

FRÂNCIS MARIA ROXO DE BRUM

EFEITOS DE DIFERENTES NÍVEIS DE LUZ,  
TEMPERATURAS E CRIOPRESERVAÇÃO NA GERMINAÇÃO E  
CRESCIMENTO INICIAL DE *Rumohra adiantiformis* (FORST.) CHING  
(DRYOPTERIDACEAE)

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós Graduação em  
Biologia Vegetal da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para Obtenção de grau  
de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dra. Áurea Maria Randi

Florianópolis

2001

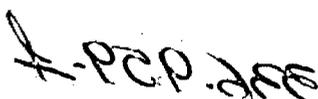
**"EFEITOS DE DIFERENTES NÍVEIS DE LUZ, TEMPERATURAS E CRIOPRESERVAÇÃO NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE *Rumohra adiantiformis* (FORST.) CHING (DRYOPTERIDACEAE) "**

**POR**

**FRANCIS MARIA ROXO DE BRUM**

**Dissertação julgada e aprovada, em sua forma final, pelo Orientador e membros da Comissão Examinadora.**

**Comissão Examinadora:**



---

**Profa. Dra. Aurea Maria Randi  
(BOT/CCB/UFSC)**



---

**Profa. Dra. Maria Terezinha Silveira Paulilo  
(BOT/CCB/UFSC)**



---

**Prof. Dr. Luciano Mauricio Esteves  
(IB/SP)**

*“Deus, tu que és mentor do universo e que habitas aqui, bem próximo, dentro de nós, te agradeço pela vida...”*

*“Dedico este trabalho à  
minha mãe, Néia, como  
reconhecimento da sua luta,  
coragem e exemplo, e aos  
meus irmãos Francisco e  
Franc.”*

## AGRADECIMENTOS

Ao Eng. Agrônomo MARCOS GENRO DE BRUM, meu marido, pelo incentivo, companheirismo, apoio e pelas longas madrugadas de amor.

Aos filhos ALEXSANDER e AGATHA (gerada durante o curso), pelo carinho e compreensão nos momentos de ausência e intolerância.

Ao DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA, pela oportunidade de realização do curso.

A Doutora AUREA MARIA RANDI, pela orientação e testemunho de companheirismo, humanismo e amizade.

A Doutora MARIA TEREZINHA SILVEIRA PAULILO, coordenadora do mestrado, pela boa vontade e pronto atendimento As solicitações de recursos.

A Doutora ANA MARIA VIANA, pelo uso da sala de crescimento e da câmara de fluxo laminar.

Ao Eng. Agrônomo RUDINEI CONTE, pela incansável coleta das frondes férteis, razão e objetivo do presente trabalho.

A Doutora Maria Leonor D'El Rei Souza, pelo auxílio taxonômico.

A LUIZA MARIA PEIXOTO, laboratorista do Depto de Fitotecnia, do CCA/UFSC, sem a qual não seria possível a obtenção das fotografias do trabalho.

Aos colegas de mestrado, pelas horas compartilhadas em campo, em sala de aula, em frente ao computador, que nos trouxeram grande aprendizado acadêmico e humano, em especial A bióloga ROSELI BAITLER ZAREMBA LISBOA, Eng. Agrônoma CLAUDETE SANTA CATARINA e ao geógrafo OSCAR IZA.

Aos PROFESSORES do curso que tão dedicadamente despenderam do seu tempo, proporcionando o melhor de si e dos recursos disponíveis para orientar essa turma pioneira de mestrandos, em especial aos doutores ADEMIR REIS, EDUARDO JUAN SORIANO-SIERRA e MAIKE HERING DE QUEIROZ.

Aos funcionários do Depto de Botânica/UFSC, XISTO, NAURO e SILVANA, pelo apoio e bom humor.

Aos administradores das FLONAS de Três Barras e Ibirama, da RPPN de Caraguatá e da Estação Ecológica de Carijós, pela recepção e oportunidade de aperfeiçoamento do nosso conhecimento acadêmico.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS-----	05
RESUMO-----	09
1- INTRODUÇÃO-----	11
2 – OBJETIVOS GERAIS-----	15
3 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS-----	15
4 – MATERIAL E MÉTODOS-----	16
4.1- Métodos Gerais-----	16
4.1.1- Obtenção do material-----	16
4.1.2- Método para quantificação do número de esporos-----	16
4.1.3- Método geral de germinação e esterilização-----	16
4.1.4- Método para determinação dos diferentes níveis de luz-----	17
4.1.5- Método para determinação do potencial de água dos esporos de <i>Rumohra adiantiformis</i> -----	17
4.2- Métodos Específicos-----	17
4.2.1- Germinação de esporos de <i>Rumohra adiantiformis</i> em diferentes níveis de luz -----	18
4.2.2- Germinação de esporos de <i>Rumohra adiantiformis</i> em diferentes temperaturas -----	18
4.2.3- Criopreservação de esporos-----	18
4.2.3.1- Análise da germinação de esporos de <i>Rumohra adiantiformis</i> sob criopreservação-----	18
4.2.3.2- Análise do crescimento inicial de gametófitos de <i>Rumohra adiantiformis</i> provenientes de esporos criopreservados-----	19
4.2.3.3- Análise do crescimento inicial de esporófitos de <i>Rumohra adiantiformis</i> provenientes de esporos criopreservados-----	19
4.2.4- Efeito do período de armazenamento de esporos em nitrogênio líquido na germinação de esporos de <i>Rumohra adiantiformis</i> -----	19
4.2.5- Determinação da matéria fresca e seca dos gametófitos e esporófitos de <i>Rumohra adiantiformis</i> -----	20
4.2.6- Determinação da taxa de crescimento relativo de esporófitos de <i>Rumohra</i> <i>adiantiformis</i> -----	20
4.2.7-Extração de açúcares solúveis totais-----	20
4.2.8- Extração de clorofila-----	21
4.2.9- Análise estatística-----	22
5- RESULTADOS-----	23
5.1- Efeito de diferentes níveis de luz na germinação de esporos de <i>Rumohra</i> <i>adiantiformis</i> -----	23
5.2- Efeito de diferentes temperaturas na germinação de esporos de <i>Rumohra</i> <i>adiantiformis</i> -----	29
5.3- Efeito do armazenamento dos esporos de <i>Rumohra adiantiformis</i> sob refrigeração -----	37
5.4- Efeito da criopreservação durante 15 minutos na germinação dos esporos de <i>Rumohra adiantiformis</i> -----	37
5.5- Efeito da criopreservação durante 90 dias na germinação dos esporos de <i>Rumohra</i> <i>adiantiformis</i> -----	42
5.6- Crescimento inicial de gametófitos de <i>Rumohra adiantiformis</i> provenientes de	

esporos criopreservados-----	42
5.7- Crescimento inicial de esporófitos de <i>Rumohra adiantiformis</i> provenientes de esporos criopreservados-----	49
6- DISCUSSÃO-----	67
7- CONCLUSÕES-----	76
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	78
9- ANEXOS-----	86

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> A 83% E 91% DE REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE LUZ, NO VERÃO DO ANO 2000, FLORIANÓPOLIS, SC/BRASIL. -----	24
FIGURA 2: GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> A 83% E 91% DE REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE LUZ, NO OUTONO DO ANO 2000, FLORIANÓPOLIS, SC/BRASIL. -----	25
FIGURA 3: GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> A 28% E 46% DE REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE LUZ, NO OUTONO DO ANO 2000, FLORIANÓPOLIS, SC/BRASIL. -----	26
FIGURA 4: GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> A 83% E 91% DE REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE LUZ, NO INVERNO DO ANO 2000, FLORIANÓPOLIS, SC/BRASIL. -----	27
FIGURA 5: COMPARAÇÃO DA PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> A 28%, 46%, 83% E 91% DE REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE LUZ, NO OUTONO DO ANO 2000, FLORIANÓPOLIS, SC/BRASIL. -----	28
FIGURA 6: COMPARAÇÃO DA PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> A 83% DE REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE LUZ, NO VERÃO (I), OUTONO (II) E INVERNO (III), DO ANO 2000, FLORIANÓPOLIS, SC/BRASIL. -----	30
FIGURA 7: COMPARAÇÃO DA PERCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> A 91% DE REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE LUZ, NO VERÃO (I), OUTONO (II) E INVERNO (III), DO ANO 2000, FLORIANÓPOLIS, SC/BRASIL. -----	31
FIGURA 8: GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> A 15°C. -----	33
FIGURA 9: GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> A 20°C. -----	34
FIGURA 10: GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> A 25°C. -----	32
FIGURA 11: GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> A 30°C. -----	35
FIGURA 12: COMPARAÇÃO DA PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> EM DIFERENTES TEMPERATURAS -----	36

FIGURA 13: GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> APÓS DIFERENTES PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO SOB REFRIGERAÇÃO. -----	38
FIGURA 14: GERMINAÇÃO DE ESPOROS CRIOPRESERVADOS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> , ESTERILIZADOS, CRIOPROTEGIDOS, DEGELADOS LENTA E RAPIDAMENTE. -----	39
FIGURA 15: GERMINAÇÃO DE ESPOROS CRIOPRESERVADOS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> , NÃO ESTERILIZADOS, NÃO CRIOPROTEGIDOS, DEGELADOS LENTA E RTAPIDAMENTE. -----	40
FIGURA 16: GERMINAÇÃO DE ESPOROS CRIOPRESERVADOS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> , ESTERILIZADOS, NÃO CRIOPROTEGIDOS, DEGELADOS LENTA E RAPIDAMENTE -----	41
FIGURA 17: GERMINAÇÃO DE ESPOROS CRIOPRESERVADOS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> , NÃO ESTERILIZADOS, CRIOPROTEGIDOS, DEGELADOS LENTA E RAPIDAMENTE -----	43
FIGURA 18: COMPARAÇÃO DA PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE ESPOROS CRIOPRESERVADOS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> -----	44
FIGURA 19: GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> CRIOPRESERVADOS DURANTE 90 DIAS. -----	45
FIGURA 20: VARIAÇÃO DA MATÉRIA FRESCA DOS GAMETÓFITOS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> PROVENIENTES DE ESPOROS CRIOPRESERVADOS. -----	46
FIGURA 21: VARIAÇÃO DA MATÉRIA SECA DOS GAMETÓFITOS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> PROVENIENTES DE ESPOROS CRIOPRESERVADOS. -----	47
FIGURA 22: TEOR DE CLOROFILA TOTAL DOS GAMETÓFITOS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> PROVENIENTES DE ESPOROS CRIOPRESERVADOS. -----	48
FIGURA 23: TEOR DE CLOROFILA “A” DOS GAMETÓFITOS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> PROVENIENTES DE ESPOROS CRIOPRESERVADOS. -----	50
FIGURA 24: TEOR DE CLOROFILA “B” DOS GAMETÓFITOS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> CRIOPRESERVADOS. -----	51

FIGURA 25: TAXA DE CLOROFILA (A/B) DOS GAMETÓFITOS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> PROVENIENTES DE ESPOROS CRIOPRESERVADOS -----	52
FIGURA 26: TEOR DE AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS DOS GAMETÓFITOS DE <i>RUMOHRA</i> <i>ADIANTIFORMIS</i> PROVENIENTES DE ESPOROS CRIOPRESERVADOS. -----	53
FIGURA 27: NÚMERO DE FRONDES DOS ESPORÓFITOS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> PROVENIENTES DE ESPOROS CRIOPRESERVADOS E DEGELADOS LENTAMENTE. -----	55
FIGURA 28: NÚMERO DE FRONDES DOS ESPORÓFITOS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> PROVENIENTES DE ESPOROS CRIOPRESERVADOS E DEGELADOS RAPIDAMENTE. -----	56
FIGURA 29: ALTURA DAS FRONDES DOS ESPORÓFITOS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> PROVENIENTES DE ESPOROS CRIOPRESERVADOS E DEGELADOS LENTAMENTE. -----	57
FIGURA 30: ALTURA DAS FRONDES DOS ESPORÓFITOS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> PROVENIENTES DE ESPOROS CRIOPRESERVADOS E DEGELADOS RAPIDAMENTE. -----	58
FIGURA 31: TAXA MÉDIA DE CRESCIMENTO RELATIVO DA PRIMEIRA FRONDE DOS ESPORÓFITOS PROVENIENTES DE ESPOROS CRIOPRESERVADOS ENTRE 25 E 33 SEMANAS DE CULTIVO. -----	71
FIGURA 32: VARIAÇÃO DA MATÉRIA FRESCA DOS ESPORÓFITOS DE <i>RUMOHRA</i> <i>ADIANTIFORMIS</i> , PROVENIENTES DE ESPOROS CRIOPRESERVADOS, COM 42 SEMANAS DE CULTIVO. -----	60
FIGURA 33: VARIAÇÃO DA MATÉRIA SECA DOS ESPORÓFITOS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> PROVENIENTES DE ESPOROS CRIOPRESERVADOS, COM 42 SEMANAS DE CULTIVO. -----	61
FIGURA 34: TEOR DE CLOROFILA TOTAL DOS ESPORÓFITOS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> PROVENIENTES DE ESPOROS CRIOPRESERVADOS, COM 42 SEMANAS DE CULTIVO. -----	62
FIGURA 35: TEOR DE CLOROFILA “A” DOS ESPORÓFITOS DE <i>RUMOHRA ADIANTIFORMIS</i> PROVENIENTES DE ESPOROS CRIOPRESERVADOS, COM 42 SEMANAS DE CULTIVO. -----	63

FIGURA 36: TEOR DE CLOROFILA "B" DOS ESPORÓFITOS DE *RUMOHRA ADIANTIFORMIS*  
PROVENIENTES DE ESPOROS CRIOPRESERVADOS, COM 42 SEMANAS DE CULTIVO. ----- 65

FIGURA 37: TAXA DE CLOROFILA (A/B) DOS ESPORÓFITOS DE *RUMOHRA ADIANTIFORMIS*  
PROVENIENTES DE ESPOROS CRIOPRESERVADOS. ----- 66

## RESUMO

*Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching é uma pteridófita terrestre, rupestre, epífita crescendo em habitats como solo arenoso descoberto, áreas arbustivas, rochas, florestas, ocorrendo desde o nível do mar até altitudes acima de 2400 m, nos Andes. É explorada para confecção de arranjos florais. Este trabalho foi desenvolvido para analisar efeitos de algumas temperaturas, níveis de luz e criopreservação sobre a germinação e crescimento inicial desta espécie. Esporos de *R. adiantiformis* atingiram 97% de germinação após 10 dias de cultivo sob temperaturas de 20 e 25 °C apresentando inibição e retardo a 30°C. Após 13 meses de armazenamento não houve perda de viabilidade de esporos. Com relação aos efeitos de diferentes níveis de luz, a maior porcentagem de germinação foi obtida pelo tratamento de 91% de redução da luminosidade, implantado na estação do inverno (5-26°C), do ano 2000, cuja curva estabilizou aos 8 dias de cultivo, com 97% de esporos germinados. Reduções de 28 e 46% dos níveis de luz, durante o verão (17-32°C) inibiram completamente a germinação após 40 dias de cultivo. A criopreservação por curtos e médios períodos constituiu-se em um método viável de armazenamento de esporos de *R. adiantiformis* quando não esterilizados e não crioprotetidos, acelerando os processos germinativos quando comparados ao controle. A esterilização associada a crioproteção reduziu e retardou drasticamente a germinação dos esporos. Não houve diferença estatística entre os teores de açúcares solúveis totais dos gametófitos oriundos de esporos criopreservados e do controle. A maior taxa de clorofila foi apresentada pelos gametófitos provenientes de esporos esterilizados, criopreservados com ou sem crioproteção e degelados lentamente. Não houve diferença estatística entre o peso de massa fresca e seca dos gametófitos oriundos de todos os tratamentos. Esporófitos provenientes de esporos criopreservados não diferiram do controle quanto ao tamanho da primeira fronde e ao número de frondes produzidas. As maiores taxas de crescimento relativo foram encontradas em esporófitos oriundos de esporos não esterilizados, criopreservados com crioprotetor e degelados lentamente e dos esporos esterilizados, criopreservados sem crioproteção e degelados lentamente. O menor teor de clorofila total foi obtido nos esporófitos provenientes de esporos não esterilizados, criopreservados sem crioproteção e degelados rapidamente. Os demais tratamentos não diferiram do controle. Todos os tratamentos de

criopreservação produziram esporófitos com peso de massa fresca e seca inferiores ao controle.

## 1- INTRODUÇÃO

*Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching, pertence a ordem Filicales, onde todas as plantas são homosporadas e originam gametófitos verdes, dióicos, cordiformes, com numerosos rizóides na superfície central inferior. Essa pteridófita é uma espécie terrestre, rupestre ou raramente epífita, crescendo numa variedade de habitats, desde solo arenoso descoberto, áreas com arbustos, sobre rochas até florestas. Sua ocorrência é observada desde o nível do mar até altitudes acima de 2.400m, nos Andes do Peru (KATO, 1974; TRYON & STOLZE, 1991).

Atualmente, *R. adiantiformis* é uma das espécies de folhagem para corte mais conhecida no mundo. O excepcional período de vida das folhas após o seu corte, quando acondicionadas em vaso, fez com que esta planta se tornasse uma das mais populares para compor arranjos florais (MILTON & MOLL, 1988).

A maior parte da produção mundial de folhas da samambaia ocorre na Flórida, onde o cultivo é realizado em condições controladas (STAMPS *et al.*, 1994). No entanto, em países como a República da África do Sul e o Brasil, onde existem populações naturais da espécie a colheita é feita diretamente no campo (MILTON & MOLL, 1988; LORENZI & SOUZA, 1995).

Neste aspecto, existe pouca informação na literatura mundial sobre demografia, produção de frondes ou efeitos da colheita sobre a dinâmica demográfica da espécie.

Um estudo realizado na Província do Cabo, África do Sul, mostrou que a densidade média de plantas em 25 locais investigados foi de 4 por m<sup>2</sup>. As maiores densidades ocorreram em capoeiras, com presença de pedras, e nas clareiras de florestas (MILTON & MOLL, 1988).

O acompanhamento da exploração comercial no Sul da África realizado por MILTON & MOLL (1988), mostrou que a retirada de frondes geralmente excedia a sua produção no primeiro ano de exploração da área. Nos anos subsequentes o volume extraído era menor, sendo que esse decréscimo era positivamente correlacionado com o decréscimo no tamanho das frondes. Além disso, o índice de área fotossintética de plantas de *Rumohra* decresceu de ano para ano em populações exploradas, e esse decréscimo foi maior onde a exploração era realizada intensamente. Esses resultados sugerem que o potencial de produção de *Rumohra* no Sul da África foi grosseiramente superestimado para exploração comercial. Segundo os autores desse trabalho, a

exploração da samambaia bem como de outros produtos florestais pode ser sustentável. Porém, informações sobre produtividade das plantas, demografia, ecologia, a fisiologia e o ciclo desenvolvimental da espécie são pré-requisitos para o estabelecimento de um sistema de manejo sustentável.

Segundo DYER (1979), a produção de esporos em samambaias adultas pode ser imensa. Em *Pteridium* sp. (Filicales) uma simples folha pode render mais de um grama de esporos e o conteúdo de uma folha pode apresentar cerca de 300 milhões de esporos. Também, segundo o mesmo autor, um indivíduo de *Dryopteris pseudo-mas* (Filicales) (Wollast.) Holub pode liberar até um bilhão de esporos em 24 horas .

MOHR (1956), cita que a maioria das pteridófitas possui esporos fotossensíveis, cuja dormência pode ser quebrada pela luz. MILLER (1968), constatou que entre 88 espécies estudadas, apenas sete possuíam esporos que germinavam em número considerável na escuridão completa, em condições favoráveis. A fotossensibilidade dos esporos é desenvolvida durante um período de embebição, sob condições aeróbicas, chamado de período de pré-indução (TOWIL & IKUMA, 1975). A duração da pré-indução varia de espécie para espécie, sendo que em diferentes espécies estudadas, os períodos variaram de 13 horas até 4 dias (FURUYA, 1983).

ESTEVES & FELIPPE (1985), estudaram a germinação de nove espécies de pteridófitas: *Adiantum serratodentatum* Willd., *Anemia flexuosa* (Sav.) Sw., *Anemia radiana* Link., *Dryopteris concolor* Langsd. & Fisch., *Polypodium hirsutissimum* Raddi, *Polypodium latipes* Langsd. & Fisch., *Polypodium pleopeltifolium* Raddi, *Polypodium polypodioides* (L.) Watt. Var *minus*, *Polypodium squamulosum* Kaulf. e observaram que apenas duas apresentaram germinação no escuro: *Polypodium pleopeltifolium* e *Polypodium polypodioides*.

Os efeitos da qualidade da luz na germinação de esporos de pteridófitas foram amplamente estudados nas últimas décadas. Por exemplo, TOMIZAWA *et al* (1983), estudando o efeito da luz vermelha na conversão Fv para Fve em *Lygodium japonicum* L. observaram nítida relação entre os níveis de Fve e a germinação. De acordo com SUGAI *et al* (1984) e SUGAI & FURUYA (1985), a luz azul inibiu a promoção da germinação dos esporos de *Pteris vittata* L. e *Adiantum capillus-veneris* L. induzida pela luz vermelha. Os esporos de *Cyathea delgadii* Sternb. apresentaram menos de 2% de germinação após tratamentos de 24 e 48 horas de luz azul sucedendo 48 horas de pré-

indução no escuro, enquanto tratamento semelhante com luz vermelha promoveu 50% de germinação (RANDI & FELIPPE, 1988). SCHOPFER (1984) cita que o criptocromo representa uma variedade de pigmentos morfogenéticos que tem em comum a capacidade de absorver a luz nos espectros azul e ultravioleta e mostram uma semelhança no seu espectro de absorção. Estas substâncias parecem estar envolvidas nestas respostas, pois grandes intensidades luminosas apresentam altos níveis de luz azul, o que provocaria um efeito inibitório da germinação.

As temperaturas exercem influência sobre os efeitos da luz na germinação de esporos de pteridófitas. Por exemplo, TOWILL (1978) observou que a germinação de *Onoclea sensibilis* L. é controlada pela luz e temperatura. Temperatura de 30°C pode induzir a germinação máxima no escuro, se a exposição for de 16 a 24 horas. O autor sugere que a temperatura é necessária para a indução da germinação por alterar a permeabilidade da membrana.

CHEN *et al* (1979) observaram que a fase de pré-indução é sensível a temperatura. Tratamentos de 40°C durante 8 horas ou mais, reduzem o desenvolvimento da fotossensibilidade para um nível muito baixo, o que pode ser revertido pela incubação no escuro a 25°C. Temperaturas inferiores a 25°C exercem menor inibição nas fases de pré e pós-indução, e a 30 e 35°C ocorre um estímulo da germinação nos esporos de *O. sensibilis*.

REYNOLDS (1982) observou que sob altas temperaturas os esporos de *Sphareopteris cooperi* sofreram inibição da germinação durante a fase da fosforilação oxidativa da respiração que é resistente ao cianeto por induzir a respiração via rota alternativa, da fase sensível ao cianeto podendo anular os efeitos da fotoindução.

HAUPT (1990) estudando a inibição da germinação dos esporos de *Dryopteris paleacea* (Sw.) Hand.-Mazz. causada por elevadas temperaturas, observou que o aumento da temperatura para 27°C, inibiu a fase de acoplamento. A transferência de 22°C para temperaturas mais elevadas promoveu a germinação. Aumentando a temperatura para 32°C, a germinação não excedeu a 2%. O referido trabalho evidencia que a temperatura afeta a germinação restringindo a fase de acoplamento, isto é, fase em que o fitocromo desencadeia uma reação de tradução de sinais em cadeia.

A criopreservação é a estocagem de células vivas em temperaturas ultrabaixas, normalmente em nitrogênio líquido. Esse método de conservação é muito usado para

culturas de interesse econômico e constitui-se num importante componente de programas de biotecnologia vegetal (BENSON *et al.*, 1998). Esta técnica envolve uma série de estresses que podem desestabilizar o material vegetal promovendo modificações em culturas vegetais regeneradas. Isso é importante para a verificação da estabilidade genética do material recuperado de exemplares criopreservados após armazenamento por longos períodos. A não modificação fenotípica, bioquímica, molecular ou cromossomal tem sido observada em vários sistemas biológicos criopreservados: embriões somáticos de palmeira (ENGELMANN, 1991), eixos embrionários e sementes de algodão (GONZALEZ-BENITO *et al.*, 1998).

A viabilidade celular é mantida durante a criopreservação por meio de substâncias crioprotetoras como o dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, sacarose e prolina, resultando num aumento de sobrevivência após o degelo, quando comparado ao uso de apenas um crioprotetor, por exemplo, o DMSO (LYNCH & BENSON, 1991).

Neste trabalho foram estudados os efeitos de temperaturas entre 15 e 30°C, reduções de níveis de luz, período de armazenamento e criopreservação na germinação e crescimento inicial de *Rumohra adiantiformis*, através da análise de açúcares solúveis totais, teor de clorofila, número de frondes e comprimento da primeira fronde como parâmetros de crescimento.

## 2- OBJETIVOS GERAIS

Analisar a germinação sob diferentes níveis de luz, temperaturas, período de armazenamento e métodos de criopreservação de esporos bem como o crescimento inicial de gametófitos e esporófitos de *Rumohra adiantiformis* provenientes de esporos criopreservados.

## 3- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1- Estudar o efeito de diferentes níveis de luz na germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis*.

3.2- Estudar o efeito de temperaturas constantes na germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis*.

3.3- Estudar o efeito do período de armazenamento na germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis*.

3.4- Analisar o efeito da criopreservação na germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis*.

3.5- Analisar o crescimento inicial de gametófitos e esporófitos de *Rumohra adiantiformis* provenientes de esporos criopreservados, através da análise de açúcares solúveis totais, teor de clorofila, número de frondes e comprimento da primeira fronde, como parâmetros de crescimento.

## 4- MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1-Métodos Gerais:

#### 4.1.1-Obtenção do material:

Esporos de *Rumohra adiantiformis* foram coletados na Área de Preservação Permanente de Ilha Comprida, estado de São Paulo. Frondes férteis foram coletadas nos meses de julho e agosto de 1999 e março de 2000.

Todas as frondes coletadas foram colocadas em bandejas revestidas com papel de filtro, desidratadas em estufa com circulação de ar, durante aproximadamente 72 horas, a temperatura ambiente, para induzir a deiscência dos esporângios e liberação dos esporos. Após, os esporos foram separados por filtração em papel de lente e foram estocados em frascos de vidro, sob refrigeração a  $4^{\circ}\text{C} \pm 1$  (Randi, 1987).

#### 4.1.2- Método para quantificação do número de esporos:

Utilizou-se uma micropipeta com capacidade de  $5\mu\text{l}$  para retirar os esporos do erlenmeyer contendo 50mg de esporos em 20ml de meio Dyer. O conteúdo foi colocado em lâmina, recoberta por lamínula e os esporos foram contados ao microscópio óptico Zeiss. Fez-se uma média aritmética do resultado de dez lâminas avaliadas. Para tanto, estimou-se que em 50mg existem 13.205.600 esporos, aproximadamente.

#### 4.1.3- Método geral de germinação e esterilização:

Foram testadas esterilizações por imersão durante 10 minutos, em soluções a 0, 5, 10, 15 e 20% de hipoclorito de sódio comercial, cujo teor de cloro ativo é de aproximadamente 2%, acrescida de 1 gota de detergente Tween 20 (Labsynth) como substância surfactante. Os esporos esterilizados foram lavados em água destilada e autoclavada até remoção superficial do hipoclorito e filtrados a vácuo sobre papel de filtro. Foram semeados cerca de 50mg de esporos,

utilizando-se uma espátula, em erlenmeyers de 50ml, contendo 20 ml de meio Mohr modificado por Dyer (1979), acrescido de  $100\text{mg.l}^{-1}$  de Benlate para evitar o aparecimento de fungos. O meio foi autoclavado a 1 atm, por 20 minutos. Após a semeadura, os erlenmeyers foram vedados com filme de polipropileno de uso doméstico Assafácil®, cortado em quadrados duplos (7 x 7 cm), fixos por elástico. Foram utilizados dois erlenmeyers por tratamento. Todo o procedimento foi conduzido em capela de fluxo laminar.

A germinação dos esporos ocorreu em sala de cultura com fotoperíodo de 16 horas, a temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa de 74% e densidade de fluxo de fótons de  $31,68\mu\text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  a 30cm dos frascos. Todo o procedimento foi repetido para testar o meio Dyer acrescido de  $200\text{mg.l}^{-1}$  de Benlate.

A solução de hipoclorito de sódio 15% foi selecionada por esterilizar sem interferir na porcentagem final da germinação.

