

DESENVOLVIMENTO INICIAL DE *LOMARIOCYCAS SCHOMBURGKII* (KLOTZSCH) GASPER & A.R. SM. (BLECHNACEAE) EM GRADIENTES DE pH, TEMPERATURA E FOTOPERÍODO

Catiuscia Marcon¹
Bianca Kussler de Oliveira²
Annette Droste³

Recebido em 26.02.2018; Aceito 11.04.2018

ABSTRACT

Lomariocycas schomburgkii (Klotzsch) Gasper & A.R. Sm. is a fern native to Brazil, occurring in the phytogeographical domains of the Amazon, the Cerrado and the Atlantic Forest. In the state of Rio Grande do Sul (RS), its occurrence is concentrated in the Campos de Cima da Serra. The aim of this study was to assess the influence of abiotic factors on spore germination and gametophyte development of *L. schomburgkii* *in vitro*. The spores were collected in the municipality of São Francisco de Paula (RS) and cultivated in liquid Meyer medium. Three experiments were performed: (a) pH values of 4, 5, 6 and 7; (b) temperatures of 10, 15, 20, 25 and 30°C; and (c) photoperiods of 6, 12, 18 and 24 hours of light and in the dark. Percentages of germination and of laminar and cordiform gametophytes were submitted to analysis of variance (ANOVA) and differences between averages were verified by the Duncan test, at 5% probability. The spores germinated in all pH conditions tested. Gametophyte development occurred more rapidly in acid pHs (4 to 6). The highest percentages of germination and of laminar gametophytes were observed in the cultures maintained at 25°C. The spores are positively photoblastic. Higher germination and more laminar gametophytes were observed at 12 hours of light. The results contribute to the knowledge of the initial stages of the life cycle of *L. schomburgkii* and provide data for *ex situ* cultivation, aiming to understand the physiological requirements of the gametophytes and to produce plants for conservation purposes.

Key-words: *Ex situ* cultivation. Ferns. Spore germination.

RESUMO

Lomariocycas schomburgkii (Klotzsch) Gasper & A.R. Sm. é uma samambaia nativa do Brasil, encontrada nos domínios fitogeográficos da Amazônia, do Cerrado e da Floresta Atlântica. No estado do Rio Grande do Sul (RS), sua ocorrência se concentra nos Campos de Cima da Serra. O objetivo do estudo foi avaliar a influência de determinados

1 Mestra em Qualidade Ambiental e Bolsista PROSUC/CAPES de Doutorado 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.

2 Bolsista de Iniciação Científica PROBITI/FAPERGS, Curso de Ciências Biológicas, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Universidade Feevale, ERS 239, 2755, CEP 93525-075, Novo Hamburgo, RS, Brasil. E-mail: biancakussler@gmail.com.

3 Doutora e Professora Titular 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.

fatores abióticos sobre a germinação de esporos e o desenvolvimento de gametófitos de *L. schomburgkii* *in vitro*. Os esporos foram coletados no município de São Francisco de Paula (RS) e cultivados em meio Meyer líquido. Três experimentos foram realizados: (a) valores de pH 4, 5, 6 e 7; (b) temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30°C; e (c) fotoperíodos de 6, 12, 18 e 24 horas luz e no escuro. As porcentagens de germinação e de gametófitos laminares e cordiformes foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre médias foram verificadas pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. Os esporos germinaram em todas as condições de pH testadas. O desenvolvimento gametofítico ocorreu de forma mais acelerada nos pHs ácidos (4 a 6). Nas culturas mantidas a 25°C, foram verificadas as maiores porcentagens de germinação e de gametófitos laminares. Os esporos são fotoblásticos positivos. Maior germinação e mais gametófitos laminares foram observados na presença de 12 horas luz. Os resultados contribuem para o conhecimento das etapas iniciais do ciclo de vida de *L. schomburgkii* e fornecem dados para o cultivo *ex situ*, visando à compreensão das exigências fisiológicas dos gametófitos e à produção de plantas para fins de conservação.

Palavras-chave: Cultivo *ex situ*. Germinação de esporos. Samambaias.

INTRODUÇÃO

Blechnaceae é uma família de samambaias de hábito comumente herbáceo terrestre, embora algumas sejam reofíticas, escandentes, arborescentes, epifíticas ou aquáticas (Rothfels *et al.*, 2012). Os rizomas são prostrados, ascendentes a eretos, os pecíolos apresentam numerosos feixes vasculares formando um anel, as folhas são monomórficas a dimórficas (Smith *et al.*, 2006), e os esporos são monoletes, reniformes, normalmente ornamentados, sem ou raramente com clorofila (Dittrich *et al.*, 2017). Esta família subcosmopolita é constituída por cerca de 267 espécies, distribuídas em dois centros de diversidade principais, os Neotrópicos e a Oceania/Austrália (para revisão, ver Gasper *et al.*, 2016). Com base na filogenia molecular, Blechnaceae é dividida em três sub-famílias: Woodwardioideae, Stenochlaenoideae e Blechnoideae (Gasper *et al.*, 2017).

