de PET foram, previamente, esterilizados quimicamente, dentro de um saco plástico fechado contendo 400 mL de solução de hipoclorito de sódio, na concentração de 0,36% (v/v) por 12 horas, com o frasco fechado, e mais 12 horas, com o frasco aberto (Teixeira, J. B., comunicação pessoal). Em seguida os frascos foram enxaguados com água estéril.

Esse experimento foi organizado em quatro tratamentos, em que explantes pesando aproximadamente 0,2 mg foram transferidos para cada recipiente. Os tratamentos 1 e 2, realizados em placas de Petri, foram representados por: Contr_p e Sac_p, respectivamente. Os tratamentos 3 e 4, realizados em frascos de PET, foram representados por: Contr_P e Sac_P, respectivamente. As placas e os frascos de PET foram fechados com tampas próprias e depois vedados com plástico filme de PVC. Ambos os recipientes foram cultivados em sala de crescimento por 45 dias.

O experimento foi inteiramente casualizado, com cinco repetições para cada tratamento. O efeito do volume da solução no ganho de biomassa de *B. argenteum* em ambos os recipientes foi avaliado de forma quantitativa, usando o peso seco da biomassa após o término do período de cultivo.

Além disso, para os tratamentos em frascos de PET, a análise do efeito do volume da solução também foi realizada de forma qualitativa, no qual os seguintes parâmetros foram avaliados: aspecto morfológico, quantidade de protonemas e quantidade de gametófitos, em que foram atribuídos a seguinte classificação: Ruim = 1; regular = 2; Bom = 3; Ótimo = 4. Ao

final do período de cultivo desse experimento, as soluções contidas em cada frasco de PET tiveram o pH e o volume aferidos.

2.2.4. Cultivo em Biorreator de Imersão Permanente (BIPER)

2.2.4.1. Montagem do Sistema BIPER

O sistema de cultivo em biorreator de imersão permanente (BIPER), foi montado como o proposto por Cid *et al.* (2002), com adaptações (Fig. 1) descritas a seguir. Foram utilizados, frascos de PET como descrito no sistema MLE, com tampa de duas portas para entrada e saída de ar. Cada porta foi acoplada a um filtro específico, produzido com membrana milipore hidrofóbica de 0,2 μm para filtragem e deslocamento de ar. Um dos filtros foi ligado a um compressor de ar, o qual teve a finalidade de promover a aeração e a agitação do meio nutritivo, com o auxílio de um tubo de silicone que canaliza o ar até a solução contida dentro do frasco (Fig. 1a). O sistema de biorreator foi montado com 15 frascos interligados por tubos de silicone, sendo 3 séries de 5 frascos por prateleira (Fig. 1b), todos alimentados por um compressor de ar (marca Schultz, modelo CSA 6.5/30) com deslocamento total de ar de até 185 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, desconsiderando-se a vazão de ar perdida e a quantidade de solução de cada frasco. Todo o sistema BIPER foi interligado a um temporizador digital com 9 ciclos diários (marca Exatron, modelo Tmds-bc), com o objetivo de promover aeração semi-contínua e programada, fornecida pelo compressor.

Os frascos de cultivo PET, utilizados no BIPER, foram esterilizados quimicamente, como descritos para o sistema MLE e os demais componentes foram previamente autoclavados a 121 °C durante 30 min.

2.2.4.2. Cultivo no Sistema BIPER

Para testar o efeito da aeração no desenvolvimento de *Bryum argenteum*, explantes com aproximadamente 0,2 mg foram transferidos para frascos de PET, contendo 1000 mL de solução, em três tratamentos. Os tratamentos 1 e 2 (Contr_P e Sac_P) foram cultivados por 45 dias, sem troca de solução nutritiva e o tratamento 3 (Contr_T) foi cultivado por 45 dias, com trocas de solução a cada 15 dias. Após as transferências dos explantes, cada unidade de biorreator foi montada e acoplada ao sistema BIPER com aeração semi-contínua, de modo que a cada 2:10 h o meio de cultura, contido nos frascos, permanecesse em constante aeração e

agitação por 30 minutos. O sistema BIPER foram cultivados em sala de crescimento, nas mesmas condições de luz e temperatura dos experimentos anteriores.

Esse experimento foi inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento, sendo cada frasco de PET uma repetição. O efeito da aeração no ganho de biomassa e no desenvolvimento de *B. argenteum* foi avaliado de forma quantitativa e qualitativa, como descrito para o sistema MLE. Adicionalmente, no tratamento com trocas quinzenais, as

soluções retiradas de cada frasco de PET tiveram o pH e o volume aferidos ao final de cada período de 15 dias. E ao término do cultivo (45 dias), foi realizado a média aritmética dos valores aferidos em cada período.

2.3. Análise de dados

O cálculo de aumento de biomassa levou em consideração apenas o crescimento quantitativo no final de cada período de cultivo. O índice de multiplicação (IC) do sistema MSS foi determinado pela fórmula: $(IC = (D_f - D_i) / D_i)$, onde D_f corresponde a média do diâmetro final da colônia e D_i ao diâmetro inicial do inóculo (Ruiz-Molina *et al.*, 2016). O índice de multiplicação (IC) dos sistemas MLA, MLE e BIPER foi determinado pela fórmula: $(IC = (B_f - B_i) / B_i)$, onde B_f corresponde a média da biomassa seca final e B_i à biomassa seca inicial do inóculo (Ruiz-Molina *et al.*, 2016).

Os dados foram submetidos à análise utilizando o software estatístico R (versão 3.5.2, 2018). A normalidade foi avaliada pelo teste *Shapiro-Wilk*, com níveis de significância a 5% de probabilidade. Como a distribuição dos dados não apresentaram distribuição normal, então a significância dos tratamentos foi avaliada pelo teste não paramétrico *Kruskall-Wallis* e as diferenças entre as concentrações foram comparadas pelo pós teste de *Dunn*, com níveis de

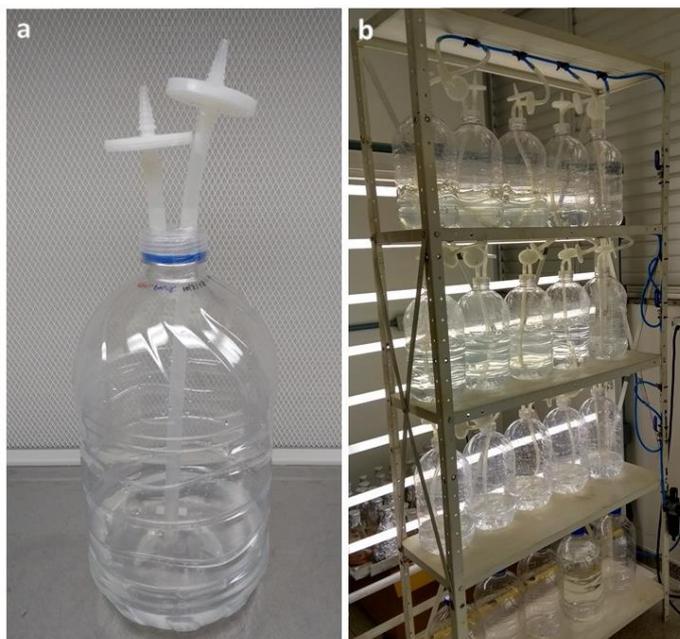


Figura 1: Biorreator de imersão permanente (BIPER). (a) Frasco de PET montado com filtros; (b) Sistema de biorreator composto por 15 frascos.

significância a 5% de probabilidade.

3. Resultados

3.1. Estabelecimento e desenvolvimento

Após o 5º dia de cultivo foi observado que o desenvolvimento de novo tecido vegetal ocorreu, principalmente, por meio de protonemas e de brotos. Estas estruturas cresceram nos gametófitos a partir da região apical, ao longo do caulídio (Fig. 2a) e nas axilas dos filídios (Fig. 2b). Além disso, foi observado também o desenvolvimento de protonemas nas regiões em que os filídios foram retirados (Fig. 2c), nos locais de fragmentação do caulídio (Fig. 2c-d) e a partir dos gametângios femininos (arquegônio). Não foi observado o desenvolvimento de tecido a partir de filídios ou de rizóides.

A formação de colônias de protonemas teve início no 10º dia de cultivo (Fig. 2e). Com cerca de 24 dias de cultivo, a colônia atingiu um diâmetro aproximado de 6 mm (Fig. 2f), e continha protonemas aptos a serem transferidos para os sistemas de cultivo. O desenvolvimento de botões gametofíticos provenientes de caulonemas foi observado entre o 18º e o 20º dia de cultivo (Fig. 2g). Por volta de 40 dias, foi possível notar gametófitos bem desenvolvidos, com até 0,4 cm de altura e gametângios em estágio inicial de desenvolvimento (Fig. 2h).

3.2. Cultivo em meio semissólido (MSS)

Todos os tratamentos realizados no sistema MSS induziram o crescimento das colônias de *B. argenteum*, como mostrado na Tabela 1. A análise de significância demonstrou que os tratamentos foram estatisticamente diferentes [$X^2(21) = 365.66$; $p < 2,2e^{-16}$]. As comparações múltiplas *a posteriori* revelaram que houve diferenças significativas na produção de biomassa nos tratamentos AIA, BAP, AG₃/AIA em todas as concentrações testadas e em AG₃/BAP a 0,1 µM, quando comparados aos tratamentos Contr e Sac. Com relação as concentrações de cada grupo de regulador, a produção de biomassa nos tratamentos AG₃ a 1 µM, AIA a 0,01 µM e AG₃/BAP a 0,1 µM foram os mais significativos (Fig. 3).

De maneira geral, os tratamentos do grupo AG₃ não influenciaram o aumento de biomassa quando comparados ao tratamento Contr, apresentando os menores índices de multiplicação (Tabela 1). Contudo, demonstrou as maiores variabilidades no crescimento das colônias em relação aos demais grupos de reguladores de crescimento (Fig. 3).

Os tratamentos dos grupos BAP e AG₃/AIA apresentaram índices de multiplicação relativamente mais altos em relação ao tratamento Contr (Tabela 1), porém apresentando poucas variações entre as medianas de cada concentração (Fig. 3) e semelhança estatística nas quatro concentrações (Fig. 3 - 3° L).

3.3. Cultivo em meio líquido sob agitação (MLA)

No geral, todos os tratamentos realizados no sistema MLA induziram o aumento da biomassa de *B. argenteum*, apresentando índices de multiplicação sempre maiores que o sistema MSS (Tabela 1) e com maiores variações entre as medianas de cada concentração em todos os grupos de reguladores de crescimento (Fig. 4).

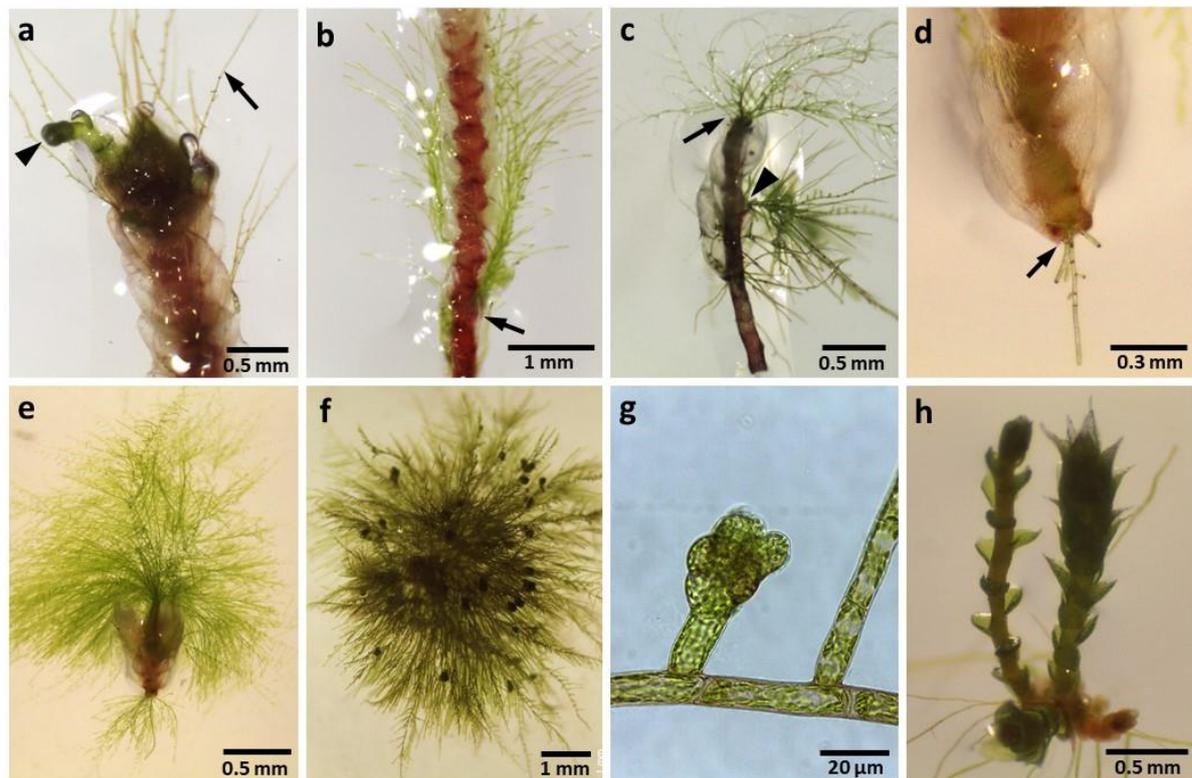


Figura 2: Desenvolvimento de *Bryum argenteum* em meio Knop. (a) Brotos (cabeça de seta) e protonemas (seta) formados no ápice do gametófito (7); (b) Protonemas formados na axila dos filídios (seta) (11); (c) Protonemas a partir do caulídio, na axila dos filídios retirados (cabeça de seta) e no local de segmentação apical (seta) (7); (d) Protonemas no local de segmentação basal (seta) do caulídio (10); (e) Fragmento apical com colônia inicial de protonemas (10); (f) Colônia de protonemas (24); (g) Botão gametofítico (20); (h) Gametófitos desenvolvidos (37). (Números em parênteses = dias de cultivo).

Tabela 1: Biomassa de *Bryum argenteum* cultivado nos sistemas: semissólido (MSS), por 30 dias, líquido sob agitação (MLA), por 45 dias, biorreator de imersão permanente (BIPER), por 45 dias e líquido estacionário (MLE), por 45 dias, contendo meio Knop sem sacarose (Contr), com sacarose (Sac), ácido giberélico (AG₃), 6-benzilaminopurina (BAP), ácido indol-3-acético (AIA) em diferentes concentrações e combinações. Cultivo em placa de Petri (p), cultivo em frasco de PET (P) e troca de meio a cada 15 dias (T). Diâmetro inicial das colônias = 0,3 cm; Biomassa inicial = 0,2 mg para MLA, MLE e BIPER.

| Tratamento ¹ | Sistema MSS | | Sistema MLA | |
|------------------------------|---|-----------------------|---------------------------------|-------------------------|
| | Diâmetro ² das Colônias (cm) | Taxa de multiplicação | Biomassa ³ seca (mg) | Índice de multiplicação |
| Contr | 1,53 ± 0,02 | 4,1 | 2,46 ± 0,29 | 11,3 |
| Sac | 1,43 ± 0,04 | 3,8 | 10,4 ± 0,45 | 51 |
| AG ₃ 0,01 | 1,09 ± 0,06 | 2,6 | 2,32 ± 0,08 | 10,6 |
| AG ₃ 0,1 | 0,96 ± 0,04 | 2,2 | 2,50 ± 0,38 | 11,5 |
| AG ₃ 0,5 | 0,87 ± 0,05 | 1,9 | 2,26 ± 0,17 | 10,3 |
| AG ₃ 1 | 1,32 ± 0,08 | 3,4 | 2,36 ± 0,05 | 10,8 |
| AIA 0,01 | 2,06 ± 0,04 | 5,9 | 2,76 ± 0,05 | 12,8 |
| AIA 0,1 | 1,82 ± 0,04 | 5,1 | 2,16 ± 0,21 | 9,8 |
| AIA 0,5 | 1,88 ± 0,05 | 5,3 | 1,68 ± 0,31 | 7,4 |
| AIA 1 | 1,93 ± 0,04 | 5,4 | 1,08 ± 0,24 | 4,4 |
| BAP 0,01 | 1,76 ± 0,04 | 4,9 | 2,08 ± 0,07 | 9,4 |
| BAP 0,1 | 1,71 ± 0,02 | 4,7 | 4,22 ± 0,18 | 20,2 |
| BAP 0,5 | 1,68 ± 0,03 | 4,6 | 2,02 ± 0,14 | 9,1 |
| BAP 1 | 1,72 ± 0,04 | 4,7 | 1,68 ± 0,12 | 7,4 |
| AG ₃ /AIA 0,01 | 1,84 ± 0,04 | 5,1 | 2,56 ± 0,36 | 11,8 |
| AG ₃ /AIA 0,1 | 1,83 ± 0,04 | 5,1 | 3,58 ± 0,80 | 16,9 |
| AG ₃ /AIA 0,5 | 1,82 ± 0,04 | 5,1 | 1,88 ± 0,20 | 8,4 |
| AG ₃ /AIA 1 | 1,74 ± 0,04 | 4,8 | 1,60 ± 0,12 | 7,5 |
| AG ₃ /BAP 0,01 | 1,25 ± 0,04 | 3,2 | 2,58 ± 0,07 | 11,9 |
| AG ₃ /BAP 0,1 | 1,83 ± 0,04 | 5,1 | 3,75 ± 0,25 | 17,8 |
| AG ₃ /BAP 0,5 | 1,38 ± 0,04 | 3,6 | 1,22 ± 0,10 | 5,1 |
| AG ₃ /BAP 1 | 1,43 ± 0,05 | 3,8 | 1,42 ± 0,07 | 6,1 |
| | Sistema MLA | | | |
| | Biomassa seca ³ (mg) | | Índice de multiplicação | |
| Contr ⁴ | 2,46 ± 0,29 | | 11,3 | |
| Sac ⁴ | 10,4 ± 0,45 | | 51 | |
| Sac/AG ₃ 0,1 | 5,0 ± 1,11 | | 24 | |
| Sac/BAP 0,1 | 23,18 ± 2,81 | | 114,9 | |
| Sac/AG ₃ /BAP 0,1 | 18,26 ± 1,38 | | 90,3 | |
| | Sistema MLE | | | |
| Contr_p | 1,74 ± 0,12 | | 7,7 | |
| Sac_p | 3,78 ± 0,16 | | 17,9 | |
| Contr_P | 2,28 ± 0,41 | | 10,4 | |
| Sac_P | 3,86 ± 0,14 | | 18,3 | |
| | Sistema BIPER | | | |
| Contr_P | 17,5 ± 8,3 | | 86,4 | |
| Sac_P | 347,8 ± 53,4 | | 1738,1 | |
| Contr_T | 75,3 ± 6,03 | | 375,6 | |

1 - Concentrações em µM;

2 - Média ± SE para 25 repetições; 3 - Média ± SE para 5 repetições;

4 - Dados repetidos para efeito de comparação.

A análise de significância demonstrou que a biomassa de *B. argenteum* cultivado nos tratamentos em sistema MLA foram estatisticamente diferentes [$X^2(21) = 83,982$; $p = 1,726e^{-09}$]. As comparações múltiplas *a posteriori* mostraram que houve diferença significativa nos tratamentos Sac e BAP a 0,1 μM em relação ao tratamento Contr. Quanto a diferença estatística entre as concentrações de cada grupo de regulador, os tratamentos AIA a 0,01 μM , BAP a 0,1 μM , AG₃/AIA a 0,1 μM e AG₃/BAP a 0,1 μM foram os mais significativos. Não foi verificada diferença estatística significativa nos tratamentos com reguladores de crescimento em relação ao tratamento Sac, bem como entre as concentrações do grupo AG₃ (Fig. 4).

Embora os tratamentos do grupo AG₃ não tenham demonstrado diferença significativa, a concentração 0,1 μM , que apresentou o maior aumento da biomassa dentro do grupo (Tabela 1; Fig. 4), elevou o índice de multiplicação no tratamento em que foi combinado com AIA, de 9,8 vezes para 16,4 vezes em AG₃/AIA a 0,1 μM .

Nos tratamentos dos grupos BAP e AG₃/BAP, a concentração 0,1 μM apresentou os maiores aumentos de biomassa, respectivamente 20,2 e 17,8 vezes (Tabela 1). Contudo, foi observado que o BAP, induziu a produção de botões gametofíticos anormais, com filídios atrofiados nas concentrações mais baixas (0,01 e 0,1) e, nas concentrações mais altas (0,5 e 1), essas

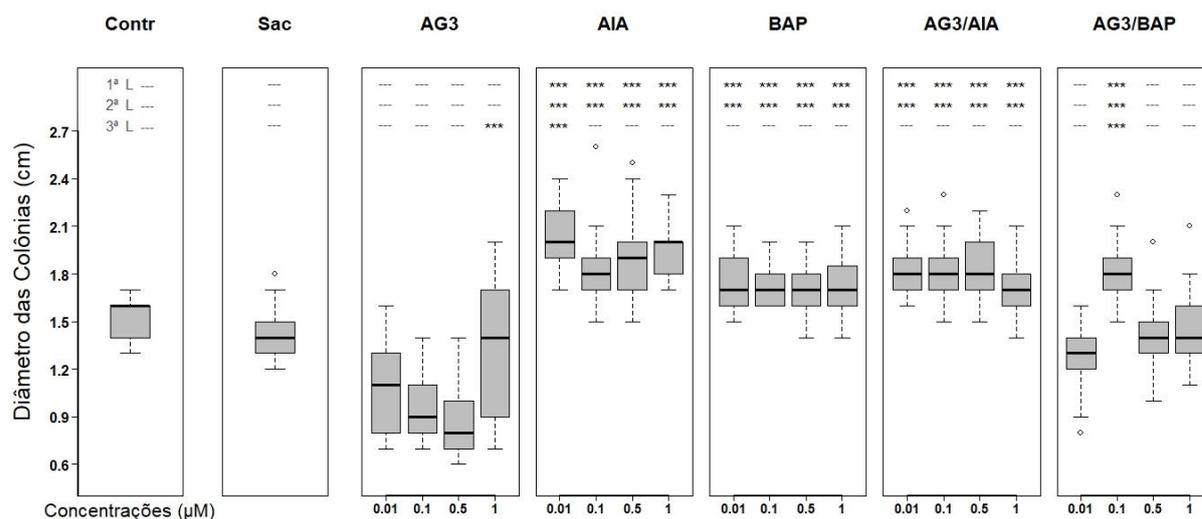


Figura 3: Influência dos reguladores de crescimento sobre o aumento do diâmetro das colônias de *Bryum argenteum*, cultivados em meio Knop semi-sólido (MSS), com e sem sacarose, e diferentes concentrações de ácido giberélico (AG₃), 6-benzilaminopurina (BAP), ácido indol-3-acético (AIA) e combinações, após 30 dias de cultivo. (***) Representa a diferença e (---) a semelhança estatística entre os tratamentos com significância $p < 0,05$, na primeira linha (1ª L) em relação ao controle (Contr), na segunda linha (2ª L) em relação ao tratamento com sacarose (Sac) e na terceira linha (3ª L) entre as concentrações de cada grupo de regulador de crescimento. (n = 25).

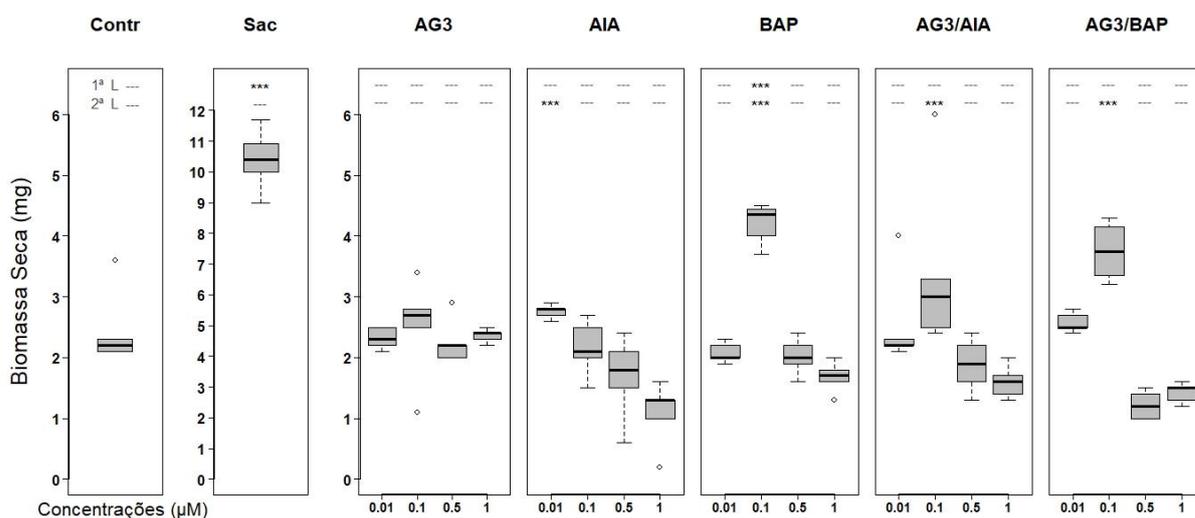


Figura 4: Influência dos reguladores de crescimento no ganho de biomassa de *Bryum argenteum*, cultivado em meio Knop líquido sob agitação (MLA), com e sem sacarose, e diferentes concentrações de ácido giberélico (AG₃), 6-benzilaminopurina (BAP), ácido indol-3-acético (AIA) e combinações, após 45 dias de cultivo. (***) Representa a diferença e (---) a semelhança estatística entre os tratamentos com significância $p < 0,05$, na primeira linha (1ª L) em relação ao controle (Contr) e na segunda linha (2ª L) entre as concentrações de cada grupo de regulador de crescimento. (n = 5)

características foram intensificadas progressivamente, podendo os filídios estarem ausentes. Nos tratamentos com AG₃/BAP, o aspecto morfológico do material vegetal cultivado foi similar ao observado nos tratamentos realizados com BAP isoladamente (Fig. 5a). Assim, os botões gametofíticos também cresceram de forma reduzida em concentrações mais baixas, apresentando filídios pouco desenvolvidos ou ausentes em concentrações mais altas, em comparação aos demais tratamentos, inclusive no tratamento Contr (Fig. 5b e c).

O cultivo de *B. argenteum* nos tratamentos com adição de sacarose também demonstrou diferença estatística [$X^2(4) = 21,89$; $p = 0,0002108$] e o pós teste revelou que as diferenças foram mais significativas nos tratamentos Sac, Sac/BAP a 0,1 µM e Sac/AG₃/BAP a 0,1 µM, em relação ao tratamento Contr, sendo que o tratamento Sac/BAP a 0,1 µM apresentou a maior significância dentro do grupo (Fig. 6a).

A adição de sacarose evidenciou a sua eficácia na produção de biomassa no sistema MLA, em relação ao tratamento Contr (Fig. 4, 5d-e). Além disso, nos demais tratamentos em que a sacarose foi incluída, houve o aumento de forma considerável nas taxas de multiplicação, passando de 11,5 no tratamento AG₃ a 0,1 µM para 24 vezes no tratamento Sac/AG₃ a 0,1 µM, de 20,2 no tratamento BAP a 0,1 µM para 114,9 vezes no tratamento Sac/BAP a 0,1 µM e de

17,8 no tratamento AG₃/BAP a 0,1 μM para 90,3 vezes no tratamento com Sac/AG₃/BAP a 0,1 μM, respectivamente (Tabela 1).

É importante salientar que o tratamento Sac/BAP a 0,1 μM, cultivado em MLA induziu o maior aumento de biomassa. No entanto, o aspecto morfológico de *B. argenteum* não foi satisfatório, pois ocorreu o desenvolvimento de plantas com botões gametofíticos reduzidos e com filídios pouco desenvolvidos.

