

CULTIVO *IN VITRO* DE MATRIZES AMAZÔNICAS DO MUSGO *Octoblepharum albidum* HEDW. (OCTOBLEPHARACEAE) EM MEIO ADAPTADO

FLÁVIA BARANOSKI¹, ISANE VERA KARSBURG², IRENE DE MORAES BARRIQUELLO³ E
THIAGO ANDRÉ⁴

Recebido em 06.04.2010 e aceito em 20.10.2010.

¹ Bióloga, Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), Campus de Alta Floresta-MT Caixa Postal 324, CEP 78580-000, flaviabaranoski@hotmail.com

² Doutora, UNEMAT, Campus de Alta Floresta, Alta Floresta-MT, Caixa Postal 324, CEP 78580-000, isane9@yahoo.com.br

³ Bióloga, UNEMAT, Campus de Alta Floresta, Alta Floresta-MT, irenebarriquello@hotmail.com

⁴ Mestre, UNEMAT, Campus de Alta Floresta, Alta Floresta-MT,, tandre@unemat.br

RESUMO: O cultivo *in vitro* de briófitas é essencial não só para elucidar o desenvolvimento celular e molecular, mas também é importante para observar o papel dos primeiros estágios de desenvolvimento. O musgo *Octoblepharum albidum* Hedw. (família Octoblepharaceae) é uma planta epífita comum em bordas de floresta, cerrado e caatinga, que habita preferencialmente troncos vivos. O presente estudo teve como objetivo observar a reprodução através de esporos e avaliar as condições de crescimento e propagação em meio adaptado de Hatcher 1965 e descrever o desenvolvimento *in vitro* de *Octoblepharum albidum* Hedw., a partir de dezenas de esporos de musgos adultos coletados aleatoriamente no Parque Ecológico Municipal Leopoldo Linhares Fernandes, Alta Floresta (MT), e mantidos em meio adaptado de Hatcher 1965, no mês de setembro de 2008 e avaliados no decorrer dos meses até março de 2009. Um quarto das amostras no decorrer dos meses apresentou contaminação por hifas fúngicas seguida do aparecimento de um pigmento marrom, que aparenta estar relacionado com a estratégia de defesa da espécie. As primeiras células protonemáticas surgiram entre o quadragésimo e o quinquagésimo dia, e os novos gametófitos surgiram aproximadamente quarenta e cinco dias após, caracterizando uma fase prolongada do protonema. A intensidade luminosa influenciou no desenvolvimento protonemático e no surgimento dos botões gametofíticos, porém o pH não foi um fator limitante para o cultivo *in vitro* do musgo *Octoblepharum albidum* Hedw.

Termos para indexação: Cultura de tecidos vegetais, Briófitas, Protonema, Gametófitos.

IN VITRO CULTURE OF AMAZON MATRICES OF THE MOSS *Octoblepharum albidum* HEDW.
(OCTOBLEPHARACEAE) IN ADAPTED MEDIUM

ABSTRACT: *In vitro* culture of bryophytes is essential not only to elucidate cell and molecular development but also to observe the role of the first development stages. The moss *Octoblepharum albidum* Hedw. (Octoblepharaceae) is an epiphytic plant frequent in forest edges, cerrado and caatinga, preferably inhabiting living trunks. The present study aimed to observe reproduction through spores, to evaluate growth conditions and propagation in adapted Hatcher's medium (Hatcher, 1965) and to describe the *in vitro* development of *Octoblepharum albidum* Hedw. using dozens of spores from adult mosses randomly collected at Leopoldo Linhares Fernandes Municipal Ecological Park, Alta Floresta Municipality, Mato Grosso State, Brazil. Spores were kept in adapted Hatcher's medium (Hatcher, 1965) in September 2008 and evaluated until March 2009. Over the months, a quarter of the samples presented contamination by fungal hyphae followed by the appearance of a brown pigment, which seems to be related to the defense mechanisms of the species. The first protonemetic cells appeared between the fortieth and the fiftieth days and new gametophytes appeared at around forty five days later, characterizing a prolonged protonemetic stage. Light intensity influenced protonemetic development and gametophytic bud appearance. However, pH was not a limiting factor for *in vitro* culture of the moss *Octoblepharum albidum* Hedw. Index terms: Plant tissue culture, Bryophytes, Protonema, Gametophytes.

