

**GERMINAÇÃO DE ESPOROS ARMAZENADOS EM FRIO E
DESENVOLVIMENTO GAMETOFÍTICO *IN VITRO* DE *CYATHEA
ATROVIRENS* (LANGSD. & FISCH.) DOMIN (CYATHEACEAE) NA PRESENÇA
DE ANTIBIÓTICOS.**

*Tatieli Silveira*¹
*Catiúscia Marcon*²
*Annette Droste*³

RESUMO

Cyathea atrovirens (Langsd. & Fisch.) Domin (Cyatheaceae) é uma samambaia arborescente de ampla distribuição no Brasil. Devido ao seu valor ornamental, a espécie é alvo de intensa exploração. Foi avaliada a germinação de esporos armazenados em temperaturas baixas e o desenvolvimento de gametófitos em meio de cultura suplementado com antibióticos. Esporos foram armazenados em tubos eppendorfs em 7 e -20°C por 30 dias, desinfestados com hipoclorito de sódio e semeados em meio Meyer suplementado com um dos antibióticos: estreptomicina (200 mg/L) e cefotaxima (200 mg/L) (três repetições/temperatura e antibiótico). Mensalmente, a contaminação foi avaliada e 300 indivíduos por tratamento foram classificados conforme seu estágio de desenvolvimento. A contaminação foi significativamente menor em esporos semeados em meio com cefotaxima e armazenados a -20°C do que em esporos armazenados a 7°C e cultivados na presença de estreptomicina. Nos tratamentos com cefotaxima, 99,7% dos esporos germinaram, enquanto que, nos tratamentos com estreptomicina, a porcentagem de germinação foi de 87,6%, estatisticamente menor. As porcentagens de gametófitos laminares nos tratamentos com cefotaxima foram cerca de duas vezes superiores às porcentagens de gametófitos nesse estágio quando cultivados em meio com estreptomicina. Gametófitos cordiformes, no estágio mais avançado, foram observados em todos os tratamentos.

Palavras-chaves: Samambaia arborescente. Gametófito. Contaminação. Cultura *in vitro*. Propagação.

ABSTRACT

Cyathea atrovirens (Langsd. & Fisch.) Domin (Cyatheaceae) is a tree fern widely distributed in Brazil. Due to its ornamental value, this species is a target of intense

¹Acadêmica de Ciências Biológicas, Bolsista PROBITI/FAPERGS, Laboratório de Biotecnologia Vegetal. Curso de Ciências Biológicas, Universidade Feevale. <tatieli@feevale.br>

²Acadêmica de Ciências Biológicas, Bolsista PROBIC/Feevale, Laboratório de Biotecnologia Vegetal. Curso de Ciências Biológicas, Universidade Feevale. <cati.marcon@hotmail.com>

³Professora e Pesquisadora, Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental. Laboratório de Biotecnologia Vegetal. Universidade Feevale. <annette@feevale.br>

exploitation. Germination of spores stored at low temperatures and gametophytic development in culture medium supplemented with antibiotics were evaluated. Spores were stored in eppendorfs tubes at 7 and -20°C for 30 days, surface sterilized with sodium hypochlorite and sown in Meyer's medium supplemented with one of the antibiotics: streptomycin (200mg/L) and cefotaxime (200mg/L) (three replicates/temperature and antibiotic). Contamination was assessed monthly and 300 individuals per treatment were classified according to their stage of development. The contamination was significantly lower in spores sown in medium with cefotaxime and stored at -20°C than in spores stored at 7°C and cultured in the presence of streptomycin. In the treatments with cefotaxime, 99.7% of the spores germinated, whereas in treatments with streptomycin, the germination percentage was of 87.6%, statistically lower. The percentages of laminar gametophytes in the treatments with cefotaxime were about two times higher than the percentages of gametophytes in this stage when cultured in the presence of streptomycin. Cordiform gametophytes, in more advanced stage, were observed in all treatments.

Keywords: Tree fern. Gametophyte. Contamination. *In vitro* culture. Propagation.

