

GERMINAÇÃO DE ESPOROS E DESENVOLVIMENTO DE GAMETÓFITOS DE *CYATHEA ATROVIREN* (LANGSD. & FISCH.) DOMIN (*CYATHEACEAE*): INFLUÊNCIA DE SAIS MINERAIS E SACAROSE

Tatieli Silveira¹
Catiúscia Marcon²
Annette Droste³

Recebido em 16.03.2015; Aceito 06.04.2015

Abstract

The tree fern *Cyathea atrovirens* (Langsd. & Fisch.) Domin occurs in diverse habitats in Brazil, being a target of extractivism due to its ornamental characteristics. Nutritional conditions that promote spore germination and early development of gametophytes are crucial for the whole life cycle of ferns. The objective of the study was to assess spore germination and early gametophytic development of *C. atrovirens* in the presence of different macronutrient salt and sucrose concentrations. Spores were surface sterilized with 2% sodium hypochlorite and sowed in Murashige & Skoog (MS) liquid medium containing 25, 50, 75 or 100% of the original macronutrient salts, without addition of sucrose or with 15, 30, 45 or 60 g L⁻¹ of the carbohydrate. Percentages of germination and of laminar gametophytes in the different treatments were determined and compared by the Student-Newman-Keuls test. Regardless salt concentration, the percentage of germinated spores in the absence of sucrose (28.7 to 69.3%) was significantly higher than the percentages recorded in media containing 45 (1 to 41%) and 60 g L⁻¹ (5 to 20%) of the carbohydrate. When treatments with different macronutrient concentrations without addition of sucrose were compared, the highest germination percentages (69.3%) and laminar gametophyte percentages (42.7%) were observed in the medium with 25% of the salts, which differ significantly from the values recorded in the medium with 100% of the original concentration of MS salts (28.7 and 5.3%, respectively). The MS medium with 25% of macronutrient salts and without sucrose is recommended for the early stage of *in vitro* culture of *C. atrovirens*.

Key Words: *In vitro* culture. Conservation. Tree fern.

¹ Bolsista PROBITI/FAPERGS, Curso de Ciências Biológicas, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Universidade Feevale, ERS 239, 2755, CEP 93525-075, Novo Hamburgo, RS, Brasil. E-mail: tatieli@feevale.br.

² Bolsista PROSUP CAPES de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale, ERS 239, 2755, CEP 93525-075, Novo Hamburgo, RS, Brasil. E-mail: cati.marcon@hotmail.com

³ Doutora e Professora Adjunta do Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale, ERS 239, 2755, CEP 93525-075, Novo Hamburgo, RS, Brasil. E-mail: annette@feevale.br.

Resumo

A samambaia arborescente *Cyathea atrovirens* (Langsd. & Fisch.) Domin ocorre em diversos habitats no Brasil, sendo alvo de extrativismo devido a suas características ornamentais. As condições nutritivas que propiciam a germinação de esporos e o desenvolvimento inicial de gametófitos são determinantes para todo o ciclo de vida das samambaias. O objetivo do estudo foi avaliar a germinação de esporos e o desenvolvimento de gametófitos de *C. atrovirens* na presença de diferentes concentrações de sais macronutrientes e de sacarose. Esporos foram superficialmente esterilizados com 2% de hipoclorito de sódio e semeados em meio Murashige & Skoog (MS) líquido contendo 25, 50, 75 ou 100% dos sais macronutrientes originais, sem sacarose ou com adição de 15, 30, 45 ou 60 g L⁻¹ do carboidrato. Foram determinadas as porcentagens de germinação e de gametófitos laminares nos diferentes tratamentos, e comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls. Independentemente da concentração de sais, as porcentagens de esporos germinados na ausência de sacarose (28,7 a 69,3%) foram significativamente superiores às porcentagens registradas nos meios contendo 45 (1 a 41%) e 60 g L⁻¹ (5 a 20%) do carboidrato. Quando os tratamentos com diferentes concentrações de macronutrientes sem adição de sacarose foram comparados entre si, as maiores porcentagens de germinação (69,3%) e de gametófitos laminares (42,7%) foram observadas no meio com 25% dos sais, que diferiram significativamente dos valores registrados no meio com 100% da concentração original de sais MS (28,7 e 5,3%, respectivamente). O meio MS com 25% de sais macronutrientes e sem sacarose é recomendado para a etapa inicial do cultivo *in vitro* de *C. atrovirens*.

Palavras-chave: Cultura *in vitro*. Conservação. Samambaia arborescente.

