

Foto: José Rubens Aguiar



Avencão e Asplênio: Metodologia para Obtenção de Mudas a Partir da Germinação In Vitro

Diva Correia¹

João Paulo Saraiva Moraes²

Alan Bernard Oliveira de Sousa³

Evaldo Heber Silva do Nascimento³

Geórgia Carvalho Anselmo⁴

No Brasil, a floricultura é uma atividade econômica que envolve cerca de 4 mil produtores, gerando 120 mil empregos diretos e indiretos em uma área de 6 mil hectares, dos quais 5,7% são destinados para o plantio de folhagens (COZER et al., 2008). Em 2007, a balança comercial da floricultura brasileira acumulou saldo de US\$ 24,74 milhões. Deste valor, US\$ 1,67 milhão deve-se ao setor de folhagens, folhas e ramos cortados, frescos e secos, o que o torna um dos setores mais promissores na pauta de exportações setoriais do País (JUNQUEIRA e PEETZ, 2008).

Entre as folhagens, as pteridófitas destacam-se pelo seu uso em vaso, corte ou na composição de arranjos florais. Esses vegetais existem há mais de 300 milhões de anos, estimando-se, atualmente, 12 mil espécies distribuídas em diversos ambientes do mundo (FERNANDEZ e REVILLA, 2003). O avencão, *Rumohra adiantiformis* (Figura 1a), pertencente à família Bryopteridaceae, e o asplênio, *Asplenium nidus* (Figura 1b), da família Aspleniaceae, são as espécies mais comercializadas.

O avencão tem rizomas longos, felpudos, com

folhas deltoides compostas de segmentos ovados, e permanentemente verdes (LORENZI e SOUZA, 1995; GILMAN, 1999). É usado em arranjos ornamentais, em composição de buquês, coroas fúnebres e outros adornos, por causa da sua durabilidade pós-colheita (RIBAS et al., 2007).

O asplênio caracteriza-se por ser epífita, com grandes folhas verdes, brilhantes, inteiras, coriáceas e dispostas em roseta (KHAN et al., 2008; LORENZI e SOUZA, 1995). Comumente, é cultivado em vasos, em locais sombreados, úmidos e protegido de ventos (LORENZI e SOUZA, 1995).

As pteridófitas são multiplicadas por esporos, seções de rizomas, divisão de plantas adultas ou rebentos que crescem do rizoma (FERNANDEZ et al., 1993). Outra possibilidade de multiplicação é por germinação in vitro de esporos. Essa técnica permite a obtenção de uma população livre de contaminação por esporos de outras pteridófitas, algas e musgos, bem como de infecções por bactérias e fungos (DEBERG, 1994).

¹Bióloga, D. Sc. em Recursos Florestais, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Dra. Sara Mesquita 2.270, Pici, tel. (85) 3391-7278, CEP 60511-110, Fortaleza, CE. E-mail: dcorreia@cnpat.embrapa.br

²Farmacêutico, M. Sc. em Bioquímica, pesquisador da Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz 1.143, Bairro Centenário, CEP 58428-095, Campina Grande, PB. E-mail: saraiva@cnpat.embrapa.br

³Aluno do Curso de Graduação em Agronomia (UFC); estagiário da Embrapa Agroindústria Tropical.

⁴Aluna do Curso de Graduação em Ciências Biológicas (UECE); estagiária da Embrapa Agroindústria Tropical.

Tendo em vista o crescimento da floricultura no Brasil e o aumento da demanda por folhagens, é fundamental que o setor produtivo tenha disponibilidade de mudas para cultivo das espécies em uso ou com potencial de uso. Considerando-se o potencial de uso na floricultura do avencão e do asplênio, é apresentada neste trabalho uma metodologia para o desenvolvimento in vitro a partir da germinação de seus esporos.

Plantas matrizes e obtenção dos esporos

Plantas adultas de avencão (Figura 1A) e asplênio (Figura 1B) devem apresentar boas condições nutricionais e fitossanitárias e os esporos devem ser retirados dos esporófitos maduros por meio de raspagem dos soros (Figura 2), com auxílio de espátula ou lâmina de bisturi e depositá-los em placa de Petri. Havendo ainda soros inteiros, estes devem ser suavemente pressionados com o próprio instrumental sobre a placa de Petri, até a obtenção de esporos livres. Para este trabalho, foram usados esporófitos provenientes de plantas matrizes oriundas da Serra de Guaramiranga, Ceará. Os estudos que definiram a metodologia foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, CE.