1 INTRODUÇÃO

Samambaias arborescentes são um componente importante de florestas tropicais úmidas (PAGE, 1979; TRYON; TRYON, 1982), sendo que a maioria delas pertencem às Cyatheaceae e Dicksoniaceae (FERNANDES, 2003). *Cyathea atrovirens* (Langsd. & Fisch.) Domin é uma ciateácea de ampla distribuição geográfica no Brasil, podendo ser encontrada no Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul (Windisch e Santiago, 2012). Devido às suas características ornamentais, a espécie é alvo de intensa exploração. Seus cáudices com feixes de raízes adventícias são usados em artesanato (FERNANDES, 2000) e suas folhas são usadas para fins ornamentais (TRYON; TRYON, 1982). No Rio Grande do Sul, *C. atrovirens* é encontrada em florestas em diferentes estádios de sucessão, bem como em áreas úmidas e ambientes alterados, como beiras de estradas e campos abandonados (RECHENMACHER et al., 2010).

A cultura *in vitro* possibilita o estudo dos estádios gametofítico e esporofítico e o entendimento da biologia das samambaias, uma vez que as exigências e preferências de germinação e crescimento de espécies neotropicais são ainda pouco compreendidas (FERNÁNDEZ et al., 1999; CASSANEGO et al., 2010).

A germinação de esporos é considerada o método mais eficiente de cultura *in vitro* de samambaias (PENCE, 2008). No entanto, a contaminação exógena de esporos é um obstáculo ao sucesso de culturas assépticas em longo prazo (DYER, 1979; SIMABUKURO et al., 1998). Entre as substâncias mais comumente utilizadas para assepsia, está o hipoclorito de sódio (VIVIANI; RANDI, 2008; SANTOS et al., 2010). Também a adição de agentes anti-microbianos ao meio de cultura tem sido testada (KYTE; KLEYN, 1996; COX et al., 2003). No entanto, a maioria dos tratamentos de assepsia também pode reduzir a germinação dos esporos (HAMILTON; CHAFFIN, 1998; SIMABUKURO et al., 1998). Os efeitos da temperatura de armazenamento sobre a viabilidade e a capacidade de germinação dos esporos têm sido investigados (SIMABUKURO et al., 1998; ROGGE et al., 2000; QUINTANILLA et al., 2002; SANTOS et al., 2010). Porém, pré-tratamentos com temperaturas baixas raramente têm sido referidos como coadjuvantes em protocolos de assepsia (SIMABUKURO et al., 1998).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência de pré-tratamentos em baixas temperaturas e da adição de antibióticos ao meio de cultura sobre a germinação de esporos e o desenvolvimento gametofítico inicial de *Cyathea atrovirens*, visando ao estabelecimento de um protocolo eficiente de propagação e, desta forma, contribuir para programas de manejo desta espécie.

2 METODOLOGIA

Dez indivíduos férteis de *Cyathea atrovirens* foram sorteados aleatoriamente para coleta de folhas no Parque Municipal Henrique Luis Roessler, uma Unidade de Conservação situada no município de Novo Hamburgo (29°40'54''S e 51°06'56''O, 16,4 m de altitude), Rio Grande do Sul (RS), Brasil.

Folhas férteis foram coletadas e acondicionadas em bandejas, em sala de aclimação com temperatura ambiente por 72 horas, para deiscência dos esporângios e liberação dos esporos. Os esporos foram separados dos esporângios por filtração manual através de papel de limpeza de lentes de microscópio (Melpaper®) e armazenados em

tubos eppendorfs. Os tubos foram divididos em dois grupos e armazenados nas temperaturas de 7 e -20°C, respectivamente, por um período de 30 dias.

Em câmara defluxo laminar horizontal, os esporos foram esterilizados com hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% durante 15 minutos. Amostras de 10 mg de esporos foram semeadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) com 30 mL de meio Meyer (Meyer et al., 1955) suplementado com 0,25% de PhytigelTM, pH ajustado em 6,0 antes da esterilização, com adição de um dos seguintes antibióticos: 200 mg/L de estreptomicina (STR) ou 200 mg/L de cefotaxima (CEF). Foram feitas três repetições por tratamento (temperatura e antibiótico), totalizando 12 repetições. As culturas foram mantidas em ambiente com temperatura a 26±1°C e fotoperíodo de 12 horas luz, com intensidade luminosa de 100µmol/m²/s.