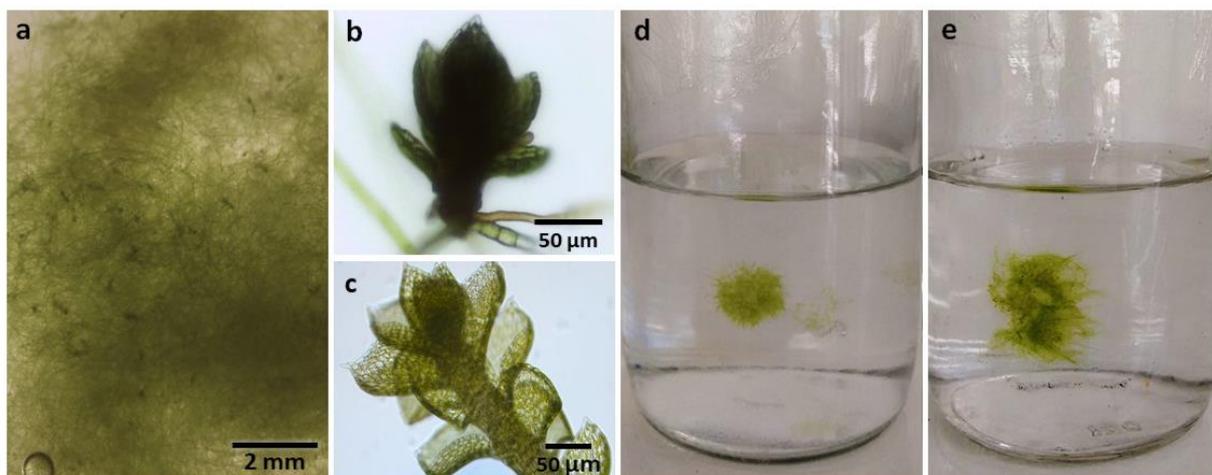


Figura 5: Desenvolvimento de *Bryum argenteum* no sistema líquido (MLA) após 45 dias de cultivo. (a) Meio Knop com adição de AG₃ a 0,1 μM; (b) Botão gametofítico no meio com adição de AG₃/BAP a 0,1 μM; (c) Gametófito jovem no meio sem adição de reguladores ou sacarose; (d) Meio Knop sem reguladores de crescimento ou sacarose; (e) Meio Knop com sacarose.

3.4. Cultivo em meio líquido estacionário (MLE)

O sistema de cultivo MLE também induziu o aumento da biomassa de *B. argenteum* (Tabela 1). Contudo, o volume de solução não influenciou de forma significativa no incremento da planta. Apesar disso, a análise de significância mostrou que os tratamentos, foram estatisticamente diferentes [$X^2(3) = 12,716$ p = 0,005294]. As comparações múltiplas a *posteriori* revelaram que não houve diferença significativa entre os tratamentos de volumes diferentes, Contr_P (1000 mL) em relação a Contr_p (10 mL) e Sac_P (1000 mL) em relação a Sac_p (10 mL). A significância foi verificada nos tratamentos com sacarose, sendo o Sac_p (10 mL) o mais eficiente dentre os quatro tratamentos (Fig. 6b).

De maneira similar, também não foram observadas diferenças nas características morfológicas no desenvolvimento de *B. argenteum* relacionadas ao volume de solução de cultivo. Contudo, a adição de sacarose no tratamento com volume de 1000 mL, melhorou o aspecto morfológico das plantas (Fig. 7a), assim como a manutenção do volume (Fig. 7d) e do pH da solução (Fig. 7e) durante o experimento. A quantidade de protonemas (Fig. 7b) e de gametófitos (Fig. 7c) se mantiveram sem alterações.

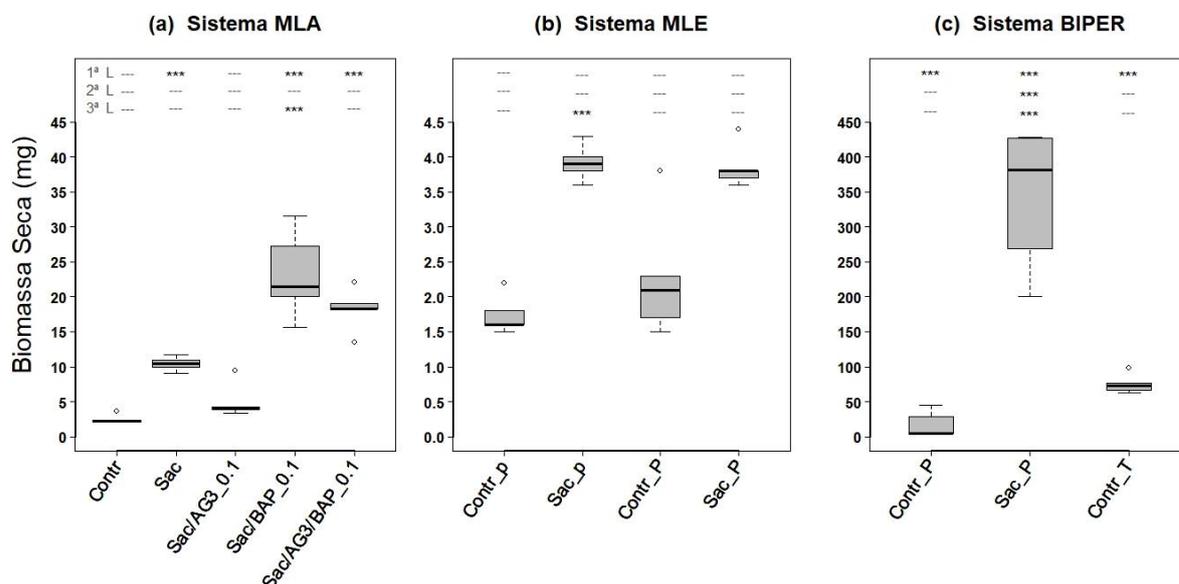


Figura 6: Biomassa de *Bryum argenteum* cultivado em três sistemas de cultivo. **a)** Sistema MLA (meio líquido sob agitação), com o cultivo em frascos contendo 180 mL de solução e combinações de sacarose (Sac), ácido giberélico (AG₃) e 6-benzilaminopurina (BAP); **b)** Sistema MLE (meio líquido estacionário); **c)** Sistema BIPER (Biorreator de imersão permanente). Controle sem sacarose (Contr), solução com sacarose (Sac), cultivo em placa de Petri contendo 10 mL de solução (p), cultivo em frasco de PET contendo 1000 mL de solução (P) e troca de meio a cada 15 dias (T). (***) Representa a diferença e (---) a semelhança estatística entre os tratamentos com significância $p < 0,05$, na primeira linha (1^a L) em relação ao tratamento Contr do sistema MLA, (2^a L) em relação ao tratamento Sac do sistema MLA e (3^a L) entre os tratamentos de cada sistema. (n = 5)

3.5. Cultivo em Biorreator de Imersão Permanente (BIPER)

O sistema BIPER foi o mais eficiente para o crescimento e produção de biomassa de *B. argenteum*. A análise de significância revelou que os tratamentos no sistema BIPER foram estatisticamente diferentes [$X^2(2) = 11,597$ $p = 0,003032$] e o pós teste demonstrou diferença significativa nos tratamentos Sac_P e Contr_T em relação ao tratamento Contr_P. Dentre os

três tratamentos, o Sac_P foi o mais eficiente para a produção de biomassa (Fig. 6c), o qual também foi bem superior ao tratamento Sac dos sistemas MLA (Fig. 6a) e MLE (Fig. 6b). Entretanto, todos os tratamentos no sistema BIPER, apresentaram diferença significativa em relação aos tratamentos Contr, nos sistemas MLA e MLE (Fig. 6).

Em comparação aos outros sistemas de cultivo testados, todos os tratamentos realizados no biorreator apresentaram taxas de aumento da biomassa significativamente maiores para todos os tratamentos correspondentes (Tabela 1, Fig. 6). Por exemplo, no tratamento Contr realizado em frascos de PET (volumes iguais), o índice de multiplicação subiu de 10,4 vezes no sistema MLE para 86,4 vezes no sistema BIPER. Já no tratamento Sac, subiu de 18,3 vezes no sistema MLE para 1.738 vezes no sistema BIPER (Tabela 1).

Quanto às características morfológicas de *B. argenteum*, o tratamento Contr_T foi o mais adequado para o desenvolvimento da planta. Nesse tratamento, o material cultivado apresentou os melhores aspectos morfológicos (Fig. 7a). Já no cultivo com sacarose, o aspecto das culturas apresentou sinais oxidação, com plantas de coloração amarelada ou escurecidas, após o período de cultivo (Fig. 8a-b). Quanto ao desenvolvimento de protonemas, notou-se que o cultivo no tratamento com meio sem sacarose (Contr_P) foi mais eficiente, demonstrando a maior quantidade, em relação aos demais tratamentos (Fig. 7b). O desenvolvimento de gametófitos foi mais favorável nos tratamentos com meio adicionado de sacarose (Sac_P) e com meio sem sacarose, mas com trocas quinzenais (Contr_T) (Fig. 7c).

No sistema BIPER, os tratamentos com 45 dias contínuos de cultivo apresentaram uma alta taxa de evaporação do meio de cultura. O tratamento com sacarose (Sac_P) teve a maior evaporação, com volume final da solução de aproximadamente 300 mL, enquanto no tratamento sem sacarose (Contr_P), o volume final foi de aproximadamente 450 mL (Fig. 7d). Além disso, nesses mesmos tratamentos se verificou uma diminuição do pH de 0,3 e 0,5 pontos, respectivamente (Fig. 7e).

As trocas de quinzenais se mostrou bastante relevante na diminuição dos efeitos negativos da aeração (evaporação da solução e diminuição do pH) (Fig. 8c). A troca da solução nutritiva a cada 15 dias favoreceu o desenvolvimento de *B. argenteum*, visto que as culturas apresentaram colônias com os melhores aspectos morfológicos, bem como resultou em um aumento de biomassa, a qual passou de uma produção média de 17,5 mg no cultivo contínuo (Contr_P), para 75,3 mg no cultivo com trocas quinzenais (Contr_T) (Tabela 1).

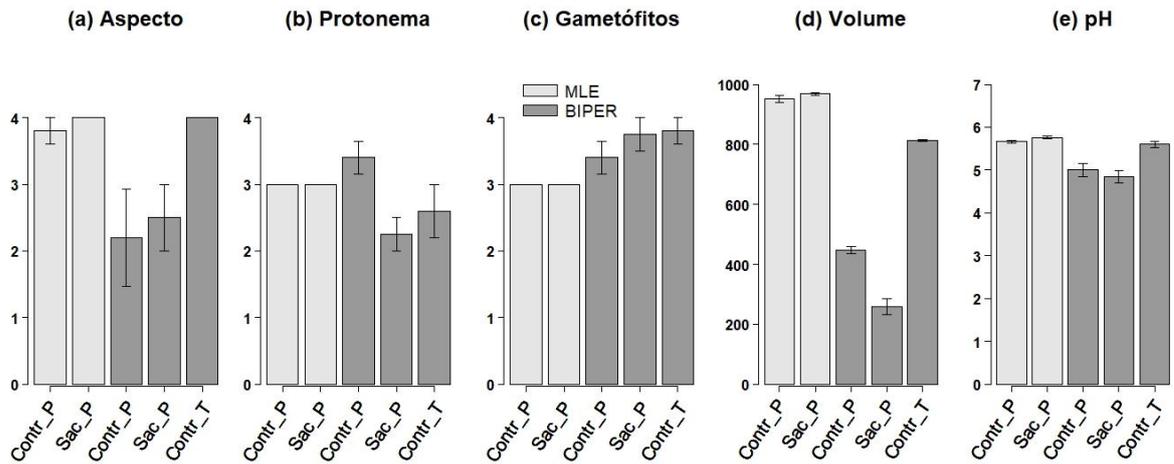


Figura 7: Características de *Bryum argenteum* cultivado no sistema MLE (meio líquido estacionário) e no sistema BIPER (Biorreator de imersão permanente). (a) Aspecto morfológico, (b) Quantidade de protonemas e (c) Quantidade de gametófitos, foram avaliados de forma qualitativa, onde foram atribuídos valores aos conceitos: Ruim = 1, Regular = 2, Bom = 3, Ótimo = 4); (d) Volume e (e) pH da solução, aferidos ao final de cada período de cultivo. Volume e pH iniciais, respectivamente, 1000 mL e 5,7. Os tratamentos Contr_P (solução sem sacarose) e Sac_P (solução com sacarose) foram cultivados por 45 dias corridos e o tratamento Contr_T, o meio foi trocado a cada 15 dias. (n = 5). Barra de erros = \pm SE



Figura 8: Cultivo *in vitro* de *B. argenteum* no sistema BIPER. Unidade de BIPER com biomassa em solução de Knop (a) com adição de sacarose (Sac_P), em 20 dias de cultivo; (b) com adição de sacarose (Sac_P), após 45 dias de cultivo; (c) sem adição de sacarose e com trocas quinzenais (Contr_T), após 45 dias de cultivo.

4. Discussão

A desinfestação de fragmentos do gametófito com o consequente estabelecimento de colônias, é considerada a etapa mais difícil para a propagação *in vitro* de briófitas (Sabovljević *et al.*, 2003; Duckett *et al.*, 2004). A fragilidade dos tecidos de algumas briófitas e o elevado grau de contaminação dos explantes são fatores que dificultam o processo de descontaminação e estabelecimento de culturas estéreis. Contudo, no presente trabalho, o desenvolvimento de um único explante sem contaminação foi suficiente para prosseguir com a propagação *in vitro* de *Bryum argenteum*. Resultado similar foi obtido por Rowntree *et al.* (2011) que trabalhou com propagação *in vitro* de espécies europeias de briófitas e por Pereira *et al.* (2019a, em submissão) em estudo sobre propagação de espécies de musgo do Cerrado.

A utilização de fragmentos do gametófito para o estabelecimento de culturas *in vitro* foi essencial para determinar o potencial regenerativo de *B. argenteum*, nessas condições de cultivo. Além disso, foi verificado que a regeneração do tecido ocorreu a partir do desenvolvimento de protonemas e de brotos, em gametófitos íntegros ou fragmentados, desde que parte do caulídio estivesse preservado. Tanto protonemas quanto brotos surgiram após o quinto dia de cultivo, e os botões gametofíticos após 20 dias. Outrossim, Chopra e Bhatla (1981) verificaram respostas similares em culturas axênicas da mesma espécie.

Após descontaminação e estabelecimento das culturas de musgos é possível realizar a multiplicação dessas plantas utilizando diferentes meios de cultura, sendo que os meios MS e Knop são os mais utilizados (Basile, 1975; Rowntree, 2006; Chen *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2010; Pandey *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2019a, em submissão). Meios semissólidos têm sido mais frequentemente utilizados nas pesquisas (Sabovljević *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2010). Entretanto, trabalhos recentes mostram que o cultivo em solução líquida tem favorecido o desenvolvimento das colônias, apresentando maior produção de biomassa (Capozzi *et al.*, 2016; Ruiz-Molina *et al.*, 2016; Itouga *et al.*, 2017).

É interessante observar que o cultivo de *Bryum argenteum* no sistema MSS apresentou o menor ganho de biomassa comparado aos demais sistemas de cultivo testados. No entanto, considerando que no cultivo em meio semissólido, sem adição de reguladores, foi observado o melhor desenvolvimento de gametófitos completos, com filídios, caulídios e rizóides. Assim, para estudos morfológicos da espécie, esse sistema para ser o mais adequado. Ainda, nessas condições, foi constatado que as colônias se mantiveram em condições de subcultivo por períodos superiores a um ano, apresentando, inclusive, o desenvolvimento de gemas

protonêmicas (Pereira *et al.*, 2019a, em submissão). Dessa forma, esse sistema também pode ser recomendado para a conservação da espécie a longo prazo.

Nos tratamentos com adição de AIA no sistema MSS, embora as colônias tenham apresentado os maiores diâmetros, os filamentos de protonemas cresceram com poucas ramificações secundárias, formando colônias de filamentos alongados e com baixa densidade de massa protonêmica. Assim, o método utilizado para quantificar o aumento da biomassa pode ter superestimado os resultados, visto que as características morfológicas não foram consideradas na avaliação no cultivo em meio semissólido (MSS). Por outro lado, nos tratamentos com BAP, nas mesmas condições de cultivo, as colônias cresceram com protonemas mais densos e com muitas ramificações, apresentando desenvolvimento de gametófitos na concentração mais baixa (0,01 μM), porém, com gametófitos anormais nas concentrações mais altas. Semelhantemente, foi mostrado que o efeito desta citocinina em meio semissólido, em baixas concentrações, estimula a formação de botões gametofíticos em *B. argenteum*, e que altas concentrações inibe o desenvolvimento dessas estruturas (Bijelović *et al.*, 2004).

Já no sistema MLA, os tratamentos com BAP a 0,1 μM , combinado ou não com AG₃, induziu um aumento maior na produção de biomassa. Entretanto, nesta concentração, a produção de botões gametofíticos anormais foi estimulada de forma mais expressiva, em comparação ao mesmo tratamento no sistema MSS. Embora a indução de botões gametofíticos em protonemas seja considerada um efeito importante das citocininas em musgos (Von Schwartzenberg, 2009), BAP em concentrações elevadas pode promover o desenvolvimento de botões com algum tipo de alteração morfológica. O aumento na produção de botões gametofíticos de *B. argenteum* também foi constatado por Liang *et al.* (2010) de modo semelhante, onde verificaram que na concentração 0,01 μM , esse regulador induziu a formação de botões, porém, em maiores concentrações apresentaram desenvolvimento anormal. A combinação de AG₃ e BAP promoveu o alongamento dos botões, todavia ainda insuficiente para o desenvolvimento morfológico característico da espécie.

A influência positiva no alongamento do gametófito, assim como no aumento da biomassa, foi verificada principalmente nos tratamentos com adição de AG₃ a 0,1 μM no sistema MLA (Fig. 4). Embora as giberelinas sejam raramente encontradas em briófitas, e quando são, ocorrem em baixíssimas concentrações (Drábková *et al.*, 2015), foi relatado que AG₃ a 0,1 μM antecipou o início do desenvolvimento de novos gametófitos (Liang *et al.*,

2010) e que, até a concentração de 3 μM , influenciou o aumento do diâmetro protonemal e do índice de multiplicação de *B. argenteum* cultivados *in vitro* (Sabovljević *et al.*, 2010).

O cultivo de *B. argenteum* em concentrações crescentes de AIA reduziu progressivamente o aumento de biomassa. Esse resultado pode estar diretamente ligado ao efeito supressor de ramificações laterais causadas pela adição de AIA exógena, uma vez que o ápice do gametóforo é o sítio de resposta ao AIA, como mostrou o estudo de Fujita *et al.* (2008) para *Physcomitrella patens*.

Efeito semelhante foi observado na região apical de protonemas de *B. argenteum* cultivado nos sistemas MSS e MLA. Nestes sistemas, a adição de diferentes concentrações de AIA não alterou as características morfológicas dos protonemas, que apresentaram desenvolvimento superior ao dos gametófitos, com filamentos protonemais longos e poucas ramificações secundárias. Em *P. patens*, a adição relativamente altas de concentrações de auxina ($\sim 1 \mu\text{M}$) inibem a ramificação protonemal, bem como o desenvolvimento secundário de cloronemas (Thelander *et al.*, 2017).

Independente da adição de sacarose, AG₃, BAP ou AIA, em quase todas as concentrações testadas, o incremento de biomassa foi maior no sistema MLA que no MSS. Nos cultivos em meio líquido, os nutrientes tendem a permanecer distribuídos mais uniformemente, tornando-os mais acessíveis para a planta, e, portanto, facilita a diferenciação regular de suas estruturas (Rahbar & Chopra, 1982; Reski & Abel, 1985). Neste contexto, solução de Knop tem sido frequentemente usada em experimentos com meio líquido em biorreatores, com o objetivo de produção em escala de musgos (Liang *et al.*, 2010; Beike *et al.*, 2014; Reski *et al.*, 2018).

A adição de sacarose no cultivo de *B. argenteum*, especialmente em meio líquido, foi muito eficiente para o aumento da biomassa nos três sistemas testados. De acordo com Sabovljević *et al.* (2005), o cultivo *in vitro* de *B. argenteum* com sacarose, embora em concentrações maiores (15 g.L⁻¹), em meio sólido, resultou no aumento do diâmetro do protonema e no índice de multiplicação. No presente estudo, principalmente nos cultivos em meio líquido, a inclusão de sacarose foi fundamental para o aumento da biomassa.

O sistema BIPER apresentou elevada eficácia para o cultivo de *B. argenteum*, com um índice produção de biomassa muito superior aos demais sistemas. O efeito da sacarose combinada com aeração no cultivo em meio líquido foi muito expressivo, promovendo um aumento de 18,3 vezes no sistema MLE para 1.738,1 vezes no sistema BIPER. Além do aumento de biomassa, o aspecto morfológico e a produção de gametófitos também foram

influenciados positivamente pela sacarose no sistema BIPER, assim como no MLE. Sabovljević *et al.* (2005) também observaram que a presença de sacarose, mesmo em meio sólido, resultou no aumento da taxa de crescimento em *B. argenteum*. A adição de sacarose, visando otimizar o ganho de biomassa no cultivo em biorreatores foi investigada na propagação em escala de *Sphagnum palustre*. Em 30 dias de cultivo foi observado, um aumento na biomassa de até 30 vezes (Beike *et al.*, 2014), evidenciando o efeito promotor da sacarose como fonte de carbono, no crescimento de musgos.

Contudo, apesar de haver relatos de que briófitas tem maior sucesso em culturas autotróficas (Rowntree 2006), os estudos que adotam o cultivo de musgos sem adição de fontes de carbono são basicamente voltados para a propagação de *P. patens*, visando a produção biofarmacêutica (Hohe *et al.*, 2002; Niederkrüger *et al.*, 2014; Reski *et al.*, 2015). Segundo Decker & Reski (2008), a produção de *P. patens* indica a necessidade de um meio basal simples e com dióxido de carbono como fonte de carbono, pois o desenvolvimento de produtos com valor farmacêutico deve ser compatível com a engenharia genética humana para evitar a perda funcional do produto terapêutico, no caso proteínas.

De acordo com Ruiz-Molina *et al.* (2016), o cultivo em soluções líquidas com a inclusão de uma fonte de carbono alterou o metabolismo de *Polytrichum juniperinum* resultando na diminuição do teor de clorofila e na hidrólise total da sacarose, após 30 dias de cultivo. Semelhantemente, ao que parece, no cultivo de *B. argenteum* com sacarose em MLA pode ter ocorrido perda de clorofila, visto que as culturas após 30 dias começaram a perder o aspecto esverdeado característico do material vegetal. Com isso, embora sem alterações morfológicas relevantes, a cultura passou a apresentar coloração amarelada. Esse tipo de alteração morfológica foi intensificado no sistema BIPER, com a aeração. Nesse sistema, também foi observado elevada evaporação da solução com a diminuição do pH de 5,7 para 4,9. Assim, possivelmente o aumento da acidez do meio de cultivo pode prejudicar o desenvolvimento de musgos em sistemas de cultura líquida. Consistente com essa ideia, foi constatado que para o cultivo de *Sphagnum* o pH ideal ficou entre 5 e 6 (Beike *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2018).

Em meio líquido, devido a maior disponibilidade de água e de nutrientes (Reski & Abel, 1985), a produção de biomassa pode ser influenciada por vários fatores. Culturas de células de *P. patens* em suspensão foram utilizadas em testes para otimizar o cultivo em biorreator semicontínuo, onde foi constatado o aumento da biomassa foi influenciado pela aeração, agitação, trocas frequentes de solução e controle do pH (Hohe & Reski, 2002; Niederkrüger *et al.*, 2014). Em outro estudo, com o cultivo de protonemas de *Funaria hygrometrica* Hedw. em

biorreator, a otimização da produção de biomassa também foi alcançada por uma aeração contínua, agitação, trocas periódicas do meio, e controle do pH, o que promoveu um rendimento de 290 vezes em 30 dias de cultivo (Itouga *et al.*, 2013).

Contudo, alguns procedimentos podem prejudicar o desenvolvimento de plantas, como verificado por Hohe e Reski (2002), com a adição de tartarato de amônio no cultivo de *P. patens* e por Liang *et al.* (2010), com a adição de concentrações elevadas de BAP no cultivo de *B. argenteum*. Resultados semelhantes também foram verificados no presente estudo, onde a adição de BAP, nos cultivos realizados em MLA, induziu a produção de gametófitos anormais, muito embora, nessas condições, tenha sido observado as mais elevadas taxas de biomassa (114,9 vezes).

É importante ressaltar que os biorreatores utilizados neste estudo, não dispunham de dispositivos internos controle de pH, evaporação, homogeneização da solução, bem como um sistema de fragmentação automatizada. O sistema do biorreator era simples, com itens de baixo custo. Ainda assim, o sistema, possibilitou um rendimento tão bom quanto ou melhor do que aqueles obtidos em biorreatores mais sofisticados e com diversas práticas de otimização de cultivo (Hohe & Reski, 2002; Itouga *et al.*, 2013).

Diante dos resultados observados, para o cultivo de *Bryum argenteum* em escala, o sistema BIPER com adição de sacarose e trocas periódicas do meio (cada 15 dias), tempo considerado suficiente para estimular o crescimento, diminuir o risco de contaminação, alterações no volume e pH, pareceu ser o mais adequado. Ainda, a adição de BAP (0,1 μ M), combinado com AG₃ se mostraram promissores, pois as características morfológicas dos gametófitos não interferiram na capacidade de regeneração em experimentos com crescimento em substratos naturais (dados não apresentados).

O alto rendimento de *B. argenteum* cultivado no sistema BIPER é de extrema relevância, haja vista o reconhecimento do seu potencial comercial. A otimização de métodos de propagação *in vitro* poderá subsidiar novos estudos briotecnológicos (biotecnologia de briófitas), com extensão a outras espécies, podendo também, ser utilizado no desenvolvimento de métodos que possibilitem a produção de musgos a baixo custo, com aplicabilidades em conservação e preservação.

5. Conclusão

O meio solidificado (MSS) foi o menos eficiente para estudos relacionados ao efeito de substâncias exógenas na taxa de multiplicação, utilizando-se o diâmetro das colônias como parâmetro. Ao contrário, o meio líquido sob agitação (MLA) apresentou resultados relevantes sobre a influência de reguladores de crescimento (AG₃, AIA e BAP), bem como da sacarose no desenvolvimento e produção de biomassa, apresentando melhor os efeitos em relação às diferentes concentrações e combinações testadas.

Embora o efeito de BAP tenha sido negativo com relação ao aspecto morfológico dos novos gametófitos, esta citocinina merece destaque por apresentar resultados satisfatórios no incremento de biomassa e precisa ser mais bem explorada, em combinação com outros reguladores de crescimento e em diferentes condições do cultivo.

De forma geral, todos os tratamentos nos sistemas de cultivo influenciaram positivamente no aumento de biomassa. A adição de sacarose estimulou, significativamente, o aumento da biomassa em cultivo com meio líquido, sendo que o volume de solução não apresentou relevância no aumento de biomassa. Assim, as melhores condições para a propagação *in vitro* de *B. argenteum* foram obtidas no cultivo em solução líquida sob agitação (MLA), com a adição de sacarose e BAP a 0,1 µM. Adicionalmente, cultivo em Biorreator com trocas de solução a cada 15 dias e adição de sacarose, notadamente o mais eficiente.

Agradecimentos

À CAPES, pela bolsa de doutorado, concedido à autora. Aos colegas do laboratório de Criptógamas da Universidade de Brasília, especialmente aos Drs. Paulo Câmara, Micheline Carvalho e Graça Machado, por ceder espaço no laboratório para manuseio e identificação das briófitas. Ao Dr. Eduardo Amorim, por suas contribuições na análise estatística. À Dra. Lúcia Helena, Dr. Hugo Teixeira, Dra. Patrícia Monah e Vinícius Olenca, pela ajuda e orientações na montagem do Biorreator.

6. Referências Bibliográficas

Anderson, M., Lambrinos, J. & Schroll, E. 2010. The potential value of mosses for stormwater management in urban environments. *Urban ecosystems*, **13**(3), 319-332.

