

PROPAGAÇÃO DE PTERIDÓFITAS IN VITRO E IN VIVO ATRAVÉS DE ESPOROS⁽¹⁾

FLÁVIA PRÓSPERO BORELLI^(2,3), CARLOS EDUARDO FERREIRA
DE CASTRO⁽³⁾, LUIZ ANTONIO FERRAZ MATTHES⁽³⁾,
ANTONIO FERNANDO CAETANO TOMBOLATO⁽³⁾ e VIOLETA NAGAI⁽⁴⁾

RESUMO

Sujeitas ao processo de extinção, em decorrência do extrativismo, as samambaias arbóreas *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook e *Cyathea schan-schin* Mart., das quais se obtém o xaxim, são espécies ainda pouco estudadas quanto à propagação. Com o objetivo de desenvolver um método adequado à propagação destas espécies, através de esporos, realizaram-se experimentos in vitro e in vivo. Para a desinfecção dos esporos, utilizaram-se soluções de hipoclorito de cálcio, em diferentes concentrações, ou de sódio, comparando-se sua eficiência. Para o cultivo in vitro, empregaram-se os meios nutritivos de Murashige e Skoog modificado e de Jones e a solução de Knop modificada. Na cultura in vivo utilizaram-se xaxim, esfagno, terrço ou tijolo fragmentado. Como condições de cultivo, manteve-se a temperatura a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e o fotoperíodo de 16 horas. Apesar da elevada contaminação durante o processo de germinação in vitro e in vivo, a desinfecção com hipoclorito de cálcio a 2% foi mais eficiente. Os esporos germinaram em 4 a 8 semanas e os prótalos formaram-se após 30 a 40 dias. Obteve-se maior percentagem de germinação e formação de prótalos com os meios de Jones e Knop, bem como xaxim e esfagno, e a germinação de esporos ocorreu mais rapidamente na ausência de esporângios.

Termos de indexação: pteridófitas, cultura in vivo e in vitro; esporos, propagação.

⁽¹⁾ Trabalho parcialmente financiado pela FAPESP. Recebido para publicação em 25 de maio e aceito em 17 de setembro de 1990.

⁽²⁾ Estagiária bolsista da FAPESP.

⁽³⁾ Seção de Floricultura e Plantas Ornamentais, Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Caixa Postal 28, 13001 Campinas, SP.

⁽⁴⁾ Seção de Técnica Experimental e Cálculo (IAC).

ABSTRACT**FERN PROPAGATION IN VITRO AND IN VIVO FROM SPORES**

The objective of this experiment was to study the fern propagation from spores of *Cyathea schanschin* Mart. and *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook. The spores were decontaminated in calcium or sodium hypochlorite solutions. The in vitro experiments were performed with the media: MS modified, Jones or Knop's solution modified. Tree-fern fibre, sphagnum moss, loam soil or brick peaces were used for the in vivo experiments. The temperature was maintained at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and 16 hours of photoperiod for both treatments (in vivo and in vitro cultures). Besides the high percentage of contamination during the germination process, in vitro and in vivo, the best results were obtained with decontamination made in a 2% sodium hypochlorite solution. The spores germination occurred after a period of 4 to 8 weeks and the prothalli were formed 30 to 40 days latter. There was a high percentage of germination and prothalli formation in Jones and Knop media, and tree-fern fibre and sphagnum moss substrates.

Index terms: Pteridophytes, in vivo and in vitro cultures; spores; propagation.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de flores e plantas ornamentais é uma atividade agrícola caracterizada pelo aproveitamento de pequenas áreas. Entre as plantas ornamentais, as pteridófitas, com destaque às samambaias e avencas, são muito utilizadas comercialmente.

Conjuntamente à questão comercial, é de considerar o aspecto relacionado à preservação ambiental ligado à exploração intensiva e indiscriminada das pteridófitas como um todo.

A constante e crescente devastação de várias espécies vegetais ocorre, principalmente, através do extrativismo, e sua devida reposição não é realizada, acelerando, assim, seu processo de extinção.