Acompanhou-se a germinação em intervalos de dois dias, avaliando-se quatro lâminas por tratamento onde foram contados 100 esporos por lâmina, em microscópio binocular, em aumento de 100 vezes.

#### 4.1.4- Método para determinação dos diferentes níveis de luz:

Foram construídas quatro caixas de tela sombrite de 50cm x 50cm, cujas reduções da intensidade luminosa total corresponderam a 28, 46, 83 e 91%. Os níveis de luz foram avaliados utilizando-se quantômetro LICOR 250, a partir da média obtida entre cinco repetições por caixa.

#### 4.1.5- Método para determinação do percentual de água dos esporos de *Rumohra adiantiformis*:

Dez amostras de 50mg de esporos foram acondicionadas em envelopes de papel de filtro medindo 4cm x 3cm, procurando-se manter uma extremidade aberta para evaporação da água. As amostras foram armazenadas em estufa a  $75^\circ\text{C}$  por 12 dias. Estabeleceu-se uma média aritmética a partir dos resultados obtidos nas pesagens feitas a cada 4 dias.

#### 4.2- Métodos Específicos:

#### 4.2.1-Germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis* em diferentes níveis de luz:

Para analisar o efeito de diferentes níveis de luz sobre a germinação, esporos esterilizados e semeados em meio Dyer, conforme descrito no item 4.1.3, germinaram em caixas de tela sombrite, (vide 4.1.4) e foram mantidas sob luz solar, nas dependências do Departamento de Botânica da UFSC. Os experimentos foram realizados durante o ano 2000, no final do verão, com início dia 15 de março, no início do outono, com início dia 19 de abril e na metade do inverno, com início dia 27 de agosto. Os erlenmeyers foram acondicionados em bandejas plásticas perfuradas, que permaneceram dentro das caixas no decorrer do experimento. Acompanhou-se a curva de germinação dos esporos a cada dois dias.

#### 4.2.2-Germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis* em diferentes temperaturas:

Foi estudado efeito das temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C, em esporos semeados em meio Dyer, conforme descrito no item 4.1.3, em regime de 16h de luz e densidade de fluxo de fótons de  $21\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . A germinação foi avaliada a cada dois dias. Os testes foram realizados em câmara de germinação produzida pela Instrulab e a temperatura foi monitorada através de termostato Policontrol.

#### 4.2.3- Criopreservação de esporos de *Rumohra adiantiformis*:

##### 4.2.3.1- Análise da germinação dos esporos de *Rumohra adiantiformis* sob criopreservação.

Esporos previamente esterilizados (vide 4.1.2) foram depositados em criofrascos de polipropileno autoclavados, com capacidade para 1ml, submersos em nitrogênio líquido por: a) 15 minutos b) 90 dias, contendo ou não crioprotetor. Foram testados 2 métodos de degelo. Um deles foi o método rápido, que compreende imersão em água a 45°C, por 5 minutos e o outro foi o método lento, a temperatura ambiente, de acordo com AGRAWAL *et al.* (1993). A solução de crioprotetor foi composta de DMSO (Nuclear®) a 15%, em glicerol 1M,( ROGGE, 2000) diluídos em meio Dyer. As amostras de esporos foram embebidas em solução de crioprotetor por 2 horas. Após a imersão em nitrogênio líquido e degelo, os esporos foram lavados com água

destilada e autoclavada e filtrados a vácuo para semeadura em meio Dyer. Este procedimento foi executado para esporos congelados ou não. Foram testados esporos não esterilizados sem crioprotetor (NS), esporos não esterilizados com crioprotetor (NC), esporos esterilizados com crioprotetor (EC), e esporos esterilizados sem crioprotetor (ES). Utilizaram-se dois erlenmeyers por tratamento. A germinação foi avaliada de dois em dois dias até a estabilização da curva.

4.2.3.2- Análise do crescimento de gametófitos de *Rumohra adiantiformis* provenientes de esporos criopreservados:

Após a estabilização da curva de germinação dos esporos criopreservados, os gametófitos foram transferidos para quatro placas de petri, por tratamento, contendo solo PLANTMAX<sup>®</sup> e foram cultivados em câmara de crescimento. Após dez semanas de cultivo, foram sorteadas 12 amostras de gametófitos, de peso inicial conhecido, por tratamento, para análise. Foram analisados o aumento da massa fresca (PF), açúcares solúveis totais (AST) e clorofila. Obteve-se uma média aritmética entre os valores quantificados como resultado.

4.2.3.3-Análise do crescimento de esporófitos de *Rumohra adiantiformis* provenientes de esporos criopreservados:

Os esporófitos com 19 semanas de cultivo, provenientes de esporos criopreservados, apresentando a primeira fronde, foram retirados das placas de petri, com auxílio da lupa, e transplantados para vasos de mini-violetas. Foram sorteados 15 esporófitos, por tratamento, para avaliar quinzenalmente, o número de frondes e comprimento da maior fronde. Ao final do experimento, avaliou-se a massa fresca (PF), massa seca (PS), teor de clorofila e a taxa de crescimento relativo para cada tratamento.

4.2.4- Efeito do período de armazenamento de esporos em nitrogênio líquido na germinação dos esporos de *Rumohra adiantiformis*:

As amostras de esporos foram acondicionadas em criofrascos (vide 4.2.3.1) e foram mantidas em tambor de nitrogênio líquido durante 90 dias. Após o período de armazenamento, as amostras foram submetidas ao degelo rápido e lento. Analisou-se a germinação.

#### 4.2.5-Determinação da matéria fresca e seca dos gametófitos e esporófitos de *Rumohra adiantiformis*:

Doze amostras de 50mg de gametófitos, por tratamento, foram embaladas em envelopes de papel de filtro medindo 4cm x 3cm, procurando-se manter uma extremidade aberta para evaporação da água. Dez esporófitos, por tratamento, foram lavados em água corrente para remoção das partículas de solo das raízes, pesados e embalados em sacos de papel medindo 20cm x 12cm, procurando-se manter uma extremidade aberta para evaporação da água. As amostras foram armazenadas em estufa com circulação de ar, a 75°C, por 12 dias. Estabeleceu-se uma média aritmética a partir dos resultados obtidos nas pesagens feitas a cada 4 dias.

#### 4.2.6- Determinação da taxa de crescimento relativo dos esporófitos de *Rumohra adiantiformis*:

A taxa de crescimento relativo foi calculada de acordo com BENABE *et al* (1999), a partir da fórmula:

$$L_2 - L_1 / t_2 - t_1$$

Onde:  $L_2$  é o logaritmo da altura da fronde no tempo 2 ( $t_2$ ) e  $L_1$  é o logaritmo da altura da fronde no tempo 1 ( $t_1$ ).

#### 4.2.7- Extração de açúcares solúveis totais:

Foram utilizadas 4 amostras de 50 mg, por tratamento de criopreservação (vide 4.2.3.1), após 10 semanas de cultivo para análise do desenvolvimento dos gametófitos. As amostras foram maceradas separadamente em graal, a seco, até sua homogeneização. Foram acrescentados 4ml de MCW (metanol - Omnisolv® EM Science / clorofórmio -Merck® / água, na proporção 12:5:3 v/v), de acordo com adaptação do método de Shannon (1968). Após, foram

centrifugadas por 5 minutos, a 2000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o precipitado extraído novamente com 2ml de MCW. O sobrenadante foi acrescido ao anterior. Mediu-se o volume total. O extrato foi quantificado e fracionado na seguinte proporção: 4 partes extrato:1,5 parte de clorofórmio:1 parte de água. Após, foram centrifugados por 10 minutos, a 2000 rpm. A fase superior (aquosa) foi retirada com uma pipeta Pasteur e o volume foi medido em tubo de centrifugação graduado. As fases aquosas foram guardadas sob refrigeração.

Açúcares solúveis totais foram dosados das fases aquosas, utilizando-se o reagente de antrona (McCready *et al*, 1950). Foram dissolvidos 200mg de antrona (Vetec®) em 100ml de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>- Merck®) 95%. Aliquotas de 1ml dos extratos foram acrescidas de 2ml do reagente de antrona. Os tubos de ensaio foram agitados e aquecidos até a ebulição, durante 5 minutos. Os cálculos de açúcares solúveis totais foram obtidos a partir dos resultados da reta padrão, para a qual foram usadas concentrações de 20 a 100µg de glicose por mililitro. Foram feitas três leituras por amostra a 620nm em espectrofotômetro digital MICRONAL® B 342 II.

#### 4.2.8- Extração de clorofila:

Foram utilizadas 4 amostras de 50 mg, por tratamento de criopreservação (vide 4.2.3.1), com peso inicial conhecido, após 10 semanas de cultivo, para análise do desenvolvimento dos gametófitos e 10 amostras, por tratamento, após 42 semanas de cultivo para análise do desenvolvimento dos esporófitos. As amostras foram maceradas a seco, em graal, adicionando-se 5ml de acetona 80% Merck®. O conteúdo foi transferido para tubos de centrifugação, revestidos com papel alumínio e vedados com filme de PVC. Foram adicionados mais 5ml de acetona 80% Merck® ao graal para remoção dos resíduos. Estes foram adicionados aos tubos de centrifugação. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos, a 2000 rpm. O sobrenadante foi transferido para frasco escuro. O precipitado foi acrescido de 10ml de acetona 80% e foi repetida a centrifugação. Os sobrenadantes foram agrupados e os volumes medidos em proveta, completando-se com acetona até 20ml. Foram feitas 3 leituras por amostra, em espectrofotômetro digital MICRONAL® B 342 II, a 645, 652 e 663nm, conforme Arnon (1949). Os cálculos dos conteúdos de clorofila seguiram a equação:

Para clorofila a:

$$Cl_a = \frac{[12,7x(A663)] - [2,69x(A645)]}{1000} \times \text{Vol(ml)} \times \text{peso tecido(g)}$$

Para clorofila b:

$$Cl_b = \frac{[22,9x(A645)] - [4,68x(A663)]}{1000} \times \text{Vol(ml)} \times \text{peso tecido(g)}$$

Para clorofila total:

$$C = Cl_a + Cl_b$$

#### 4.2.9-Análise estatística:

Nos experimentos de germinação, os valores obtidos em porcentagem foram transformados em valores angulares (arco seno  $\sqrt{\%}$ ), de acordo com SNEDECOR, 1962. As medidas entre 3 ou mais tratamentos, foram comparadas pela análise de variância seguida de teste LSD, através do programa computacional STATGRAPHYCS (1993). O teste t-student foi aplicado para comparar 2 tratamentos.

## 5- RESULTADOS

### 5.1- Efeito de Diferentes Níveis de Luz na Germinação dos Esporos de *Rumohra adiantiformis*:

A figura 1 mostra as curvas de germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis* sob 83 e 91% de redução de luz, durante a estação do verão. Os esporos mantidos sob 91% de redução de luz apresentaram aceleração na germinação, cuja curva estabilizou após 14 dias, enquanto que os esporos sob 83% de redução de luz sofreram retardo e diminuição do percentual de germinação que estabilizou aos 20 dias de cultivo com 57% dos esporos germinados. Não houve germinação de esporos sob reduções de 28 e 46% de luz no verão (não mostrados na figura 1).

Na figura 2 observa-se, para o experimento realizado no outono, que os esporos mantidos sob 91% de redução de luz apresentaram pequeno retardo da germinação, que atingiu 97% aos 10 dias de cultivo, diferindo dos esporos germinados sob 83% de redução de luz que apresentaram retardo na germinação estabilizando após 16 dias de cultivo, atingindo também 97% de germinação.

A figura 3 mostra que esporos cultivados no outono, a 46% de redução de luz, sofreram retardo na germinação, estabilizando a curva após 30 dias de cultivo. Em esporos mantidos a 28% de redução de luz verificou-se retardo e diminuição do percentual de germinação, cuja curva estabilizou aos 38 dias de cultivo com 67% de germinação. Esses resultados diferiram do mesmo tratamento realizado na estação do verão que não apresentou germinação.

A figura 4 mostra a curva de germinação dos esporos mantidos a 83 e 91% de redução de luz, realizada no inverno. Observou-se que os esporos de ambos os tratamentos atingiram 97% de germinação. Porém, houve um retardo entre o 4° e o 6° dia de cultivo para os esporos germinados a 83% de redução de luz.

Na figura 5, comparando-se os tratamentos de 28, 46, 83 e 91% de redução de luz, realizados na estação do outono, é possível observar que a redução de 28% de luz foi o tratamento mais inibidor da germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis*, seguido do tratamento de 46%, cujas percentagens de germinação foram menores do que os demais tratamentos. Após o 12° dia de cultivo não houve diferença estatisticamente significativa entre 83 e 91% de redução de luz e após o 30° dia não houve essa diferença também para os esporos

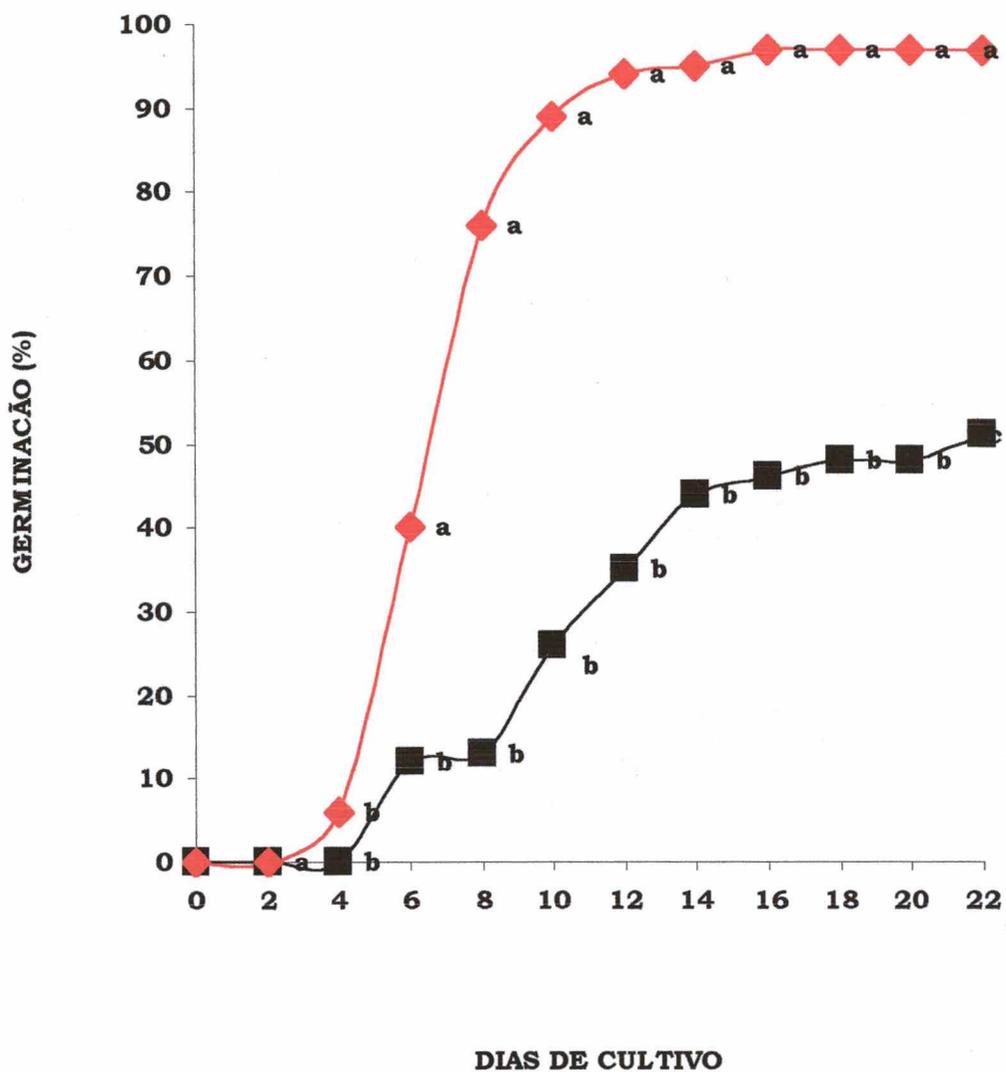


Figura 1: Germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis* a 83% e 91% de redução dos níveis de luz, no verão do ano 2000, Florianópolis, SC/Brasil. Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste LSD, para cada dia de avaliação da germinação.

- - 83% de redução de luz
- ◆ - 91% de redução de luz

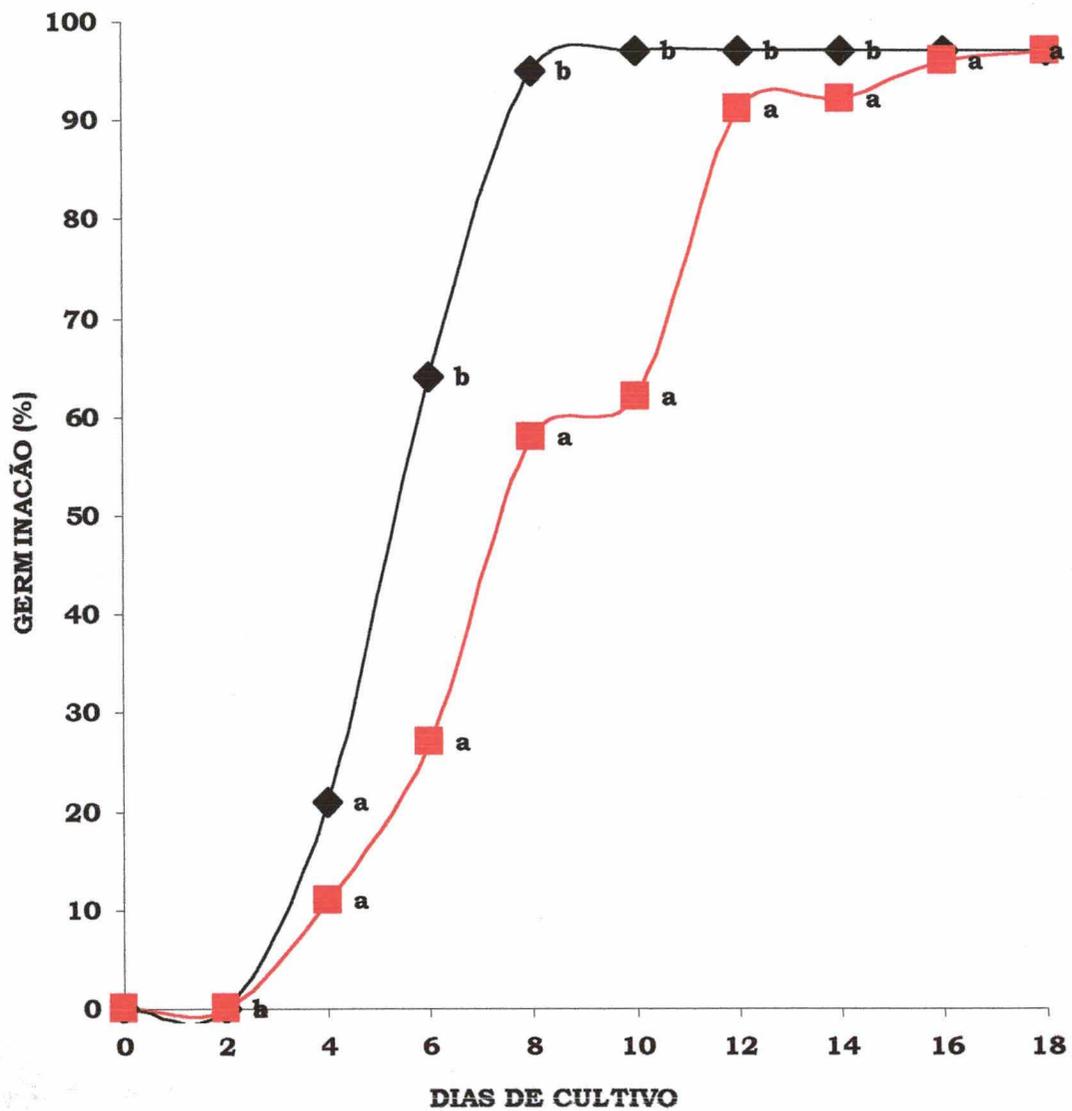


Figura 2: Germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis* a 83% e 91% de redução dos níveis de luz, no outono do ano 2000, Florianópolis, SC/Brasil. Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste LSD, para cada dia de avaliação da germinação.

- - 83% de redução de luz
- ◆ - 91% de redução de luz

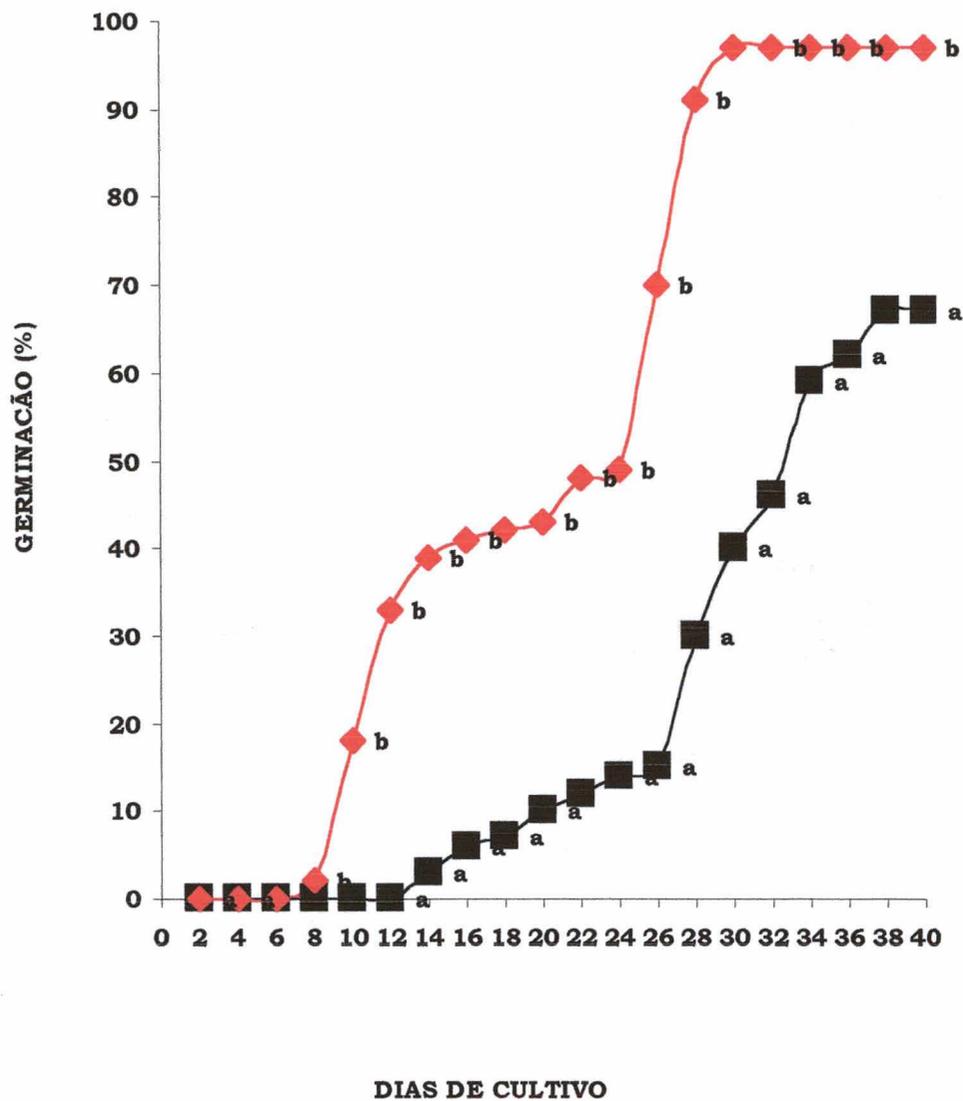


Figura 3: Germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis* a 28% e 46% de redução dos níveis de luz, no outono do ano 2000, Florianópolis, SC/Brasil. Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste LSD, para cada dia de avaliação da germinação.

- - 28% de redução de luz
- ◆ - 46% de redução de luz

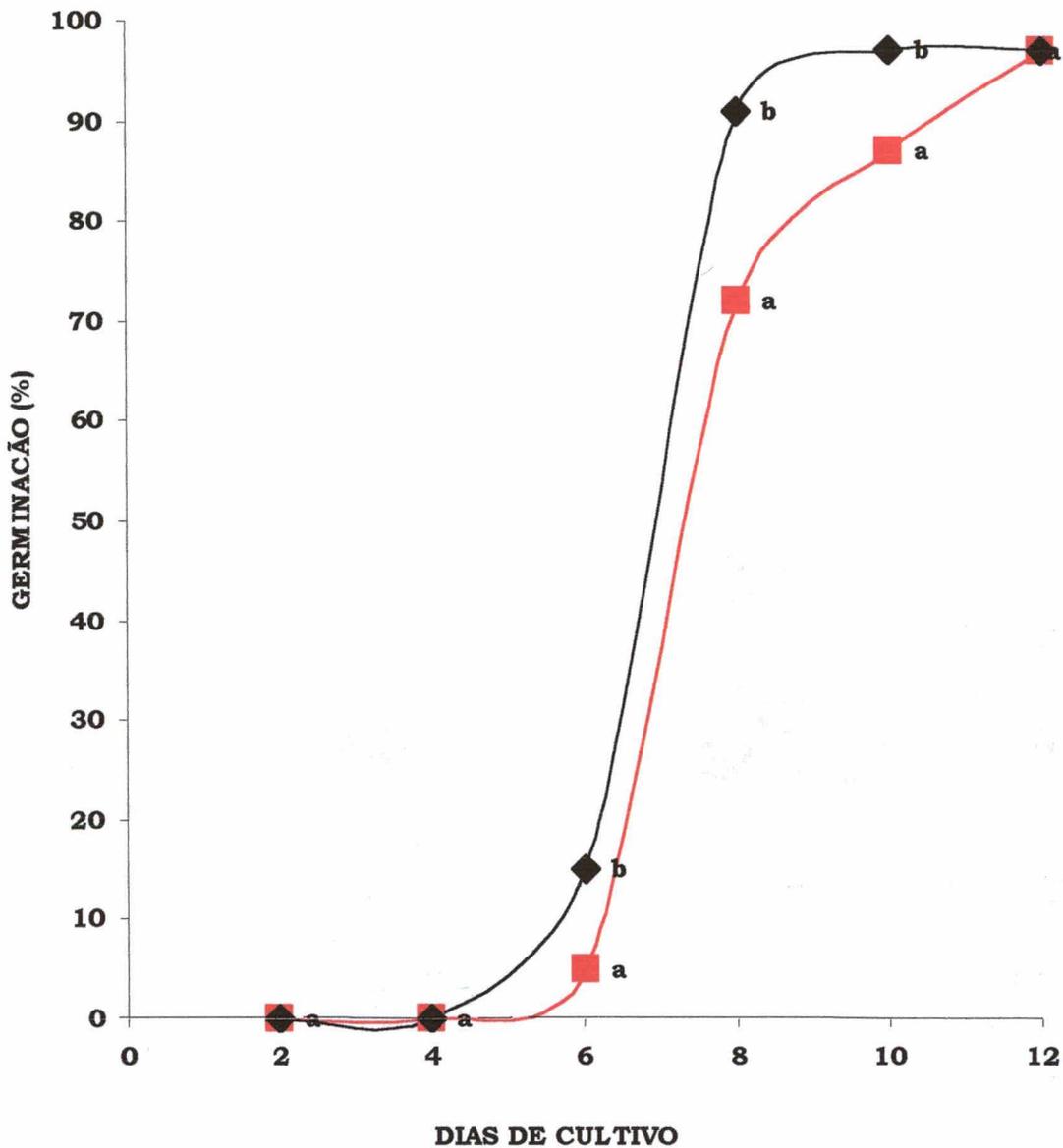


Figura 4: Germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis* a 83% e 91% de redução dos níveis de luz, no inverno do ano 2000, Florianópolis, SC/Brasil. Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste LSD, para cada dia de avaliação da germinação.

