

EFEITO DA SACAROSE NA MORFOGÊNESE DOS GAMETÓFITOS DE *Pecluma ptilodon* (KUNZE) PRICE (POLYPODIACEAE) *IN VITRO*

SUCROSE EFFECT ON *IN VITRO* GAMETOPHYTES MORPHOGENESIS OF *Pecluma ptilodon* (KUNZE) PRICE (POLYPODIACEAE)

MARIA AUCILENE DE LIMA ROCHA¹, LUCIA HELENA SOARES E SILVA²,
JOSÉ GETÚLIO DA SILVA FILHO³, ANTONIO CARLOS TORRES^{4*}

¹Bióloga – MSc em Botânica – Departamento de Botânica – Universidade de Brasília – C.P. 4.457 – CEP 709190-970 – Brasília, DF – E-mail: aucilene.lima@hotmail.com

²Bióloga – Dr. em Botânica – Departamento de Botânica – Universidade de Brasília – C.P. 4.457 – CEP 709190-970 – Brasília, DF – E-mail: Isoares@unb.br

³Engenheiro Agrônomo – MSc Botânica – Embrapa Hortaliças – C.P. 218 – CEP 70359-970 – Brasília, DF – E-mail: jgetulio@cnph.embrapa.br

^{4*}Engenheiro Agrônomo – Embrapa Hortaliças – C.P. 218 – CEP 70359-970 – Brasília, DF – Autor para correspondência – E-mail: antonioctorres@hotmail.com

ABSTRACT

The development of gametophyte of *Pecluma ptilodon* (Kunze) Price was described from *in vitro* spores germination. Fertile fronds were collected from plants growing in gallery forest, in the right margin of the river Couros, in the Portal da Chapada, in Alto Paraíso, GO. The fronds were placed in plastic bags and frictionated for spores release. The spores were disinfested with 0.8% sodium hypochlorite solution, for 20 minutes, inoculated in medium containing macro and micronutrients MS and vitamins, supplemented with sucrose (0.0; 1.0; 2.0; 3.0 and 4.0%). The cultures were maintained in growth chamber with 16-hr daily exposure to 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photon flux density illumination from fluorescent lamps. Spores germination occurred from 12 to 15 days after inoculation, showing *Vittaria* pattern, and the development of the prothallium follow the *Aspidium* type. The young prothallium is spatulated and ovalated in shape and reached the heart-shaped morphology after 65 day of germination, showing trichomes differentiation and leptosporangiated gametophytes. Gametangia are classified as leptosporangiate ferns type.

Index terms: Spores, *in vitro* culture, prothallium development.

RESUMO

Foi descrito o desenvolvimento do gametófito de *Pecluma ptilodon* (Kunze) Price, a partir da germinação *in vitro* dos esporos. As frondes férteis foram coletadas de plantas desenvolvendo-se em Mata de Galeria, na margem direita do rio dos Couros no Portal da Chapada em Alto Paraíso, GO. As frondes foram colocadas em sacos plásticos e friccionadas para a retirada dos esporos. Os esporos foram desinfestados com hipoclorito de sódio a 0,8%, por 20 minutos e inoculados em meio de cultura contendo macro e micronutrientes MS e vitaminas, suplementado com sacarose (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0%). As culturas foram mantidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 h, densidade de fluxo de fótons de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por

lâmpadas fluorescentes. A germinação dos esporos ocorreu entre 12 e 15 dias da inoculação, apresentando-se como do tipo *Vittaria* e o desenvolvimento do protalo do tipo *Aspidium*. Os protalos jovens eram espatulados a ovalados e alcançaram a forma cordiforme, após 65 dias da germinação, com a diferenciação de tricomas e gametângios. Os gametângios são típicos das samambaias leptosporangiadas.