Introdução

As samambaias constituem um grupo de grande diversidade morfológica, incluindo plantas de alguns milímetros de comprimento até espécies arborescentes (Page, 1979), que apresentam uma variada ocupação de habitats, com distribuição desde o nível do mar até o limite da vegetação altimontana, nas regiões tropicais (Page, 1979; Windisch, 1992). Estima-se que ocorram cerca de 13.600 espécies de samambaias no mundo (Moran, 2008) sendo que 1.253 espécies estão distribuídas no Brasil, das quais 461 são endêmicas (Prado & Sylvestre, 2015).

As Cyatheaceae, também conhecidas como “xaxins” ou “samambaias”, são samambaias arborescentes, amplamente exploradas na região sul do Brasil para fins ornamentais (Schmitt & Windisch, 2005). *Cyathea atrovirens* (Langsd. & Fisch.) Domin é uma Cyatheaceae de até seis metros de altura, com raízes adventícias e folhas que podem ter até três metros de comprimento, contendo espinhos nos pecíolos (Fernandes, 1997). A espécie ocorre em estados do Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, no Paraguai, na Argentina (Ponce, 1996) e no Uruguai (Marquez & Brussa, 2011). No Brasil, a espécie é encontrada principalmente no domínio da Floresta Atlântica (Windisch & Santiago, 2015) e sofre com pressões antrópicas de

cunho exploratório, sendo que plantas inteiras são retiradas de seus habitats naturais para ornamentação de jardins e seus cáudices são utilizados para a fabricação de vasos (Schmitt, 2005; Fernandes, 2000).

O estabelecimento de *Cyathea atrovirens* ocorre em habitats com diferentes estágios sucessionais, e indivíduos podem ser encontrados em capoeira, floresta secundária baixa e alta. Apesar de apresentar ocorrência em ambientes com diferentes características, a variação dos fatores abióticos ao longo do ano influenciam os eventos fenológicos, como produção e senescência de folhas e maturação de esporos (Schmitt & Windisch, 2012). No sul do Brasil, foi verificado que a produção e a maturação de esporos é restrita aos meses de verão, sendo possível que o ciclo reprodutivo da espécie possa estar relacionado a fatores ambientais específicos, como, fotoperíodo, temperatura e substrato, refletindo também na formação de novos indivíduos (Schmitt & Windisch, 2012).

Para a conservação e a proteção de uma espécie explorada, são utilizadas estratégias *in situ* e *ex situ* (Primack & Rodrigues, 2008). As técnicas de cultura *in vitro* são valiosas para a propagação e o uso sustentável dos recursos vegetais (Harding *et al.*, 1997), sendo assim uma possibilidade de produção de indivíduos e uma forma indireta de reduzir a pressão sobre espécies exploradas pelo seu valor econômico. Para que a cultura *in vitro* tenha sucesso, é necessário compreender as exigências ecofisiológicas para o desenvolvimento das plantas. Uma vez que o gametófito é o estágio de desenvolvimento mais sensível do ciclo de vida das samambaias, as condições *in vitro* para a germinação de esporos e o desenvolvimento gametofítico são decisivas para a propagação eficiente destas plantas (Hua *et al.*, 2010). A concentração de sais e de fontes de carbono são fatores que influenciam no estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de gametófitos de samambaias (Mohr, 1962; Khoo & Thomas, 1980; Lê, 1983; Pasqual *et al.*, 1994; Fernández *et al.*, 1997a). O meio Murashige e Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) é utilizado para cultura de samambaias (Knauss, 1976; Pasqual *et al.*, 1994; Fernández *et al.*, 1997b; Cox *et al.*, 2003; Hua *et al.*, 2010) e em sua formulação original contém sacarose. Este meio apresenta concentrações de sais macronutrientes maiores comparativamente a outros meios, além de sais micronutrientes (Torres *et al.*, 1998). A concentração ideal de sacarose para cada tecido vegetal depende de seu efeito promotor como nutriente e de seu efeito inibidor como agente osmótico (Fernández & Revilla, 2003). Diferenças entre espécies são observadas nas respostas às condições *in vitro*, de forma que algumas samambaias apresentam germinação e crescimento de gametófitos maiores em meios com maiores concentrações de nutrientes, enquanto que outras espécies têm preferência por meios menos ricos em nutrientes, incluindo a fonte de carbono (Fernández *et al.*, 1997a; Marcon *et al.*, 2014).

O presente estudo teve por objetivo avaliar a germinação de esporos e o desenvolvimento de gametófitos de *Cyathea atrovirens* na presença de diferentes concentrações de sais macronutrientes e de sacarose. A hipótese

testada foi de que a germinação de esporos e o desenvolvimento gametofítico são superiores em culturas com maiores concentrações destes compostos.