INTRODUÇÃO

Sendo plantas avasculares, pequenas e de estrutura relativamente simples, as briófitas podem ser encontradas nos habitats mais diversos, colonizando tipos variados de substratos, como muros, rochedos, solo, troncos vivos e mortos, folhas e cupinzeiros (Glime, 2006a). No Brasil ocorrem tanto em matas úmidas e sombreadas como em ambientes de cerrados e secos como as caatingas, demonstrando assim variabilidade de relações ecofisiológicas que estas plantas podem manter com o ambiente (Lisboa, 1993).

As briófitas apresentam uma alternância de geração bem definida onde o esporófito (geração diplóide) permanece fixo ao gametófito (geração sexuada e haplóide) e nunca se transforma em uma planta livre e independente (Glime, 2006a). Os novos gametófitos podem ter origem após a germinação de esporos, germinação de gemas ou por regeneração de fragmentos da planta adulta (Nehira, 1983), mas para o estabelecimento destes esporos ou de diásporos vegetativos é necessária a presença de umidade suficiente que permita a produção de protonemas e gametófitos fixos (Schofield, 1985). Segundo Nishida (1978) o protonema das briófitas folhosas origina-se a partir da divisão do esporo e persistem até a formação de uma célula apical com três faces, da qual se origina o gametófito folhoso.

O musgo *Octoblepharum albidum* Hedw. pertence à família Octoblepharaceae e é uma planta geralmente epífita comum em bordas de floresta, cerrado e caatinga, que habita preferencialmente troncos vivos. Possui distribuição pantropical e sua ocorrência já foi registrada em todos os estados brasileiros (Yano, 1989).

O cultivo *in vitro* de briófitas é essencial não só para observar o desenvolvimento celular e molecular, mas também é importante para elucidar o papel dos primeiros estágios de desenvolvimento, e para conservar indivíduos vivos *ex situ*. Silva et al. (2006) realizaram um trabalho sobre a morfogênese protonemática de briófitas ocorrentes em Floresta Atlântica do estado de Pernambuco, utilizando apenas os esporos das espécies. Barriquello (2009) realizou um estudo da fenologia reprodutiva do musgo *Octoblepharum albidum* Hedw. na Amazônia Meridional, mas até o presente momento não se tinha registro do cultivo *in vitro* de matrizes amazônicas de espécies de briófitas, onde há uma importante proporção da diversidade do grupo (Gradstein et al., 2001) sendo este, um estudo pioneiro nesta região do Brasil.

O objetivo foi observar a reprodução através de esporos e avaliar as condições de crescimento e propagação em meio adaptado de Hatcher (1965) e descrever o desenvolvimento *in vitro* do musgo *Octoblepharum albidum* Hedw. a partir de populações nativas da Amazônia meridional.

MATERIAL E MÉTODOS

Indivíduos adultos de *Octoblepharum albidum* Hedw. foram coletados no Parque Ecológico Municipal Leopoldo Linhares Fernandes, fragmento florestal urbano formado por floresta

ombrófila aberta que possui uma área de 17,8 hectares. O parque está localizado no perímetro urbano do município de Alta Floresta, Mato Grosso (MT), que se situa na Depressão da Amazônia Meridional entre as latitudes 9°30' – 10° 8' Sul e longitudes 56° 27' - 55° 30' Oeste (Rodrigues, 1996).

Uma população matriz *in vitro* foi mantida a partir de musgos adultos coletados aleatoriamente em palmeira do Parque Ecológico Municipal Leopoldo Linhares Fernandes, no mês de setembro de 2008, contendo esporos de *Octoblepharum albidum* Hedw., sendo avaliados no decorrer dos meses até março de 2009. Para preparação do meio de cultura foi utilizado o protocolo de Hatcher 1965 com adaptações para as soluções utilizadas (Tabela 1). O meio de cultura foi suplementado com 8 g de agar/L⁻¹, 150 mL/L⁻¹ estoque A = 30,00 mL/L⁻¹ de cada solução, 4,5 mL/L⁻¹ estoque B = 0,90 mL/L⁻¹ de cada solução, 1,5 mL/L⁻¹ estoque C = 0,75 mL/L⁻¹ de cada solução, com pH 6,7.