Lomariocycas (J.Sm.) Gasper & A.R. Sm. (Blechnoideae), anteriormente tratado como uma seção de *Blechnum* L. (Morton, 1959), se caracteriza por plantas terrestres com cáudices eretos, folhas dimórficas, pecíolos robustos, longos, amarelados a castanho-escuros, com escamas semelhantes às dos rizomas na base, distalmente glabrosos ou escamosos, e soros lineares (para detalhes, ver Gasper *et al.*, 2016). São reconhecidas 19 espécies de *Lomariocycas* nos Neotrópicos, na África e em Madagascar, dentre as quais se encontra *Lomariocycas schomburgkii* (Klotzsch) Gasper & A.R. Sm. (Gasper *et al.*, 2016). Nativa do Brasil, esta espécie é encontrada nos domínios fitogeográficos da Amazônia, do Cerrado e da Floresta Atlântica (Dittrich & Gasper, 2017). No Rio Grande do Sul, os registros de sua ocorrência se concentram para os Campos de Cima da Serra (Specieslink, 2017).

A germinação de esporos e o estabelecimento de gametófitos são influenciados por vários fatores ambientais, como composição, aeração, drenagem e pH (potencial de hidrogênio) do substrato, grau de sombreamento, regularidade do suprimento de água, umidade do ar, temperatura, assim como tipo e duração da incidência luminosa (Miller, 1968; Page, 1979). Gametófitos de espécies tropicais são especialmente sensíveis a mudanças ambientais, sendo necessária a existência de micro-habitats adequados para seu estabelecimento, fato que também reflete no estabelecimento dos esporófitos (Page, 1979; Ranal, 1995).

A cultura *in vitro*, por fornecer um ambiente com condições controladas, permite a avaliação da influência de fatores abióticos sobre a germinação de esporos e o desenvolvimento inicial dos indivíduos, o que contribui para o entendimento das necessidades dos gametófitos no ambiente natural, considerando que a sua estrutura

morfológica parece altamente conservada entre ambientes *in vitro* e *in situ* (Farrar *et al.*, 2008).

No ambiente de ocorrência natural, o monitoramento das fases iniciais de desenvolvimento das samambaias é dificultado em função do prolongado período envolvido no processo e do diminuto tamanho das estruturas. Por isso, a maioria dos estudos com este grupo de plantas se concentra no entendimento da fase esporófitica. Em específico, para *L. schomburgkii*, os dados disponíveis estão restritos à sua distribuição (Rolleri & Prada, 2006; Rolleri *et al.*, 2008, 2013), discussão de sua posição sistemática (Gasper *et al.*, 2016, 2017) e à morfologia dos esporos (Nayar & Devi, 1964; Coelho & Esteves, 2008; Passarelli *et al.*, 2010). O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do pH do meio de cultura, da temperatura e do fotoperíodo sobre a germinação de esporos e o desenvolvimento de gametófitos de *L. schomburgkii*, com vistas a estabelecer protocolos de produção de plantas para sua conservação.

MATERIAL E MÉTODOS

Folhas férteis de *Lomariocycas schomburgkii* com esporângios em deiscência foram coletadas em março de 2015 no Parque Natural Municipal da Ronda, no município de São Francisco de Paula - RS (PNMR, 29°26'S, 50°32'W). Por meio da Lei Municipal 2425/2007, o parque foi instituído como Unidade de Conservação, abrangendo uma área de 1.200,00 ha (São Francisco de Paula, 2007) com uma matriz florestal e cerca de 60 ha de áreas abertas (zonas úmidas e campo usado para pastagem) (Franz *et al.*, 2014). A área está situada na região de Floresta Ombrófila Mista e possui elementos da Floresta Sazonal Semidecidual nas menores altitudes e encostas íngremes (Teixeira *et al.*, 1986). O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é do tipo "Cfb" (temperado úmido) (Peel *et al.*, 2007). O solo da região, de acordo com Streck *et al.* (2002), é classificado como cambissolo húmico alumínico, raso a profundo, associado com neossolo lítico, comum em áreas onde a alta pluviosidade e as baixas temperaturas facilitam o acúmulo de matéria orgânica.

Em laboratório, as folhas foram acondicionadas em bandejas e mantidas em temperatura ambiente ($25\pm 1^\circ\text{C}$) por aproximadamente 72 h para completar a deiscência dos esporângios. Os esporos foram filtrados em papel interfolhado (Melpaper®) e armazenados em tubos eppendorf a $7\pm 1^\circ\text{C}$ (Marcon *et al.*, 2014). Em câmara de fluxo laminar, os esporos passaram pelo processo de assepsia com hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% por 15 minutos antes da semeadura (adaptado de Vargas & Droste, 2014). Depois de remover o agente desinfestante, 1 mL de água destilada autoclavada foi adicionado para realizar o enxague dos esporos em cada tubo, e, na sequência, se realizou a centrifugação durante 3 minutos a 3000 rpm. O processo de lavagem e centrifugação ocorreu em quatro repetições. Posteriormente, amostras de 10 mg de esporos foram semeadas em frascos de vidro (capacidade 200 mL) contendo 30 mL de meio Meyer líquido (Meyer *et al.*, 1955) autoclavado e suplementado com nistatina (Sigma®) 50.000 U L^{-1} .