Material e métodos

A população de *Cyathea atrovirens* da qual foram coletadas folhas férteis encontra-se na Área de Relevante Interesse Ecológico Henrique Luis Roessler (29°40'54" S e 51°06'56" O; 16,4 m de altitude), que foi decretada em 2009 como Unidade de Conservação. A área está localizada no ambiente urbano do município de Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, Brasil.

As folhas foram coletadas de dez espécimes, acondicionadas em bandejas e mantidas em temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ por aproximadamente 72 h para induzir a deiscência dos esporângios, conforme método de Brum & Randi (2006), com adaptações. Os esporos foram separados dos esporângios através de filtração em papel interfolhado (Melpaper®). Em tubos Eppendorf (capacidade de 1,5 mL), foram colocados 60 mg de esporos, os quais passaram por assepsia em 1 mL de hipoclorito de sódio a 2% por 15 min e quatro lavagens em 1 mL de água destilada autoclavada (Vargas & Droste, 2014). Imediatamente após a assepsia, os esporos foram semeados em meio MS, com pH ajustado em 6,0 (Rechenmacher *et al.*, 2010) antes da esterilização em autoclave. Para esterilização superficial dos esporos, foi adicionada actidiona (Fluka, Sigma-Aldrich) na concentração de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ (Vargas & Droste, 2014) em cada frasco (capacidade de 200 mL) contendo 30 mL de meio MS e 10 mg de esporos. Foram preparadas três repetições (frascos) para cada concentração de sais macronutrientes (25, 50, 75 e 100%) combinada com cada concentração de sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g L^{-1}), totalizando 20 tratamentos e sessenta repetições. As culturas foram mantidas em ambiente com temperatura controlada de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas luz, intensidade luminosa de $70 \mu\text{mol m}^{-2}/\text{s}$.

A germinação e o desenvolvimento gametofítico foram avaliados aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*. Para cada tratamento, três lâminas microscópicas foram preparadas (uma lâmina a partir de cada frasco), sendo contados os 100 primeiros indivíduos observados de cada lâmina em microscópio binocular (Nikon, Eclipse E200, aumento de 400x), conforme metodologia proposta por Viviani & Randi (2008). O número total de gametófitos e o número de gametófitos laminares (estádio de desenvolvimento gametofítico mais avançado visualizado no período de 60 dias) (Figura 1) foram registrados, seguindo a classificação descrita por Rechenmacher *et al.* (2010). Utilizou-se como critério para considerar esporo germinado a emergência do clorócito e do rizoide (Ranal, 1999).

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e as diferenças entre médias foram analisadas pelo teste de Student-Newman-Keuls, a 5% de probabilidade. O agrupamento dos tratamentos com base na distância euclidiana foi feito por meio da análise de conglomerados hierárquicos com standardização das variáveis. Para os testes, foi utilizado o programa BioEstat versão 5.3.

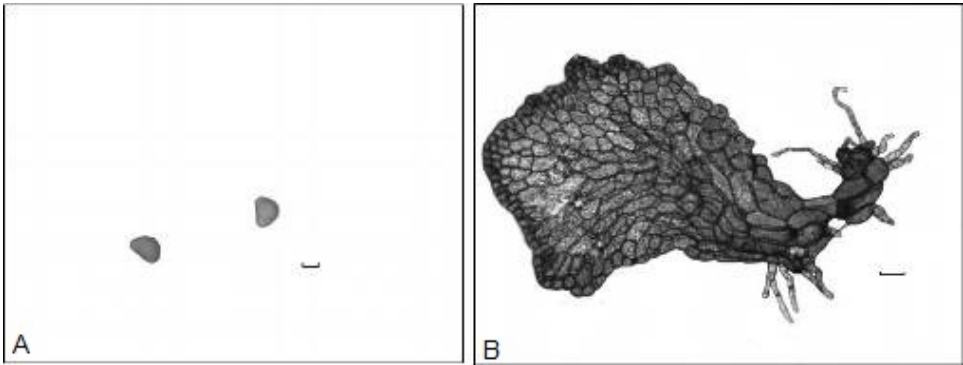


Figura 1. *Cyathea atrovirens*: (A) Esporos (barra = 50 µm). (B) Gametófito laminar (barra = 100 µm).

Resultados

A germinação de esporos de *Cyathea atrovirens* foi observada em todos os meios de cultura. No entanto, as diferentes concentrações de sais macronutrientes e de sacarose influenciaram na capacidade de germinação dos esporos (Figura 2). Tanto aos 30 bem como aos 60 dias após a semeadura, independentemente da concentração de sais, a porcentagem de esporos germinados na ausência de sacarose foi significativamente superior às porcentagens registradas nos meios contendo 45 e 60 g L⁻¹ desta fonte de carbono. As porcentagens de esporos germinados na presença de 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose foram estatisticamente intermediárias. Salienta-se que nos tratamentos com 100% dos sais macronutrientes não houve germinação na presença de 45 e 60 g L⁻¹ de sacarose aos 30 dias. Neste mesmo período e tratamentos, a porcentagem de germinação foi significativamente inferior no meio com 30 g L⁻¹ de sacarose, quando comparada à registrada na ausência de sacarose, enquanto que, na presença de 15 g L⁻¹ do carboidrato, a porcentagem foi intermediária (Figura 2).