Os indivíduos adultos que apresentavam cápsulas maduras foram separados de seu substrato original através de uma delicada lavagem em água para evitar a perda de esporos, em seguida esterilizados em solução de 1,5% de hipoclorito de sódio onde permaneceram por 10 minutos, logo após foram lavados com água destilada estéril (autoclavada). Os meios experimentais foram montados em câmara de fluxo laminar, onde foram colocados cinco indivíduos adultos (*Octoblepharum albidum* Hedw.) em cada frasco, sendo os mesmo dispostos equidistantes uns aos outros. Todos os frascos foram vedados com parafilme de PVC, evitando-se a evaporação do meio, bem como eventual contaminação, e conduzidos em sala de cultivo com temperatura variando entre 25 a 28°C, e armazenados em prateleiras, tendo um período de 8 horas de luminosidade. A intensidade luminosa média foi medida com aparelho luxímetro LD - 230 em dias e horários diferenciados. O mesmo procedimento foi feito para avaliar a intensidade luminosa *in situ* de onde foi retirada a população para realização do experimento.

TABELA 1. Soluções estoques.

Soluções	Substâncias	Quantidade (g/L ⁻¹)
A	MgSO ₄ • 7H ₂ O	7,35
	Na ₂ SO ₄	2,00
	NaNO ₃	0,80
	KCl	0,65
	KH ₂ PO ₄	1,65
B	MnSO ₄ • 4H ₂ O	3,00
	ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0,50
	H ₂ BO ₃	0,50
	CuSO ₄ • 5H ₂ O	0,25
	Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	0,25
C	Na ₂ EDTA	0,93
	FeSO ₄ • 7H ₂ O	0,70

Depois de preparado, o meio de cultura foi distribuído em 24 frascos de vidro, com capacidade para 300 mL/L⁻¹, contendo aproximadamente 90 mL/L⁻¹ do meio, em seguida foram vedados com papel alumínio e levados para autoclavagem por 30 minutos, a 121 °C 1 kg.cm⁻². O pH de onde foi retirada a população original de briófitas, para realização do experimento também foi avaliado por meio da coleta de 20 g do substrato e acrescentado a ele 100 mL de água destilada, depois de decorridos 10 minutos o mesmo foi filtrado e verificado o pH.

Decorridos seis meses de experimento, os frascos foram abertos e o meio de cultura foi fotografado, para contagem dos indivíduos que se desenvolveram *in vitro*, em seguida feito uma média da quantidade de indivíduos. As imagens foram realizadas com uma câmara digital de oito *megapixels* (Olympus FE-340) e analisadas no *software* Microsoft Office PowerPoint 2003 com zoom de 150 vezes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Contaminação por fungos

No decorrer do experimento as análises dos frascos foram feitas de forma descritiva, no décimo sétimo dia até o vigésimo terceiro dia de experimento, seis amostras (25 % do total) apresentaram contaminação por hifas fúngicas (Figura 1A). As amostras não foram descartadas e passados dez dias, as referidas amostras passaram a ter a presença de um pigmento marrom não presentes em outras amostras (Figura 1B). Treze dias antes do surgimento das primeiras células protonemáticas os fungos desapareceram. Segundo Duckett et al. (2004), os fungos surgem em meios de cultura geralmente dentro de uma semana, devido à técnica empregada na esterilização. Passados oitenta e nove dias da implementação do experimento, três amostras apresentaram contaminação por hifas fúngicas e nove dias depois houve o aparecimento do pigmento marrom. No mês de janeiro de 2009, cento e doze dias de experimento, as amostras ainda apresentavam o pigmento, porém não mais os fungos, e no decorrer de onze dias as amostras não apresentavam mais nenhuma pigmentação.

