



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
Campus São Gabriel

PHYSCOMITRIUM ACUTIFOLIUM BROTH. (FUNARIACEAE):
PROPOSIÇÃO DE UM NOVO MODELO EXPERIMENTAL PARA ESTUDOS
DE MUSGOS EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

SARA NAVARRETE BOHI GOULART
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

PHYSCOMITRIUM ACUTIFOLIUM BROTH. (FUNARIACEAE):
PROPOSIÇÃO DE UM NOVO MODELO EXPERIMENTAL PARA ESTUDOS
DE ENTRE OS MUSGOS EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

SARA NAVARRETE BOHI GOULART

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

Orientador: Dr. Frederico Costa Beber Vieira

Co-orientador: Dr. Filipe de Carvalho Victoria

Co-orientadora: Ms. Maria Victória Magalhães de Vargas

Rio Grande do Sul
Dezembro de 2019

PHYSCOMITRIUM ACUTIFOLIUM BROTH. (FUNARIACEAE):
PROPOSIÇÃO DE UM NOVO MODELO EXPERIMENTAL PARA ESTUDOS
DE ENTRE OS MUSGOS EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

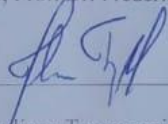
SARA NAVARRETE BOHI GOULART

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

Aprovada por:



Presidente, Prof. Dr. Frederico Costa Beber Vieira



Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo

Karine Elise Janner de Freitas

Prof^{Ms.} Karine Elise Janner de Freitas

São Gabriel, dezembro de 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

B676p Bohi, Sara

PHYSCOMITRIUM ACUTIFOLIUM BROTH. (FUNARIACEAE): PROPOSIÇÃO DE UM NOVO MODELO EXPERIMENTAL PARA ESTUDOS DE ENTRE OS MUSGOS EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO / Sara Bohi.

47 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -- Universidade Federal do Pampa, CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2019.

"Orientação: Frederico Vieira".

1. Cultivo in vitro. 2. Musgos. 3. Physcomitrium acutifolium. I. Título.

“We have a choice, to live or to exist.
I love anything that’s a bit of a challenge”

TPWK

Harry Styles

AGRADECIMENTOS

Obrigada, paizinho e mãezinha, por não entenderem por que eu vim para cá e por quê eu escolhi o que escolhi, mas me apoiaram de todas as formas e se orgulharam da decisão que fiz 4 anos atrás. Obrigada, pai, por não medir esforços para minha formação, sempre dizendo que estás “investindo em mim”. Obrigada, mãe, por me passar a paixão pela biologia, tu me deste um dos presentes mais lindos da minha vida.

Agradeço a UNIPAMPA por me ceder o espaço para aprendizado, estudo e pesquisa. Agradeço ao meu grupo de pesquisa NEVA, Núcleo de Estudos de Vegetação Antártica, por me permitir realizar minha pesquisa e ser minha segunda casa. Agradeço as instituições que em algum momento fomentaram minha pesquisa nestes 4 anos: CAPES, CNPq e PDA.

Obrigada ao meu orientador, Professor Filipe Victoria, por me acolher neste grupo de pesquisa, ser extremamente paciente nas mais variadas situações, não desistir e acreditar em mim. Me ensinando e guiando ao que é fazer ciência verdadeiramente. Obrigada a cada um dos professores que fizeram diferença no meu conhecimento acadêmico e de vida.

Obrigada ao meu irmão, Bohil, por ser meu melhor amigo no mundo e me incentivar a viver. Obrigada por sempre me ouvir, contigo eu sei que posso ser eu mesma nos meus piores e melhores momentos.

Maria, obrigada por ser meu exemplo, minha parceria apaixonada por biotecnologia, por me apresentar os organismos mais lindos e fascinantes desse mundo e principalmente por estar sempre disponível pra me guiar e ensinar tanto. Obrigada a minha duplinha de lab, parceira de aventuras em BSB, Bruna, que continuemos apoiando uma a outra em tudo. Obrigada, Gui, por me fazer rir o tempo inteiro e fazer de tudo por esse grupo. Team Moss, creio que um grupo que se gosta e tem um único objetivo: fazer ciência, deve ser assim. Obrigada por todo apoio e união, sempre nós.

Obrigada, amiguinha, que mesmo que eu insista em cair, tu estás lá rindo e me levantando e isso é tudo pra mim, não posso colocar em palavras o que foi mim te ter ao meu lado nessa bagunça, Josi, obrigada.

Obrigada a cada uma das pessoas (muitas) que colocaram a mãozinha pro caos que foi para que meu estágio em Brasília pudesse acontecer, foi a experiência mais linda que eu tive na vida. Agradeço meus amigos na minha cidade natal, Bagé, que mesmo de longe sempre estiveram presentes me incentivando de todas as formas possíveis e por entenderem o porquê das vezes que estive ausente, Giu, Estêvão, Deamici, Gabriel, Filipe, eu amo vocês e obrigada por ouvirem meus choros, mas me lembrarem o quanto sou apaixonada pelo que faço.

RESUMO

As plantas são organismos conhecidos por sua importância como modelos para estudos biológicos. O uso destes organismos em cultura *in vitro* é uma importante ferramenta, tanto nos estudos básicos, quanto em aplicações comerciais. Nesta linha, um grupo que tem se destacado são as briófitas. As Briófitas *sensu lato* são o grupo de maior sucesso evolutivo entre as plantas, juntamente com as angiospermas, em número de espécies, distribuição geográfica em todos os continentes e diversidade de habitat. Também, mais particularmente, o grupo Bryophyta *stricto sensu*, conhecido popularmente como musgos, possui como fase dominante a haplóide, o estágio gametofítico, e fase transitória a diplóide, estágio esporofítico e reprodutivo. Ao longo dos anos, a utilidade dos musgos vem se tornando cada vez mais conhecida e estudada. Dentre as características que demonstram nitidamente a importância ecológica do seu estudo pode-se pontuar que, por não possuírem cutícula ou epiderme, e terem simples estruturas gametofíticas, há uma maior absorção e retenção de nutrientes, tanto quanto de poluentes, metais e outras substâncias presentes na atmosfera e os torna excelentes modelos para experimentação *in vitro* entre as plantas. O presente estudo refere-se à avaliação de vários aspectos que contribuem para o melhoramento e otimização do crescimento *in vitro* do musgo *Physcomitrium acutifolium* a fim de transformá-lo em um novo modelo experimental entre as espécies de musgo. Primeiramente testes em 3 meios de cultura comumente utilizados para o cultivo de plantas (KNOP +ME, MS e BCD), onde foram colocados 3 gametófitos da planta em cada vidro e feitas réplicas de 4 de cada um dos meios. Estes foram realizados para que pudesse ser feita a análise de qual apresentaria melhor crescimento em medida e peso. Posteriormente, testes foram realizados com 5 fitorreguladores diferentes: ácido indol-3-acético (AIA), ácido 2-aminoisobutírico (AIB), cinetina (KIN), 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido abscísico (ABA) em 3 doses + controle. 6 gametófitos da planta em cada vidro em réplicas de 4. Os gametófitos foram medidos e pesados e, após, analisou-se possíveis polimorfismos no genoma das plantas com auxílio de primers ISSRs. Concluiu-se que o melhor meio a ser usado para medida e peso, respectivamente, seria MS e KNOP + ME. Observou-se que nenhum dos tratamentos com os fitorreguladores resultou em diferença estatística significativa quanto à medida e peso sendo necessário mais testes em número de doses e condições distintas. Já na análise de polimorfismos através de um fenograma de relação cofenética e uma tabela de ausência e presença de ampliações pelos marcadores ISSRs demonstrou-se que os fitorreguladores causam polimorfismos no genoma de *Physcomitrium acutifolium* em diferentes doses, sendo nos mais presentes AIB em 0,5 μ M e BAP 1,0 μ M, respectivamente.

ABSTRACT

Plants are organisms known for their importance as models of biological studies. The use of these organisms in vitro culture is an important tool, both in applied studies and in other commercial applications. In this line, one group that have stood out are the bryophytes. Bryophytes lato sensu are the most successful evolutionary group among plants, along with Angiosperms, in number of species, geographical distribution on all continents and habitat diversity. Also, more particularly, the Bryophyta stricto sensu group, popularly known as mosses, has as its dominant phase haploid, gametophytic stage, and transient to diploid phase, sporophytic and reproductive stage. Over the years, the usefulness of mosses has become increasingly known and studied. Among the characteristics that clearly demonstrate the ecological importance of their study it can be pointed out that, because they do not have cuticle or epidermis, and have simple gametophytic structures, this provides a greater absorption and retention of nutrients, as well as pollutants, metals and other substances present in the atmosphere and make them excellent models for in vitro experimentation between plants. The present study refers to the evaluation of several aspects that contribute to the improvement and optimization of in vitro growth of Physcomitrium acutifolium moss in order to transform it into a new experimental model among moss species. First tests on 3 culture media commonly used for plant cultivation (KNOP + ME, MS and BCD), where 3 plant gametophytes were placed in each glass and 4 replicates were made so that the analysis could be done. which would have better growth in measure and weight. Subsequently tests were performed with 5 different phytohormones: indole-3-acetic acid (AIA), 2-aminoisobutyric acid (AIB), kinetin (KIN), 6-benzylaminopurine (BAP) and abscisic acid (ABA) in 3 doses + control. 6 plant gametophytes in each glass in replicates of 4. Gametophytes were measured and weighed and after that possible polymorphisms in the plant genome were analyzed using ISSRs primers. It was concluded that the best medium to be used for measurement and weight, respectively, would be MS and KNOP + ME. It was observed that none of the treatments with phytohormones resulted in statistically significant difference regarding the measurement and weight, being necessary more tests in number of doses and different conditions. Already in the analysis of polymorphisms through a cophenetic dissimilarity relationship based in phenogram and in binary matrix to asses table the absence and presence of amplifications by the markers ISSRs, showed that the phytohormones, could cause polymorphisms in the genome of Physcomitrium acutifolium in different doses, being the most present IBA in 0, 5 μ M and 1.0 μ M BAP, respectively.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 DETERMINAÇÃO DE MEIO DE CULTURA IDEAL PARA O CRESCIMENTO DE PHYSCOMITRIUM ACUTIFOLIUM.....	16
3.2 EXPERIMENTO UTILIZANDO FITORREGULADORES.....	17
3.3 MEDIÇÃO DA PLANTA	19
3.4 PESAGEM DA PLANTA.....	20
3.5 EXTRAÇÃO DE DNA.....	20
3.6 ANÁLISES MOLECULARES.....	21
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 DETERMINAÇÃO DO MEIO DE CULTURA.....	23
4.1.1 CRESCIMENTO EM BIOMASSA.....	23
4.1.2 CRESCIMENTO EM COMPRIMENTO.....	24
4.2 TRATAMENTO COM FITORREGULADORES	25
4.2.1 <i>ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (AIA)</i>	26
4.2.2 <i>ÁCIDO 2-AMINOISOBUTÍRICO (AIB)</i>	28
4.2.3 <i>CINETINA (KIN)</i>	30
4.2.5 <i>ÁCIDO ABCISICO (ABA)</i>	34
4.2.6 TODOS OS FITORREGULADORES CONTRA TODOS.....	37
4.4 ANÁLISE MOLECULAR	39
5. CONCLUSÕES.....	42
6. REFERÊNCIAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

As plantas são organismos conhecidos, de longa data, por sua importância como modelos de estudos biológicos. O uso destes organismos em cultura *in vitro* é uma importante ferramenta, tanto nos estudos aplicados, quanto em outras aplicações comerciais (SMITH, 2006). A propagação de plantas *in vitro* se baseia em técnicas de cultivo de tecidos vegetais. Fragmentos de tecidos vivos são cultivados em ambiente preparado artificialmente, em meio de cultura com nutrientes necessários, por vezes com reguladores de crescimento, onde cada fragmento da planta encontra condições favoráveis para a regeneração e propagação (FIOR, 2007). O mesmo ocorre com um grupo específico de plantas: as Briófitas.

As Briófitas *sensu lato* são o grupo de maior sucesso evolutivo entre as plantas, juntamente com as Angiospermas, em número de espécies, distribuição geográfica em todos os continentes e diversidade de habitat. Estas plantas não possuem raízes, folhas e nem tecidos verdadeiros. Este táxon pertence à primeira linhagem de plantas terrestres. As briófitas são subdivididas em Bryophyta (musgos), Hepatophyta (hepáticas) e Anthoceroophyta (antóceros) e possuem características evolutivas que lhes conferem vantagem de colonização e adaptação a diversos ambientes. Caracterizam-se por apresentarem tamanho pequeno, crescimento radial, transporte de água célula a célula, transporte externo de água, presença de rizóides para se aderirem às rochas, madeira e outros inúmeros tipos de substrato (PIZARRO *et al*, 2019). São, em sua maioria, ectohídricas, ou seja, sem tecidos condutores internos, e absorvem água e nutrientes por toda a superfície da sua “falsa folha”, o gametófito (TUBA, SLACK, STARK, 2011). Todas essas, dentre outras individualidades, fazem das briófitas excelentes modelos experimentais *in vitro* em meio às plantas.

Mais particularmente, o grupo Bryophyta *stricto sensu*, conhecido popularmente como musgos, possui como fase dominante a haplóide, o estágio gametofítico e como fase transitória a diplóide, estágio esporofítico e reprodutivo. Possuem anatomia não complexa e ciclo celular e reprodutivo de curto período. Desta forma, estas são algumas das características que torna os musgos, principalmente, um alvo atrativo para estudos genéticos, por exemplo, pois o isolamento de mutantes e análises genéticas e moleculares se tornam mais simples em espécies com a fase haplóide dominante (COVE, 2005).