- - 83% de redução de luz
- ◆ - 91% de redução de luz

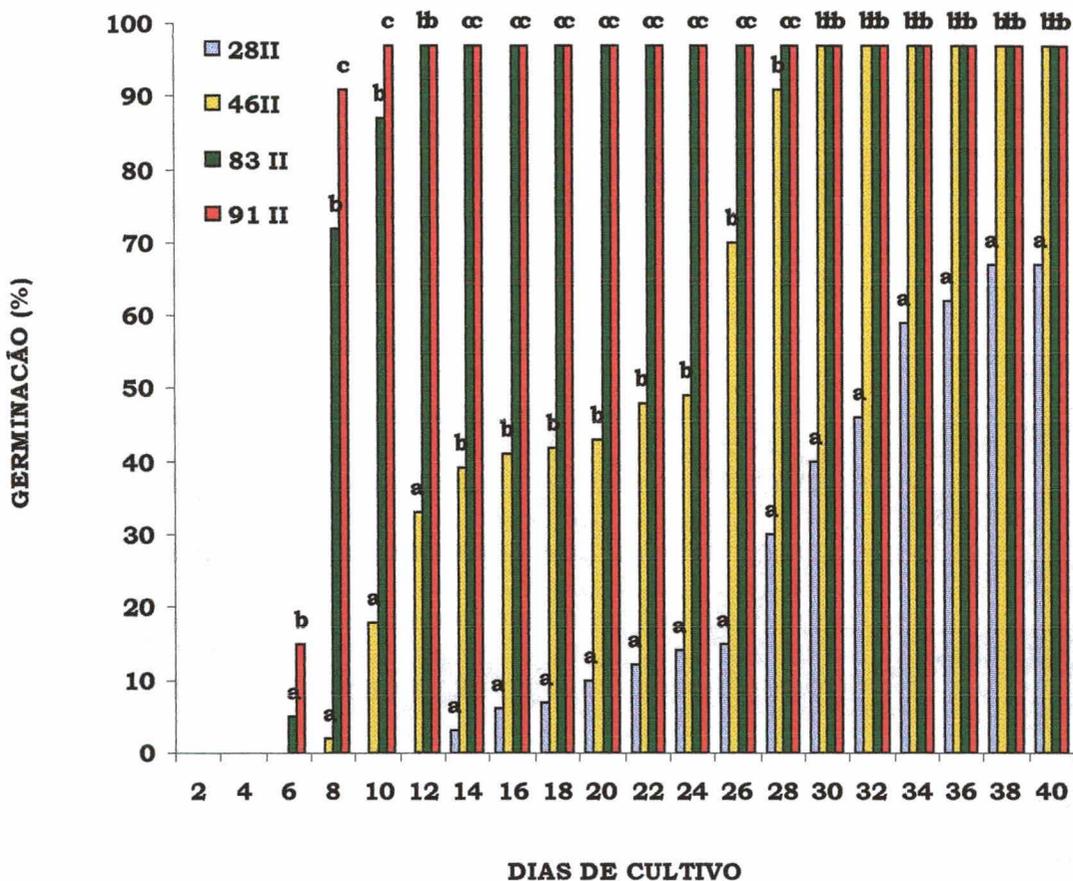


Figura 5: Comparação da porcentagem de germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis* a 28%, 46%, 83% e 91% de redução dos níveis de luz, no outono do ano 2000, Florianópolis, SC/Brasil. Análises de variância foram realizadas para cada dia de avaliação de germinação. Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste LSD, para cada dia de avaliação da germinação.

mantidos a 46% de redução de luz.

A figura 6 compara as porcentagens de germinação a 83% de redução de luz entre os experimentos realizados no verão, outono e inverno. Pode-se observar que não houve diferença entre o percentual de germinação para os experimentos realizados no outono e inverno após o 16° dia de cultivo. Durante o verão registraram-se as menores porcentagens de germinação dos esporos de *Rumohra adiantiformis*.

A figura 7 compara as porcentagens de germinação a 91% de redução de luz no verão, outono e inverno. Após o 10° dia de cultivo não houve diferença estatisticamente significativa entre o experimento realizado no outono e inverno e após o 16° dia de cultivo todos os experimentos atingiram 97% de germinação.

## 5.2- Efeito de Diferentes Temperaturas na Germinação dos Esporos de *Rumohra adiantiformis*:

A figura 8 revela que os esporos cultivados em câmara de germinação, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas durante todo o experimento com relação ao controle que germinou em sala de crescimento, também a 25°C.

A figura 9 mostra que os esporos cultivados em câmara de germinação, sob intensidade luminosa de  $21\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e temperatura de 15°C, sofreram retardo na germinação entre o 6° e o 12° dia de cultivo atingindo 97 % de germinação aos 14 dias de cultivo igualando-se ao controle que germinou em sala de crescimento a 25 °C.

Na figura 10 os esporos cultivados sob as mesmas condições de luminosidade, mas a 20°C apresentaram resultados estatisticamente iguais ao controle a partir do 8° dia de cultivo, atingindo 97% de esporos germinados.

A figura 11 mostra que os esporos cultivados a 30°C apresentaram retardo e inibição da germinação, cuja curva estabilizou no 18° dia de cultivo com 75% dos esporos germinados diferindo do controle que estabilizou após 10 dias de cultivo com 97 % de germinação.

A figura 12 compara a germinação dos esporos sob diferentes temperaturas. Observa-se que a partir do 6° dia de cultivo não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos de 20 e 25°C, e que a partir do 14° dia os resultados do tratamento de 15°C igualaram-se aos tratamentos citados.

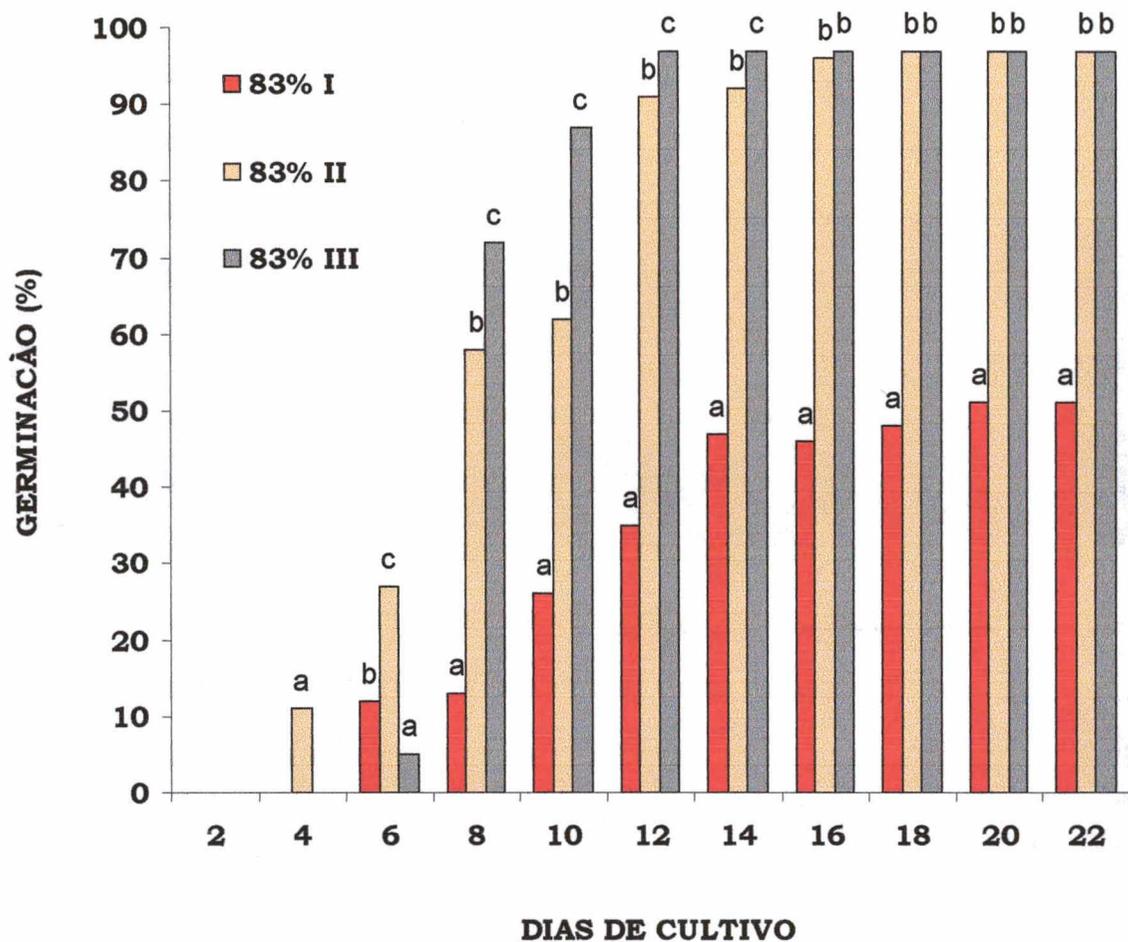


Figura 6: Comparação da porcentagem de germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis* a 83% de redução dos níveis de luz, no verão (I), outono (II) e inverno (III), do ano 2000, Florianópolis, SC/Brasil. Análises de variância foram realizadas para cada dia de avaliação de germinação. Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste LSD, para cada dia de avaliação da germinação.

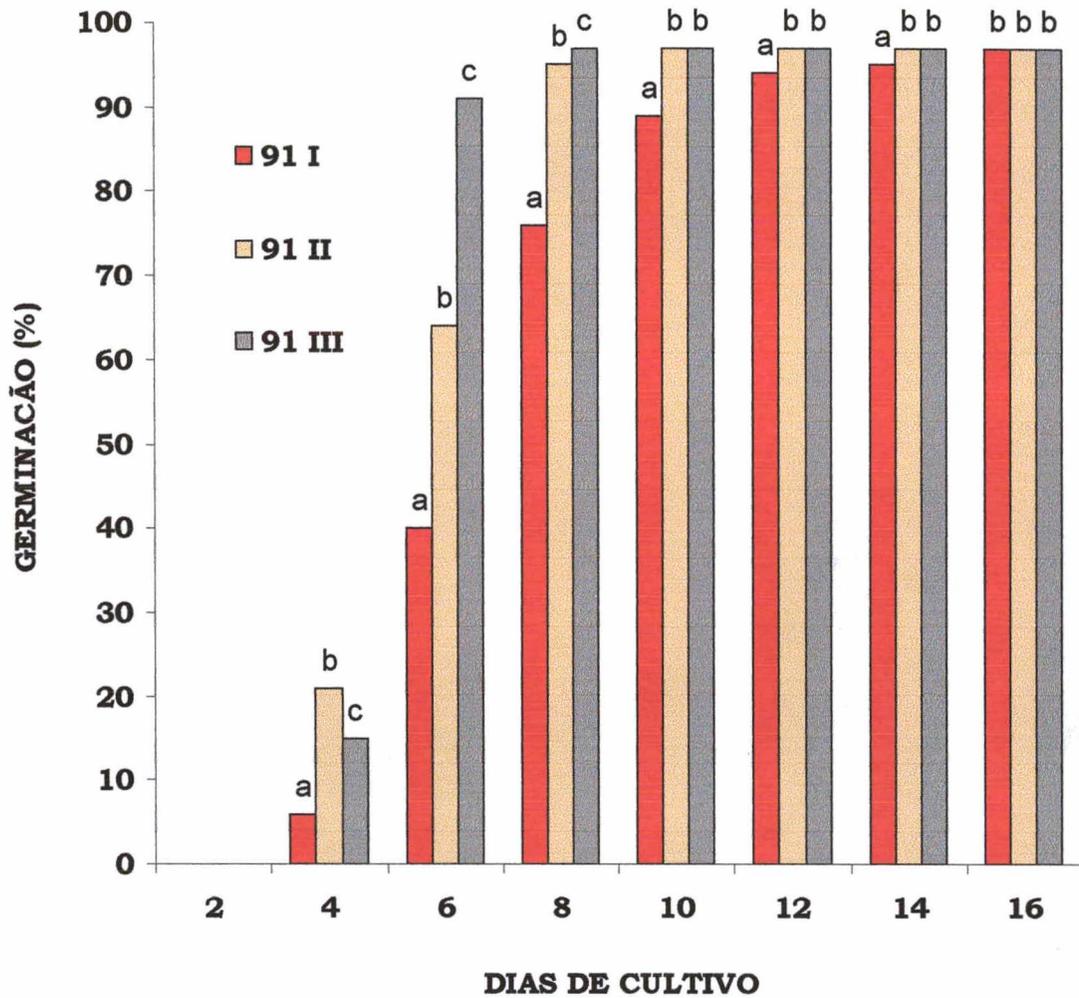


Figura 7: Comparação da percentagem de germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis* a 91% de redução dos níveis de luz, no verão (I), outono (II) e inverno (III), do ano 2000, Florianópolis, SC/Brasil. Análises de variância foram realizadas para cada dia de avaliação de germinação. Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste LSD, para cada dia de avaliação da germinação.

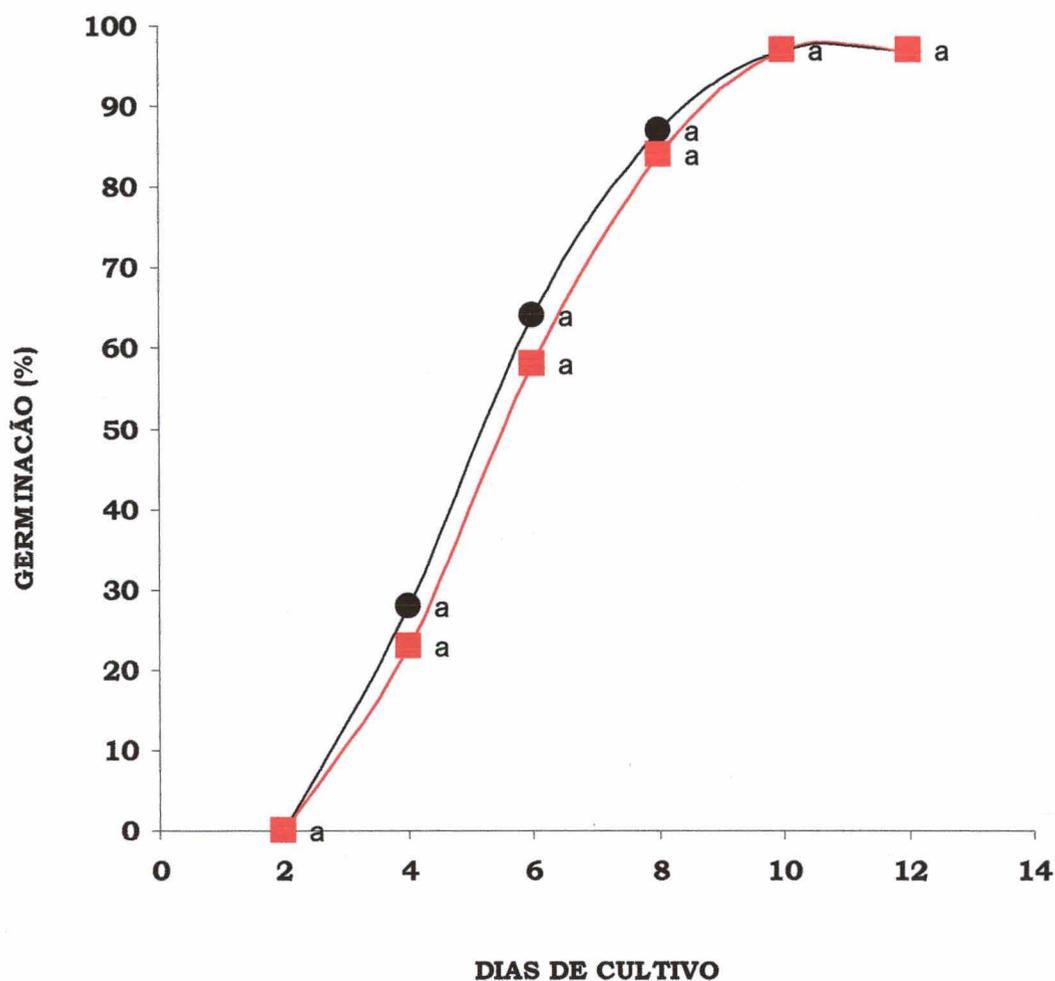


Figura 8: Germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis* a 25°C. Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, ao nível de 5%, ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste LSD, para cada dia de avaliação da germinação.

- - esporos cultivados em câmara de cultivo, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $21 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , a 25°C.
- - controle (cultivados em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , a 25°C).

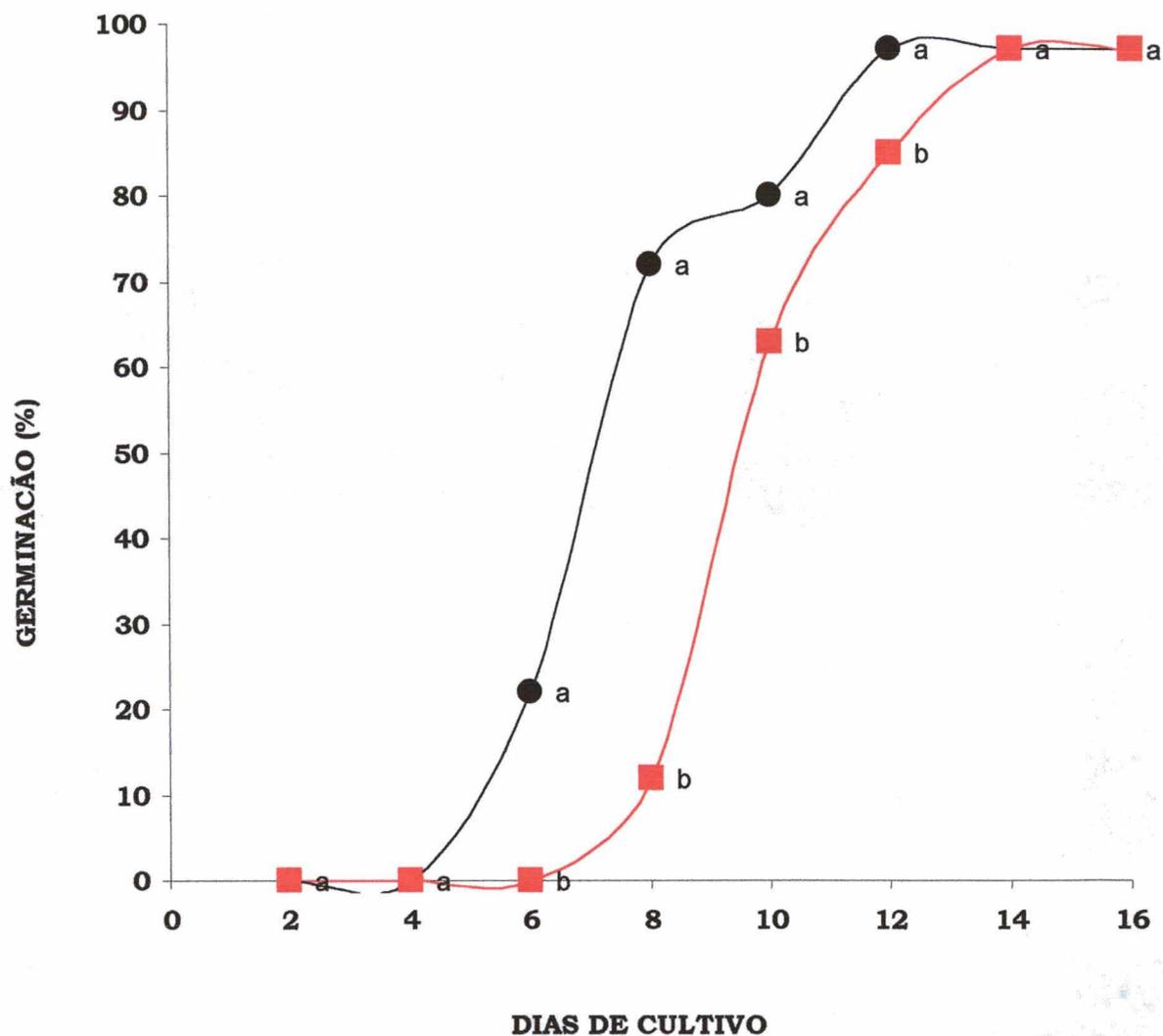


Figura 9: Germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis* a 15°C. Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, ao nível de 5% , ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste LSD, para cada dia de avaliação da germinação.

- esporos cultivados em câmara de cultivo, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $21 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , a 15°C.
- - controle (esporos cultivados em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de  $31,68 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , a 25°C).

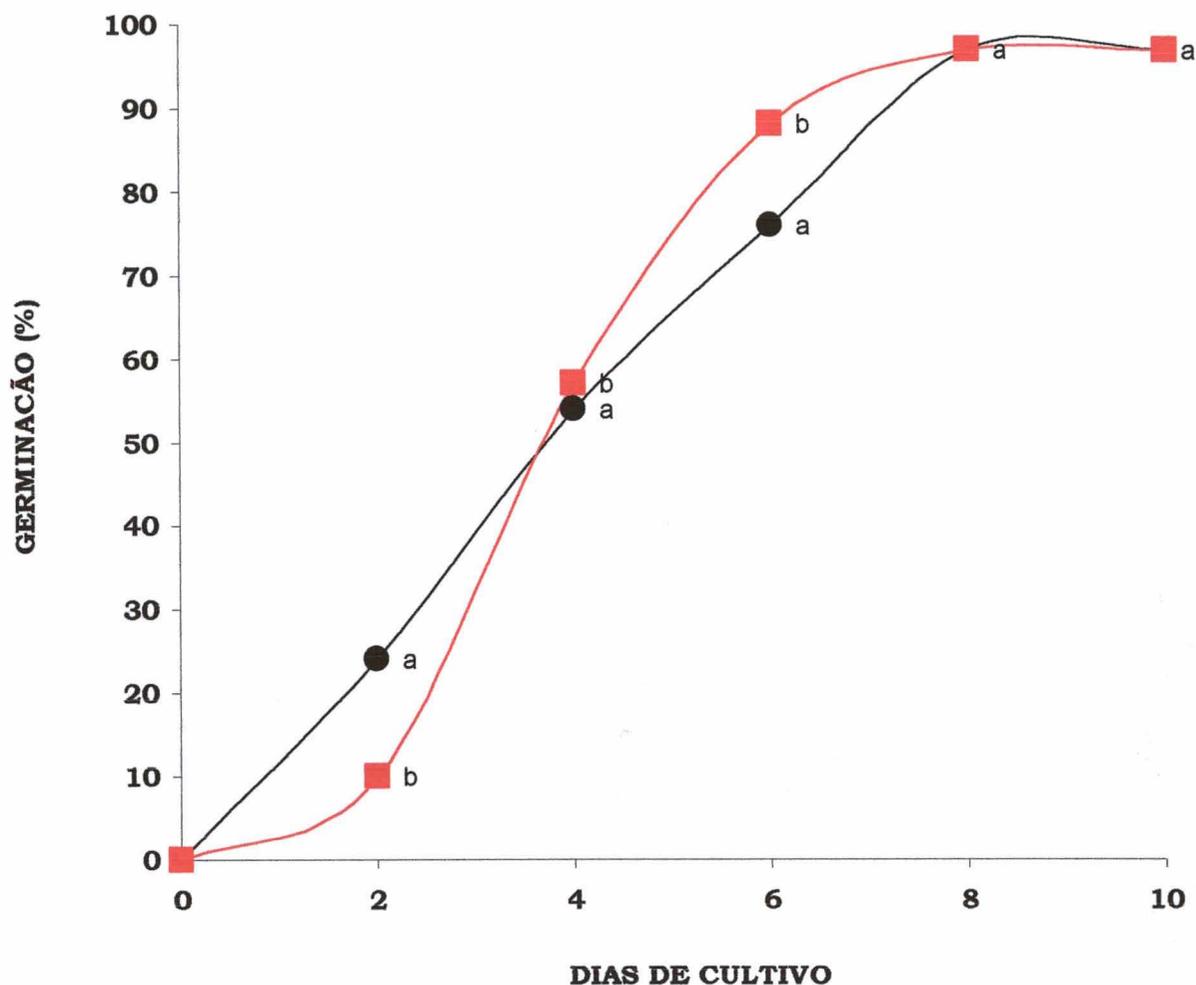


Figura 10: Germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis* a 20°C. Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste LSD, para cada dia de avaliação da germinação.

■ - esporos cultivados em câmara de cultivo, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $21 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , a 20°C.

● - controle (cultivados em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , a 25°C).

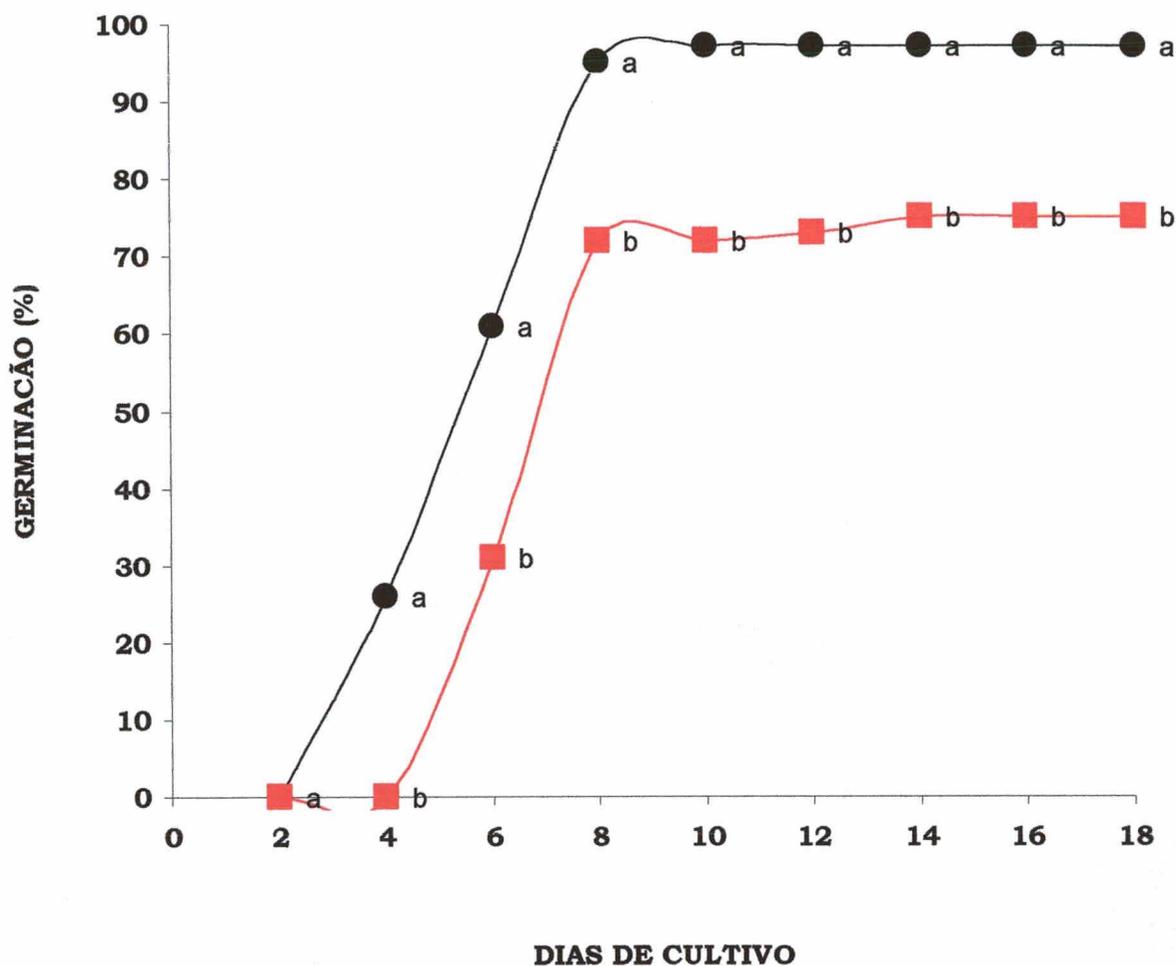


Figura 11: Germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis* a 30°C. Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste LSD, para cada dia de avaliação da germinação.

- - esporos cultivados em câmara de cultivo, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $21 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , a 30°C.
- - controle (cultivados em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , a 25°C).