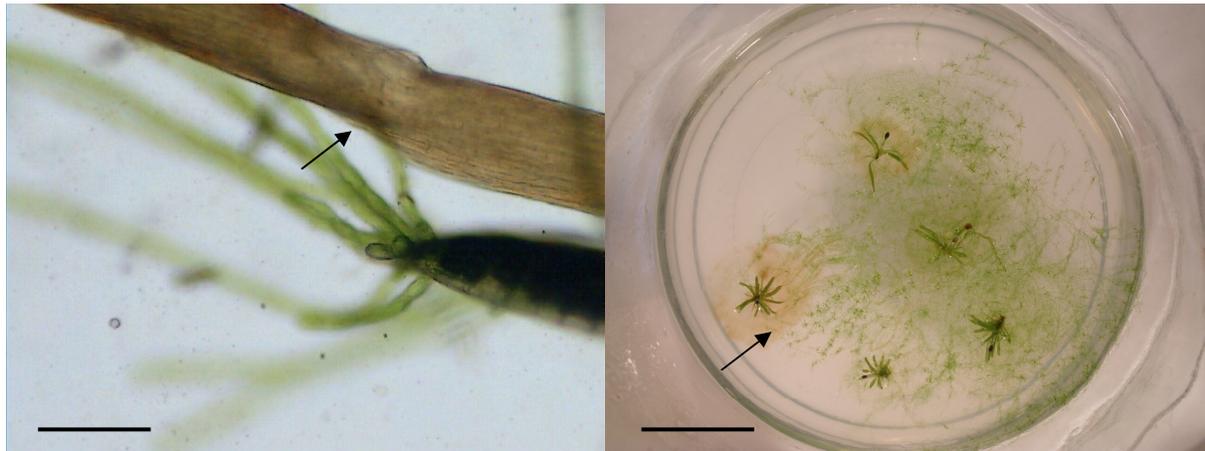


FIGURA 1. Meios de cultura. A - amostra contaminada por hifa fúngica. B - amostra contendo pigmento marrom. Barra: A = 10 μ m; B = 10cm.

O surgimento do pigmento marrom no meio de cultura pode estar relacionado com uma estratégia de defesa do musgo *Octoblepharum albidum* Hedw. em resposta ao aparecimento dos fungos. Nos trabalhos realizados por Silva et al. (2006), Duckett et al. (2004) e Egunyomi (1978),

foram utilizados os esporos de espécies diferenciadas de briófitas, enquanto no presente trabalho, foram utilizados indivíduos adultos (gametófito e esporófito), onde os indivíduos apresentavam condições maduras de defesas. Pesquisas recentes realizadas por Stalheim et al. (2009) mostraram a capacidade do gênero *Sphagnum* como inibidores do crescimento de bactérias, pois em seus filídios existe um polissacarídeo formalmente chamado de *sphagnan*, que deixa o ambiente ácido evitando que alguns tipos de bactérias se desenvolvam. As linhagens de bactérias testadas por Stalheim et al. (2009) com crescimento inibido em presença de *sphagnan* incluem cepas comumente encontradas em alimentos frescos (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. e *Shewanella* spp.).

Germinação dos esporos e crescimento protonemático

Os esporos do musgo *Octoblepharum albidum* Hedw. apresentaram vários corpúsculos lipídicos que serviram como reserva energética para que o mesmo pudesse germinar (Figura 2A). A germinação foi do tipo exospórica, com protonema filamentoso (Figura 2B) que surgiu entre o trigésimo e trigésimo quinto dia em todas as amostras, evidenciando o retardo no surgimento do protonema, pois no trabalho realizado por Silva et al. (2006) o protonema do musgo *Octoblepharum albidum* Hedw. surgiu no décimo quarto dia. Segundo Nehira (1983) o protonema tem como principal função o estabelecimento e a produção de numerosos gametófitos a partir de um único esporo.



FIGURA 2. Esporos e protonema da espécie *Octoblepharum albidum* Hedw. A – esporos com corpúsculos lipídicos. B - protonema filamentoso. Barra = 12 μ m.

Os novos gametófitos surgiram em todos os frasco entre quarenta à cinquenta dias após o surgimento das primeiras células protonemáticas. Em seus estudos sobre a fenologia do musgo *Octoblepharum albidum* Hedw., Egunyomi (1979) relata que a chuva desempenha importante papel na germinação dos esporos, no desenvolvimento do protonema e no crescimento dos gametófitos. As

condições do meio de cultura bem como luminosidade, umidade e pH produziram desvios no padrão de desenvolvimento protonemático e do surgimento dos primeiros botões gametofíticos da espécie.

No fim do experimento todos os frascos apresentam indivíduos jovens em estágio de desenvolvimento (Figura 3A) e os mesmo apresentam filídio possuindo as características da espécie, já diagnosticáveis, com ápice mais ou menos obtuso, denteado em sua maior parte, células na parte central da lâmina retangular (Figura 3B).



FIGURA 3. Meio de cultura com *Octoblepharum albidum* Hedw. A - indivíduo jovem. B - filídio de indivíduo jovem. Barra: A = 12µm; B = 30µm.

Influência da luz e do pH no desenvolvimento protonemático e gametofítico

Condições favoráveis de temperatura, luz e umidade são pré-requisitos para a germinação dos esporos e desenvolvimento dos protonemas. Para os táxons tropicais, 20-25°C tende a ser o ótimo de temperatura (Duckett et al., 2004). A luz apresenta dois aspectos diferentes de ação, ou seja, fornece energia necessária para realização da fotossíntese e age como um sinal externo na regulação do desenvolvimento vegetal (Hartman & Weber, 1990).