- Basile, D. V. 1975. A comparison of some macronutrient media used to culture bryophytes. **Bryologist**, 403-413.
- Beike, A. K., Decker, E. L., Frank, W., Lang, D., Vervliet-Scheebaum, M., Zimmer, A. D. & Reski, R. 2010. Applied bryology–bryotechnology. **Tropical Bryology**, 31, 22-32.
- Beike, A. K., Spagnuolo, V., Lüth, V., Steinhart, F., Ramos-Gomez, J., Krebs, M., Adamo, P., Rey-Asensio, A. I., Fernandez, J. A., Giordano, S., Decker, E. L. & Reski, R. 2014. Clonal *in vitro* propagation of peat mosses (*Sphagnum* L.) as novel green resources for basic and applied research. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 120(3), 1037-1049.
- Bijelović, A., Sabovljević, M., Grubisic, D. & Konjevi, R. 2004. Phytohormone influence on the morphogenesis of two mosses (*Bryum argenteum* Hedw. and *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv.). **Israel journal of plant sciences**, 52(1), 31-36.
- Bordin, J. & Yano, O. 2009. Briófitas do centro urbano de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. **Hoehnea**, 36(1), 7-71.
- Câmara, P. E. A. S. 2008. Musgos acrocárpicos das matas de galeria da Reserva Ecológica do IBGE, RECOR, Distrito Federal, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, 22(4), 1027-1035.
- Capozzi, F., Giordano, S., Di Palma, A., Spagnuolo, V., De Nicola, F. & Adamo, P. 2016. Biomonitoring of atmospheric pollution by moss bags: Discriminating urban-rural structure in a fragmented landscape. **Chemosphere**, 149, 211-218.
- Cid, P. B., Cruz, A. R. R. & Teixeira, J. M. 2002. Biorreatores de imersão permanente. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. 25, 50-53.
- Costa, D. P. da, Almeida J. S. dos S., Dias, N. dos S., Gradstein, S. R. & Churchil, S. P. 2010. **Manual de Briologia**. Editora Interciência.
- Chandra, S., Chandra, D., Barh, A., Pandey, R. K. & Sharma, I. P. 2017. Bryophytes: Hoard of remedies, an ethno-medicinal review. **Journal of traditional and complementary medicine**, 7(1), 94-98.

- Chen, Y. Y., Lou, Y. X., Guo, S. L. & Cao, T. 2009. Successful tissue culture of the medicinal moss *Rhodobryum giganteum* and factors influencing proliferation of its protonemata. *In: Annales Botanici Fennici*. **46**(6), pp. 516-524.
- Chopra, R. N. & Bhatla, S. C. 1981. Effect of physical factors on gametangial induction, fertilization and sporophyte development in the moss *Bryum argenteum* grown *in vitro*. *New phytologist*, **89**(3), 439-447.
- Cuvertino-Santoni, J. & Montenegro, G. 2013. Bioprospecting a tool to conserve Chilean bryophytes. *Gayana Bot*, **70**, 1.
- Decker, E. L. & Reski, R. 2004. The moss bioreactor. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**(2), 166-170.
- Decker, E. L. & Reski, R. 2007. Moss bioreactors producing improved biopharmaceuticals. *Current Opinion in Biotechnology*, **18**(5), 393-398.
- Decker, E. L. & Reski, R. 2008. Current achievements in the production of complex biopharmaceuticals with moss bioreactors. *Bioprocess and biosystems engineering*, **31**(1), 3-9.
- Decker E. L., Parsons J. & Reski R. 2014. Glyco-engineering for biopharmaceutical production in moss bioreactors. *Front. Plant Sci.* **5**:346.
- Deora, G. S. & Guhil, N. 2018. Comparative study on the extracts of *Bryum argenteum* and synthetic fungicide against some common diseases of *Zea mays*. *Int. J. of Life Sciences*, **6**(1), 217-221.
- Drábková, L. Z., Dobrev, P. I. & Motyka, V. 2015. Phytohormone profiling across the bryophytes. *PLoS One*, **10**(5), e0125411.
- Duckett, J. G., Burch, J., Fletcher, P. W., Matcham, H. W., Read, D. J., Russell, A. J. & Pressel, S. 2004. *In vitro* cultivation of bryophytes: a review of practicalities, problems, progress and promise. *Journal of Bryology*, **26**(1), 3-20.

- Fernández, J. A. & Carballeira, A. 2000. Differences in the responses of native and transplanted mosses to atmospheric pollution: a possible role of selenium. **Environmental Pollution**, *110*(1), 73-78.
- Fujita, T., Sakaguchi, H., Hiwatashi, Y., Wagstaff, S. J., Ito, M., Deguchi, H., Sato, T. & Hasebe, M. 2008. Convergent evolution of shoots in land plants: lack of auxin polar transport in moss shoots. **Evolution & development**, *10*(2), 176-186.
- Glime, J. M. 2017. Construction. Chapt. 5. In: Glime, J. M. **Bryophyte Ecology**. Volume 2. Uses. Ebook sponsored by 5-1-1 Michigan Technological University and the International Association of Bryologists. Last updated 5 November 2017 and available at.
- Henes, B., Züllli, F., Niederkrüger, H., Schaaf, A., Frischmuth, T., Decker, E. L. & Reski, R. 2018. The magic of moss. **Soap Perfum Cosmet**, *91*, 64-66.
- Hohe, A., Decker, E., Gorr, G., Schween, G. & Reski, R. 2002. Tight control of growth and cell differentiation in photoautotrophically growing moss (*Physcomitrella patens*) bioreactor cultures. **Plant Cell Reports**, *20*(12), 1135-1140.
- Hohe, A. & Reski, R. 2002. Optimisation of a bioreactor culture of the moss *Physcomitrella patens* for mass production of protoplasts. **Plant Science**, *163*(1), 69-74.
- Hohe, A., Schween, G. & Reski, R. 2000. Establishment of a semi-continuous bioreactor culture of *Physcomitrella patens* for mass production of protoplasts. In: IV International Symposium on **In vitro Culture and Horticultural Breeding** *560*, 425-428.
- Itouga M., Komatsu Y., Sakakibara H. & Kawakami S. 2013. Moss protonemata for metal recovery. **Resources Processing** *60*: 84-89.
- Itouga, M., Hayatsu, M., Sato, M., Tsuboi, Y., Kato, Y., Toyooka, K., Suzuki S., Nakatsuka, S., Kawakami, S., Kikuchi, J. & Sakakibara, H. 2017. Protonema of the moss *Funaria hygrometrica* can function as a lead (Pb) adsorbent. **PloS one**, *12*(12), e0189726.
- Jing, L., Wenjing, Q., Dan, S. & Zhengquan, H. 2013. Genetic transformation of moss plant. **African Journal of Biotechnology**, *12*(3).

- Jones, P. R. & Rosentreter, R. 2006. Gametophyte fragment growth of three common desert mosses on artificial and natural substrates. **The bryologist**, *109*(2), 166-172.
- Karpiński, T. M. & Adamczak, A. 2017. Antibacterial activity of ethanolic extracts of some moss species. **Herba Polonica**, *63*(3), 11-17.
- Knop, W. 1865. Quantitative Untersuchungen über die Ernährungsprozesse der Pflanze. **Die Landwirtschaftlichen Versuchs-Stationen**, *7*, 93-107.
- Liang, S. F., Sun, Y. & Zhu, R. L. 2010. *In vitro* micropropagation of *Bryum argenteum* Hedw. **Cryptogamie. Bryologie**, *31*(3), 233-239.
- Lucumi, A., Posten, C. & Pons, M. N. 2005. Image analysis supported moss cell disruption in photo-bioreactors. **Plant Biology**, *7*(03), 276-282.
- Michelfelder, S., Parsons, J., Bohlender, L. L., Hoernstein, S. N., Niederkrüger, H., Busch, A., ... & Frischmuth, T. 2017. Moss-produced, glycosylation-optimized human factor H for therapeutic application in complement disorders. **Journal of the American Society of Nephrology**, *28*(5), 1462-1474.
- Niederkrüger, H., Dabrowska-Schlepp, P. & Schaaf, A. 2014. Suspension culture of plant cells under phototrophic conditions. **Industrial Scale Suspension Culture of Living Cells**, 259-292.
- Pandey, V. K. & Mishra, R. & Chandra, R. 2014. *In vitro* culture of moss *Bryum Coronatum* Schwaegr.(Bryaceae) and its phytochemical analysis. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. *6*:307-3011.
- Peck, J. E. & Muir, P. S. 2001. Harvestable epiphytic bryophytes and their accumulation in central western Oregon. **The Bryologist**, *104*(2), 181-190.
- Pereira, C. G., Carvalho-Silva, M., Pereira, L. A. R. & Silveira, C. E. S. 2019 (em submissão). Indirect establishment increases the chances of *in vitro* propagation of Cerrado mosses – A new method. **Rodriguésia**

- Pisa, S., Biersma, E. M., Convey, P., Patiño, J., Vanderpoorten, A. Werner, O. & Ros, R. M. 2014. The cosmopolitan moss *Bryum argenteum* in Antarctica: recent colonisation or *in situ* survival?. **Polar biology**, **37**(10), 1469-1477.
- Prince, B. A. 2016. An Ecological Analysis of the Potential for Moss-Based Green Roof Design (Doctoral dissertation).
- R Core Team. 2017. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Organization: R Foundation for Statistical Computing. (Version 3.4.3) Vienna, Austria.
- Radu, D. M., Trautz, D. & Cantor, M. 2015. Moss: Decorative and Ecological Potential in Landscape. **Pro Environment/ProMediu**, **8**(21).
- Rahbar, K. & Chopra, R. N. 1982. Effect of liquid medium, activated charcoal and pH on the onset of reproductive phase in the moss *Bartramidula bartramioides*. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, **106**(2), 185-189.
- Raudenbush, Z., Greenwood, J. L., McLetchie, D. N., Eppley, S. M., Keeley, S. J., Castetter, R. C. & Stark, L. R. 2018. Divergence in Life-History and Developmental Traits in Silvery-Thread Moss (*Bryum argenteum* Hedw.) Genotypes between Golf Course Putting Greens and Native Habitats. **Weed Science**, **66**(5), 642-650.
- Raudenbush, Z., Keeley, S. J. & Basel, M. 2016. Effect of irrigation water pH and acidifying source on silvery-thread moss (*Bryum argenteum* Hedw.) establishment. **The Bryologist**, **119**(1), 1-7.
- Reski, R. 1998. Development, genetics and molecular biology of mosses. **Botanica Acta**, **111**(1), 1-15.
- Reski, R., Bae, H. & Simonsen, H. T. 2018. *Physcomitrella patens*, a versatile synthetic biology chassis. **Plant Cell Reports**, 1-9.
- Reski, R. & Abel, W. O. 1985. Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. **Planta** **165**: 354-358.
- Reski, R., Parsons, J. & Decker, E. L. 2015. Moss-made pharmaceuticals: from bench to bedside. **Plant biotechnology journal**. **13**(8), 1191-1198.

- Rowntree, J. K. 2006. Development of novel methods for the initiation of *in vitro* bryophyte cultures for conservation. **Plant cell, tissue and organ culture**, *87*(2), 191-201.
- Rowntree, J. K., Pressel, S., Ramsay, M. M., Sabovljević, A. & Sabovljević, M. 2011. *In vitro* conservation of European bryophytes. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, *47*(1), 55-64.
- Ruiz-Molina, N., Villalobos-López, M. Á. & Arias-Zabala, M. 2016. Protonema suspension cultures of the medicinal moss *Polytrichum juniperinum*. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, *52*(4), 419-426.
- Sabovljević, A., Sabovljević, M., Grubisic, D. & Konjevic, R. 2005. The effect of sugars on development of two moss species (*Bryum argenteum* and *Atrichum undulatum*) during *in vitro* culture. **Belgian journal of botany**, *138*, 79-84.
- Sabovljević, A., Sabovljević, M. & Grubišić, D. 2010. Gibberellin influence on the morphogenesis of the moss *Bryum argenteum* Hedw. in *in vitro* conditions. **Archives of Biological Sciences**, *62*(2), 373-380.
- Sabovljević, M., Bijelović, A. & Grubišić, D. 2001. Bryophytes as a potential source of medicinal compounds. **Pregledniclanak–Review**, *21*, 17-29.
- Sabovljević, M., Bijelović, A. & Dragicevic, I. Č. 2003. *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. **Turkish journal of botany**, *27*(6), 441-446.
- Sabovljević, A., Sokovic, M., Sabovljević, M. & Grubisic, D. 2006. Antimicrobial activity of *Bryum argenteum*. **Fitoterapia**, *77*(2), 144-145.
- Sharp, A. J., Crum, H. & Eckel, P. 1994. The Moss Flora of Mexico. **Memoirs of The New York Botanical Garden**, *69*(1-2): 1-1113.
- Shaw, J., Beer, S. C. & Lutz, J. 1989. Potential for the evolution of heavy metal tolerance in *Bryum argenteum*, a moss. I. Variation within and among populations. **Bryologist**, 73-80.

- Shaw, A. J. & Albright, D. L. 1990. Potential for the evolution of heavy metal tolerance in *Bryum argenteum*, a moss. II. Generalized tolerances among diverse populations. **Bryologist**, 187-192.
- Stanković, J. D., Sabovljević, A. D. & Sabovljević, M. S. 2018. Bryophytes and heavy metals: a review. **Acta Botanica Croatica**, 77(2), 109-118.
- Studlar, S. M. e Peck, J. E. 2009. Extensive green roofs and mosses: reflections from a pilot study in Terra Alta, west Virginia. **Evansia**, 26 (2), 52-63.
- Tacoronte, B. M., León, Y., Olivo, A. & Vielma, M. 2009. Crecimiento *in vitro* de musgos del bosque nublado andino de Venezuela. **Revista Forestal Latino americana**, 24(2), 69-89.
- Teixeira, J. B. & Cid, L. P. B. 2010. Biorreatores para produção de mudas em larga escala. pp. 157- 176. In: Cid, L. P. B., Ed. Técnico. 2010. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Embrapa informações tecnológicas. Brasília, DF, 303 p.
- Thelander, M., Landberg, K. & Sundberg, E. 2017. Auxin-mediated developmental control in the moss *Physcomitrella patens*. **Journal of Experimental Botany**, 69(2), 277-290.
- Von Schwartzberg, K. 2009. Hormonal regulation of development by auxin and cytokinin in moss. **Annual Plant Reviews** 36:246-281.
- Yano, O. 1984. Briófitas. pp: 27-30, In: O. Fidalgo & Bononi V. L. R. (coords.). **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico**. Instituto de Botânica, São Paulo, Manual.
- Zhao, W., Li, Z., Hu, Y., Wang, M., Zheng, S., Li, Q., Wang, Y, Xu, L., Li, X., Zhu, R., Reski, R. & Sun, Y. 2018. Development of a method for protonema proliferation of peat moss (*Sphagnum squarrosum*) through regeneration analysis. **New Phytologist**, 221(2), 1160-1171.

Capítulo III

Efeito de reguladores de crescimento no ganho de biomassa e na morfologia de *Isopterygium tenerifolium* Mitt. (Pylaisiadelphaceae) cultivado *in vitro*

Resumo

O cultivo *in vitro* de briófitas, bem como o aperfeiçoamento da propagação vegetativa e estudos relacionados aos efeitos de substâncias exógenas, como reguladores de crescimento e açúcar, são fundamentais para o conhecimento do potencial propagativo das espécies. *Isopterygium tenerifolium*, amplamente distribuída no Brasil, é uma planta pleurocárpica, com caulídios rastejantes, crescendo em forma de tapetes. Apresenta gametófitos com ramificações livres, filídios ovados, assimétricos, verde-claros a amarelados. O objetivo desse trabalho foi cultivar *I. tenerifolium*, a partir de fragmentos dos gametófitos, bem como comparar o efeito dos reguladores de crescimento, em meio sólido e meio líquido, com relação a capacidade de desenvolvimento *in vitro*, ao ganho de biomassa e aos aspectos morfológicos. Após o estabelecimento de colônias de protonemas, explantes foram cultivados em meio semi-sólido (MSS) e meio líquido sob agitação (MLA), adicionados de Ácido giberélico (AG₃), Ácido indol-3-acético (AIA) e 6-Benzilaminopurina (BAP), nas concentrações 0,01; 0,1; 0,5 e 1 µM, isoladamente ou em diferentes combinações. O efeito da sacarose também foi testado em MSS e MLA. As análises morfológicas foram realizadas nas amostras cultivadas em MLA. Os resultados mostraram que o MLA foi mais eficiente para investigações sobre o efeito dos reguladores de crescimento na propagação *in vitro*. A adição de sacarose ao meio líquido estimulou, de forma relevante, o aumento da biomassa e intensificou os efeitos do ácido giberélico, o qual induziu a formação de brotos e aumentou as dimensões dos filídios. AIA a 1 µM causou efeito supressor de ramificações laterais. BAP inibiu o desenvolvimento dos filídios, diminuindo gradativamente as dimensões, porém induziu a produção de brotos. Assim a melhor condição para a propagação *in vitro* de *I. tenerifolium* foi verificada em MLA com adição de sacarose e AG₃ a 0,1 µM.

Palavras chaves: auxina, citocinina, ácido giberélico, morfologia, musgo, sacarose.

Effect of growth regulators on biomass gain and morphology of *Isopterygium tenerifolium* Mitt. (Pylaisiadelphaceae) cultivated *in vitro*

Abstract

The *in vitro* cultivation of bryophytes, as well as the improvement of vegetative propagation and studies related to the effects of exogenous substances, such as growth regulators and sugar, are fundamental for the knowledge of the propagation potential of the species. *Isopterygium tenerifolium*, widely distributed in Brazil, is a pleurocarpous plant, with crawling stem, growing in the form of carpets. It presents gametophytes with free branches, asymmetric ovate leaves, light green to yellowish coloration. The objective of this work was to cultivate *I. tenerifolium*, from fragments of gametophytes, as well as to compare the effect of growth regulators, in solid and liquid medium, regarding *in vitro* development capacity, biomass gain and aspects morphological. After the establishment of colonies of protonemata, explants were cultured in semi-solid medium (SSM) and liquid agitated medium (LAM), supplemented with gibberellic acid (GA₃), indole-3-acetic acid (IAA) and 6-benzylaminopurine (BAP) at concentrations of 0.01; 0.1; 0.5 and 1 µM, alone or in different combinations. The effect of sucrose was also tested on SSM and LAM. Morphological analyzes were carried out on samples cultured in LAM. The results showed that LAM was more efficient for investigations on the effect of growth regulators on *in vitro* propagation. The addition of sucrose to the liquid medium significantly stimulated biomass increase and intensified the effects of gibberellic acid, which induced shoot formation and leaves size increase. IAA at 1 µM caused side branch suppressor effect. BAP inhibited the development of leaves, gradually decreasing their size, but induced the production of shoots. Thus the best condition for the *in vitro* propagation of *I. tenerifolium* was verified in LAM with the addition of sucrose and GA₃ at 0.1 µM.

Keywords: auxin, cytokinin, gibberellic acid, morphology, moss, sucrose.

1. Introdução

O cultivo *in vitro* de briófitas tem sido cada vez mais utilizado como ferramenta em diferentes pesquisas. O aprimoramento de métodos para propagação em escala, visando a produção de culturas renováveis tem se mostrado imprescindível para estudos inovadores no âmbito biotecnológico, nas mais diversas áreas (Hohe & Reski, 2002; Beike *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2010; Capozzi *et al.*, 2016; Itouga *et al.*, 2017), uma vez que algumas pesquisas de potencial valor são realizadas com plantas oriundas do extrativismo, o que por muitas vezes inviabiliza a aplicabilidade de descobertas promissoras (Studlar & Peck, 2007; 2009).

Estudos realizados com fragmentos de gametófitos de musgos raros, como *Bryum schleicheri* var. *latifolium* e *Entosthodon hungaricus*, cultivados sob condições controladas, demonstraram sucesso na reintrodução de populações, em ambiente natural (Vanderpoorten & Hallingbäck, 2009; Sabovljević *et al.*, 2012). Dessa forma, o aperfeiçoamento da propagação vegetativa de musgos pode ser adaptado ao desenvolvimento de métodos que possibilitem a produção de musgos, a baixo custo, para utilização em conservação e preservação, assim como no paisagismo, o que pode ampliar o interesse econômico e ecológico dessas plantas (Anderson *et al.*, 2010; Radu *et al.*, 2015).

Alguns estudos relacionados à cultura axênica tiveram como propósito o aprimoramento da indústria de biofarmacêuticos (Reski *et al.*, 2015), de bioprospecção (Cuvertino-Santoni & Montenegro, 2013), de biotecnologia (manipulação genética) (Duckett *et al.*, 2004; Beike *et al.*, 2010; Niederkrüger *et al.*, 2014), de cosméticos (Henes *et al.*, 2018) ou biomonitoramento de poluição atmosférica (Capozzi *et al.*, 2016), bem como para a biorremediação de ambientes contaminados por metais pesados (Itouga *et al.*, 2013, 2017; Stanković *et al.*, 2018).

Adicionalmente, trabalhos relacionados aos efeitos de substâncias exógenas, como influência de açúcar (Beike *et al.*, 2014; Sabovljević *et al.*, 2005), de giberelinas (Sabovljević *et al.*, 2010) e fitormônios reguladores de crescimento no crescimento de protonemas e multiplicação dos gametófitos (Bijelović *et al.*, 2004; Cove *et al.*, 2006), são fundamentais para ampliar o conhecimento sobre o potencial propagativo da espécie e, conseqüentemente, a realização da escolha da planta mais adequada para atender as diferentes áreas das pesquisas.

Dentre os fitormônios reguladores de crescimento com efeito em briófitas, auxinas e citocininas desempenham funções básicas na regulação do desenvolvimento normal de musgos (Sabovljević *et al.*, 2014). Os estudos sobre os efeitos desses fitormônios na morfogênese de

musgos são concentrados em *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. (Decker *et al.*, 2006; Sabovljević *et al.*, 2014), e raramente em algumas outras espécies, como *Aloina aloides* (Schultz) Kindb., *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv., *Bryum argenteum* Hedw., *Homalothecium sericeum* (Hew.) Schimp. e *Pogonatum urnigerum* (Hedw.) P. Beauv., (Bijelović & Sabovljević, 2003; Bijelović *et al.*, 2004; Cvetić *et al.*, 2007; Erdağ *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2019b, em submissão).

Das espécies acima, apenas *H. sericeum* pertence ao grupo morfológico dos pleurocárpicos. Esse grupo apresenta como característica morfogenética em culturas axênicas, o predomínio do crescimento meristemático do gametófito e regeneração dos gametófitos por extensas ramificações, enquanto que os acrocárpicos apresentam predomínio de desenvolvimento protonemático por ramificações, anterior ao desenvolvimento de gametófitos (Awasthi *et al.*, 2012; 2016; Pereira *et al.* 2019a, em submissão). Assim sendo, essas diferenças morfológicas não são consideradas nos estudos relacionados a influências de substâncias exógenas ao desenvolvimento de musgos.

Isopterygium tenerifolium Mitt. é um musgo pleurocárpico, que se caracteriza por crescer formando tapetes, apresentando caulídios rastejantes e ramificados, com desenvolvimento de esporófitos na parte lateral do caulídio (Gradstein *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2010). Seus gametófitos são simples e livremente ramificados, podendo alcançar 4 cm de comprimento, com filídios assimétricos, ovados a ovado-lanceolados, de coloração verde-clara a amarelada (Sharp *et al.*, 1994; Yano & Câmara, 2004).

A espécie pertence a família a Pylaisiadelphaceae (Goffinet *et al.*, 2009) e apresenta distribuição Neotropical e nos EUA (Ochyra & Ireland, 2016). No Brasil é uma planta comum, apresentando registro em todas as regiões, bem como nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica (Peralta, 2015). Ocorre preferencialmente em ambientes mais úmidos e pouco ensolarados, colonizando substratos diversos, tais como solos, rochas, troncos de árvores e madeira em decomposição, podendo também ser encontrado em áreas urbanizadas (Ireland, 1992; Yano & Câmara, 2004; Câmara, 2008; Batista *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2018).

A literatura referente a essa espécie é restrita à taxonomia. Contudo, Pereira *et al.* (2019a, em submissão) realizaram um trabalho relacionado ao estabelecimento de culturas *in vitro* a partir de gametófitos de musgos do Cerrado, onde *I. tenerifolium* apresentou resultados satisfatórios de desenvolvimento e propagação.

Este estudo teve como objetivo cultivar *Isopterygium tenerifolium*, utilizando fragmentos dos gametófitos, bem como comparar as respostas aos efeitos de reguladores de crescimento e da sacarose em meio sólido e meio líquido, com relação a capacidade de desenvolvimento *in vitro*, ao ganho de biomassa e às características morfológicas.

2. Material e métodos

2.1. Preparação do material e condições de cultivo

Isopterygium tenerifolium Mitt. foi coletado no solo, entre a vegetação rasteira de campo aberto, em ambiente urbano, Samambaia, Brasília – DF, Brasil (15°53'33"S e 48°04'33"W), em maio de 2017. A amostra foi identificada no laboratório de criptógamas da Universidade de Brasília – UnB, com o auxílio de microscópio óptico, microscópio estereoscópico (lupa) e literatura especializada. O voucher (*Pereira, C.G.* 588) foi depositado no Herbário UB.

Após a confirmação da espécie, fragmentos mais jovens do gametófito foram selecionados e lavados em água corrente. Em seguida foram submetidos ao procedimento de desinfestação, no qual pequenas porções de material foram mergulhadas em álcool a 70% por 5 segundos e em solução de hipoclorito de sódio (alvejante comercial contendo de 2 a 2,5% de cloro ativo, NaClO), na concentração de 1% por 5 minutos, seguida de 3 enxagues em água estéril. Em placas de Petri, contendo meio solidificado, foram inoculados os fragmentos de gametófitos, que consistiam em filídios, caulídios, ápices, rizóides, brotos e gametófitos inteiros. As placas foram vedadas com filme plástico de PVC e cultivadas em sala de crescimento por 10 dias.

Os explantes descontaminados e com desenvolvimento foram transferidos e subcultivados por aproximadamente 30 dias. Neste período, os explantes cresceram e formaram colônias de gametófitos com capacidade para serem transferidas e utilizadas como inóculos iniciais nos experimentos com meio semi-sólido e meio líquido.

Todos experimentos foram realizados utilizando solução de Knop (Knop, 1865), com modificações, preparado com: 0,8 g/L de nitrato de cálcio [Ca(NO₃) 2.4H₂O]; 0,2 g/L de nitrato de potássio (KNO₃); 0,2 g/L de fosfato monopotássico (KH₂PO₄); 0,2 g/L de sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O); e água ultra pura. As soluções tiveram o pH ajustado para 5,7 ± 0,1 e foram autoclavados a 121 °C por 20 minutos. Os meios semi-sólidos foram solidificados com a adição de 7,5 g/L de ágar. A sacarose, quando utilizada, foi adicionada na proporção de 10 g/L.

Para os estudos relacionados aos efeitos dos reguladores de crescimento, inóculos de *Isopterygium tenerifolium* estabelecidos e subcultivados, foram transferidos para novas placas e cultivados em meio semi-sólido (MSS) e meio líquido sob agitação (MLA). Foram testados três reguladores: ácido giberélico (AG₃), ácido indol-3-acético (AIA) e 6-benzilaminopurina (BAP) e combinações de AG₃/AIA e AG₃/BAP, em partes iguais, nas mesmas concentrações. Além disso, também foi avaliado o efeito de uma fonte de carbono. Os tratamentos realizados com apenas solução de Knop foram denominados Contr e os tratamentos realizados com solução de Knop adicionado de sacarose foram denominados Sac.

Os experimentos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h de luz e intensidade luminosa de aproximadamente $41 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

2.2. Cultivo em meio semi-sólido (MSS)

Para a avaliação do efeito dos reguladores de crescimento no ganho de biomassa de *Isopterygium tenerifolium*, inóculos medindo aproximadamente 0,3 cm de diâmetro foram transferidos para novas placas de Petri contendo 15 mL de MSS por placa (90 x 15 mm), adicionados ou não de reguladores de crescimento em suas respectivas concentrações e combinações. Esse experimento foi organizado em 22 tratamentos. O tratamento 1 foi representado por Contr, os tratamentos de 2 a 21 por: AG₃, AIA, BAP, AG₃/AIA e AG₃/BAP nas concentrações 0,01; 0,1; 0,5 e 1 μM cada e o tratamento 22 por Sac (Tabela 1).