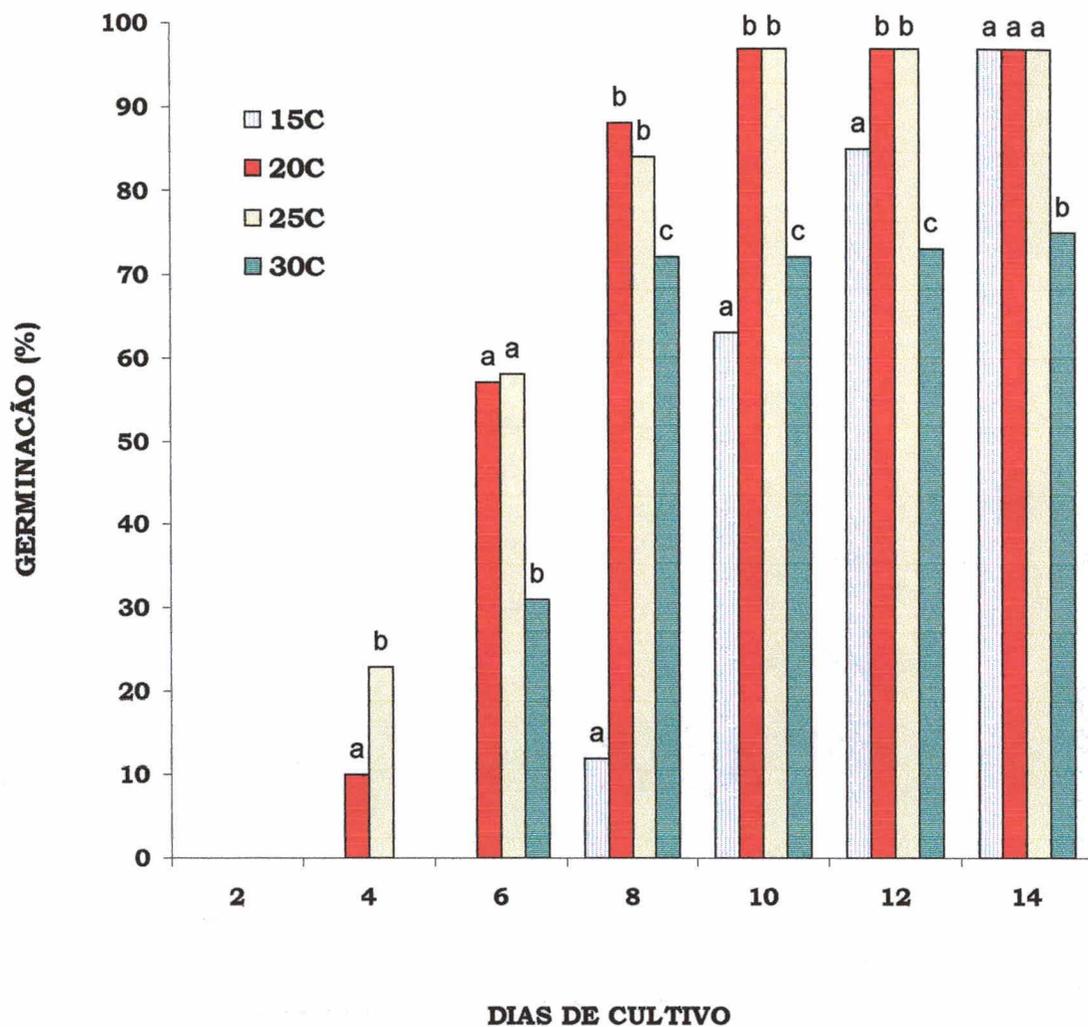


Figura 12: Comparação da porcentagem de germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis* em diferentes temperaturas. Análises de variância foram realizadas para cada dia de avaliação de germinação. Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste LSD, para cada dia de avaliação da germinação.

### 5.3- Efeito do armazenamento dos esporos de *Rumohra adiantiformis* sob refrigeração (6°C).

A figura 13 mostra a germinação dos esporos de *R. adiantiformis* após 7, 8, 9 e 13 meses de armazenamento sob refrigeração. Após 7 meses de armazenamento, observa-se que os esporos atingiram 97% de germinação aos 14 dias de cultivo. Após 8 e 9 meses de armazenamento, os esporos atingiram 97% de germinação após 12 e 10 dias respectivamente. Entretanto, após 13 meses de armazenamento, não houve perda da viabilidade dos esporos embora tenha sido observado um retardo na velocidade de germinação. A estabilização da germinação ocorreu aos 18 dias de cultivo. Embora tenham ocorrido essas flutuações, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas entre as avaliações.

### 5.4- Efeito da criopreservação durante 15 minutos na germinação dos esporos de *Rumohra adiantiformis*:

A figura 14 mostra esporos esterilizados, crioprotégidos, degelados lenta e rapidamente. Observa-se drástica inibição da germinação dos esporos criopreservados. A maior inibição foi obtida em esporos degelados lentamente, pois atingiram 5% de germinação após 20 dias de cultivo. Os esporos degelados rapidamente atingiram 25% de germinação após 24 dias de cultivo.

Na figura 15 observa-se que os esporos não esterilizados, não crioprotégidos, degelados lenta e rapidamente sofreram aceleração da germinação após 4 e 6 dias de cultivo, cuja curva estabilizou no 6<sup>a</sup> dia de cultivo com 97% de esporos germinados. A curva do controle estabilizou no 8<sup>a</sup> dia com o mesmo percentual de germinação.

A figura 16 mostra a curva de germinação dos esporos esterilizados, não crioprotégidos, degelados lenta e rapidamente. Houve drástica inibição e diminuição da germinação para os dois processos de degelo, em relação ao controle. Os esporos degelados rapidamente apresentaram 6% de germinação após 24 dias de cultivo enquanto que os esporos degelados lentamente atingiram 3% de germinação após 20 dias de cultivo.

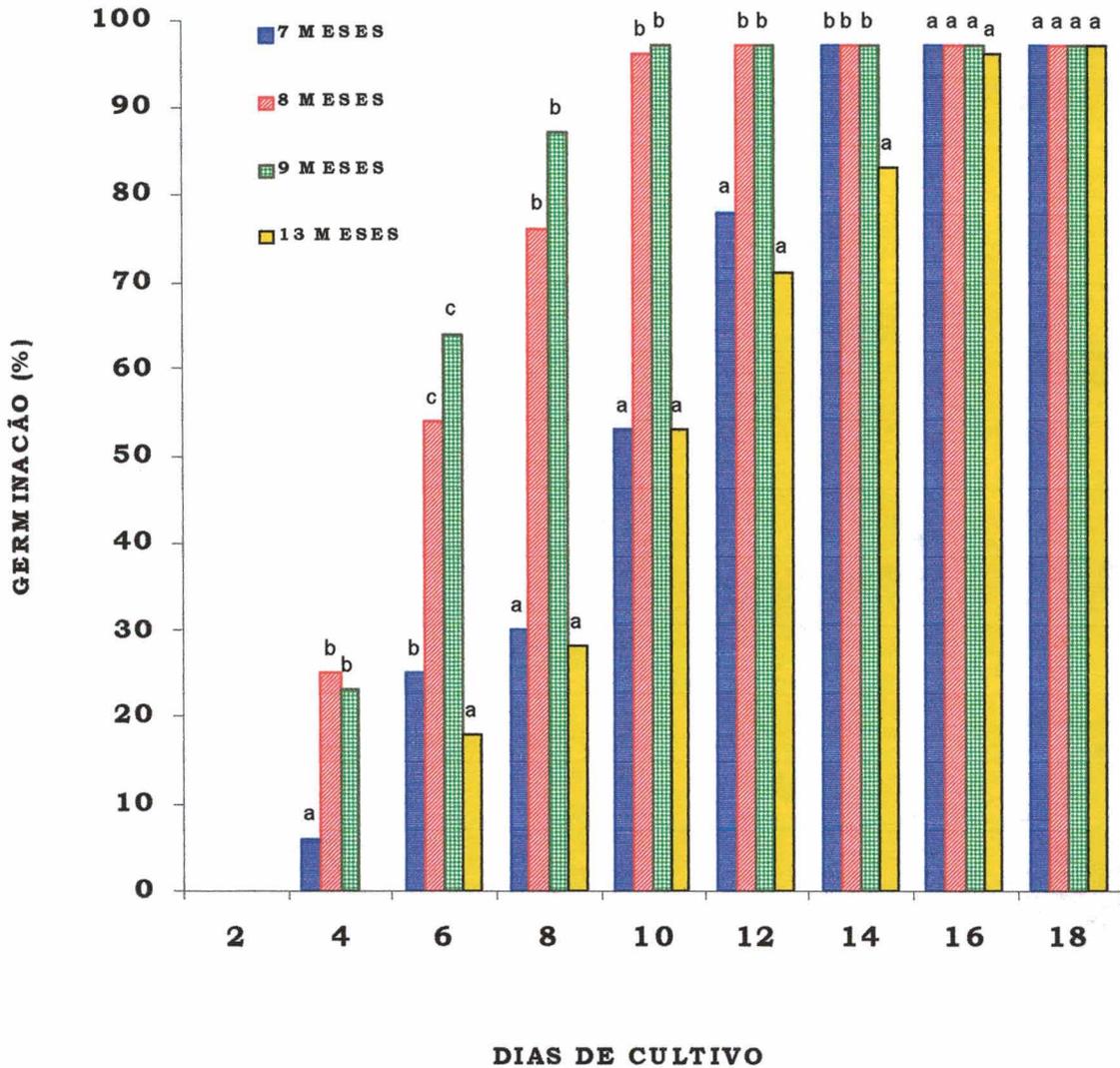


Figura 13: Germinação dos esporos de *Rumohra adiantiformis* após diferentes períodos de armazenamento sob refrigeração, cultivados em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , a  $25^\circ\text{C}$ . Análises de variância foram realizadas para cada dia de avaliação de germinação. Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste LSD.

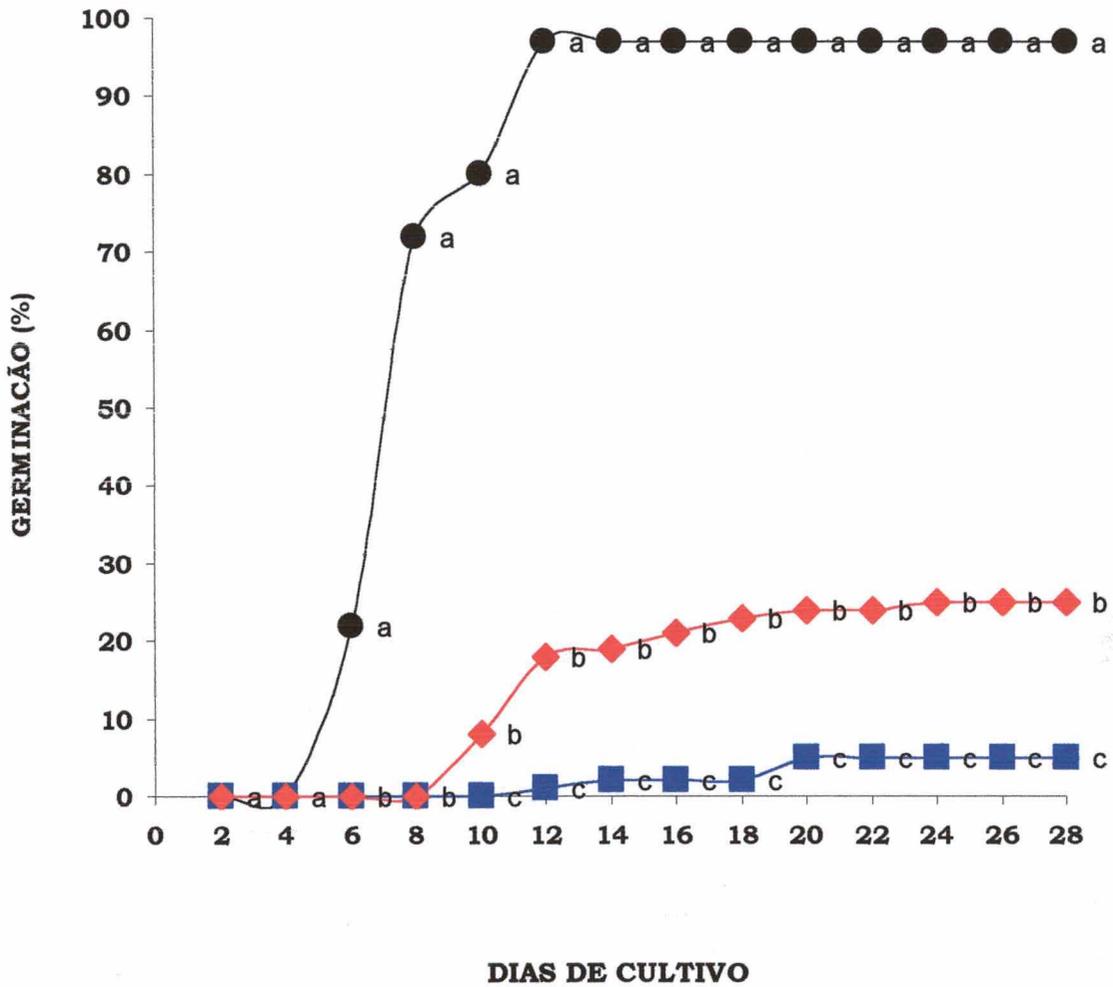


Figura 14: Germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis* criopreservados durante 15 minutos e cultivados em sala de crescimento, 16 em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , a  $25^{\circ}\text{C}$ ). Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste LSD, para cada dia de avaliação da germinação.

- - controle (esporos esterilizados, não criopreservados).
- ◆ - esporos esterilizados, pré-tratados com crioprotetor, degelo rápido.
- - esporos esterilizados, pré-tratados com crioprotetor, degelo lento.

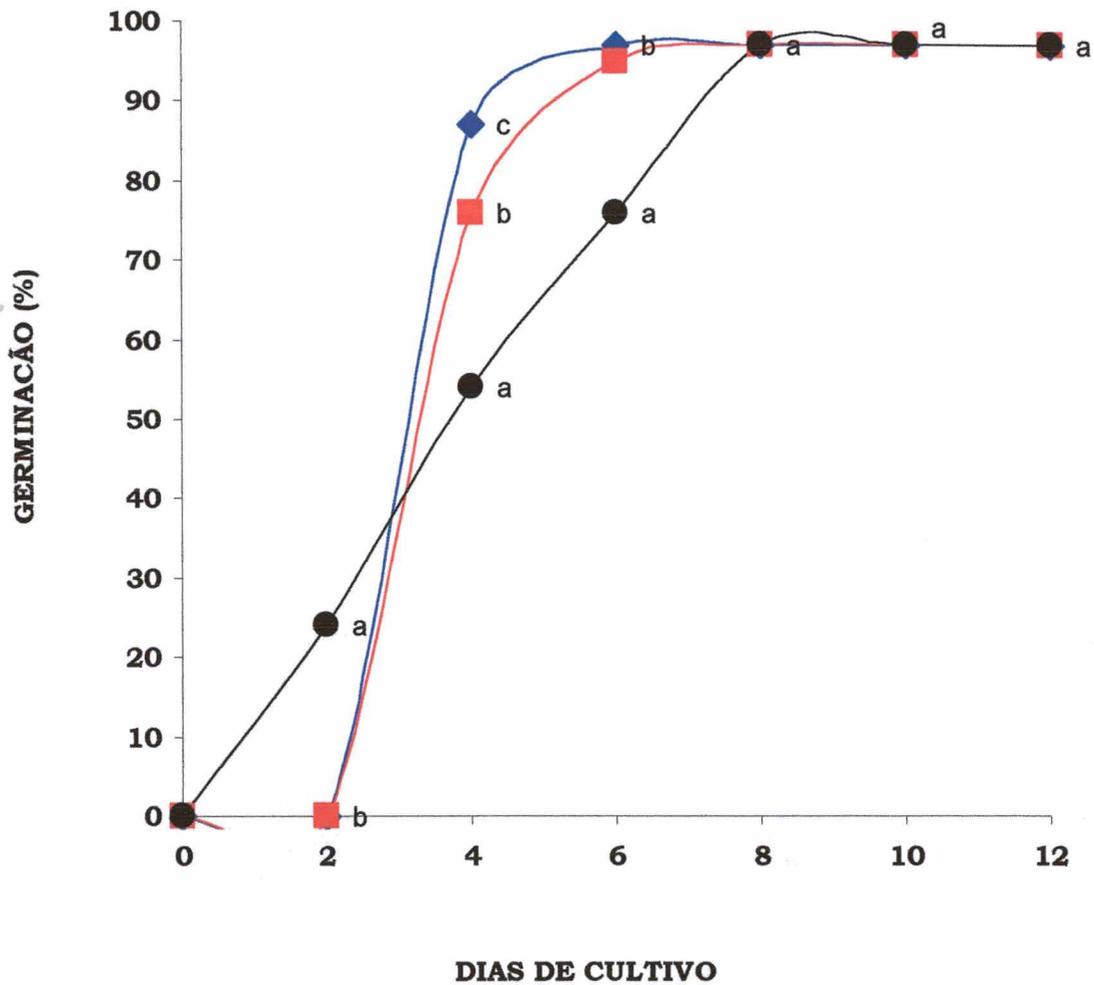


Figura 15: Germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis* criopreservados durante 15 minutos e cultivados em sala de crescimento, 16 em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de  $31,68\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , a  $25^{\circ}\text{C}$ . Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste LSD, para cada dia de avaliação da germinação.

- - controle (esporos esterilizados, não criopreservados).
- ◆ - esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido
- - esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento

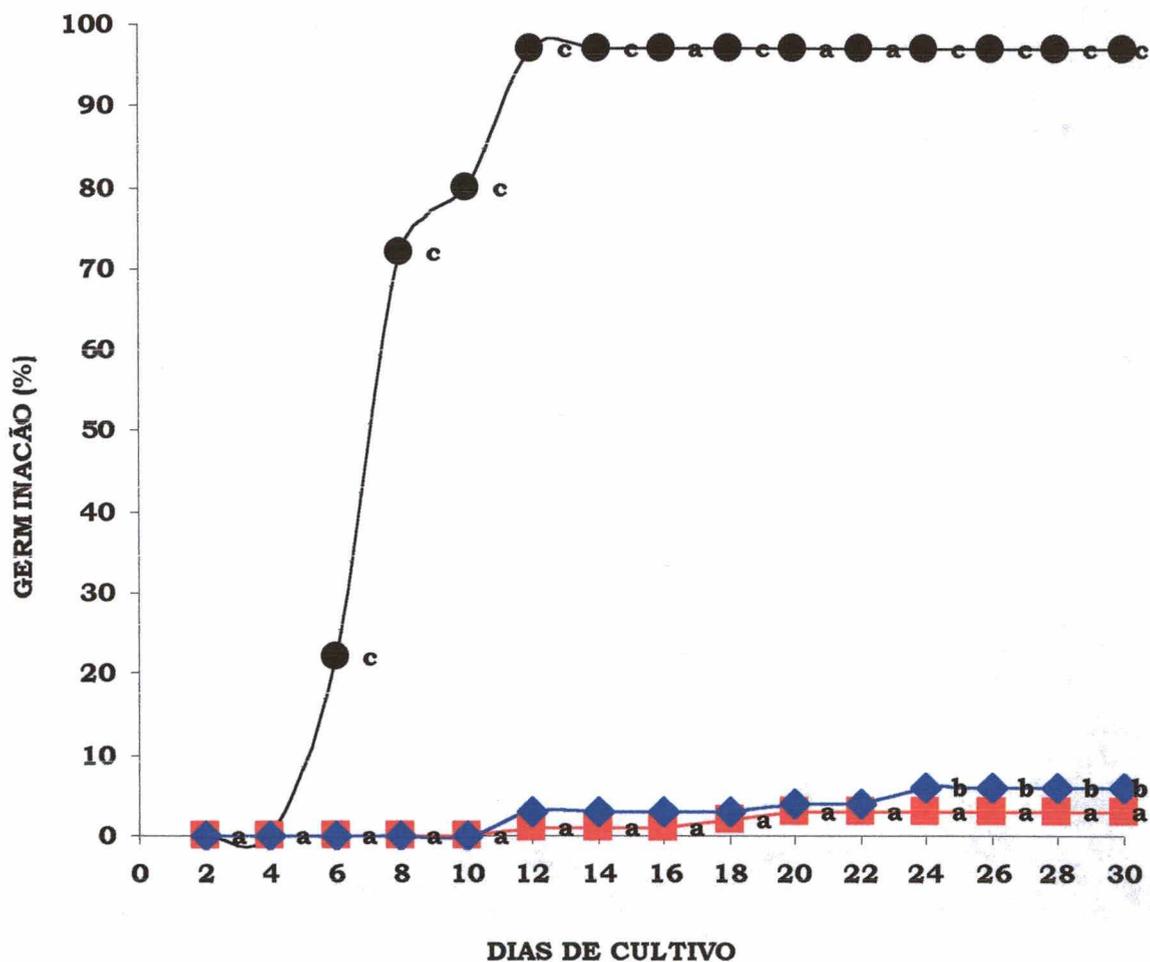


Figura 16: Germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis* criopreservados durante 15 minutos e cultivados em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , a  $25^{\circ}\text{C}$ . Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste LSD, para cada dia de avaliação da germinação.

- - controle (esporos esterilizados, não criopreservados).
- ◆ - esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido
- - esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento

A Figura 17 ilustra a germinação dos esporos não esterilizados, crioprotetidos e degelados lenta e rapidamente. A inibição da germinação foi mais drástica para os esporos degelados lentamente, que atingiram 10% de germinação após 28 dias de cultivo. Esporos degelados rapidamente apresentaram estabilização da germinação após 41 dias de cultivo com 47% de germinação.

A figura 18 compara todos os tratamentos de criopreservação e mostra que o tratamento mais eficiente foi aplicado aos esporos não esterilizados, não crioprotetidos, degelados rapidamente seguido dos esporos degelados lentamente, pois a partir do 12º dia de cultivo não houve diferença estatisticamente significativa entre esses dois tratamentos. A porcentagem de germinação foi inferior a 97% para os demais tratamentos, sendo que as maiores inibições da germinação ocorreram em esporos esterilizados, não crioprotetidos e degelados lentamente seguidos dos esporos esterilizados, não crioprotetidos, degelados rapidamente e dos esporos esterilizados, crioprotetidos, degelados lentamente. Os dois últimos não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

#### 5.5- Efeito da criopreservação durante 90 dias na germinação dos esporos de *Rumohra adiantiformis*:

A figura 19 mostra a curva de germinação dos esporos não esterilizados, criopreservados sem crioproteção durante 90 dias. Não houve diferença entre os dois métodos de degelo. A criopreservação acelerou a germinação de esporos que estabilizou após dez dias de cultivo, enquanto que o controle, esporos armazenados durante treze meses sob refrigeração, estabilizou após 16 dias de cultivo.

#### 5.6-Crescimento inicial de gametófitos de *Rumohra adiantiformis* provenientes de esporos criopreservados:

As figuras 20 e 21 mostram que não houve diferença estatisticamente significativa entre o peso de massa fresca e seca, de gametófitos provenientes de esporos criopreservados.

Na figura 22 observa-se que o maior teor de clorofila total, após dez semanas de cultivo, foi obtido em gametófitos provenientes de esporos não esterilizados, degelados

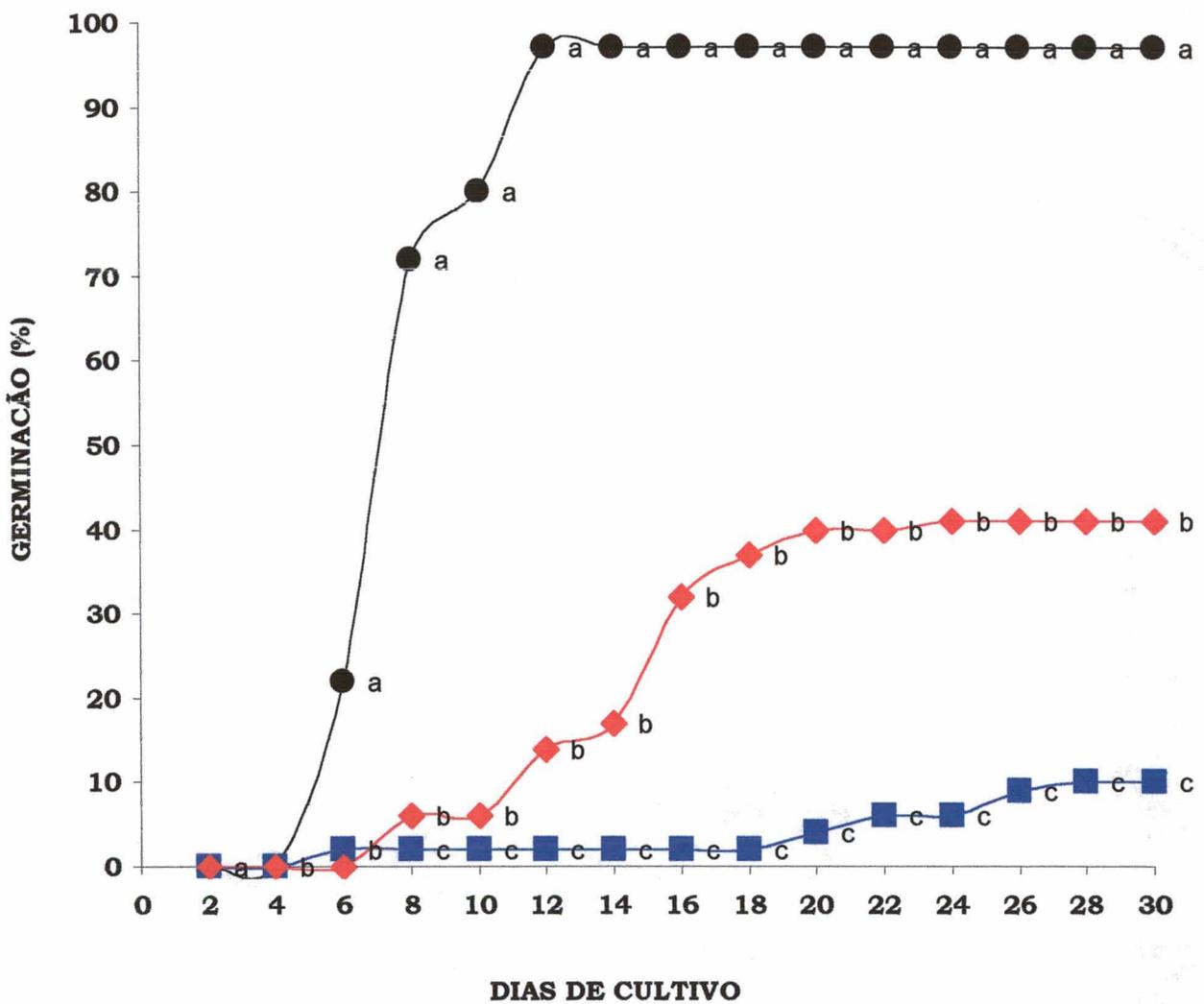


Figura 17: Germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis* criopreservados durante 15 minutos e cultivados em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de  $31,68 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , a  $25^\circ\text{C}$ . Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste LSD, para cada dia de avaliação da germinação.

- - controle (esporos esterilizados, não criopreservados).
- ◆ - esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido
- - esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo lento

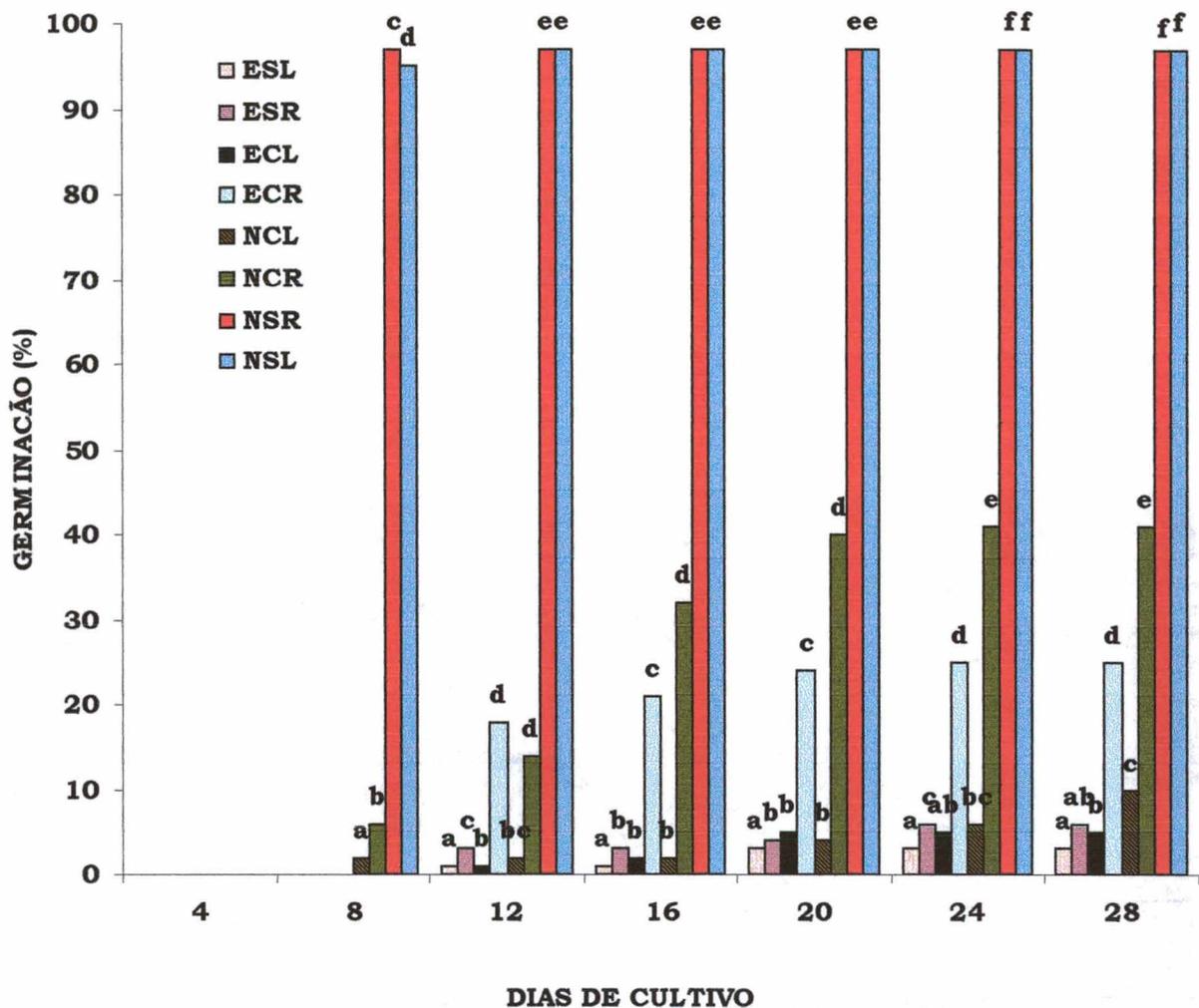


Figura 18: Comparação da porcentagem de germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis* criopreservados durante 15 minutos e cultivados em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , a  $25^{\circ}\text{C}$ ). Análises de variância foram realizadas para cada dia de avaliação de germinação. Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste LSD, para cada dia de avaliação da germinação. ESL= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; ESR= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; ECL= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; ECR= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NCL= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; NCR= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NSL= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; NSR= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido.