Assepsia dos esporos

Com auxílio de uma espátula, pequenas porções de esporos são colocadas em microtubos de capacidade de 1,5 mL, até aproximadamente a metade da marcação de 0,1 mL (Figura 3).

Em cada microtubo, adiciona-se 1,0 mL de solução de hipoclorito de sódio 0,8% (v/v) contendo Tween 20 (duas gotas para cada 100 mL de solução desinfestante), os quais devem ser agitados manualmente, com vigor, durante 20 minutos. A seguir, os microtubos são centrifugados a 10 mil rpm, por 3 minutos. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, o sobrenadante da solução desinfestante de cada microtubo é descartado e adicionado 1,0 mL de água destilada e esterilizada, para o início do processo de enxágue. Os microtubos, devidamente fechados, devem ser agitados vigorosamente durante 3 minutos e, depois, centrifugados a 10 mil rpm, por 3 minutos. Novamente, em câmara de fluxo laminar, o

sobrenadante é descartado e adicionado 1,0 mL de água destilada e esterilizada a cada microtubo. Este processo de enxágue deve ser repetido mais duas vezes.

Após o último enxágue, deve ser adicionado 1,0 mL de água destilada e esterilizada a cada microtubo, agitando-se os recipientes até ressuspender os esporos, que serão utilizados na etapa de inoculação.



Fotos: José Rubens Aguiar

Figura 1. (A) Plantas de avencão (*Rumohra adiantiformis*); (B) e de asplênio (*Asplenium nidus*).



Figura 2. (A) Esporófitos com soros de avencão (*Rumohra adiantiformis*); (B) e de asplênio (*Asplenium nidus*).

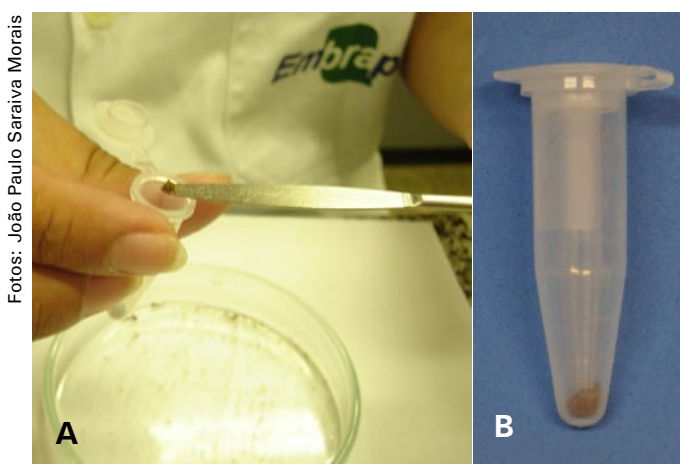


Figura 3. (A) Esporos de avencão sendo colocados no microtubo; (B) exemplo do volume aproximado de esporos em cada microtubo.

A Figura 4 apresenta a sequência das etapas desta metodologia de assepsia e inoculação de esporos de pteridófitas, segundo Fernandez et al. (1993), modificada.