Para a avaliação da contaminação, foram feitas análises quantitativas aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultura, usando duas folhas de papel, uma preta e uma branca, com 21 campos de 1,5 cm². As folhas foram colocadas separadamente debaixo de cada placa, cobrindo toda a área, e o número de campos com contaminação macroscopicamente visível foi contado.

O desenvolvimento gametofítico foi avaliado aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultura. Uma lâmina microscópica por placa foi analisada, e os 100 primeiros indivíduos (esporos ou gametófitos jovens) foram contados sob microscópio óptico (Nikon YS 100), aumento de 400 vezes. Considerou-se o esporo germinado quando foi observada a emergência do clorócito ou do rizoide (RANAL, 1999). De acordo com o desenvolvimento, os esporos foram classificados como: gametófito com clorócito e rizoide, gametófito filamentar, gametófito laminar e gametófito cordiforme (RECHENMACHER et al., 2010).

Para análise dos dados, foi utilizado o programa estatístico SPSS versão 20 (SPSS, Chicago, IL, USA). A normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias foram verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e diferenças entre médias foram verificadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises macroscópicas referentes à contaminação mostraram não haver diferença significativa aos 30 dias ($F=0,509$; $p=0,687$) e 60 dias ($F=1,942$; $p=0,201$) entre gametófitos cultivados na presença dos dois antibióticos (Figura 1). Aos 90 dias, a média de campos contaminados foi significativamente menor (13,67) quando os esporos haviam sido semeados em meio com cefotaxima e armazenados a -20°C , do que a média de contaminação das culturas a partir de esporos armazenados a 7°C e cultivados na presença de estreptomicina (21,00 campos contaminados) ($F=4,456$; $p=0,040$). O mesmo fato foi observado aos 120 dias, quando a média de campos contaminados no tratamento dos esporos armazenados a -20°C e semeados na presença de cefotaxima foi significativamente menor (12,33) do que quando os esporos haviam sido armazenados a 7°C e semeados na presença de estreptomicina (20,33 campos contaminados) ($F=4,866$; $p=0,033$) (Figura 1).

A esterilização de esporos é requerida quando se deseja obter culturas assépticas de samambaias, uma vez que a contaminação dos esporos em campo é bastante comum (DYER, 1979). Culturas iniciadas sem esterilização de esporos tendem a contaminar após certo tempo, como registrado para *Platyserium bifurcatum* (Cav.) C. Chr. (CAMLOH, 1999) e *Cyathea atrovirens* (RECHENMACHER et al., 2010). Esporos da samambaia *Schizaea dichotoma* (L.) J. Sm. apresentaram 80% de contaminação e não foram capazes de germinar após esterilização com 1% de hipoclorito de sódio e 200 mg/L de estreptomicina (COX et al., 2003). Os autores aplicaram o antibiótico simultaneamente ao NaClO sobre os esporos secos durante 5 minutos, antes da iniciação da cultura *in vitro*. Ápices caulinares de *Heliconia rauliniana* Barreiros apresentaram redução da contaminação para 30% quando da adição de 500 mg/L de cefotaxima ao meio de cultura (RODRIGUES, 2005). Segundo Torres e Caldas (1998), a cefotaxima é um eficiente agente bacteriostático e mesmo bactericida. Explantes de bananeira (*Musa* AAB cv. Maçã) tiveram redução importante de contaminação por fungos e bactérias em meio de cultura adicionado de 300 mg/L de cefotaxima, apresentando 26,7% de meristemas contaminados (CARNEIRO et al., 2000).