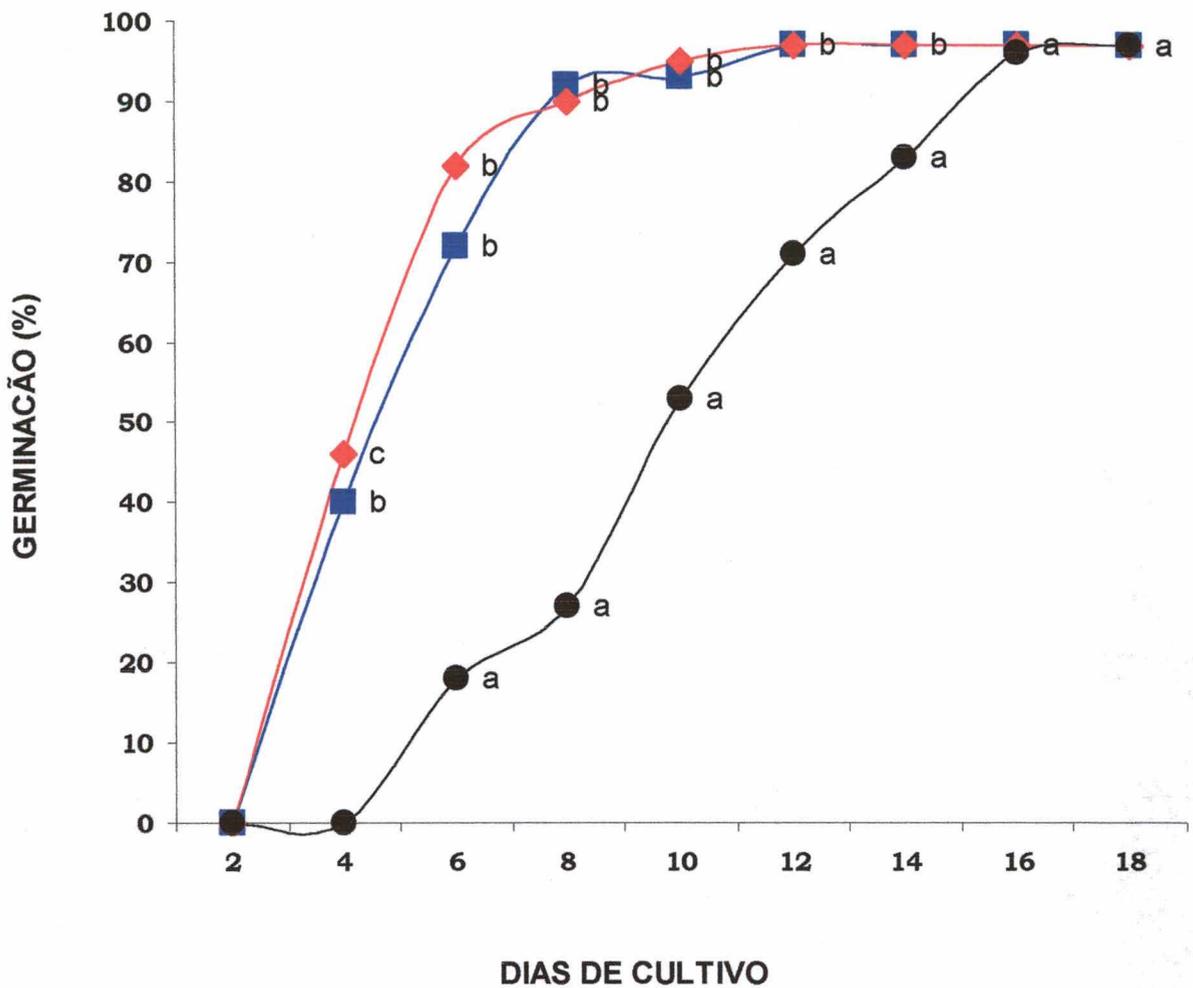


Figura 19: Germinação dos esporos de *Rumohra adiantiformis* criopreservados durante 90 dias, cultivados em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , a  $25^{\circ}\text{C}$ . Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste LSD, para cada dia de avaliação da germinação.

- - controle (esporos esterilizados, não criopreservados).
- ◆ - esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido
- - esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento

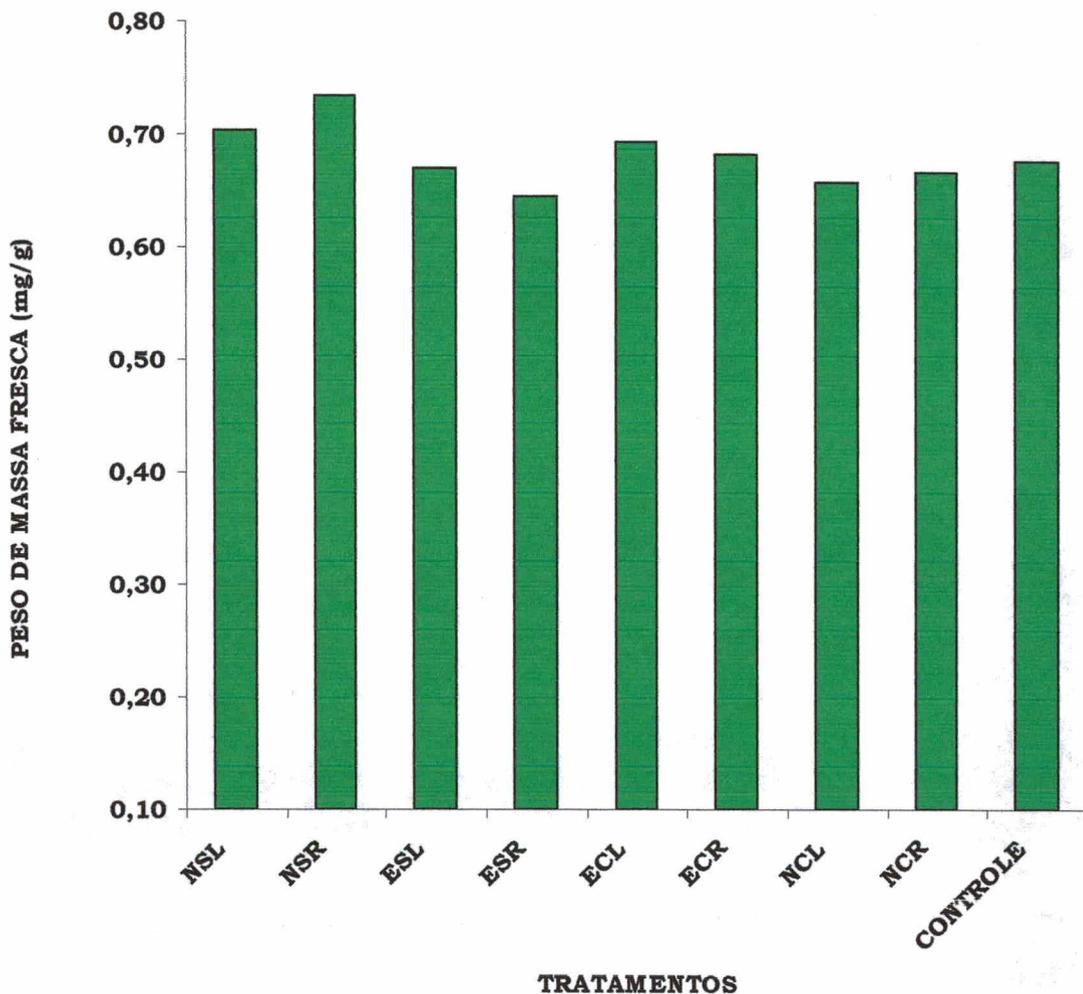


Figura 20: Variação da matéria fresca dos gametófitos de *Rumohra adiantiformis*, provenientes de esporos criopreservados, com 10 semanas de cultivo. Os gametófitos cresceram em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , a  $25^{\circ}\text{C}$ . Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. ESL= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; ESR= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; ECL= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; ECR= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NCL= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; NCR= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NSL= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; NSR= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; CONTROLE = esporos esterilizados, não criopreservados.

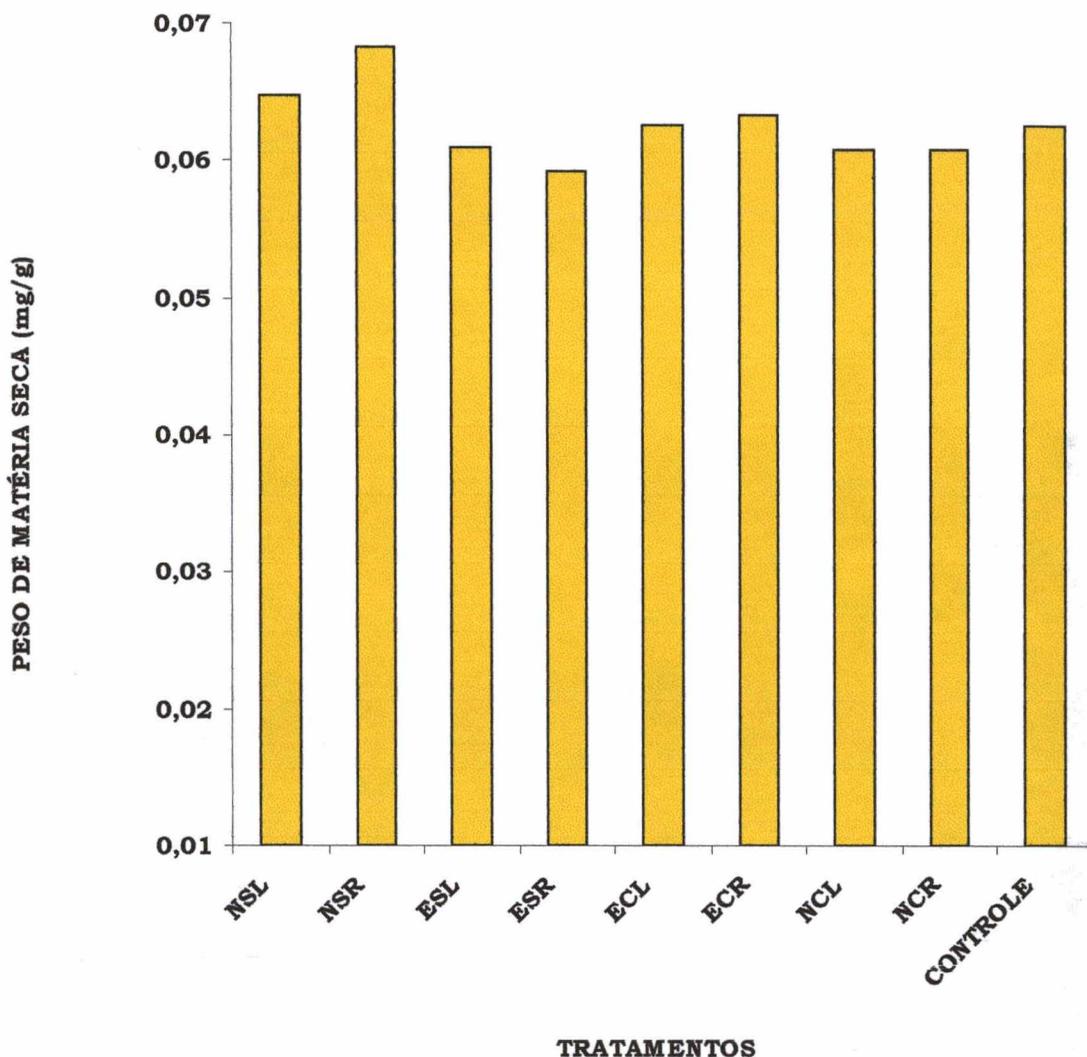


Figura 21: Variação da matéria seca dos gametófitos de *Rumohra adiantiformis*, provenientes de esporos criopreservados, com 10 semanas de cultivo. Os gametófitos cresceram em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , a  $25^{\circ}\text{C}$ . Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. ESL= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; ESR= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; ECL= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; ECR= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NCL= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; NCR= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NSL= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; NSR= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; CONTROLE = esporos esterilizados, não criopreservados.

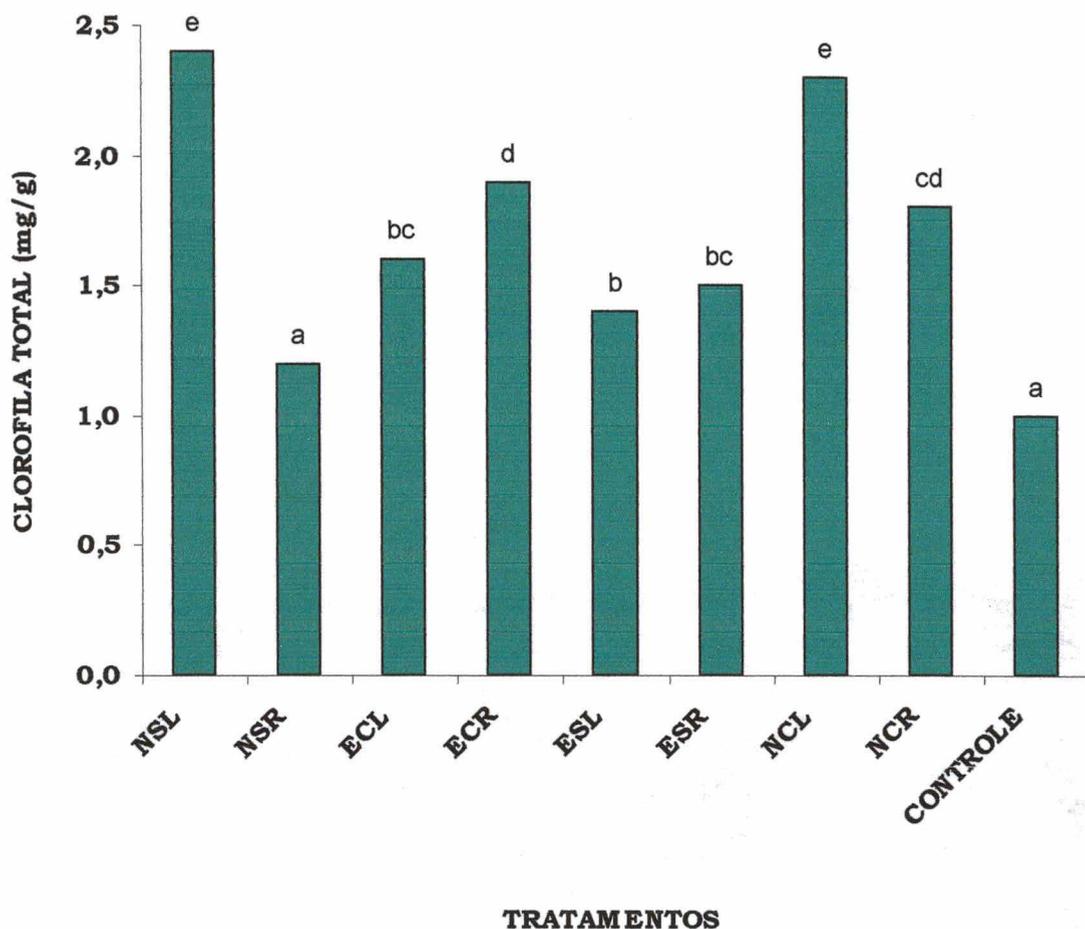


Figura 22: Teor de clorofila total dos gametófitos de *Rumohra adiantiformis* provenientes de esporos criopreservados, com 10 semanas de cultivo. Os gametófitos cresceram em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , a  $25^{\circ}\text{C}$ . Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste LSD, entre os tratamentos. ESL= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; ESR= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; ECL= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; ECR= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NCL= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; NCR= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NSL= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; NSR= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; CONTROLE = esporos esterilizados, não criopreservados.

Lentamente, com e sem crioprotetor, seguidos dos gametófitos provenientes de esporos esterilizados, com crioprotetor e degelados rapidamente. Os menores teores de clorofila total foram encontrados nos gametófitos provenientes dos esporos controle e dos esporos não esterilizados, criopreservados sem crioprotetor e submetidos ao degelo rápido.

A figura 23 mostra que o maior teor de clorofila “a” foi observado em gametófitos provenientes de esporos criopreservados, não esterilizados, não crioprotetidos e degelados lentamente, seguidos pelos provenientes dos esporos não esterilizados, crioprotetidos degelados lentamente. O menor teor de clorofila “a” foi apresentado pelos gametófitos provenientes dos esporos não esterilizados, sem crioproteção e degelados lentamente. A maioria dos tratamentos apresentou teores de clorofila iguais ao controle.

A figura 24 evidencia que o maior teor de clorofila “b” foi observado nos gametófitos provenientes dos esporos não esterilizados, crioprotetidos, submetidos ao degelo lento. O menor teor de clorofila “b” foi obtido nos gametófitos provenientes do controle e nos gametófitos provenientes dos esporos não esterilizados, não crioprotetidos, degelados rapidamente. Todos os tratamentos apresentaram teores de clorofila “b” estatisticamente superiores aos do controle.

Na figura 25, observa-se que a menor taxa de clorofila (a/b) foi apresentada pelos gametófitos provenientes de esporos não esterilizados, sem crioproteção e degelados rapidamente que se igualou ao controle com valor inferior a 0,05. A maior taxa de clorofila estava presente nos gametófitos oriundos de esporos esterilizados, criopreservados, com crioproteção, degelados lentamente e rapidamente, seguidos dos gametófitos provenientes de esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelados lentamente e rapidamente e dos não esterilizados, crioprotetidos e degelados lentamente que apresentaram valores acima de 0,2.

Na figura 26, observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os gametófitos provenientes de esporos criopreservados e o controle quanto ao teor de açúcares solúveis totais. Todos apresentaram teor de açúcares solúveis totais em torno de 3 mg/g.

5.7- Desenvolvimento inicial de esporófitos de *Rumohra adiantiformis* provenientes de esporos criopreservados:

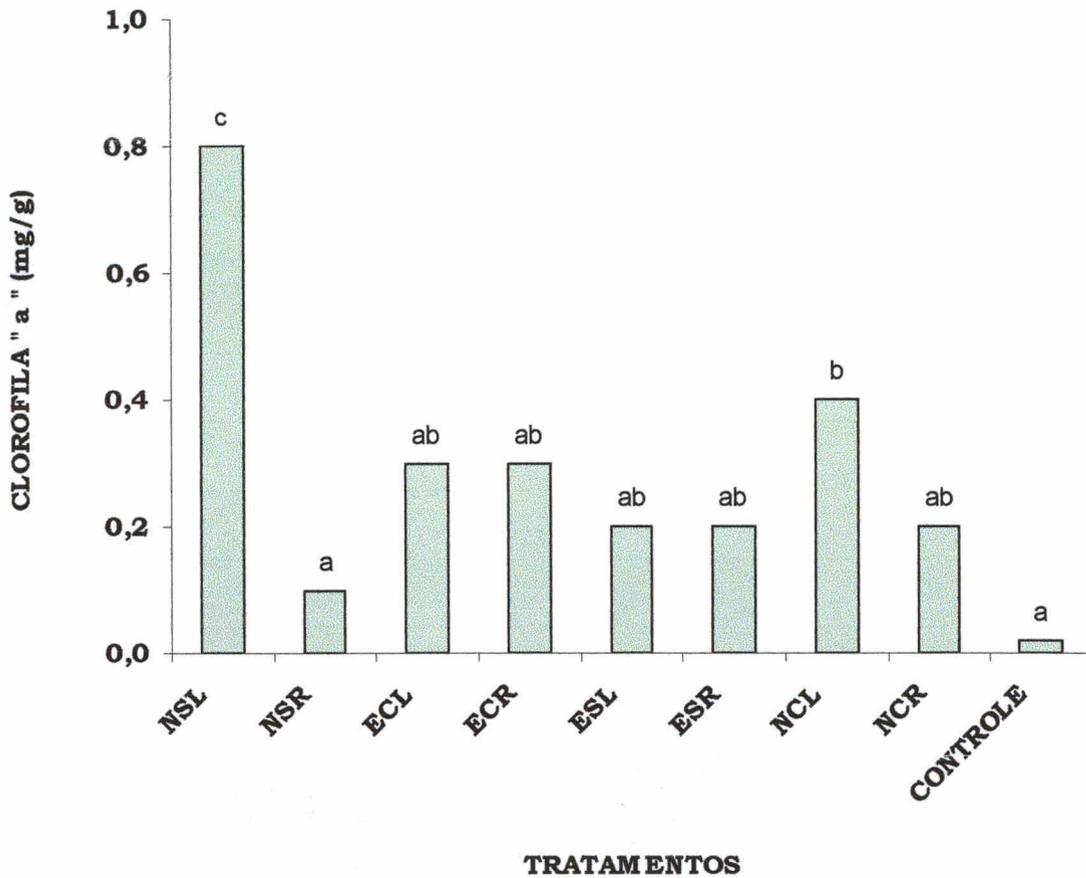


Figura 23: Teor de clorofila "a" dos gametófitos de *Rumohra adiantiformis* provenientes de esporos criopreservados, com 10 semanas de cultivo. Os gametófitos cresceram em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , a  $25^\circ\text{C}$ . Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste LSD, entre os tratamentos. ESL= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; ESR= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; ECL= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; ECR= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NCL= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; NCR= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NSL= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; NSR= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; CONTROLE = esporos esterilizados, não criopreservados.

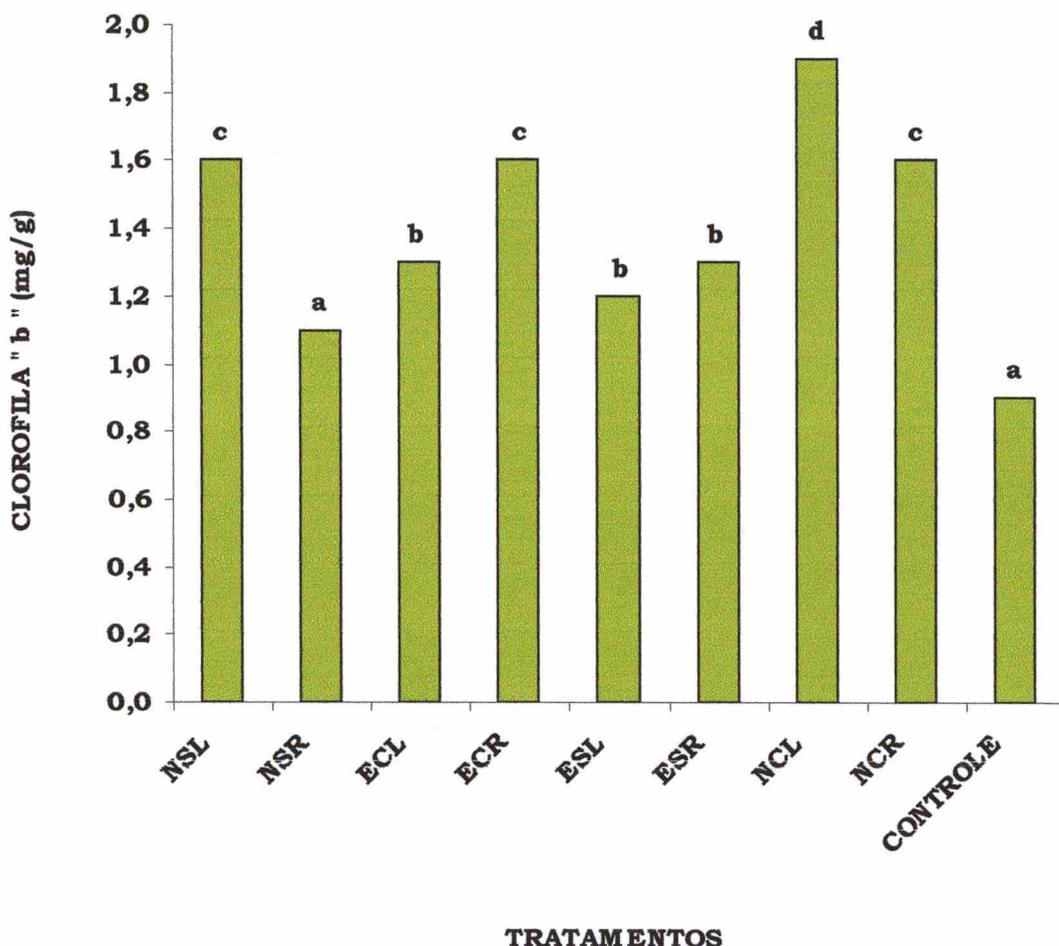


Figura 24: Teor de clorofila "b" dos gametófitos de *Rumohra adiantiformis* provenientes de esporos criopreservados, com 10 semanas de cultivo. Os gametófitos cresceram em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , a  $25^{\circ}\text{C}$ . Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste LSD, entre os tratamentos. ESL= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; ESR= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; ECL= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; ECR= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NCL= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; NCR= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NSL= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; NSR= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; CONTROLE = esporos esterilizados, não criopreservados.

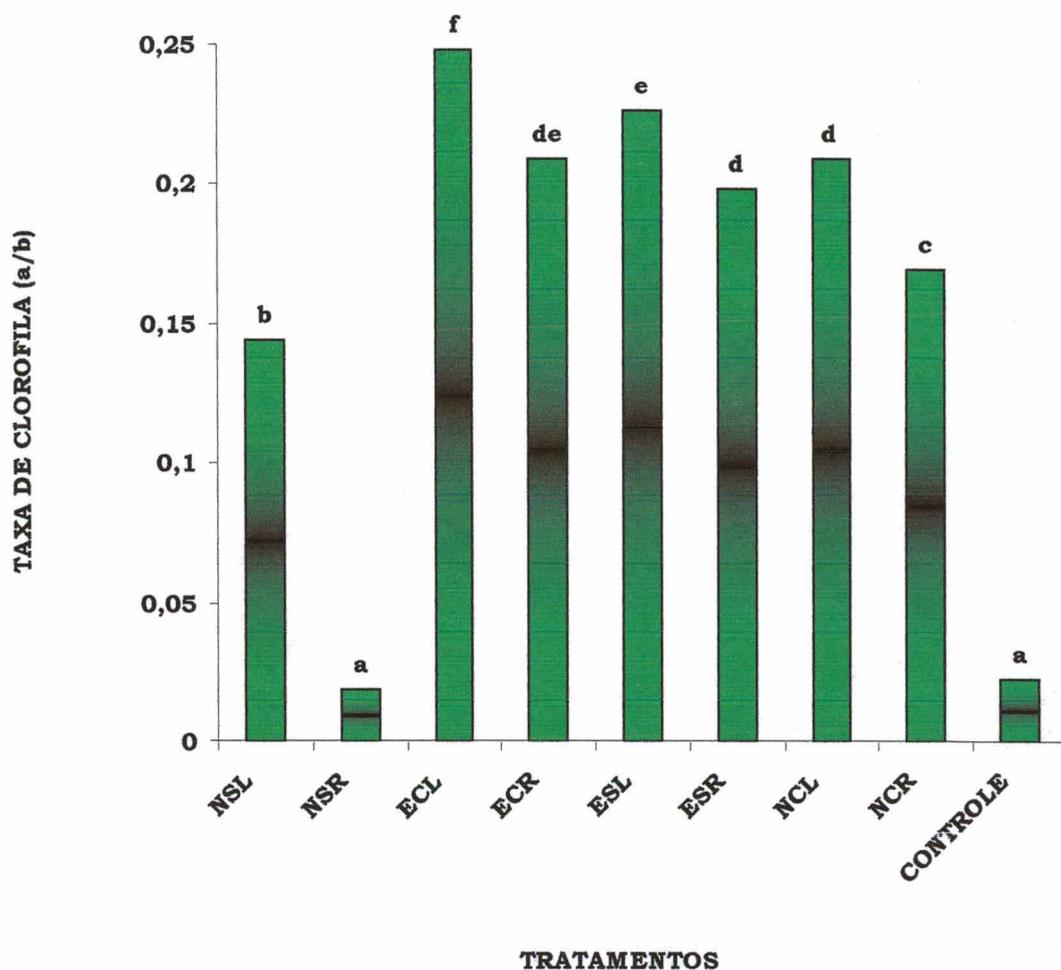


Figura 25: Taxa de clorofila (a/b) dos gametófitos de *Rumohra adiantiformis* provenientes de esporos criopreservados, com 10 semanas de cultivo. Os gametófitos cresceram em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , a  $25^{\circ}\text{C}$ . Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste LSD, entre os tratamentos. ESL= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; ESR= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; ECL= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; ECR= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NCL= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; NCR= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NSL= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; NSR= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; CONTROLE = esporos esterilizados, não criopreservados.