O experimento foi inteiramente casualizado, com 5 explantes por placa em 5 repetições, totalizando 25 explantes para cada tratamento. Após a transferência dos explantes as placas foram vedadas com plástico filme de PVC e mantidas em sala de crescimento por 30 dias. O efeito dos reguladores de crescimento, bem como da sacarose no desenvolvimento de *I. tenerifolium*, em condições de cultivo no MSS, foi avaliado de forma quantitativa, usando a medida do diâmetro da colônia após o período de cultivo, de acordo com Erdağ *et al.* (2015).

As medições foram realizadas com auxílio de um microscópio estereoscópico e uma régua, a qual foi posicionada sobre a placa de Petri fechada e em cada colônia o comprimento dos maiores seguimentos de gametófitos foram mensurados, sendo a região de inserção do inóculo transplantado considerada como ponto central do seguimento de reta para a aferição do diâmetro da sua circunferência.

2.3. Cultivo em meio líquido sob agitação (MLA)

Para a avaliação do efeito dos reguladores de crescimento no ganho de biomassa de *Isopterygium tenerifolium* cultivado em meio líquido sob agitação, os experimentos foram organizados em duas etapas consecutivas. Na primeira, sem sacarose, foram realizados 21 tratamentos conforme descritos no MSS. Na segunda etapa, foram realizados 7 tratamentos a fim de avaliar o efeito da adição de sacarose combinada com reguladores de crescimento, em diferentes concentrações (Sac; Sac/AG₃ 0,1 µM; Sac/AG₃ 1 µM; Sac/AIA 0,01 µM; Sac/AIA 1 µM Sac/BAP 0,1 µM e Sac/AG₃/BAP 0,1 µM). Em ambas as etapas, para efeito comparativo nos testes estatísticos, foram utilizados os tratamentos Contr e Sac.

Inóculos com o equivalente a 0,2 mg de massa seca, provenientes de material vegetal subcultivados em meio semi-sólido, foram transferidos para frascos de vidro com capacidade de 400 mL, contendo 180 mL de solução nutritiva. Após a transferência dos inóculos, os frascos foram vedados com duas camadas de plástico filme de PVC e mantidos sob agitação a 50 rpm em sala de crescimento por 45 dias.

O experimento foi inteiramente casualizado, com 5 repetições (frascos) para cada tratamento. O efeito dos reguladores de crescimento e da sacarose no desenvolvimento e no ganho de biomassa de *I. tenerifolium*, cultivados em MLA foram avaliados de forma quantitativa, usando a biomassa do peso seco após o término do período de cultivo.

A desidratação das plantas cultivadas ocorreu de forma natural, com o propósito de manter as características morfológicas da espécie. Para tanto, ao final do período de cultivo, as plantas de cada frasco foram colocadas em placas de Petri, forradas com papel filtro e mantidas em ambiente com temperatura controlada de 25 °C. Após 48 horas o material foi pesado e, posteriormente, a cada 24 horas, até a estabilização dos pesos.

2.4. Análises morfológicas

As análises morfológicas foram realizadas com base na morfometria do filídio, em que foram mensurados o comprimento (C) (Fig. 1a) e a largura (L) (Fig. 1b), e na quantificação de novas brotações (desenvolvimento de botões gametofíticos, brotos e ramificações).

Para isso, os materiais resultantes de 3 das 5 réplicas de cada tratamento, cultivados em MLA, foi reidratado e montado em lâminas semipermanentes, com Hoyer (Anderson, 1954). Em cada lâmina, foram realizados a contagem das brotações e também foram aferidas as medidas de cinco filídios, selecionados aleatoriamente, para cada uma das réplicas, totalizando

15 filídios para cada tratamento. As medições foram realizadas utilizando-se microscópio óptico marca Leica DM500, acoplado a uma câmera de microscópio digital marca Leica ICC50 com software Leica LAS EZ (v 3.2.0).

2.5. Análise de dados

O aumento da biomassa foi calculado levando-se em consideração apenas o crescimento quantitativo, após os períodos de cultivo. Os índices de crescimento (IC) nos cultivos em MSS ($IC = (D_f - D_i) / D_i$), foram determinados, onde D_f é a média do diâmetro final da colônia e D_i é o diâmetro inicial do inóculo (Ruiz-Molina *et al.*, 2016). Os índices de crescimento (IC) nos cultivos em MLA ($IC = (B_f - B_i) / B_i$), foram determinados, onde B_f é a média da biomassa seca final e B_i é a biomassa seca inicial do inóculo (Ruiz-Molina *et al.*, 2016).

Os dados foram submetidos à análise utilizando o software estatístico R (versão 3.5.2, 2018). A normalidade foi avaliada por *Shapiro-Wilk* teste, com níveis de significância a 5% de probabilidade. Como a distribuição dos dados não apresentaram distribuição normal, então a significância dos tratamentos foi avaliada pelo teste não paramétrico *Kruskall-Wallis* e as diferenças entre as concentrações foram comparadas pelo pós teste de *Dunn*, com níveis de significância a 5% de probabilidade.

3. Resultados

A inoculação de fragmentos de *Isopterygium tenerifolium* permitiu observar que o desenvolvimento de protonemas ocorreu, principalmente, a partir dos gametângios, produzidos lateralmente no caulídio (Fig. 2a), como verificado no gametângio masculino (anterídio) (Fig. 2b). Protonemas também se desenvolveram a partir do ápice de ramos (Fig. 2c) e da axila de filídios e de ramos, quando ambos foram destacados do gametófito (Fig. 2d). O crescimento de novos brotos (Fig. 2e) foi observado a partir de ramos, dando início a ramificações (Fig. 2f). Não foi constatado o desenvolvimento a partir de filídios ou de rizóides.

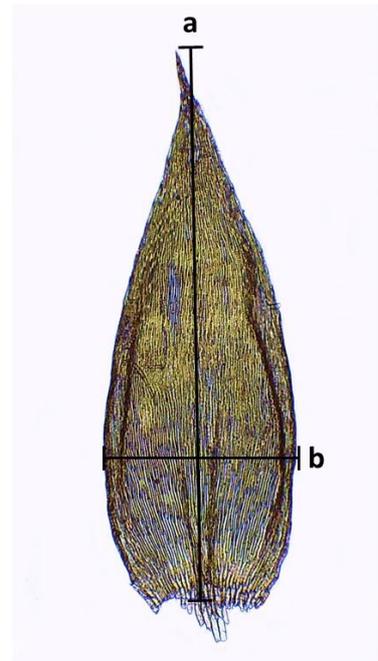


Figura 1: Caracteres morfológicos (Filídio *in situ*). (a) Comprimento (1,85 mm); (b) Largura (0,62 mm).

Após 30 dias de cultivo, *I. tenerifolium* se desenvolveu produzindo colônias com um diâmetro de aproximadamente 12 mm (Fig. 2g), constituídas predominantemente de segmentos de gametófitos, com ramificações apresentando comprimento suficiente para serem fragmentados e repicados. Foi observado o desenvolvimento de novos gametófitos iniciados de protonemas (Fig. 2h).

3.1. Cultivo em meio semi-sólido (MSS)

A análise de significância demonstrou que a biomassa de *I. tenerifolium* cultivado nos os tratamentos em MSS foram estatisticamente diferentes [$X^2(21) = 382,88$; $p < 2,2e^{-16}$]. As comparações múltiplas a *posteriori* mostraram que não houve diferença significativa nos tratamentos com reguladores de crescimento em relação ao tratamento Contr. Com relação à significância entre as concentrações de cada grupo de regulador, os tratamentos AG₃ a 0,1 μ M,

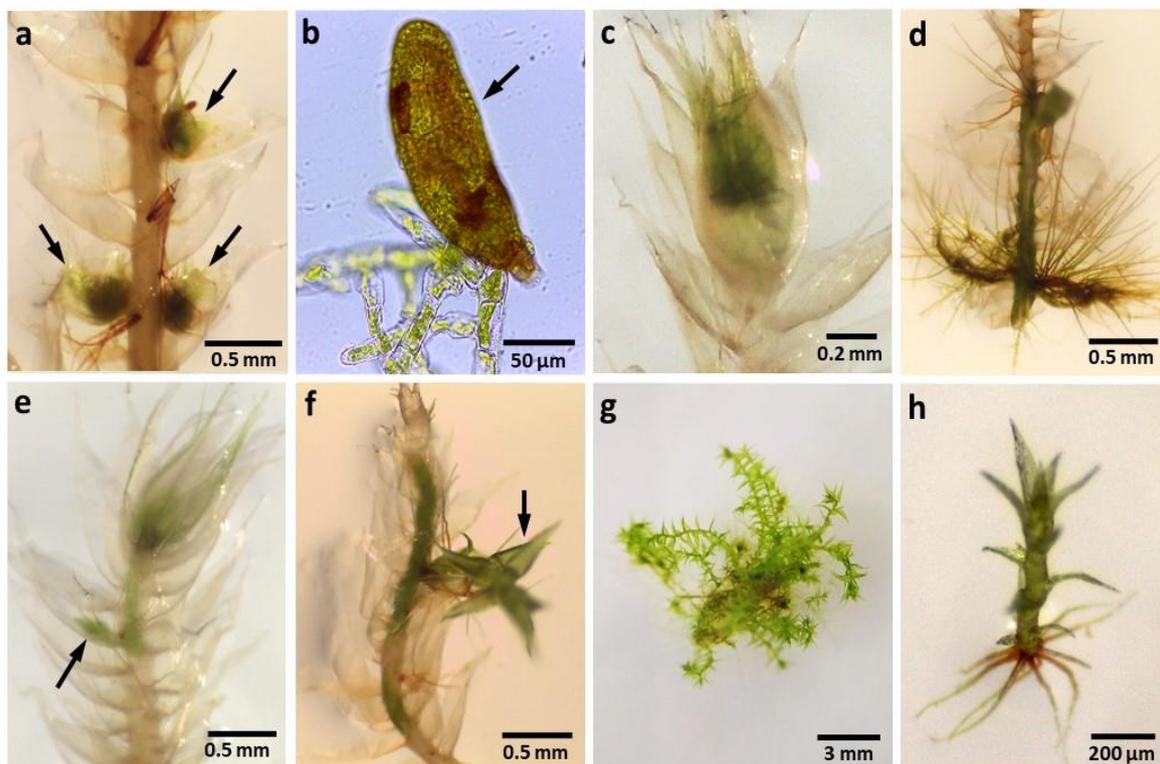


Figura 2: Desenvolvimento de *Isopterygium tenerifolium* *in vitro*. (a) Formação de protonema, em cultivos de 6 dias, a partir de gametângios (seta), (b) do anterídio (seta), (c) do ápice do caulídio e (d) no local de seção do segmento de caulídio; (e) Desenvolvimento de protonemas no ápice de ramos e surgimento de broto (seta) na axila do filídio; (f) Broto desenvolvido (seta), dando origem a um novo ramo; (g) Colônia de segmentos do gametófito com 30 dias de cultivo; (h) Gametófito jovem com desenvolvimento iniciado a partir de protonema.

AIA a 1 μM , BAP a 0,01 μM , AG₃/AIA a 0,1 μM e AG₃/BAP a 0,1 μM foram significativamente maiores. Os tratamentos Contr, AG₃ a 0,01, 0,1 e 0,5 μM , AIA a 0,01, 0,1 e 1 μM e AG₃/AIA a 0,01 e 0,1 μM também foram significativamente superiores em relação ao tratamento Sac (Fig. 3).

Contudo, de maneira geral, em todos os tratamentos foi observado a indução do crescimento. Mas, apenas os tratamentos com AG₃ 0,1 μM , AIA 0,1 e 1 μM e AG₃/AIA 0,1 μM apresentaram taxas de multiplicação maiores, em relação ao tratamento Contr (Tabela 1).

Os tratamentos dos grupos AG₃, AIA e Sac, apresentaram as maiores variações dos diâmetros dentro de cada tratamento, porém demonstrando homogeneidade no crescimento das colônias. Ao contrário, os tratamentos dos grupos BAP e AG₃/BAP demonstraram as menores variações dos diâmetros dentro de cada tratamento e com heterogeneidade no crescimento das colônias, sendo que BAP exibiu a menores variações em relação às concentrações 0,1, 0,5 e 1 (Fig. 3).

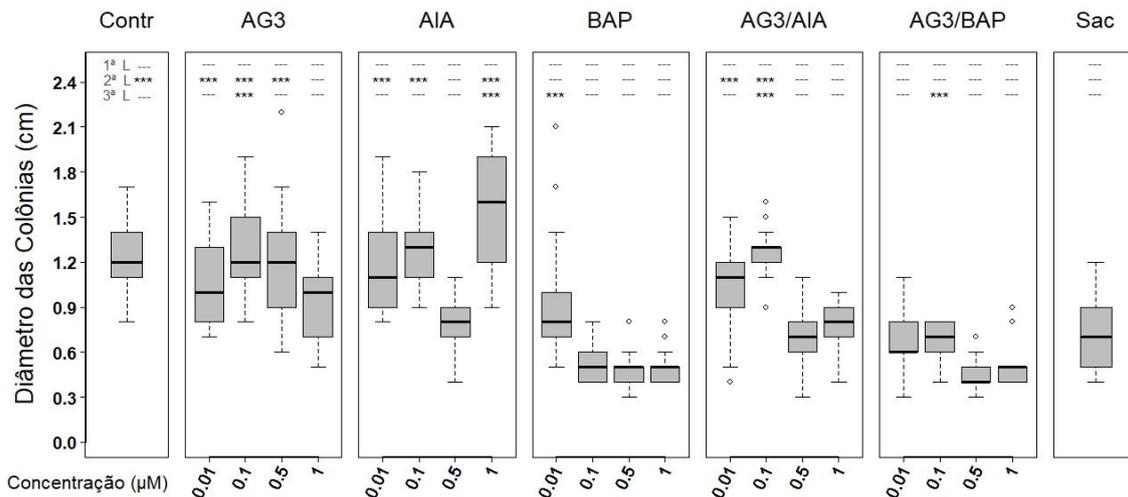


Figura 3: Influência dos reguladores de crescimento no aumento do diâmetro das colônias de *Iopterygium tenerifolium*, cultivados em meio Knop semi-sólido (MSS), com e sem sacarose, contendo diferentes concentrações de AG₃ (ácido giberélico), BAP (6-benzilaminopurina), AIA (ácido indol-3-acético) e combinações, após 30 dias de cultivo. (***) Representa a diferença e (---) a semelhança estatística entre os tratamentos com significância $p < 0,05$, na primeira linha (1^a L) em relação ao controle (Contr), na segunda linha (2^a L) em relação ao tratamento com sacarose (Sac) e na terceira linha (3^a L) entre as concentrações de cada grupo de regulador de crescimento. (n = 25).

Tabela 1: Influência comparativa do ganho de biomassa de *Isopterygium tenerifolium* cultivados em meio Knop semi-sólido (MSS) e meio Knop líquido sob agitação (MLA), com e sem sacarose, contendo AG₃ (ácido giberélico), BAP (6-benzilaminopurina), AIA (ácido indol-3-acético) e combinações, em diferentes concentrações, após 30 e 45 dias de cultivo, respectivamente. Diâmetro inicial das colônias = 0,3 cm; Biomassa inicial = 0,2 mg.

| Tratamento ¹ | Sistema MSS | | Sistema MLA | |
|--------------------------------------|---|-------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| | Diâmetro ² das Colônias (cm) | Índice de multiplicação | Biomassa ³ seca (mg) | Índice de multiplicação |
| 1 Contr | 1,24 ± 0,05 | 3,13 | 2,18 ± 0,07 | 9,9 |
| 2 AG₃ 0,01 | 1,07 ± 0,06 | 2,56 | 2,24 ± 0,08 | 10,2 |
| 3 AG₃ 0,1 | 1,27 ± 0,06 | 3,24 | 2,68 ± 0,07 | 12,4 |
| 4 AG₃ 0,5 | 1,18 ± 0,07 | 2,95 | 2,34 ± 0,11 | 10,7 |
| 5 AG₃ 1 | 0,92 ± 0,06 | 2,08 | 2,28 ± 0,17 | 10,4 |
| 6 AIA 0,01 | 1,17 ± 0,06 | 2,89 | 2,24 ± 0,07 | 10,2 |
| 7 AIA 0,1 | 1,30 ± 0,05 | 3,33 | 2,30 ± 0,08 | 10,5 |
| 8 AIA 0,5 | 0,77 ± 0,04 | 1,56 | 2,62 ± 0,12 | 12,1 |
| 9 AIA 1 | 1,55 ± 0,08 | 4,16 | 1,86 ± 0,07 | 8,3 |
| 10 BAP 0,01 | 0,92 ± 0,07 | 2,07 | 1,78 ± 0,10 | 7,9 |
| 11 BAP 0,1 | 0,53 ± 0,02 | 0,76 | 1,10 ± 0,09 | 4,5 |
| 12 BAP 0,5 | 0,46 ± 0,02 | 0,55 | 0,78 ± 0,04 | 2,9 |
| 13 BAP 1 | 0,49 ± 0,02 | 0,63 | 1,50 ± 0,14 | 6,5 |
| 14 AG₃/AIA 0,01 | 1,00 ± 0,06 | 2,33 | 1,74 ± 0,02 | 7,7 |
| 15 AG₃/AIA 0,1 | 1,28 ± 0,03 | 3,25 | 1,88 ± 0,15 | 8,4 |
| 16 AG₃/AIA 0,5 | 0,68 ± 0,04 | 1,28 | 1,92 ± 0,04 | 8,6 |
| 17 AG₃/AIA 1 | 0,76 ± 0,03 | 1,53 | 1,00 ± 0,11 | 4 |
| 18 AG₃/BAP 0,01 | 0,67 ± 0,04 | 1,23 | 1,42 ± 0,19 | 6,1 |
| 19 AG₃/BAP 0,1 | 0,68 ± 0,02 | 1,25 | 1,28 ± 0,14 | 5,4 |
| 20 AG₃/BAP 0,5 | 0,45 ± 0,02 | 0,51 | 0,80 ± 0,13 | 3 |
| 21 AG₃/BAP 1 | 0,50 ± 0,02 | 0,65 | 0,74 ± 0,05 | 2,7 |
| 22 Sac | 0,74 ± 0,05 | 1,45 | | |
| | Sistema MLA adicionado de sacarose | | | |
| | Biomassa seca ³ (mg) | | Índice de multiplicação | |
| 22 Sac | 10,92 ± 2,63 | | 53,6 | |
| 23 Sac/AG₃ 0,1 | 9,44 ± 1,33 | | 46,2 | |
| 24 Sac/AG₃ 1 | 4,43 ± 0,26 | | 21,1 | |
| 25 Sac/AIA 0,01 | 7,34 ± 0,60 | | 35,7 | |
| 26 Sac/AIA 1 | 3,10 ± 0,45 | | 14,5 | |
| 27 Sac/BAP 0,1 | 3,75 ± 0,31 | | 17,8 | |
| 28 Sac/AG₃/BAP 0,1 | 7,76 ± 0,52 | | 37,8 | |

1 - Reguladores de crescimento e suas respectivas concentrações em µM;

2 - Média ± SE para 25 repetições e 3 - Média ± SE para 5 repetições.

3.2. Cultivo em meio líquido sob agitação (MLA)

A análise de significância demonstrou que a biomassa de *I. tenerifolium* cultivado, sem sacarose, nos tratamentos em MLA foram estatisticamente diferentes [$X^2(21) = 97,03$; $p = 9,6e^{-12}$]. As comparações múltiplas *a posteriori* mostraram que houve diferença estatística, dentro dos grupos de concentrações de cada regulador, nos tratamentos AIA 0,5 μM , BAP a 0,01 μM e AG₃/AIA a 0,5 μM . Não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos com reguladores de crescimento e o Contr (Fig. 4a).

Nos tratamentos com sacarose, a análise de significância demonstrou diferença estatística [$X^2(7) = 28,62$; $p = 1,69e^{-4}$]. As comparações múltiplas *a posteriori* revelaram significância nos tratamentos Sac, Sac/AG₃ a 0,1 μM , Sac/AIA a 0,01 μM e Sac/AG₃/BAP a 0,1 μM em relação ao tratamento Contr, sendo o tratamento Sac/AG₃ a 0,1 μM o mais significativo entre os tratamentos com reguladores e sacarose (Fig. 4b).

De maneira geral, em todos os tratamentos em MLA foi observado o ganho de biomassa de *I. tenerifolium* (Tabela 1) (Fig. 5a-d). Os tratamentos do grupo AG₃ (as quatro concentrações) e AIA a 0,01, 0,1 e 0,5 μM , apesar da semelhança estatística, demonstraram índices de multiplicação maiores em relação ao tratamento Contr (Tabela 1).

Os tratamentos AG₃ a 1 μM , AIA a 0,5 μM , AG₃/AIA a 0,1 μM , AG₃/BAP a 0,5 μM (Fig. 4a), apresentaram as maiores variações no aumento da biomassa dentro de cada grupo de regulador. Como também nos tratamentos com adição de sacarose (Fig. 4b), com exceção do tratamento Sac/AG₃/BAP a 0,1 μM .

Todos os tratamentos com adição de sacarose apresentaram taxas de multiplicação superiores em relação ao tratamento Contr (Tabela 1), com destaque para o tratamento sem adição de reguladores de crescimento (Sac), que apresentou um incremento de biomassa relevante, com índice 5 vezes maior e com crescimento bastante homogêneo em relação aos demais tratamentos.

3.3. Análises morfológicas

A análise de significância demonstrou que o número de brotações produzidos em *I. tenerifolium*, cultivado nos tratamentos em MLA, sem sacarose, foi estatisticamente diferente [$X^2(21) = 58,37$; $p = 2,24e^{-5}$]. As comparações múltiplas *a posteriori* mostraram que os tratamentos BAP a 0,1, 0,5 e 1 μM , AG₃/AIA a 0,01 μM e AG₃/BAP (nas quatro concentrações) foram significativamente diferentes em relação ao tratamento Contr. O teste também mostrou

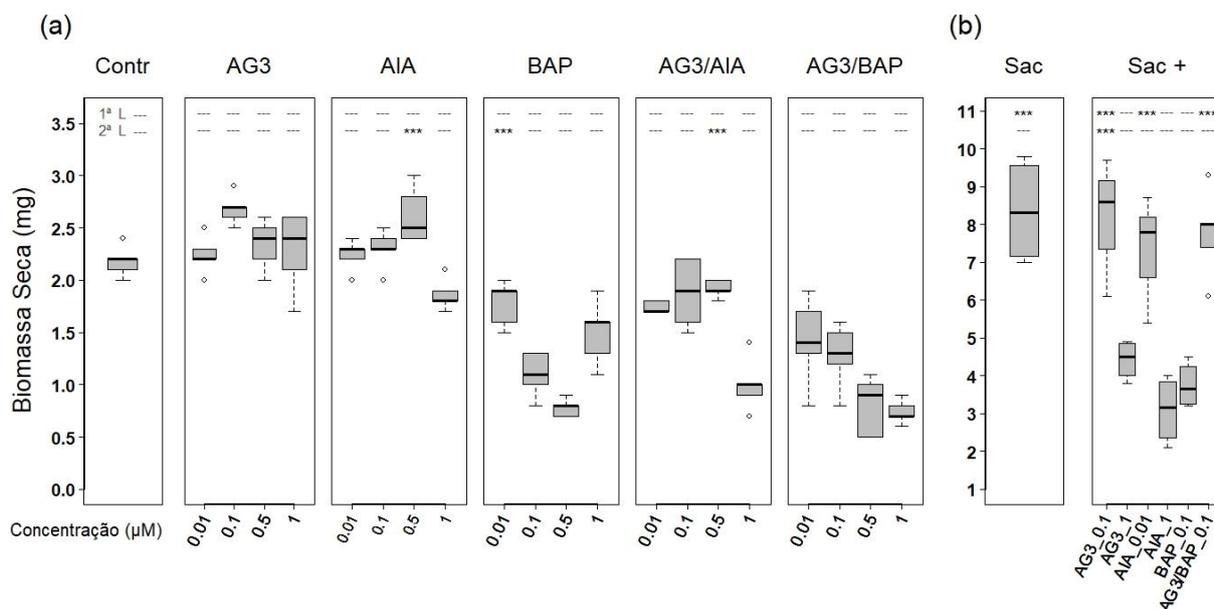


Figura 4: Influência dos reguladores de crescimento no ganho de biomassa de *Isopterygium tenerifolium*, cultivado em meio Knop líquido sob agitação (MLA). (a) Contendo AG₃ (ácido giberélico), BAP (6-benzilaminopurina), AIA (ácido indol-3-acético), sem adição de sacarose e (b) com adição de sacarose, ambos em diferentes concentrações e combinações, após 45 dias de cultivo. (***) Representa a diferença e (---) a semelhança estatística entre os tratamentos com significância $p < 0,05$, na primeira linha (1^a L) em relação ao controle (Contr) e na segunda linha (2^a L), entre as concentrações de cada grupo de regulador de crescimento. (n = 5)

que não houve diferença estatística entre as concentrações de cada grupo de regulador de crescimento, exceto em 0,01 do grupo AG₃/AIA (Fig. 6a).

Nos tratamentos em MLA com sacarose, os números de brotações também foram estatisticamente diferentes [$X^2(7) = 22,53$; $p = 2,29e^{-3}$]. As comparações múltiplas *a posteriori* mostraram que nos tratamentos Sac, Sac/AG₃ a 0,1 µM, Sac/AG₃ a 1 µM e Sac/BAP a 0,1 µM as brotações foram significativamente maiores em relação ao tratamento Contr. Da mesma forma, o tratamento Sac/AG₃ a 1 µM foi o mais significativo em relação aos demais tratamentos adicionados de sacarose (Fig. 6b).

O desenvolvimento de novos brotos (Fig. 5b), que dão origem a ramificações, e de botões gametofíticos (Fig. 5d e g), nos tratamentos sem sacarose foram bastante variáveis em todos os grupos de reguladores de crescimento. Os tratamentos AG₃/BAP a 0,1 µM e BAP a 1 µM apresentaram os maiores números de brotações. AG₃/BAP a 0,5 e 1 µM também apresentaram medianas elevadas, variando entre 500 e 600 brotações (Fig. 6a). Os demais tratamentos, em sua maioria, demonstraram menor variação no número de brotações

produzidas. Apenas os tratamentos AIA a 1 μM e Sac/AIA a 1 μM apresentaram valores inferiores ao tratamento Contr, bem como aos demais tratamentos (Fig. 6b).

As medidas morfométricas foram limitadas a dois caracteres do filídio (comprimento e largura), em razão das variações morfológicas relacionadas aos efeitos da adição de BAP, como o desenvolvimento de filídios muito pequenos, deformados ou ausentes. Assim, alguns caracteres morfológicos não apresentaram condições de serem mensurados com confiabilidade.