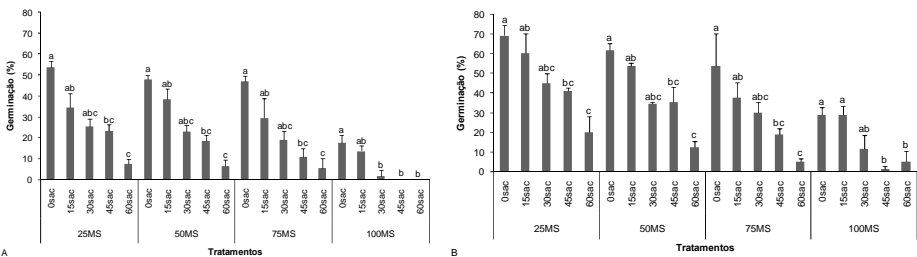


Figura 2. Porcentagem (média ± desvio padrão) de germinação de esporos de *Cyathea atrovirens* aos 30 dias (A) e 60 dias (B) de cultivo em meio com diferentes concentrações de sais macronutrientes (MS) e de sacarose (Sac). Médias com letras iguais em cada concentração de sais macronutrientes indicam que os dados não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls, a 5% de probabilidade.

As porcentagens de gametófitos laminares nos meios com 25% da concentração de sais macronutrientes com 15 g L⁻¹ ou sem sacarose foram significativamente superiores à porcentagem registrada na maior concentração de sacarose aos 30 dias após a semeadura (Figura 3). Nos meios com 50 e 75% de sais macronutrientes, as porcentagens de gametófitos laminares desenvolvidos na ausência de sacarose foram significativamente maiores daquelas nos meios com 30 g L⁻¹ ou mais de sacarose. Nos tratamentos com 100% dos sais, apenas na ausência e na presença de 15 g L⁻¹ de sacarose houve formação de gametófitos laminares (Figura 3). Aos 60 dias, as porcentagens de gametófitos laminares na ausência de sacarose nos tratamentos com 25, 50 e 75% de sais macronutrientes foram significativamente superiores às porcentagens registradas na presença de 45 e 60 g L⁻¹ do açúcar (Figura 3). Nos tratamentos com 100% dos sais, as porcentagens de gametófitos laminares foram as mais baixas observadas (0,67 a 7,67%).

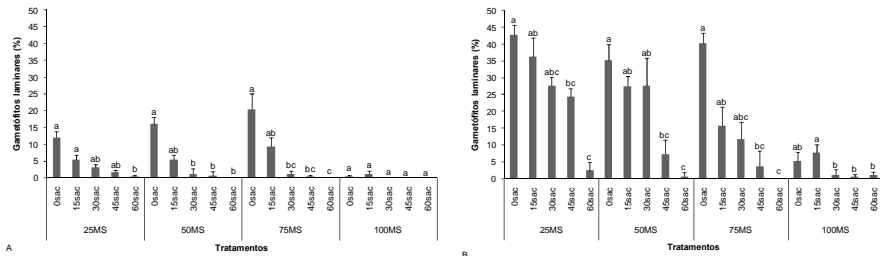


Figura 3. Porcentagem (média \pm desvio padrão) de gametófitos laminares de *Cyathea atrovirens* aos 30 dias (A) e 60 dias (B) de cultivo em meio com diferentes concentrações de sais macronutrientes (MS) e de sacarose (sac). Médias com letras iguais em cada concentração de sais macronutrientes indicam que os dados não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls, a 5% de probabilidade.

Pelo fato de numericamente as maiores porcentagens de germinação de esporos e de gametófitos laminares terem sido observadas na ausência de sacarose independente da concentração de macronutrientes, estas foram estatisticamente comparadas (Figura 4). As maiores porcentagens de germinação (69,3%) e de gametófitos laminares (42,7%) foram observadas aos 60 dias após a semeadura no meio com 25% dos sais macronutrientes, embora as porcentagens nos meios com 50 e 75% dos sais não tenham sido significativamente inferiores (50% dos sais: 62,0 e 35,3%; 75% dos sais: 53,7 e 40,3%, respectivamente). A germinação e a formação de gametófitos laminares no meio contendo 100% dos sais macronutrientes foram significativamente inferiores (28,7 e 5,3%, respectivamente) aos valores registrados no meio com 25% dos sais. O processo de germinação foi retardado na concentração original de sais do meio MS sem sacarose, uma vez que apenas 18,6% dos indivíduos germinados havia atingido o estágio laminar nesse tratamento, enquanto que nos demais meios sem sacarose, os gametófitos laminares representaram pelo menos 57% dos indivíduos germinados (Figura 4).