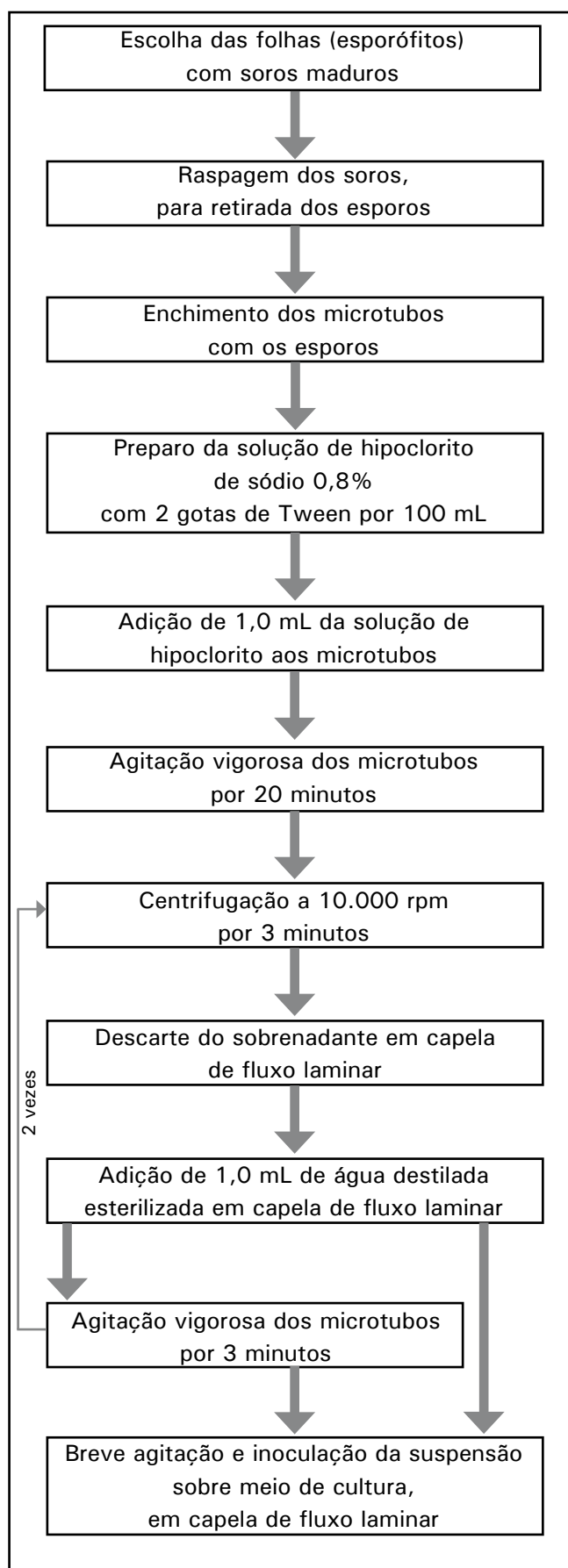


Figura 4. Etapas da metodologia de assepsia de esporos de avencão (*Rumohra adiantiformis*) e de asplênio (*Asplenium nidus*).

Inoculação dos esporos

Em capela de fluxo laminar, o conteúdo de cada microtubo é dispensado em um único frasco com capacidade de 220 mL, com tampa de polipropileno transparente, contendo 30 mL de meio de cultura JADS (Tabela 1), suplementado com 3% (p/v) de sacarose, pH ajustado para 5,8 antes da esterilização e solidificado com agar Merck® a 5,5 g L⁻¹. A esterilização do meio de cultura ocorre em autoclave à temperatura de 121 °C, durante 15 minutos.

Alguns estudos conduzidos in vitro com pteridófitas apresentaram melhor desenvolvimento em meio nutritivo contendo a metade da concentração de N do meio Murashige e Skoog (1962) (GUIMARAES et al., 1999; FERNANDEZ et al., 1999; FERNANDEZ e REVILLA, 2003).

Estudos preliminares realizados com avencão e asplênio no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Agroindústria Tropical indicaram resultados similares. A escolha do meio de cultura JADS foi em razão de ele apresentar aproximadamente a metade da concentração de nitrogênio total quando comparado à concentração de N total existente no meio de cultura MS e, também, por apresentar uma relação NO₃⁻:NH₄⁺ 5,5:1 enquanto no meio MS essa relação é de 1,9:1. A preferência por nitrato é citada no estudo conduzido por Fernandez e Revilla (2003).

As culturas devem ser mantidas em câmara de crescimento com radiação ativa fotossintética de 30 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 12 horas e temperatura a 27 °C ± 2 °C.

Tabela 1. Composição do meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995).

Componentes	Concentração (mg L ⁻¹)	Concentração (mmol L ⁻¹)
Macronutrientes		
Nitrato de amônio (NH ₄ NO ₃)	324,0	4,0
Nitrato de potássio (KNO ₃)	809,0	8,0
Nitrato de cálcio tetraidratado (CaNO ₃ ·4H ₂ O)	1.181,0	5,0
Fosfato monobásico de potássio (KH ₂ PO ₄)	408,0	3,0
Sulfato de magnésio heptaidratado (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	739,5	3,0
Micronutrientes		
Ferro-EDTA		
(FeSO ₄ ·7H ₂ O)	55,60	0,2
(Na ₂ EDTA·2H ₂ O)	74,50	0,2
Sulfato de manganês monoidratado (MnSO ₄ ·H ₂ O)	12,80	0,076
Sulfato de zinco heptaidratado (Zn SO ₄ ·7H ₂ O)	4,30	0,015
Sulfato de cobre pentaidratado (Cu SO ₄ ·5H ₂ O)	1,25	0,005
Molibdato de sódio diidratado (Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O)	0,15	0,0006
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	3,10	0,05
Compostos orgânicos		
Tiamina.HCl (vitamina B ₁)	5,0	0,015
Piridoxina.HCl (vitamina B ₆)	0,5	0,0024
Ácido nicotínico (vitamina PP)	0,5	0,004
Pantotenato de cálcio (vitamina B ₅)	2,4	0,005
Cisteína	2,5	0,02
Arginina	7,0	0,04
Glutamina	146,0	1,0
Inositol	100,0	0,555
Sacarose	30.000,0	11.400,0