Ao longo dos anos, a utilidade dos musgos vem se tornando cada vez mais conhecida e estudada. Dentre as características que demonstram nitidamente a importância ecológica do seu

estudo pode-se pontuar que, por não possuírem cutícula ou epiderme e terem simples estruturas gametofíticas, há uma maior absorção e retenção de nutrientes, tanto quanto de poluentes, metais e outras substâncias presentes na atmosfera. Musgos são excelentes bioindicadores, alguns deles crescem exclusivamente na presença de uma faixa muito estreita de pH, cálcio, potássio, magnésio e nutrientes no solo e água, o que os torna, obviamente, excelentes indicadores da condição destes locais. Como já descrito, alguns destes organismos acumulam facilmente e em grandes quantidades metais pesados como Chumbo (Pb), Ferro (Fe), Zinco (Zn) e (Níquel) Ni, característica que lhes serve tanto para como indicadores daquilo que está presente no local, como para fitorremediadores de solos contaminados (SAXENA *et al*, 2004).

O estudo em relação a alternativas sustentáveis para a vida encontra-se, muito em foco nos dias de hoje. Nesta linha, a biomassa de musgos vem entrando no ramo com pesquisas demonstrando que a mesma possui uma ação promissora para a produção de bioenergia e biocombustíveis, bem como materiais biodegradáveis (ROY, DUTTA e GALLANT, 2018) (TASKILA, SÄRKELÄ e TANSKANEN, 2016).

Em ascensão, também, se encontra a área de pesquisa acerca da medicina e produção de novos fármacos. A pesquisa em relação aos musgos não foge a essa realidade onde muitos estudos já comprovaram fatores como sua excelente atividade antimicrobiana (DULGER, YAYNTAS e GONUZ, 2015), extratos da biomassa dos mesmos inibindo patologias por fungos (SAXENA & HARINDER, 2004), extrato de terpenóides e ácidos urônicos para aplicação em fármacos e cosméticos sustentáveis (TASKILA, SÄRKELÄ e TANSKANEN, 2015).

Entre outros estudos, também aqueles voltados a geração de plantas com identidade genética, sanidade e em grande escala, cultivo e propagação de plantas em ambiente preparado artificialmente, com cultura de células, tecidos e órgãos vegetais, todos fatores que dão caminho para o avanço biotecnológico, molecular e de engenharia genética (FIOR, 2007).

A espécie de musgo mais conhecida, também chamada “modelo experimental” é a *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch&Schimp., considera-se que a mesma é o modelo dentro do grupo pois já foi realizada uma varredura em questão do seu genoma, condições ideais *in vitro*, muitas de suas respostas quanto a estresses bióticos e abióticos, modo de transformação, entre outros (COVE, 2005). Espécie de ocorrência na Europa, América do Norte e Ásia, (TROPICOS, 2019) porém sem nenhum registro de ocorrência na América do Sul e trópicos, ou seja, não há

acesso a ela a não ser por compra e envio. Fato esse nos leva ao interesse por espécies que possam se relacionar com nossa espécie modelo, mas que tenhamos acesso em nosso Bioma. Por exemplo, *Physcomitrium acutifolium* Broth. que tem ocorrência relatada em abundância no Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro (TROPICOS, 2019) e pertence à mesma Família da *P. patens*, Funariaceae, e se relacionam em vários aspectos e pode vir a se tornar uma excelente proposta para modelo tropical.

Neste âmbito, além das condições já conhecidas e citadas de necessidade natural das plantas, quando e para serem reproduzidas corretamente *in vitro*, existem também os chamados fitorreguladores, que são compostos orgânicos produzidos e atuantes nas mais variadas partes das plantas, podendo também serem sintéticas, que regulam crescimento e desenvolvimento ou estimulando ou inibindo certos comportamentos (RAVEN, 2001).

O ácido indol-3-acético, mais conhecido como AIA, é um fitorregulador da classe das auxinas, que estão amplamente envolvidas em processos de desenvolvimentos das plantas. As auxinas possuem envolvimento na morfologia de raízes, estimulando o aumento lateral das mesmas e inibindo o alongamento. (KARAKEÇILLI *et al*, 2019). Sob condições favoráveis, este grupo estimula o bom crescimento de plantas em baixas concentrações. Quando administrada em concentrações muito altas, facilmente apresentam funções inibitórias, fatores que demonstram a demanda de uma boa regulação nas concentrações adicionais de AIA para o seu bom uso (MITTAG, GABRIELIAN e LUDWIG-MÜLLER, 2015).

AIA é uma das principais auxinas exógena entre as plantas. É sintetizado tanto por triptofano (TRP) usando vias dependentes de TRP quanto por um precursor indólico de TRP por vias dependentes dele. Esta mesma auxina pode ser obtida através da β -oxidação do indol-3-butírico, outra auxina endógena, ou por hidrólise de conjugados AIA, nos quais está ligado a aminoácidos, açúcares ou peptídeos (WOODWARD & BARTEL, 2005).

Quanto à relação dos musgos com este regulador, considerando as diferentes estruturas que estes organismos apresentam comparados com plantas superiores com tecidos verdadeiros, estudo prévios sugerem que AIA poderia induzir o caulonema e o cloronema a se diferenciarem posteriormente ao que normalmente fariam estes organismos (ZHAO *et al*, 2018). Bem como, NOMURA *et al* (2014), também demonstraram a grande repressão desta auxina na fase de diferenciação celular de cloronema para caulonema na espécie *Scopelophila cataractae* (Mitt.) Broth., além da lentidão na formação inicial do protonema. E em 2015, MITTAG,

GABRIELIAN e LUDWIG-MÜLLER, sugeriram que temperaturas mais altas em cultivo no escuro do musgo modelo *Physcomitrella patens* induz a maior produção de AIA na planta.

Ainda, entre as auxinas, existem aquelas sintéticas, ou seja, que são suplementadas exogenamente à planta. Exemplos destes fitorreguladores sintéticos são o ácido 2-aminoisobutírico (AIB) e o ácido naftalenoacético (ANA), que são efetivas ao estimularem a criação mais rápida e uniforme de raízes, mais especificamente de raízes adventícias (FERREIRA *et al*, 2010). Mais comumente usado em espécies arbóreas, é relatado que, quando aplicado em concentrações ideais se torna útil na estimulação do enraizamento adventício em estacas caulinares e foliares em *Eucalyptus cloeziana* (ALMEIDA *et al*, 2007). É importantíssimo nas primeiras divisões celulares de raízes, parte crucial para o início da formação das mesmas. Estudos mais avançados também demonstraram influência do AIB no processo pós-transcricional e traducional em um passo vital para o enraizamento e que é útil na síntese de proteína precoce (JACKSON, 2012). Neste sentido, segundo DONOGUE *et al*, em estudos ainda em andamento, o gene envolvido na formação dos rizóides em musgos e hepáticas seria o mesmo gene que também está relacionado com a formação de raízes em Tracheophytes, trazendo a tona a hipótese de que, de um ponto de vista genômico, rizóides poderiam ser considerados raízes; o que torna a aplicação de AIB em musgos interessantíssima a fim de saber como, ou se, um fitorregulador que atua sob raízes nas plantas atuaria nos rizóides de musgos.

Outro grupo de fitorreguladores são as citocininas conhecidas por promoverem principalmente a divisão celular, mas também a formação de gemas, atraso da senescência foliar, inibição das gemas laterais, entre outros. Dentro deste grupo, encontra-se a cinetina (KIN), a citocinina em forma sintética mais utilizada, descoberta e sintetizada por MILLER & SKOOG, através do isolamento do fator de crescimento da preparação autoclavada de DNA (RAVEN, 2001). Estudos mostram que quando aplicada na germinação, cinetina pode acelerar a protuberância radicular, porém pode também causar comprometimento no crescimento da radícula (ARAÚJO *et al*, 2019). Na literatura encontram-se relatos de que a cinetina pode ser uma grande aliada na estimulação da regeneração de parede celular, divisão celular e formação de protonema e gametófito (NOWAK e MLODZIANOWSKI, 2014). Relata-se que as citocininas teriam propriedade para eliminação de radicais livres e melhoramento da síntese de proteínas fotossintéticas e o teor de clorofila das plantas. E importantemente, a cinetina, em específico, é crucial no papel de resistência à inúmeros estresses abióticos, como salinidade,

seca, temperaturas extremas e metais pesados (KAYA, AKRAM e ASHRAF, 2018). Como já descrito por de VARGAS *et al*, 2017, musgos como *Funaria hygrometrica* Hedw. podem ser considerados tolerantes ao estresse por sal, o que ressalta a importância dos testes em outras espécies em questão disso e eventualmente da necessidade do uso de cinetina em meio com alto teor salino.

A 6-benzilaminopurina, BAP, também faz parte do grupo de citocininas sintéticas, comumente usada na propagação *in vitro* de diversas espécies. Como já mencionado, as citocininas agem estimulando a divisão celular nas plantas, portanto, o BAP tem sido descrito por ser excelente induzindo as gemas adventícias e partes aéreas da planta (de MOURA *et al*, 2001). Pesquisas prévias apresentaram relação do BAP com a macieira, por exemplo, induzindo brotação e em determinadas doses a formação de calos e brotações (MORALES *et al*, 1999). A área de estudos deste fitorregulador aplicada à musgos ainda é bastante escassa, porém em 2010 SABOVLJEVIC, SABOVLJEVIC e VUKOJEVIC demonstraram que BAP possui efeito positivo para a retenção de cloforila em musgos desenvolvidos *in vitro*, porém inferior ao poder de KIN, porém melhores ainda em concentrações mais altas nas plantas coletadas na natureza. E, interessante, esta citocinina, quando testada para a indução de desenvolvimento gametofítico mais rápido em *Bryum billarderi* Schwägr., apresenta efeito após apenas 6 dias, dependendo da concentração (ZAVALA *et al*, 2012)

O ácido abscísico (ABA) é um fitorregulador em um grupo isolado de todos os outros. Tem como característica abscisão e inibição nos mais variados quesitos, um deles sendo o próprio crescimento da planta. Induz a síntese de proteínas de reserva em sementes podendo afetar na indução e manutenção da dormência nas sementes e gemas de algumas espécies. Segundo estudos, pode induzir o fechamento de estômatos na grande maioria das espécies o que pode ajudar na resistência a patógenos pois inibe a sua entrada, bem como, a perda de água por transpiração. Desempenha, também, papel de sinalizador da raiz para o sistema caulinar. Quando expostas a fatores abióticos, gerando estresse hídrico, as raízes das plantas respondem com o aumento da biossíntese do ABA, que acaba sendo liberado no xilema, se movendo rapidamente para as folhas. Outro caso são as plantas mutantes wilty, que são incapazes de sintetizar o ABA, possuem um fenótipo murcho, ou seja, são capazes de crescer normalmente somente em condição de muita umidade (RAVEN, 2001)

Quando se trata da atuação do ABA nos musgos, pesquisas moleculares foram feitas por KITAGAWA *et al*, 2018 em *Physcomitrella patens* demonstrando que este fitorregulador restringe o movimento célula a célula de Dendra2, uma proteína monomérica fluorescente, nesta espécie. Este tipo de resposta pode trazer à tona a hipótese de a relação do mecanismo de transporte célula a célula nos musgos quando restrita com a abertura e fechamento dos estômatos em plantas altas.

Já anteriormente relatado, também, temos em vista a possibilidade de serem gerados polimorfismos, variações ou mutações no genoma de plantas devido ao uso em níveis muito elevados de alguns tipos de fitorreguladores. Visto isso, sabendo-se que para cultura de plantas *in vitro* é de extrema necessidade a garantia de estabilidade genética das mesmas. Variações no genoma de um banco de biomassa de plantas leva a problemas na propagação pois não se pode prever seu comportamento e não se pode assumir que todas as réplicas se comportarão da mesma maneira (TIWARI *et al*, 2013) (RAHMAN e RAJORA, 2001), fato que torna relevante, além das condições morfológicas da planta *in vitro*, a investigação do comportamento do genoma de organismos vegetais nos mais variados meios de culturas e reguladores de crescimento.

2. OBJETIVOS

Objetivou-se caracterizar o desenvolvimento de espécie de *Physcomitrium acutifolium* em condições *in vitro* ideais, analisando diferentes aspectos que podem influenciar, facilitando ou não, sua propagação em ambiente artificial.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a influência de 6-benzilaminopurina sobre o peso e comprimento de *Physcomitrium acutifolium*.

Avaliar a influência de ácido indol-3-acético sobre o peso e comprimento de *Physcomitrium acutifolium*.

Avaliar a influência de ácido 2-aminoisobutírico sobre o peso e comprimento e de *Physcomitrium acutifolium*.

Avaliar a influência de ácido abscísico sobre o peso e comprimento de *Physcomitrium acutifolium*.

Avaliar a influência de cinetina sobre o peso e comprimento de *Physcomitrium acutifolium*.

Observar possíveis polimorfismos no genoma de *Physcomitrium acutifolium* causados por diferentes fitorreguladores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório do Núcleo de Estudos da Vegetação Antártica (NEVA), localizado na Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus São Gabriel. A biomassa de *Physcomitrium acutifolium* Broth. necessária para uso nos experimentos pertence ao banco de espécies de briófitas que é mantido em cultura no laboratório em câmara de fotoperíodo (16 h luz/8 h escuro) a $\pm 20^{\circ}\text{C}$. Esta foi obtida previamente a partir do inóculo dos esporos de *P. acutifolium* em meio de cultura KNOP (RESKI e ABEL, 1985) coletados no Campus São Gabriel da Universidade Federal do Pampa (-30.3337015; -54.3625962).

Absolutamente todos os equipamentos, vidrarias e instrumentos utilizados no processo foram devidamente esterilizados e os processos necessários feitos dentro de capela de fluxo laminar a fim de manter as plantas em condições assépticas.