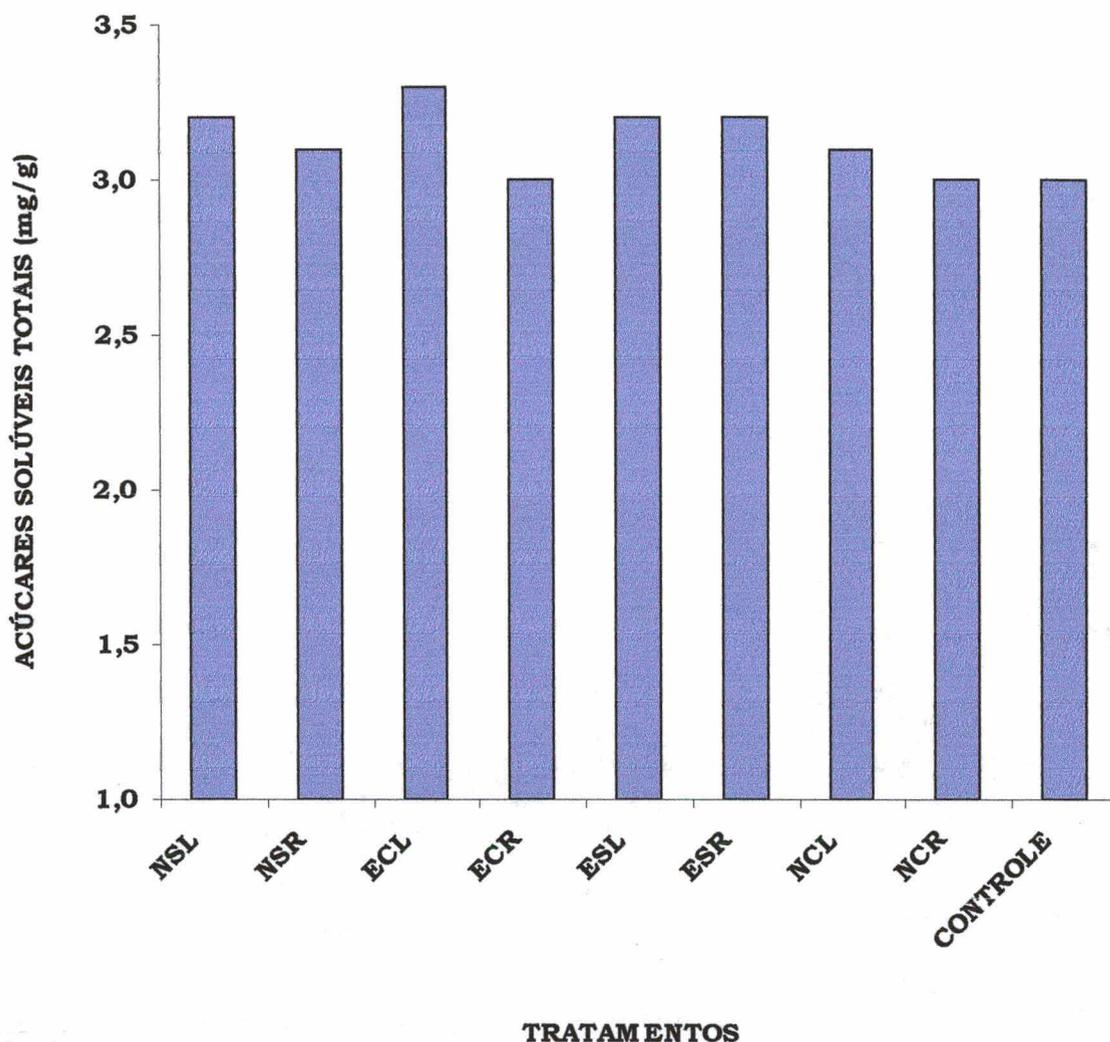


Figura 26: Teor de açúcares solúveis totais dos gametófitos de *Rumohra adiantiformis* provenientes de esporos criopreservados, com 10 semanas de cultivo. Os gametófitos cresceram em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , a  $25^\circ\text{C}$ . Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. ESL= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; ESR= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; ECL= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; ECR= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NCL= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; NCR= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NSL= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; NSR= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; CONTROLE = esporos esterilizados, não criopreservados.

As figuras 27 e 28 mostram o número de frondes dos esporófitos provenientes dos esporos criopreservados e degelados lenta e rapidamente, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos.

Nas figuras 29 e 30 observa-se o comprimento da primeira fronde dos esporófitos provenientes dos esporos criopreservados e degelados lenta e rapidamente, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos.

A figura 31 compara as taxas médias de crescimento relativo da primeira fronde dos esporófitos provenientes de esporos criopreservados, entre 25 e 33 semanas de cultivo. Observam-se as menores taxas nos esporófitos oriundos de esporos não esterilizados, com ou sem crioproteção e degelados lentamente. As maiores taxas foram obtidas dos esporófitos provenientes de esporos esterilizados, sem crioproteção, degelados lentamente e dos esporos não esterilizados, com crioproteção, degelados rapidamente.

A figura 32 mostra que o maior peso de matéria fresca foi obtido nos esporófitos provenientes do controle que igualou-se ao dos esporos não esterilizados, não crioprottegidos, submetidos ao degelo rápido, seguidos dos esporófitos provenientes de esporos não esterilizados, não crioprottegidos e submetidos ao degelo lento. O menor peso de matéria fresca foi observado nos esporófitos provenientes de esporos não esterilizados, crioprottegidos e submetidos ao degelo lento.

A figura 33 mostra que o maior peso de matéria seca foi encontrado em esporófitos provenientes do controle, seguidos dos esporófitos oriundos de esporos não esterilizados, não crioprottegidos e degelados rapidamente. O menor peso seco foi encontrado em esporófitos provenientes de esporos não esterilizados, crioprottegidos e degelados lentamente, nos oriundos de esporos esterilizados, com e sem crioprotetor, degelados lenta e rapidamente.

Na figura 34, observa-se que o menor teor de clorofila total foi obtido nos esporófitos oriundos de esporos não esterilizados, não crioprottegidos e degelados rapidamente. Os demais tratamentos igualaram-se ao controle.

A figura 35 mostra que não houve diferença estatística entre o teor de clorofila "a" dos tratamentos de criopreservação e o controle.

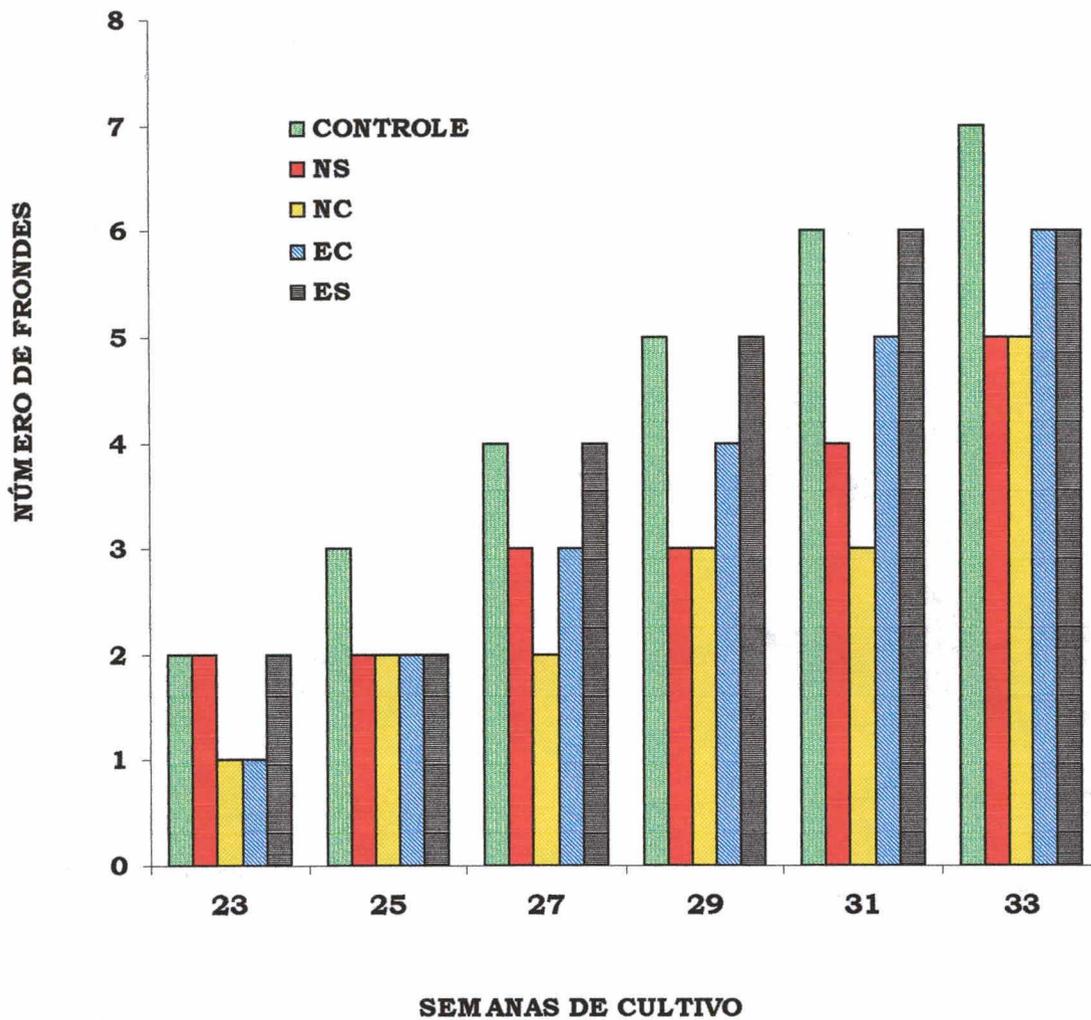


Figura 27: Número de frondes dos esporófitos de *Rumohra adiantiformis* provenientes de esporos criopreservados e degelados lentamente. Os esporófitos cresceram em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , a  $25^{\circ}\text{C}$ . Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. ES= esporos esterilizados, sem crioprotetor; EC= esporos esterilizados, com crioprotetor; NC= esporos não esterilizados, com crioprotetor; NS= esporos não esterilizados, sem crioprotetor; CONTROLE = esporos esterilizados, não criopreservados.

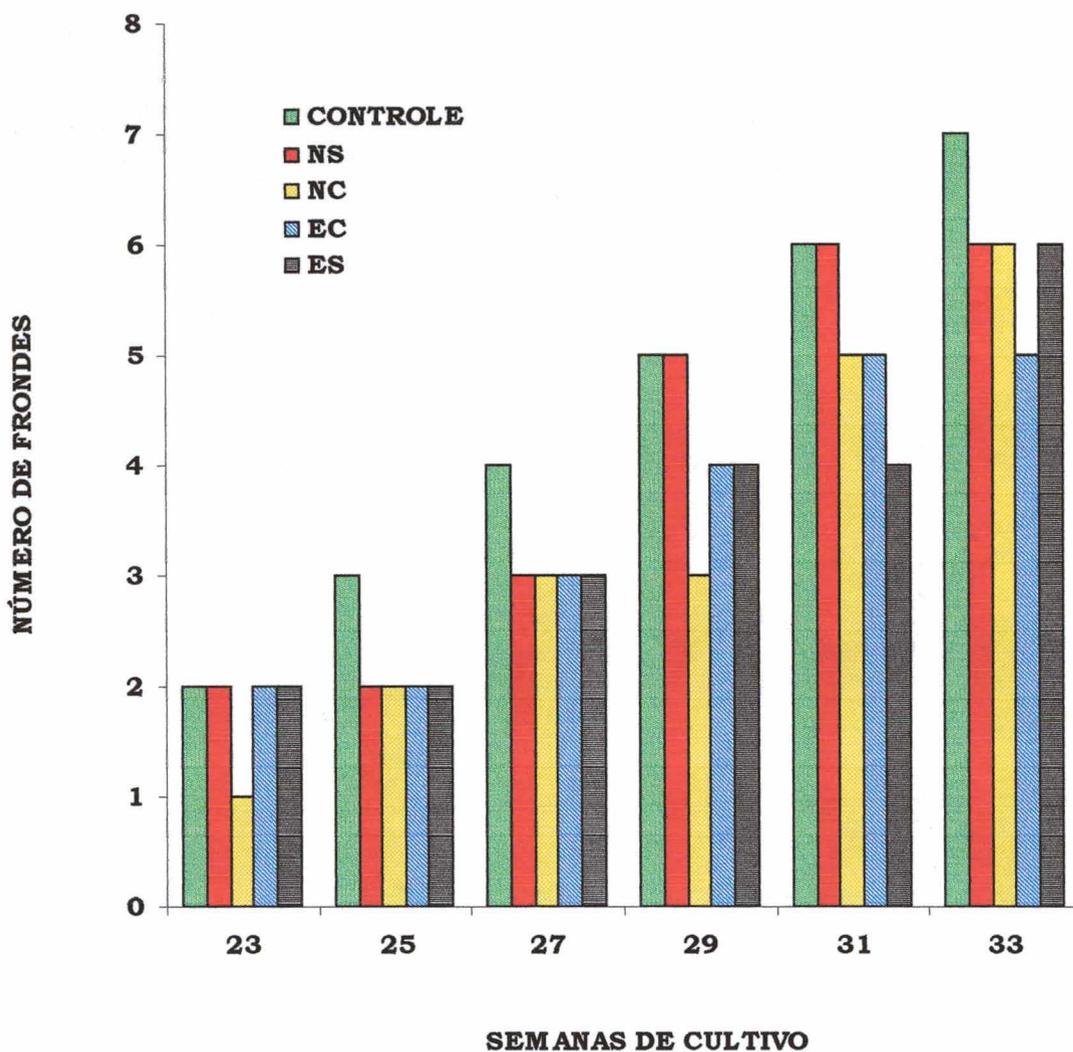


Figura 28: Número de frondes dos esporófitos de *Rumohra adiantiformis* provenientes de esporos criopreservados e degelados rapidamente. Os esporófitos cresceram em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , a  $25^{\circ}\text{C}$ . Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. ES= esporos esterilizados, sem crioprotetor; EC= esporos esterilizados, com crioprotetor; NC= esporos não esterilizados, com crioprotetor; NS= esporos não esterilizados, sem crioprotetor; CONTROLE = esporos esterilizados, não criopreservados.

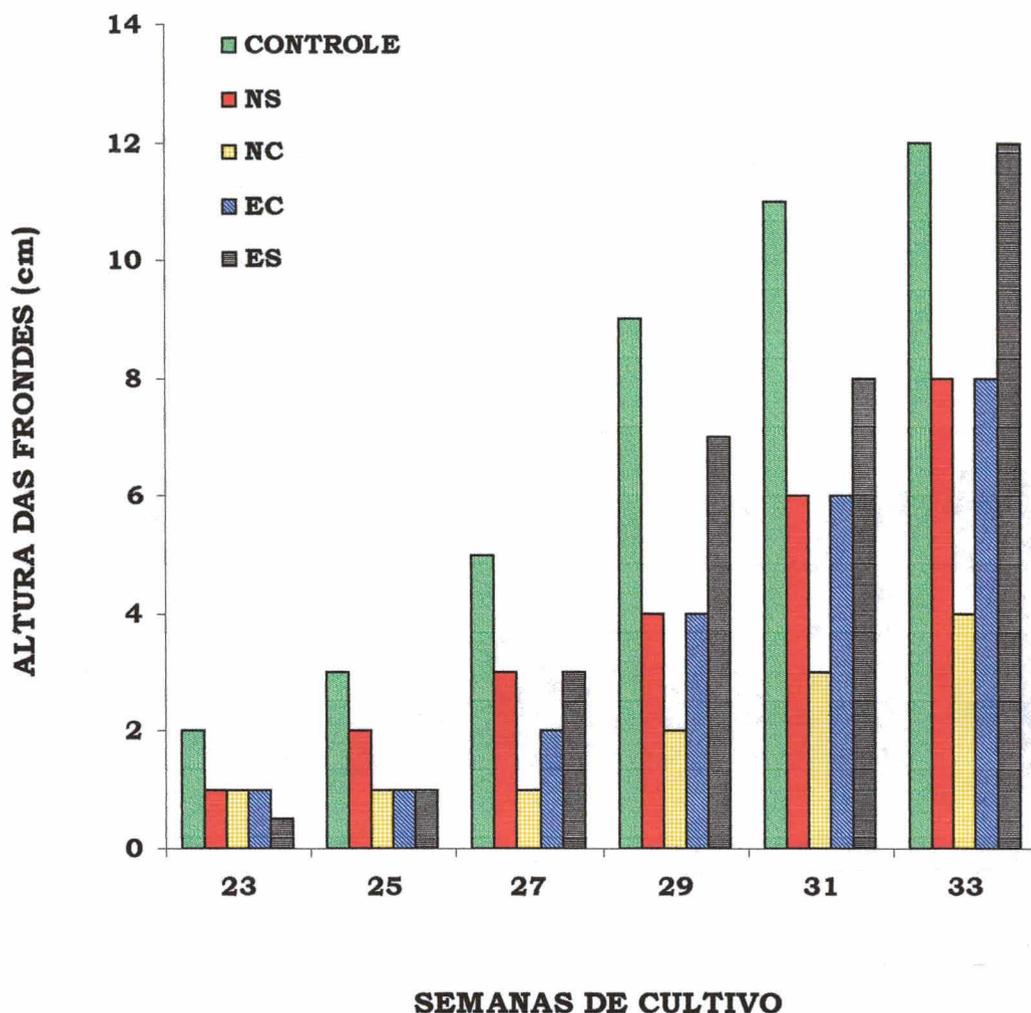


Figura 29: Comprimento da primeira fronde dos esporófitos de *Rumohra adiantiformis* provenientes de esporos criopreservados e degelados lentamente. Os esporófitos cresceram em sala de crescimento 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , a  $25^\circ\text{C}$ . Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. ES= esporos esterilizados, sem crioprotetor; EC= esporos esterilizados, com crioprotetor; NC= esporos não esterilizados, com crioprotetor; NS= esporos não esterilizados, sem crioprotetor; CONTROLE = esporos esterilizados, não criopreservados.

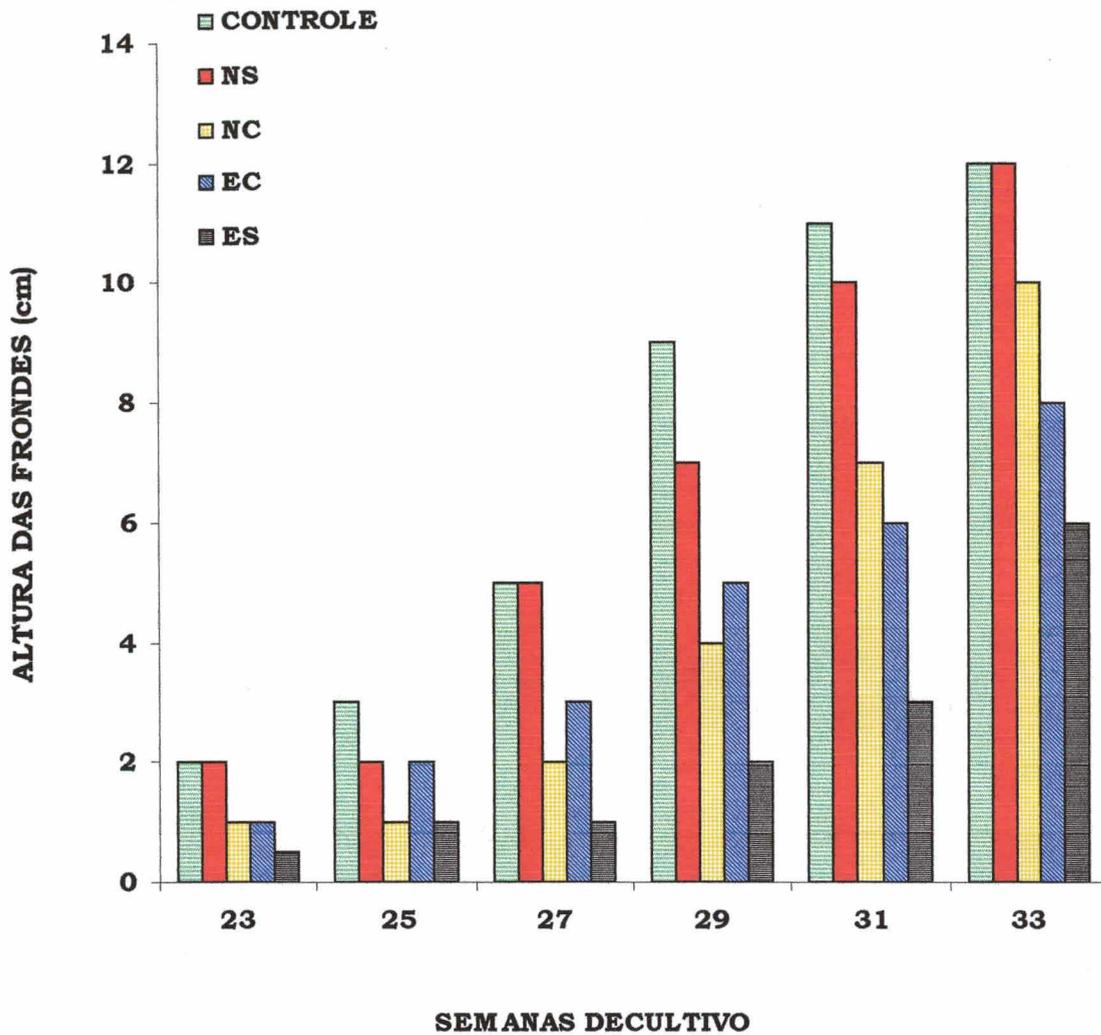


Figura 30: Comprimento da primeira fronde dos esporófitos de *Rumohra adiantiformis* provenientes de esporos criopreservados e degelados rapidamente. Os esporófitos cresceram em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , a  $25^\circ\text{C}$ . Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. ES= esporos esterilizados, sem crioprotetor; EC= esporos esterilizados, com crioprotetor; NC= esporos não esterilizados, com crioprotetor; NS= esporos não esterilizados, sem crioprotetor; CONTROLE = esporos esterilizados, não criopreservados.

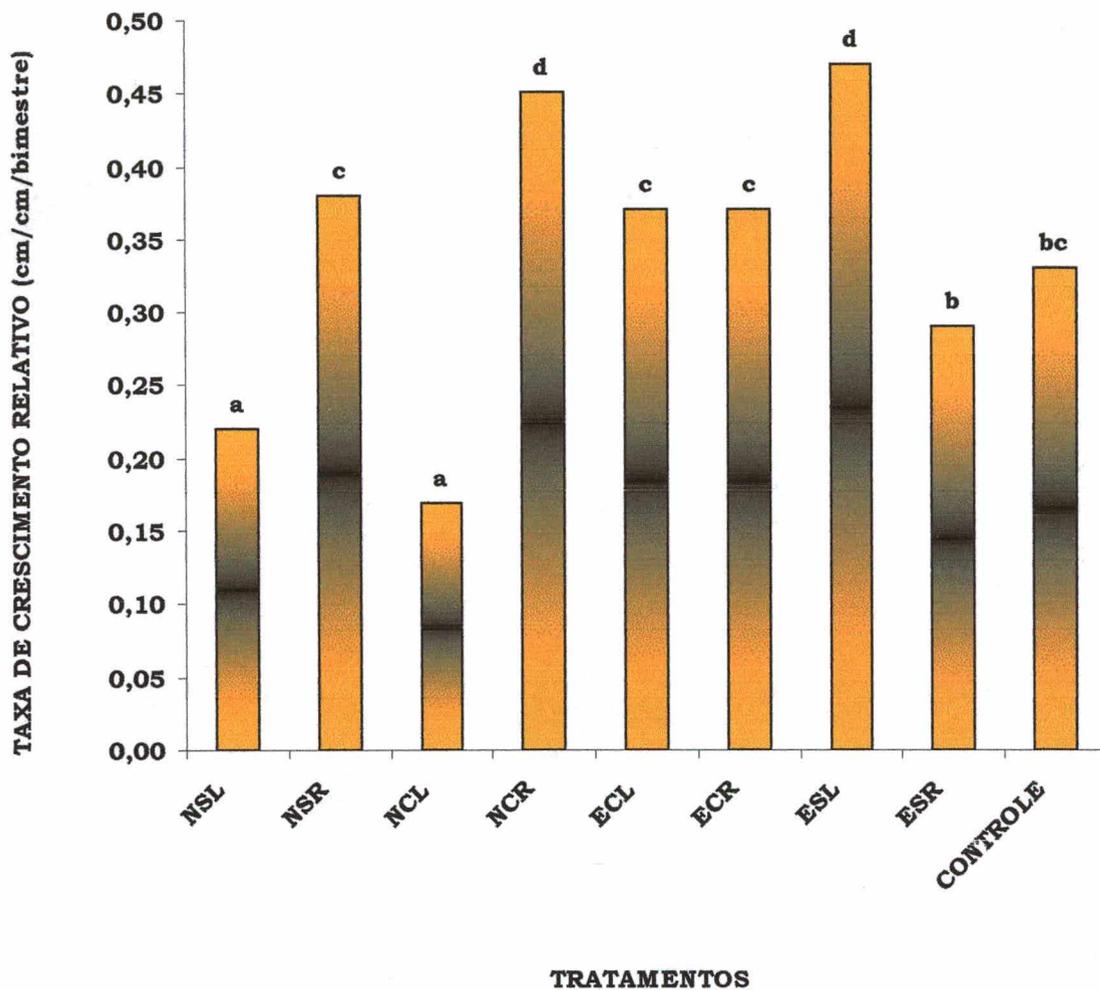


Figura 31: Taxa média de crescimento relativo da primeira fronde dos esporófitos, avaliados entre 25 e 33 semanas de cultivo, provenientes de esporos criopreservados. Os esporófitos cresceram em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , a  $25^\circ\text{C}$ . ESL= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; ESR= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; ECL= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; ECR= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NCL= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; NCR= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NSL= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; NSR= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; CONTROLE = esporos esterilizados, não criopreservados.