A maior parte da germinação dos esporos ocorre entre 30 e 60 dias após a inoculação (Figura 5).

Fotos: João Paulo Saraiva Moraes

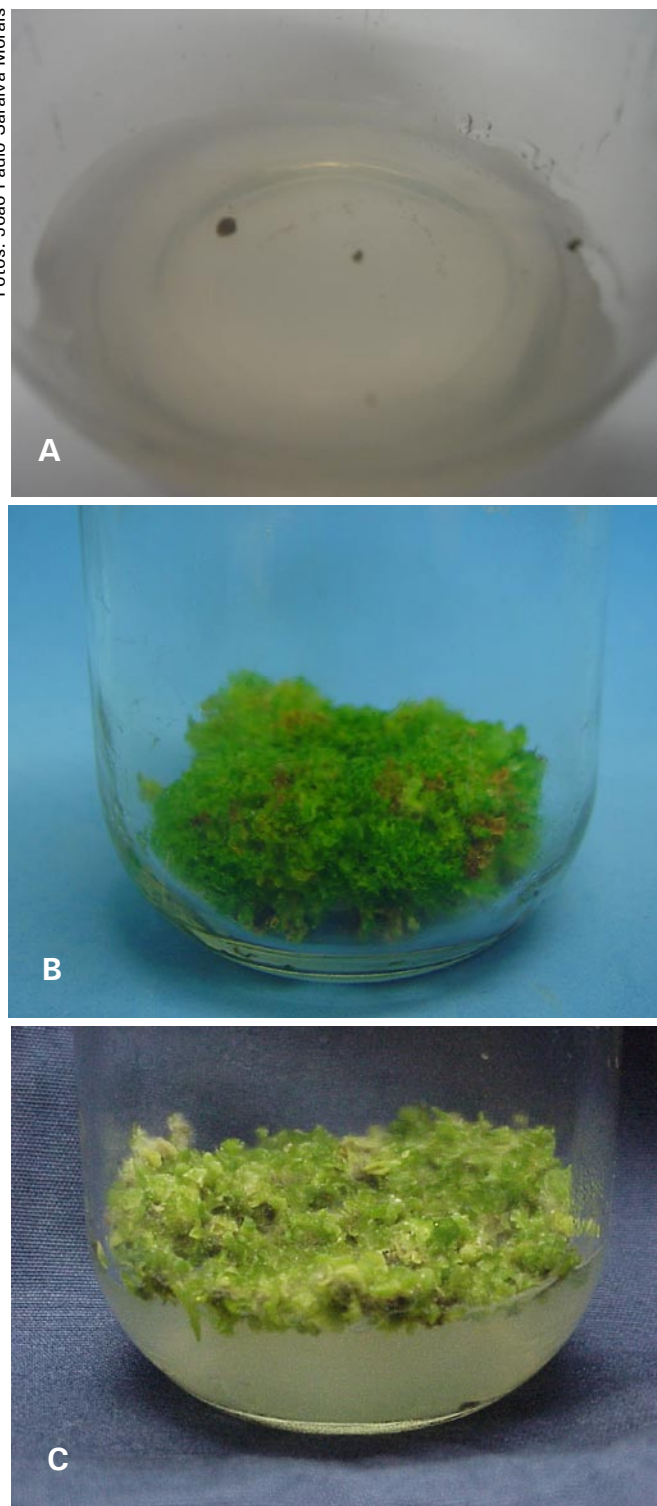


Figura 5. (A) Germinação de esporos e início do desenvolvimento de gametófitos de avenção (*Rumohra adiantiformis*) aos 30 dias após a inoculação; (B) gametófitos de avenção (*Rumohra adiantiformis*); (C) asplênio (*Asplenium nidus*) desenvolvidos aos 120 dias após a inoculação dos esporos.