3.1 DETERMINAÇÃO DE MEIO DE CULTURA IDEAL PARA O CRESCIMENTO DE *PHYSCOMITRIUM ACUTIFOLIUM*

A fim de determinar qual meio de cultura seria o mais adequado para o cultivo *in vitro* de *Physcomitrium acutifolium* foram testados os três meios mais comumente utilizados em briófitas (SABOVLJEVIC *et al* 2012; BATRA e ABEL, 1981; HOHE e RASKI, 2002; DA SILVA, PORTO e SIMABUKURO, 2009; CHATTOPADHYAY, 2018). (1) KNOP (RESKI; ABEL, 2004) contendo 25 g/L das soluções KH_2PO_4 , KCl e MgSO_4 , 100 g/L de CaNO_3 e 250 mg/L de FeSO_4 . Neste meio, ainda, há uma suplementação de micronutrientes: 309 mg/L de H_3BO_3 , 845 mg/L de MnSO_4 , 431 mg/L de ZnSO_4 , 41,5 mg/L de KJ, 12,1 mg/L de Na_2MoO_4 , 1,25 mg/L de CuSO_4 e 1,46 mg/L de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$. (2) MS (Murashige e Skoog, 1962) sendo preparado a partir de 4,4 g/L do pó Sigma-Aldrich®, e (3) BCD medium (ASHTON e COVE, 1977) com 25 g/L de MgSO_4 e KH_2PO_4 e 1,25 g/L de FeSO_4 . Inicialmente os meios foram preparados e suplementados com 6 g/L de Phytigel®. Os meios (1) e (2) tiveram seu pH ajustado para 5,8 e (3) para 6,5. A esterilização dos meios de cultura foi realizada através de autoclave e após esse processo foram vertidos em vidros de cultivo *in vitro* do tipo Bio-Sama em réplicas de quatro para cada meio.

Em cada vidro foram colocados três gametófitos cuidadosamente escolhidos para serem aproximadamente do mesmo tamanho. Estes vidros foram, então, mantidos durante 14 dias em câmara de fotoperíodo (16 h luz/ 8 h escuro) a $\pm 20^{\circ}\text{C}$ e observados diariamente para a

certificação de que nenhuma das amostras apresentasse contaminação bacteriana ou fúngica. Ao fim do prazo estipulado de 14 dias, essas amostras foram retiradas e cada amostra passou por análises de peso e medida.



Figura 1: Exemplo do experimento de cultivo *in vitro* de *P. acutifolium* em meio KNOP + ME semi-sólido demonstrando a disposição dos três gametófitos . Fonte: Arquivo pessoal/Pinheiro.

3.2 EXPERIMENTO UTILIZANDO FITORREGULADORES

Após os resultados obtidos no primeiro experimento, onde foi possível determinar qual meio seria mais eficiente ou conveniente para uso, o meio KNOP + ME foi escolhido e assim deu-se a continuidade aos experimentos. Foram testados cinco fitorreguladores neste meio semi-sólido com as plantas.

A quantidade de 5 mg de cada um dos fitorreguladores em pó foi diluída em 100 mL de água destilada para a produção de cada solução a ser utilizada equivalentemente nos meios.

Cinco soluções foram feitas: (1) Ácido abscísico, (2) 6-benzilaminopurina, (3) Ácido 2-aminoisobutírico, (4) Ácido indol-3-acético, (5) Cinetina. Para a esterilização as soluções número 2 e 5 foram autoclavadas após a preparação, por não apresentarem nenhuma restrição que interferiria na sua ação. Já as soluções números 1, 3 e 4 foram filtrados com filtros MILLEX®GV Durapore®PVDF 0.22 μm após a preparação por serem termosensíveis. Todos foram armazenados na geladeira e em vidros âmbar devido a sua fotossensibilidade.

Os tratamentos de cada um dos fitorreguladores foram aplicados em 4 concentrações (0; 0,5; 1,0; 1,5 μM). Usando réplicas de quatro para cada um dos tratamentos, ao final tínhamos dezesseis vidros de cada fitorregulador. A solução foi inserida utilizando pipeta de 10 μL Eppendorf® Research Plus no meio ainda líquido após autoclavado, porém já morno, para que a viabilidade das soluções termosensíveis não fossem perdidas no meio muito quente. Após solidificação desses meios foram colocados seis gametófitos da planta em cada vidro cuidadosamente para que todas tivessem tamanho aproximado. Três gametófitos foram destinados à medição e pesagem e outros três à posterior extração de DNA. Este experimento foi observado pelo período de sete dias.



Figura 2: Experimento para fitorreguladores; disposição dos gametófitos de *P. acutifolium* em meio de cultura KNOP + ME, com adição de fitorregulador. Fonte: Arquivo pessoal/Pinheiro.

3.3 MEDIÇÃO DAS PLANTAS

Após o prazo estipulado de sete dias, cada gametófito foi medido com paquímetro Mitutoyo® de alta precisão e seus valores devidamente colocados em tabela em formato apropriado para posterior análise no software R®. Cada amostra de gametófito teve sua imagem registrada em microscópio estereoscópico Zeiss Stemi 2000-C (Figura 3).



Figura 3: Amostra de gametófito após sete dias de crescimento. Arquivo pessoal.

3.4 PESAGEM DA PLANTA

Após o mesmo prazo, cada gametófito foi pesado em balança analítica de alta precisão Bioscale® para a obtenção de valores exatos e, com o mesmo intuito da medição, estes dados foram colocados em tabela apropriada para análise no mesmo software.

3.5 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA dos gametófitos de *P. acutifolium* após tratamento com fitorreguladores foi extraído separadamente utilizando o kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit Invitrogen® conforme protocolo estabelecido e instruído pelo fabricante. O DNA foi extraído, quantificado sua concentração e qualidade no equipamento Nanovue® e armazenado em freezer a -20 °C até a o prosseguimento das análises moleculares.

3.6 ANÁLISES MOLECULARES

As análises moleculares dos experimentos de cada um dos tratamentos dos cinco fitorreguladores testados em *Physcomitrium acutifolium* foram realizadas através da reação em cadeia da polimerase (PCR) no termociclador BioRad® C-1000 Thermocycler. Cada tratamento (0; 0,5; 1,0; 1,5 µM) de cada fitorregulador foi submetido à amplificação com 16 primers ISSRs (Tabela 1), de acordo com a padronização para regiões ISSRs de *Physcomitrella patens* descritos por VICTORIA *et al* (2011). Em um tubo padrão para PCR (0,2 mL) foi adicionado 2 µL do primer (com concentração de 100 pM), 4 µL de amostra de DNA (em 20 ng/µL) e 19 µL de mix para PCR. O programa usado no termociclador para a PCR para amplificação das regiões de ISSR (microssatélites) foi o ISSR, iniciando a 94° C por 5 minutos, a amplificação com 35 ciclos de 55° C por 45 segundos, 72° C por 90 segundos. A extensão foi feita a 72°C por 7 minutos (A tabela 1 mostra as sequências dos primers utilizados).

Após a conclusão dos ciclos de PCR, géis de agarose a 3% foram feitos para a aplicação das amostras e a conseguinte corrida eletroforética feita à 90 W. O resultado da eletroforese foi visualizado em transiluminador LPix® LOCCUSBiotecnologia® Molecular Imaging com luz ultravioleta.

Tabela 1 - Sequências e temperaturas de anelamento do primers das regiões ISSR segundo VICTORIA *et al* (2011)

<i>LOCUS</i>	Sequência 5' - 3'	Temperatura de anelamento
ISSR1	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAA	53.5°C
ISSR2	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAC	52.8°C
ISSR3	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG	53°C
ISSR4	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAT	52.3°C
ISSR5	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTA	51°C
ISSR6	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC	53°C
ISSR7	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTG	54.1°C
ISSR8	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTT	52.6°C
ISSR9	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA	53.0°C
ISSR10	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGC	55.3°C
ISSR11	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGG	55.1°C
ISSR12	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGT	51.9°C
ISSR13	ATATATATATATATATATATA	29.5°C

ISSR14	ATATATATATATATATATATATC	31°C
ISSR15	ATATATATATATATATATATATG	31.9°C
ISSR16	ATATATATATATATATATATATT	31.2°C

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os testes estatísticos foram feitos através do software RStudio, Inc. Version 1.2.1335 pelo teste Mann Whitney U com teste de Shapiro $p > 0,05$. E para a análise dos números de polimorfismos identificados pelos primers para regiões ISSRs de todos os tratamentos em *P. acutifolium* foi montada uma tabela de presença e ausência de bandas (polimorfismos) para geração de uma matriz de dissimilaridade e árvore de distância fenética foi gerada também no software RStudio. O software gerou um fenograma pelo método UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETERMINAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

Para determinar qual meio iria favorecer melhor o crescimento de *P. acutifolium* para a continuação dos experimentos, analisou-se o crescimento em peso (biomassa em gramas) e o crescimento em medida (comprimento em milímetros).

4.1.1 CRESCIMENTO EM BIOMASSA

Assim, apresenta-se uma análise em relação ao crescimento em massa (g) da planta.

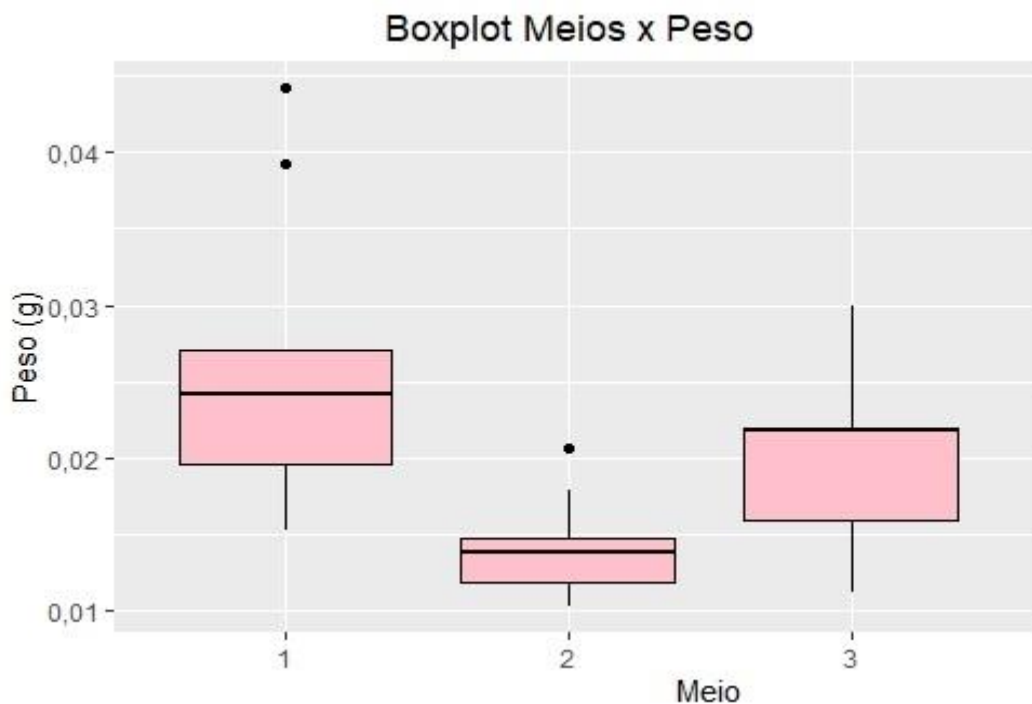


Figura 4: Gráfico boxplot da análise dos 3 meios de cultura em relação ao peso (biomassa) em gramas demonstrando a diferença entre os três meios, onde meio 1 (KNOP + ME) se sobressai aos demais. 1: KNOP + ME, 2: MS e 3: BCD.

Baseando-se no teste de Mann-whitney u test considerando $p \leq 0,05$ como parâmetro para comparação de diferença significativa entre os meios 1 (KNOP + ME) com 2 (MS), 2 (MS) com 3 (BCD) e 1 (KNOP + ME) com 3 (BCD) e valor de $p > 0,05$ para o teste de Shapiro para a comparação dos três meios de cultura juntos. Considerando os três meios (Figura 4), em um todo, com $p\text{-value} = 0,006235$ não pode-se dizer que há diferença estatística significante quando

comparados em conjunto, já quando avaliados separadamente com o teste Mann-whitney U o meio 1 (KNOP + ME) e meio 2 (MS) apresentam diferença estatisticamente significativa em relação um ao outro e pode-se dizer que o meio KNOP + ME possui o melhor crescimento em peso, mesmo que não significativamente em uma visão geral. Por outro lado, meio 3 (BCD) e meio 1 apresentaram $p\text{-value} = 0,2224$, e meio 2 com 3 $p\text{-value} = 0,0517$ demonstrando uma diferença que não se pode afirmar significativa entre eles.

4.1.2 CRESCIMENTO EM COMPRIMENTO

O gráfico a seguir apresentando análise do crescimento (mm) da planta.