No Brasil, algumas samambaias arbóreas encontradas na serra do Mar são: *Cyathea gardneri* Hook, *Cyathea schanschin* Mart., *Trichipteris atrovirens* (Langsd. & Fisch) Tryon, *Nephelea sternbergii* (Pohl.) Tryon, *Alsophilla corcovadensis* (Raddi) C. Ch. e *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook. Esta última espécie se encontra em processo de extinção, pois, por seu intermediário, é que se obtém o xaxim verdadeiro, intensamente utilizado (isolado ou em mistura com outros componentes) como substrato para outras espécies ornamentais, como orquídeas e bromélias. Atualmente, é realizada a extração do xaxim da espécie *Cyathea schanschin* Mart. em substituição à *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook.

O déficit, entre a retirada das plantas dos seus habitats e sua reposição, pode ser amenizado, se forem dirigidos estudos com o intuito de produzi-las em níveis quantitativos e qualitativos adequados ao suprimento da demanda.

Um dos estudos pioneiros sobre a cultura in vitro com pteridófitas foi efetuado por HIRE (1940), mediante inoculação de esporos de *Polypodium aureum* J. Sm. em meio nutritivo sólido.

O meio de Murashige e Skoog (MS) foi comercialmente utilizado para pteridófitas, pela primeira vez, em 1976, com *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott. Atualmente, muitos laboratórios utilizam o método definido para esta espécie na produção de outras samambaias.

KNAUSS (1976) cultivou in vitro esporos de *Pteris ensiformis* Burm., *Adiantum tenerum* Swartz, 'Pink Lady', *Cyromium falcatum* Presl., *Davallia bullata* Wall., *Polystichum adiantiforme* (Foerst) J. Sm. e *Platyserium bifurcatum* C. Chr. Os esporos foram inoculados em meio MS modificado, suplementado com sacarose, tiamina e ágar, mantendo-se um pH de 5,7 a 5,8 e, como condições de cultivo, um fotoperíodo de 16 horas e uma temperatura de 27°C. Verificou-se que, para as espécies de pteridófitas citadas, somente o estágio gametofítico foi produzido por cultura in vitro em MS modificado. A fragmentação das colônias de prótalo foi efetuada através de sua agitação em uma solução de sais (meio MS diluído à metade) por 5 segundos. Esta suspensão de tecido gametofítico foi, posteriormente, distribuída nos substratos. Após a transferência do material, foi produzido o estágio esporofítico.

LÊ (1983) implantou ensaio de cultura in vitro com esporos de *Nephrolepis exaltata*, em condições de cultivo idênticas àquelas adotadas por KNAUSS (1976), alterando apenas a faixa de temperatura para 18 a 23 ± 1°C. Houve referências à necessidade de açúcar na composição do meio para que as colônias de prótalo se constituíssem, além da necessidade de transferência dos prótalos a um meio fresco da mesma composição, para que proliferassem rapidamente. O processo de fragmentação das colônias de prótalo realizou-se através da agitação delas em uma solução nutritiva de MS diluída a 1/4, com posterior distribuição nos substratos. Tal processo induziu o desenvolvimento de esporófitos.

FERREIRA NETO (1983) efetuou a inoculação de esporos de *Cyathea delgadii* Sternb. em solução líquida de Knop com as modificações introduzidas por DYER (1979), mantendo os frascos, com os esporos inoculados, em luz fluorescente branca e à temperatura constante de 25°C. O autor, realizando testes preliminares com diferentes períodos de pré-embebição dos esporos no escuro e posterior manutenção em solução de Knop em luz fluorescente branca por tempo definido, verificou que os tratamentos de pré-embebição no escuro por 48 ou 72 horas foram os mais efetivos. Verificou, também, que em nenhum caso os esporos germinaram em escuro constante, enquanto os que permaneceram sob condições de plena luminosidade apresentaram os maiores índices, superando até os tratamentos de pré-embebição.

JONES (1987) referiu-se à técnica de inoculação de esporos em meio sólido com pH ajustado para 6,0-6,5 ou 7,0-7,5, recomendando a supressão de açúcares do meio, visto que favorecem o surgimento e o desenvolvimento de fungos e bactérias. Essa recomendação contraria LÊ (1983). Para a inoculação de esporos in vivo, foram utilizados substratos como o esfagno, o xaxim, a areia grossa e o solo propriamente dito, isoladamente ou em mistura. Adicionalmente,

o autor informa que a germinação de algumas espécies de pteridófitas ocorre na presença de fungos micorrízicos, recomendando a desinfecção dos esporos em solução de hipoclorito de cálcio ou de sódio (10g/140ml de água).