Foram realizados três experimentos independentes e consecutivos:

Experimento 1 – Condição de pH: os esporos foram semeados em meio de cultura com pH ajustado em: 4, 5, 6 e 7, sendo que, para cada valor de pH, foram preparadas três repetições, totalizando 12 frascos. As culturas foram acondicionadas em câmaras de germinação tipo BOD sob fotoperíodo de 12 h luz (lâmpadas fluorescentes de luz branca - luz do dia especial Philips T10), na temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$.

Experimento 2 – Temperatura: após semeadura dos esporos em meio com pH ajustado conforme resultado do experimento 1, as culturas foram mantidas em câmaras de germinação tipo BOD nas temperaturas de 10, 15, 20, 25 e $30\pm 1^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 12 h luz, sob intensidade luminosa de $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (lâmpadas fluorescentes de luz

branca - luz do dia especial Philips T10). Para cada temperatura avaliada, foram preparadas três repetições, totalizando 15 frascos.

Experimento 3 – Fotoperíodo: os frascos com os esporos foram acondicionados em câmaras de germinação tipo BOD no escuro, em 6, 12, 18 e 24 h luz (intensidade luminosa de $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, lâmpadas fluorescentes de luz branca - luz do dia especial Philips T10), com pH e temperatura ajustados conforme experimentos 1 e 2. Para cada fotoperíodo avaliado, foram utilizadas três repetições, totalizando 15 frascos.

Nos três experimentos, a posição dos frascos foi aleatoriamente modificada a cada sete dias. Aos sete, 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*, foi realizada a avaliação do efeito das condições abióticas sobre a germinação de esporos e a formação de gametófitos. Foi preparada uma lâmina microscópica da cultura de cada frasco e sob microscópio binocular (Nikon Eclipse E200, aumento de 400x), foram contados os 100 primeiros indivíduos visualizados (Viviani & Randi, 2008), dos quais foram registrados: o número total de indivíduos germinados, os gametófitos laminares e os gametófitos cordiformes (Rechenmacher *et al.*, 2010). Consideraram-se germinados os esporos que apresentavam emergência do clorócito ou do rizoide (Ranal, 1999).

Os dados foram expressos em porcentagem e analisados estatisticamente pelo programa SPSS versão 20. A normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias foram verificadas por meio dos testes de Shapiro-Wilk e de Levene, respectivamente. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo que diferenças entre médias foram verificadas pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. Análise de regressão quadrática foi aplicada para estimar a relação da temperatura e do fotoperíodo com a respectiva porcentagem de esporos germinados aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Não foi aplicada análise de regressão para o fator pH por terem sido testados apenas quatro valores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados indicaram que os pHs ácidos proporcionam maiores porcentagens de germinação dos esporos e de desenvolvimento dos gametófitos de *L. schomburgkii*. O pH ótimo para o cultivo de samambaias varia de acordo com a espécie, porém há uma preferência por ambientes com substratos com pH levemente ácido (Raghavan, 1980; Suo *et al.*, 2015). Na primeira análise realizada, após sete dias de cultivo, foi observado que em todos os pHs testados havia germinação de esporos, entre 22 e 31% (Tabela 1). Estes valores não apresentaram diferença significativa, mas nas culturas com pH 6, ocorreu a maior porcentagem de germinação (31,33%). Nesta primeira análise, também foi possível observar a formação de gametófitos laminares em todos os tratamentos (0,7 a 2,67%) (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem (média \pm desvio padrão) de esporos germinados (EG), gametófitos laminares (GL) e gametófitos cordiformes (GC) de *Lomariocycas schomburgkii* cultivados em meios de cultura com diferentes pHs. Letras iguais na linha indicam que os dados não diferem significativamente entre si, de acordo com teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Dias	Estádio	pH				F	p
		4	5	6	7		
7	EG	24,33 \pm 3,21 a	22,33 \pm 8,08 a	31,33 \pm 11,01 a	25,00 \pm 6,56 a	0,76	0,59
	GL	1,33 \pm 1,16 a	2,00 \pm 3,46 a	2,67 \pm 1,53 a	0,67 \pm 1,16 a	0,52	0,68
30	EG	56,33 \pm 5,13 a	49,67 \pm 4,16 ab	45,00 \pm 6,00 b	27,33 \pm 4,73 c	18,10	0,001
	GL	39,00 \pm 9,64 a	34,00 \pm 1,73 a	35,67 \pm 6,03 a	12,00 \pm 2,65 b	13,01	0,002
	GC	2,00 \pm 1,00 a	2,00 \pm 2,00 a	2,00 \pm 1,73 a	0,00 \pm 0,00 a	1,50	0,287
60	EG	76,33 \pm 4,73 a	72,00 \pm 2,65 a	71,00 \pm 1,00 a	34,33 \pm 4,16 b	95,99	<0,001
	GL	55,00 \pm 3,61 a	53,33 \pm 3,06 a	53,00 \pm 1,00 a	21,33 \pm 2,31 b	110,48	<0,001
	GC	9,33 \pm 3,22 a	11,33 \pm 0,58 a	9,67 \pm 2,08 a	1,33 \pm 2,31 b	11,82	0,003

Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, foi observado que no pH 7 houve a menor porcentagem de esporos germinados (27,33%) diferindo significativamente dos demais tratamentos (Tabela 1). A maior porcentagem de germinação foi observada no pH 4 (56,33%), a qual não diferiu significativamente do pH 5. Entre os pHs 4 e 6 foram observados 34 a 39% de gametófitos laminares, diferença significativa em relação à porcentagem no pH 7 (Tabela 1). Além disso, nos pHs ácidos, já foi possível verificar a ocorrência de gametófitos cordiformes, estágio mais avançado do desenvolvimento gametofítico. Aos 60 dias de cultivo, esta preferência por pHs mais ácidos se manteve, sendo que nos pHs 4 a 6 se verificou entre 71 e 76% de esporos germinados (Tabela 1). Esta diferença significativa em relação ao pH 7 também se confirmou tanto para gametófitos laminares, quanto para gametófitos cordiformes (Tabela 1).

Em estudos realizados com samambaias do gênero *Cyathea* Sm. (Cyatheaceae) ocorrentes no Rio Grande do Sul, os autores também observaram uma preferência por substratos com pHs ácidos. Rechenmacher *et al.* (2010) cultivaram por 12 dias *Cyathea atrovirens* (Langsd. & Fisch.) Domin e verificaram menor porcentagem de germinação no pH 7, bem como maior número de gametófitos laminares em pH 5 e 6,5. A germinação de esporos de *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin cultivados em meio de cultura com pH ajustado em 4 foi de 80% após 30 dias *in vitro*. Neste período, 52% dos gametófitos observados estavam em estágio laminar (Medeiros *et al.*, 2017). Para o cultivo de *Cyathea phalerata* Mart., após 60 dias de cultivo *in vitro*, os pHs ácidos (4 a 6) proporcionaram maiores porcentagens de germinação de esporos (entre 84 e 90%) do que o pH neutro (37%), assim como as maiores porcentagens de gametófitos laminares ocorreram nos pHs 5 e 6, aproximadamente 76% (Marcon *et al.*, 2017).

Na avaliação da influência da temperatura sobre o desenvolvimento inicial de *L. schomburgkii*, verificou-se que nas culturas mantidas a 10°C não houve germinação aos sete dias, enquanto que, nas culturas a 25°C, foram observados 43% de indivíduos germinados, o que gerou diferença significativa com todos os outros tratamentos. Somente a 20 e 25°C foram registrados indivíduos em estágio laminar, porém em 25°C foi observado valor significativamente superior (20,33%) (Tabela 2). De acordo com a literatura, as samambaias podem se adaptar a uma ampla gama de temperaturas. Porém, a germinação de esporos normalmente ocorre entre 20 e 30°C (Esteves, 2013), sendo que a temperatura de 25°C se mostrou ótima para 22 espécies (para revisão, veja Suo *et al.*, 2015).

Tabela 2. Porcentagem (média \pm desvio padrão) de esporos germinados (EG), gametófitos laminares (GL) e gametófitos cordiformes (GC) de *Lomariocycas schomburgkii* cultivados em diferentes temperaturas. Letras iguais na linha indicam que os dados não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Dias	Estádio	Temperatura					F	p
		10°C	15°C	20°C	25°	30°C		
7	EG	0,00 \pm 0,00 c	1,00 \pm 1,73 c	16,33 \pm 2,52 b	43,00 \pm 3,00 a	14,67 \pm 3,05 b	163,58	<0,001
	GL	0,00 \pm 0,00 c	0,00 \pm 0,00 c	3,67 \pm 2,31 b	20,33 \pm 2,52 a	0,00 \pm 0,00 c	100,19	<0,001
30	EG	14,33 \pm 2,52 e	32,00 \pm 4,36 d	68,33 \pm 2,89 b	76,00 \pm 4,52 a	49,33 \pm 7,87 c	144,89	<0,001
	GL	0,00 \pm 0,00 d	23,33 \pm 6,51 c	47,33 \pm 2,31 b	61,67 \pm 9,30 a	19,67 \pm 3,06 c	61,58	<0,001
	GC	0,00 \pm 0,00 b	0,00 \pm 0,00 b	0,00 \pm 0,00 b	1,00 \pm 1,00 a	0,00 \pm 0,00 b	3,00	<0,001
60	EG	24,67 \pm 5,13 e	43,67 \pm 7,37 d	74,67 \pm 1,53 b	85,00 \pm 1,73 a	58,33 \pm 5,51 c	74,81	<0,001
	GL	14,33 \pm 5,13 d	29,00 \pm 4,58 c	53,67 \pm 1,15 b	63,33 \pm 6,11 a	29,33 \pm 3,05 c	63,07	<0,001
	GC	0,00 \pm 0,00 d	2,33 \pm 0,58 c	8,00 \pm 1,00 b	10,67 \pm 2,08 a	0,00 \pm 0,00 d	62,88	<0,001