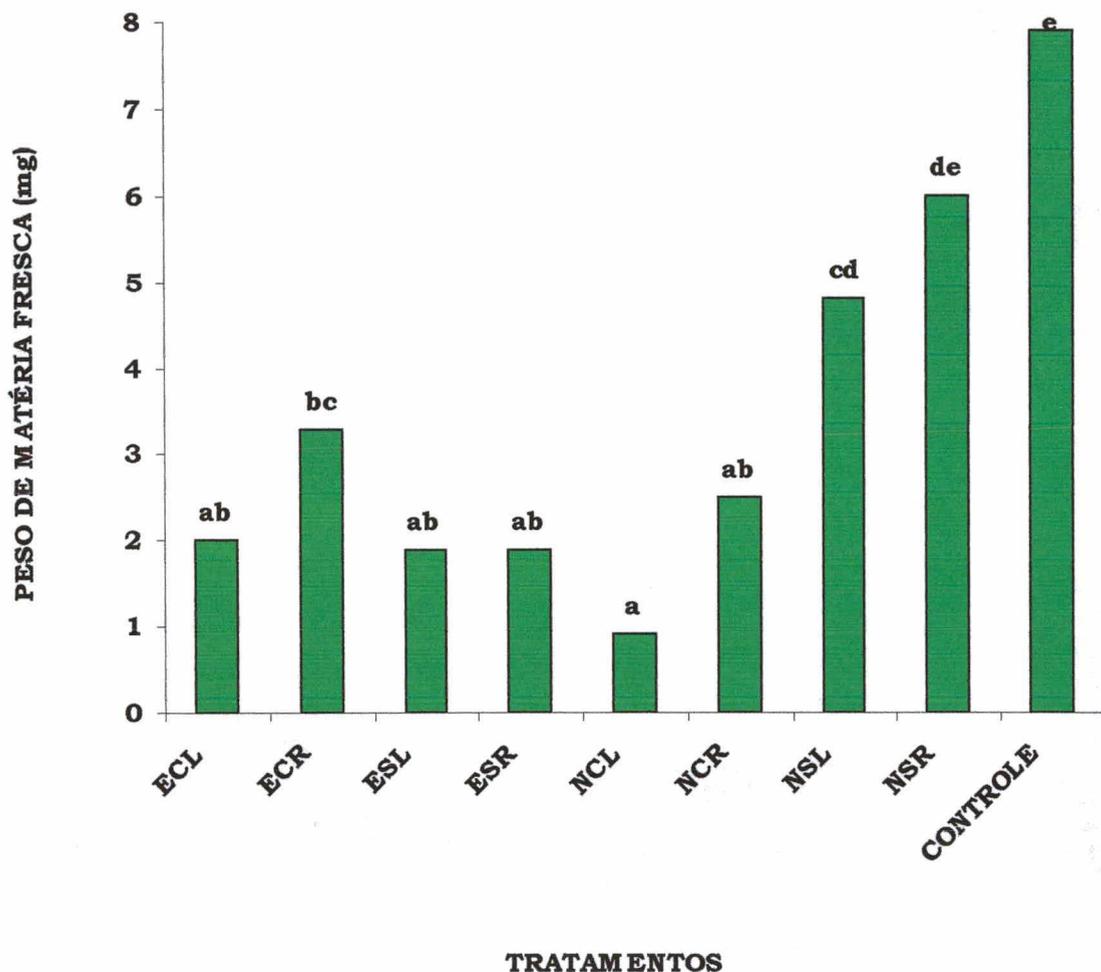


Figura 32: Variação da matéria fresca dos esporófitos de *Rumohra adiantiformis*, provenientes de esporos criopreservados, com 42 semanas de cultivo. Os esporófitos cresceram em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , a  $25^{\circ}\text{C}$ . Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste LSD, entre os tratamentos. ESL= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; ESR= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; ECL= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; ECR= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NCL= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; NCR= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NSL= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; NSR= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; CONTROLE = esporos esterilizados, não criopreservados.

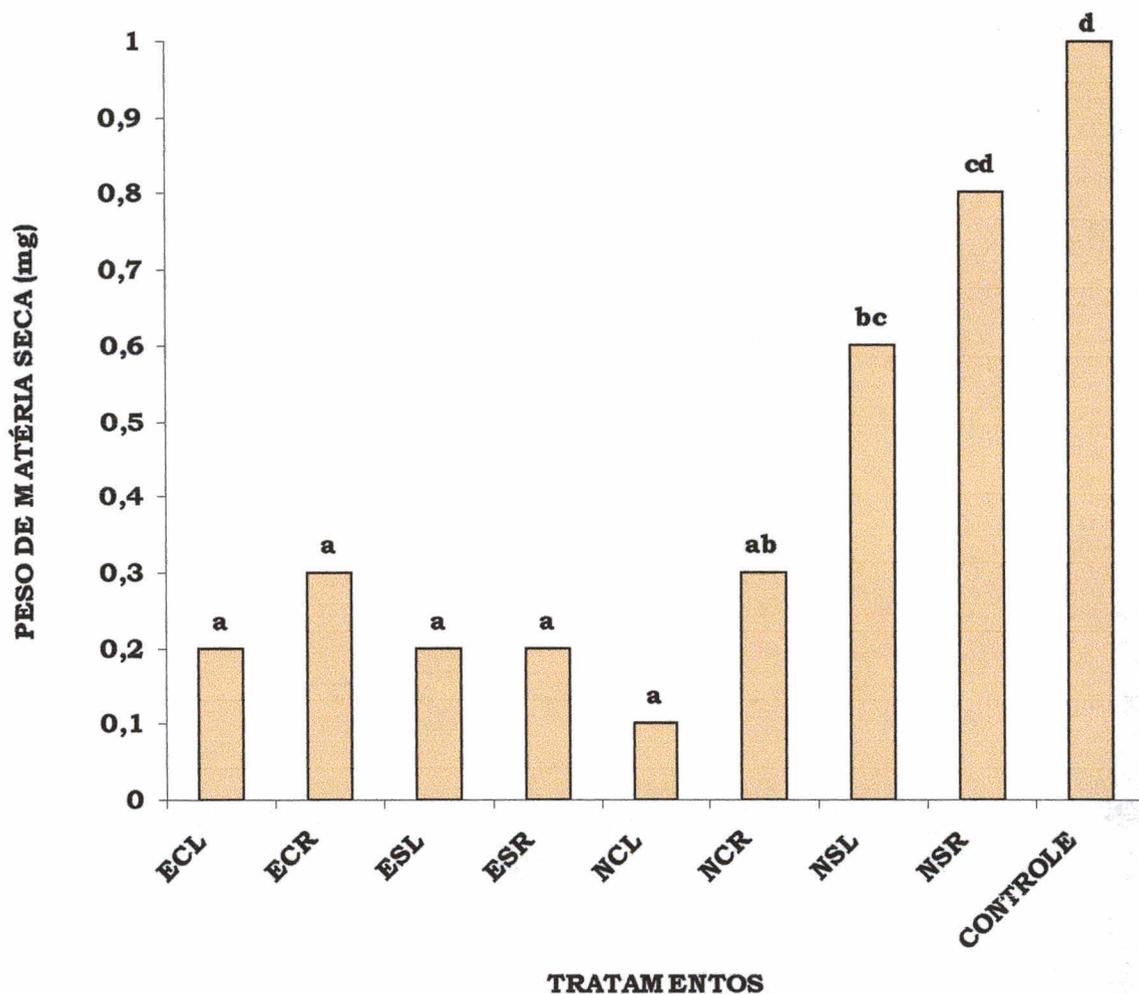


Figura 33: Variação da matéria seca dos esporófitos de *Rumohra adiantiformis*, provenientes de esporos criopreservados, com 42 semanas de cultivo. Os esporófitos cresceram em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , a  $25^\circ\text{C}$ . Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste LSD, entre os tratamentos. ESL= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; ESR= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; ECL= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; ECR= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NCL= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; NCR= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NSL= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; NSR= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; CONTROLE = esporos esterilizados, não criopreservados.

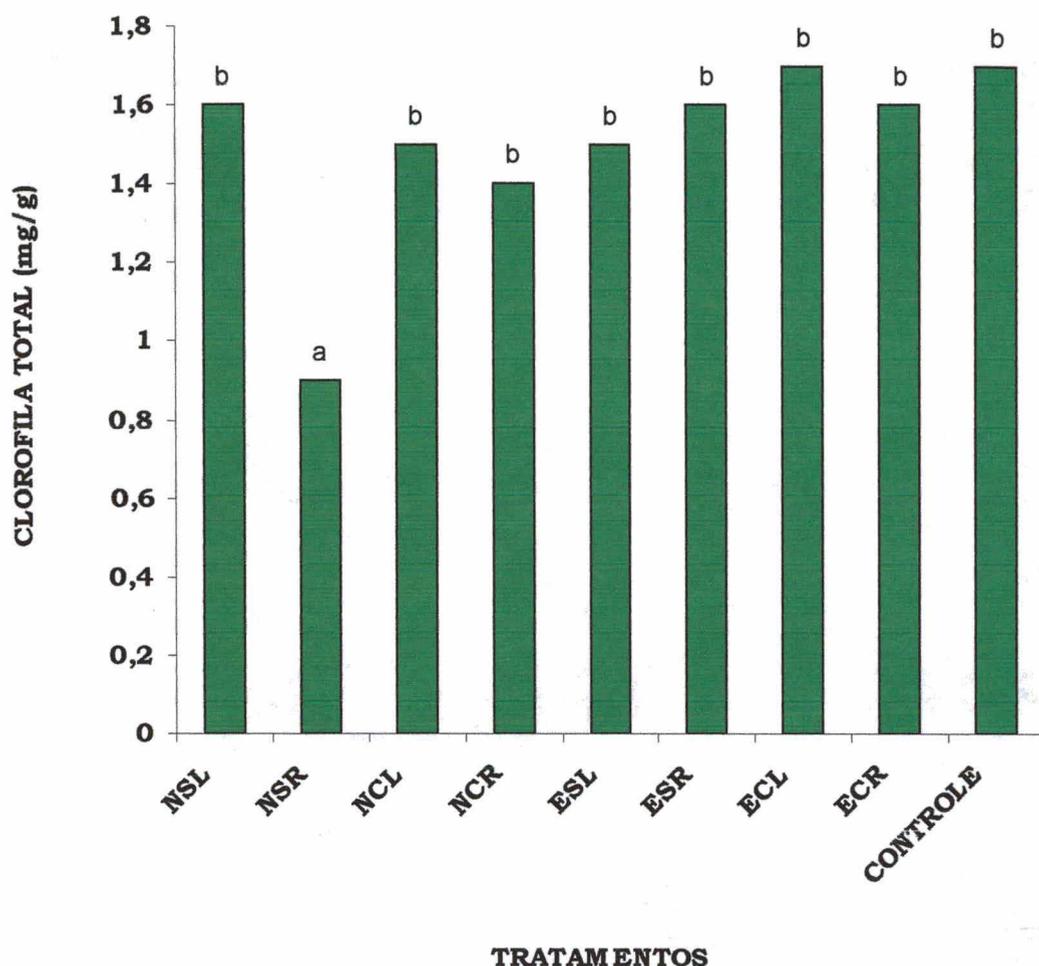


Figura 34: Teor de clorofila total dos esporófitos de *Rumohra adiantiformis* provenientes de esporos criopreservados, com 42 semanas de cultivo. Os esporófitos cresceram em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , a  $25^{\circ}\text{C}$ . Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste LSD, entre os tratamentos. ESL= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; ESR= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; ECL= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; ECR= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NCL= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; NCR= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NSL= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; NSR= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; CONTROLE = esporos esterilizados, não criopreservados..

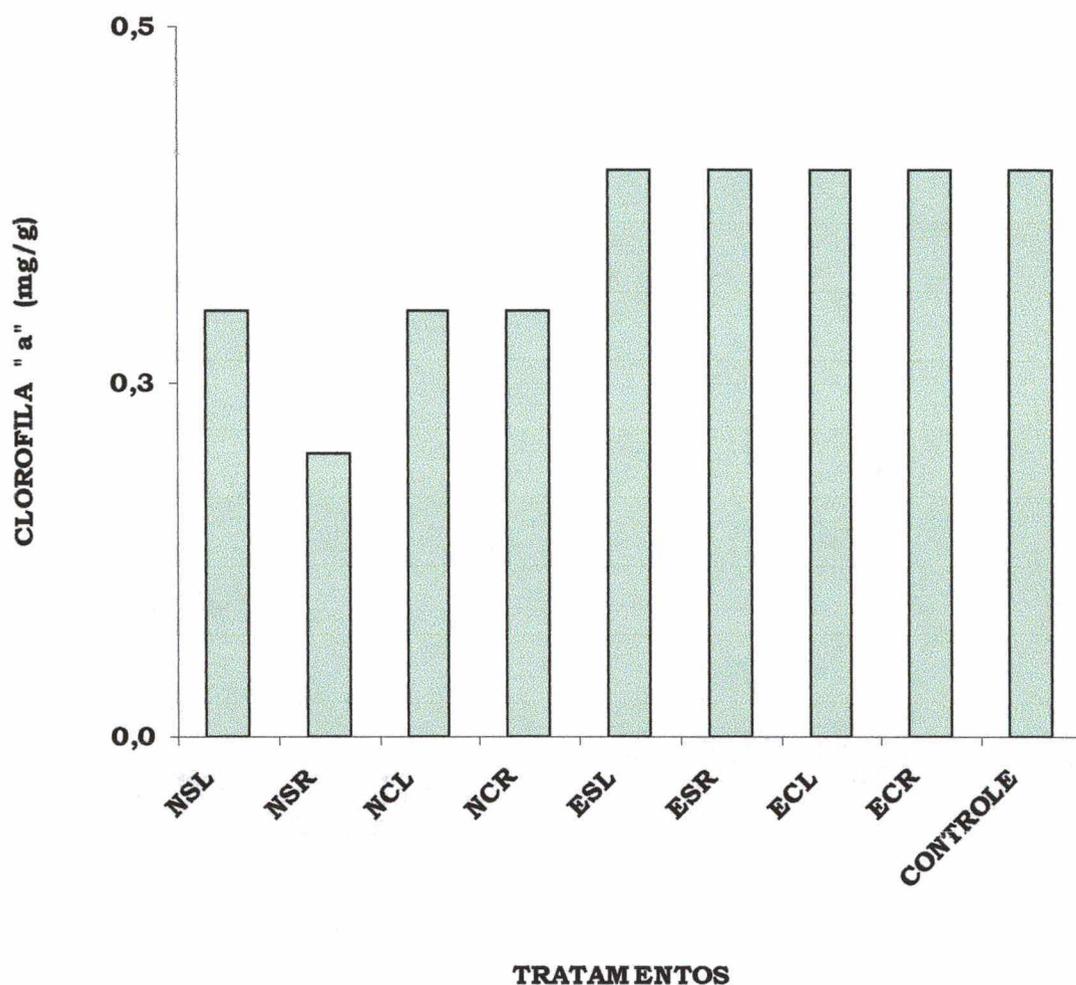


Figura 35: Teor de clorofila “a” dos esporófitos de *Rumohra adiantiformis* provenientes de esporos criopreservados, com 42 semanas de cultivo. Os esporófitos cresceram em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , a  $25^{\circ}\text{C}$ . Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. ESL= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; ESR= esporos esterilizados, sem crioprotetor , degelo rápido; ECL= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; ECR= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NCL= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; NCR= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NSL= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; NSR= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; CONTROLE = esporos esterilizados, não criopreservados.

Na figura 36 observa-se que o menor teor de clorofila “b” foi obtido nos esporófitos oriundos de esporos não esterilizados, sem crioprotetor e degelados rapidamente. Os demais tratamentos igualaram-se ao controle.

A figura 37 mostra que esporófitos oriundos dos esporos não esterilizados, sem crioproteção e degelados lentamente apresentaram a menor taxa de clorofila e os esporófitos provenientes dos esporos esterilizados, criopreservados sem crioproteção e degelados lenta ou rapidamente apresentaram as maiores taxas de clorofila. Os demais tratamentos igualaram-se ao controle.

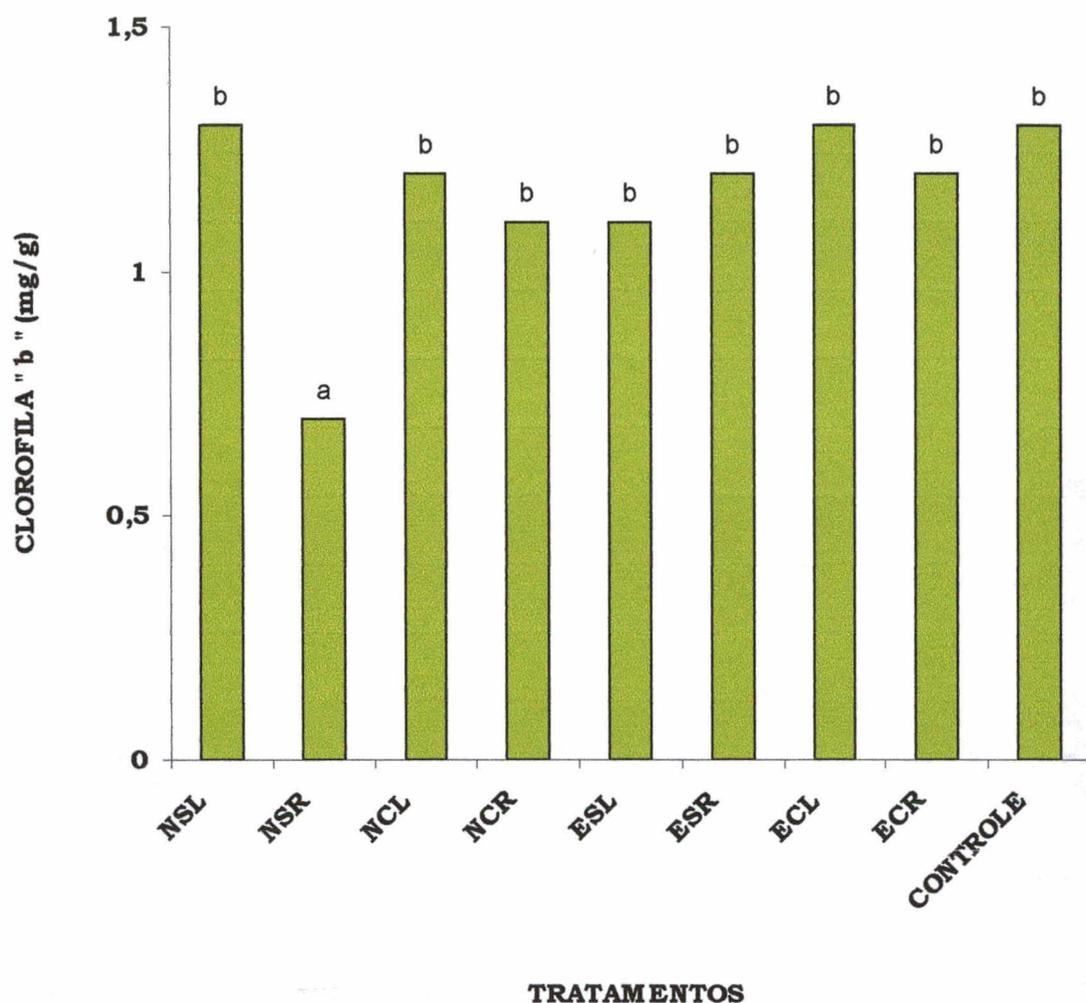


Figura 36: Teor de clorofila "b" dos esporófitos de *Rumohra adiantiformis* provenientes de esporos criopreservados, com 42 semanas de cultivo. Os esporófitos cresceram em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , a  $25^\circ\text{C}$ . Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste LSD, entre os tratamentos. ESL= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; ESR= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; ECL= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; ECR= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NCL= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; NCR= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NSL= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; NSR= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; CONTROLE = esporos esterilizados, não criopreservados.

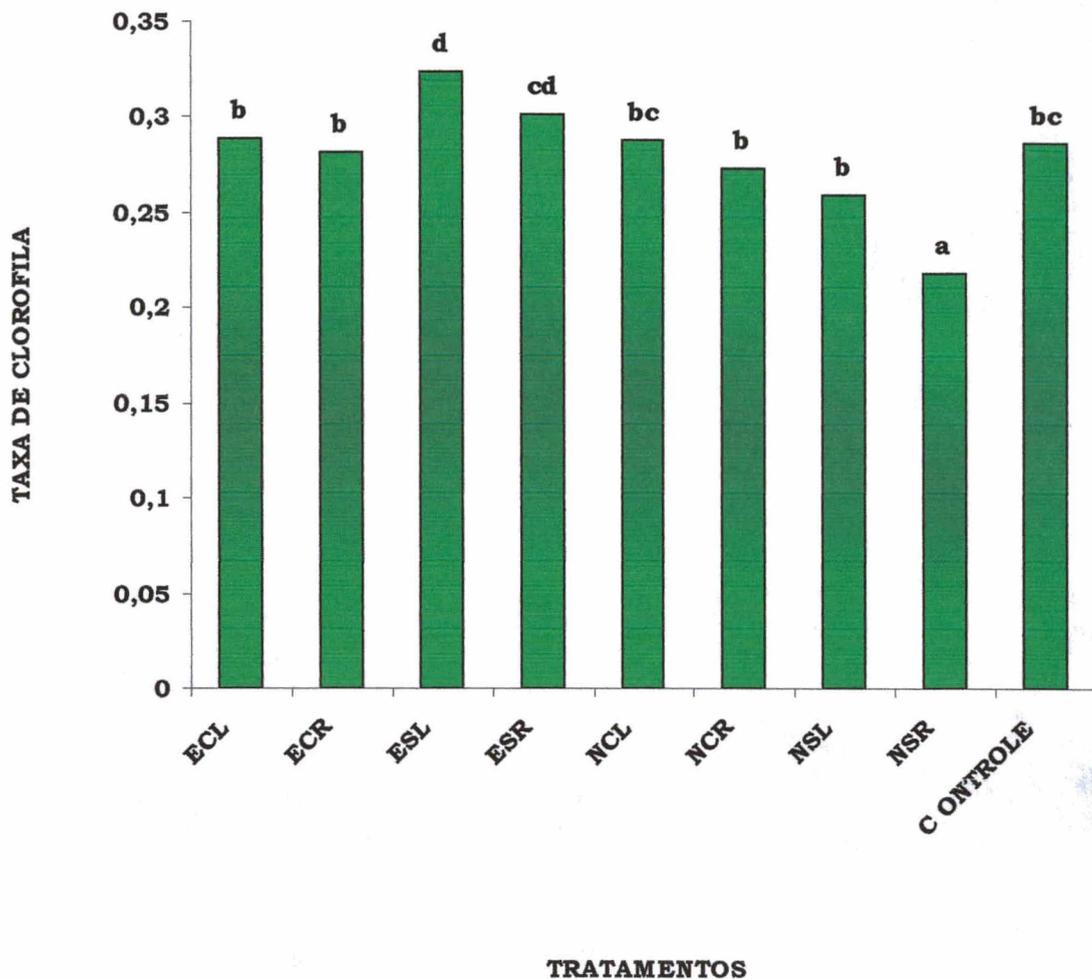


Figura 37: Taxa de clorofila (a/b) dos esporófitos de *Rumohra adiantiformis* provenientes de esporos criopreservados, com 42 semanas de cultivo. Os esporófitos cresceram em sala de crescimento, 16 horas de luz, densidade de fluxo de fótons de  $31,68 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , a  $25^\circ\text{C}$ . Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste LSD, entre os tratamentos. ESL= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; ESR= esporos esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; ECL= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; ECR= esporos esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NCL= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo lento; NCR= esporos não esterilizados, com crioprotetor, degelo rápido; NSL= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo lento; NSR= esporos não esterilizados, sem crioprotetor, degelo rápido; CONTROLE = esporos esterilizados, não criopreservados.

## 6-DISCUSSÃO

Os esporos de *Rumohra adiantiformis* são fotoblásticos positivos e atingem o máximo percentual de germinação com 8 dias de cultivo, sob luz branca, a  $23^{\circ}\text{C} \pm 2$ , densidade de fluxo de fótons de  $31,68\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , formando 2 células rizoidais hialinas e uma célula protálica. Resultados semelhantes foram obtidos por RANDI (1996) que observou que esporos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd & Fisch. (Pteridaceae) sob fotoperíodo de 12 horas apresentaram a máxima germinação após nove dias de cultivo a  $25^{\circ}\text{C}$  e por FILIPPINI *et al* (1999) que observaram que os esporos de *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook são fotoblásticos positivos atingindo a máxima germinação a  $23^{\circ}\text{C} \pm 2$  em luz branca após 8 ou 9 dias de cultivo. Porém, a germinação de *R. adiantiformis* é mais rápida quando comparada com outras espécies de pteridófitas como a estudada por PÉREZ-GARCIA *et al* (1994), que cultivaram esporos de *Thelypteris rhachifexuosa* Riba. (Thelypteridaceae) em laboratório e observaram que a germinação iniciou com oito dias de cultivo, com a formação de uma célula protálica e uma rizoidal hialina. A germinação de *Niphidium crassifolium* (Filicales: Polypodiaceae s. str.), também iniciou após 10 dias de cultivo, atingindo 95%, (JARAMILLO *et al* 1996). MENDONZA *et al* (1997) observaram que a germinação de *Pteris berteriana* (Pteridaceae) ocorreu a partir do oitavo dia de cultivo com o aparecimento da célula rizoidal hialina grande, sem cloroplastos.

Já outras espécies de pteridófitas apresentam baixas porcentagens de germinação, como por exemplo, *Trichipteris corcovadensis* (RADDI) Copel., espécie que ocorre nas matas úmidas da Serra do Mar, em São Paulo, que atinge 20% de germinação após 14 dias de cultivo; em *Adiantum serratodontatum* Willd., a porcentagem de germinação é de 35% e em *Polypodium hirsutissimum* Raddi., 49% (ESTEVEZ & FELIPPE, 1985, FELIPPE *et al.*, 1989).

Neste trabalho não houve a necessidade de métodos drásticos de esterilização como aconteceu com os esporos de *Dicksonia sellowiana* (FILIPPINI *et al*, 1999, ROGGE, 2000). Os esporos não esterilizados, não apresentavam contaminação por fungos. Entretanto, sofreram contaminação de protozoários que provavelmente achavam-se encistados junto das frondes. As esterilizações com hipoclorito de sódio em concentrações inferiores a 15% matavam os protozoários, mas alteravam a exina dos esporos tornando-os suscetíveis aos fungos e acima de 15%, evitavam, mas retardavam a germinação. Simabukuro *et al* (1998) citam que a contaminação por bactérias e fungos não é prejudicial para a viabilidade de esporos de

samambaias quando armazenados a seco, mas pode ser desvantajosa durante a germinação e desenvolvimento. Entretanto, durante o armazenamento em meio úmido, pode comprometer a viabilidade desses esporos. Os autores observaram que o pré-tratamento com hipoclorito de sódio acima de 0,5% reduziu a contaminação pelos fungos, mas também reduziu a germinação dos esporos de *C. delgadii* após 7 dias de cultivo.

CAMLOH (1999) observou que esporos de *Platyserium bifurcatum* L., esterilizados, sofreram diminuição no comprimento do primeiro rizóide, no número de rizóides e de células do gametófito. Uma possível explicação para esses efeitos podem ser as mudanças que acontecem na permeabilidade da exina do esporo. Se a permeabilidade aumenta com o período de armazenamento, ocorrerá detrimento do mesmo quando atingido por agentes esterilizantes.

Os esporos de *Rumohra adiantiformis* apresentaram maior percentual de germinação em menor número de dias a 91% de redução da luminosidade no verão, outono e inverno, cujas temperaturas mínimas e máximas foram respectivamente, para cada estação 17-32°C, 13-30°C e 5-26°C, de acordo com a estação de monitoramento do vôo, Florianópolis/SC. O tratamento de 28% de redução de luz foi o que provocou maior retardo e diminuição do percentual da germinação provavelmente devido a fotoinibição em decorrência da interação da intensidade luminosa com a temperatura. BEWLEY & BLACK (1994) citam que mesmo em diversas espécies de sementes, cuja dormência é quebrada pela luz, a germinação pode ser inibida por exposição prolongada a luz solar especialmente se o fluxo de fótons for alto. Tal mecanismo serviria para reprimir a germinação sob altas intensidades luminosas quando as plântulas ficariam expostas a condições estressantes colocando em risco seu estabelecimento no ambiente. Resultado semelhante foi observado por ROGGE (2000), que cultivou esporos de *D. sellowiana* Hook. sob 50, 64, 80 e 95% de redução da luz obtendo maior percentual de germinação nas reduções de 64 e 95%. FILIPPINI *et al* (1999), obtiveram percentagens de germinação mais altas para as reduções de 74, 81 e 96% após 10 dias.

Por outro lado, PÉREZ-GARCÍA *et al* (1994) observaram que esporos de *Lygodium heterodoxum* Kunze não germinaram no escuro, mas em luz branca e vermelho extremo. A indiferença a qualidade da luz explica por que *L. heterodoxum* germina e desenvolve abaixo do dossel.