Após a formação dos prótalos, POOLE & CONOVER (1973, 1978), FUJINO & REID (1983), GILLIAM et al. (1983) e JONES (1987) informaram sobre a necessidade de proceder-se a suplementações nutricionais com fertilizantes líquidos.

Na prática, tem-se observado que viveiristas efetuam a sementeação de esporos de várias pteridófitas em fragmentos de tijolos com relativo êxito à propagação: estudos mais aprofundados são requeridos para avaliar sua eficiência.

Com o objetivo de desenvolver um método adequado à propagação de *Cyathea schanschin* e *Dicksonia sellowiana*, através de esporos, realizaram-se experimentos in vitro e in vivo, testando-se os diversos processos preconizados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Como material vegetal, foram utilizados esporos de *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook, *Cyathea schanschin* Mart. e *Alsophila* sp. coletados no Instituto de Botânica, São Paulo.

O estudo foi desenvolvido através de doze tratamentos com quatro repetições, diferenciados pelas suas condições de cultivo, conforme o esquema abaixo:

In vivo:

- T1 = conjunto esporângios e esporos (E) em esfagno;
- T2 = esporos (e) em esfagno;
- T3 = (E) em xaxim;
- T4 = (e) em xaxim;
- T5 = (E) em terriço;
- T6 = (e) em terriço.

In vitro:

- T7 = (E) em meio sólido de Jones;
- T8 = (e) em meio sólido de Jones;
- T9 = (E) em meio de Murashige e Skoog modificado;
- T10 = (e) em meio de Murashige e Skoog modificado;
- T11 = (E) em solução de Knop modificada por Dyer;
- T12 = (e) em solução de Knop modificada por Dyer.

Os meios de cultura utilizados tinham as seguintes composições:

1) Meio sólido de Jones (pH = 6,0-6,5): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g/litro; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 500mg/litro; KCl 250mg/litro; KH_2PO_4 250mg/litro; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 250mg/litro; quelato de ferro 42mg/litro; MnSO_4 7,5mg/litro e ágar 12,0g/litro.

2) Meio nutritivo de MS modificado (pH = 5,7-5,8): NH_4NO_3 1.320mg/litro; KNO_3 1.520mg/litro; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 325mg/litro; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 296mg/litro; KH_2PO_4 136mg/litro; Na_2EDTA 37,3 mg/litro; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27,8mg/litro; H_3BO_3 6,2mg/litro; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22,3mg/litro; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8,6mg/litro; KI 0,83mg/litro; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,25 mg/litro; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,025mg/litro; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,025mg/litro; tiamina 0,5mg/litro; sacarose 30g/litro e ágar 7g/litro.

3) Solução de Knop modificada por Dyer (pH = 5,7): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 510mg/litro; KNO_3 120mg/litro; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 144mg/litro; KH_2PO_4 250mg/litro; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + Na_2EDTA 1mg/litro.

Os esporos foram obtidos de frondes férteis de pteridófitas que apresentavam soros maduros; o conjunto de esporângios e esporos, pela separação em peneira de malha de 80 micros, e os esporos, pela separação subsequente em peneira de malha de 120 micros.

Após a pesagem de várias parcelas de esporos, obteve-se uma média de 0,0013g do material em cada inoculação.

A desinfecção de esporos ou conjunto de esporângios e esporos foi efetuada com soluções de hipoclorito de cálcio 1% (1,53g do produto comercial/100ml de água); 2% (3,06g do produto comercial/100ml de água); 4% (6,12g do produto comercial/100ml de água) ou 6% (9,18g do produto comercial/100ml de água), ou solução de hipoclorito de sódio 20% (20ml do produto comercial Q-Boa/100ml de água).

Os esporos ou conjunto de esporângios e esporos foram agitados por 10 ou 20 minutos nas soluções de hipoclorito de cálcio, nas diferentes concentrações, ou de hipoclorito de sódio com a adição de Tween 20.

Inocularam-se os esporos ou conjunto de esporângios e esporos nos meios (cultura in vitro) ou substratos (cultura in vivo), com o auxílio de uma espátula metálica.

Para realização da cultura in vitro, utilizaram-se o meio sólido de JONES (1987), o meio nutritivo de Murashige & Skoog (MS) modificado e a solução de Knop modificada por Dyer.

