



MICROPROPAGAÇÃO DE SAMAMBAIA ARBÓREA (PTERIDOPSIDA) EM RECIPIENTES DE VIDRO E DE POLIETILENO SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PRÓPOLIS E QUALIDADE DE LUZ

Mariana Pereira da Silva ⁽¹⁾; Marcelo Augusto Filardi ⁽²⁾; Ari Medeiros Braga Neto ⁽³⁾

⁽¹⁾ Bolsista, Licencianda do Curso de Ciências Biológicas - Instituto Federal de Minas Gerais (IFMG) - Campus São João Evangelista. psmariana300@gmail.com

⁽²⁾ Professor orientador - Instituto Federal de Minas Gerais (IFMG) - Campus São João Evangelista. marcelo.filardi@ifmg.edu.br

⁽³⁾ Servidor Técnico de Laboratório - Instituto Federal de Minas Gerais (IFMG) - Campus São João Evangelista. ari.braga@ifmg.edu.br

RESUMO

Através da técnica de micropropagação vegetal, há possibilidade de produção em larga escala de plantas de interesse agrícola e ambiental de alta qualidade para produtores de diferentes origens econômicas, contribuindo efetivamente para a expansão agrícola e preservação ambiental. Problemas fitossanitários e qualidade genética foram resolvidos com esta técnica, no entanto, os desafios incluem redução de custos, maior eficiência, desenvolvimento de novas tecnologias e estabelecimento de protocolos seguros. Samambaias arbóreas são pteridófitas altamente exploradas (como as ‘samambaias’ ou ‘xaxins’) em biomas cada vez mais antropizados (como a Mata Atlântica). São plantas de um grupo taxonômico que, evolutivamente, não desenvolveram estruturas botânicas produtoras de sementes, flores ou frutos. A reprodução se dá especialmente por esporos que precisam encontrar ambiente favorável para se desenvolver e formar um indivíduo adulto. O desenvolvimento de mudas de pteridófitas em ambientes naturais pode ser restrito pelas condições inadequadas de luz e umidade, além do crescimento lento. Neste contexto, a micropropagação de samambaias arbóreas (‘samambaias’) pode contribuir com a preservação das espécies e educação ambiental, sensibilizando e mobilizando toda uma comunidade local. Neste propósito, na inexistência de trabalhos científicos nesta linha, este projeto desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do IFMG/SJE tem a perspectiva de estabelecer um protocolo de micropropagação de samambaia arbórea (Pteridopsida) através da germinação de esporos. Para isso, frascos de cultivo vegetal de (vidro e polipropileno) contendo esporos em meio de cultura básico formulado sob diferentes concentrações de própolis (2, 4 e 8 g/mL) foram mantidos sob diferentes qualidade de luz (verde, vermelha, azul, branca, luz natural). Um protocolo deverá ser estabelecido para obter o procedimento experimental mais eficiente na germinação dos esporos da com formação de gametófitos e novos esporófitos. A partir dos dados coletados de dois experimentos independentes (março-junho e julho-outubro), realizados dentro do prazo deste projeto, não foi possível estabelecer um protocolo seguro para reprodução in vitro dos esporos da pteridófito. O extrato de própolis não foi capaz de inibir as contaminações nos frascos para os diferentes tratamentos. Mais estudos necessitam ser conduzidos no sentido de investigar o efeito da autoclavagem sob a bioatividade do extrato de própolis. Pela importância do projeto, um novo ensaio independente está em andamento para investigar as falhas experimentais anteriores e dar continuidade aos trabalhos. Nova submissão do Projeto será realizada em novo Edital.

Palavras-chave: Cultura de tecidos. Esporos. Gametófitos. Samambaiaçu.

1 INTRODUÇÃO

Fatores experimentais como composição do meio de cultivo *in vitro* e qualidade de luz podem otimizar os procedimentos de micropropagação vegetal, mas a contaminação microbiológica pode limitar o sucesso nos resultados (ABDALLA et al., 2022).