Termos para indexação: Esporos, cultura *in vitro*, desenvolvimento do protalo

INTRODUÇÃO

A família Polypodiaceae é formada por ca. 56 gêneros e ca. 1200 espécies de distribuição pantropical (SMITH, 2006). Entretanto, outros autores (TRYON; TRYON, 1982; MORAN, 1995; LABIAK, 2005) consideram, para essa família, como composta de, aproximadamente, 40 gêneros e 600 espécies. No Distrito Federal, está representada por seis gêneros (*Campyloneurum*, *Microgramma*, *Pecluma*, *Phlebodium*, *Pleopeltis* e *Polypodium*), treze espécies e uma variedade (LABIAK, 2005).

O gênero *Pecluma* possui cerca de 30 espécies, com distribuição restrita à região Neotropical, sendo no Distrito Federal representado por duas espécies de hábito epifítico ou terrestre, ocorrente nas Matas de Galeria (LABIAK, 2005). A espécie *P. ptilodon* (Kunze) Price possui caule horizontal curto a longo-reptante, com escamas

(Recebido em 4 de agosto de 2009 e aprovado em 13 de janeiro de 2011)

castanhas e brilhantes, frondes com tamanho entre 100-130 x 10-18cm, pecíolos cilíndricos, negros, com tricomas castanhos e lâminas pectinadas, lanceoladas, conspicuamente reduzidas em direção à base (LABIAK, 2005).

A morfogênese dos gametófitos de *P. ptilodon* é desconhecida. Existem alguns trabalhos referentes à fase gametofítica de outras espécies da família Polypodiaceae, para o México, tais como: *Polypodium lepidotrichum* (Fée) Maxon (JARAMILLO; PÉREZ-GARCÍA, 1994); *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger (JARAMILLO et al., 1996); *Microgramma nitida* (RAMÍREZ; PÉREZ-GARCÍA, 1998); *Phlebodium araneosum* (M. Martens and Galeotti) Mickel and Beitel, *P. pseudoaureum* (Cav.) Lellinger e *P. decumanum* (Willd.) J. Sm. (PÉREZ-GARCIA et al., 1998) e *Pleopeltis astrolepis*, *P. crassinervata*, *P. macrocarpa*, *P. polylepis*, *P. revoluta*, *P. angusta* e *P. mexicana* (JARAMILLO et al., 2003); *Microgramma lycopodioides* e *M. piloselloides* (MENDOZA-RUIZ; PÉREZ-GARCÍA, 2005).

A cultura *in vitro* de espécies de pteridófitas é uma estratégia que possibilita o estudo das fases de desenvolvimento do vegetal, desde o gametófito até a formação de esporófito bem como, permite a multiplicação de genótipos de interesse ornamental e medicinal, e também para a manutenção e conservação das espécies sujeitas à extinção.

Conduziu-se este trabalho, com objetivo de estudar os estádios morfogenéticos da fase sexual de *Pecluma ptilodon*, a partir da germinação dos esporos cultivados em meio com sacarose e sem sacarose.

MATERIAL E MÉTODOS

As frondes férteis de *P. ptilodon* foram coletadas na Mata de Galeria do rio dos Couros no Portal da Chapada, Alto Paraíso, GO e acondicionadas em sacos plásticos para transporte até o laboratório. O material foi disposto sobre folha de papel para secagem, à temperatura ambiente. Após a secagem, as frondes foram colocadas em sacos plásticos e, os mesmos, agitados manualmente para propiciar a

abertura dos esporângios e a liberação dos esporos. Em seguida, os esporos foram depositados sobre folha de papel, recolhidos e passados em duas peneiras com poros de 0,25mm e 0,037mm, respectivamente, para separar os esporos de fragmentos de esporângios e dos demais tecidos das frondes.

A obtenção de esporos para o cultivo *in vitro* baseou-se nos métodos descrito por Knaus (1976) e Somers et al. (2010), com modificações. Os esporos obtidos foram colocados em tubos Eppendorf e desinfestados com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,8% v/v por 20 minutos e, em seguida, centrifugados a 10 mil rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e os esporos, ressuspensos em água destilada autoclavada e submetidos à nova centrifugação. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. Finalizando a lavagem, os esporos foram ressuspensos, novamente, em água destilada autoclavada e inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 0,7% de ágar e, em mg.L⁻¹: i-inositol, 100; glicina, 2,0; tiamina.HCl, 1,0; piridoxina.HCl, 0,5; e ácido nicotínico, 0,5. A esse meio foram adicionadas diferentes concentrações de sacarose (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0%). O pH dos meios foi ajustado para 5,7.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 3 repetições. Cada repetição consistiu de uma placa de Petri, com 30 ml de meio, inoculada com 1 ml da suspensão de esporos. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento com intensidade luminosa de 30 mmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 27±2°C, por um período de 240 dias.