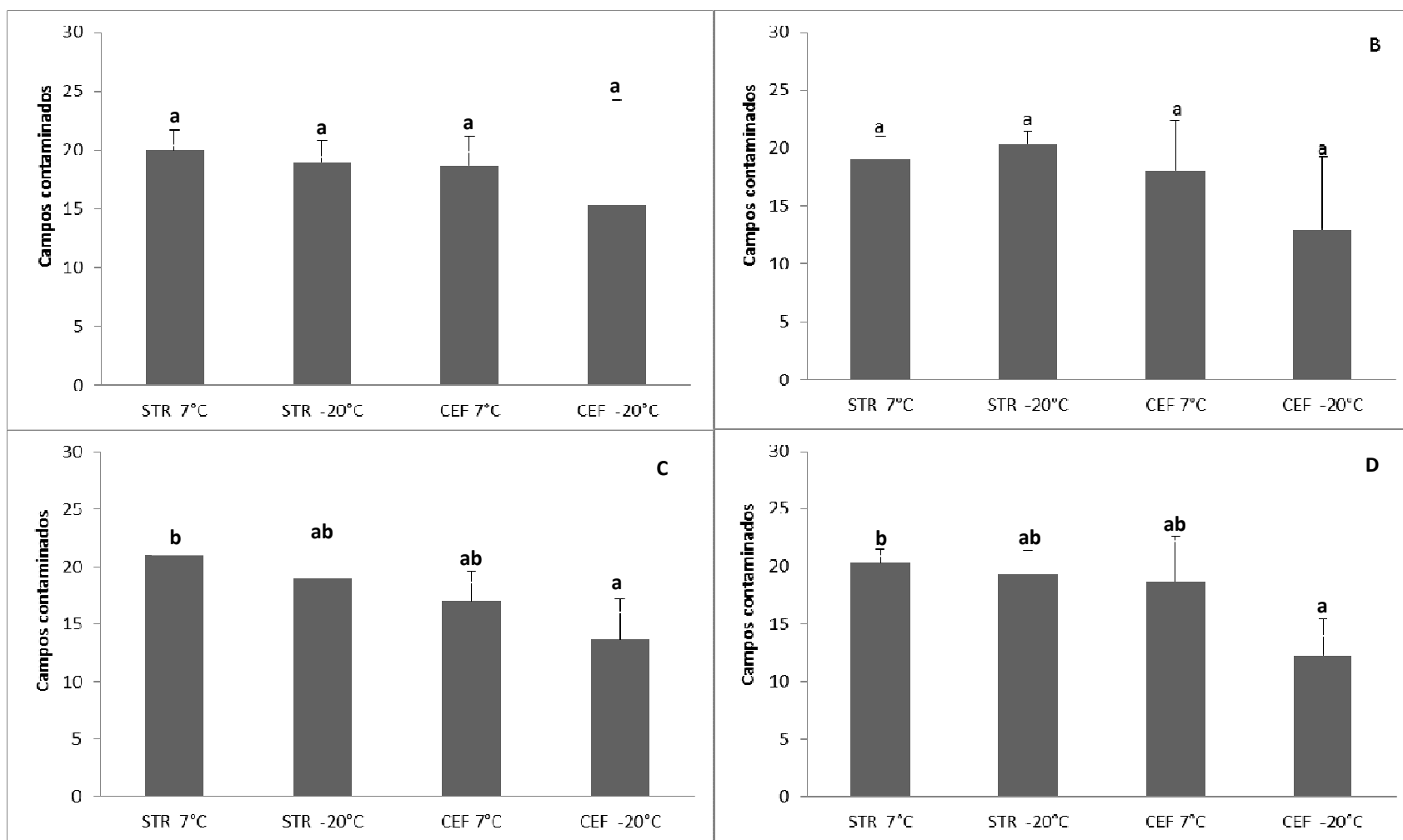


Figura 1 - Número de campos contaminados (de um total de 21) em placas com gametófitos de *Cyathea atrovirens* aos 30 (A), 60 (B), 90 (C) e 120 (D) dias de cultivo *in vitro* com diferentes antibióticos (STR: estreptomicina, CEF: cefotaxima), após armazenamento a 7 e -20°C. Letras iguais indicam que as médias não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Embora na literatura a esterilização de esporos tenha sido registrada como responsável pela diminuição da capacidade de germinação (SIMABUKURO et al., 1998; COX et al., 2003), este fato não foi observado no presente estudo. Aos 30 dias de cultura aproximadamente 98% dos esporos armazenados a 7°C e cultivados na presença de cefotaxima germinaram, diferindo significativamente das porcentagens de germinação observadas nos tratamentos com estreptomicina, tanto com armazenamento a 7°C bem como a -20°C, que foram, respectivamente, de 81 e 70% (F=19,358; p=0,001). Ao final do experimento esta tendência se confirmou, pois nos dois tratamentos com cefotaxima, 99,7% dos esporos haviam germinado, enquanto que, nos tratamentos com estreptomicina, a porcentagem de germinação foi de 87,6%, significativamente menor (F=20,810; p<0,001).