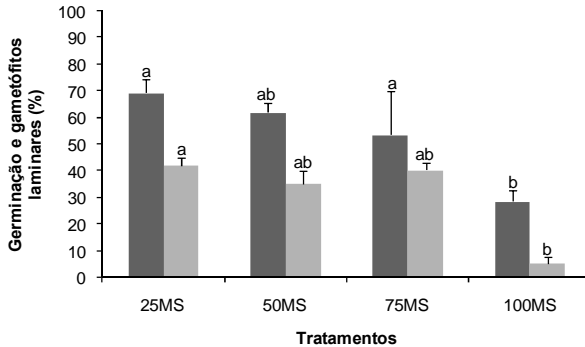


Figura 4. Porcentagem (média ± desvio padrão) de germinação (barras pretas) e de gametófitos laminares (barras cinzas) de *Cyathea atrovirens* aos 60 dias em meios com diferentes concentrações de sais macronutrientes (MS) sem adição de sacarose. Médias com letras iguais (barras da mesma cor) indicam que os dados não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls, a 5% de probabilidade.

Considerando simultaneamente a germinação de esporos e a formação de gametófitos laminares, a análise de agrupamento dos tratamentos possibilitou distinguir dois grupos: A e B (Figura 5). As combinações de 25% dos sais macronutrientes de MS sem sacarose e com 15g L⁻¹ de sacarose e de 50% e 75% de macronutrientes sem sacarose influenciaram a germinação e o desenvolvimento gametofítico de forma similar (Figura 5, grupo A). As demais combinações de sais macronutrientes e sacarose formaram um grande grupo (Figura 5, grupo B), dentro do qual os tratamentos 25% de sais com 30 e 45 g L⁻¹ de sacarose e 50% de sais com 15 g L⁻¹ se agruparam (Figura 5, grupo Bb) e se diferenciaram dos demais (Figura 5, grupo Ba). Os tratamentos com as maiores concentrações de sais macronutrientes e de sacarose se agruparam, reforçando os resultados que evidenciaram uma influência negativa destes sobre a germinação e o desenvolvimento de gametófitos laminares.

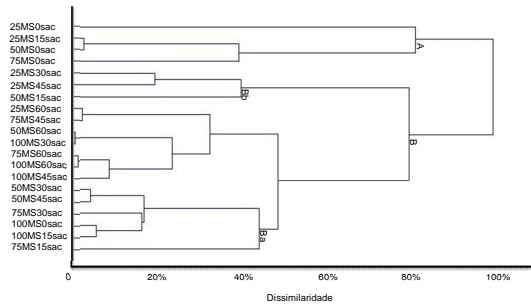


Figura 5. Dendrograma gerado pela análise de aglomerados hierárquicos com padronização das variáveis, utilizando o índice de dissimilaridade baseado na distância euclidiana para os 20 tratamentos com diferentes concentrações de sais macronutrientes e de sacarose para o cultivo *in vitro* de *Cyathea atrovirens*.

Discussão

A maior porcentagem de germinação de esporos de *Cyathea atrovirens* observada na ausência de sacarose e a diminuição gradativa do número de esporos germinados na medida em que a concentração desta fonte de carbono foi aumentada no meio de cultura corroborou com o registro para *Dicksonia sellowiana* Hook (Dicksoniaceae), outra samambaia arborescente (Renner & Randi, 2004). Esporos de *Adiantum reniforme* var. *sinense* (Y. X. Lin) (Pteridaceae) cultivados em meio MS com 45 e 60 g L⁻¹ de sacarose apresentaram atraso na germinação quando comparados a esporos germinados na presença de 15 g L⁻¹ do carboidrato (Hua *et al.*, 2010). *Cyathea atrovirens* também apresentou menor germinação de esporos no meio MS com a concentração original dos sais macronutrientes. No entanto, não se observou decréscimo sensível do número de esporos germinados entre os tratamentos com 25 e 50% destes sais. Cox *et al.* (2003) observaram ausência de germinação de esporos de *Schizaea dichotoma* (L.) Sw. (Schizaeaceae) em 50% dos macronutrientes, evidenciando a preferência desta espécie pelo meio MS com 25% de sais. Concentrações menores de nutrientes no meio de cultura representam uma pressão osmótica inferior àquela presente quando altas concentrações de nutrientes compõem o meio, o que é benéfico para a absorção de água por parte dos esporos, que é requisito para o início do processo de germinação (Whittier, 1975). Além disso, a adição de sacarose ao meio de cultura pode aumentar os níveis de contaminação por fungos ou bactérias (Cid, 2010), fato observado para *C. atrovirens* no presente estudo. Tais organismos competem pelos nutrientes, podem eliminar substâncias tóxicas para o meio, bem como afetar a produção de metabólitos secundários importantes para o desenvolvimento vegetal (Torres *et al.*, 1998), vindo a diminuir a capacidade de germinação. No entanto, enquanto algumas espécies de samambaias possuem preferência por meios menos ricos em nutrientes, outras têm a germinação estimulada em meios com a concentração original de sais, tais como *Dryopteris affinis* (Lowe) Fraser-Jenk. (Dryopteridaceae) (Fernández *et al.*, 1996a), *Blechnum spicant* (L.) Sm. (Blechnaceae), *Pteris ensiformis* (Burm. F.) (Fernández *et al.*, 1996b) e *Asplenium nidus* L. (Aspleniaceae) (Fernández *et al.*, 1997b).