As análises de significância das medidas morfométricas de *I. tenerifolium* nos tratamentos em MLA, sem sacarose, revelaram diferença significativa nas dimensões dos filídios, tanto no comprimento [$X^2(21) = 244,56$; $p < 2,2e^{-16}$], quanto na largura [$X^2(21) = 264,52$; $p < 2,2e^{-16}$]. Contudo, as comparações múltiplas a posteriori, de ambos os caracteres, mostraram que os tratamentos com os reguladores de crescimento não foram significativos em relação ao tratamento Contr. Entretanto, acerca das concentrações dentro dos grupos de cada

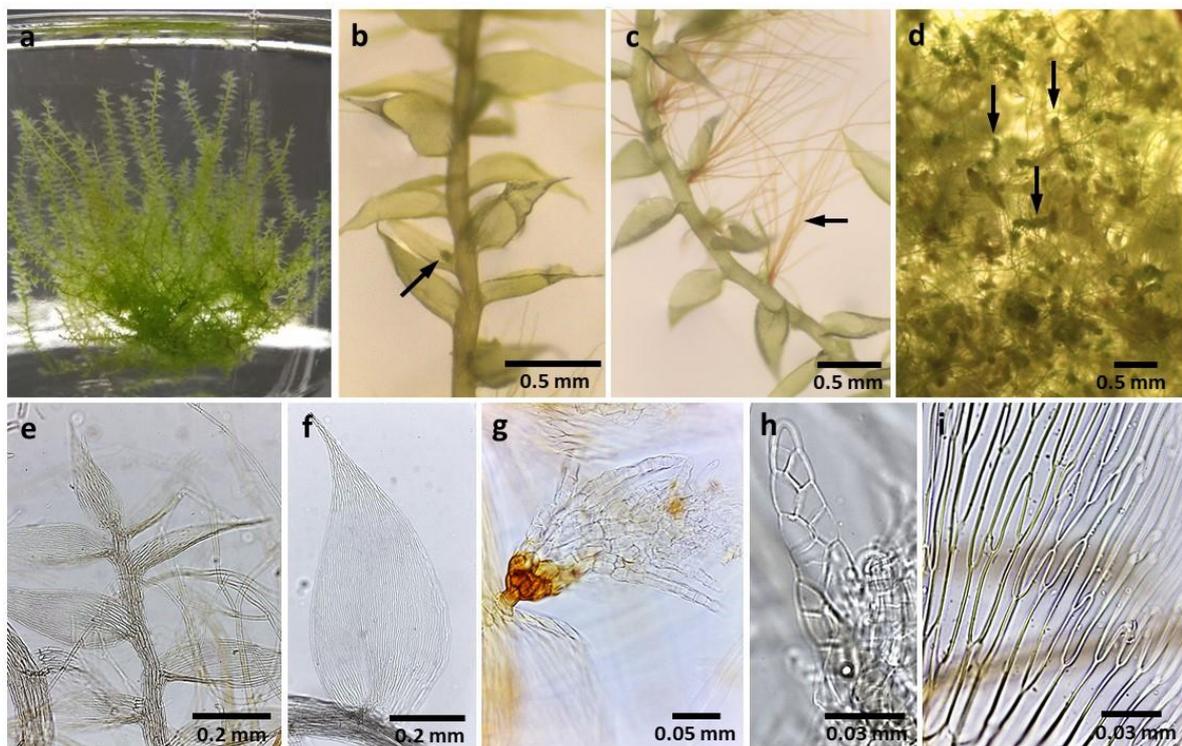


Figura 5: Aspecto morfológico de *Isopterygium tenerifolium* cultivado em meio líquido sob agitação (MLA). (a-d) Plantas frescas. (e-i) Plantas em lâminas semipermanentes. (a) Planta em solução de Knop; (b) Gametófito, com início de brotação (seta); (c) Gametófito em AIA a 0,1 μM , com rizóides desenvolvidos (seta); (d) Biomassa produzida em BAP a 0,1 μM , com botões gametofíticos; (e) Ápice do gametófito em AG₃ a 0,1 μM ; (f) Filídio em AIA a 0,5 μM ; (g) Botão gametofítico em BAP a 0,5 μM ; (h) Filídio com desenvolvimento anormal em AG₃/BAP a 0,5 μM e (i) Células da lâmina do filídio em Sac/AG₃ a 0,1 μM .

regulador, os tratamentos BAP a 0,01 μM , AG₃/AIA a 0,5 μM e AG₃/BAP a 0,01 μM apresentaram significância para ambos os caracteres (Fig. 7a).

Ainda que a utilização de reguladores de crescimento no cultivo de *I. tenerifolium* em MLA, sem sacarose, não tenha sido significativa nas análises morfométricas, foi observado variações morfológicas relacionadas aos efeitos dos reguladores como o desenvolvimento de rizóides em AIA (Fig. 5c) e de protonemas em AG₃ e BAP (Fig. 5d), além de redução do filídio, em AG₃ e AIA (Fig. 5e-f) e especialmente em BAP (Fig. 5g-h). Independente da combinação com AG₃, quanto maior a concentração de BAP menor as dimensões dos filídios (Fig. 7a).

Nos tratamentos com sacarose, as análises das medidas morfométricas também foram estatisticamente diferentes [$X^2(7) = 90,59$; $p < 2,2e^{-16}$] e [$X^2(7) = 90,51$; $p < 2,2e^{-16}$], para comprimento e largura, respectivamente. As comparações múltiplas *a posteriori* revelaram diferença significativa nas duas dimensões do filídio nos tratamentos Sac e Sac/AG₃ a 0,1 μM em relação ao tratamento Contr, sendo Sac/AG₃ a 0,1 μM o mais significativo em relação aos demais tratamentos com adição de sacarose (Fig. 7b).

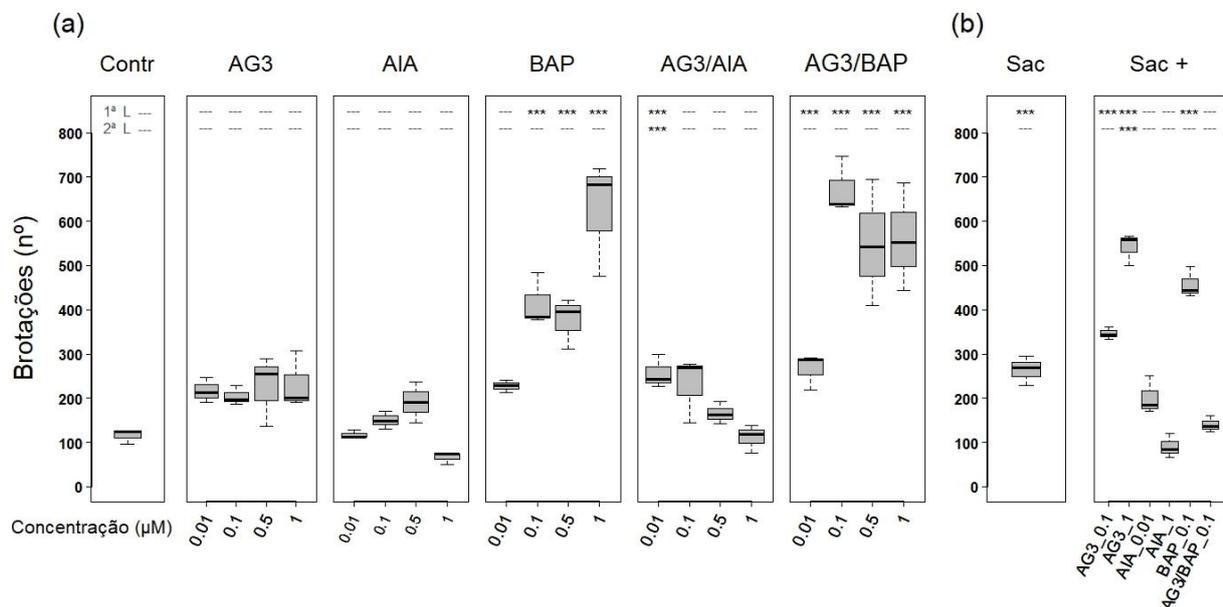


Figura 6: Influência dos reguladores de crescimento na produção de brotações de *Isopterygium tenerifolium* cultivado em meio líquido sob agitação (MLA). **(a)** Contendo AG₃ (ácido giberélico), BAP (6-benzilaminopurina), AIA (ácido indol-3-acético), sem adição de sacarose e **(b)** com adição de sacarose, ambos em diferentes concentrações e combinações, após 45 dias de cultivo. (***) Representa a diferença e (---) a semelhança estatística entre os tratamentos com significância $p < 0,05$, na primeira linha (1ª L) em relação ao controle (Contr) e na segunda linha (2ª L) entre as concentrações de cada grupo de regulador de crescimento. (n = 3)

Assim a adição de sacarose no cultivo de *I. tenerifolium* em MLA favoreceu o crescimento da planta em todos os tratamentos em que foi incluída, e com exceção de AG₃ 1 μM, essa fonte de carbono promoveu o aumento nas dimensões do filídio (Fig. 5i e 7b).

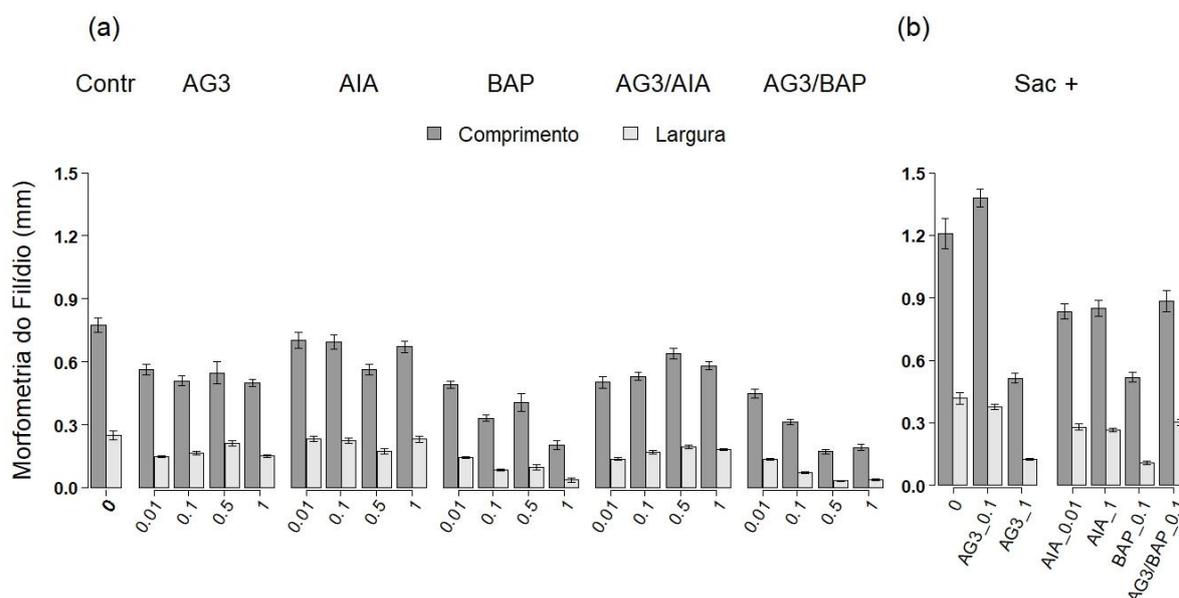


Figura 7: Influência dos reguladores de crescimento nas dimensões dos filídios de *Isopterygium tenerifolium* cultivado em meio líquido sob agitação (MLA). (a) Contendo AG₃ (ácido giberélico), BAP (6-benzilaminopurina), AIA (ácido indol-3-acético), sem adição de sacarose e (b) com adição de sacarose, ambos em diferentes concentrações e combinações, após 45 dias de cultivo. (n = 15). Barra de erros = ± SE.

4. Discussão

A realização do estabelecimento de culturas axênicas a partir de fragmentos de gametófitos foi essencial para o conhecimento do potencial regenerativo de *Isopterygium tenerifolium* em cultivo *in vitro*. Assim, foi verificado o desenvolvimento de protonemas em várias partes do gametófito, como nas regiões apicais dos ramos, gametângios, axilas dos filídios e dos ramos, e também de brotos a partir de ramos. O padrão de crescimento dos gametófitos e dos seus fragmentos em subculturas foi a produção de gametófitos folhosos e ramificados, formando colônias de pequenos tufos eretos.

Embora o estabelecimento de culturas axênicas de musgos, utilizando gametófitos como inóculo inicial seja reconhecidamente mais difícil (Sabovljević *et al.*, 2003; 2012; Duckett *et al.*, 2004), *I. tenerifolium* demonstrou bons percentuais de sucesso. De acordo com o trabalho

de Pereira *et al.* (2019a, em submissão), em condições semelhantes de cultivo, realizada com NaClO a 1% por 5 minutos, essa espécie apresentou desenvolvimento direto em 19% dos explantes e quando realizada com NaClO a 2% por 2 minutos apresentou desenvolvimento indireto em 43,5% dos explantes. Diferentemente dos resultados alcançados em *Vitalia cuspidifera* (Mitt.) P.E.A.S. Câmara, Carv.-Silva & W.R. Buck, espécie também pleurocárpica, que, não apresentou desenvolvimento direto e o desenvolvimento indireto ocorreu em apenas 7% dos explantes desinfestados nas mesmas condições Pereira *et al.* (2019a, em submissão).

Estudos morfogênicos comparativos de musgos acrocárpicos e pleurocárpicos, em culturas axênicas iniciadas de esporos indicam que, assim como na natureza, as espécies apresentam variações nas formas de crescimento, porém, nas condições *in vitro*, os padrões de crescimento podem ser influenciados pelo microambiente do sistema de cultivo (Awasthi *et al.*, 2012; 2016; Sabovljević *et al.*, 2012).

Em geral, a influência dos reguladores de crescimento, no ganho de biomassa de *I. tenerifolium* cultivado em solução de Knop, sem sacarose, solidificada ou líquida, foi muito similar em todos os tratamentos. Ambas as formas de cultivo não demonstraram aumento significativo da biomassa, relacionadas a adição dos reguladores de crescimento testados, em comparação aos controles. Adicionalmente, em MSS, foi necessário realizar cultivos de 30 dias, uma vez que, acima desse período, foi observada a ocorrência de necrose apical em alguns gametófitos, efeito que aumentou, progressivamente, em cultivos mais longos.

Nos tratamentos em MSS, os índices de multiplicação mais elevadas foram observadas nos tratamentos dos grupos AG₃ e AIA. Porém, verificou-se que o crescimento foi mais relevante no cultivo em MLA, uma vez que os índices de multiplicação foram sempre maiores, em todos os grupos de reguladores, quando a espécie foi cultivada em solução líquida. Além disso, a adição de sacarose em MLA, aumentou, consideravelmente, o crescimento, ao contrário do observado em MSS. Provavelmente, nos cultivos em solução líquida, os nutrientes permanecem distribuídos mais uniformemente, o que os tornam mais acessíveis para a planta, promovendo maior desenvolvimento (Rahbar & Chopra, 1982; Reski & Abel, 1985; Sarasan *et al.*, 2006). De fato, Pereira *et al.* (2019b, em submissão) observaram, um ganho de biomassa, quando cultivaram *Bryum argenteum* em meio líquido com reguladores de crescimento se comparado ao cultivo em meio semi-sólido (Pereira *et al.*, 2019b, em submissão).

No cultivo de *I. tenerifolium* em meio solidificado adicionado de sacarose, embora o índice de multiplicação tenha sido inferior ao tratamento sem sacarose, a adição dessa fonte de carbono aumentou o desenvolvimento de protonemas, bem como o crescimento da biomassa,

em relação à massa inicial. Resultado semelhante foi constatado por Sabovljevic *et al.* (2005) para *B. argenteum*, no qual o diâmetro do protonema e a multiplicação de gametófitos, em condições de cultivo equivalentes, aumentou aproximadamente 6 vezes em um mês de cultivo. Entretanto, para *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv., em aproximadamente dois meses, nas mesmas condições de cultivo, o diâmetro do protonema diminuiu em mais de 50% e a multiplicação de gametófitos foi quase imperceptível (Sabovljevic *et al.*, 2005), evidenciando que a influência da sacarose depende da espécie, bem como da forma de crescimento.

Com relação à adição de sacarose no cultivo de *I. tenerifolium* em MLA, os resultados mostraram que o aumento da biomassa foi muito relevante, indicando que os efeitos dos reguladores foram intensificados quando essa fonte de carbono foi acrescentada à solução de cultivo. Musgos cultivados em soluções líquidas, incluindo a sacarose como fonte de carbono, visando a otimização do ganho de biomassa para a produção em escala, tem sido o foco de estudos recentes, como o de Beike *et al.* (2014), que investigaram a propagação em escala de *Sphagnum palustre* L. e de Ruiz-Molina *et al.* (2016), com o cultivo de protonemas de *Polytrichum juniperinum* Hedw.. No presente trabalho, os tratamentos em meio líquido, enriquecido com sacarose, com ou sem adição de reguladores de crescimento, foram mais eficientes para a produção de biomassa, melhorando também o aspecto morfológico dos gametófitos.

No cultivo em meio líquido, os tratamentos adicionados de AG₃, sem a inclusão de sacarose, apresentaram médias de multiplicação maiores que o controle (Tabela 1). Essa pequena elevação, pode estar relacionada ao aumento do número de brotações, visto que praticamente dobrou nas quatro concentrações testadas. Em contrapartida, os filídios apresentaram dimensões menores que o tratamento controle, contribuindo ainda mais para a diminuição no ganho de biomassa.

Nos cultivos em meio líquido adicionados de sacarose e AG₃, os efeitos no ganho de biomassa e nos aspectos morfológicos foram mais contundentes. No tratamento com a menor concentração (Sac/AG₃ 0,1 µM), o índice de multiplicação e o número de brotações, foram aproximadamente 4,5 e 3 vezes maiores, respectivamente, em relação ao controle. No tratamento com maior concentração de AG₃ (Sac/AG₃ 1 µM), o número de brotações foi aproximadamente 5 vezes maior. Porém, as dimensões dos filídios foram menores, apresentando tamanho semelhante ao da mesma concentração, sem sacarose. Isso indica que a sacarose intensificou os efeitos da giberelina, no aumento de brotações.

Adicionalmente, o tratamento Sac/AG₃ 0,1 µM em MLA promoveu aumento significativo das dimensões dos filídios, uma vez que praticamente dobraram de tamanho, apresentando características morfológicas semelhante ao que ocorre em ambientes naturais (Fig. 1). Esse aumento também foi verificado na quantidade de células (Fig. 5 h-i) e nas dimensões celulares (dados não amostrados), sugerindo a eficiência desse tratamento para a preservação das características morfológicas naturais de *I. tenerifolium* em condições *in vitro*.

Esses resultados são relevantes para a elucidação de questões, como as elaboradas por Sabovljevic *et al.* (2010), que investigaram a influência de giberelinas (AG₃ e AG₇) no crescimento e na multiplicação de protonemas de *B. argenteum*, em condições *in vitro*, comprovando o efeito estimulador das giberelinas na morfogênese dessa espécie. Contudo, em seu trabalho, os autores questionaram se o crescimento dos protonemas ocorreu devido à expansão ou divisão celular. No presente estudo, foram verificadas ambas as formas de crescimento nos filídios de *I. tenerifolium*.

Os tratamentos com AIA em MSS, apesar de ter demonstrado o maior índice de multiplicação na concentração 1 µM, as colônias produzidas apresentaram pouca densidade e menos ramificações secundárias, indicando o predomínio do crescimento apical. No cultivo em MLA, nessa mesma concentração foi verificado o menor índice de multiplicação, dentre os demais tratamentos do mesmo grupo. Esse efeito inverso de AIA está coerente com a literatura, que sugere ação inibidora na formação de brotos e de novas ramificações (Fujita *et al.*, 2008), uma vez que esse regulador, na maior concentração em MLA, também apresentou o menor número de brotações. Ainda em MLA, a concentração 0,5 de AIA demonstrou elevação no índice de multiplicação e aumento moderado na quantidade de brotamentos e na produção de rizóides, porém, as dimensões dos filídios foram menores. Isso indica que o aumento da biomassa pode também estar relacionado ao alongamento do caulídio e a produção de rizóides. O efeito supressor de ramificações laterais, causado pela adição de AIA exógena foi observado em gametófitos (Fujita *et al.*, 2008) e em protonemas (Thelander *et al.*, 2017).

Com base na produção da biomassa, quantificação dos brotamentos e morfometria dos filídios foi verificado que a adição de BAP à solução de cultivo, mostrou uma relação dos efeitos com as concentrações. Quanto maior a concentração utilizada, menor a produção de biomassa, menor as dimensões do filídio e maior a produção de brotos. Embora a indução de botões gametofíticos em protonemas seja considerada um efeito importante das citocininas em musgos (Von Schwartzenberg, 2009), no presente trabalho, concentrações crescentes de BAP demonstraram efeito negativo no aspecto morfológico *I. tenerifolium* em relação ao controle.

O desenvolvimento de brotos anormais também foi relatado por Liang *et al.* (2010) em *B. argenteum* cultivado em condições semelhantes e concentrações entre 0,1-10 μM . No cultivo com BAP a 0,1 μM adicionado de sacarose, foi observado aumento no ganho de biomassa, no número de brotações e nas dimensões do filídio, principalmente no comprimento, em relação ao mesmo tratamento sem sacarose.

As análises dos efeitos dos reguladores de crescimento nas características morfológicas foram realizadas com base em três caracteres, comprimento, largura do filídio e número de brotações. A ideia inicial era a utilização de mais caracteres dos filídios, tais como comprimento e largura da base e do ápice, além de comprimento e largura das células da região apical, mediana e basal do filídio, como realizado no trabalho de De Luna & Gómez-Velasco (2008), para as espécies *Braunia secunda* e *B. andrieuxii* ou de Câmara *et al.* (2019), para *Roaldia revoluta*. Contudo, não foi possível mensurar esses caracteres em todas as amostras de forma padronizada, uma vez que, nos tratamentos com BAP, os filídios eram muito pequenos, anormais ou ausentes.

Apesar disso, os caracteres utilizados foram suficientes e permitiram identificar diferenças morfológicas em respostas aos diferentes tratamentos. Entretanto, sugerimos uma investigação sobre a possível influência de reguladores de crescimento na composição genética de *I. tenerifolium* propagado *in vitro*. Ainda que células não diferenciadas de briófitas cultivadas pareçam permanecer estáveis por longos períodos, quando diferenciadas, é possível ocorrer a modificação genética (Reski *et al.*, 2018). Além disso, sabe-se que diversos fatores podem favorecer tanto variações morfológicas, quanto genéticas (Sabovljevic *et al.*, 2014; Câmara *et al.*, 2019), como a adição de reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* prolongado de algumas plantas (Sarasan *et al.*, 2006; Rowntree *et al.*, 2011), porém ainda sem estudos aprofundados para briófitas.

5. Conclusão

O cultivo em meio semi-sólido (MSS) se mostrou menos eficiente para investigações sobre o efeito dos reguladores de crescimento no aumento do índice de multiplicação, utilizando-se o diâmetro das colônias como parâmetro. Em meio líquido sob agitação (MLA), a produtividade do cultivo foi mais distinta e demonstrou maior índice de multiplicação e melhor regularidade na expressão dos efeitos em relação aos tratamentos, em comparação ao cultivo em meio semi-sólido.

A influência de ácido giberélico (AG₃), na formação de novos brotos e no aumento das dimensões do filídio (0,1 µM), foi intensificada pela adição da sacarose no cultivo em meio líquido, o que estimulou, de forma relevante, o aumento da biomassa. A adição de ácido indol-3-acético (AIA) estimulou o desenvolvimento de rizóides. Na concentração 0,5 µM, essa auxina elevou, moderadamente, a formação de brotos e na concentração 1 µM causou efeito supressor de ramificações laterais. Por outro lado, 6-benzilaminopurina (BAP) inibiu o desenvolvimento de filídios, diminuindo gradativamente as dimensões, porém induziu a produção de brotos e de protonemas.

Assim, a melhor condição para a propagação *in vitro* de *Isopterygium tenerifolium* foi verificada utilizando-se meio Knop líquido sob agitação, com adição de sacarose e AG₃ a 0,1 µM, uma vez que essa combinação, além de ter estimulado a produção de biomassa, preservou as características morfológicas naturais da espécie.

Agradecimentos

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado. À Universidade de Brasília pelo suporte financeiro. Aos colegas do laboratório de Criptógamas da Universidade de Brasília, por suas contribuições. Ao Dr. Paulo Câmara e a Dra. Graça Machado, pela concessão do espaço e pelos convites em suas expedições para coletas. Ao Dr. Eduardo Barbosa e ao Dr. Eduardo Toledo Amorim, por suas contribuições na organização e análises estatísticas dos dados.

6. Referências Bibliográficas

- Anderson, L. E. 1954. Hoyer's solution as a rapid permanent mounting medium for bryophytes. **The Bryologist**. 57:242-244
- Anderson, M., Lambrinos, J. & Schroll, E. 2010. The potential value of mosses for stormwater management in urban environments. **Urban ecosystems**, 13(3), 319-332.
- Awasthi, V., Nath, V., Pande, N. & Asthana, A. K. 2012. Morphogenetic studies and *in vitro* propagation of two mosses: *Philonotis thwaitesii* Mitt. and *Brachythecium plumosum* (Hedw.) BSG. **Taiwania**, 57(1), 27-36.

- Awasthi, V., Bisht, A. K. & Pande, N. 2016. Morphogenetic studies on two mosses, *Bryum dichotomum* and *Entodon macropodus* grown *in vitro*. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, **86**(2), 421-427.
- Batista, W. V. S. M., Pôrto, K. C. & Santos, N. D. D. 2018. Distribution, ecology, and reproduction of bryophytes in a humid enclave in the semiarid region of northeastern Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, **32**(2), 303-313.
- Beike, A. K., Decker, E. L., Frank, W., Lang, D., Vervliet-Scheebaum, M., Zimmer, A. D. & Reski, R. 2010. Applied bryology–bryotechnology. **Tropical Bryology**, **31**, 22-32.
- Beike, A. K., Spagnuolo, V., Lüth, V., Steinhart, F., Ramos-Gomez, J., Krebs, M., Adamo, P., Rey-Asensio, A. I., Fernandez, J. A., Giordano, S., Decker, E. L. & Reski, R. 2014. Clonal *in vitro* propagation of peat mosses (*Sphagnum* L.) as novel green resources for basic and applied research. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, **120**(3), 1037-1049.
- Bijelović, A., Sabovljević, M., Grubisic, D. & Konjevi, R. 2004. Phytohormone influence on the morphogenesis of two mosses (*Bryum argenteum* Hedw. and *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv.). **Israel journal of plant sciences**, **52**(1), 31-36.
- Bijelović, A. & Sabovljević, M. 2003. Callus induction and plant regeneration in the moss *Aloina aloides* (Schultz.) Kindb.(Pottiaceae, Bryopsida). **Archives of Biological Sciences**, **55**(3-4), 77-80.
- Câmara, P. E. A. S. 2008. Musgos pleurocárpicos das matas de galeria da Reserva Ecológica do IBGE, RECOR, Distrito Federal, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, **22**(2), 573-581.
- Câmara, P. E. A. S., Valente, D. V., de Amorim, E. T., Henriques, D. K., Carvalho-Silva, M., Convey, P. & Stech, M. 2019. Integrated analysis of intraspecific diversity in the bipolar moss *Roaldia revoluta* (Mitt.) PEAS Câmara & M. Carvalho-Silva (Bryophyta) in Antarctica. **Polar Biology**, **42**(3), 485-496.
- Capozzi, F., Giordano, S., Di Palma, A., Spagnuolo, V., De Nicola, F. & Adamo, P. 2016. Biomonitoring of atmospheric pollution by moss bags: Discriminating urban-rural structure in a fragmented landscape. **Chemosphere**, **149**, 211-218.