O meio sólido de MS modificado, ou de Jones, foi distribuído em placas de Petri ou em frascos de vidro. A solução de Knop modificada por Dyer foi distribuída em tubos de ensaio com ou sem ponte de papel de filtro. Todo o material inoculado foi mantido em câmara clara a uma temperatura de aproximadamente $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas. De acordo com as necessidades, efetuaram-se irrigações com água bidestilada autoclavada (em condições assépticas).

Realizou-se a fragmentação de algumas colônias de prótalo, obtidas através da cultura *in vitro* (meios sólidos de MS modificado ou Jones), de acordo com o método de KNAUSS (1976), ou seja, agitação daquelas em uma solução de sais (meio MS diluído à metade) por cinco segundos. Após esse processo, a suspensão de tecido gametofítico foi transferida para os substratos (xaxim ou esfagno). As colônias de prótalo e os prótalos isolados, obtidos em solução de Knop, foram diretamente distribuídas nos substratos, sem o uso do método de KNAUSS (1976).

A cultura *in vivo* foi realizada em vasos plásticos, preenchidos com 1/3 da capacidade total, em sua porção inferior, com pequenos cacos de vaso, 1/3 de areia grossa lavada e 2/3 de substrato. Os substratos (xaxim peneirado, esfagno peneirado, terrço ou tijolo fragmentado) foram autoclavados por 20 minutos a 120°C ou mantidos em forno de microondas por 15 minutos. Após a inoculação, colocaram-se os vasos em bandejas cobertas por plásticos e mantidas em câmara clara com condições idênticas às utilizadas para a cultura *in vitro*.

Efetuaram-se irrigações com água destilada, de acordo com as necessidades e, adicionalmente, fertilizações com soluções do produto comercial Hyponex (1g/l de água). Este fertilizante líquido foi distribuído nos recipientes, a partir da formação dos prótalos.

A análise estatística foi realizada com base na distribuição binomial, considerando os cinco seguintes possíveis casos de resposta, nas quatro repetições, e respectivos valores de proporção p e $q = 1 - p$, e erro padrão $s(p) =$

$$= \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

Casos	Repetições				Proporção		Erro padrão
	1	2	3	4	p	q	s(p)
1	x	x	x	x	1,0	0	0
2	x	x	x	-	0,75	0,25	0,2164
3	x	x	-	-	0,50	0,50	0,25
4	x	-	-	-	0,25	0,75	0,2164
5	-	-	-	-	0	1,0	0

onde x se refere à presença e -, à ausência da característica em estudo.

Com 68% de probabilidade, pode-se dizer que: (a) tratamentos com mesmo erro padrão e proporções diferentes diferem estatisticamente entre si; (b) tratamentos com erro padrão igual a 0,25 e proporções $p = 0,75$ e $p = 0,25$ diferem entre si.

Devido aos resultados obtidos na primeira fase do trabalho, estudaram-se também os seguintes tratamentos, cujos resultados se encontram, respectivamente, nos quadros 4 e 5.

In vitro (*Alsophila* sp.)

- T1 = esporos (e) em meio sólido de Jones (frascos de vidro);
- T2 = (e) em meio sólido de Jones (placas de Petri);
- T3 = (e) em MS modificado (frascos de vidro);
- T4 = (e) em MS modificado (placas de Petri);
- T5 = (e) em solução de Knop modificada por Dyer (tubos de ensaio).

In vitro (*Cyathea schanschin*)

- T1 = (e) em solução de Knop modificada por Dyer (tubos de ensaio com ponte de papel de filtro);
- T2 = (e) em solução de Knop modificada por Dyer (tubos de ensaio sem ponte de papel de filtro);

In vivo (*Cyathea schanschin*)

- T3 = (e) em xaxim;
- T4 = (e) em esfagno;
- T5 = (e) em tijolo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Constatou-se um elevado índice de contaminações por fungos e bactérias, independente da concentração do agente esterilizante empregado e do período de esterilização a que os esporos foram submetidos, o que prejudicou sensivelmente a germinação. Pressupõe-se que a contaminação manifestada esteja diretamente relacionada ao fato de as plantas matrizes serem mantidas em condições de campo, o que facilita o surgimento e desenvolvimento de grande número de microorganismos nas frondes. Ademais, a rugosidade da superfície dos esporângios e esporos também pode influenciar a penetração do agente esterilizante, a qual nem sempre ocorre em um nível ótimo, dificultando, portanto, uma desinfecção mais eficiente.