A adição de sacarose ao meio de cultura de *Cyathea atrovirens* não promoveu o crescimento dos gametófitos. Porcentagens estatisticamente equivalentes de gametófitos laminares foram observadas nos meios com zero a 30 g L⁻¹ de sacarose, com destaque numérico para os gametófitos desenvolvidos na ausência deste carboidrato. Meios sem adição de fontes de carbono ou com baixas concentrações destas são preferidos também por outras espécies de samambaias no estágio inicial de desenvolvimento gametofítico. Para *Platyterium bifurcatum* (Cav.) C. Chr. (Polypodiaceae), o meio MS com 25% da concentração original dos sais macronutrientes e sem sacarose foi o mais benéfico para a formação de gametófitos jovens, que tiveram seu crescimento inibido na presença de 30 g L⁻¹ desta fonte de carbono (Camloh & Gogala, 1992, Camloh, 1993). A mesma concentração de sacarose igualmente inibiu a germinação de esporos e o crescimento gametofítico de

Osmunda regalis L. (Osmundaceae) (Fernández *et al.*, 1997a). A espécie também teve o desenvolvimento inicial de gametófitos estimulado em baixa concentração de sais macronutrientes (25%). Ao contrário, quando os gametófitos foram cultivados em meios com 100 ou 50% da concentração de sais, os mesmos apresentaram necrose e seu crescimento cessou, o que foi atribuído à maior concentração de amônio presente nestes meios (Fernández *et al.*, 1997a). O amônio é uma fonte importante de nitrogênio para aqueles tecidos que possuem comportamento nutritivo heterotrófico durante o período em que não são capazes de suprir suas necessidades energéticas com o processo fotossintético (Whittier, 1989). A capacidade de formar e desenvolver gametófitos na ausência de sacarose indicou a autotrofia desse estágio de desenvolvimento em *C. atrovirens* no presente estudo. Sendo assim, estas estruturas não dependem da presença de amônio e o mesmo pode até vir a ser prejudicial para o estágio de desenvolvimento inicial. Também para *Adiantum reniforme* var. *sinense*, a concentração original de sais macronutrientes no meio MS associada a 45 ou 60 g L⁻¹ de sacarose não se mostrou benéfica para os gametófitos em estágio laminar, que formaram ramificações ao invés de seguir seu desenvolvimento morfológico esperado (Hua *et al.*, 2010) e dar origem a gametófitos cordiformes, típicos do próximo estágio de desenvolvimento. Ao contrário, gametófitos laminares típicos e em maior número foram obtidos em meio MS com 25% da concentração original de macronutrientes contendo 15 g L⁻¹ de sacarose (Hua *et al.*, 2010). Também no presente trabalho foram visualizados gametófitos laminares ramificados nos meios com 45 e 60 g L⁻¹ de sacarose, apontando para um efeito negativo da presença de altas concentrações deste carboidrato sobre este estágio de desenvolvimento de *C. atrovirens*.