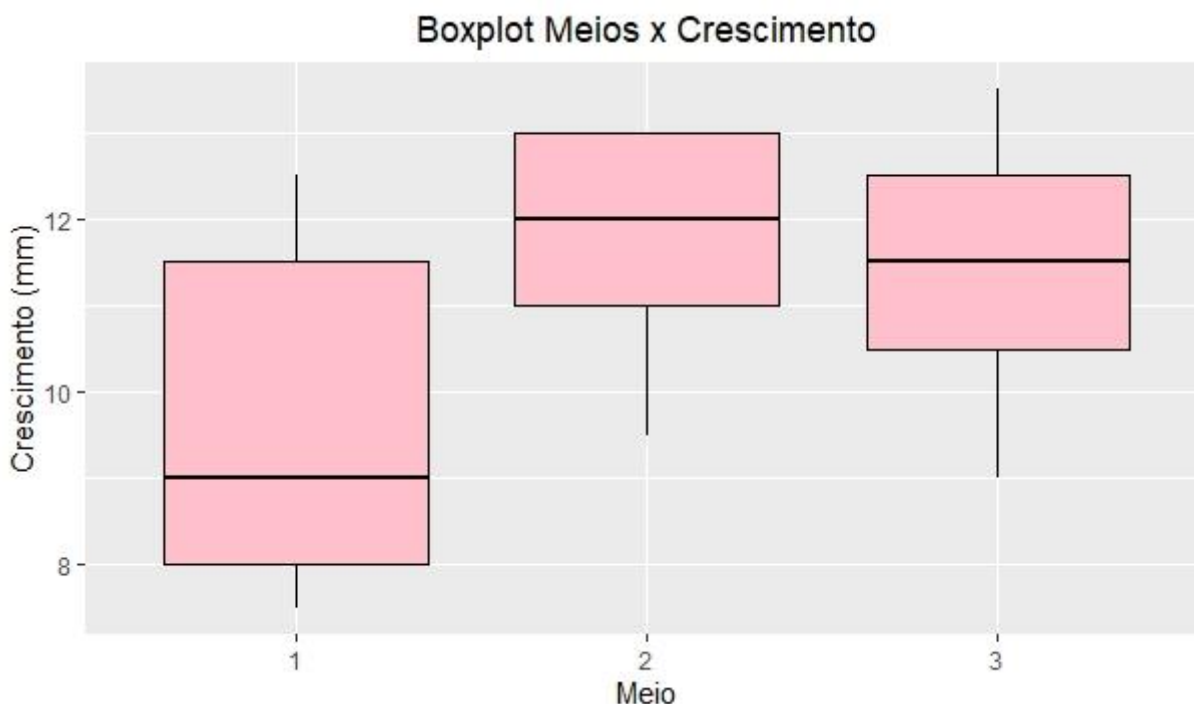


Figura 5: Gráfico boxplot da análise dos 3 meios de cultura em relação à medida em milímetros demonstrando que o meio 2 (MS) difere dos demais apresentando melhor crescimento. 1: KNOP + ME, 2: MS e 3: BCD.

Os mesmos testes e parâmetros foram adotados para a avaliação do crescimento em medida (mm) dos explantes. Em um patamar geral (Figura 5), $p\text{-value}$ foi igual à 0,0497 o que nos diz que se pode considerar que os meios possuem diferença significativa entre si, porém com um valor não muito confiável, pois fica na margem do parâmetro que é $p > 0,05$ pelo teste de

Shapiro. Comparando um contra o outro separadamente, o meio 1 (KNOP) e meio 2 (MS) foram os únicos que apresentaram diferença significativa entre si, com p-value sendo igual à 0,01854 e demonstrando que entre os 3 meios, pode-se dizer que o 2 (MS) é o mais eficiente, podendo o meio 3 (BCD) ser eficiente também. Pois meio 1 (KNOP) com 3 (BCD) e meio 2 (MS) com 3 (BC) tiveram um p-value igual à 0,061664 e 0,4767 respectivamente que de acordo com o parâmetro do Mann-Whitney U test não é possível afirmar que são significantes.

Tendo estes dados e afirmativas em vista, para a decisão de que meio é o ideal a ser utilizado para *P. acutifolium*, deve-se considerar o objetivo desejado à cada experimento. Se no caso deseja-se obter mais biomassa em peso, como demonstrado acima, o ideal seria a escolha do meio 1 testado, ou seja, KNOP descrito por RESKI e ABEL em 1985 + ME. Desejando-se obter maior crescimento em medida (mm) os meios mais ideias para este fim seriam o meio 1 (KNOP) principalmente, mas também, muito próximo, o meio 3, BCD, descrito por ASHTON e COVE em 1977. Por outro lado, se o experimento não requer uma abordagem específica para crescimento, o critério a ser adotado pode ser de disponibilidade e custo de materiais.

Neste caso, optamos por dar continuidade com o meio 1 (KNOP + ME).

4.2 TRATAMENTO COM FITORREGULADORES

Procurou-se analisar como cada um dos fitorreguladores se apresentou nas plantas e em suas respectivas doses, sendo o 1 (controle), 2 (0,5 μ M), 3 (1,0 μ M) e 4 (1,5 μ M).

4.2.1 ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (AIA)

Iniciando por AIA as análises e resultados da comparação de doses de cada fitorregulador levando em consideração peso (g) e medida (mm).

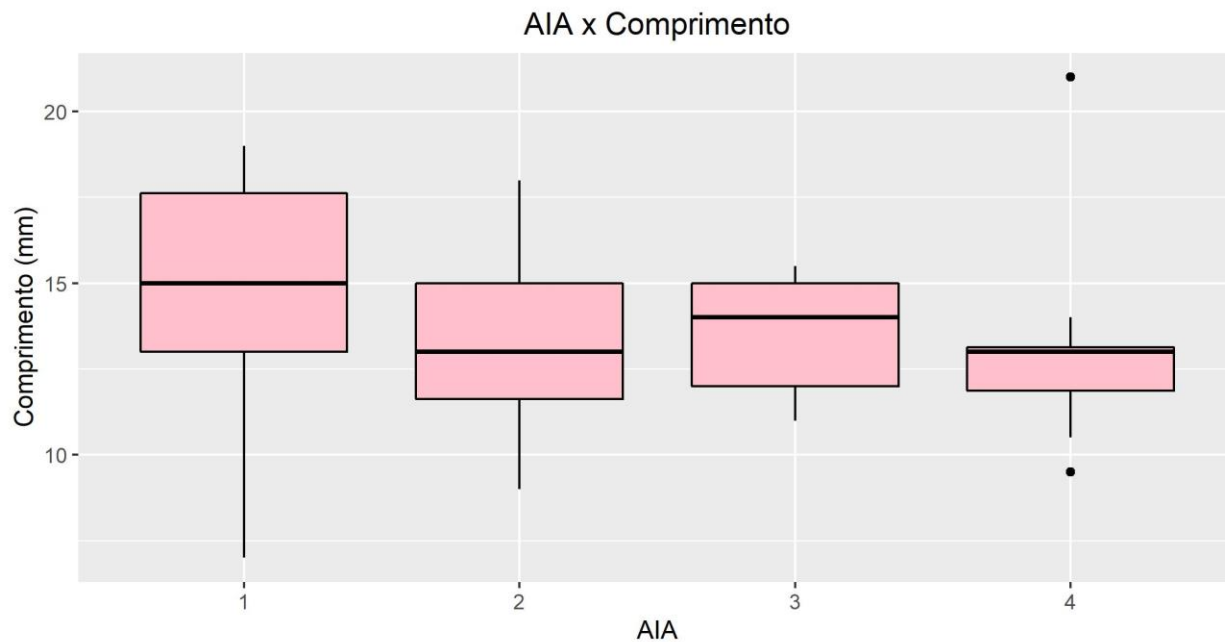


Figura 6: Gráfico boxplot da análise em medida das 3 doses + controle utilizadas para o teste do fitorregulador AIA em *Physcomitrium acutifolium* onde não se observa diferença estatística significativa entre nenhuma das doses aplicadas. 1: controle, 2: 0,5 μM , 3: 1,0 μM e 4: 1,5 μM .

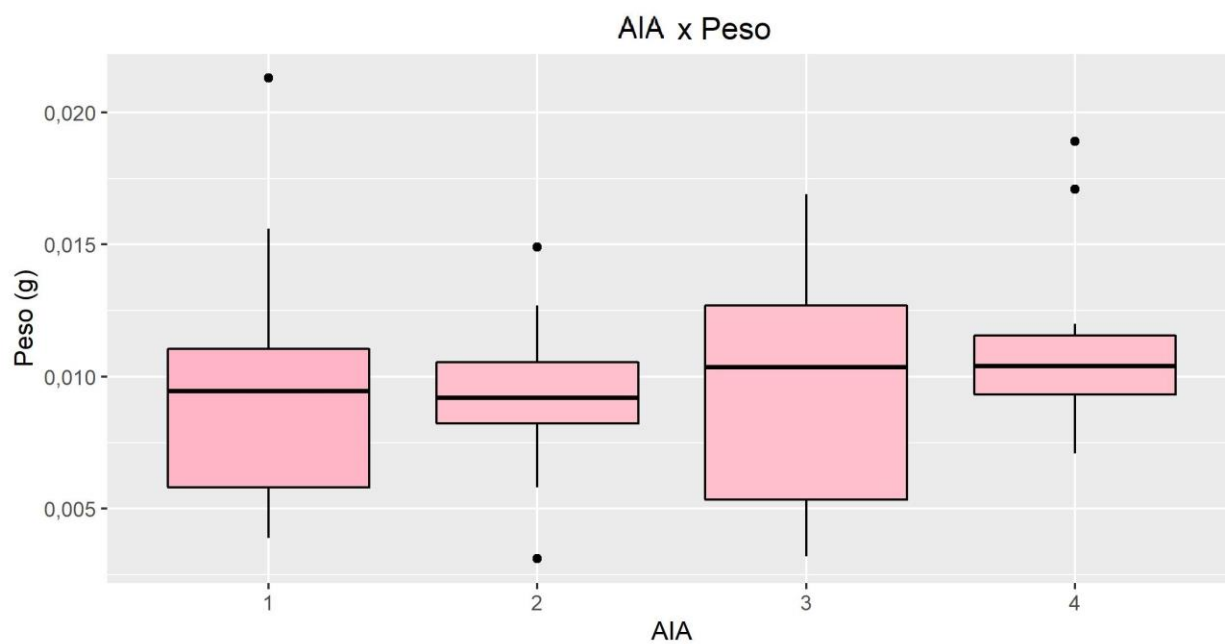


Figura 7: Gráfico boxplot da análise em peso das 3 doses + controle utilizadas para o teste do fitorregulador AIA em *Physcomitrium acutifolium* onde não se observa diferença estatística significativa entre nenhuma das doses aplicadas. 1: controle, 2: 0,5 μM , 3: 1,0 μM e 4: 1,5 μM .

Primeiramente, foi avaliado o efeito de AIA em questão do crescimento da planta em medida e em peso. De acordo com os valores e observação dos gráficos acima (Figura 6 e 7), constata-se que não se pode afirmar com propriedade que o fitorregulador, nessas doses, tiveram diferença significativa e estatística sobre os explantes de *P. acutifolium*, nem em medida, nem em peso.

Estudos recentes, de 2019, por OHTAKA *et al*, demonstraram os efeitos de AIA em uma espécie de alga carofítica *Klebsormidium nitens* (Kützing) Lokhorst. Apresentando os resultados de que AIA inibe divisão e alongação celular e, ainda, regula genes de expressão indicando que possivelmente pode regular a divisão e alongação celular. Visto isso e sabendo que as briófitas são ancestrais de algas verdes e por essa razão muitas vezes podemos relacioná-las, sugere-se que estudos mais aprofundados em relação a citologia da espécie estudada sejam realizados, a fim de averiguar se comportamentos neste sentido também ocorreriam, já que este tipo de processo afeta diretamente o crescimento e alongamento dos gametófitos em questão das divisões celulares e também dos genes de regulação que possuem influência no desenvolvimento de todas as partes da planta.

Uma pesquisa realizada por JANG e DOLAN, no ano de 2011, tendo como organismo a espécie modelo *Physcomitrella patens*, realizando testes com alguns tipos de auxinas demonstraram que essas promovem a transição de cloronema para caulonema no protonema do musgo por regularem positivamente os genes PpRSL1 e PpRSL2 e de forma simplificada essa expressão é suficiente para promover a diferenciação de protonema para caulonema. Este é um estudo a ser levado muito em conta quanto ao crescimento de musgos pois quanto mais rápida esta diferenciação ocorre, mais rápido se dá o crescimento da planta, em vista disso sugere-se que experimentos com as doses do estudo de Jang e Dolan desde a inoculação esporofítica de *P. acutifolium* sejam feitos para averiguar se este mesmo comportamento ocorre nesta espécie.

4.2.2 ÁCIDO 2-AMINOISOBUTÍRICO (AIB)

Análise e discussão em termos de crescimento de *P. acutifolium* em peso (g) e medida (mm) da aplicação de AIB em meio de cultivo.

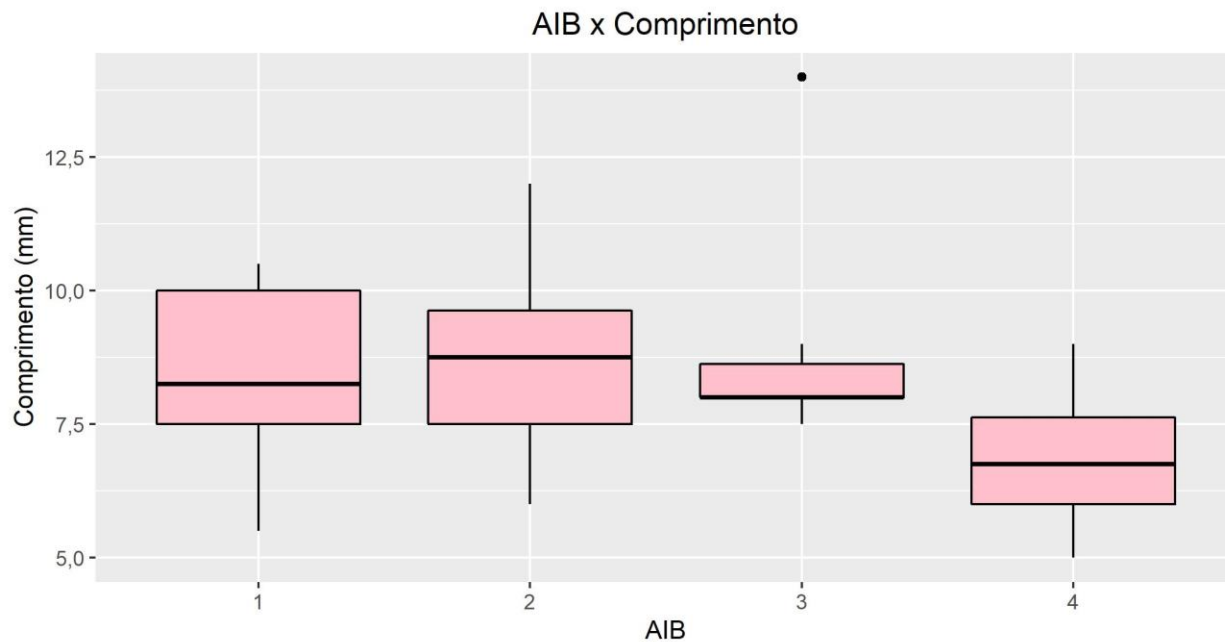


Figura 8: Gráfico boxplot da análise em medida das 3 doses + controle utilizadas para o teste do fitorregulador AIB em *Physcomitrium acutifolium* onde não se observa diferença estatística significativa entre nenhuma das doses aplicadas, porém se vê um decaimento visual na última dose, de 1,5 μM . 1: controle, 2: 0,5 μM , 3: 1,0 μM e 4: 1,5 μM .