- Costa, D. P. da, Almeida J. S. dos S., Dias, N. dos S., Gradstein, S. R. & Churchil, S. P. 2010. **Manual de Briologia**. Editora Interciência.
- Cuvertino-Santoni, J. O. R. G. E. & Montenegro, G. 2013. Bioprospecting a tool to conserve Chilean bryophytes. **Gayana Bot**, **70**, 1.
- Cove, D., Bezanilla, M., Harries, P. & Quatrano, R. 2006. Mosses as model systems for the study of metabolism and development. **Annu. Rev. Plant Biol.**, **57**, 497-520.
- Cvetić, T., Sabovljević, A., Sabovljević, M. & Grubišić, D. 2007. Development of the moss *Pogonatum urnigerum* (Hedw.) P. Beauv. under *in vitro* culture conditions. **Archives of biological sciences**, **59**(1), 57-61.
- De Luna, E. & Gómez-Velasco, G. 2008. Morphometrics and the identification of *Braunia andrieuxii* and *B. secunda* (Hedwigiaceae, Bryopsida). **Systematic Botany**, **33**(2), 219-228.
- Decker, E. L., Frank, W., Sarnighausen, E. & Reski, R. 2006. Moss systems biology en route: phytohormones in *Physcomitrella* development. **Plant Biology**, **8**(03), 397-406.
- Duckett, J. G., Burch, J., Fletcher, P. W., Matcham, H. W., Read, D. J., Russell, A. J. & Pressel, S. 2004. *In vitro* cultivation of bryophytes: a review of practicalities, problems, progress and promise. **Journal of Bryology**, **26**(1), 3-20.
- Erdağ, B., Bağdatlı, M. N., Kuzu, İ. & Emek, Y. 2015. Early Developmental Stages of *Homalothecium sericeum* (Hew.) Schimp (Brachytheciaceae) under *in vitro* Conditions. **American international journal of biology**, **3**(1),1-18.
- Fujita, T., Sakaguchi, H., Hiwatashi, Y., Wagstaff, S. J., Ito, M., Deguchi, H., Sato, T. & Hasebe, M. 2008. Convergent evolution of shoots in land plants: lack of auxin polar transport in moss shoots. **Evolution & development**, **10**(2), 176-186.
- Goffinet, B., Buck W. R. & Shaw A. J. 2009. Morphology and classification of the Bryophyta. pp. 55-138, *In*: A. J. Shaw & B. Goffinet (ed). **Bryophyte Biology**. Cambridge University Press. 2 Ed. 535 p.

- Gradstein, R., Churchill, S. & Salazar, N. 2001. Guide to the Bryophytes of Tropical America, **Editorial Board**, New York, EEUU, 2-32.
- Henes, B., Züllli, F., Niederkrüger, H., Schaaf, A., Frischmuth, T., Decker, E. L. & Reski, R. 2018. The magic of moss. **Soap Perfum Cosmet**, *91*, 64-66.
- Hohe, A. & Reski, R. 2002. Optimisation of a bioreactor culture of the moss *Physcomitrella patens* for mass production of protoplasts. **Plant Science**, *163*(1), 69-74.
- Ireland, R. R. 1992. The moss genus *Isopterygium* (Hypnaceae) in Latin America. **Tropical Bryology** *6*: 111-132.
- Itouga M., Komatsu Y., Sakakibara H. & Kawakami S. 2013. Moss protonemata for metal recovery. **Resources Processing** *60*: 84-89.
- Itouga, M., Hayatsu, M., Sato, M., Tsuboi, Y., Kato, Y., Toyooka, K., Suzuki S., Nakatsuka, S., Kawakami, S., Kikuchi, J. & Sakakibara, H. 2017. Protonema of the moss *Funaria hygrometrica* can function as a lead (Pb) adsorbent. **PloS one**, *12*(12), e0189726.
- Knop, W. 1865. Quantitative Untersuchungen über die Ernährungsprozesse der Pflanze. **Die Landwirtschaftlichen Versuchs-Stationen**, *7*, 93-107.
- Liang, S. F., Sun, Y. & Zhu, R. L. 2010. *In vitro* micropropagation of *Bryum argenteum* Hedw. **Cryptogamie. Bryologie**, *31*(3), 233-239.
- Niederkrüger, H., Dabrowska-Schlepp, P. & Schaaf, A. 2014. Suspension culture of plant cells under phototrophic conditions. **Industrial Scale Suspension Culture of Living Cells**, 259-292.
- Ochyra, R. & Ireland, R. R. 2016. *Isopterygium tenerifolium* (Hypnaceae, Bryophyta) - one more Afro-American disjunct. **Herzogia**, *29*(1), 72-79.
- Oliveira, R. R., Medeiros, D. L., Oliveira, H. C. & Conceição, G. M. 2018. Briófitas de área sob o domínio fitogeográfico do Cerrado e novas ocorrências para o Maranhão e região Nordeste do Brasil. **Iheringia. Série Botânica**, *73*(2), 191-195.

- Peralta, D. F. 2015. *Hypnaceae* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB96445>>. Acesso em: 23 Mai. 2019
- Pereira, C. G., Carvalho-Silva, M., Pereira, L. A. R. & Silveira, C. E. S. 2019 (em submissão). Indirect establishment increases the chances of *in vitro* propagation of Cerrado mosses – A new method. **Rodriguésia**
- Pereira, C. G., Pereira, L. A. R. & Silveira, C. E. S. 2019 (em submissão). *In vitro* culture systems of moss *Bryum argenteum* Hedw. (Bryaceae)
- R Core Team. 2017. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Organization: R Foundation for Statistical Computing. (Version 3.4.3) Vienna, Austria.
- Radu, D. M., Trautz, D. & Cantor, M. 2015. Moss: Decorative and Ecological Potential in Landscape. **ProEnvironment/ProMediu**, 8(21).
- Rahbar, K. & Chopra, R. N. 1982. Effect of liquid medium, activated charcoal and pH on the onset of reproductive phase in the moss *Bartramidula bartramioides*. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, 106(2), 185-189.
- Reski, R. & Abel, W. O. 1985. Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. **Planta** 165: 354-358.
- Reski, R., Bae, H. & Simonsen, H. T. 2018. *Physcomitrella patens*, a versatile synthetic biology chassis. **Plant Cell Reports**, 1-9.
- Reski, R., Parsons, J. & Decker, E. L. 2015. Moss-made pharmaceuticals: from bench to bedside. **Plant biotechnology journal**. 13(8), 1191-1198.
- Rowntree, J. K., Pressel, S., Ramsay, M. M., Sabovljevic, A. & Sabovljevic, M. 2011. *In vitro* conservation of European bryophytes. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 47(1), 55-64.

- Ruiz-Molina, N., Villalobos-López, M. Á. & Arias-Zabala, M. 2016. Protonema suspension cultures of the medicinal moss *Polytrichum juniperinum*. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***, **52**(4), 419-426.
- Sabovljevic, A., Sabovljevic, M., Grubisic, D. & Konjevic, R. 2005. The effect of sugars on development of two moss species (*Bryum argenteum* and *Atrichum undulatum*) during *in vitro* culture. ***Belgian journal of botany***, **138**, 79-84.
- Sabovljević, A., Sabovljević, M. & Grubišić, D. 2010. Gibberellin influence on the morphogenesis of the moss *Bryum argenteum* Hedw. in *in vitro* conditions. ***Archives of Biological Sciences***, **62**(2), 373-380.
- Sabovljević, A., Vujičić, M., Skorić M., Bajić-Ljubičić, J. & Sabovljević M. 2012. Axenically culturing the bryophytes: Establishment and propagation of the pleurocarpous moss *Thamnobryum alopecurum* Nieuwland ex Gangulee (Bryophyta, Neckeraceae) in *in vitro* conditions. ***Pakistan Journal of Botany*** **44**: 339-344.
- Sabovljević, M., Bijelović c, A. & Dragicevic, I. Č. 2003. *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. ***Turkish journal of botany***, **27**(6), 441-446.
- Sabovljević, M. S., Papp, B., Sabovljević, A., Vujičić, M., Szurdoki, E. & Segarra-Moragues, J. G. 2012. *In vitro* micropropagation of rare and endangered moss *Entosthodon hungaricus* (Funariaceae) ***Bioscience Journal***, **28**(4).
- Sabovljević, M., Vujičić, M., Pantović, J. & Sabovljević, A. 2014. Bryophyte conservation biology: *In vitro* approach to the ex situ conservation of bryophytes from Europe. ***Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology***, **148**(4), 857-868.
- Sarasan, V., Cripps, R., Ramsay, M. M., Atherton, C., McMichen, M., Prendergast, G. & Rowntree, J. K. 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***, **42**(3), 206-214.

- Sharp, A. J., Crum, H. & Eckel, P. 1994. The Moss Flora of Mexico. **Memoirs of The New York Botanical Garden** **69**(1-2): 1-1113.
- Stanković, J. D., Sabovljević, A. D. & Sabovljević, M. S. 2018. Bryophytes and heavy metals: a review. **Acta Botanica Croatica**, **77**(2), 109-118.
- Studlar, S. M. & Peck, J. E. 2007. Commercial moss harvest in the Appalachian Mountains of West Virginia: targeted species and incidental take. **The Bryologist**, **110**(4), 752-766.
- Studlar, S. M. & Peck, J. E. 2009. Extensive green roofs and mosses: reflections from a pilot study in Terra Alta, West Virginia. **Evansia**, **26**(2), 52-63.
- Thelander, M., Landberg, K. & Sundberg, E. 2017. Auxin-mediated developmental control in the moss *Physcomitrella patens*. **Journal of Experimental Botany**, **69**(2), 277-290.
- Vanderpoorten, A. & Hallingbäck, T. 2009. Conservation biology of bryophytes. pp. 487-534, *In.*: A. J. Shaw & B. Goffinet (ed). **Bryophyte Biology**. Cambridge University Press. 2 Ed. 535 p.
- Von Schwartzenberg, K. 2009. Hormonal regulation of development by auxin and cytokinin in moss. **Annual Plant Reviews** **36**:246-281.
- Yano, O. & Câmara, P. E. A. S. 2004. Briófitas de Manaus, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, **34**(3), 445-457.

CAPÍTULO IV

Propagação clonal *ex situ* de musgos do Cerrado em diferentes substratos

Resumo

Os musgos apresentam adaptações evolutivas fisiológicas importantes para sobrevivência às variações na temperatura e umidade. O aperfeiçoamento e a efetiva implementação de estratégias de desenvolvimento, podem viabilizar não só a preservação dessas espécies, mas também expandir e motivar ações ecológicas inovadoras. Espécies coletadas em áreas de vegetação do perímetro urbano do Cerrado, em Brasília-DF, foram estabelecidas, propagadas e subcultivadas *in vitro* com sucesso, o que tornou inspirador a realização de estudos para testar outras formas de propagação. Este estudo teve como objetivo propagar *ex situ* espécies de musgos do cerrado cultivados *in vitro*, bem como avaliar a sobrevivência e o desenvolvimento das plantas em diferentes substratos. As espécies *Barbula indica*, *Bryum argenteum*, *B. coronatum*, *B. densifolium*, *Isopterygium tenerifolium*, *Leucobryum crispum*, *Pogonatum pensilvanicum*, *Sphagnum platyphylloides* e *Vitalia cuspidifera*, foram subcultivadas *in vitro* e transferidas para recipientes contendo diferentes substratos: bioplant, areia, vermiculita, solo, bioplant/areia e bioplant/solo. A propagação *ex situ* foi conduzida em duas etapas de 45 dias cada. A primeira etapa, pré-aclimatização, consistiu no cultivo de explantes em recipientes transparentes fechados e mantidos em sala de crescimento com condições controladas e a segunda etapa, aclimatização, onde os recipientes foram abertos e cultivados em casa de vegetação. A pré-aclimatização foi relevante para o crescimento de musgos ainda em estágio inicial de desenvolvimento, promovendo a colonização do substrato, tanto por protonemas quanto por gametófitos. Nesta etapa, todas as espécies cultivadas em areia ou bioplant/solo tiveram 100% de sobrevivência, sendo a areia o substrato que apresentou os melhores resultados. A aclimatização favoreceu a colonização de gametófitos e o aumento da densidade das colônias. Bioplant e bioplant/solo apresentaram os melhores resultados para *B. argenteum*, *B. coronatum* e *I. tenerifolium* cultivadas em casa de vegetação. Vermiculita foi o substrato com resultados menos satisfatórios em ambas as etapas de cultivo.

Palavras chaves: Casa de vegetação, aclimatização, protonema, colonização, revegetação.

***Ex situ* clonal propagation of Cerrado mosses on different substrates**

Abstract

Mosses present physiological evolutionary adaptations essential for survival to variations in temperature and humidity. The improvement and effective implementation of development strategies can make possible not only the preservation of these species but also the expansion and motivation of innovative ecological actions. Species collected in vegetation areas of the urban perimeter of Cerrado were established, propagated and subcultivated *in vitro* successfully, which made inspiring studies to test other forms of propagation. This study aimed to propagate *ex situ* species of Cerrado moss grown *in vitro*, as well as to evaluate the survival and development of plants on different substrates. The species *Barbula indica*, *Bryum argenteum*, *B. coronatum*, *B. densifolium*, *Isopterygium tenerifolium*, *Leucobryum crispum*, *Pogonatum pensilvanicum*, *Sphagnum platyphylloides*, and *Vitalia cuspidifera* were subcultivated *in vitro* and transferred to containers containing different substrates: bioplant, sand, vermiculite, soil, bioplant/sand and bioplant/soil. *Ex situ* propagation was conducted in two steps of 45 days each. The first stage, pre-acclimatization consisted of the cultivation of explants in transparent containers closed and kept in a room of growth with controlled conditions and the second stage, acclimatization, where the containers were opened and cultivated in a greenhouse. Pre-acclimatization was relevant for the growth of mosses still in the initial phase of development, promoting the colonization of the substrate, both by protonemata and by gametophytes. At this stage, all species cultivated in the sand or bioplant/soil had 100% survival, sand being the substrate that presented the best results. Acclimatization favored colonization of gametophytes and increased density of colonies. Bioplant and bioplant/soil presented the best results for *B. argenteum*, *B. coronatum* and *I. tenerifolium* grown in a greenhouse. Vermiculite was the substrate with less satisfactory results in both cultivation stages.

Keywords: Greenhouse, acclimatization, protonema, colonization, revegetation.

1. Introdução

Com uma diversidade de 487 espécies de briófitas (*latu sensu*), o Cerrado brasileiro representa o terceiro bioma, com o maior número de espécies, e o segundo maior em endemismo, com 63 espécies listadas (Costa & Peralta, 2015). Esse domínio fitogeográfico tem sofrido intensa pressão antrópica com o avanço agropecuário e o crescimento urbano, o que influencia negativamente na conservação da brioflora local (Myers, 2000; Söderström, 2006). O aperfeiçoamento e a efetiva implementação de estratégias de desenvolvimento de musgos podem viabilizar não só a preservação dessas plantas, mas também expandir e motivar ações ecológicas inovadoras (Jones & Rosentreter, 2006; Anderson *et al.*, 2010; González & Pokrovsky, 2014).

Briófitas possuem pequeno porte, ausência de tecido vascularizado e de epiderme, bem como a poiquiloidria (hidratação controlada pelo ambiente externo), que são adaptações evolutivas fisiológicas importantes para sobrevivência às variações na temperatura e umidade. Essas características podem ter um papel relevante na ciclagem de nutrientes, na retenção e disponibilidade de água no ambiente (Gignac, 2001; Gradstein *et al.*, 2001; Glime, 2017a). Contudo, também as tornam organismos susceptíveis a alterações causadas por poluição atmosférica e aquática, bem como a mudanças climáticas (Gignac, 2001; Saxena & Harinder, 2004).

Embora as briófitas sejam, de maneira geral, bem adaptadas a diversos habitats, como florestas e ambientes desérticos (Costa *et al.*, 2010; Tuba *et al.*, 2011), em algumas regiões, a disponibilidade de musgos em grande quantidade na natureza é limitada. A recuperação natural também pode ser lenta nos locais utilizados para o extrativismo, o que limita a utilização dessas plantas em diversas aplicações inovadoras (Peck & Muir, 2001; Studlar & Peck, 2007; 2009; Tacoronte *et al.*, 2009). Assim como o emprego ecológico, na recuperação de ambientes degradados pelo processo de antropização (Jones & Rosentreter, 2006) e, adicionalmente, com potencial paisagístico (Radu *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2010), como por exemplo no emprego em telhados verdes (Prince, 2016). Além disso, diversos usos potenciais na indústria hortícola são discutidos no estudo de Alam & Sharma, (2015), com destaque para aplicação no condicionamento de solo, como cama para cultura de outras plantas, como plantas ornamentais e na indústria de musgo eficientes para absorção de poluentes.

Um trabalho realizado por Anderson *et al.* (2010) revelou o potencial de musgos com aplicação em telhados verdes, para gerenciamento de águas pluviais e de temperatura ambiental,

por sua alta capacidade de retenção de água e de estabelecimento em ambientes sazonalmente secos. Contudo, apesar de muito promissor, foi necessário um esforço de coleta considerável para a captação de musgos em quantidade suficiente e em condições *in situ*, de ambientes urbanos.

Eventualmente, o estabelecimento de algumas espécies parece ser impossível mesmo com inúmeras tentativas de cultivo iniciados tanto a partir de esporos quanto de gametófitos, fazendo com que o aperfeiçoamento de técnicas de estabelecimento (Rowntree *et al.*, 2006, Pereira *et al.*, 2019a, em submissão), de cultivo *in vitro* (Duckett *et al.*, 2004; Rowntree *et al.*, 2011) e *ex situ* (Rowntree & Ramsay, 2005; 2009; Ros *et al.*, 2013; Sabovljević *et al.*, 2014), sejam extremamente necessários. Especialmente, quando a espécie em questão estiver em risco de extinção, ou simplesmente, não for encontrada com esporos disponíveis, como frequentemente acontece (Longton & Miles, 1982; Löbel & Rydin, 2010).

Segundo Duckett *et al.* (2004), a transferência de angiospermas cultivadas *in vitro* para a reintrodução na natureza são de difícil sucesso e pode ser fatal, diferentemente das briófitas que apresentam maior facilidade para mudança de ambiente de cultivo. Contudo, para Sabovljević *et al.* (2014), a aclimatização é um passo muito importante no processo de adaptação, pois é a primeira vez que plantas cultivadas, em ambiente axênico, entram em contato com organismos xênicos e inicia relações entre eles.

Estudos que visem aperfeiçoar a propagação *in vitro* de musgos e a posterior reintrodução, são essenciais para expansão da exploração de benefícios ecológicos, e podem ajudar a resolver problemas ambientais causados pela urbanização acelerada, tais como a impermeabilidade do solo, poluição atmosférica, aumento da temperatura climática, entre outros (Glime, 2007; Vanderpoorten & Hallingbäck, 2009; Radu *et al.*, 2015).

Um trabalho visando o cultivo *in vitro* de espécies aleatórias, coletadas em áreas de vegetação do perímetro urbano do Cerrado em Brasília-DF, foi realizado por Pereira *et al.* (2019a, em submissão), em que o estabelecimento iniciado de gametófitos foi viável para as dez espécies testadas. Além disso, essas mesmas espécies foram propagadas e subcultivadas com sucesso, o que tornou inspirador a realização de estudos para testar outras formas de propagação. Este estudo teve como objetivo propagar *ex situ* espécies de musgos do cerrado cultivados *in vitro*, bem como avaliar a sobrevivência e o desenvolvimento das plantas em diferentes substratos.

2. Material e métodos

2.1. Coleta e preparação do material vegetal

Nove espécies de musgos foram coletadas em áreas de vegetação do Cerrado e no perímetro urbano de Brasília – DF, Brasil, entre os anos de 2015 e 2017. *Barbula indica* (Hook.) Spreng., *Bryum argenteum* Hedw., *Bryum coronatum* Schwägr., *Bryum densifolium* Brid., *Isopterygium tenerifolium* Mitt., *Leucobryum crispum* Müll. Hal., *Pogonatum pensilvanicum* (Bartram ex Hedw.) P. Beauv., *Sphagnum platyphylloides* Warnst., *Vitalia cuspidifera* (Mitt.) P.E.A.S. Câmara, Carv.-Silva & W.R. Buck, tiveram seus vouchers depositados no Herbário UB, sob os números: Pereira, C.G. 503; 587; 501; Silva, C.F.S. 31B; Pereira, C.G. 509; 583; 526; 541 e 560, respectivamente.

Gametófitos, preferencialmente, mais jovens, de cada espécie foram separados e lavados em água corrente e em água estéril. Todos os procedimentos foram realizados nos laboratórios da Universidade de Brasília – UnB.

2.2. Cultivo *in vitro*

As espécies foram desinfestadas em hipoclorito de sódio e estabelecidas em meio Knop (Knop, 1865) de forma direta e indireta, de acordo com Pereira *et al.* (2019a, em submissão) e mantidas em subcultivos em meio solidificado (MSS). Os inóculos foram transferidos do MSS e subcultivados em meio líquido sob agitação (MLA), enriquecido com 10 g/L de sacarose, visando o ganho de biomassa. Apenas *L. crispum* teve os inóculos transferidos diretamente do MSS, por não apresentar boas condições quando cultivada em meio líquido.

Para os cultivos em MSS, aproximadamente 15 mL de solução nutritiva foram vertidos em placas de Petri (90 x 15 mm). As placas foram fechadas e vedadas com duas camadas de plástico filme de PVC. Para os cultivos em MLA, foram utilizados frascos de vidro com capacidade para 400 mL, contendo 180 mL de solução nutritiva. Após a transferência dos explantes, cada frasco foi vedado com duas camadas de plástico filme de PVC e mantidos sob agitação de 50 rpm.

Todos os subcultivos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h de luz e intensidade luminosa de aproximadamente $41 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, por aproximadamente 30 dias.

2.3. Propagação clonal *ex situ*

A propagação clonal de cada espécie foi conduzida em duas etapas, pré-aclimatização e aclimatização. O experimento foi estruturado em 6 tratamentos com 5 repetições cada e 3 explantes por repetição, organizados em delineamentos inteiramente casualizados, com 15 explantes por tratamento.

2.3.1. Pré-aclimatização

Esse experimento consistiu no cultivo de pequenos fragmentos de musgos em recipientes transparentes fechados, contendo substrato hidratado por uma única vez e mantidos em sala de crescimento em condições controladas, por determinado período contínuo (Fig. 1a). Para isso, foram utilizados 6 tipos de substratos, compostos por: bioplant (substrato comercial (Bioplant® plus, Nova Ponte, Brasil)); areia lavada (granulometria fina); vermiculita (granulometria fina); solo (latossolo vermelho, coletado no cerrado); bioplant com solo (1:1) e bioplant com areia (1:1). Os substratos foram autoclavados a 121 °C e 1,3 atm por 20 minutos.

Foram utilizados recipientes plásticos transparentes, com tampas estéreis e capacidade para 250 ml. Em cada recipiente foi adicionado uma camada de 1,5 a 2 cm de altura de substrato, o qual foi hidratado em seguida (Fig.1b). A hidratação foi realizada com solução de Knop previamente autoclavada, onde o volume necessário para hidratar uniformemente cada substrato variou de 20 a 80 mL de solução, de acordo com a composição do substrato.

Em cada recipiente foram transplantados 3 inóculos, oriundos de cultivos em MLA, medindo aproximadamente 0,2 cm. Em seguida, os recipientes foram tampados e mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h de luz e intensidade luminosa de aproximadamente $41 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, por 45 dias.

2.3.2. Aclimatização

Após o término do período de pré-aclimatização, foram realizados pequenos furos de drenagem no fundo dos recipientes, dos quais as tampas foram retiradas e utilizadas como pratos (Fig.1c). Os recipientes foram mantidos em casa de vegetação, com temperatura ambiente não controlada, luz natural não controlada e irrigação por aspersão, por 30 minutos diários.

Os dados foram coletados após 45 dias de cultivo, tal como foram coletados após o período de pré-aclimatização. Depois das coletas de dados, os recipientes foram mantidos em casa de vegetação.

Em ambas as etapas, as avaliações foram realizadas de forma qualitativa, em que foram observadas a sobrevivência e a capacidade de colonização dos inóculos, e quantitativa, em que o diâmetro das colônias e a altura do maior gametófito foram aferidos (Fig. 1d). Ao aspecto morfológico e ao desenvolvimento de protonemas foram atribuídos valores aos conceitos: Ruim = 0; regular = 1; Bom = 2; Ótimo = 3. O desenvolvimento de gametófitos (novos brotos) foi avaliado por agrupamentos, os quais foram atribuídos valores aos conceitos: Ruim (Gametófitos ausentes) = 0; Regular (01 a 50 gametófitos) = 1; Bom (51 a 150 gametófitos) = 2; Ótimo (acima de 150 gametófitos) = 3.



Figura 1: Propagação *ex vitro* de musgo. (a) Cultivo em recipientes fechados em condições controladas durante a pré-aclimatização; (b) Recipiente contendo substrato; (c) Cultivo em diferentes substratos na casa de vegetação durante a aclimatização; (d) Coleta de dados após cada período de cultivo.

2.4. Análise de dados

Os dados foram submetidos à análise utilizando o software estatístico R (versão 3.5.2, 2018). A normalidade foi avaliada por *Shapiro-Wilk* teste, com níveis de significância a 5% de probabilidade. Como a distribuição dos dados não apresentaram distribuição normal, então a significância dos tratamentos foi avaliada pelo teste não paramétrico *Kruskall-Wallis* e as diferenças entre as concentrações foram comparadas pelo pós teste de *Dunn*, com níveis de significância a 5% de probabilidade. Para os testes, as variáveis foram agrupadas sem interação.

3. Resultados

3.1. Sobrevivência

A tabela 1 mostra o percentual de sobrevivência dos inóculos cultivados em diferentes substratos. Na etapa de pré-aclimatização, todas as espécies cultivadas em areia ou bioplant/solo apresentaram 100% de sobrevivência. *Barbula indica*, *B. densifolium* e *L. crispum* apresentaram sobrevivência de todos os inóculos e em todos os substratos, bem como *B. coronatum* e *I. tenerifolium* em todos os substratos testados, em ambas as etapas de propagação.

P. pensilvanicum apresentou o menor índice sobrevivência, com percentual abaixo de 50% para bioplant, solo e bioplant/areia na pré-aclimatização e bioplant, areia, solo e bioplant/areia na aclimatização, seguido de *V. cuspidifera* para solo na pré-aclimatização e areia na aclimatização, demonstrando maior sensibilidade aos agentes contaminantes, principalmente fungos, em comparação à *Barbula indica*, uma vez que essas três espécies foram inoculadas nos substratos em fase protonêmica (Tabela 1).

3.2. Colonização

Na pré-aclimatização, o teste *Dunn* (Tabela 2) mostrou que a colonização em areia foi significativamente melhor em sete das nove espécies, com exceção apenas de *L. crispum* e *S. platyphylloides*, para as quais os substratos mais significativos foram bioplant/solo e vermiculita, respectivamente. Em oposição, os substratos com menor diferença estatística foram a vermiculita, para quatro das espécies testadas: *B. argenteum*, *B. coronatum*, *B. densifolium* e *I. tenerifolium*, o bioplant para quatro espécies: *Barbula indica*, *L. crispum*, *P. pensilvanicum* e *S. platyphylloides*, solo para *V. cuspidifera*.

Na aclimatização, a colonização no bioplant foi significativamente melhor para *Barbula indica*, *B. argenteum* e *V. cuspidifera*. De maneira semelhante, no bioplant/solo para *B. coronatum*, *P. pensilvanicum* e *S. platyphylloides*, seguido de solo para *B. densifolium* e *L. crispum* e bioplant/areia para *I. tenerifolium*. A vermiculita se mostrou o substrato menos significativo para *B. argenteum*, *B. coronatum*, *B. densifolium* e *I. tenerifolium*, seguido da areia para *L. crispum* e *V. cuspidifera*, bioplant/areia para *P. pensilvanicum* e *S. platyphylloides* e solo para *Barbula indica* (Tabela 2).