Os resultados e discussão dos mesmos são apresentados por espécie.

1) *Cyathea schanschin* Mart.

No quadro 1, observa-se que, na desinfecção do material com hipoclorito de cálcio 1%, os resultados foram insatisfatórios (contaminação = 100% ou $p = 1$) para a cultura in vivo, situação atribuída à assepsia insuficiente a que foram submetidos os substratos. A contaminação do material (in vitro) foi maior em meio sólido de MS modificado do que em meio nutritivo de Jones, confirmando,

portanto, a recomendação de JONES (1987): a presença de açúcar na composição do meio favorece o surgimento e o desenvolvimento de fungos e bactérias. O menor índice de contaminação (in vitro) ocorreu em solução de Knop: pressupõe-se que esta apresente resultados mais satisfatórios quanto à contaminação do material porque não há necessidade de irrigações, evitando, assim, maior manuseio. Os esporos inoculados em placas de Petri e frascos de vidro (meios de cultura sólidos) necessitam ser irrigados, aumentando, portanto, a possibilidade de contaminações.

Em relação à germinação, quando utilizado o meio sólido de Jones, apesar da contaminação, houve maior porcentagem de germinação de esporos na ausência de esporângios.

Não foi observado o desenvolvimento de esporófitos (in vitro): portanto, utilizou-se o método de KNAUSS (1976) para fragmentação de colônias de prótalo (obtidas através de cultura in vitro) e com sua posterior transferência para os substratos (in vivo). O desenvolvimento de esporófitos foi observado quatro meses após o procedimento acima.

QUADRO 1. Proporção (P) de contaminação, germinação e formação de prótalos nos diferentes tratamentos após a desinfecção de esporos (e) ou conjunto de esporângios e esporos (E) de *Cyathea schanschii* com solução de hipoclorito de cálcio 1%

Tratamentos	Hipoclorito de Ca 1%	
	Contaminação	Germinação e Prótalos
	p	
In vivo		
(E) esfagno	1,00	0,0
(e) esfagno	1,00	0,0
(E) xaxim	1,00	0,0
(e) xaxim	1,00	0,0
(E) terriço	1,00	0,0
(e) terriço	1,00	0,0
In vitro		
(E) Jones	0,75	0,25
(e) Jones	0,75	0,75
(E) MS	0,75	0,0
(e) MS	1,00	0,0
(E) Knop	0,50	0,0
(e) Knop	0,50	0,25