Aos 30 dias de cultivo, foi possível verificar germinação de esporos em todos os tratamentos, mas a preferência por 25°C se manteve. Neste momento, havia 76% de indivíduos germinados em 25°C, valor este significativamente superior do que os valores nas demais temperaturas (Tabela 2). Destaca-se que a menor porcentagem de

germinação foi observada nas culturas mantidas a 10°C (14,13%). Além disso, gametófitos laminares ainda não foram observados nesta temperatura. Em 25°C, 61,67% dos indivíduos estavam em estágio laminar, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Somente em 25°C, foi registrado o início do surgimento de gametófitos cordiformes (Tabela 2).

Resultados semelhantes foram observados aos 60 dias de cultivo *in vitro*, sendo registrado 85% de germinação de esporos nas culturas a 25°C, valor este significativamente superior que nos demais tratamentos (entre 24 e 74%) (Tabela 2). Esta relação entre a temperatura e a capacidade de germinação foi melhor explicada pela regressão quadrática (Figura 1A). Em 25°C, 63,33% dos indivíduos estavam em estágio laminar e 10,67%, em estágio cordiforme. Os demais tratamentos apresentaram valores significativamente inferiores, sendo a menor porcentagem de gametófitos laminares registrada nas culturas mantidas em 10°C (14,33%). Nas culturas a 10°C e 30°C, não foram observados gametófitos cordiformes (Tabela 2).

Assim como *L. schomburgkii*, outras espécies de samambaias apresentam preferência por temperaturas medianas para a germinação e o desenvolvimento gametofítico. Para *Blechnum appendiculatum* Willd. (Blechnaceae) cultivada também por este período, foi registrada taxa de germinação superior a 90% nas culturas mantidas entre 15 e 30°C, sendo que nas culturas a 35°C, não houve germinação (Juárez-Orozco *et al.*, 2013). Brum e Randi (2002) verificaram altas porcentagens de germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Dryopteridaceae), aproximadamente 97%, cultivada em 15, 20 e 25°C, enquanto que, a 30°C, esta foi reduzida. *C. phalerata* cultivada na temperatura de 25°C apresentou 83% de germinação dos esporos, 68% de gametófitos laminares e 8% de gametófitos cordiformes (Marcon *et al.*, 2017). Esporos de *C. corcovadensis* cultivados a 23°C apresentaram maior porcentagem de germinação (95%) e aqueles acondicionados a 26°C, as maiores porcentagens de gametófitos laminares (62%) (Medeiros *et al.*, 2017).

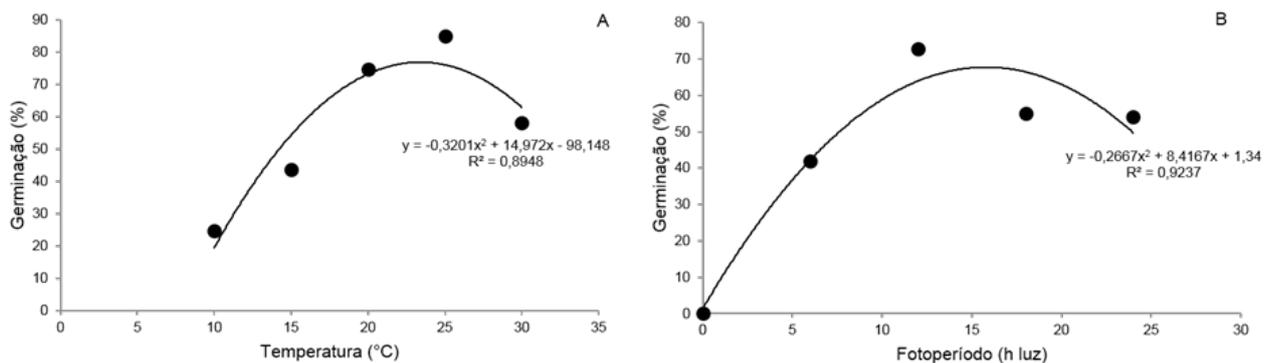


Figura 1. Relação da germinação de esporos de *Lomariocycas schomburgkii* com (A) temperatura ($F=38,763$; $p<0,001$) e (B) fotoperíodo ($F=61,808$; $p<0,001$) aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Pontos representam a porcentagem média de germinação em cada tratamento.

Os esporos de *L. schomburgkii* não germinaram na ausência de luz, o que indica que são fotoblásticos positivos, assim como os esporos da maioria das espécies de samambaias (Miller, 1968; Esteves & Felipe 1985), dentre elas *Blechnum appendiculatum* (Juárez-Orozco *et al.*, 2013). A necessidade de luz para iniciar o processo de germinação sugere que somente os esporos expostos na superfície do solo germinariam, como já descrito para *C. atrovirens* e *Alsophila setosa* Kaulf. (Cyatheaceae) (Azevedo *et al.*, 2008).