Samambaias arbóreas (samambaias ou xaxins) podem atingir mais de 10 metros de altura e são típicas de florestas úmidas. São plantas muito exploradas comercialmente, especialmente no bioma da Mata Atlântica, único bioma protegido por uma lei específica, a Lei da Mata Atlântica nº 11.428/2006 (BRASIL, 2006).

Pela escassez de pesquisas envolvendo reprodução *in vitro* samambaias arbóreas e um protocolo estabelecido para obtenção de mudas através da micropropagação (SUNEETHA et al., 2022), além da dificuldade de germinação de esporos destas plantas em ambiente natural, este projeto visa contribuir com os estudos deste grupo de plantas. Além disso, a alternativa de se utilizar recipientes plásticos, mais baratos e reutilizáveis, livres de bisfenol e atóxicos, pode impactar favoravelmente no custo de produção de mudas micropopagadas, o que ainda é um desafio nesta área biotecnológica.

2 METODOLOGIA

2.1 Local do experimento

Os ensaios experimentais foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais *Campus* São João Evangelista (IFMG|SJE).

2.2 Origem do material propagativo

O material propagativo experimental foi coletado em fragmento de Mata Atlântica do município de São João Evangelista – MG (-18.531032, -42.771813). Para isso, folhas adultas de samambaia arbórea (Pteridopsida) foram coletadas e, em ambiente de laboratório, os esporos foram imediatamente retirados com ajuda de uma espátula, dando início aos trabalhos de desinfecção e preparo das amostras experimentais inoculantes. A identificação botânica da espécie foi realizada por um biólogo da Instituição.

2.3 Meio de Cultivo

O meio de cultura básico MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962) foi formulado a partir de água destilada e deionizada, com pH ajustado para $5.8 \pm 0,1$ (MS Tecnopon mPA-210®).

2.4 Fase de Estabelecimento

No início dos trabalhos experimentais pilotos (maio 2022), foram conduzidos ensaios sob diferentes concentrações de própolis acrescidos ao meio de cultura MS. Para isso, sob câmera de fluxo laminar (Ideoxima[®] ORG H 1270), os procedimentos se iniciaram com a desinfestação superficial dos esporos utilizando-se solução de álcool 70%, imergindo-se o material por 30 segundos e enxaguando 3 vezes com água destilada, deionizada e autoclavada. Ainda, posteriormente, o material foi imerso em solução de hipoclorito de sódio comercial (2,5%) acrescido do espalhante adesivo Tween[®] (4 gotas/100 ml). Em seguida, cinco enxágues com água destilada, deionizada e autoclavada finalizam a etapa de desinfecção.

A inoculação dos esporos foi realizada em recipientes de vidro transparente (250 mL) e polipropileno transparente (250 mL) contendo meio de cultura MS e os tratamentos diferenciam de própolis (2, 4 e 8 g/mL). Para isso, com auxílio de uma pipeta plástica graduada, uma gota contendo a suspensão estéril de esporos da pteridófito foi depositada no meio de cultura preparado nos diferentes tratamentos. O estabelecimento nesta fase piloto foi conduzido em câmara de cultivo por 30-40 dias, sob fotoperíodo de 16 h e temperatura de 25 ± 2 °C. Foram considerados como estabelecidos os esporos vivos germinados e gametófitos formados que, aparentemente, não apresentarem oxidação excessiva e contaminação bacteriana ou fúngica.

Nesta fase é que serão definidas as concentrações de própolis que fornecerem os melhores resultados na germinação dos esporos da samambaiaçu, na presença ou ausência de própolis, nos diferentes tipos de frascos. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool 70% e radiação ultravioleta por 30 min. Todos os materiais, instrumentais e vidraria foram esterilizados em autoclave vertical (Phoenix[®]) por 20 min (121 °C e 1,0 kgf/cm²).