Foi realizado teste para lipídio nos esporos da espécie, utilizando-se os corantes Sudan III e IV (JOHANSEN, 1940), para saber se os glóbulos amarelos observados eram realmente de gordura.

As observações foram semanais, momento em que as placas eram revisadas sob estereomicroscópio Zeiss. Uma vez selecionadas as estruturas a serem fotografadas, as placas eram abertas em capela de fluxo laminar, evitando a contaminação do restante do material. Porções do meio,

com os esporos em germinação, eram então removidas com o auxílio de um estilete e transportadas para uma lâmina de microscópio. As lâminas montadas com as estruturas eram analisadas em microscópio Olympus, modelo BH-2, em aumentos de 100 a 400x e, posteriormente, fotografadas com máquina Olympus modelo C-35AD-4, acoplada ao microscópio. A amostragem era feita semanalmente, por um período de 150 dias. Após esse período, as placas eram observadas, quinzenalmente, sob estereomicroscópio, até 240 dias após a inoculação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em laboratório, os esporos de *P. ptilodon* apresentaram baixa capacidade de germinação (Figura 1), variando de 0,27 a 1,1%. Houve uma relação quadrática decrescente entre a percentagem de germinação e as concentrações de sacarose testadas. O meio nutritivo sem sacarose apresentou maior percentagem de germinação em relação aos demais tratamentos (Figura 1). Esse crescimento, independente de sacarose, indica a autotrofia dessa espécie, quando cultivada *in vitro* e foi observado em *Osmunda regalis*, conforme relatado por Fernández e Revilla (2003). Resultados semelhantes foram obtidos por Renner e Randi (2004) em trabalho com *Dicksonia sellowiana* Hook. Nessa espécie maior percentagem de germinação de esporos ocorreu aos 14 dias após a inoculação, em meio mineral desprovido de sacarose; entretanto, aos 30 dias da inoculação dos esporos, a massa fresca dos gametófitos foi maior em meio com sacarose. Também, Sakamaki e Ino (2007) cultivaram com sucesso esporos *Thelypteris palustris* em meio sem sacarose. Entretanto, Somer et al. (2010) recomendam suplementação do meio MS com 2% de sacarose para germinação de esporos de *Adiantum capillus-veneris*, *Asplenium adiantum-nigrum*, *Ceterach officinarum*, *Davallia canariensis*, *Dryopteris dilatata*, *Dryopteris filix-mas*, *Polypodium cambricum* e *Dicksonia antarctica*. Após a germinação, os gametófitos são transferidos para meio MS sem sacarose.

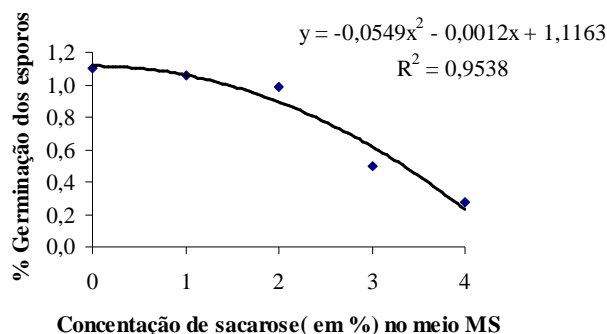


FIGURA 1 – Percentagem de germinação de esporos de *Pecluma ptilodon* (Kunze) Price em meio MS com diferentes concentrações de sacarose.