Da mesma forma como para a germinação dos esporos, diferentes espécies de samambaias apresentam preferências diversas pela disponibilidade de nutrientes no meio de cultura também no estágio inicial de gametófitos. Ao contrário dos resultados obtidos para *Cyathea atrovirens*, o meio MS em sua formulação original de sais e contendo 20 g L⁻¹ de sacarose promoveu o aumento da massa seca de gametófitos de *Dicksonia sellowiana*, enquanto que na ausência de sacarose ou com 40 e 50 g L⁻¹ deste carboidrato, os gametófitos apresentaram menor massa seca (Renner & Randi, 2004). A redução da massa seca dos gametófitos em meio sem sacarose foi atribuída à deficiência em substâncias de reserva durante a germinação e os primeiros estádios do desenvolvimento gametofítico, em consequência de uma taxa fotossintética insuficiente aliada à respiração. Por sua vez, a adição de concentrações mais altas de sacarose ao meio, de 40 ou 50 g L⁻¹, torna o potencial osmótico mais negativo, o que pode levar à menor ou nenhuma absorção de água e conseqüentemente inibir o metabolismo dos gametófitos, reduzindo sua massa seca (Renner & Randi, 2004).

Os padrões de germinação dos esporos e do desenvolvimento inicial dos gametófitos laminares evidenciaram que as concentrações de 45 e 60 g L⁻¹ de sacarose, independentemente da concentração de sais macronutrientes do meio MS, bem como a concentração original destes sais, mesmo na ausência

de sacarose, foram restritivas ao estabelecimento de *Cyathea atrovirens*, de forma que a hipótese inicial não foi sustentada. Recomenda-se a utilização do meio MS com 25% da concentração original de sais macronutrientes e sem adição de sacarose para a etapa inicial do cultivo *in vitro* desta espécie. Futuros estudos deverão direcionar esforços para a avaliação do efeito da baixa pressão osmótica do meio de cultura sobre os estádios mais avançados do desenvolvimento de *C. atrovirens*.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Feevale pela infraestrutura disponibilizada e pelo apoio financeiro, bem como à Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pela bolsa de Iniciação Tecnológica e Inovação (PROBITI) concedida à primeira autora e à CAPES/PROSUP pela bolsa de Mestrado concedida à segunda autora.

Referências bibliográficas

- BRUM, F. M. R. & RANDI, A. M. 2006. Germination of spores and growth of gametophytes and sporophytes of *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Dryopteridaceae) after spore cryogenic storage. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 489-495.
- CAMLOH, M. & GOGALA, N. 1992. *In vitro* culture of *Platyserium bifurcatum* gametophytes. *Science Horticulture* 51: 343-346.
- CAMLOH, M. 1993. Spore germination and early gametophyte development of *Platyserium bifurcatum*. *American Fern Journal* 89: 79-85.
- CID, L.P.B. 2010. *Cultivo in vitro de plantas*. Brasília: EMBRAPA. 303 p.
- COX, J.; BHATIA, P. & ASHWATH, N. 2003. *In vitro* spore germination of the fern *Schizaea dichotoma*. *Scientia Horticulturae* 97: 369-378.
- FERNANDES, I. 1997. *Taxonomia e fitogeografia de Cyatheaceae e Dicksoniaceae nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil*. 435 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.
- FERNANDES, I. 2000. Taxonomia dos representantes de Dicksoniaceae no Brasil. *Pesquisas, Botânica* 50: 5-26.
- FERNÁNDEZ, H.; BERTRAND, A.M. & SÁNCHEZ-TAMÉS, R. 1996a. Influence of tissue culture conditions on apogamy in *Dryopteris affinis* sp. *affinis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 45: 93-97.
- FERNÁNDEZ, H.; BERTRAND, A.M. & SÁNCHEZ-TAMÉS, R. 1996b. Micropropagation and phase change in *Blechnum spicant* and *Pteris ensiformes*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 44: 261-265.
- FERNÁNDEZ, H.; BERTRAND, A.M. & SÁNCHEZ-TAMÉS, R. 1997a. Gemmation in cultured gametophytes of *Osmunda regalis*. *Plant Cell Reports* 16: 358-362.
- FERNÁNDEZ, H.; BERTRAND, A.M. & SÁNCHEZ-TAMÉS, R. 1997b. Plantlet regeneration in *Asplenium nidus* L. and *Pteris ensiformes* L. by homogenization of BA treated rhizomes. *Scientia Horticulturae* 68: 243-247.
- FERNÁNDEZ, H. & REVILLA, M.A. 2003. *In vitro* culture of ornamental ferns. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73: 1-13.