Na presença de luz, independentemente do tempo de exposição à luminosidade, se pode observar germinação de esporos e desenvolvimento de gametófitos. Isto está relacionado com o fato da luz ser considerada o principal estímulo para a quebra de

dormência dos esporos (Esteves & Felipe, 1985) e por promover a germinação de esporos por meio de uma resposta de baixa fluência (LRF) mediada pelo sistema fitocromo (Sugai & Furuya, 1968; Miller, 1968; Furuya, 1985; Raghavan, 1993). Aos sete dias de cultivo *in vitro*, foi verificado que nas culturas mantidas a 6 e 12 horas luz, 29 e 35,33% dos esporos haviam germinado, diferindo significativamente dos demais tratamentos com luz. Além disso, nos tratamentos de 6 e 12 horas luz, já foi possível observar indivíduos em estágio laminar (Tabela 3).

Aos 30 dias de cultivo, os frascos mantidos na presença de luz apresentaram entre 31 e 35% de esporos germinados, sem diferirem significativamente entre si (Tabela 3). Contudo, nas culturas expostas a 12 horas luz, 29,33% dos indivíduos eram gametófitos laminares, valor significativamente superior em relação aos demais tratamentos (entre 8 e 15%) (Tabela 3). Neste período, pode-se observar o início da formação de gametófitos cordiformes. Na avaliação aos 60 dias de cultivo, foi constatado que no fotoperíodo de 12 horas luz havia 72,67% de esporos germinados (Tabela 3), valor significativamente superior às demais porcentagens, relação esta comprovada pela regressão quadrática (Figura 1B). Nas culturas acondicionadas a 6 horas luz foi observado o menor valor de germinação (42%) (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem (média±desvio padrão) de esporos germinados (EG), gametófitos laminares (GL) e gametófitos cordiformes (GC) de *Lomariocycas schomburgkii* cultivados em diferentes fotoperíodos. Letras iguais na linha indicam que os dados não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Dia	Estádio	Fotoperíodo					F	p
		0h	6h	12h	18h	24h		
7	EG	0,00±0,00 c	29,00±7,00 a	35,33±1,15 a	19,00±1,73 b	14,33±5,67 b	32,75	<0,001
	GL	0,00±0,00 b	0,33±0,58 b	1,67±0,58 a	0,00±0,00 b	0,00±0,00 b	3,00	0,072
30	EG	0,00±0,00 b	33,67±7,77 a	34,33±17,90 a	35,00±4,58 a	31,00±4,58 a	55,83	<0,001
	GL	0,00±0,00 c	10,67±9,87 bc	29,33±5,13 a	8,67±3,22 bc	14,67±7,57 b	9,06	0,002
60	EG	0,00±0,00 d	42,00±4,58 c	72,67±4,16 a	55,00±4,36 b	54,00±1,73 b	185,23	< 0,001
	GL	0,00±0,00 d	27,33±3,79 c	57,67±4,93 a	36,67±3,78 b	39,33±3,22 b	105,39	< 0,001

Em relação ao desenvolvimento gametofítico aos 60 dias, a preferência por 12 horas luz também foi demonstrada, sendo possível observar 57,67% de gametófitos laminares, diferindo significativamente dos demais fotoperíodos, que apresentaram entre 27 e 39% (Tabela 3). Em todos os tratamentos com exposição à luz, foi possível observar a formação de 4 e 12% de gametófitos cordiformes. Neste período, ainda não foram observados gametângios.

A influência do fotoperíodo também foi testada para *Cyathea atrovirens* (Marcon *et al.*, 2015), *C. phalerata* (Marcon *et al.*, 2017) e *C. corcovadensis* (Medeiros *et al.*, 2017), sendo possível observar germinação de esporos e desenvolvimento gametofítico independentemente do número de horas de exposição, assim como para *L. schomburgkii*. No presente estudo, nos fotoperíodos de 6, 18 e 24 horas luz, foram observadas as menores porcentagens de germinação, bem como de gametófitos laminares. Para *C. phalerata* (Marcon *et al.*, 2017) e *C. corcovadensis* (Medeiros *et al.*, 2017), as menores porcentagens foram registradas quando do cultivo em 24 horas luz. Este fato deve ter ocorrido em função da necessidade de intercalação de períodos de presença e ausência de luz, tal como ocorre no ambiente natural.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os processos de antropização vêm gerando ambientes com condições naturais alteradas e, conseqüentemente, com condições desfavoráveis para o desenvolvimento de diversos grupos vegetais, assim como para as samambaias, pois o estabelecimento do

esporófito é fortemente limitado à existência de micro-habitats adequados aos gametófitos (Page, 1979; Nondorf *et al.*, 2003).