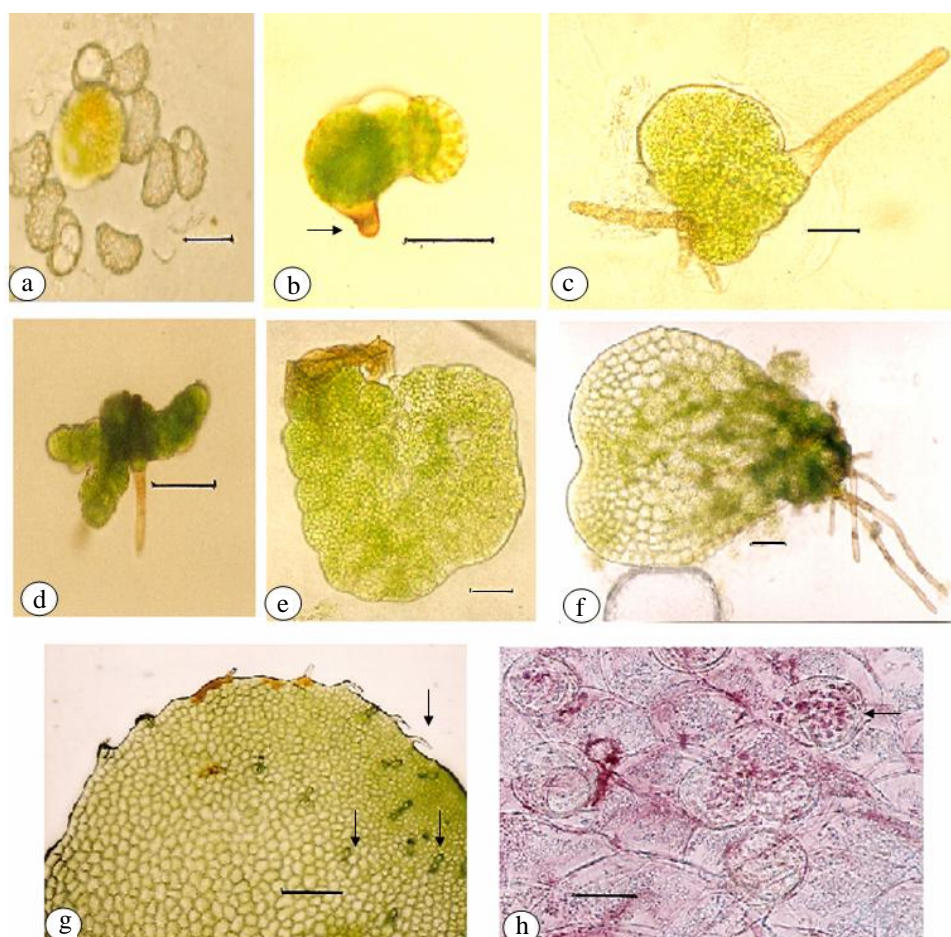
Os esporos maduros de *P. ptilodon* são reniformes, monoletes, medindo 45 a 50 μm de comprimento, com superfície rugosa (Figura 2). A germinação é do tipo *Vittaria* (Figuras 2, 3), conforme descrito para outras espécies da família Polypodiaceae (JARAMILLO & PÉREZ-GARCIA, 1994; PÉREZ-GARCÍA et al., 1998; RAMIREZ; PÉREZ-GARCÍA, 1998; JARAMILLO et al., 2003; MENDOZA-RUIZ; PÉREZ-GARCIA, 2005). Foi observada a presença de glóbulos de gordura, de coloração amarela, nos esporos (Figura 2), conforme descrito em outras Polypodiaceae (JARAMILLO; PÉREZ-GARCÍA, 1994; PÉREZ-GARCÍA et al., 1998). Possivelmente, essas substâncias de reserva propiciaram maior percentagem de germinação em meio sem sacarose.

Observou-se que a germinação dos esporos de *P. ptilodon* inicia-se no período entre o 12º e 15º dia após a inoculação. Esse resultado está em consonância com o relatado em germinação de esporos de *in vitro* outras espécies de Polypodiaceae, tais como: *Polypodium lepidotrichum* (Fée) Maxon, 14 dias após a inoculação (JARAMILLO; PÉREZ-GARCÍA 1994); em sete espécies de *Pleopeltis*, 7 a 12 dias (JARAMILLO et al. 2003) e em três espécies de *Phlebodium*, 7 a 15 dias (PÉREZ-GARCIA et al., 1998).