Cultura de gametófitos

Aos 120 dias após a inoculação dos esporos, os gametófitos devem ser seccionados em pequenas porções de aproximadamente 1 cm de diâmetro e transferidos para novo meio de cultura JADS (Figura 6), e as culturas devem ser mantidas sob as mesmas condições de crescimento citadas anteriormente.

O processo de repicagem deve ser feito a partir do segundo subcultivo, a cada 60 dias, para novo meio de cultura JADS, utilizando-se pequenas porções de gametófitos com aproximadamente 1 cm de diâmetro. É importante ressaltar que todos os subcultivos são realizados em meio de cultura sem regulador de crescimento, o que leva à redução de custos de produção das mudas. Intervalos de tempo para o subcultivo não devem ser superiores a 60 dias pois acarretam o esgotamento nutricional do meio de cultura, reduzindo a taxa de crescimento e comprometendo a qualidade das culturas.

Após dois ou três subcultivos para o asplênio, e três ou quatro subcultivos para o avenção, observa-se o início da diferenciação de esporófitos, os quais devem ser subcultivados.

Fotos: João Paulo Saraiva Moraes

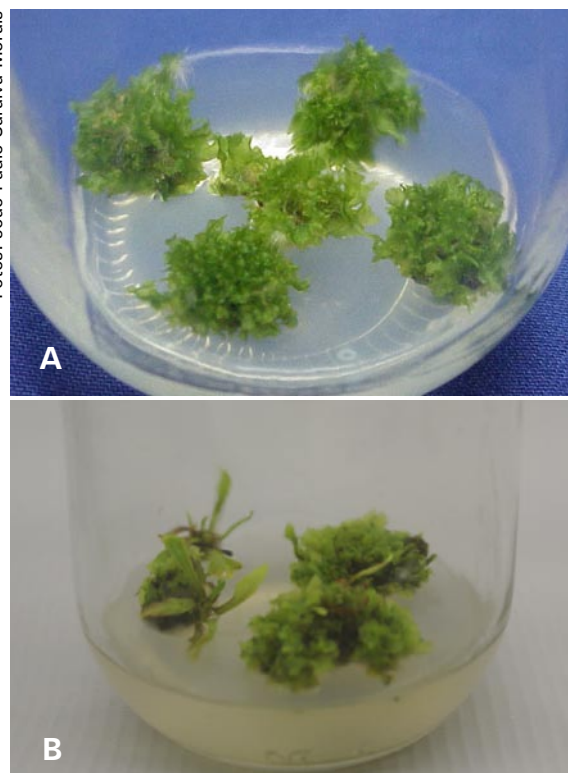


Figura 6. (A) Gametófitos de avenção (*Rumohra adiantiformis*); (B) e de asplênio (*Asplenium nidus*) subcultivados aos 120 dias após a inoculação dos esporos.

Cultura de esporófitos

Os esporófitos (Figura 7) devem ser subcultivados para novo meio de cultura JADS, com uma pequena porção do gametófito ainda ligada a ele. Esses gametófitos devem permanecer durante um mês, nas mesmas condições de crescimento citadas anteriormente. Após esse período, devem ser transferidos para telado.

Transferência dos esporófitos para telado

Os esporófitos devem ser removidos dos frascos, lavados com água corrente e transferidos para recipientes de pelo menos 150 cm³ contendo como substrato, a seguinte formulação: casca de arroz carbonizada, fibra da casca (mesocarpio) de coco seco picada, solo hidromórfico, areia fina e vermicomposto (5:2:1:1:1 v/v).

As mudas devem ser mantidas sob telado com 70% de redução da intensidade luminosa, irrigadas por nebulização durante 5 minutos, de 8 a 12 vezes ao dia, cada. (Figura 8).