Os dados obtidos no presente estudo comprovam que é possível cultivar *L. schomburgkii in vitro*, sendo que, para tal, recomenda-se ajustar o pH do meio de cultura em 6 e acondicionar as culturas em temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas luz. Além disso, com estes dados, se faz possível iniciar novos estudos com a espécie, visando à compreensão de outros fatores que influenciem no cultivo *ex situ*, para obtenção de um protocolo de cultivo para produção de plantas com fins de conservação da espécie.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à Universidade Feevale pela infraestrutura disponibilizada, bem como à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROSUP) pela bolsa de Doutorado concedida à primeira autora, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pela Bolsa de Iniciação Tecnológica e Inovação da segunda autora. Os autores, agradecem também ao Dr. Vinícius Leão da Silva pelo auxílio na identificação da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, F.; DROSTE, A. & WINDISCH, P. 2008. Aspectos da germinação de esporos e desenvolvimento da fase gametofítica de *Alsophila setosa* Kaulf. e *Cyathea atrovirens* Langsd. & Fisch.) Domin (Cyatheaceae). *Pesquisas, Botânica* 59: 223-236.
- BRUM, F.R. & RANDI, A.M. 2002. High irradiance and temperature inhibit the germination of the spores in the fern *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Dryopteridaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 25(4): 391-396.
- COELHO, C.B. & ESTEVES L.M. 2008. Morfologia de esporos de pteridófitas do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (São Paulo, Brasil) Família: 2-Blechnaceae. *Hoehnea* 35(3): 387-393.
- DITTRICH, V.A.O. & GASPER, A.L. 2017. *Blechnaceae in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB602593>. Acesso em 20 jun. 2017.
- DITTRICH, A.V.O.; SALINO, A.; MONTEIRO, R. & GASPER, A.L. 2017. The family Blechnaceae (Polypodiopsida) in Brazil: key to the genera and taxonomic treatment of *Austroblechnum*, *Cranfillia*, *Lomaridium*, *Neoblechnum* and *Telmatoblechnum* for southern and southeastern Brazil. *Phytotaxa* 303(1): 001–033.
- ESTEVES, L. 2013. Banco de esporos de samambaias e licófitas: uma revisão. *Anuário do Instituto de Geociências* 36(1): 72-79.
- ESTEVES, L.M. & FELIPPE, G.M. 1985. Fotossensibilidade de esporos de pteridófitas dos cerrados. *Revista Brasileira de Botânica* 8: 219-222.
- FARAR, D.R.; DASSLER, C.; WATKINS Jr, J.E. & SKELTON, C.I. 2008. Gametophyte Ecology. In: RANKER, T.A.; HAUFLER, C.H. (eds.). *Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes*. New York, Cambridge University Press.
- FRANZ, I.; BARROS, M.P.; CAPPELATTI, L.; DALA-CORTE, R.B. & OTT, P.H. 2014. Birds of two protected areas in the southern range of the Brazilian Araucaria Forest. *Papéis Avulsos de Zoologia* 54(10): 111-127.
- FURUYA, M. 1985. Photocontrol of spore germination and elementary process of development in fern gametophytes. *Proceedings of the Royal Society of London* 86: 13-19.
- GASPER, A.L.; DITTRICH, V.A.O.; SMITH, A.R. & SALINO, A. 2016. A classification for Blechnaceae (Polypodiales: Polypodiopsida): New genera, resurrected names, and combinations. *Phytotaxa* 275(3): 191–227.
- GASPER, A.L.; ALMEIDA, T.E.; DITTRICH, V.A.O.; SMITH, A.R. & SALINO, A. 2017. Molecular phylogeny of the fern family Blechnaceae (Polypodiales) with a revised genus-level treatment. *Cladistics* 33(3): 429-446.