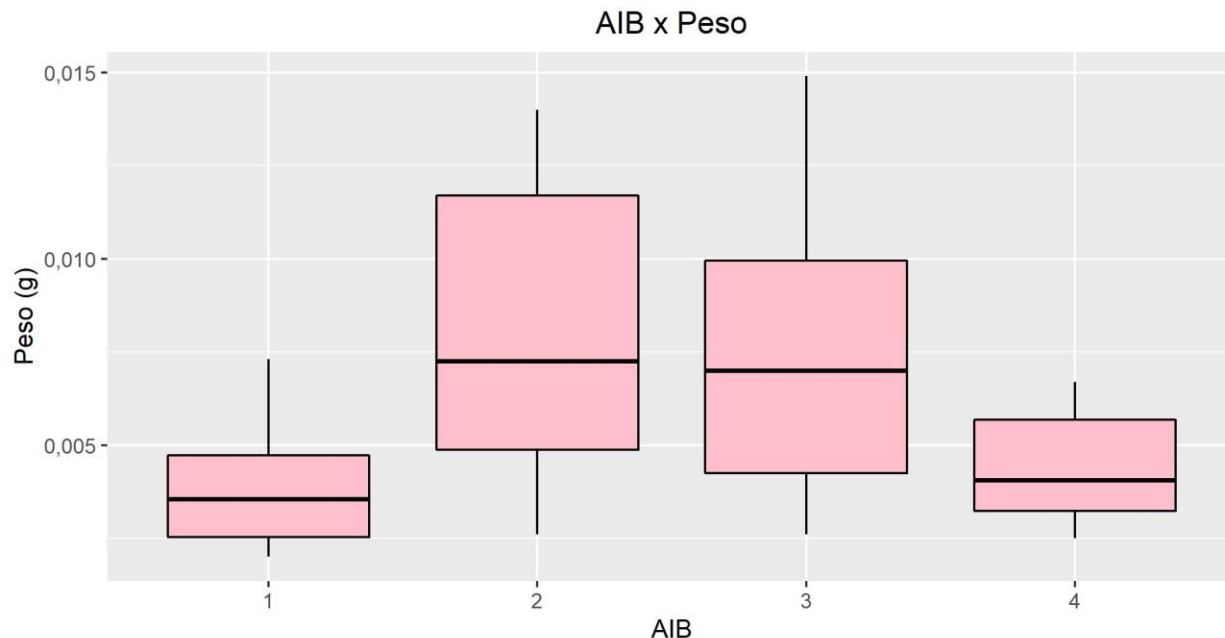


Figura 9: Gráfico boxplot da análise em peso das 3 doses + controle utilizadas para o teste do fitorregulador AIB em *Physcomitrium acutifolium* onde não se observa diferença estatística significativa entre nenhuma das doses aplicadas. 1: controle, 2: 0,5 μM, 3: 1,0 μM e 4: 1,5μM.

Na aplicação de AIB nos gametófitos em meio de cultura os p valores se apresentaram tanto em medida como em peso abaixo de 0,05 (p-value = 0,01153 e 0,00010) (Figura 8 e 9) não se podendo afirmar que são diferentes estatisticamente, ou seja, as doses não causaram diferença na planta.

Em estudos feitos com uma abordagem diferente, demonstram que o AIB tem ação de diminuir a extensão de hifas de algumas espécies de fungos. Nos testes realizados foi comprovado que à medida que a dose de AIB era aumentada mais ação de inibição de crescimento dos fungos o mesmo apresentava. (DOBSON *et al* 1993). Voltando os olhos para o nosso tipo de experimentação, ou seja, propagação de plantas *in vitro*, é sabido que todos os procedimentos devem ser feitos em ambiente estéril para que seja evitado o tipo mais comum de contaminação neste âmbito: por fungos, porém, sabe-se também que muitas vezes nem todo o cuidado é o suficiente. As hifas são as primeiras a rodearem os musgos e o meio de cultura *in vitro*, trazendo à tona uma sugestão interessante de relação entre estes dois estudos, pois talvez, se os gametófitos da espécie *P. acutifolium* forem tratados com doses mais altas de AIB desde o

início do cultivo, este poderia ser um agente para evitar e prevenir logo no princípio qualquer chance contaminação por ataque de fungos.

Experimentos realizados em tomateiros no ano de 2017 por CALVO-POLANCO *et al*, foi observado que, na presença de AIB em baixa umidade relativa do ar, o fitorregulador diminuía consideravelmente a condutividade hidráulica da planta e de sua raiz, porém em condições de alta umidade relativa do ar, aumentava essa condutividade. Sabendo que entre os musgos a fácil condução de água entre todas as partes da planta é um dos seus principais mecanismos e razões da sua imensa vantagem e facilidade de estudos em laboratório, o uso deste regulador de crescimento poderia ser de grande utilidade se fosse possível o controle da umidade relativa do ar. Poderia se dizer também que o AIB atuou na verdade de forma contrária nos falsos tecidos da briófitas, pois a medida que sua concentração aumentava, o crescimento diminuía, e isso pode estar relacionado com o não controle da umidade na planta.

4.2.3 CINETINA (KIN)

Análises dos resultados da aplicação de cinetina em meio de cultura de *P. acutifolium*.

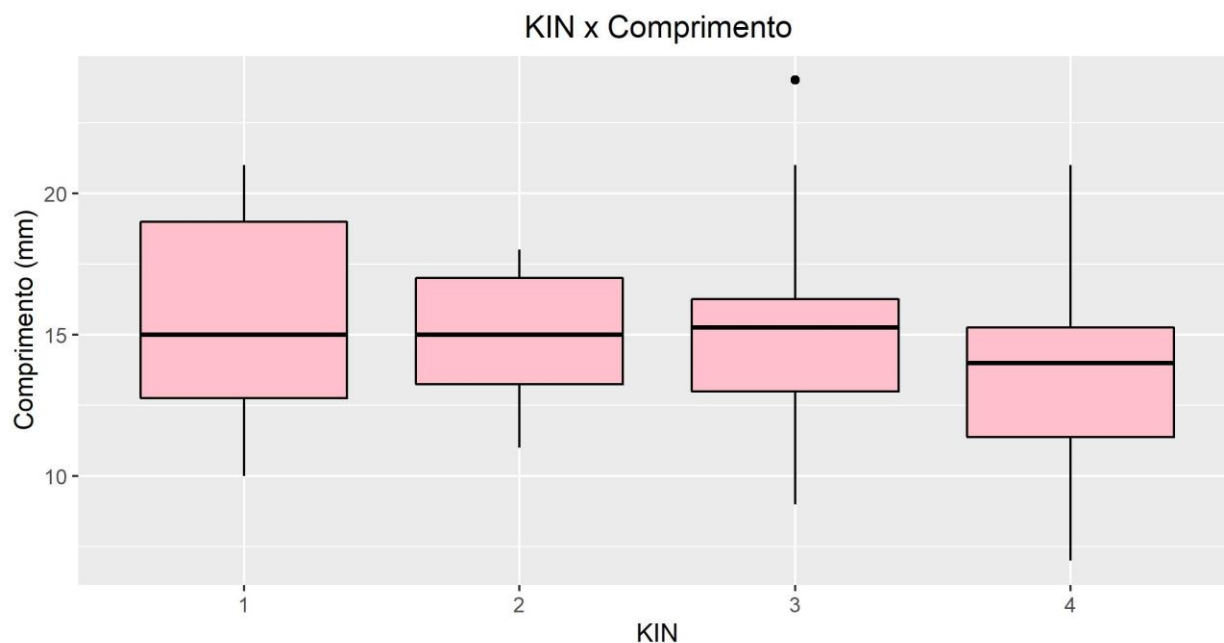


Figura 10: Gráfico boxplot da análise de medida das 3 doses + controle utilizadas para o teste do fitorregulador KIN em *Physcomitrium acutifolium* onde não se observa diferença estatística significativa entre nenhuma das doses aplicadas. 1: controle, 2: 0,5 μ M, 3: 1,0 μ M e 4: 1,5 μ M.

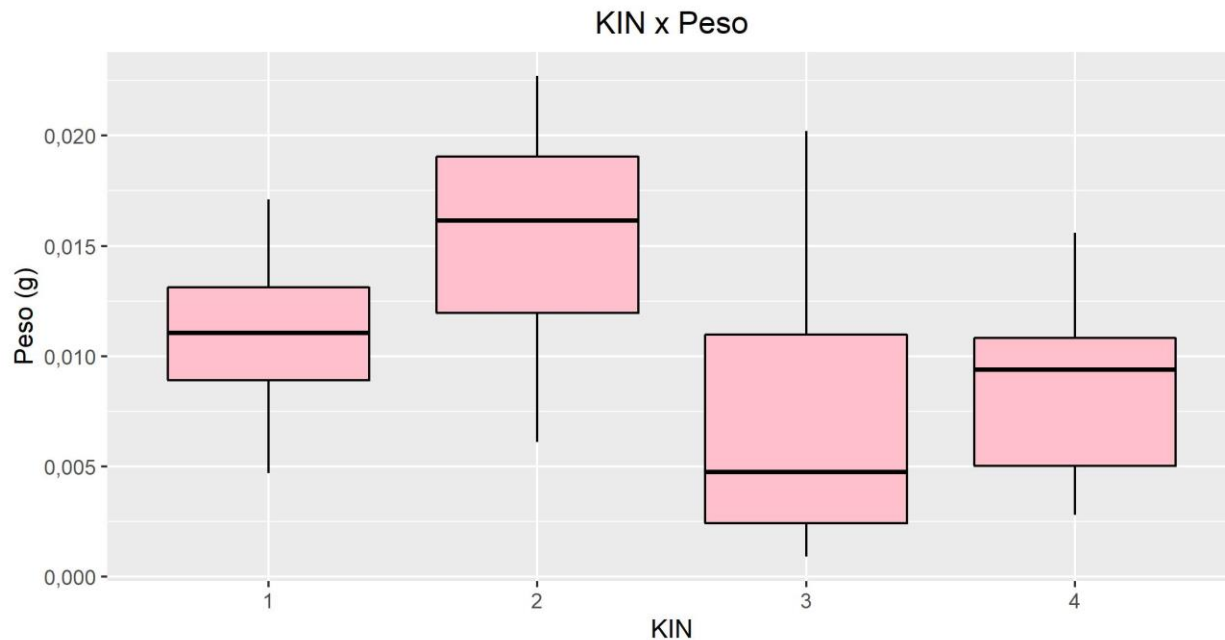


Figura 11: Gráfico boxplot da análise em peso das 3 doses + controle utilizadas para o teste do fitorregulador KIN em *Physcomitrium acutifolium* onde não se observa diferença estatística significativa entre nenhuma das doses aplicadas, e os blocos se encontram bastante dispersos. 1: controle, 2: 0,5 μM , 3: 1,0 μM e 4: 1,5 μM .

No tratamento de KIN (Figura 10 e 11) também não podemos afirmar que há diferença estatística no crescimento da planta entre as doses aplicadas, nem em medida nem em peso (p-values = 6,622 e-7 e 1,231 e-14)

No ano de 2010 um grupo de pesquisadores, SABOVLJEVIC, SABOVLJEVIC e VUKOJEVIC, realizaram um estudo abordando a interferência da cinetina na retenção de clorofila em *Bryum argenteum* Broth. e mostraram que entre concentrações de 1 à 10 μM , a cinetina aumentava a retenção de clorofila significativamente, porém nas concentrações menores sua retenção era maior. Isto é extremamente interessante pois normalmente a presença de clorofila entre as briófitas é muito menor comparadas às plantas vascularizadas, o que torna esse tipo de estudo importante na avaliação de conteúdo de clorofila em musgos. Visto isso, relacionando ao nosso estudo, mais concentrações deste regulador poderiam ser aplicadas e possivelmente estabelecer uma relação com o tanto de clorofila presença em *P. acutifolium* e se a cinetina realmente teria significância nesse sentido em nossa espécie assim como na de *B. argenteum*.

4.2.4 6-BENZILAMINOPURINA (BAP)

A seguir, apresenta-se a análise da aplicação de BAP nos meios de *P. acutifolium*.