O desenvolvimento gametofítico não foi homogêneo nos diferentes tratamentos. Na presença de cefotaxima, uma porcentagem significativamente maior de gametófitos já se encontrava em estágio laminar aos 30 dias de cultura do que nos tratamentos com estreptomicina (F=149,170; p<0,001) (Figura 2). Este fato se repetiu durante todas as etapas do estudo, sendo que, aos 120 dias, as porcentagens de gametófitos laminares nos tratamentos com cefotaxima foram cerca de duas vezes superiores às porcentagens de gametófitos nesse estágio de desenvolvimento quando cultivados em meio com estreptomicina (F=41,475; p<0,001) (Figura 2). Por outro lado, nos tratamentos com estreptomicina, aos 120 dias 16,3% (armazenamento em 7°C) e 14,3% (armazenamento em -20°C) dos gametófitos ainda estavam no estágio de desenvolvimento mais inicial, estágio de clorócito com rizoide, enquanto que no tratamento com cefotaxima e armazenamento a -20°C, apenas 0,33% dos gametófitos permaneciam nesse estágio e, em cefotaxima e armazenamento a 7°C, não havia mais gametófitos em estágio de clorócito com rizoide.

Ao final do experimento foram observados gametófitos no estágio mais avançado, cordiforme, em todos os tratamentos (Figura 2). Não puderam ser confirmadas diferenças estatísticas significativas, provavelmente devido ao pequeno tamanho amostral, uma vez que aos 120 dias o número de gametófitos cordiformes ainda é reduzido (RECHENMACHER et al., 2010). Numericamente, as porcentagens de gametófitos nesse estágio foram maiores na presença de cefotaxima do que na presença de estreptomicina.