Segundo Silva et al. (2006) a intensidade luminosa influencia diretamente o estabelecimento e a manutenção do ciclo das briófitas, cujo aparato fotossintético responde a alteração da intensidade da luz, por ser adaptado com a presença de pigmentos de fotoproteção e acessórios, que auxiliam em condições de excesso ou restrição de luz. A intensidade luminosa no local de onde foram retirados os indivíduos para o meio de cultura é de aproximadamente de 449 lux, e onde os meios foram armazenados foi de aproximadamente 190 lux. A germinação dos esporos, o desenvolvimento protonemático e gametofítico foram retardados devido à baixa na luminosidade. Segundo Glime (2006b), o desenvolvimento protonemático pode ser retardado em ambientes com pouca luz, e em protonemas filamentosos, causando também o retardo do aparecimento do cloronema, caulonema e surgimento do botão gametofítico, além de prejudicar o desenvolvimento dos

novos indivíduos. Aqui, a luminosidade não eliminou o desenvolvimento dos novos indivíduos, pois os mesmos estavam presentes em todos os meios de cultura apresentando caulídios, filídios e rizóides.

Uma série de respostas a diferentes intensidades luminosas tem sido verificada entre os esporos de briófitas cultivados *in vitro*. Egunyomi (1978) constatou que esporos de *Octoblepharum albidum* Hedw. germinaram e produziram protonemas sob todas as intensidades luminosas utilizadas, com 100% sob 1375 lux e 5,1% sob 1 lux. Todavia, o autor também constatou que sob 1375 lux os protonemas se apresentaram deteriorados ao final do experimento, o que indica efeito deletério da irradiação forte. Glime & Knoop (1986) constataram que a germinação de esporos e formação de protonemas de *Fontinalis squamosa*, um musgo aquático, foi promovida tanto sob 3°C e 49 lux e sob 20°C e 3000 lux, indicando que espécies expostas à extensa amplitude térmica e luminosa, têm a capacidade de sobreviver ao longo do ano.

Em estudos realizados por Silva et al. (2006) com a espécie *Thamniopsis incurva* sob diferentes intensidades luminosas constataram que a germinação de esporos e o desenvolvimento protonemático ocorrem sob intensidades de 10 a 100% (de 1200 lux) sugerindo que o estabelecimento de novos indivíduos e multiplicação das populações não é limitado pela intensidade luminosa até um limite de aproximadamente 10% de passagem da luz.

O pH do meio *in vitro* foi 6,7 e *in loco* 6,8 não apresentando variação significativa, o que facilitou o desenvolvimento gametofítico da espécie e auxiliou para que o retardo na germinação e desenvolvimento do protonema não fossem ainda maior, pois segundo Armentano & Caponetti (1972), o pH pode ser importante na restrição do habitat, e em meio de cultura, o pH é um dos fatores limitantes para o desenvolvimento protonemático e gametofítico, pois em seu experimento com a espécie *Tetraplodon mnioides* (Hedw.), puderam observar que o desenvolvimento protonemático só ocorreu em pH entre 5,8 e 7,8 condizendo com o valor encontrado nos substratos de onde a espécie foi retirada, sendo estes carcaças de animais e árvores.

CONCLUSÃO

No meio de cultura o musgo *Octoblepharum albidum* Hedw. apresentou um retardo na germinação dos esporos, desenvolvimento protonemático e no surgimento dos novos gametófitos devido à baixa intensidade luminosa do local de armazenamento. O desenvolvimento protonemático com fase prolongada no meio de cultura se mostrou uma interessante ferramenta para elucidar características e estratégias envolvidas nos primeiros estádios do ciclo de vida, que foram fundamentais para o estabelecimento dos novos gametófitos. Sugerimos também este meio para conservação e acompanhamento de indivíduos *ex situ*. O pH não foi um fator limitante para o cultivo *in vitro*, pois não houve variação significativa com o pH medido *in loco*, o que possibilitou o desenvolvimento dos gametófitos jovens.

A presença de fungos em meio de cultura *in vitro* é comum. Porém, o pigmento marrom registrado nas amostras do presente trabalho pode estar relacionado com o mecanismo de defesa da espécie, pois no meio de cultura estavam indivíduos adultos, potencialmente mais capazes de responder aos ataques fúngicos que indivíduos juvenis. Análises qualitativas e quantitativas das substâncias químicas produzidas pelo musgo, em meio de cultura, devem ser realizadas a fim de investigar seu potencial antibiótico. Também recomendamos que publicações futuras abordando o cultivo *in vitro* de briófitas registrem e discutam a contaminação ou não do meio.