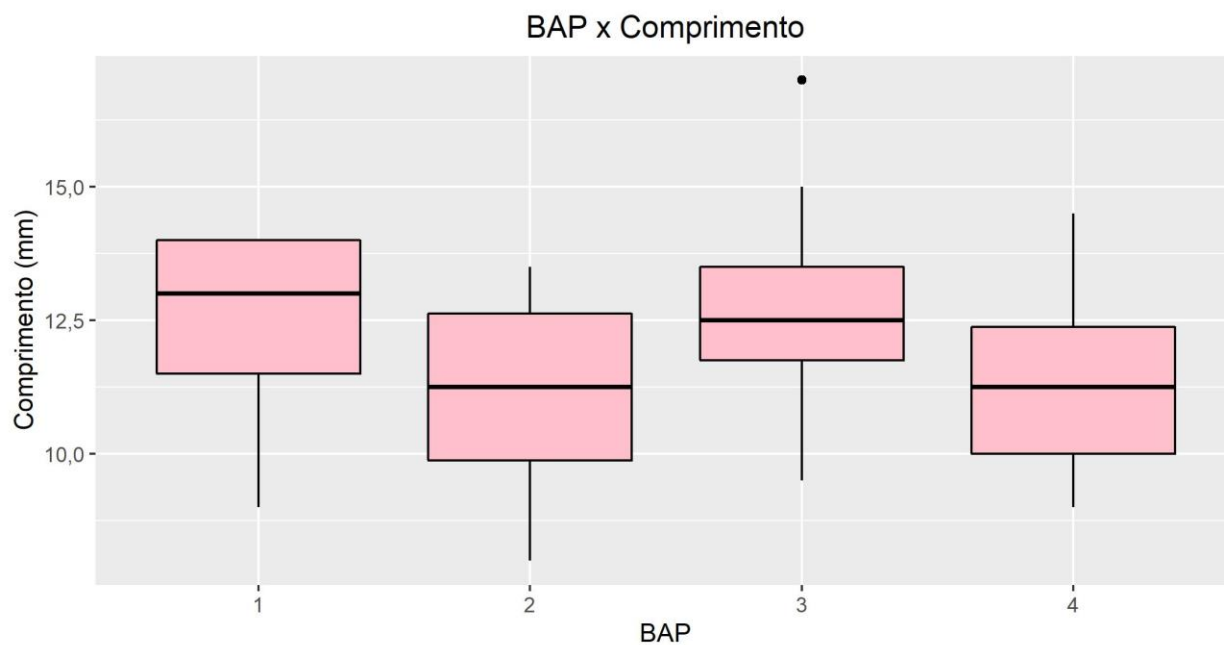


Figura 12: Gráfico boxplot da análise em medida das 3 doses + controle utilizadas para o teste do fitorregulador BAP em *Physcomitrium acutifolium* onde apesar de blocos dispersos visualmente não se observa diferença estatística significante entre nenhuma das doses aplicadas. 1: controle, 2: 0,5 μM , 3: 1,0 μM e 4: 1,5 μM

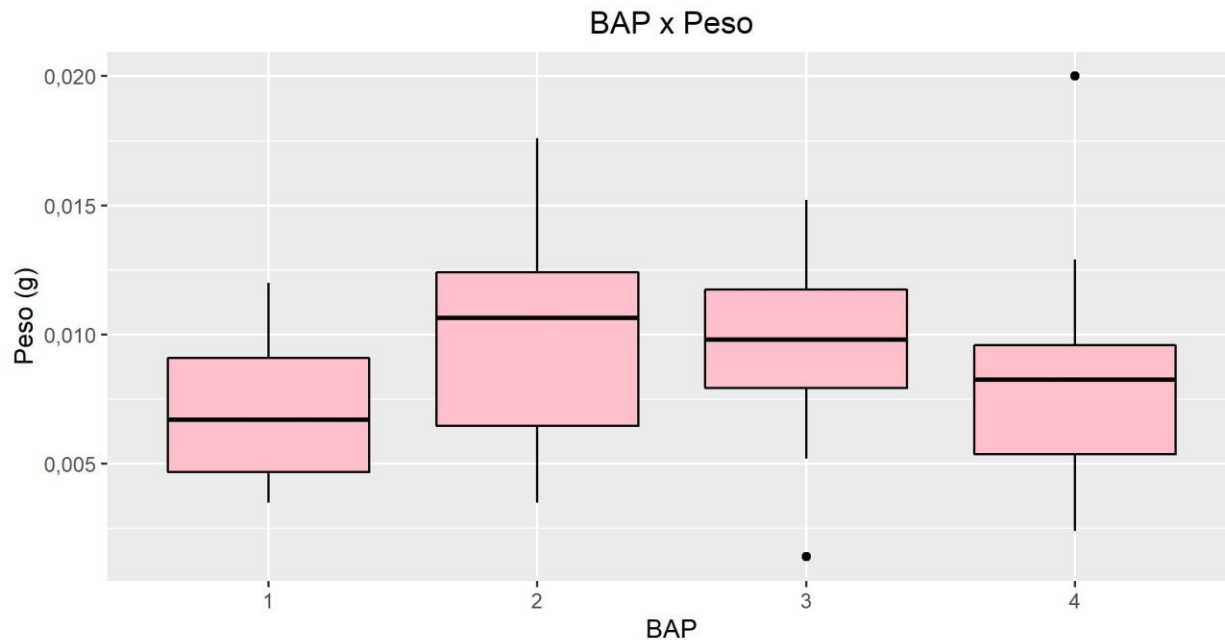


Figura 13: Gráfico boxplot da análise em peso das 3 doses + controle utilizadas para o teste do fitorregulador BAP em *Physcomitrium acutifolium* onde apesar de blocos dispersos visualmente não se observa diferença estatística significativa entre nenhuma das doses aplicadas. 1: controle, 2: 0,5 µM, 3: 1,0 µM e 4: 1,5µM

Analisando estatisticamente o crescimento de nossos explantes quando tratados com as diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (Figura 12 e 13) observa-se que em questão de peso, há um aumento inicial de biomassa no primeiro tratamento que logo decai, aumento este que de acordo com a estatística não pode ser considerado significativo, porém é interessante observar. E em medida vemos que a diferença entre eles também não pode se afirmar estatisticamente significativa.

Neste sentido, no ano de 2015, AHMANDLOO *et al* mencionaram em seus estudos que o fitorregulador em questão apresenta uma interessante função na quebra da dormência de sementes de algumas espécies e aumenta a taxa de germinação significativamente. Apesar dos mecanismos de germinação nas briófitas serem diferentes do que em plantas superiores, se torna interessante a averiguação de como se comportam os musgos quando BAP fosse aplicado antes mesmo da formação dos protonemas iniciais, ou seja, logo após a colocação dos esporos em meio de cultura, a fim de saber se BAP agiria da mesma forma, aumentando as chances de mais esporos crescerem e se tornarem em gametófitos.

A abordagem feita em nosso estudo procurou saber quais eram os efeitos e diferenças entre as doses de cada fitorregulador aplicado separadamente. Em 2014, testes sobre a regeneração *in vitro* de *Ziziphus jujuba* Mill. por MELYAN, SAHAKYAN e DANGYAN, demonstraram que os explantes quando tratados apenas com BAP a planta não apresentava uma vantagem significativa, já quando tratados com BAP e KIN ou BAP e AIA e ácido giberélico estes apresentavam o maior número de novos crescimentos da parte aérea por explante. Ou seja, sugere-se que BAP pode não ser um regulador que haja significativamente sozinho em aspectos de crescimento após os explantes formados, podendo resultar melhor quando combinado.

4.2.5 ÁCIDO ABCISICO (ABA)

Por fim, apresenta-se a análise da aplicação de ABA nos meios de *P. acutifolium*, único fitorregulador que demonstra maior proximidade em diferença estatística entre suas doses em medida (mm).

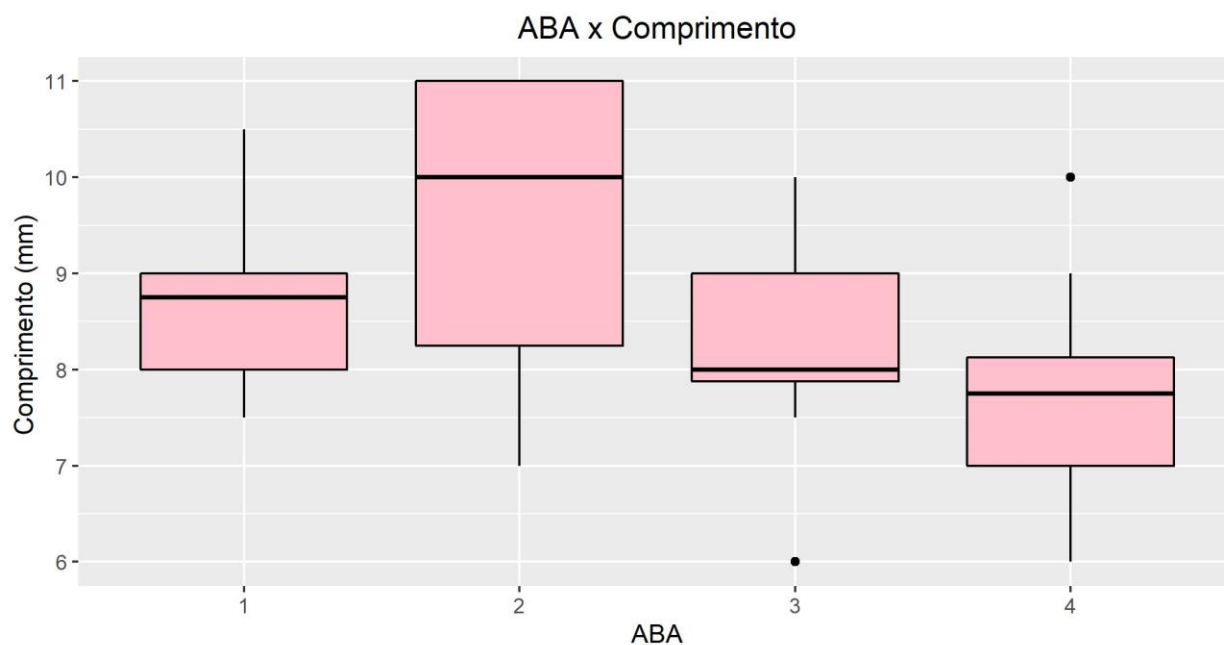


Figura 14: Gráfico boxplot da análise em medida das 3 doses + controle utilizadas para o teste do fitorregulador ABA em *Physcomitrium acutifolium* onde apesar de blocos dispersos visualmente não se observa diferença estatística significativa entre nenhuma das doses aplicadas. 1: controle, 2: 0,5 µM, 3: 1,0 µM e 4: 1,5µM

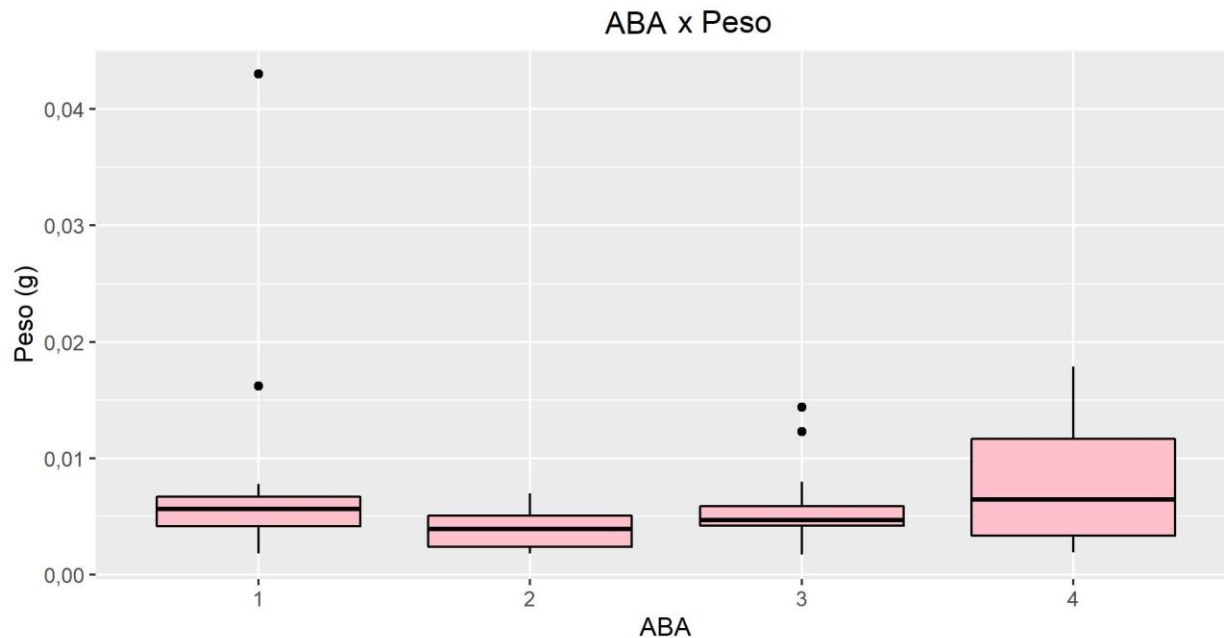


Figura 15: Gráfico boxplot da análise em peso das 3 doses + controle utilizadas para o teste do fitorregulador ABA em *Physcomitrium acutifolium* não se observa diferença estatística significativa entre nenhuma das doses aplicadas. 1: controle, 2: 0,5 µM, 3: 1,0 µM e 4: 1,5µM

Quanto aos resultados da aplicação de ABA nos gametófitos de *P. acutifolium* (Figura 14 e 15) novamente tendo como parâmetro o teste de shapiro onde p deve ser maior que 0,05 para que se considere os valores normais e com diferença, aqui demonstrou-se que em medida, onde tivemos um pvalue = 0,04746 e em peso pvalue = $3,59 \times 10^{-16}$. Mesmo que em medida, o valor seja quase que normal, não se pode afirmar que alguma das doses do tratamento apresentam diferença estatística significativa entre si. Porém, em relação ao crescimento em medida, no gráfico observa-se que, mesmo que não totalmente diferentes, pela estatística, o crescimento mais baixo apresenta-se em concentrações maiores do regular. Dados estes, que apresentam o mesmo resultado apresentado em plantas superiores, por exemplo estudo realizado em 2017 por ZHANG *et al* demonstrando que quando as concentrações aplicadas na planta *Cosmos sulphureus* Cav. não passavam de 5mg/L as folhas, raízes e biomassa eram elevadas, já quando essa concentração ultrapassa este valor, a planta era suprimida e crescia muito menos. As concentrações aplicadas nos gametófitos de nossas plantas eram obviamente muito menores, porém aplicadas em musgos, plantas baixas. Podemos surgir com a hipótese de que o mesmo possa ocorrer com os explantes de *P. acutifolium*, tendo em vista que o melhor crescimento se

deu com a concentração de 0,5uM, uma dose específica e pequena poderia ser estabelecida para esta espécie e beneficiá-la.