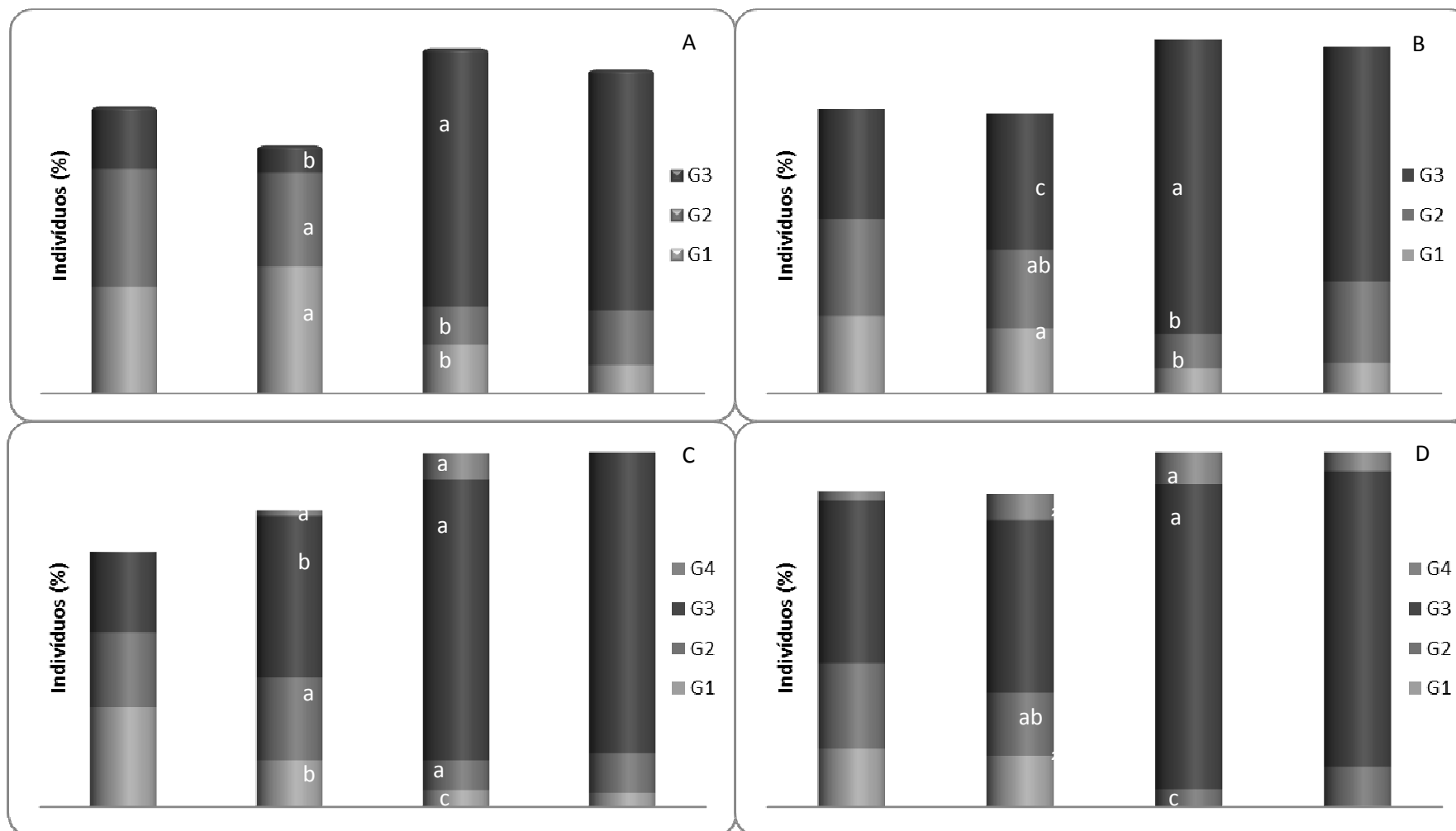


Figura 2 - Influência de antibióticos (STR: estreptomicina, CEF: cefotaxima) e do armazenamento prévio em 7°C e - 20°C sobre o desenvolvimento de gametófitos (porcentagem média) de *Cyathea atrovirens* aos 30 (A), 60 (B), 90 (C) e 120 (D) dias de cultura *in vitro*. G1: gametófitos com rizoide e clorócito; G2: gametófitos filamentosos; G3: gametófitos laminares; G4: gametófitos cordiformes. Letras iguais indicam que as médias não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4 CONCLUSÃO

Embora sejam utilizados agentes esterilizantes para a cultura *in vitro* de ciateáceas, não há registros na literatura acerca da influência qualitativa e quantitativa destes sobre o desenvolvimento de gametófitos. No presente estudo, maiores porcentagens de germinação e aceleração do desenvolvimento gametofítico de *Cyathea atrovirens* puderam ser observadas quando do armazenamento de esporos em 7 e -20°C associado à adição de cefotaxima ao meio de cultura. No entanto, mesmo na presença de antibióticos, ainda houve contaminação das culturas, sendo que maiores esforços deverão ser direcionados para o desenvolvimento de um protocolo de assepsia, visando a contribuir para um eficiente método de propagação *in vitro* de *C. atrovirens*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Feevale pelo apoio financeiro e pela infraestrutura disponibilizada e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pela concessão de Bolsa de Iniciação Científica Tecnológica Institucional (PROBITI, Processo 0427-2551/12-3).

REFERÊNCIAS

- CAMLOH, M. Spore age and sterilization affect germination and early gametophyte development of *Platyserium bifurcatum*. *American Fern Journal*, v.89 , p. 124-132, 1999.
- CARNEIRO, M. F. et al. Avaliação de produtos na descontaminação de explantes de banana (*Musa* AAB cv. MAÇÃ). *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 30, n. 1, p. 29-35, 2000.
- CASSANEGO, M. B. B.; DROSTE, A.; WINDISCH, P. G. Effects of 2,4-D on the germination of megaspores and initial development of *Regnellidium diphyllum* Lindman (Monilophyta, Marsileaceae). *Brazilian Journal of Biology*, v. 70, n. 2, p. 361-366, 2010.
- COX, J.; BHATIA, P.; ASHWATH, N. In vitro spore germination of the fern *Schizaea dichotoma*. *Scientia Horticulturae*, v. 97, p.369-378, 2003.