Fotos: João Paulo Saraiva Moraes

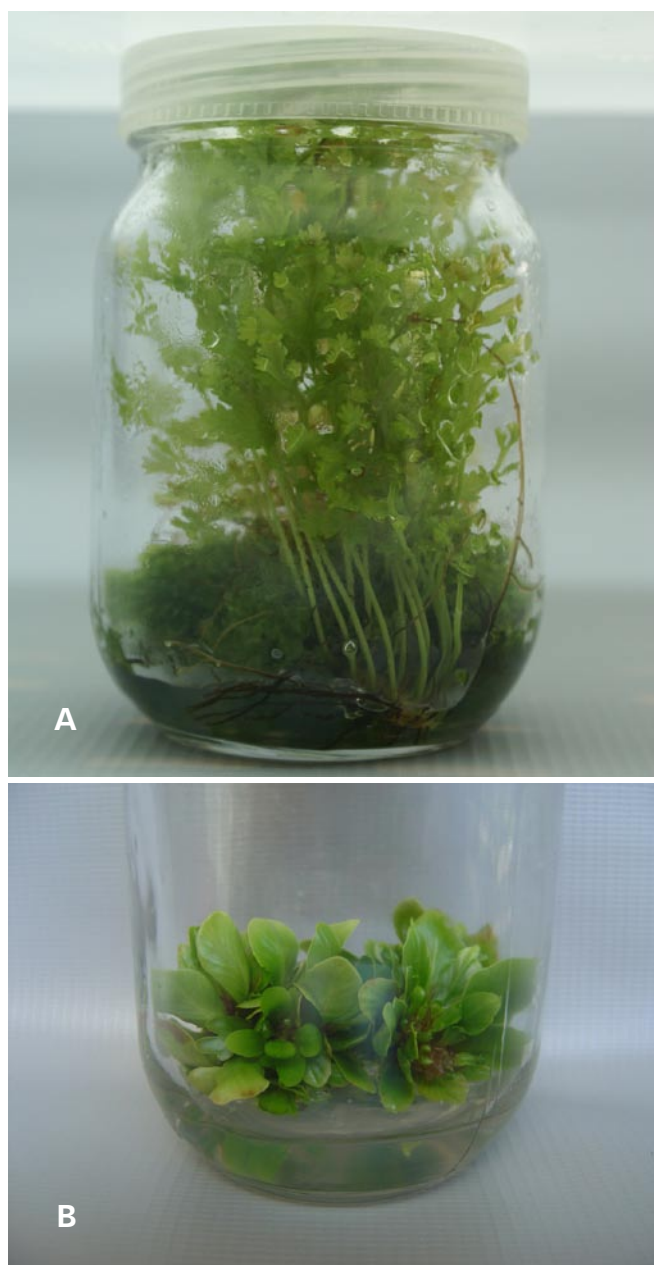


Figura 7. (A) Esporófitos de avencão (*Rumohra adiantiformis*); (B) e de asplênio (*Asplenium nidus*) aproximadamente aos 270 dias após a inoculação dos esporos.