A morfogênese dos gametófitos de *P. ptilodon* apresenta um padrão definido de divisões celulares. A primeira divisão da célula esporica é assimétrica, resultando

em duas células de tamanhos diferentes (Figura 3): a célula distal (inicial protalial) de maior dimensão e a célula proximal, menor, que originará o rizóide. O rizóide emerge como uma protuberância transparente, apresentando na região apical coloração pardo-escura (Figura 3). Nesse estágio, estabelece-se o padrão axial (apical-basal) de ordenamento das divisões celulares. A célula distal (inicial protática) divide-se, perpendicularmente, à primeira divisão. Sucessivas divisões anticlinais, periclinais e oblíquas originam o filamento germinativo, composto de 2 a 4 células

(Figura 3). As células apicais desse filamento formam um meristema pluricelular, levando a formação da lâmina do protalo, estabelecendo-se o padrão radial de desenvolvimento (Figura 4). É comum, nessa espécie, observar o fenômeno da gemação que consiste em uma propagação vegetativa do filamento. Outros autores também observaram esse fenômeno em gametófito de *Osmunda regalis* (FERNÁNDEZ et al., 1997). Geralmente, esses filamentos germinativos são unidos pela base (Figura 5), conforme descrito por JARAMILLO et al., (2003), estudando *Pleopeltis* (Polypodiaceae). A



FIGURAS 2 – Morfogenese dos gametófitos de *Pecluma ptilodon* (Kunze) Price em meio desprovido de sacarose. 2 – Esporos maduros em germinação; 3 - Fase unidimensional mostrando divisões celulares da célula protática e desenvolvimento do rizóide (→); 4 - Fase bidimensional; 5 – gemação do protalo; 6 – diferenciação da lâmina; 7 – fase cordiforme; 8 – tricoma uni e bicelulares na margem e superfície do gametófito (↓); 9 – anterídios com anterozóides (←). Figuras 2a 5, 7 e 9, barra=50µm. Figuras 6 e 8, barra = 20µm.

diferenciação da fase laminar foi constatada a partir do 25º dia após a inoculação dos esporos (Figura 6), alcançando a forma ovalada à espatulada-cordiforme em torno de 45 a 67 dias (Figura 7).

A fase adulta caracteriza-se pelo término do crescimento do gametófito e início da formação dos gametângios, anterídios e arquegônios, concordando com os trabalhos de Jaramillo et al., (2000). Em *Pecluma*, essa fase foi observada entre os 67 e 145 dias depois da inoculação dos esporos. Os gametófitos, nessa fase, apresentaram forma cordiforme-espatulada a cordiforme-reniforme com zona meristemática bem definida (Figura 7). Nessa fase, observaram-se vários tricomas unicelulares e bicelulares na superfície e, em maior quantidade, na margem do gametófito (Figura 8), caracterizando o desenvolvimento do protalo do tipo *Aspidium*, conforme relatado por Nayar e Kaur (1971). Os arquegônios formam-se na região central-apical do gametófito. São constituídos de duas fileiras de células de coloração pardo-clara. Os anterídios, em geral, formam-se na região basal do gametófito, próximo aos rizoides com morfologia globosa e, no seu interior, encontram-se os anterozoides (Figura 9).

Até um período de 240 dias da inoculação, não foi observada a formação de esporófitos.

CONCLUSÕES

A germinação dos esporos de *Pecluma ptilodon* inicia-se entre 12 a 15 dias após a inoculação, em meio gelificado, composto de sais minerais MS e vitaminas.

A adição de sacarose não foi benéfica para a germinação dos esporos.

É comum observar a gemação dos gametófitos.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade concedida

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FERNÁNDEZ, H.; BERTRAND, A. M.; SÁNCHEZ-TAMÉS, R. *Gemmation in cultured gametophyte of*

Osmunda regalis. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.16, p.358-362, 1997.