AGRADECIMENTO

Agradecemos a Eliakim de Oliveira Küster pelo auxílio na manutenção do experimento. Agradecemos também a Lígia Ebúrneo, Ivone Vieira da Silva e Amanda Frederico Mortati pela revisão e comentários do texto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMENTANO, T.V.; CAPONETTI, J.D. The effect of pH on the growth of protonemata of *Tetraplodon mnioides* and *Funaria hygrometrica*. **The Bryologist**, Storrs, USA, v.75, n.2, p.147-153, 1972.
- BARRIQUELLO, I.M. **Fenologia reprodutiva e crescimento em populações do musgo *Octoblepharum albidum* Hedw. (Octoblepharaceae) no Parque Ecológico Municipal Leopoldo Linhares Fernandes, Alta Floresta (MT), Amazônia Meridional**. 2009. 63p. Trabalho de conclusão de Curso e Licenciatura Plena em Ciências Biológicas. Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta.
- DUCKETT, J.G.; BURCH, J.; FLETCHER, P.W.; MATCHAM, H.W.; READ, D.J.; RUSSELL, A.; PRESSEL, S. *In vitro* cultivation of bryophytes: a review of practicalities, problems, progress and promise. **Journal of Bryology**, London, v.26, p.3-20, 2004.
- EGUNYOMI, A. Comparative cultura studies on the spores and gemmae of *Octoblepharum albidum* Hedw. **Journal of Hattori Botanical Laboratory**, Japan, v.44, p.25-30, 1978.
- EGUNYOMI, A. Autoecology of *Octoblepharum albidum* Hedw., in western Nigeria II Phenology and water relations. **Nova Hedwigia**, Berlim, v.31, p.377-388, 1979.
- GLIME, J.M.; KNOOP, B.C. Spore germination and protonemal development of *Fontinalis squamosa*. **Journal of Hattori Botanical Laboratory**, Japan, v.61.p.487-497, 1986.

GLIME, J.M. Meet the Bryophytes. In: GLIME, J.M.. **Bryophyte Ecology**. Sponsored by Michigan Technological University. Botanical Society of America International. Association of Bryologists, 2006a. 10p.

GLIME, J.M. Ecophysiology of development: protonema. In: GLIME, J.M.. **Bryophyte Ecology**. Sponsored by Michigan Technological University. Botanical Society of America International. Association of Bryologists, 2006b. 47p.

GRADSTEIN, S.R.; SALAZAR-ALLEN, N.; CHURCHILL, S.P. **Guide to the Bryophytes of Tropical America**. Memoirs of the New York Botanical Garden, v.86, p.577, 2001.

HARTMAN, E.; WEBER, M. Photomodulation of protonema development. In: CHOPRA RN, BHATLA SC (Eds) **Bryophyte development: Physiology and Biochemistry**. Flórida: CRC Press, 1990. p.33-54,

HATCHER, R.E. Protocol for Preparing Nutrient Agar. **Bryologist**, Inglaterra, v.68, n.2, p.230-231, 1965.

LISBOA, R.C.L. **Musgos acrocárpicos do Estado de Rondônia**. Coleção Adolfo Ducke, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, 1993. 272p.

NEHIRA, K. Spore germination, protonema development and sporeling development. In: SHUSTER, R.M. (Ed.). **New Manual of Bryology**. Nichinan: The Hattori Laboratory, v.1, 1983. p.343-379.

NISHIDA, Y. Studies on the sporeling types in mosses. **Journal of Hattori Botanical Laboratory**, Japan, v. 44, n.3, p.371-454, 1978.

RODRIGUES, J.A. **Processo Histórico de Alta Floresta**. Secretaria Municipal de Educação/ P.M.A.F. 1996. p.4-7.

SCHOFIELD, W.B. **Introduction to Bryology**. New York: Macmillan Publishing Company. 1985. p.290-305; 309-328; 398-400.

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

STALHEIM, T.; BALLANCE, S.; CHRISTENSEN, B.E.; GRANUM, P.E. Sphagnan – a pectin-like polymer isolated from Sphagnum moss can inhibit the growth of some typical food spoilage and food poisoning bacteria by lowering the Ph. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, USA., v.106, n.3, p.967–976, 2009.

YANO, O. An additional checklist of Brazilian bryophytes. **The Journal of the Hattori Botanical Laboratory**, v. 66, p. 371-434, 1989.

★★★★★