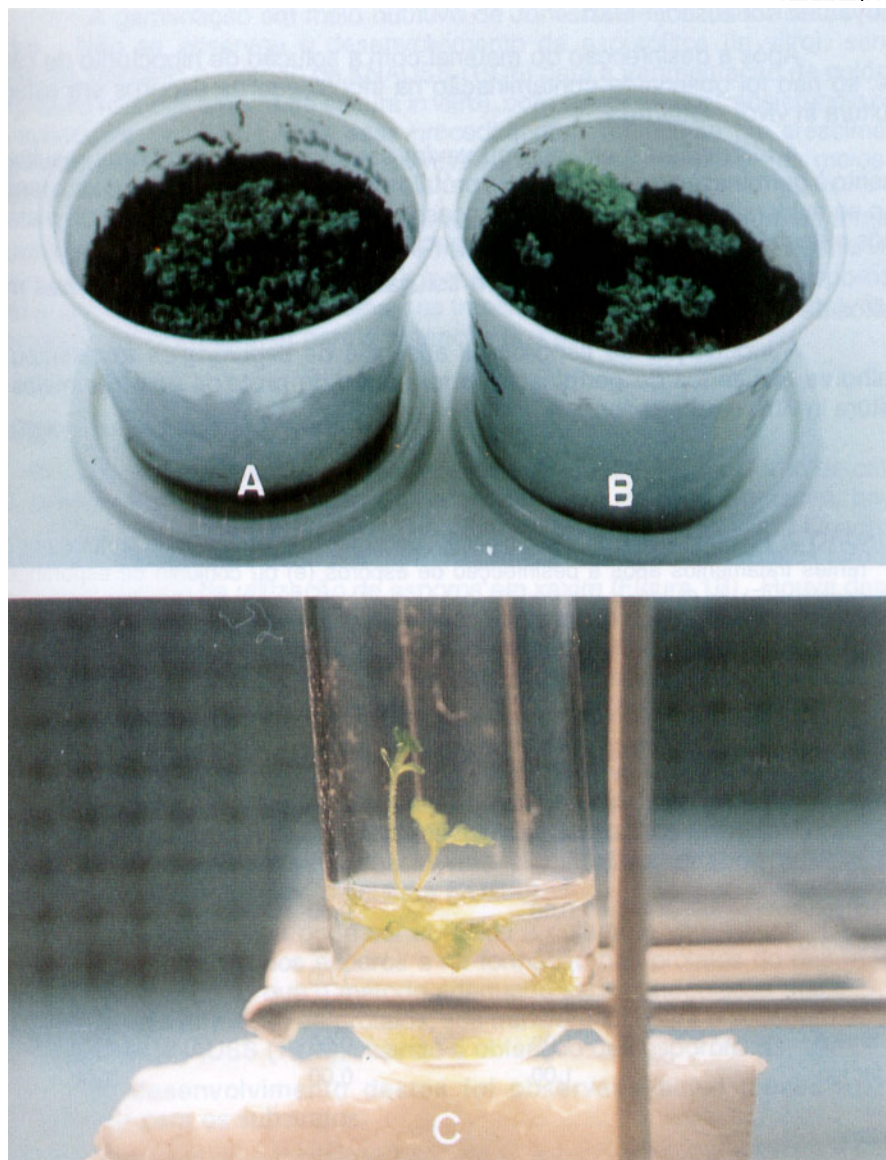


Figura 1. A: Prótalos de *Cyathea schanschin* e B: Prótalos de *Dicksonia sellowiana*, ambos obtidos pelo método de KNAUSS (1976), utilizando como substrato o xaxim; C: Formação de esporófitos de *Cyathea schanschin* em solução de Knop, sem ponte de papel de filtro.

2) *Cyathea schanschin* Mart.

Após a desinfecção do material com a solução de hipoclorito de cálcio 2%, só não foi observada contaminação na inoculação de esporos em esfagno (cultura in vivo) - Quadro 2.

A utilização de esfagno ou xaxim caracterizou os melhores resultados quanto à germinação e à formação de prótalos (Figura 1A), enquanto, com o terriço, não se evidenciou a ocorrência do processo. Não houve germinação do material após a desinfecção com solução de hipoclorito de sódio 20%.

Nos tratamentos in vitro, a solução de Knop revelou os índices mais baixos de contaminação.

A inoculação de esporos na ausência de esporângios apresentou os melhores resultados de germinação e formação de prótalos nos três meios de cultura in vitro empregados.

QUADRO 2. Proporção (P) de contaminação, germinação e formação de prótalos nos diferentes tratamentos após a desinfecção de esporos (e) ou conjunto de esporângios e esporos (E) de *Cyathea schanschin* com solução de hipoclorito de cálcio 2% ou hipoclorito de sódio 20%

Tratamentos	Hipoclorito de Ca 2%		
	Contaminação	Germinação e Prótalos	Hipoclorito de Na 20% Contaminação
	p		
In vivo			
(E) esfagno	0,00	0,00	1,00
(e) esfagno	1,00	1,00	0,25
(E) xaxim	0,75	1,00	0,50
(e) xaxim	1,00	1,00	1,00
(E) terriço	1,00	0,00	1,00
(e) terriço	1,00	0,00	1,00
In vitro			
(E) Jones	1,00	0,75	1,00
(e) Jones	0,75	1,00	1,00
(E) MS	0,75	0,00	1,00
(e) MS	1,00	1,00	1,00
(E) Knop	0,25	0,00	0,75
(e) Knop	0,25	1,00	1,00

A germinação em meio nutritivo de Jones alcançou os melhores resultados. Não se observou o desenvolvimento de esporófitos (in vitro), sendo, portanto, utilizado o método de KNAUSS (1976) para a fragmentação de colônias de prótalo (obtidas através de cultura in vitro), com sua posterior transferência para os substratos (in vivo). Após esse procedimento, verificou-se um crescimento significativo dos mesmos quando comparados àqueles mantidos nos meios de cultura (in vitro).