FERNÁNDEZ, H.; REVILLA, M.A. *In vitro* culture of ornamental ferns. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 73, p. 1–13, 2003.

JARAMILLO, I.R.; PÉREZ-GARCIA, B. Morfología y estrategias reproductivas del gametofito de *Polypodium lepidotrichum* (Fée) Maxon (Polypodiaceae). **Acta Botânica Mexicana**, Michoacán, v. 28, p.71-78, 1994.

JARAMILLO, I.R.; PÉREZ-GARCIA, B.; MENDOZA-RUIZ, A.M. Desarrollo del gametofito y del esporofito joven de *Niphidium crassifolium* (Filicales: Polypodiaceae s. str.) **Revista de Biología Tropical**, San José, v.44, p.485-490, 1996.

JARAMILLO, I.R.; PÉREZ-GARCIA, B.; MENDOZA-RUIZ, A.M. Fase gametofítica del helecho *Llavea cordifolia* (Pteridaceae). **Revista de Biología Tropical**, San José, v.48, p.19-23, 2000.

JARAMILLO, I.R.; PÉREZ-GARCIA, B.; MENDOZA-RUIZ, A.M. Morfogénesis de los gametofitos de especies mexicanas de *Pleopeltis* (Polypodiaceae, subfamilia Pleopeltoideae). **Revista de Biología Tropical**, San José, v.51, p.321-332, 2003.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-hill Book Company Inc. 1940. 523p.

KNAUS, J.F. A partial tissue culture method for pathogen-free propagation of selected ferns from spores. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Gainesville, v.89, p.363-365. 1976.

LABIAK, P.H. Polypodiaceae. In: CAVALCANTI, T.B. ; RAMOS, A.E. (Ed.). **Flora do Distrito Federal**, Brasília, v.4, p.159-181, 2005.

MENDOZA-RUIZ, A.M.; PÉREZ-GARCIA, B. Análisis comparativo de la fase sexual de dos especies de *Microgramma* (Polypodiaceae, Pleopeltoideae). **Acta Botânica Mexicana**, Michoacán, v.71, p.1-10, 2005.

MORAN, R. C. Polypodiaceae. In: MORAN, R.C.; RIBA, R. (Ed.). **Flora Mesoamericana: Psilotaceae a Salviniaceae**, Cidade do México, v.1, p.333-366, 1995.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NAYAR, B.K.; KAUR, S. Gametophytes of homosporous ferns. **Botanical Review**, New York, v.37, p.350-351, 1971.
- PÉREZ-GARCIA, B. et al. Compared gametophytic development of three species of *Phlebodium* (Polypodiaceae, s. str.). **Revista Biologia Tropical**, San José, v.46, p.1059-1067, 1998.
- RAMÍRES, R.; PÉREZ-GARCIA, B. Fase gametofítica del helecho *Microgramma nítida* (Polypodiaceae). **Revista Biologia Tropical**, San José, v.46, p.1-7, 1998.
- RENNER, G.D.R.; RANDI, A.M. Effects of sucrose and irradiance on germination and early gametophyte growth of the endangered tree fern *Dicksonia sellowiana* Hook (Dicksoniaceae). **Acta Botanica Brasílica**, São Paulo, v.18, p. 375-380, 2004.
- SAKAMAKI, Y.; INO, Y. Gametophyte contribution to sporophyte growth on the basis of carbon gain in the fern *Thelypteris palustris*: effect of gametophyte organic-matter production on sporophytes. **Journal of Plant Research**, Japan, v. 120, p. 301-308, 2007.
- SMITH, A.R. et al. Ferns classification. **Taxon**, Viena, v.55, p.705-731, 2006.
- SOMER, M. et al. Sporophyte induction studies in ferns *in vitro*. **Euphytica**, Dordrecht, v.171, p.203-210, 2010.
- TRYON, R.M.; TRYON, A.F. **Ferns and allied plants with special reference to tropical America**. New York: Springer. 1982. 857p.