Inicialmente, todos os tratamentos foram mantidos em sala escura por sete dias após a inoculação in vitro. Após este tempo, todos os meios foram transferidos para a sala de cultivo e mantidos por 60 dias em diferentes condições de qualidade de luz: luz branca, verde, vermelha e azul (Foxlux[®] Led Bulbo 7W), sob fotoperíodo de 16 h e temperatura de 25 ± 2 °C. São considerados como estabelecidos os esporos vivos germinados que, aparentemente, não apresentaram senescência, oxidação excessiva e contaminação bacteriana ou fúngica.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos mostraram a necessidade de readequação metodológica já na primeira etapa inicial do experimento. Após três meses, não houve germinação dos esporos da samambaia arbórea em nenhum dos tratamentos. Ao contrário, em 2022, resultados preliminares obtidos em ensaios experimentais anteriores (LEITE et al., 2022), foram mais promissores, com obtenção de esporos germinados de *Pteridopsida* *in vitro* já no segundo mês dos trabalhos (**Figura 2**).



Figura 2. Vista parcial dos ensaios experimentais envolvendo a germinação de esporos de ‘samambaia arbórea’ (*Pteridopsida*) em diferentes qualidade de luz (verde, amarela), conduzidos em sala de cultivo do Laboratório de Cultura de Tecidos do IFMG|SJE. Fonte: Acervo dos autores.

Suspeitando-se do grau de maturação das folhas da planta-mãe coletadas em campo, novo experimento foi realizado, utilizando-se folhas mais maduras e cheias de esporângios. Infelizmente, o nível de contaminação foi elevado nos diferentes tratamentos (**Figura 3**).



Figura 3. Frascos de vidro e de plástico em um segundo procedimento experimental de inoculação dos esporos de ‘samambaia arbórea’ (*Pteridopsida*) conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do IFMG|SJE. Detalhe para o elevado nível de contaminação do meio de cultura. Fonte: acervo dos autores.

Assim, de acordo com os objetivos propostos inicialmente, não foi possível, a partir dos resultados obtidos, emitir um parecer seguro sobre o efeito comparativo das diferentes qualidades de luz (verde, vermelha, azul, amarela, branca, luz ambiente) ou, ainda,

dos recipientes de polietileno comparativamente aos frascos de vidro tradicionais na germinação dos esporos de ‘samambaiçu’.

Em relação ao efeito das diferentes concentrações de própolis no estabelecimento dos esporos, uma primeira percepção é a de que o extrato não foi capaz de impedir as contaminações sejam nos frascos plásticos ou nos frascos de vidro. No entanto, despertou-se a discussão de que, talvez, o processo de autoclavagem possa ter inativado os princípios bioativos da própolis e impedindo a ação de seu efeito antimicrobiano nos meios de culturas. Essa percepção levou ao planejamento de novos ensaios com testes experimentais do extrato de própolis incluídos em meios de cultivo *in vitro* antes e após a autoclavagem.

4 CONCLUSÃO

O extrato de própolis não foi capaz de inibir as contaminações nos frascos para os diferentes tratamentos. Os dados coletados em dois experimentos conduzidos independentemente, não forneceram um protocolo seguro para reprodução *in vitro* de esporos de ‘samambaiçu’. Mais estudos necessitam ser conduzidos no sentido de investigar o efeito da autoclavagem sob a bioatividade do extrato de própolis.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, N. et al. An academic and technical overview on plant micropropagation challenges. **Horticulturae**, v. 8, n. 8, p. 677, 2022.

BRASIL, 2006. **Lei Nº 11.428, de 22 de dezembro de 2006**. Dispõe sobre a utilização e proteção da vegetação nativa do Bioma Mata Atlântica, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2006/lei/l11428.htm> Acesso em: LEITE, M.P.; FILARDI, M.A.; NETO, A.M.B. Propagação *in vitro* de samambaiçu sob diferentes concentrações de própolis, fungicida e qualidade de luz. **Anais da I Mostra do Ensino, Pesquisa e Extensão**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais. São João Evangelista, nov. 2022 (em processo de publicação).

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

SUNEETHA, C.; HEGDE, S. Micropropagation of Pteridophytes. In: Marimuthu, J. et al. (eds) **Ferns**. Springer, Singapore, 2022.