Fotos: João Paulo Saraiva Moraes

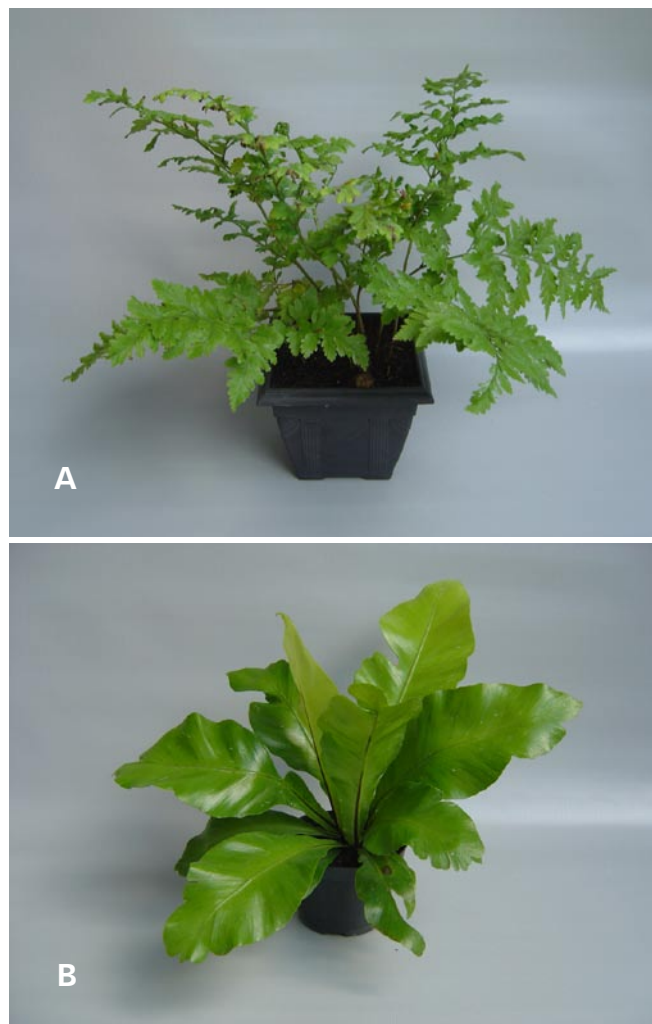


Figura 8. (A) Plantas aclimatizadas de avencão (*Rumohra adiantiformis*); (B) e de asplênio (*Asplenium nidus*) com 6 meses de idade após o plantio.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao engenheiro agrônomo José Rubens Aguiar pelo fornecimento do material genético.

Referências

- CORREIA, D.; GONÇALVES, A. N.; COUTO, H. Y. Z.; RIBEIRO, M. C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação in vitro. **IPEF**, n. 48/49, p. 107-116, 1995.
- COZER, C. E. P.; DOMHORT, M. L.; SAAB, M. S. M.; NEVES, M. F. Marketing e estratégia em flores. **Agroanalysis**, v. 28, n. 5, p. 35-36, 2008.
- DEBERG, P. In vitro culture of ornamentals. In: VASIL, I. K.; T. A. THORPE (Ed.). **Plant Cell and Tissue Culture**. Dordrecht: Kluwer, 1994. p. 561-573.
- FERNANDEZ, H.; BERTRAND, A.; SANCHEZ-TAMES, R. In vitro regeneration of *Asplenium nidus* L. from gametophytic and sporophytic tissue. **Scientia Horticulturae**, v. 56, p. 71-77, 1993.
- FERNANDEZ, H.; BERTRAND, A.; SANCHEZ-TAMES, R. Biological and nutritional aspects involved in fern multiplication. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 56, p. 211-214, 1999.
- FERNANDEZ, H.; REVILLA, M.A. In vitro culture of ornamental ferns. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 73, p. 1-13, 2003.
- GILMAN, E. F. *Rumohra adiantiformis*. Fact Sheet FPS-515. University of Florida, oct., 1999. 3 p.
- GUIMARAES, P. T. C.; PASQUAL, M.; MIRANDA, A. M. P. Efeito de diferentes concentrações de nitrogênio e de sacarose sobre a propagação "in vitro" da samambaia-espada [*Nephrolepis exaltata* (L.) Schott]. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n.2, p. 309-316, abr./jun. 1999.
- JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Exportações de flores e plantas ornamentais superam US\$ 35 milhões em 2007: recorde e novos desafios para o Brasil. **Hortica News**. Disponível em: < <http://www.hortica.com.br/news.php> >. Acesso em: 11 nov. 2008.
- LORENZI, H.; SOUZA, H. M. de. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. Nova Odessa: Plantarum, 1995. 736 p.
- KHAN, S.; RAZIQ, M.; KAYANI, H. A. In vitro propagation of bird's nest fern (*Asplenium nidus*) from spores. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n. 1, p. 91-97, 2008.
- 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.
- RIBAS, R. P.; SEVERO, C. M.; MIGUEL, L. A. Agricultura familiar, extrativismo e sustentabilidade: o caso dos "samambaieiros" do litoral norte do Rio Grande do Sul. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 45, n. 1, p. 205-226, 2007.

Comunicado Técnico, 145

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria Tropical
Endereço: Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici,
CEP 60511-110 Fortaleza, CE
Fone: (0xx85) 3391-7100
Fax: (0xx85) 3291-7109 / 3291-7141
E-mail: vendas@cnpat.embrapa.br

1ª edição *on line*: dezembro de 2009

Comitê de Publicações

Presidente: Antonio Teixeira Cavalcanti Júnior
Secretário-Executivo: Marco Aurélio da R. Melo
Membros: Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho,
Antonio Calixto Lima, Diva Correia, Ingrid Vieira
Machado de Moraes, Adriano Lincoln Albuquerque
Mattos e Ebenézer de Oliveira Silva.

Expediente

Supervisor editorial: Marco Aurélio da Rocha Melo
Revisão de texto: Jane Maria de Faria Cabral
Editoração eletrônica: Arilo Nobre de Oliveira
Normalização bibliográfica: Rita de Cassia Costa Cid