- JUÁREZ-OROZCO, S.; OROZCO-SEGOVIA, A.; MENDOZA-RUIZ, A. & PÉREZ-GARCÍA, B. 2013. Spore germination of eight homosporous ferns in a temperature gradient. *South African Journal of Botany* 87: 112-117.
- MARCON, C.; SILVEIRA, T. & DROSTE, A. 2014. Germination and gametophyte development of *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin (Cyatheaceae) from spores stored at low temperatures. *Acta Scientiarum - Biological Sciences* 36(4): 403-410.
- MARCON, C.; SILVEIRA, T.; BENDER, D. & DROSTE, A. 2015. Germinação de esporos e desenvolvimento gametofítico de *Cyathea atrovirens* (Langsd. et Fisch.) Domin (Cyatheaceae) em diferentes temperaturas e fotoperíodos. *Ambiência* 11(2): 409-422.
- MARCON, C.; SILVEIRA, T.; SCHMITT, J.L. & DROSTE, A. 2017. Abiotic environmental conditions for germination and development of gametophytes of *Cyathea phalerata* Mart. (Cyatheaceae). *Acta Botanica Brasílica* 31(1): 58-67.
- MEDEIROS, L.G.; MARCON, C.; SILVEIRA, T.; SCHMITT, J.L. & DROSTE, A. 2017. Looking for the conservation and sustainable use of *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin (Cyatheaceae): the influence of environmental factors on gametophytes. *Brazilian Journal of Botany* 40(1): 13-20.
- MEYER, B.S.; ANDERSON, D.B. & SWANSON, C.A. 1955. *Laboratory Plant Physiology*. New York, Van Nostrand.
- MILLER, J.H. 1968. Fern gametophytes as experimental material. *Botanical Review* 34: 361-440.
- MORTON, C.V. 1959. The identification of a Costa Rican - *Blechnum*. *American Fern Journal* 49: 66-69.
- NAYAR, B.K. & DEVI, S. 1964. Spore morphology of Indian ferns, 2 - Aspleniaceae and Blechnaceae. *Grana Palynologica* 5(2): 222-246.
- NONDORF, S.L.; DOOLEY, M.A.; PALMIERI, M. & SWATZELL, L.J. 2003. The effects of pH, temperature, light intensity, light quality, and moisture levels on spore germination in *Cheilanthes feei* of Southeast Missouri. *American Fern Journal* 93: 56-69.
- PAGE, C.N. 1979. The diversity of ferns: an ecological perspective. In: DYER, A.F. (ed.). *The experimental biology of ferns*. London, Academic Press.
- PASSARELLI, L.M.; GABRIEL Y GALÁN, J.M.; PRADA, C. & ROLLERI, C.H. 2010. Spore morphology and ornamentation in the genus *Blechnum* (Blechnaceae). *Grana* 49: 243-262.
- PEEL, M.C.; FINLAYSON, B.L. & MCMAHON, T.A. 2007. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences* 11: 1633-1644.
- RAGHAVAN, V. 1980. Cytology, physiology, and biochemistry of germination of fern spores. *International Review of Cytology* 62: 69-118.
- RAGHAVAN, V. 1993. Cellular and molecular biology of fern haplophase development. *Journal of Plant Research* (Special Issue) 3: 59-73.
- RANAL, M.A. 1995. Estabelecimento de pteridofitas em mata mesófila semidécidua do estado de São Paulo. 2. Natureza dos substratos. *Revista Brasileira de Biologia* 55: 583-594.
- RANAL, M. A. 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 (Cyatheaceae) under different pH conditions. *Brazilian Journal of Biology* 70: 1155-1160.
- ROLLERI, C.H. & PRADA C. 2006. Catálogo de las especies de *Blechnum* L. (Blechnaceae, Pteridophyta) de Mesoamérica y Sudamérica. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 63(1): 67-106.
- ROLLERI, C.H.; PRADA, C. & PASSARELLI, L.M. 2008. Estudos morfológicos y taxonómicos en *Blechnum* (Blechnaceae-Pteridophyta): *B. tabulare* y *B. magellanicum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 65(2): 179-195.
- ROLLERI, C.H.; PRADA, C.; GABRIEL Y GALÁN, J.M & PASSARELLI, L.M. 2013. Especies arborescentes del género *Blechnum* (Blechnaceae: Pteridophyta). *Revista de Biología Tropical* 61(1): 377-408.
- ROTHFELS, C.J.; SUNDUE, M.A.; KUO, L.; LARSSON, A.; KATO, M.; SCHUETTPELZ, E. & PRYER, K. 2012. A revised family-level classification for eupolypod II ferns (Polypodiidae: Polypodiales). *Taxon* 61(3): 515-533.

- SÃO FRANCISCO DE PAULA. Lei Municipal nº 2425 de 27 de março de 2007. Cria o Parque Municipal da Ronda. Disponível em: <http://www.sema.rs.gov.br/upload/arquivos/201703/28150614-cria-pnm-ronda-2425-2007.pdf>. Acesso em 20 jun. 2017.
- SMITH, A.R.; PRYER, K.M.; SCHUETTPELZ, E.; KORALL, P.; SCHNEIDER, H.; WOLF, P.G. 2006. A classification for extant ferns. *Taxon* 55: 705-731.
- SPECIESLINK – Base de dados. Disponível em: <http://www.splink.org.br/index?lang=pt>. Acesso em 20 jul. 2017.
- STRECK, E.V.; KÄMPF, N.; DALMOLIN, R.S.D.; KLAMT, E.; NASCIMENTO, P.C. & SCHNEIDER, P. 2002. *Solos do Rio Grande do Sul*. 1ª ed. Porto Alegre, UFRGS.
- SUGAI, M. & FURUYA, M. 1968. Photomorphogenesis in *Pteris vittata*. II. Recovery from blue-light-induced inhibition of spore germination. *Plant Cell Physiology* 9: 671-680.
- SUO, J.; CHEN, S.; ZHAO, Q.; SHI, L. & DAI, S. 2015. Fern spore germination in response to environmental factors. *Frontiers in Biology* 10(4): 358-376.
- TEIXEIRA, M.B.; COURA-NETO, A.B.; PASTORE, U. & RANGEL-FILHO, A.L.R. 1986. Vegetação. In: *Levantamento de recursos naturais*. vol. 33. Rio de Janeiro, IBGE.
- VARGAS, I.B. & DROSTE, A. 2014. *In vitro* propagation of *Cyathea atrovirens* (Cyatheaceae): spore storage and sterilization conditions. *Revista de Biología Tropical* 62(1): 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 lepidopteris* (Pteridophyta, Polypodiaceae). *Rodriguésia* 59: 751-760.