Em testes realizados no ano atual, 2019, por ZHANG *et al* no musgo antártico *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb. a aplicação exógena de ABA aumentava consideravelmente a porcentagem de sobrevivência e crescimento da planta quando em estresse por sal, além de regular positivamente o gene de expressão de enzimas antioxidantes e biossintéticas. Observando estes resultados comparados com nosso estudo, a não diferença em relação ao crescimento de nossa planta pode-se relacionar ao fato de que o ácido abscísico se faz presente de forma útil quando o organismo está sofrendo algum tipo de estresse abiótico que apresente a necessidade, por exemplo de fator antioxidante ou inibição da ação do sal, como demonstrado. Nossos explantes apenas encontravam-se em condições ideais para crescimento com a adição de ABA, sendo assim talvez não necessária sua ação.

4.2.6 TODOS OS FITORREGULADORES CONTRA TODOS

Para uma análise mais visual e profunda de como cada um dos fitorregulador agiu diferentemente nos gametófitos de *P. acutifolium* e afim de visualizar a diferença de cada um deles no crescimento foi realizado um teste de todos os fitorreguladores e doses contra todos.

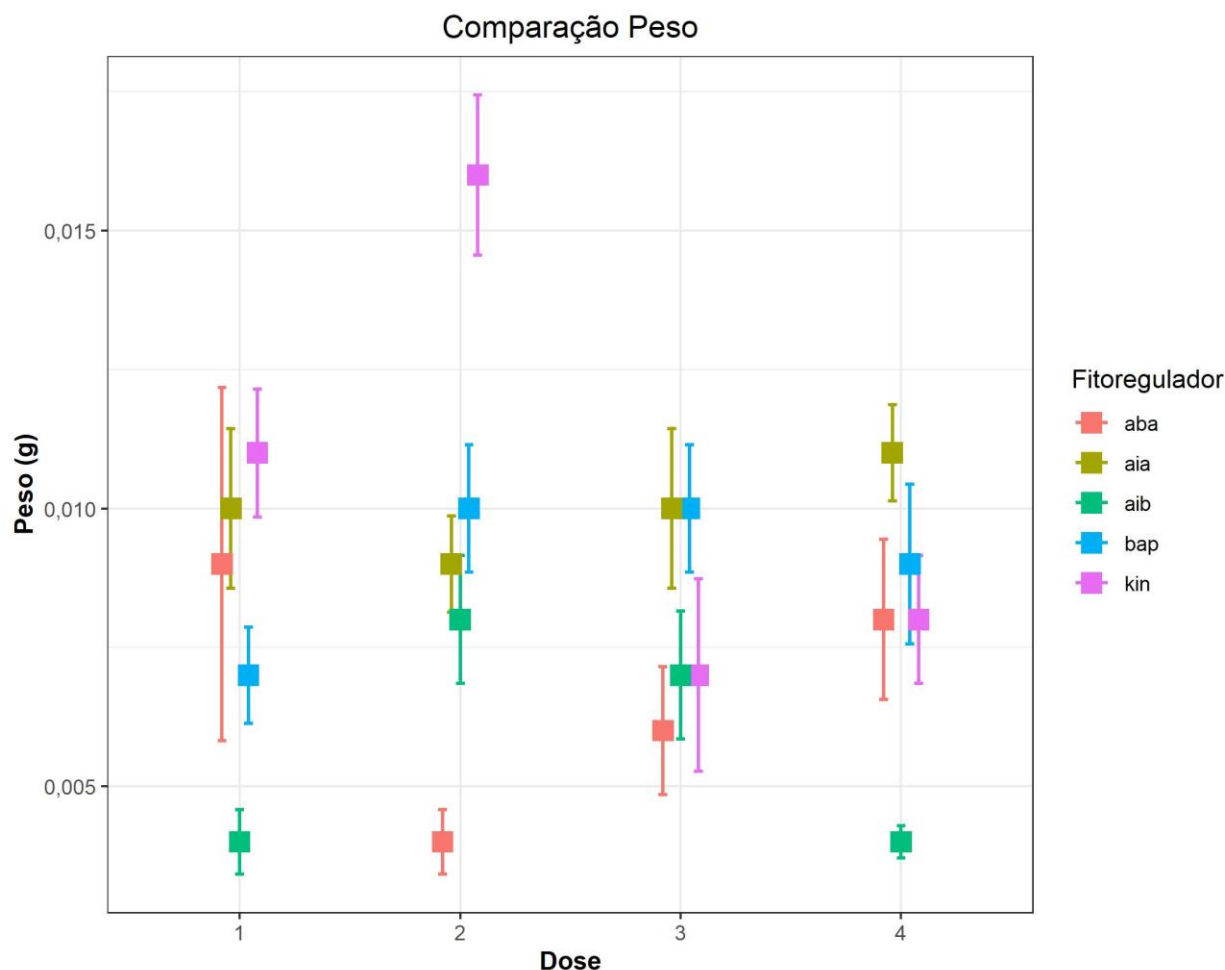


Figura 16: Gráfico boxplot da análise em medida de todos os fitorreguladores e doses utilizados contra eles mesmos, mostrando visualmente e estatisticamente valores bem dispersos, onde os fitorregulares diferem entre si, porém suas doses não e cada dose em relação a cada fitorregulador também não pode-se afirmar que diferem . 1: controle, 2: 0,5 μM , 3: 1,0 μM e 4: 1,5 μM .

Para tanto, este teste foi realizado por Teste de Tukey - ANOVA onde $p\text{-value} > 0,05$ mostra não significância. Os seguintes valores foram resultados dessa análise em relação ao peso

(biomassa) em gramas. Os valores neste caso de biomassa em gramas se mostraram dispersos, com muitos valores discrepantes e muita variação (Figura 16).

Entre os fitorreguladores há diferença significativa entre os tratamentos com diferentes reguladores ($p\text{-value} = 2,262494 \text{ e-}6$) com relação ao peso.

Entre as doses de cada fitorregulador ($p\text{-value} = 0,551547$) as doses não interferem no crescimento em biomassa.

E na interação dose x fitorreguladores, ou seja, analisando cada fitorregulador em relação as suas doses aplicadas ($p\text{-value} = 0,1388478$) não se pode afirmar significante.

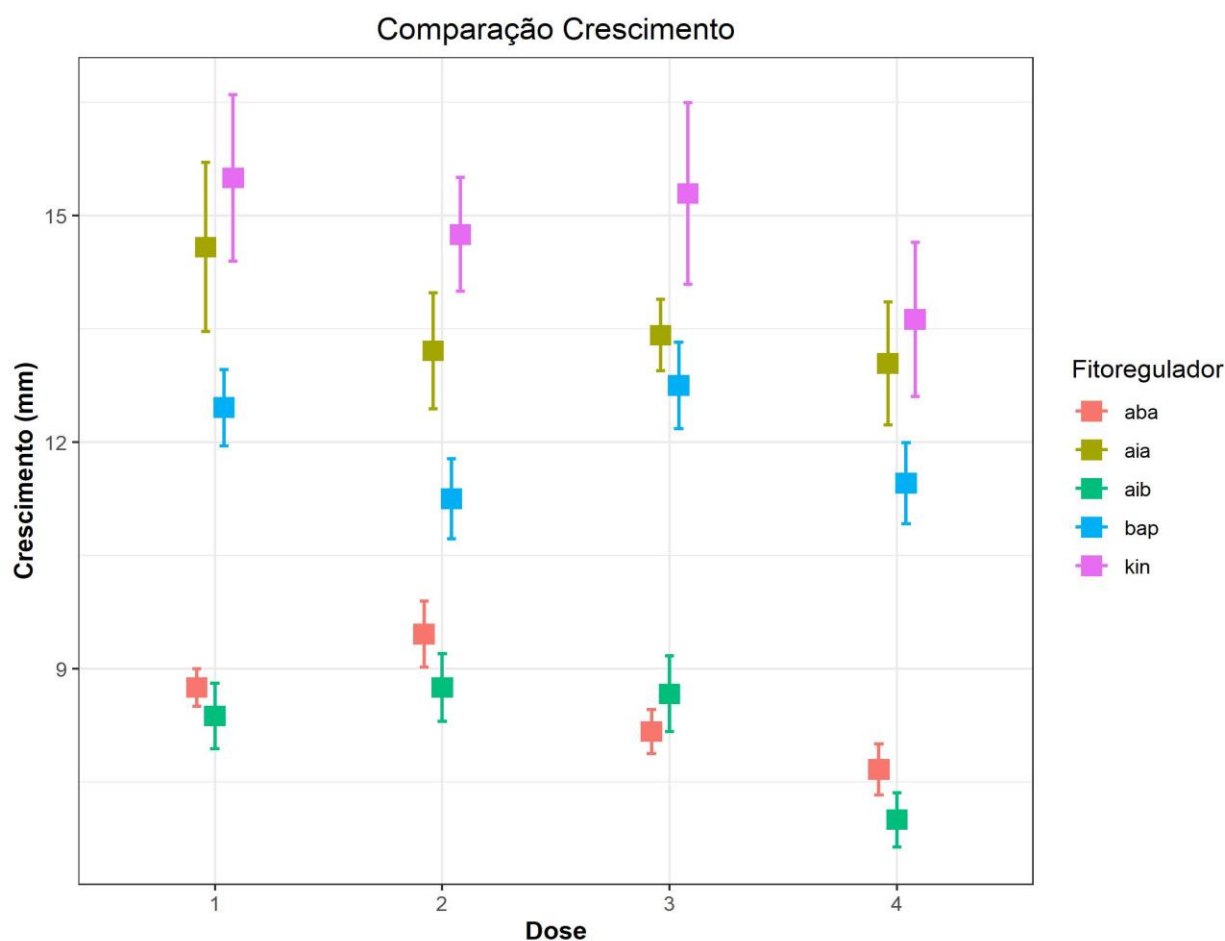


Figura 17: Gráfico boxplot da análise em medida de todos os fitorreguladores utilizados contra todos eles mesmos demonstrando diferença significativa entre os fitorreguladores, e também suas doses, porém não se podendo afirmar diferença entre cada dose e cada fitorregulador. 1: controle, 2: 0,5 μM , 3: 1,0 μM e 4: 1,5 μM .

Entre os fitorreguladores (p-value = 1,3349 e-40) temos estatisticamente e visivelmente uma diferença significativa entre os tratamentos com diferentes reguladores com relação ao crescimento (Figura 17).

Entre as doses de cada fitorregulador (p-value = 0,004268617), as doses interferem no crescimento das plantas.

E na interação dose x fitorreguladores, ou seja, analisando cada fitorregulador em relação as suas doses aplicadas, não diferem (p-value = 0,9318932) com relação ao crescimento.

Claramente o uso de KIN e AIA, à 1,5 μ M ambos, obtiveram os melhores crescimentos em comparação com o uso ABA e AIB nos meios de cultura para *P. acutifolium*. Com esse tipo de observação, duas hipóteses podem ser levantadas. A primeira de que, realmente, KIN e AIA seriam os melhores para auxílio de maior crescimento de nossa planta (1), ou de que mais variações de tratamento deveriam ser testados, pois como mencionado anteriormente alguns destes fitorreguladores reagem melhor em doses bem mais altas ou bem mais baixas (2) e isso pode ter influenciado em questão de crescimento, tanto em peso quanto em medida.

4.3 ANÁLISE MOLECULAR

Analisando os resultados da amplificação das regiões ISSRs em cada uma das 20 amostras testadas contra todos os 16 primers tivemos um total de 60 polimorfismos (Figura 18). Sendo 13 dos tratamentos por ABA, 4 por AIA, 18 por AIB, 20 por BAP e 5 por KIN, porém considerando que ABA, AIA, AIB, BAP e KIN tiveram, respectivamente, 5, 1, 2, 5 e 2 bandas polimórficas nos seus controles, indicando que estas, em específico, não podem ser relacionadas ao uso dos reguladores. Ou seja, os fitorreguladores a apresentarem maior número de polimorfismos foram AIB e BAP respectivamente. O primer mais amplificado foi o de número 9, seguido do número 4 e assim sucessivamente como apresentado na figura 18.

Com os dados obtidos foi possível gerar um fenograma de relação cofenética (Figura 19) onde o tratamento que demonstrou maior dissimilaridade quanto ao demais foi BAP 1,0 μ M, seguido de AIB 0,5 μ M. Baseado nesses resultados através da amplificação das bandas e do fenograma de correlação cofenética gerado podemos perceber e confirmar que os fitorreguladores aplicados geram alterações no genoma de *Physcomitrium acutifolium*.

Com foco em saber as causas desse tipo de alteração genética, estudos mais aprofundados demonstraram que um dos motivos para estas ocorrências são os níveis de substâncias de

KIN	0																
KIN	0,5																
KIN	1,0																
KIN	1,5																

Figura 18: Figura para amostragem de presença e ausência de polimorfismos nos tratamentos pelos fitorreguladores demonstrados pelos primers ISSR. Em rosa presença e branco ausência.