- DYER, A. F. The culture of fern gametophytes for experimental investigation. In: Dyer, A. F. (Ed). *The experimental biology of ferns*. London: Academic Press, 1979. p. 253-305.
- FERNANDES, I. Taxonomia dos representantes de Dicksoniaceae no Brasil. *Pesquisas*, v. 50, p. 5-26, 2000.
- FERNANDES, I. Taxonomia dos representantes de Cyatheaceae do Nordeste Oriental do Brasil. *Pesquisas*, v. 54, p. 1-54, 2003.
- FERNANDÉZ, H.; BERTRAND, A. M.; SÁNCHEZ-TAMÉS, R. Biological and nutritional aspects involved in fern multiplication. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 56, p. 211-214, 1999.
- HAMILTON, R.; CHAFFIN, C. The effect of surface sterilization on cultures of *Ceratopteris richardii* gametophytes. *American Fern Journal*, v. 88, p. 81-85, 1998.
- KYTE, L.; KLEYN, J. *Plants from test tubes*. An introduction to micropropagation. Portland: Timber Press, 1996.
- MEYER, B. S.; ANDERSON, D. B.; SWANSON, C. A. *Laboratory plant physiology*. New York: Van Nostrand, 1955.
- PAGE, C. N. The diversity of ferns: an ecological perspective. In: DYER, A. F. (Ed.). *The experimental biology of ferns*. London: Academic Press, 1979. p. 10-56.
- PENCE, V. C. *In vitro* collecting for *ex situ* conservation. In: RANKER, T. A.; HAUFLER, C. H. (Ed.) *Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes*. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. p. 417-461.
- QUINTANILLA, L. G.; AMIGO, J.; PANGUA, E.; PAJARON, S. Effect of storage method on spore viability in five globally threatened fern species. *Annals of Botany*, v. 90, p. 461-467, 2002.
- RANAL, M. A. Effects of temperature on spore germination in some fern species from semi deciduous mesophytic Forest. *American Fern Journal*, v.89, p.149-158, 1999.
- RECHENMACHER, C.; SCHMITT, J. L.; DROSTE, A. Spore germination and gametophyte development of *Cyathea atrovirens* (Langsd. & Fisch.) Domin (Cyatheaceae) under different pH conditions. *Brazilian Journal of Biology*, v. 70, n. 4, suppl., p. 1155-1160, 2010.
- RODRIGUES, P. H. V. *In vitro* establishment of *Heliconia rauliniana* (Heliconiaceae). *Scientia Agricola*, v. 62, n. 1, p. 69-71, 2005.

ROGGE, G. D.; VIANA, A. M.; RANDI, A. M. Cryopreservation of spores of *Dicksonia sellowiana* an endangered tree fern indigenous to South and Central America. *Cryoletters*, v. 21, p. 223-230, 2000.

SANTOS, E. P. G.; LEHMANN, D. R. M.; SANTOS, M.; RANDI, A. M. Spore germination of *Gleichenella pectinata* (Willd.) Ching (Polypodiopsida-Gleicheniaceae) at different temperatures, levels of light and pH. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 53, p. 1309-1318, 2010.

WINDISCH, P. G., SANTIAGO, A. C. P. *Cyatheaceae* in *Lista de Espécies da Flora do Brasil (2012)*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB090866>>. Acesso em: 12 de dez. 2012.

SIMABUKURO, E. A.; DYER, A. F.; FELIPPE, G. M. The effect of sterilization and storage conditions on the viability of the spores of *Cyathea delgadii* Sternb. *American Fern Journal*, v. 88, p. 72-80, 1998.

TRYON, R. M.; TRYON, A. F. *Ferns and allied plants with special reference to Tropical America*. New York: Springer Verlag, 1982.

VIVIANI, D.; RANDI, A. M. Effects of pH, temperature and light intensity on spore germination and growth analysis of young sporophytes of *Polypodium lepidopteris* (Langsd. and Fisch.) Kunze (Pteridophyta, Polypodiaceae). *Rodriguésia*, v. 59, p. 435-444, 2009.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, DF: SPI/Embrapa- CNPH. v. 1, 1998.