A vantagem que pode ser atribuída à cultura in vitro refere-se à maior rapidez na germinação dos esporos e na formação dos prótalos do que in vivo. Assim, pressupõe-se que o método adequado seria a inoculação dos esporos in vitro e, após a formação de prótalos, sua transferência para o substrato através do método de KNAUSS (1976) para a obtenção dos esporófitos.

3) *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook

Após a desinfecção do material com a solução de hipoclorito de cálcio 2%, observou-se que, à exceção do tratamento com esporos em xaxim, houve uma contaminação de 100%, $p = 1$, nos demais tratamentos in vivo - Quadro 3. Os melhores resultados quanto à germinação e à formação de prótalos também ocorreram quando da utilização de esporos em xaxim (Figura 1B). Houve desenvolvimento de esporófitos seis meses após a formação dos prótalos em xaxim. A desinfecção com a solução de hipoclorito de sódio 20% mostrou-se ineficiente (contaminação = 100%), para a cultura tanto in vivo como in vitro.

A germinação e formação de prótalos em meio MS modificado apresentou os melhores resultados quando utilizados esporos na ausência de esporângios. Não houve formação de esporófitos (in vitro): assim, utilizou-se o método de KNAUSS (1976) para a fragmentação de colônias de prótalo (obtidas através de cultura in vitro), e posterior transferência para os substratos (in vivo). Após esse procedimento, notou-se seu crescimento significativo, quando comparados àqueles mantidos nos meios de cultura (in vitro).

A vantagem que pode ser atribuída à cultura in vitro refere-se à maior rapidez na germinação dos esporos e na formação dos prótalos do que in vivo. Portanto, pressupõe-se que o método adequado seria a inoculação dos esporos in vitro e, após a formação de prótalos, sua transferência para o substrato através do método de KNAUSS (1976), visando à obtenção dos esporófitos.

O desenvolvimento destes foi observado cinco meses após a transferência para os substratos.

4) *Alsophila* sp.

O quadro 4 mostra que a desinfecção dos esporos com a solução de hipoclorito de cálcio 2% levou a um menor índice de contaminação quando empregados frascos de vidro (Jones e MS modificado). Comparando-se as desinfecções com as soluções de hipoclorito de cálcio 2, 4 e 6%, pode-se concluir que a primeira foi a mais eficiente quando empregados frascos de vidro e tubos de ensaio (solução de Knop.) Pressupõe-se que o aumento da concentração do

agente desinfetante aumente a contaminação, pois provoca uma oxidação do material, favorecendo, assim, a ação de microorganismos saprófitos.

QUADRO 3. Proporção (P) de contaminação, germinação e formação de prótalos nos diferentes tratamentos após a desinfecção de esporos (e) ou conjunto de esporângios e esporos (E) de *Dicksonia sellowiana* com solução de hipoclorito de cálcio 2% ou hipoclorito de sódio 20%

Tratamentos	Hipoclorito de Ca 2%		Hipoclorito de Na 20%
	Contaminação	Germinação e Prótalos	Contaminação
	p		
In vivo			
(E) esfagno	1,00	0,00	1,00
(e) esfagno	1,00	0,00	1,00
(E) xaxim	1,00	0,00	1,00
(e) xaxim	0,50	0,75	1,00
(E) terriço	1,00	0,00	1,00
(e) terriço	1,00	0,00	1,00
In vitro			
(E) Jones	0,50	1,00	1,00
(e) Jones	0,50	0,75	1,00
(E) MS	1,00	0,00	1,00
(e) MS	0,50	1,00	1,00
(E) Knop	0,50	0,75	1,00
(e) Knop	0,75	0,75	1,00

QUADRO 4. Proporção (P) de contaminação nos diferentes tratamentos após a desinfecção de esporos (e) de *Alsophila* sp. com solução de hipoclorito de cálcio 2%, 4% ou 6%

Tratamentos	Hipoclorito de cálcio		
	2%	4%	6%
	p		
In vitro			
(e) Jones, frascos de vidro	0,50	0,75	1,00
(e) Jones, placas de Petri	1,00	1,00	1,00
(e) MS, frascos de vidro	0,50	1,00	1,00
(e) MS, placas de Petri	1,00	1,00	1,00
(e) Knop, tubos de ensaio	0,50	0,75	1,00

A germinação dos esporos ocorreu a 30 dias da inoculação nos substratos. Os prótalos formaram-se 40 dias após a germinação dos esporos e os esporófitos iniciaram o desenvolvimento 110 dias depois da formação dos prótalos.