Tabela 1: Sobrevivência de inóculos de nove espécies de musgos cultivados *ex situ* em diferentes substratos nas etapas de pré-aclimatização e aclimatização, em até 45 dias de cultivo. (n = 15)

| Espécies | Inóculo inicial | Etapas da propagação | Sobrevivência do explante no Substrato (%) | | | | | |
|----------------------------------|------------------------|----------------------|--|-------|-------------|------|--------------------|-------------------|
| | | | Bioplant | Areia | Vermiculita | Solo | Bioplant/ Areia | Bioplant/ Solo |
| <i>Barbula indica</i> | Protonema | Pré-aclimatização | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | | Aclimatização | 100 | 100 | 73 | 100 | 87 | 87 |
| <i>Bryum argenteum</i> | Protonema e Gametófito | Pré-aclimatização | 100 | 100 | 73 | 100 | 93 | 100 |
| | | Aclimatização | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| <i>Bryum coronatum</i> | Protonema e Gametófito | Pré-aclimatização | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | | Aclimatização | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| <i>Bryum densifolium</i> | Protonema e Gametófito | Pré-aclimatização | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | | Aclimatização | 100 | 100 | 27 | 100 | 87 | 87 |
| <i>Isopterygium tenerifolium</i> | Gametófito | Pré-aclimatização | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | | Aclimatização | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| <i>Leucobryum crispum</i> | Gametófito | Pré-aclimatização | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | | Aclimatização | 100 | 60 | 87 | 100 | 100 | 100 |
| <i>Pogonatum pensilvanicum</i> | Protonema | Pré-aclimatização | 0 | 100 | 100 | 27 | 13 | 100 |
| | | Aclimatização | 0 | 0 | 73 | 40 | 0 | 60 |
| <i>Sphagnum platyphylloides</i> | Gametófito | Pré-aclimatização | 60 | 100 | 100 | 53 | 67 | 100 |
| | | Aclimatização | 53 | 100 | 100 | 53 | 27 | 100 |
| <i>Vitalia cuspidifera</i> | Protonema | Pré-aclimatização | 73 | 100 | 100 | 47 | 87 | 100 |
| | | Aclimatização | 73 | 0 | 100 | 60 | 53 | 73 |

De maneira geral, a pré-aclimatização favoreceu a produção de protonemas e o aumento do comprimento dos gametófitos, os quais apresentaram alturas frequentemente mais elevadas do que na aclimatização (Fig. 2). O cultivo em areia, na pré-aclimatização foi o mais eficiente para a propagação de protonemas como inóculos iniciais (Tabela 2) (Fig. 2b1, b2, b3, b4, b7, b9). A aclimatização favoreceu a colonização de gametófitos, aumentando a densidade e a expansão das colônias (Fig. 2). *B. coronatum* (Fig. 2a3-f3) e *I. tenerifolium* (Fig. 2a5-f5) foram as espécies com maior sucesso propagativo nos diferentes substratos.

Embora o cultivo em bioplant/solo não tenha sido estatisticamente melhor, esse substrato apresentou bons resultados em todas as espécies em ambas as etapas (Fig. 2), especialmente após 45 dias de cultivo na aclimatização. Nesta etapa, foi observado contaminação, principalmente por algas e cianobactérias em praticamente todos os substratos, devido ao acúmulo de água eventual em alguns recipientes, o que prejudicou o desenvolvimento ou causou a morte de algumas plantas, principalmente nas espécies com o predomínio de crescimento por protonemas em até 45 dias de cultivo.

Tabela 2: Valores para o teste de significância *Kruskal-Wallis* (*KW) e de comparação múltipla por meio do pós teste de *Dunn* (*Dunn*) para a colonização de nove espécies de musgos, cultivados *ex situ*, em diferentes substratos, em até 45 dias de cultivo. (n = 15)

| Espécies | Etapas da propagação | Significância *KW | | Comparação (<i>Dunn</i>) | | |
|----------------------------------|----------------------|-------------------|-----------------------|----------------------------|------------------------------------|----------------------|
| | | Chi ² | P-Value | Melhor Substrato | Pior Substrato | P-Value |
| <i>Barbula indica</i> | Pré-aclimatização | 63,61 | 2,169e ⁻¹² | Areia | Bioplant | 2,72e ⁻¹¹ |
| | Aclimatização | 24,96 | 1,418e ⁻⁴ | Bioplant | Solo | 2,75e ⁻⁰⁵ |
| <i>Bryum argenteum</i> | Pré-aclimatização | 68,35 | 2,251e ⁻¹³ | Areia | Vermiculita | 2,11e ⁻¹² |
| | Aclimatização | 71,51 | 4,961e ⁻¹⁴ | Bioplant | Vermiculita | 2,45e ⁻¹³ |
| <i>Bryum coronatum</i> | Pré-aclimatização | 46,01 | 9,023e ⁻⁰⁹ | Areia | Vermiculita | 1,03e ⁻⁰⁸ |
| | Aclimatização | 75,40 | 7,643e ⁻¹⁵ | Bioplant/ Solo | Vermiculita | 1,35e ⁻¹² |
| <i>Bryum densifolium</i> | Pré-aclimatização | 55,24 | 1,162e ⁻¹⁰ | Areia | Vermiculita | 1,55e ⁻⁰⁹ |
| | Aclimatização | 55,14 | 1,218e ⁻¹⁰ | Solo | Vermiculita | 1,34e ⁻¹⁰ |
| <i>Isopterygium tenerifolium</i> | Pré-aclimatização | 71,54 | 4,887e ⁻¹⁴ | Areia | Vermiculita | 7,77e ⁻¹⁵ |
| | Aclimatização | 55,06 | 1,266e ⁻¹⁰ | Bioplant/Areia | Vermiculita | 5,41e ⁻⁰⁷ |
| <i>Leucobryum crispum</i> | Pré-aclimatização | 51,58 | 6,554e ⁻¹⁰ | Bioplant/Solo | Bioplant | 2,66e ⁻¹¹ |
| | Aclimatização | 60,70 | 8,672e ⁻¹² | Solo | Areia | 6,30e ⁻¹² |
| <i>Pogonatum pensilvanicum</i> | Pré-aclimatização | 78,49 | 1,73e ⁻¹⁵ | Areia | Bioplant | 2,53e ⁻¹⁰ |
| | Aclimatização | 36,39 | 7,918e ⁻⁰⁷ | Bioplant/Solo | Bioplant; Areia; Bioplant/Areia | 6,54e ⁻⁰⁵ |
| <i>Sphagnum platyphylloides</i> | Pré-aclimatização | 64,20 | 1,636e ⁻¹² | Vermiculita | Bioplant | 5,39e ⁻⁰⁹ |
| | Aclimatização | 45,51 | 1,141e ⁻⁰⁸ | Bioplant/Solo | Bioplant/Areia | 6,42e ⁻⁰⁹ |
| <i>Vitalia cuspidifera</i> | Pré-aclimatização | 68,81 | 1,808e ⁻¹³ | Areia | Solo | 2,97e ⁻¹² |
| | Aclimatização | 29,34 | 1,982e ⁻⁰⁵ | Bioplant | Areia | 5,03e ⁻⁰⁷ |

3.3. Desenvolvimento das espécies cultivadas *ex situ*

Barbula indica: crescimento predominantemente de protonemas na pré-aclimatização e de gametófitos na aclimatização, com poucos botões gametofíticos desenvolvidos, medindo até 0,1 cm de altura. Os maiores diâmetros das colônias foram observados no cultivo em areia (Fig. 3a) durante a pré-aclimatização. Apesar de bioplant ser o tratamento menos significativo na etapa de pré-aclimatização, esse substrato se mostrou estatisticamente superior durante a aclimatização (Tabela 2), aumentando a quantidade dos gametófitos, porém diminuindo a densidade de protonemas e comprometendo o aspecto morfológico (Fig. 3b) (Fig. 2a1-f1). No cultivo em vermiculita na pré-aclimatização, ocorreu o desenvolvimento de gemas nos protonemas.

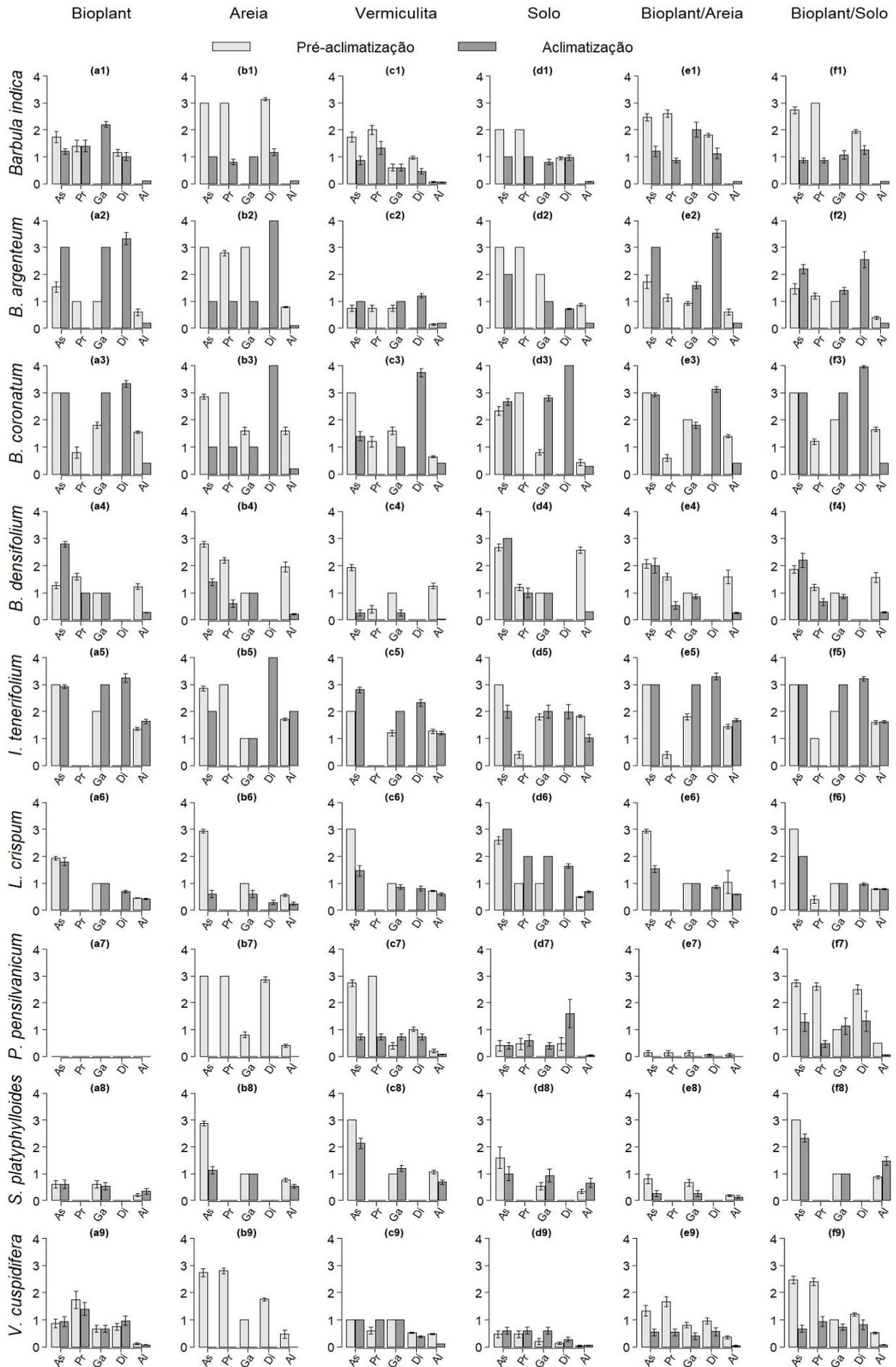


Figura 2: Cultivo *ex vitro* de nove espécies de musgos em diferentes substratos. **As** = aspecto morfológico; **Pr** = desenvolvimento de protonemas; **Ga** = desenvolvimento de gametófitos; **Di** = diâmetro das colônias; **Al** = altura do maior gametófito. Eixo vertical (Y), de 0 a 3 para **As**, **Pr** e **Ga** = conceito (Ruim = 0; regular = 1; Bom = 2; Ótimo = 3) e de 0 a 4 para **Di** e **Al** = valores em cm. Barra de erros = \pm SE. (n = 15)

Bryum argenteum: crescimento tanto de protonemas quanto de gametófitos, com comprimento aproximado de 1 cm de altura no cultivo, em solo (Fig. 3c) e em areia na etapa de pré-aclimatização, sendo a areia o substrato significativamente melhor (Tabela 2), apresentando ótimo aspecto morfológico e ótimo desenvolvimento de gametófitos, chegando a 500 por recipiente (Fig. 2a2-f2). Na aclimatização, a colonização por gametófitos foi predominante, porém com comprimento aproximadamente de 0,1 cm (Fig. 3d). Em todos os substratos, foi observado grande produção de propágulos vegetativos caducos (bulbilhos) (Fig. 3e). Após 3 meses de aclimatização em biopiant, biopiant/areia e biopiant/solo a planta colonizou todo o substrato, formando uma camada densa com cerca de 0,5 cm de altura e 0,8 cm em 4 meses.

Bryum coronatum: crescimento tanto de protonemas quanto de gametófitos, com altura cerca de 1,8 cm no cultivo em biopiant, areia (Fig. 3f), biopiant/areia e biopiant/solo (Fig. 3g), sendo a areia o substrato significativamente mais favorável, na etapa de pré-aclimatização (Tabela 2). Nos cultivos durante a aclimatização, os substratos biopiant, biopiant/areia e biopiant/solo (Fig. 3h) apresentaram ótimo aspecto morfológico, com gametófitos colonizando praticamente toda a superfície do substrato contido nos recipientes (Fig. 2a3-f3). Após 4 meses de cultivo na aclimatização, *B. coronatum* cresceu, formando uma densa camada na superfície do biopiant (Fig. 5a) e biopiant/solo. Os gametófitos chegaram a mais de 2 cm de altura (Fig. 5b), com alguns apresentando o desenvolvimento de gametângios femininos completamente formados. Também foi observado a produção abundante de propágulos vegetativos na região apical dos gametófitos, facilmente liberados ao toque, além de tubérculos ao longo do caulídio.

Bryum densifolium: crescimento tanto de protonemas quanto de gametófitos durante a pré aclimatização. Nesta etapa, o cultivo em areia, que foi significativamente o mais favorável, apresentando boa colonização de protonemas e o desenvolvimento de poucos gametófitos (Fig. 3i). Da mesma forma, o cultivo em solo também apresentou ótimo aspecto morfológico e desenvolvimento de gametófitos com cerca de 2,8 cm (Fig. 3j) (Fig. 2a4-f4). Contudo, durante a aclimatização, os gametófitos primários secaram e caíram, e brotos secundários se originaram

a partir dos caulídios (Fig. 3k), sendo o solo o substrato significativamente melhor (Tabela 2). No cultivo em bioplant, gametófitos secundários cresceram a partir de protonemas, na região onde inicialmente foram inoculados, formando pequenos tufos (Fig. 3l). Essa espécie apresentou colonização lenta, demonstrando aumento na densidade de gametófitos após cerca de 7 meses de cultivo em bioplant, contudo, exibindo coloração não característica para a espécie (Fig. 5d).

Isopterygium tenerifolium: crescimento predominante de gametófitos, com formação de protonemas na pré-aclimatização, principalmente no cultivo em areia (Fig. 4a). Apesar dos testes estatísticos terem apontado como substratos mais favoráveis areia e bioplant/areia (Tabela 2), essa espécie apresentou bom desenvolvimento em todos os substratos, em ambas as etapas de propagação (Fig. 2a5-f5). Embora *I. tenerifolium* apresente habito pleurocárpico, com caulídios rastejantes crescendo em forma de tapetes em ambientes naturais, na pré-aclimatização os gametófitos primários cresceram com orientação ereta em todos os substratos, formando tufos de gametófitos pouco ramificados, com aproximadamente 1,5 cm de altura (Fig. 4a-b). Na aclimatização, os gametófitos primários secaram e novos brotos se desenvolveram, originando ramificações secundárias, as quais cresceram prostradas ao substrato (Fig. 4c). Após 75 dias na aclimatização, as amostras cultivadas em bioplant apresentaram o desenvolvimento de setas, em 120 dias cápsulas imaturas com caliptras e em 135 dias, cápsulas sem caliptra e sem opérculo, apresentando a dispersão de esporos (Fig. 5d), indicando que o desenvolvimento do esporófito pode ser estimado entre 60-75 dias. Adicionalmente, em 10 meses de observação, a produção de esporófitos foi contínua em bioplant, que teve a maior quantidade de esporófitos desenvolvidos, cerca de 15-25 por recipiente. O desenvolvimento de esporófitos também ocorreu em solo, bioplant/solo e vermiculita, porém, em menor quantidade, de 3-10 em pelo menos um recipiente por substrato.

Leucobryum crispum: crescimento predominantemente de gametófitos, com cerca de 0,8 cm de altura. Na pré-aclimatização, os gametófitos apresentaram aspecto melhor na maioria dos substratos, demonstrando coloração mais vigorosa (Fig. 2a6-f6) e no cultivo em solo, ocorreu a regeneração de filídios, nos quais foi observado o desenvolvimento de protonemas na região apical (Fig.4d). Durante a aclimatização, esse substrato favoreceu a colonização, com a formação de protonemas e de brotos (Fig. 4e).

Pogonatum pensilvanicum: crescimento predominantemente de protonemas na pré-aclimatização e de gametófitos na aclimatização (Fig. 2a7-f7). Apesar da areia demonstrar resultados significativamente melhores na etapa de pré-aclimatização (Fig. 4f), esse substrato foi menos significativo na etapa de aclimatização (Tabela 2), não apresentando sobrevivência

dos inóculos (Fig. 2b7), bem como no cultivo em bioplant/areia (Fig. 2e7). Todos os cultivos em bioplant apresentaram contaminação por fungos, causando a morte dos inóculos ainda na pré-aclimatização. Em bioplant/solo ocorreu o desenvolvimento tanto de protonemas quanto de gametófitos na pré-aclimatização (Fig. 4g) e durante a aclimatização, de gametófitos, com cerca de 0,1 cm de altura (Fig. 4h).

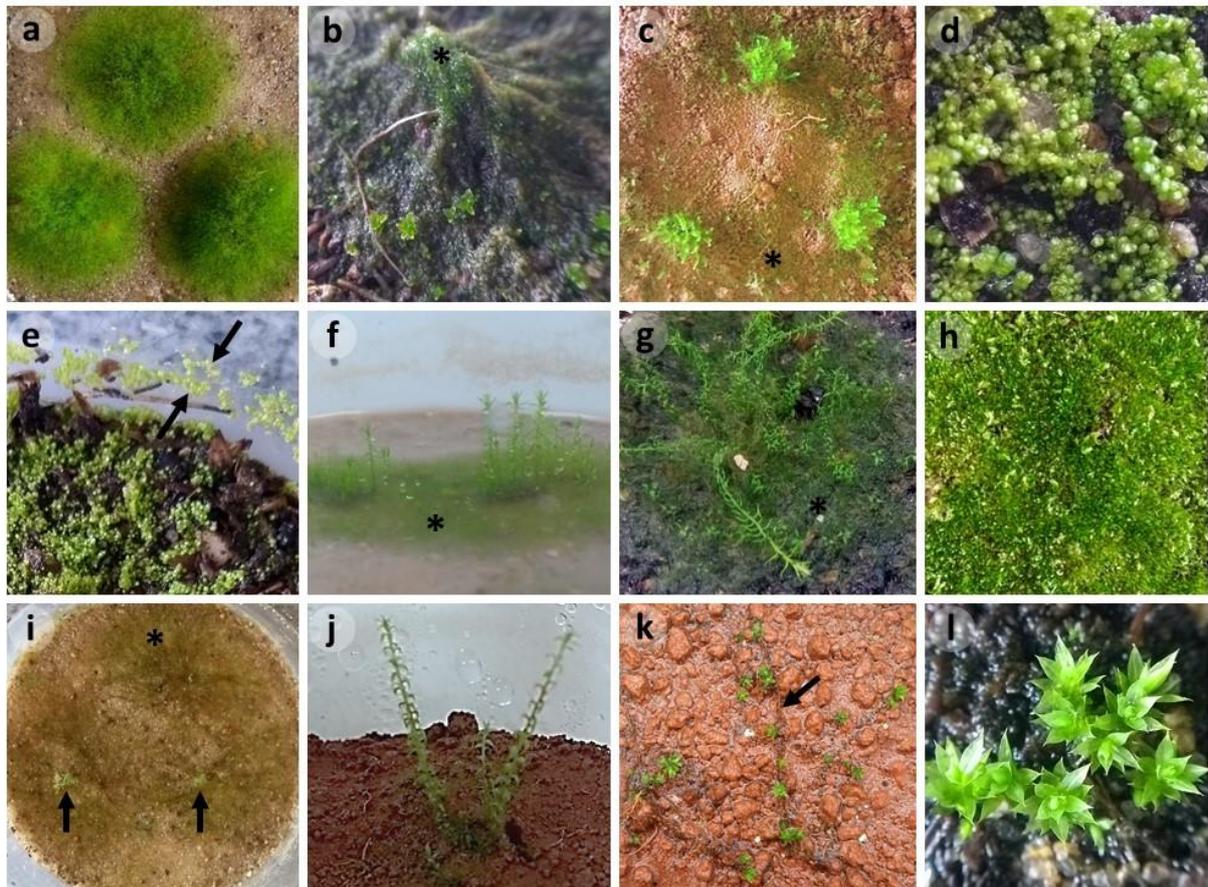


Figura 3: Propagação *ex vitro* de musgos. (a, c, f, g, i, j) Pré-aclimatização (45 dias de cultivo) e (b, d, e, h, k, l) Aclimatização (45 dias de cultivo). (a) *Barbula indica* em areia e (b) bioplant, com a formação gametófitos e protonemas (asterisco); (c) *Bryum argenteum* em solo, com a formação de colônias de gametófitos e protonemas (asterisco), (d) em bioplant/areia, e (e) em bioplant, mostrando propágulos concentrados na borda do recipiente (setas); (f) *Bryum coronatum* em areia, com a formação de gametófitos e protonemas (asterisco), (g) em bioplant/solo, com a formação de gametófitos e protonemas (asterisco), (h) em bioplant/solo; (i) *Bryum densifolium* com a formação de gametófitos (setas) e a colonização de protonemas (asterisco), (j) em solo, com a formação de gametófitos e (k) brotos secundários originados de caulídios primários (seta), (l) em bioplant, com a formação de novos brotos.

Sphagnum platyphylloides: crescimento exclusivamente por gametófitos (Fig. 2a8-f8), demonstrando aspecto melhor na pré-aclimatização, demonstrando coloração mais vigorosa. Nesta etapa, o cultivo em vermiculita foi significativamente melhor (Tabela 2), com gametófitos medindo cerca de 1 cm de altura e apresentado a formação de ramos (Fig. 4i), como também observado nos cultivos em solo e bioplant/solo. Na aclimatização, os melhores resultados foram verificados no cultivo em bioplant/solo (Fig. 4j). Contudo, em todos os substratos testados, notou-se que as plantas desenvolvidas foram mais frágeis do que as plantas em ambientes naturais.

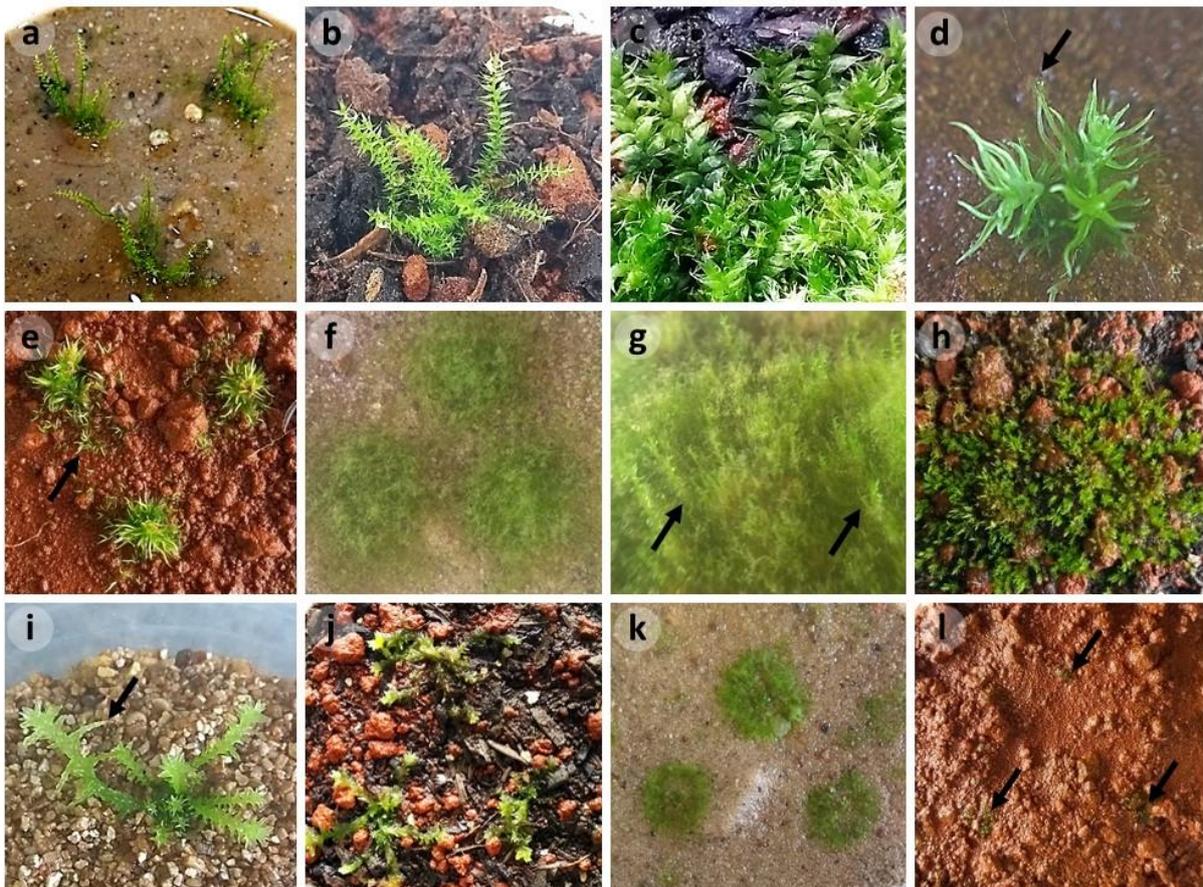


Figura 4: Propagação *ex vitro* de musgos. (a, b, d, f, g, i, k) Pré-aclimatização (45 dias de cultivo) e (c, e, h, j, l) Aclimatização (45 dias de cultivo). (a) *Isopterygium tenerifolium* em areia e (b) bioplant/solo mostrando gametófitos com orientação ereta e (c) bioplant/solo, com gametófitos prostrados ao substrato. (d) *Leucobryum crispum* em solo, com desenvolvimento de protonemas no ápice do filídio (seta) e (e) solo, com formação de novos brotos. (f) *Pogonatum pensilvanicum* em areia, (g) em bioplant/solo, com formação de protonemas e gametófitos (setas) e (h) em bioplant/solo com formação de gametófitos. (i) *Sphagnum platyphylloides* em vermiculita, com desenvolvimento de ramos (seta) e (j) em bioplant/solo. (k) *Vitalia cuspidifera* em areia e (l) em solo, com colônias pouco desenvolvidas (setas).

Vitalia cuspidifera: crescimento predominantemente por protonemas nas duas fases. Na pré-aclimatização, ocorreu o desenvolvimento de 1-5 gametófitos, geralmente na região de inóculo, em praticamente todos os substratos testados. Nesta etapa, o cultivo em areia (Fig. 2k) apresentou os melhores resultados (Tabela 2) (Fig. 2a9-f9). Contudo, na aclimatização esse substrato se mostrou o pior, com a morte de todos os inóculos. Nos demais substratos testados, essa espécie também não exibiu bons resultados, apresentando sensibilidade relevante aos agentes contaminantes, o que promoveu a degradação das colônias formadas na pré-aclimatização (Fig. 4l).



Figura 5: Musgos cultivados em bioplant e aclimatizados em casa de vegetação. (a) *Bryum coronatum*, mostrando a colonização total da superfície do substrato (4) e (b) colônia com altura de 2 cm (seta) (4); (c) *Bryum densifolium* (7); (d) *Isopterygium tenerifolium* com esporófitos (4-5). (Números entre parênteses = meses de cultivo).

4. Discussão

As principais utilidades comerciais praticadas para os musgos estão concentradas na horticultura, principalmente em países asiáticos (Glime, 2017b), e para isso, o mercado é essencialmente abastecido pelo extrativismo (Muir *et al.*, 2006; Studlar & Peck, 2007; 2009). Estudos visando o cultivo *ex situ* de musgos, em condições controladas, para aplicação na horticultura são iniciados com espécies também coletadas em ambientes naturais (Anderson *et al.*, 2010; Doherty *et al.*, 2015; Radu *et al.*, 2015; Prince, 2016). Contudo, considerando que os musgos crescem preferencialmente em locais úmidos (Costa *et al.*, 2010), essa prática pode ser inviável em ambientes de clima seco, uma vez que nesses locais a aquisição de musgos em grande quantidade é um fator limitante (Anderson *et al.*, 2010; Doherty *et al.*, 2015).