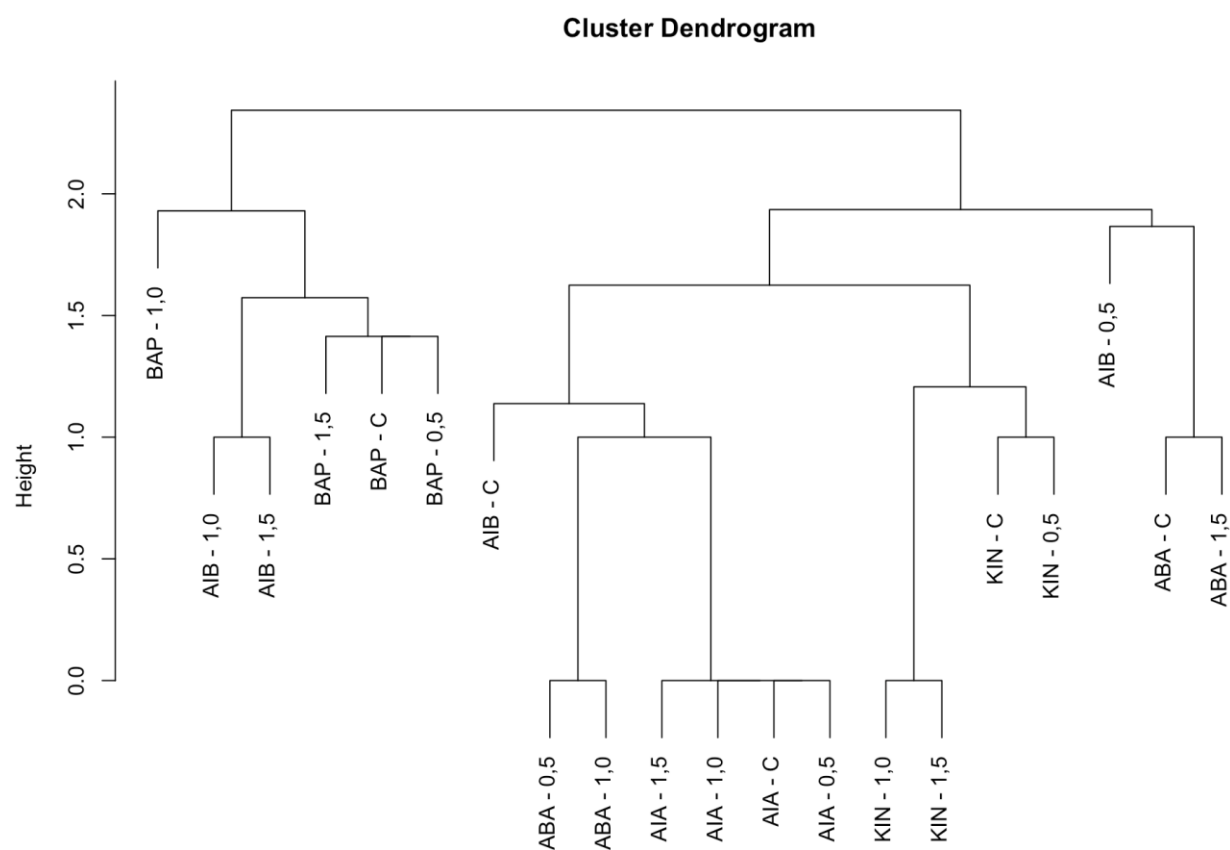


Figura 19: Fenograma de relação cofenética entre os tratamentos com os fitorreguladores em *Physcomitrum acutifolium*.

5. CONCLUSÕES

Concluindo-se, primeiramente, que os melhores meios de cultura para o crescimento de *Physcomitrium acutifolium* são, respectivamente, para medida em milímetros e peso em gramas MS e KNOP-ME. Posteriormente pode-se concluir que nenhum dos fitorreguladores obteve diferença estatística significativa quanto a crescimento em medida e peso, porém não podendo-se descartar a importância ou significância dos mesmos pois mais testes com diferentes concentrações e condições devem ser rodados para este fim.

Em relação à influência dos fitorreguladores em possíveis polimorfismos no genoma da espécie, conclui-se que os marcadores ISSRs são extremamente eficientes e nos mostraram que sim, os fitorreguladores causam polimorfismos em determinadas regiões nos genes das plantas e em determinadas concentrações, sendo o maior número de polimorfismos por AIB e BAP. Portanto, neste mesmo sentido, não se recomenda o uso de concentrações muito altas dos fitorreguladores que apresentaram alto índice de polimorfismos, pois não é o ideal que tenhamos variações no genoma de plantas *in vitro* em questão da necessidade da previsibilidade de propagação das mesmas, a não ser que o objetivo da propagação *in vitro* seja a geração e seleção de mutantes putativos.

6. REFERÊNCIAS

- AHMADLOO, Fatemeh et al. Effects of pectinase, BAP and dry storage on dormancy breaking and emergence rate of *Crataegus pseudoheterophylla* Pojark. **New Forests**, v. 46, n. 3, p. 373-386, 2015.
- ALMEIDA, Fernanda Daniele de et al. Eficiência das auxinas (AIB e ANA) no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. **Revista Árvore**, 2007.
- ARAÚJO, Susana et al. Metabolic signatures of germination triggered by kinetin in *Medicago truncatula*. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.
- ARDILES HUERTA, Víctor; CUVERTINO SANTONI, Jorge; OSORIO ZÚÑIGA, Felipe. Briófitas de los bosques templados de Chile: una introducción al mundo de los musgos, hepáticas y antocerotes: guía de campo. 2008.
- ASHTON, Neil W. et al. Estimation of indole-3-acetic acid in gametophytes of the moss, *Physcomitrella patens*. **Planta**, v. 164, n. 1, p. 142-144, 1985.
- BATRA, Amla; ABEL, W. O. Development of moss plants from isolated and regenerated protoplasts. **Plant Science Letters**, v. 20, n. 3, p. 183-189, 1981.
- Brotherus, Viktor Ferdinand. *Physcomitrium acutifolium* Broth. Acesso em 17 de Nov. de 2019. Disponível em: <https://www.tropicos.org/Name/35108872>
- CALVO-POLANCO, Monica et al. Ethylene sensitivity and relative air humidity regulate root hydraulic properties in tomato plants. **Planta**, v. 246, n. 5, p. 987-997, 2017.
- CHATTOPADHYAY, Abhishek et al. Indoleamines and phenylpropanoids modify development in the bryophyte *Plagiomnium cuspidatum* (Hedw.) TJ Kop. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 54, n. 4, p. 454-464, 2018.
- COVE, David. The moss *Physcomitrella patens*. **Annu. Rev. Genet.**, v. 39, p. 339-358, 2005.
- DA SILVA, A. S. M. et al. Effect of light and water availability on spore germination and protonemal growth of the Neotropical moss *Thamniopsis incurva* (Pilotrichaceae). **Cryptogamie Bryologie**, 2009.
- DE MOURA, THAÍS LACAVA et al. Organogênese in vitro de *Citrus* em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, p. 240 citation_lastpage= 245, 2001.
- DE VARGAS, Maria Victória Magalhães et al. Growth and development of halophyte *Funaria hygrometrica* Hedw.(Funariaceae) under salt stress. **Bioscience Journal**, v. 33, n. 6.
- DOBSON, J. et al. The effectiveness of 2-aminoisobutyric acid as a translocatable fungistatic agent for the remedial treatment of dry rot caused by *Serpula lacrymans* in buildings. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 31, n. 2, p. 129-141, 1993.

DULGER, Basaran; YAYINTAS, Ozlem Tonguc; GONUZ, Ahmet. Antimicrobial activity of some mosses from Turkey. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7-8, p. 730-732, 2005.

FENG, Jian-Can et al. Factors influencing efficiency of shoot regeneration in *Ziziphus jujuba* Mill. 'Huizao'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 101, n. 1, p. 111-117, 2010.

FERREIRA, C. da S. et al. Ácido indolbutírico e tamanho de estaca de raiz na produção de mudas de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.). In: **Embrapa Meio-Norte-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 21., 2010, Natal. Frutas: saúde, inovação e responsabilidade: anais. Natal: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2010., 2010.

FIOR, Claudimar Sidnei et al. Aspectos da propagação de *Persea willdenovii* Kosterm.(Lauraceae). **Rodriguésia**, p. 27-44, 2007.

HOHE, Annette; RESKI, Ralf. Optimisation of a bioreactor culture of the moss *Physcomitrella patens* for mass production of protoplasts. **Plant Science**, v. 163, n. 1, p. 69-74, 2002.

JACKSON, Michael B. (Ed.). **New root formation in plants and cuttings**. Springer Science & Business Media, 2012.

JANG, Geupil; DOLAN, Liam. Auxin promotes the transition from chloronema to caulonema in moss protonema by positively regulating PpRSL1 and PpRSL2 in *Physcomitrella patens*. **New Phytologist**, v. 192, n. 2, p. 319-327, 2011.

KADLECOVÁ, Alena et al. The plant hormone kinetin in disease therapy and healthy aging. **Ageing research reviews**, p. 100958, 2019.

KARAKEÇILI, Ayşe et al. Synthesis of indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid loaded zinc oxide nanoparticles: Effects on rhizogenesis. **Journal of biotechnology**, v. 303, p. 8-15, 2019.

KAYA, Cengiz; AKRAM, Nudrat Aisha; ASHRAF, Muhammad. Kinetin and indole acetic acid promote antioxidant defense system and reduce oxidative stress in maize (*Zea mays* L.) plants grown at boron toxicity. **Journal of plant growth regulation**, v. 37, n. 4, p. 1258-1266, 2018.

KITAGAWA, Munenori et al. Abscisic Acid Acts as a Regulator of Molecular Trafficking through Plasmodesmata in the Moss *Physcomitrella patens*. **Plant and Cell Physiology**, v. 60, n. 4, p. 738-751, 2018.

MITTAG, Jennifer; GABRIELIAN, Anastasia; LUDWIG-MÜLLER, Jutta. Knockout of GH3 genes in the moss *Physcomitrella patens* leads to increased IAA levels at elevated temperature and in darkness. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 97, p. 339-349, 2015.

MORALES, Cinara et al. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cv. Gala RW1. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 5, n. 3, 1999.

MORRIS, Jennifer L. et al. The timescale of early land plant evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 10, p. E2274-E2283, 2018.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NOMURA, Toshihisa et al. Copper mediates auxin signalling to control cell differentiation in the copper moss *Scopelophila cataractae*. **Journal of experimental botany**, v. 66, n. 5, p. 1205-1213, 2014.

NOWAK, Urszula; MŁODZIANOWSKI, Fortunat. The influence of kinetin on regeneration of the protonema from isolated protoplasts of the moss *Funaria hygrometrica* L. Sibth. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 49, n. 3, p. 195-203, 2014.

OHTAKA, Kinuka et al. Primitive auxin response without TIR1 and Aux/IAA in the charophyte alga *Klebsormidium nitens*. **Plant physiology**, v. 174, n. 3, p. 1621-1632, 2017.

PIZARRO, Marisol et al. Desiccation tolerance in the Antarctic moss *Sanionia uncinata*. **Biological research**, v. 52, n. 1, p. 46, 2019.

RAHMAN, M.; RAJORA, O. Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*). **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 6, p. 531-536, 2001.

RAVEN, Peter H.; EVERT, Ray F.; EICHHORN, S. E. *Biologia vegetal*. 6ª edição. **Guanabara Koogan SA**, 2001.

RESKI, Ralf; ABEL, Wolfgang O. Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. **Planta**, v. 165, n. 3, p. 354-358, 1985.

RESKI, Ralf; COVE, David J. *Physcomitrella patens*. **Current Biology**, v. 14, n. 7, p. R261-R262, 2004.

ROY, Poritosh; DUTTA, Animesh; GALLANT, Jim. Hydrothermal Carbonization of Peat Moss and Herbaceous Biomass (*Miscanthus*): A Potential Route for Bioenergy. **Energies**, v. 11, n. 10, p. 2794, 2018.

SABOVLJEVIĆ, ANETA; SABOVLJEVIĆ, MARKO; VUKOJEVIĆ, VANJA. Effects of different cytokinins on chlorophyll retention in the moss *Bryum argenteum* (Bryaceae). **Periodicum biologorum**, v. 112, n. 3, p. 301-305, 2010.

SABOVLJEVIĆ, Marko et al. Reviving, In Vitro Differentiation, Development, and Micropropagation of the Rare and Endangered Moss *Bruchia vogesiaca* (Bruchiaceae). **HortScience**, v. 47, n. 9, p. 1347-1350, 2012.

SAXENA, DK[†] et al. Uses of bryophytes. **Resonance**, v. 9, n. 6, p. 56-65, 2004.

SHAW, A. Jonathan; GOFFINET, Bernard (Ed.). **Bryophyte biology**. Cambridge University Press, 2000.

TASKILA, Sanna; SÄRKELÄ, Riikka; TANSKANEN, Juha. Valuable applications for peat moss. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 6, n. 1, p. 115-126, 2016.

TIWARI, Jagesh K. et al. Analysis of genetic stability of in vitro propagated potato microtubers using DNA markers. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 19, n. 4, p. 587-595, 2013.

TUBA, Zoltán; SLACK, Nancy G.; STARK, Lloyd R. (Ed.). **Bryophyte ecology and climate change**. Cambridge University Press, 2011.

VANDERPOORTEN, Alain; GOFFINET, Bernard. **Introduction to bryophytes**. Cambridge University Press, 2009.

VICTORIA, Filipe C.; DA MAIA, Luciano C.; DE OLIVEIRA, Antonio Costa. In silico comparative analysis of SSR markers in plants. **BMC plant biology**, v. 11, n. 1, p. 15, 2011.

WANG, Jing et al. PnSAG1, an E3 ubiquitin ligase of the Antarctic moss *Pohlia nutans*, enhanced sensitivity to salt stress and ABA. **Plant Physiology and Biochemistry**, 2019.

WANG, Jing et al. PnSAG1, an E3 ubiquitin ligase of the Antarctic moss *Pohlia nutans*, enhanced sensitivity to salt stress and ABA. **Plant Physiology and Biochemistry**, 2019.

WOODWARD, Andrew W.; BARTEL, Bonnie. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of botany**, v. 95, n. 5, p. 707-735, 2005.

ZAVALA, Arturo Martínez et al. Glucose inhibits the shoot bud formation in the moss *Bryum billardieri*. **Central European Journal of Biology**, v. 7, n. 4, p. 648-654, 2012.

ZHANG, Qian et al. Effects of Abscisic Acid (ABA) on Growth of *Cosmos sulphureus*. In: **2017 6th International Conference on Energy, Environment and Sustainable Development (ICEESD 2017)**. Atlantis Press, 2017.

ZHANG, Wei et al. Transcriptome sequencing of Antarctic moss under salt stress emphasizes the important roles of the ROS-scavenging system. **Gene**, v. 696, p. 122-134, 2019.

ZHAO, Mengkai et al. Regulatory Mechanism of ABA and ABI3 on Vegetative Development in the Moss *Physcomitrella patens*. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 9, p. 2728, 2018.