5) *Cyathea schanschin* Mart.

No quadro 5, observa-se que, após a desinfecção com hipoclorito de cálcio 2%, à exceção da solução de Knop em tubos de ensaio com ponte de papel de filtro, foram obtidos resultados satisfatórios quanto à germinação e à ausência de contaminação. Na solução de Knop (cultura in vitro), o desenvolvimento de esporófitos ocorreu 40 dias após a formação de prótalos (Figura 1C). Não existem referências quanto ao desenvolvimento de esporófitos (in vitro) na literatura consultada.

O desenvolvimento de esporófitos (nos substratos de cultura in vivo) ocorreu 30 a 40 dias após a formação dos prótalos.

QUADRO 5. Proporção (P) de contaminação, germinação e formação de prótalos nos diferentes tratamentos após a desinfecção de esporos (e) de *Cyathea schanschin* com solução de hipoclorito de cálcio 2%

Tratamentos	Hipoclorito de Ca 2%	
	Contaminação	Germinação e Prótalos
	p	
In vitro		
(e) Knop, tubos com ponte papel filtro	1,00	0,50
(e) Knop, tubos sem ponte papel filtro	0,00	1,00
In vivo		
(e) xaxim	0,00	1,00
(e) esfagno	0,00	1,00
(e) tijolo	0,00	1,00

4. CONCLUSÕES

1. A germinação dos esporos ocorreu mais rapidamente na ausência de esporângios.

2. Apesar do elevado índice de contaminação por fungos e bactérias durante o processo de germinação e desenvolvimento dos esporos, a desinfecção do material com a solução de hipoclorito de cálcio 2% mostrou-se mais eficiente em comparação às demais concentrações utilizadas.

3. O meio de cultura (in vitro) mais eficaz foi a solução de Knop sem ponte de papel de filtro.

4. A utilização de frascos de vidro em substituição às placas de Petri para os meios sólidos (Jones e MS modificado) mostrou-se satisfatória, pois reduziu a porcentagem de contaminação.

5. O substrato (cultura in vivo) de maior eficiência foi o xaxim.

AGRADECIMENTOS

Os autores expressam os seus agradecimentos à Técnica de Laboratório da Seção de Floricultura e Plantas Ornamentais, Sra. Ana Maria Molini Costa, cuja dedicação tornou possível o atendimento de todas as etapas do presente trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DYER, A.F. The culture of fern gametophytes for experimental investigation. In: _____, ed. *The experimental biology of ferns*. London, Academic Press, 1979. p.253-305.
- FERREIRA NETO, W.M. *Efeito de luz e temperatura na germinação de esporos de Cyathea delgadii Sterb.* Campinas, UNICAMP-Instituto de Biologia, 1983. 63p. Tese (Mestrado).
- FUJINO, D.W. & REID, M.S. Factors affecting the vase life of fronds of maidenhair fern. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, 21:181-188, 1983.
- GILLIAM, C.H.; SHUMACK, R.L. & EVANS, C.E. The effects of slow-release fertilizers on the growth and postproduction performance of Boston fern. *HortScience*, Alexandria, 18(4):442-444, 1983.
- HIRES, C.S. Growing ferns from spores on sterile nutrient media. *Journal of the New York Botanical Garden*, New York, 41(490):257-266, 1940.
- JONES, D.L. *Encyclopaedia of ferns*. Portland, Timber Press, 1987. 433p.
- KNAUSS, J.F. A partial tissue culture method for pathogen-free propagation of selected ferns from spores. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, Tallahassee, 89:363-365, 1976.
- LÉ, C.L. Essai de multiplication de *Nephrolepis exaltata* par culture in vitro de tissu gamétophytique. *Revue Suisse de Viticulture d'Arboriculture et d'Horticulture*, Lausanne, 15(3):189-192, 1983.

POOLE, R.T. & CONOVER, C.A. Fertilization of Maidenhair fern, *Adiantum raddianum* K. Presl. *HortScience*, Alexandria, 13(2):176-177, 1978.

————— & —————. Influence of dolomite and micronutrients on yield of leatherleaf fern. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, Tallahassee, 86:372-374, 1973.