- HARDING, K.; BENSON, E. & CLACHER, K. 1997. Plant conservation biotechnology: An overview. *Agro-Food-Industry Hi-Tech* 8: 8-13.
- HUA, W.; XIU-QUN, L.; HUA, J. & LONG-QING, C. 2010. Effects of light, macronutrients, and sucrose on germination and development of the endangered fern *Adiantum reniforme* var. *sinense* (Adiantaceae). *Scientia Horticulturae* 125: 417-421.
- KHOO, S.I. & THOMAS, M.B. 1980. Studies on the germination of fern spores. *Plant Propagation* 26: 11-15.
- KNAUSS, J.F. 1976. A partial tissue culture method for pathogen-free propagation of selected ferns from spores. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 89: 363-365.
- LÊ, L. 1983. Essai de multiplication de *Nephrolepis exaltata* par culture *in vitro* de tissue gamétophytique. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture* 15: 189-192.
- MARCON, C.; SILVEIRA, T & DROSTE, A. 2014. Germination and gametophyte development of *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin (Cyatheaaceae) from spores stored at low temperatures. *Acta Scientiarum* 36: 403-410.
- MARQUEZ, G.J. & BRUSSA, C.A. 2011. First record of Cyatheaaceae in Uruguay. *American Fern Journal* 101: 205-205.
- MOHR, H. 1962. The influence of visible radiation on the germination of archegoniate spores and the growth of the fern protonema. *Botanical Journal of the Linnean Society* 58: 287-296.
- MORAN, R.C. 2008. Diversity, biogeography and floristics. In: RANKER, T.A.; HAUFLE, C.H. (Ed.). *Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes*. Cambridge, Cambridge University Press: 417-461.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- PAGE, C.M. 1979. Experimental aspects of fern ecology. In: DYER, A.F. *The experimental biology of ferns*. London, Academic Press: 552-581.
- PASQUAL, M.; HOSHIKA, E. & ISHIDA, J.S. 1994. Influência de diferentes concentrações de sacarose e sais minerais sobre a multiplicação *in vitro* de *Nephrolepis exaltata*, uma samambaia ornamental. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 29: 1681-1684.
- PRADO, J. & SYLVESTRE, L. Samambaias e Licófitas in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB128483>. Acesso em 28 Fev. 2015.
- PONCE, M. 1996. Pteridophyta. In: ZULOAGA, F.O.; MORRONE, O. (Ed.). *Catálogo de las plantas vasculares de Argentina I: Pteridophyta, Gymnospermae y Angiospermae* (Monocotyledoneae). Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden: 1-79.
- PRIMACK, R.B. & RODRIGUES, E. 2008. *Biologia da Conservação*. Londrina, Editora Planta. 323 p.
- RANAL, M. 1999. Effects of temperature on spore germination in some fern species from semideciduous mesophytic Forest. *American Fern Journal* 89: 149-158.
- RECHENMACHER, C.; SCHMITT, J.L. & DROSTE, A. 2010. Spore germination and gametophyte development of *Cyathea atrovirens* (Langsd. & Fisch.) Domin (Cyatheaaceae) under different pH conditions. *Brazilian Journal of Biology* 70: 1155-1160.
- RENNER, G.D.R. & RANDI, A.M. 2004. Effects of sucrose and irradiance on germination and early gametophyte growth of the endangered tree fern *Dicksonia sellowiana* Hook (Dicksoniaceae). *Acta Botanica Brasílica* 18: 375-380.
- SCHMITT, J.L. 2005. *Estudos florísticos, ecológicos e do desenvolvimento em Cyatheaaceae (Pteridophyta) no Rio Grande do Sul, Brasil*. 167 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biotecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

- SCHMITT, J.L. & WINDISCH, P.G. 2005. Aspectos ecológicos de *Alsophila setosa* Kaulf. (Cyatheaceae, Pteridophyta) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 19: 859-865.
- SCHMITT, J.L. & WINDISCH, P.G. 2012. Caudex growth and phenology of *Cyathea atrovirens* (Langsd. & Fisch.) Domin (Cyatheaceae) in secondary forest, southern Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 72: 397-405.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. (Ed.). 1998. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, ABCTP/Embrapa. 509 p.
- VARGAS, I.B. & DROSTE, A. 2014. *In vitro* propagation of *Cyathea atrovirens* (Cyatheaceae): spore storage and sterilization conditions. *Revista de Biologia Tropical* 62: 299-308.
- VIVIANI, D. & RANDI, A.M. 2008. Effects of pH, temperature and light on spore germination and growth analysis of young sporophytes of *Polypodium leptopteris* (Pteridophyta, Polypodiaceae). *Rodriguésia* 59: 751-760.
- WHITTIER, D.P. 1975. The influence of osmotic conditions on induced apogamy in *Pteridium* gametophytes. *Phytomorphology* 25: 246-249.
- WHITTIER, D.P. 1989. Effects of nitrogen source on spore germination and gametophyte growth of *Psilotum*. *Botanical Gazette* 151: 50-53.
- WINDISCH, P.G. 1992. *Pteridófitas da região norte-ocidental do Estado de São Paulo: guia para estudo e excursões*. 2ª ed. São José do Rio Preto, UNESP. 110p.
- WINDISCH, P.G. & SANTIAGO, A.C.P. Cyatheaceae in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB90866>>. Acesso em: 25 fev. 2015.