Trabalhos buscando a aclimatização de musgos propagados *in vitro*, visto que favorece uma cultura mais limpa e possibilita a produção em escala (Beike *et al.*, 2010a; 2014; Henes *et al.*, 2018), ainda são escassos. Apesar da importância do direcionamento de estudos com essa

perspectiva, de acordo com Duckett *et al.*, (2004), esse caminho não parece ser fácil devido a inúmeras dificuldades.

No presente trabalho, a partir de um experimento preliminar, foi verificado a necessidade de realizar uma etapa de pré-aclimatização, anterior à aclimatização, visando favorecer a colonização do inóculo inicial com maior eficácia e sem a necessidade de irrigação. Essa etapa adicional permitiu a inoculação do material vegetal em pequena quantidade, tanto em estágio de protonema quanto de gametófito. Assim, apesar de não termos encontrado na literatura, relatos sobre a utilização de pré-aclimatização no cultivo de briófitas, nesta etapa os resultados foram bem satisfatórios, pois aumentou a sobrevivência, especialmente das espécies com inóculos ainda em desenvolvimento inicial e promoveu a colonização tanto por protonemas quanto por gametófitos. Com isso, a transição também favoreceu os resultados ao final da aclimatização.

Em uma pesquisa experimental realizada nos Estados Unidos, foi desenvolvido um sistema de propagação de organismos em escala para a recuperação da crosta biológica (Biocrostas). O sistema é baseado no cultivo em estufas, utilizando recipientes contendo solo de biocrosta em um substrato, sobre outro recipiente contendo uma cama de areia, onde a hidratação é realizada por capilaridade, através da irrigação da areia por gotejamento. De acordo com os autores, esse método foi eficiente, aumentando a taxa de crescimento de *Syntrichia ruralis* (Doherty *et al.*, 2015). Contudo, esse sistema favoreceu também o crescimento de bactérias, uma vez que o crescimento é generalista, como destacados pelos autores, e com isso, um desequilíbrio pode prejudicar o desenvolvimento de espécies potencialmente importantes.

Apesar de os melhores resultados terem sido obtidos utilizando-se a areia na pré-aclimatização, esse substrato não foi eficiente durante o cultivo em casa de vegetação, como também observado para vermiculita. Assim, areia e vermiculita não foram os mais indicados para o cultivo em casa de vegetação. Contudo, Jones e Rosentreter (2006), em um estudo realizado com musgos do deserto, destacaram que no cultivo de *B. argenteum* e *Ceratodon purpureus* (Hedw.), em substratos artificiais, os resultados foram melhores quando irrigados com solução nutritiva. No presente estudo, a irrigação dos cultivos em aclimatização foi realizada com água.

Apesar do bioplant ter apresentado percentual de contaminação relevante para *P. pensilvanicum*, *S. platyphylloides* e *V. cuspidifera*, esse substrato, assim como o bioplant/solo parecem ser potencialmente os substratos mais adequados para a propagação *ex situ* em duas etapas, como sugerido na presente pesquisa, uma vez que apresentaram melhores resultados em

períodos mais prolongados de cultivo em casa de vegetação. Para diminuir a contaminação dos substratos orgânicos, como o bioplant, Beike *et al.* (2010b) sugerem a esterilização dupla, com um interstício noturno, para promover a germinação dos esporos de agentes contaminantes sobreviventes na primeira esterilização, o que melhora a desinfestação do substrato após a segunda esterilização.

Observações de campo nos permitiram verificar que as espécies utilizadas na presente pesquisa ocorrem naturalmente em diferentes substratos. *Barbula indica* e *B. argenteum* foram coletadas habitando uma fina camada de solo sobre cimento, mas ocorrem também apenas em solo, principalmente de ambientes perturbados. *B. coronatum*, *B. densifolium*, *I. tenerifolium*, *L. crispum* e *P. pensilvanicum* foram coletadas em solo, *S. platyphylloides* em ambiente aquático e *V. cuspidifera* em rocha. Entretanto, não foi possível diagnosticar um substrato de preferência para o crescimento entre os substratos testados durante o período de observação, 45 dias na pré-aclimatização e 45 dias na aclimatização. Todas as espécies, de maneira geral, apresentaram desenvolvimento na maioria dos substratos no intervalo de 90 dias. Após um período maior, a preferência de crescimento foi mais perceptível para as espécies *B. argenteum*, *B. coronatum* e *I. tenerifolium* cultivadas em bioplant e bioplant/solo.

O cultivo utilizando o solo, coletado no ambiente de ocorrência natural da espécie, como substrato, também foram realizados nos estudos de Jones e Rosentreter (2006) para *B. argenteum*, *Ceratodon purpureus* (Hedw.) e *Syntrichia ruralis* (Hedw.) F. Weber & D. Mohr. T, de Liang *et al.* (2010) também para *B. argenteum* e de Awasthi *et al.* (2012) para *Philonotis thwaitesii* Mitt e *Brachythecium plumosum* Hedw.. Duckett *et al.* (2004) destacam que a aclimatização em substrato natural tem apresentado sucesso, além de vantagem por demonstrar semelhança morfológica entre as espécies de plantas que ocorrem livremente na natureza (Shaw, 1986).

B. argenteum, *B. coronatum* e *I. tenerifolium* apresentaram os melhores resultados na aclimatização, mostrando ótimo desenvolvimento e colonização total do substrato, em até 4 meses de cultivo, principalmente em bioplant e bioplant/solo. Ambas as espécies cresceram de acordo com características próprias de seus hábitos de crescimento. No caso de *B. argenteum* e *B. coronatum*, que são plantas acrocárpicas, cresceram como tufos, com os gametófitos bem justos, formando uma camada densa e almofadada. *I. tenerifolium*, que é uma planta pleurocárpica, cresceu formando um tapete denso de musgos. Essas formas de crescimento são atributos relevantes para evitar a perda de água da superfície do substrato (Glime, 2017a).

O bom desempenho de *B. argenteum* na fase de aclimatização pode ter ocorrido devido ao sucesso reprodutivo dessa espécie em diversas condições de cultivo, como constatado por Raudenbush *et al.* (2016), que em seus experimentos, percebeu que *B. argenteum* apresentou crescimento mesmo quando hidratado com água de pH acidificado. Além disso, outro fato que contribui para o seu sucesso reprodutivo é a constatação da capacidade de tolerância à dessecação (Wood, 2007; Stark *et al.*, 2016), habilidade que também é comprovada para os filamentos de protonemas, por meio da produção de propágulos protonemais (gemas) (Pressel *et al.*, 2007, Pereira *et al.*, 2019a, em submissão) e em suas estruturas de reprodução (Shortlidge *et al.*, 2012; Stark *et al.*, 2016). Em nossos experimentos, foi observado a produção abundante de propágulos vegetativos após 45 dias de cultivo em todos os substratos, bem como a dispersão em um raio de no mínimo 2 metros de distância, no interior da casa de vegetação.

Dentre as espécies aqui estudadas, apenas *B. argenteum* parece ter sido anteriormente cultivado em condições *ex situ*. No trabalho de Jones e Rosentreter (2006), foram utilizados areia, perlita, vermiculita e solo, sendo os melhores resultados alcançados em solo sem hidratação inicial (crescimento em 22%) e vermiculita hidratada com macro e micro nutrientes (crescimento em 13%). Liang *et al.* (2010) também realizou o cultivo *ex situ* para essa espécie, em que foi comparado a propagação de *B. argenteum* selvagem e produzido *in vitro* em vermiculita/turfa (6:1), onde os melhores resultados foram obtidos para a planta produzida *in vitro*.

Isopterygium tenerifolium, que apresenta reprodução bissexual, ou seja monóica, produziu esporófitos em quantidade relevante, com milhares de esporos sendo dispersos no ambiente durante aproximadamente 6 meses. Entretanto, não foi verificado o desenvolvimento dessa espécie em nenhum outro local da casa de vegetação, a não ser nos seus próprios recipientes de origem, embora houvesse diversos recipientes contendo os demais musgos e substratos participantes da presente pesquisa, além de outras espécies e substratos de pesquisas alheias em andamento na casa de vegetação. Em contrário, propágulos vegetativos de *B. argenteum* e de *B. coronatum* se dispersaram e forma considerável, apresentando desenvolvimento em diversos recipientes, crescendo associada a outras plantas.

Apesar dos estudos com foco na indústria hortícola estejam intensamente voltadas para os musgos do gênero *Sphagnum* sp., em função de sua alta capacidade de armazenamento de água e retenção de nutrientes, outras espécies podem ser igualmente usadas para substituir o *Sphagnum*, como *Leucobryum* spp., dentre outros (Alam & Sharma, 2015).

Leucobryum crispum pode ser potencialmente uma espécie substituta do *Sphagnum* sp., por suas características morfológicas similares. Essa espécie demonstrou bom desenvolvimento na propagação *ex situ* em solo e bioplant/solo, apresentando boa colonização, inclusive com regeneração de filídios, como também constatado por Pereira *et al.* (2019a, em submissão), nas condições *in vitro*. *L. crispum* pode ser uma espécie substitutiva promissora do *Sphagnum* sp., especialmente em ambientes sazonalmente secos, em função de sua forma de crescimento, podendo chegar a 5 cm de altura, além de sua melhor adaptação a baixas umidades. Em um estudo com dados ainda não publicados, a propagação *in vitro* de *L. crispum* pôde ser iniciada a partir de gametófitos em meio de cultivo básico, sem reguladores de crescimento, tendo mostrado melhor desenvolvimento em meio com menor disponibilidade de água.

De maneira diferente, *S. platyphylloides* se desenvolveu melhor em vermiculita e areia na pré-aclimatização, que é um ambiente sem flutuações de umidade. Na aclimatização, apesar de ter sobrevivido por mais de 8 meses, essa espécie não demonstrou bom desenvolvimento, apresentando pouco aumento do número de brotos e aspecto morfológico também não satisfatório. Talvez esse resultado esteja relacionado ao fato de que seu ambiente natural seja preferencialmente o aquático.

A propagação *ex situ* de musgos clonados *in vitro* apresenta vantagens relevantes a serem consideradas. Como já constatado, algumas espécies apresentam características morfológicas distintas relacionadas ao sexo, como altura e investimento reprodutivo (Horsley *et al.*, 2011). No trabalho de Horsley *et al.* (2011) para *B. argenteum*, foi reportado que os gametófitos de plantas femininas são mais altos que plantas masculinas e que o investimento reprodutivo de plantas masculinas foi 24 vezes maior que as plantas femininas. Apesar de ambos os sexos apresentarem crescimento vegetativo similar, as plantas do sexo feminino são menos propensas a desenvolver gametângios (Horsley *et al.*, 2011). Adicionalmente, Stark *et al.* (2010), verificaram que a expressão sexual de plantas desenvolvidas de esporos, são proporcionalmente similares. Contudo, populações desenvolvidas naturalmente são predominantemente femininas (Stark *et al.*, 2010). Com isso, a depender das razões para a propagação de determinadas espécies, é preciso a compreensão comportamental prévia do desenvolvimento morfológico e da expressão sexual. E para isso, o cultivo *ex situ* pode encurtar o caminho para esse conhecimento.

O aperfeiçoamento do conhecimento acerca do crescimento vegetativo dos musgos, em condições de cultivo *ex situ*, podem ser de grande contribuição para os estudos relacionados à revegetação de briófitas, como método para recuperação de ecossistemas perturbados, uma vez

que a coleta de material suficiente para a aplicação no campo em grande escala, tem sido reconhecidamente um problema, especialmente em ambientes sazonalmente secos (Saxena & Harinder, 2004; Zhao *et al.*, 2016).

A propagação em condições ambientais controladas é apropriada para a produção de biomassa inicial de briófitas visando as mais diversas aplicações (Anderson *et al.*, 2010; Radu *et al.*, 2015; Glime, 2017b). No presente estudo, verificamos que a pré-aclimatização possivelmente pode ser empregada como etapa única, a depender do objetivo do cultivo, uma vez que esse método demonstrou simplicidade na execução, baixo custo, necessidade de pouco espaço na sala de crescimento, ausência de procedimentos adicionais, bem como de irrigação. Além disso, devido os recipientes permanecerem fechados, proporciona um cultivo altamente seletivo e maior eficiência na propagação.

5. Conclusão

A propagação clonal *ex situ*, realizada em duas etapas, favoreceu a sobrevivência das espécies cultivadas *in vitro* e inoculadas em diferentes substratos. A realização da pré-aclimatização demonstrou eficiência para o crescimento de musgos ainda em estágio inicial de desenvolvimento, promovendo a colonização do substrato tanto por protonemas quanto por gametófitos. A altura dos gametófitos foi frequentemente mais elevada do que na aclimatização. Contudo, a areia não demonstrou bons resultados no cultivo após a transferência para a casa de vegetação. Vermiculita foi o substrato com resultados menos satisfatórios em ambas as etapas de cultivo.

Na pré-aclimatização, todas as espécies cultivadas em areia ou biopant/solo tiveram 100% de sobrevivência. A areia foi o substrato que apresentou os melhores resultados para o cultivo de *Barbula indica*, *Bryum argenteum*, *B. coronatum*, *B. densifolium*, *Isopterygium tenerifolium*, *Pogonatum pensilvanicum* e *Vitalia cuspidifera*. *Leucobryum crispum* e *Sphagnum platyphylloides*, se desenvolveram melhor quando cultivados em biopant/solo e vermiculita, respectivamente.

A aclimatização propiciou a colonização de gametófitos e o aumento da densidade das colônias. O biopant foi melhor para o cultivo de *Barbula indica*, *B. argenteum* e *V. cuspidifera*, o biopant/solo para o cultivo de *B. coronatum*, *P. pensilvanicum* e *S. platyphylloides*, o solo para *B. densifolium* e *L. crispum* e biopant/areia para *I. tenerifolium*.

B. argenteum, *B. coronatum* e *I. tenerifolium* apresentaram os melhores resultados no cultivo em casa de vegetação, mostrando ótimo desenvolvimento e colonização total do substrato, em até 4 meses de cultivo, principalmente em bioplant e bioplant/solo.

Agradecimentos

À CAPES, pela bolsa de doutorado concedida à autora. À Universidade de Brasília pelo suporte financeiro. Aos colegas do laboratório de Criptógamas da Universidade de Brasília, por suas contribuições. Aos Drs. Paulo Câmara, Graça Machado e Denise Costa, pela concessão do espaço, pelos convites em suas expedições e pela identificação do *Sphagnum platyphylloides*, respectivamente. Ao Dr. Eduardo Amorim, por suas contribuições nas análises estatísticas.

6. Referências Bibliográficas

- Alam, A. & Sharma, V., 2015. Horticultural importance of bryophytes - A review. **International Journal of Horticulture**, 5(19) 1-9 (doi: 10.5376/ijh.2015.05.0019)
- Anderson, M., Lambrinos, J. & Schroll, E. 2010. The potential value of mosses for stormwater management in urban environments. **Urban ecosystems**, 13(3), 319-332.
- Awasthi, V., Nath, V., Pande, N. & Asthana, A. K. 2012. Morphogenetic studies and *in vitro* propagation of two mosses: *Philonotis thwaitesii* Mitt. and *Brachythecium plumosum* (Hedw.) BSG. **Taiwania**, 57(1), 27-36.
- Beike, A. K., Decker, E. L., Frank, W., Lang, D., Vervliet-Scheebaum, M., Zimmer, A. D. & Reski, R. 2010. Applied bryology–bryotechnology. **Tropical Bryology**, 31, 22-32.
- Beike, A. K., Horst, N. A. & Rensing, S. A. 2010. Axenic bryophyte *in vitro* cultivation. **Journal of Endocytobiosis and Cell Research**, 20: 102-108
- Beike, A. K., Spagnuolo, V., Lüth, V., Steinhart, F., Ramos-Gomez, J., Krebs, M., Adamo, P., Rey-Asensio, A. I., Fernandez, J. A., Giordano, S., Decker, E. L. & Reski, R. 2014. Clonal *in vitro* propagation of peat mosses (*Sphagnum* L.) as novel green resources for

- basic and applied research. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, *120*(3), 1037-1049.
- Costa, D. P. da, Almeida J. S. dos S., Dias, N. dos S., Gradstein, S. R. & Churchil, S. P. 2010. **Manual de Briologia**. Editora Interciência.
- Costa, D. P. & Peralta, D. F. 2015. Bryophytes diversity in Brazil. **Rodriguésia**, *66*(4): 2015
- Doherty, K. D., Antoninka, A. J., Bowker, M. A., Ayuso, S. V. & Johnson, N. C. 2015. A novel approach to cultivate biocrusts for restoration and experimentation. **Ecological Restoration**, *33*(1), 13-16.
- Duckett, J. G., Burch, J., Fletcher, P. W., Matcham, H. W., Read, D. J., Russell, A. J. & Pressel, S. 2004. *In vitro* cultivation of bryophytes: a review of practicalities, problems, progress and promise. **Journal of Bryology**, *26*(1), 3-20.
- Gignac, L. D. 2001. Bryophytes as indicators of climate change. **The bryologist**, *104*(3), 410-420.
- Glime, J. A. 2007. Economic and Ethnic Uses of Bryophytes. pp. 14–41. *In: Flora of North America*. Editorial Committee, (eds.) *Flora of North American North of Mexico*. v. 27, **Bryophytes: Mosses**, part 1. Oxford University Press. New York.
- Glime, J. M. 2017. Introduction. 1: 1–10. *In: Glime, J. M. (ed) Bryophyte Ecology*. Vol 1. Physiological Ecology. Ebook sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists.
- Glime, J. M. 2017. Gardening: Horticultural Uses. 7: 1-32. *In: Glime, J. M. (ed) Bryophyte Ecology*. Vol 5. Uses. Ebook sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists.
- González, A. G. & Pokrovsky, O. S. 2014. Metal adsorption on mosses: toward a universal adsorption model. **Journal of colloid and interface science**, *415*, 169-178.
- Gradstein, R., Churchill, S. y Salazar, N. 2001. Guide to the Bryophytes of Tropical America, **Editorial Board**, New York, EEUU, 2-32.

- Henes, B., Züllli, F., Niederkrüger, H., Schaaf, A., Frischmuth, T., Decker, E. L. & Reski, R. 2018. The magic of moss. **Soap Perfum Cosmet**, *91*, 64-66.
- Horsley, K., Stark, L. R. & McLetchie, D. N. 2011. Does the silver moss *Bryum argenteum* exhibit sex-specific patterns in vegetative growth rate, asexual fitness or prezygotic reproductive investment?. **Annals of Botany**, *107*(6), 897-907.
- Jones, P. R. & Rosentreter, R. 2006. Gametophyte fragment growth of three common desert mosses on artificial and natural substrates. **The bryologist**, *109*(2), 166-172.
- Knop, W. 1865. Quantitative Untersuchungen über die Ernährungsprozesse der Pflanze. **Die Landwirtschaftlichen Versuchs-Stationen**, *7*, 93-107.
- Liang, S. F., Sun, Y. & Zhu, R. L. 2010. *In vitro* micropropagation of *Bryum argenteum* Hedw. **Cryptogamie. Bryologie**, *31*(3), 233-239.
- Löbel, S. & Rydin, H. 2010. Trade-offs and habitat constraints in the establishment of epiphytic bryophytes. **Functional ecology**, *24*(4), 887-897.
- Longton, R. E. & Miles, C. J. 1982. Studies on the reproductive biology of mosses. **Journal of the Hattori Botanical Laboratory**. *52*, 219–239.
- Muir, P. S., Norman, K. N. & Sikes, K. G. 2006. Quantity and value of commercial moss harvest from forests of the Pacific Northwest and Appalachian regions of the US. **The Bryologist**, *109*(2), 197-215.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Fonseca, G. A. B. & Kente, J. 2000. Biodiversity Hotspots for Conservation Priorities. **Nature**, 403:853-858.
- Peck, J. E. & Muir, P. S. 2001. Harvestable epiphytic bryophytes and their accumulation in central western Oregon. **The Bryologist**, *104*(2), 181-190.
- Pereira, C. G., Carvalho-Silva, M., Pereira, L. A. R. & Silveira, C. E. S. 2019 (em submissão). Indirect establishment increases the chances of *in vitro* propagation of Cerrado mosses – A new method. **Rodriguésia**.

- Pressel, S., Matcham, H. W. & Duckett, J. G. 2007. Studies of protonemal morphogenesis in mosses. XI. *Bryum* and allied genera: a plethora of propagules. **Journal of Bryology**, **29**(4), 241-258.
- Prince, B. A. 2016. An Ecological Analysis of the Potential for Moss-Based Green Roof Design (Doctoral dissertation).
- Radu, D. M., Trautz, D. & Cantor, M. 2015. Moss: Decorative and Ecological Potential in Landscape. **Pro Environment/ProMediu**, **8**(21).
- Raudenbush, Z. 2015. Cultural and chemical control of silvery-thread moss in creeping bentgrass putting greens (Doctoral dissertation, Kansas State University). Disponível em: <http://krex.k-state.edu/dspace/handle/2097/19717>.
- Ros, R. M., Werner, O. & Pérez-Álvarez, J. R. 2013. *Ex situ* conservation of rare and threatened Mediterranean bryophytes. **Fl. Medit**, **23**, 223-235.
- Rowntree, J. K. & Ramsay, M. M. 2005. *Ex situ* conservation of bryophytes: progress and potential of a pilot project. **Boletín de la sociedad Española de briología**, (26), 17-22.
- Rowntree, J. K. 2006. Development of novel methods for the initiation of *in vitro* bryophyte cultures for conservation. **Plant cell, tissue and organ culture**, **87**(2), 191-201.
- Rowntree, J. K. & Ramsay, M. M. 2009. How bryophytes came out of the cold: successful cryopreservation of threatened species. **Biodiversity and conservation**, **18**(5), 1413-1420.
- Rowntree, J. K., Pressel, S., Ramsay, M. M., Sabovljevic, A. & Sabovljevic, M. 2011. *In vitro* conservation of European bryophytes. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, **47**(1), 55-64.
- Sabovljević, M., Vujičić, M., Pantović, J. & Sabovljević, A. 2014. Bryophyte conservation biology: *In vitro* approach to the *ex situ* conservation of bryophytes from Europe. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, **148**(4), 857-868.

- Saxena, D. K. & Harinder. 2004. Uses of bryophytes. **Resonance**, *9*(6), 56-65.
- Shaw, J. 1986. A new approach to the experimental propagation of bryophytes. **Taxon**, 671-675.
- Shortlidge, E. E., Rosenstiel, T. N., & Eppley, S. M. 2012. Tolerance to environmental desiccation in moss sperm. **New Phytologist** *194*: 741 – 750.
- Söderström, L. 2006. Conservation biology of bryophytes. **Lindbergia**, 24-32.
- Stark, L. R., McLetchie, D. N. & Eppley, S. M. 2010. Sex ratios and the shy male hypothesis in the moss *Bryum argenteum* (Bryaceae). **The Bryologist**, *113*(4), 788-798.
- Stark, L. R., D. N. McLetchie, J. L. Greenwood & S. M. Eppley. 2016. Moss antheridia are desiccation tolerant: rehydration dynamics influence sperm release in *Bryum argenteum*. **American Journal of Botany**, *103*: 856–864.
- Studlar, S. M. & Peck, J. E. 2007. Commercial moss harvest in the Appalachian Mountains of West Virginia: targeted species and incidental take. **The Bryologist**, *110*(4), 752-766.
- Studlar, S. M. & Peck, J. E. 2009. Extensive green roofs and mosses: reflections from a pilot study in Terra Alta, West Virginia. **Evansia**, *26*(2), 52-63.
- Tacoronte, B. M., León, Y., Olivo, A. & Vielma, M. 2009. Crecimiento *in vitro* de musgos del bosque nublado andino de Venezuela. **Revista Forestal Latino americana**, *24*(2), 69-89.
- Tuba, Z., Slack, N.G., Stark, L.R. 2011. Bryophyte Ecology and Climate Change. **Cambridge University Press**.
- Vanderpoorten, A. & Hallingbäck, T. 2009. Conservation biology of bryophytes. pp. 487-534, *In.*: A. J. Shaw & B. Goffinet (ed). **Bryophyte Biology**. Cambridge University Press. 2 Ed. 535 p.
- Wood, A. J. 2007. The nature and distribution of vegetative desiccation-tolerance in hornworts, liverworts and mosses. **The Bryologist**, *110*(2), 163-177.

Zhao, Y.G., Bowker, M.A., Zhang, Y., Zaady, E. 2016. Enhanced recovery of biological soil crusts after disturbance. *In*: Weber, B., Büdel, B., Belnap, J. (eds) **Biological soil crusts: an organizing principle in drylands**. Ecological studies series. SpringerVerlag, Berlin, pp 499–523

Considerações finais

Dez espécies de musgos coletadas em áreas de vegetação do perímetro urbano do Cerrado foram estabelecidas, cultivadas e propagadas *in vitro* com sucesso. As técnicas de resgate para estabelecer culturas em condições assépticas, a partir de explantes parcialmente contaminados (estabelecimento indireto), aumentou o índice de estabelecimento para a maioria das espécies testadas. O estabelecimento indireto como nova metodologia de cultivo *in vitro* pode ser uma forma viável de propagação das espécies de briófitas.

Duas espécies, *Bryum argenteum* e *Isopterygium tenerifolium* foram selecionadas, por suas características distintas, para avaliar formas de cultivo visando o ganho de biomassa. Em ambas foram testadas a adição de reguladores de crescimento e de sacarose no cultivo tanto em soluções solidificadas quanto em soluções líquidas, além do cultivo no biorreator de imersão permanente (BIPER) para *B. argenteum*. Os resultados mostraram que o meio líquido foi mais eficiente para investigações sobre o efeito dos reguladores de crescimento. As melhores condições para a propagação de *B. argenteum* foram obtidas no cultivo em solução líquida com adição de sacarose no BIPER, no qual o índice de multiplicação aumentou 1.738 vezes. No cultivo de *I. tenerifolium*, a adição de sacarose ao meio líquido estimulou o aumento da biomassa e intensificou os efeitos do ácido giberélico, o qual induziu a formação de brotos e aumentou as dimensões dos filídios. BAP inibiu o desenvolvimento dos filídios, diminuindo gradativamente as dimensões, porém induziu a produção de brotos.

Em nove espécies cultivadas *in vitro* foram realizadas a propagação clonal *ex situ*, a qual foi conduzida em duas etapas, pré-aclimatização e aclimatização. A primeira etapa foi eficiente para o crescimento de musgos ainda em estágio inicial de desenvolvimento, promovendo a colonização do substrato, tanto por protonemas quanto por gametófitos. A segunda etapa favoreceu a colonização de gametófitos e o aumento da densidade das colônias. *B. argenteum*, *B. coronatum* e *I. tenerifolium* se desenvolveram melhor cultivadas na casa de vegetação.

Embora a maioria das espécies utilizadas neste estudo atualmente apresentem ocorrência comum, o conhecimento e o aprimoramento de estratégias de desenvolvimento, podem viabilizar não só a preservação do grupo, mas também motivar ações ecológicas inovadoras. Dessa forma, são necessários mais estudos com foco no estabelecimento de espécies consideradas de interesse conservacional, na micropropagação e produção em escala, bem como suas aplicabilidades briotecnológicas

Plano de Publicação

Capítulo I:

Estabelecimento indireto aumenta as chances de propagação *in vitro* de musgos do Cerrado –

Um novo método

Revista: *Rodriguésia*

Estágio: Em submissão, já traduzido e formatado de acordo com as regras da revista.

Capítulo II:

Sistemas de cultivo *in vitro* do musgo *Bryum argenteum* Hedw. (Bryaceae)

Revista: *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*

Estágio: Em tradução

Capítulo III:

Efeito de reguladores de crescimento no ganho de biomassa e na morfologia de *Isopterygium*

tenerifolium Mitt. (Pylaisiadelphaceae) cultivado *in vitro*

Revista: *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*

Estágio: Em revisão

Capítulo IV

Propagação Clonal *ex situ* de musgos do Cerrado em diferentes substratos

Revista: *Functional Ecology*

Estágio: Em revisão