As maiores porcentagens de germinação de *R. adiantiformis* foram obtidas aos 20 e 25°C após 10 dias de cultivo e houve inibição parcial da germinação a 30°C. Os efeitos da temperatura na germinação dos esporos de certas espécies de samambaias são complexos devido

a interação com a luz. Altas temperaturas seguidas de irradiações com uma dose saturante de luz vermelha inibem os processos de germinação dos esporos (RANAL, 1999). RAGHAVAN (1989) cita que altas temperaturas desativam as moléculas de fitocromo. De acordo com TOWIL (1978) a diminuição na hidratação e as mudanças das propriedades da membrana tornam os esporos sensíveis a temperatura. O escuro ou a combinação de escuro com baixas temperaturas usadas em pré-tratamentos, estimularam a germinação de *Schizaea pusilla* Pursh durante subseqüentes exposições a luz (GUIRAGOSSIAN & KONING, 1986). RANAL (1999) cita que, para diversas espécies de pteridófitas, os esporos cultivados sob as temperaturas de 20 e 25°C apresentaram maior percentual de germinação diferindo das espécies de samambaia *Microgramma lindbergii* (Kuhn) Sota, *Polypodium hirsutissimum* Raddi, *P. pleopeltifolium* Raddi, *P. latipes* Langsd. & Fisch., *Adiantopsis radiata* (L.) Fée e *Pteris denticulata* Sw. que apresentaram maior germinação a 18°C. Apenas *P. polipoidioides* (L.) Watt. atingiu maior germinação a 22°C. Esporos de *Cyathea delgadii* germinaram a 15, 20, 25 e 30°C, com maior germinação a 25°C (RANDI & FELIPPE, 1988).

PÉREZ-GARCÍA *et al* (1982) analisando a germinação dos esporos das Cyathaceae sob diversas temperaturas, observaram que *Lophosoria quadripinata* (Gmel.) C. Chr. e *Trichipteris bicrenata* (Liebm.) Tryon atingiram seu ótimo de germinação na faixa dos 18 e 25°C, apresentando tolerância de 11 a 32°C e de 15 a 28°C, respectivamente. As espécies *Trichipteris scrabiusscula*, *Nephelea mexicana* (Schlect. & Cham.) Tryon e *Cyathea fulva* (Mart. & Gal) Fée apresentaram seu ótimo de germinação a 25°C. As duas primeiras tolerando a faixa dos 15 a 28°C e a última a faixa dos 11 aos 28°C.

PANGUÁ *et al* (1994) observaram que a germinação de *Asplenium trichomanes* L. subesp. *quadrivalens* D. E. Meyer emend. Lovis e *A. scolopendrium* L. a 20 e 25°C começou após 5 dias de cultivo terminando aos 12 dias. A 15°C houve atraso de 5 dias e a 10°C a germinação ocorreu entre 7 e 8 dias estabilizando aos 28 dias de cultivo. Para *A. ruta-muraria* L. a melhor germinação ocorreu a 25°C.

HAUPT (1992) observou que esporos de *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott foram inibidos com o aumento da temperatura de 22 para 32°C. A sensibilidade ao efeito da temperatura foi encontrada no período antecedente ao pulso de luz vermelha e durante a fase de acoplamento, isto é, antes e durante a conversão de Fv a Fve. O Fve provavelmente acopla-se a genes reguladores resultando na síntese da proteína Q e os passos subsequentes da cadeia de tradução são iniciados, independentemente da presença de Fve, caracterizando a fase de pós-

acoplamento. Então, sob altas temperaturas, o fitocromo é inibido, afetando a fase de acoplamento por comprometer elementos importantes na fase de pré-acoplamento.

Os esporos de *Rumohra adiantiformis*, após 13 meses de cultivo sofreram retardo na germinação embora não tenha sido detectada perda de viabilidade dos mesmos. RANDI (1996), trabalhando com a fotossensibilidade, viabilidade e substâncias de reserva em esporos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd & Fisch. (Pteridaceae) observou que a viabilidade dos esporos estocados em frascos de vidro a 3°C foi mantida por cerca de 3 anos.

SMITH & ROBINSON (1975), observaram que esporos de *Polypodium vulgare* L. armazenados durante 1, 2, 3 e 4 anos, sofreram diminuição no teor de açúcares solúveis totais, proteínas e aminoácidos livres, gradualmente com o tempo de armazenamento .

Segundo WILSON *et al* (1979) durante o período de armazenamento, a atividade metabólica continua em níveis menores e os substratos endógenos necessários para a germinação e desenvolvimento estarão gradualmente consumidos.

O período de armazenamento de esporos de samambaias afeta a sua germinação. RANDI & FELIPPE (1988) verificaram que os esporos de *Cyathea delgadii*, recém coletados, germinaram a 15, 20, 25 e 30°C; aqueles armazenados por 7 meses não germinaram a 15°C e os estocados durante 14 meses, não germinaram sob as temperaturas alternadas de 25-35, 25-40 e 25-45°C.

BERI & BIR (1993) observaram que esporos de *Pteris vittata* L. sofreram redução de 30% da germinação, decréscimo nos teores de açúcares solúveis totais, proteínas e aminoácidos livres após 20 dias de armazenamento, afetando o desenvolvimento protonemal.

CAMLOH (1999) observou que esporos de *Platyterium bifurcatum* L., quando esterilizados e armazenados por longos períodos, sofreram decréscimo de 40% na germinação e atraso na formação do rizóide. Entretanto, quando armazenados, sem esterilização, a germinação ocorreu normalmente.

GUIRAGOSSIAN & KISS (1998) observaram que esporos de três populações de *Schizaea pusilla* L. sofreram aceleração na germinação quando armazenados a 4°C em relação aos esporos armazenados a 22°C. Associaram tempo de armazenamento, com luz e obtiveram maior germinação a 4°C, sob luz vermelha, seguida do vermelho extremo. A luz azul promoveu drástica inibição da germinação desses esporos.

Esporos de *Rumohra adiantiformis*, criopreservados, germinaram com sucesso sem crioproteção, provavelmente devido ao baixo teor de água (cerca de 7%), comportando-se como sementes ortodoxas.

Segundo MARZALINA & KRISHNAPILLAY (1999), sementes ortodoxas ou semi-recalcitrantes de espécies tropicais podem ser criopreservadas diretamente sem maiores problemas, desde que tenham conteúdo de água abaixo de 20%.

NUNES (2000) criopreservou sementes de *Cedrella fissilis* Vell., sem crioproteção, em nitrogênio líquido, e obteve 91% de sementes viáveis, após 10 dias de cultivo e nenhuma alteração no crescimento das plântulas.

Para manter a viabilidade celular, usa-se aplicar substâncias crioprotetoras como o DMSO, glicerol ou sacarose que aumentam a sobrevivência celular após longos períodos de armazenamento (LYNCH & BENSON, 1991). Houve severa inibição de germinação após a esterilização de esporos de *R. adiantiformis*. O mesmo ocorreu para esporos crioprotetidos, confirmando o que foi observado, nos esporos de *D. sellowiana*, pré-tratados com crioprotetor (ROGGE, *et al* 2000). Obteve-se o melhor percentual germinativo no tratamento que dispensou a esterilização e a crioproteção, tanto para degelo lento quanto para degelo rápido e aceleração da germinação quando comparada ao controle. AGRAWAL *et al* (1993) observaram esse comportamento para os esporos de *Cyathea spinulosa* que foram descongelados lentamente. Essa aceleração pode ser decorrente do estresse osmótico provocado pela criopreservação acelerando a absorção de água e conseqüentemente, a germinação. Houve drástica inibição da germinação nos esporos esterilizados. Provavelmente a esterilização tenha danificado a exina do esporo, possibilitando a injúria causada pela exposição a temperatura ultra-baixa, ou fragilizando a estrutura de modo a comprometê-la durante a entrada da água no momento de degelo. A crioproteção também reduziu severamente a germinação de esporos de *R. adiantiformis* criopreservados. O modo de ação dos crioprotetores ainda não é completamente conhecido. Supõe-se que poderiam reduzir a quantidade de sais da célula, restringir a formação de cristais de gelo ou retirar a água dessas células, deixando-as parcialmente plasmolisadas (GEORGE, 1993). O baixo percentual de germinação dos esporos crioprotetidos pode ter ocorrido em função da retirada excessiva de água, já que os esporos de *Rumohra adiantiformis* apresentam cerca de 7% de água. Conclui-se que os esporos de *Rumohra adiantiformis* não necessitam de esterilização nem de crioproteção para serem criopreservados com sucesso.

BHOJWANI & RAZDAN (1983) citam que as células ficam inativas quando estocadas a  $-196^{\circ}\text{C}$  e, que se os procedimentos de congelamento e armazenamento forem acompanhados criteriosamente, esses materiais podem ficar estocados em nitrogênio líquido por tempo indeterminado. GEORGE (1993) admite que muitos artigos descrevem a regeneração de plantas em curtos períodos de armazenamento em temperaturas ultra-baixas, mas que poucos descrevem com sucesso o armazenamento por longos períodos.

Em duas variedades de rosa inglesa foi observada a redução da viabilidade do pólen estocado a  $+4^{\circ}\text{C}$  e a  $-20^{\circ}\text{C}$  em contraste com o pólen estocado a  $-196^{\circ}\text{C}$  que não afetou a capacidade de fertilização (MARCHANT *et al*, 1993).

Comparando-se os dados da criopreservação de esporos de *R. adiantiformis* por médio período com o controle, observa-se que não houve diminuição da germinação, mas ocorreu um retardo de 4 dias na estabilização da germinação do controle.

No trabalho de ROGGE *et al* (2000) foram encontrados resultados semelhantes para criopreservação de esporos de *Dicksonia sellowiana*. Houve aceleração da germinação dos esporos criopreservados durante 15, 30 e 90 dias em relação ao controle e promoção da germinação de esporos aparentemente dormentes. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os métodos de degelo lento e rápido.

A criopreservação bem sucedida deve preservar germoplasmas por longos períodos de tempo mantendo sua viabilidade sendo capaz de regenerar plantas após seu degelo (GEORGE, 1993).

GANESHAN *et al* (1991) observaram que a criogenia de pólen de diferentes cultivares de limão foi um método eficiente de armazenamento após 3 anos, aumentando a velocidade da germinação. Este fato pode ser relacionado com a liberação de enzimas endógenas ligadas ao amadurecimento do pólen.

PENCE (2000) criopreservou tecidos pré-tratados com sacarose e encapsulados de gametófitos de *Davallia fejeensis* Hook., *Drynaria quercifolia* (L.) J. Sm., *Cibotium glaucum* (Sm.) Hook & Arn., *Adiantum trapeziforme* L., *Adiantum tenerum* Swartz e *Polypodium aureum* L. e obteve 86 a 100% de sobrevivência independente da pré-cultura em ABA, igualando-se ao controle. Esses tecidos foram regenerados após 3 anos de armazenamento em nitrogênio líquido e comprovaram a eficiência do protocolo para a preservação de culturas “*in vitro*” de germoplasmas raros ou ameaçados de samambaias.

Os gametófitos provenientes de esporos não criopreservados e de esporos criopreservados de *R. adiantiformis*, apresentaram-se cordiformes aos 60 dias de cultivo e originaram esporófitos após 4 a 5 meses aproximando-se dos resultados obtidos por JARAMILLO *et al* (1996), que observaram gametófitos de *Niphydium crassifolium* L., cordiformes, maduros com 70 dias e esporófitos após 3 meses de cultivo, com a primeira folha espatulada. No entanto, RAMÍREZ *et al* (1998), obtiveram gametófitos de *Microgramma nitida* (J.Sm.) A. R. Sm., maduros, após 80 dias e os esporófitos surgiram após 8 meses de cultivo, com a primeira folha espatulada. PÉREZ-GARCIA *et al* (1998), observaram que os gametófitos de *Phlebodium araneosum* (M. Martens e Galeotti) Mickel e Beitel, *P. pseudoaureum* (Cav.) Lellinger e *P. decumanum* (Wild.) J. Sm. atingiram a maturidade após 60 a 120 dias e os esporófitos surgiram entre 150 a 400 dias de cultivo, com a primeira folha espatulada. Estes resultados diferem do que foi encontrado para outras pteridófitas que atingiram maturidade dos gametófitos e produziram esporófitos após maior período de cultivo como em *Metaxya rostrata* (H. B. K.) Presl. que após 112 dias de cultivo, os gametófitos espatulados ou cordiformes, atingiram a fase adulta, não havendo formação de esporófitos após 8 meses (PÉREZ-GARCIA *et al* 1994). Também a *Lophosoria quadripinnata* (J. F. Gmel.) C. Chr. apresentou gametófitos maduros após 270 a 285 dias, espatulados a cordiformes e os esporófitos não apareceram após 3 anos de cultivo (PÉREZ-GARCIA *et al*, 1995). Os gametófitos de *Thyrsopteris elegans* Kze. atingiram a maturidade após 100 a 120 dias e os esporófitos apareceram aos 200 dias de cultivo com a primeira folha trilobulada (PÉREZ-GARCIA *et al* 1997). Outras espécies de pteridófitas apresentam seu ciclo desenvolvimental em menor período de cultivo, como o obtido por PÉREZ-GARCIA *et al* (1999) que analisaram gametófitos de *Lygodium heterodoxum* Kunze e L. e *L. venustum* Sw. Observaram que atingiam a maturidade a partir de 36 a 80 dias. Os esporófitos aparecem após 84 dias com a primeira folha obtriangular alargada.

MENDONZA *et al* (1999) obtiveram gametófitos de *Didymochlaena truncatula* (Sw.) J. Sm. após 45 a 50 dias e os esporófitos surgiram após 100 dias de cultivo, com a primeira folha espatulada.

Esporófitos provenientes de esporos não criopreservados de *Rumohra adiantiformis* apresentaram 96% de água e maior massa fresca e seca que os esporófitos oriundos de esporos criopreservados embora o número e altura de frondes não tenham diferido estatisticamente.

Os menores valores da taxa de crescimento relativo dos esporófitos avaliados entre 25 e 33 semanas de cultivo foram evidenciados para os esporófitos oriundos de esporos não

esterilizados, com e sem crioproteção e degelados lentamente sugerindo que a não esterilização associada ao degelo lento foi um fator de seleção menos rigoroso de esporos para esses tratamentos. A maior taxa de crescimento relativo, entre todos os tratamentos, foi observada, nos esporófitos provenientes de esporos esterilizados, sem crioproteção e degelados lentamente. A esterilização associada ao degelo lento foi o fator de seleção mais rigoroso observado entre os tratamentos.

O teor de clorofila total e clorofila "b" seguiu o mesmo perfil para todos os tratamentos. Os menores teores foram observados nos esporófitos provenientes de esporos não esterilizados, sem crioproteção e degelados rapidamente. Os demais tratamentos igualaram-se aos esporos não criopreservados. Não houve diferença estatística para o teor de clorofila "a" entre os tratamentos. Teores semelhantes de clorofila foram encontrados por JAYAKUMAR *et al* (1999) e YEH & WANG (2000) em esporófitos de *Azolla microphylla* Kaulf., pteridófito aquática, e *Adiantum raddianum* cv. Fritz Luth, pteridófito terrestre, ambas cultivadas em casa de vegetação. Observou-se aumento da taxa de clorofila após 42 semanas de cultivo com relação aos resultados obtidos após 10 semanas de cultivo sendo que as plantas oriundas de esporos não esterilizados, criopreservados sem crioproteção e degelados rapidamente continuavam apresentando os menores valores.

Culturas de células em suspensão de *Arabidopsis thaliana* (L.) regeneram plantas férteis de células descongeladas após armazenamento criogênico, mostrando a manutenção do seu potencial morfogênico (RIBEIRO *et al*, 1996).

De acordo com STANWOOD & SOWA (1993), a criopreservação de sementes de *Allium cepa* L. resulta em sementes mais vigorosas quando comparadas as estocadas a - 18°C. Contudo, experimentos mais longos são necessários para determinar se a criopreservação resulta em maior preservação das sementes.

O armazenamento criogênico de pólen de *Lycopersicon sculentum* Miller não afetou sua capacidade polinizadora que produziu um número de sementes por fruto estatisticamente superior ao pólen não criopreservado constituindo-se numa técnica eficiente para estoque de germoplasma (SACKS & CLAIR, 1996).

GONZÁLES-BENITO *et al* (1998) observaram que os eixos embrionários de *Gossypium hirsutum* L. resistiram a criopreservação quando o seu teor de umidade foi igual ou menor que 19,4%, apresentando germinação superior àquelas sementes apenas estocadas sob dissecação.

A criopreservação mostrou-se um método capaz de armazenar esporos de *Rumohra adiantiformis* possibilitando a regeneração de plantas viáveis. Embora alguns métodos inibiram drasticamente a germinação, os esporos que foram selecionados sob essas condições de extremo estresse, germinaram e produziram plantas normais com relação ao número, tamanho de frondes e teores de clorofila.

## 7- CONCLUSÕES

1- As maiores percentagens de germinação dos esporos de *Rumohra adiantiformis*, no menor intervalo de tempo, para os tratamentos de diferentes níveis de luz, foram atingidas durante o inverno, sob redução de 91% de luz.

2- Redução de 28% da luz total inibiu a germinação durante o verão, outono e inverno.

3- Os esporos de *R. adiantiformis*, após 13 meses de cultivo, sofreram retardo na germinação, embora não tenha sido detectada perda de viabilidade dos mesmos.

4- Os esporos de *R. adiantiformis* criopreservados apresentaram maiores percentuais de germinação quando não esterilizados e não crioprotetidos, degelados lenta e rapidamente.

5- Houve severa inibição da germinação após criopreservação de esporos esterilizados e/ou crioprotetidos.

6- Após 33 semanas de cultivo, a maior taxa média de crescimento relativo foi apresentada pelos esporófitos provenientes de esporos esterilizados, criopreservados, não crioprotetidos e degelados lentamente.

7- Os esporos de *R. adiantiformis*, não esterilizados, não crioprotetidos, suportaram a criopreservação durante o período de 90 dias, apresentando aceleração da germinação com relação ao controle.

8- Não houve diferença estatística entre o peso de massa fresca e seca entre os gametófitos oriundos de esporos criopreservados.

9- Os teores de clorofila total, clorofila "a" e "b" foram maiores em todos os tratamentos de criopreservação, sendo que os gametófitos provenientes de esporos não esterilizados, não crioprotetidos, apresentaram o maior teor de clorofilas.

10- Não houve diferença estatisticamente significativa entre os teores de açúcares solúveis totais dos gametófitos provenientes de esporos criopreservados e do controle.

11- Não houve diferença estatisticamente significativa entre o número e altura das frondes dos esporófitos de *R. adiantiformis*, oriundos de esporos criopreservados.

12- Todos os esporófitos provenientes de esporos criopreservados atingiram peso de matéria fresca e seca inferior ao controle após 42 semanas de cultivo.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, D. C., PAWAR, S. S. & MASCARENHAS, A F. 1993. Cryopreservation of spores of *Cyathea spinulosa* Wall. Ex. Hook.F. an endangered tree fern. **J. Plant. Physiol.** 142:124-26.
- ARNON, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyfenoxidase in *Beta vulgaris*. **Plant. Physiol.** 24:1-15.
- BENABE, N.; WILLIAMS-LINERA, G. & PALACIOS-RIOS, M. 1999. Tree ferns in the interior and at the edge of a Mexican cloud forest remant: Spore germination and sporophyte survival and establishment. **Biotropica.** 31(1):88.
- BENSON, E.E., LYNCH, P. T. & STACEY, G. N.1998. Advances in plant cryopreservation technology: current applications in crop plant biotechnology. **AgBiotech News and Information.**10(5):133-41.
- BERI, A, & BIR, S. S. 1993. Germination of stored spores of *Pteris vittata* L. **Amer. Fern J.** 83:73-8.
- BEWLEY, J. D. & BLACK, M. 1994. Seeds. Physiology of development and germination. 2 ed. PLENUM, New York. 445p.
- BHODJWANI, S. S. & RAZDAN, M. K. 1983. Development in crop science (5)- plant tissue culture: theory and practice. 4<sup>th</sup> ELSEVIER. Amsterdam. **The Netherlands.** p.373-85.
- CHEN, C. & IKUMA, H. 1979. Photocontrol of the germination of *Onoclea* spores. **Plant Physiol.** 63:704-8.
- DYER, A F. 1979. The culture of fern gametophytes for experimental investigation. p. 253-305. *In:* A f. Dyer (Ed.). **The experimental biology of ferns.** London. Academic.

- ENDLER, J. A . 1993. The color of light in forests and its applications. **Ecological Monographs**. 63(1):1-27.
- ENGELMANN, F. 1991. In vitro conservation of tropical plant germplasm – a review. **Euphytica**. 57:227-43.
- ESTEVES, L. M. & FELIPPE, G. M. 1985. Fotossensibilidade de esporos de pteridófitas dos cerrados. **Revta Brasil Bot.** 8:219-22.
- FELIPPE, G. M., ESTEVES, L. M. & RANDI, A M. 1989. Lipids, proteins and sugars in spores of *Cyathea delgadii* STERNB., *Polypodium latipes* LANGS & FISCH. and *Trichipteris corcovadensis* (RADDI) COPEL. **ÍNSULA**, Florianópolis, 19:3-12.
- FILIPPINI, E. C. P., DUZ, S.R. & RANDI, A M. 1999. Light and storage on the germination of spores of *Dicksonia selowiana* (Presl.) Hook., Dicksoniaceae. **Revta Brasil Bot** 22:21-26.
- FURUYA, M. 1983. Photomorphogenesis in ferns, p. 569-600. In: W. Shropshire Jr. & H. Mohr (Eds.). Photomorphogenesis. **Encyclopedia of plant physiology**. Springer, Berlin.
- GANESHAN, S. & ALEXANDER, M.P. 1995. Cryogenic preservation of lemon ( *Citrus limon* Burm.) pollen. **Gartenbauwissenschaft**. 56(5):228-30.
- GEORGE, E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture – the technology (part.1) 2<sup>nd</sup> **Exegetics Limitade**, England. p. 173-80.
- GONZALES-BENITO, M. E.; IRIONDO, J. M.; PITA, J. M. & PÉREZ-GARCIA. F. 1995. Effects of seed cryopreservation and priming on germination in several cultivars of *Apium graveolens*. **Annals of Bot.** 75:1-4.
- GONZALES-BENITO, M. E.; CARVALHO, J. M. F. C. & PÉREZ, C. 1998. Effect of desiccation and cryopreservation on the germination of embryonic axes and seeds of cotton. **Pesq. Agropec. Bras.** 33(1):17-20.

- GUIRAGOSSIAN, H. A. & KONING, R. E. 1986. Introduction of spore germination in *Schizaea pusilla* (Schizaeaceae). **Amer. J. Bot.** 73:1588-94.
- GUIRAGOSSIAN, H. A. & KISS, J. Z. 1998. Spore germination in populations of *Schizaea pusilla* from New Jersey and Nova Scotia. **Int. J. Plant Sci.** 159(5):848-52.
- HAUPT, W. 1990. Phytochrome-mediated fern-spore germination: Inhibition by elevated temperatures. **Photochem. photobiol.** 52(1): 57-9.
- HAUPT, W. 1992. Phytochrome-mediated fern-spore germination: A temperature-sensitive phase in the transduction chain after action of P<sub>fr</sub>. **J. Plant Physiol.** 140: 575-81.
- JARAMILLO, I. R., PÉREZ-GARCIA, B. & MENDONZA, A 1996. Desarrollo del gametofito y del esporofito joven de *Niphidium crassifolium* (Filicales: Polypodiaceae S STR.) **Revta. Biol. Trop.** 44(2): 485-90.
- JAYAKUMAR, M.; EYINI, M.; SELVINTHANGADURAI, P. LINGAKUMAR, K. PREMKUMAR, A. & KULANDAIVELU, G. 1999. Changes in pigment composition and photosynthetic activity of aquatic fern (*Azolla microphylla* Kaulf.) exposed to low doses of UV-C (254 nm) radiation. **Photosynthetica** 37(1): 33-8.
- KATO, M. 1974. A note on the systematic position of *Rumohra adiantiformis*. **Acta Phytotax. Geobot.** 26: 52-57.
- LORENZI, H.; SOUZA, H.M. 1995. **Plantas Ornamentais no Brasil** (arbustivas, herbáceas e trepadeiras). PLANTARUM, São Paulo.
- LYNCH, P. T. & BENSON, E. E. 1991. Cryopreservation, a method for maintaining the plant regeneration capability of rice cell suspension cultures. In: Rice Genetics. Vol.II, Proceedings of the Second International Rice Genetics. IRRI, Los Banos, Philippines, p. 321-32.

- MARCHANT, R., POWER, B., DAVEY, M. R., CHARTIER-HOLLIS, J. M., LYNCH, T. 1993. Cryopreservation of pollen from two rose cultivars. **Euphytica**. 66: 235-41.
- MARZALINA, M. & KRISHNAPILLAY, B. 1999. Recalcitrant seed biotechnology application to rain forest conservation. In: BENSON, E. E. (Ed.) **Plant Conservation Biotechnology**. London, Taylor and Francis Ltd. p.265-76.
- McCREADY, R. M. , GUGGOLZ, J., SILVIERA, V. & OWENS, H. S. 1950. Determination of starch and amylose in vegetables. **Anal. Chem.** 22: 1156-58.
- MENDONZA, A, PÉREZ-GARCIA, B., JARAMILLO, I. R. & RICCI, M. 1996-1997. Desarrollo del gametofito de *Pteris berteroa* (Pteridaceae: Pterideae). **Revta. Biol. Trop.** 44(3)/45(1): 51-7.
- MENDONZA, A., PÉREZ-GARCIA, B. & RIBA, R. 1999. Morfología y anatomía del gametofito de *Didymachlaena truncatula* (Dryopteridaceae). **Revta. Biol. Trop.** 4(1-2): 93-99.
- MENDONZA, A. 1999. Desarrollo protálico de *Lygodium heterodoxum* y *Lygodium venustum* (Schizaeaceae). **Revta. Biol. Trop.** 47(1-2): 83-92.
- MILLER, J. H. 1968. Fern gametophytes as experimental material. **Botanical Review** 34: 361-440.
- MILTON, S. J. & MOLL, E.J. 1988. Effects of harvesting on frond production of *Rumohra adiantiformis* (Pteridophyta: Aspidiaceae) in South Africa. **Journal of Applied Ecology** 25: 725-43.
- MOHR, H. 1956. Die Abhängigkeit des Protonemawachstums und der Protonemapolarität bei farmen vom licht. **Planta** 47: 127-156.

- NETO, J. A A M. & MARTINS, F. A . 2000. Estrutura da Mata da Silvicultura, Uma Floresta Estacional Semidescidual Montana no Município de Viçosa – MG. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, 24 (2): 1151-60.
- NUNES, E. C. 2000. Sistemas de cultura e conservação “in vitro” para *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). **Dissertação de mestrado**. Fpolis.
- PANGUÁ, E., LINDSAY, S. & DYER, A. 1994. Spore germination and gametophyte development in three species of *Asplenium*. **Annals of Botany** 73: 587-93.
- PENCE, V. C. 2000. Cryopreservation of *in vitro* grown fern gametophytes. **Amer. Fern J.** 90(1): 16-21.
- PÉREZ-GARCIA, B. & RIBA, R. 1982. Germinacion de esporos de Cyathaceae bajo diversas temperaturas. **Biotrópica** 14(4): 281-7.
- PÉREZ-GARCIA, B. MENDONZA, A . & RIBA, R. 1994. Desarrollo gametofítico de *Metaxya rostrata* (Filicales: Metaxyaceae). **Rev. Biol. Trop.** 42(3): 455-60.
- PÉREZ-GARCIA, B., OROZCO-SEGOVIA, A. & RIBA, R. 1994. The effects of white fluorescent light, far-red light, darkness and moisture on spore germination of *Lygodium heterodoxum* (Schizaeaceae). **Amer. J. Bot.** 81(11): 1367-9.
- PÉREZ-GARCIA, B., FRAYLE, M. E. & MENDONZA, A. 1995. Desarrollo del gametofito de *Lophosoria quadripinnata* (Filicales: Lophosoriaceae). **Rev. Biol. Trop.** 43(1 - 3): 55-60.
- PÉREZ-GARCIA, B., RIBA, R. & RICCI, M. 1996-1997. Morfogénesis del gametofito de *Thelypteris rhachiflexuosa* Riba (Thelypteridaceae). **Acta bot. Mex.** 28: 63-9.

- PÉREZ-GARCIA, B., RIBA, R. & MENDONZA, A. 1998. Compared gametophytic development of three species of *Phlebodium* (Polypodiaceae, s. str.). **Rev. Biol. Trop.** 46(4): 1059-1067.
- PITA, J. M. PÉREZ-GARCIA, F., ESCUDERO, A. & CUADRA, C. 1998. Viability of *Avena sativa* L. seeds after 10 years of storage in base collection. **Field Crops Research** 55: 183-87.
- RAGHAVAN, V. 1989. Developmental biology of fern gametophytes – Cambridge Univ. Press, Cambridge. 361pp.
- RAGHAVAN, V. 1993. Cellular and molecular biology of fern haplophase development. **J. Plant. Res.** (Special Issue) 3: 59-73.
- RAMÍREZ, M. R. & PÉREZ-GARCÍA, B. 1998. Fase gametofítica del helecho *Microgramma nitida* (Polypodiaceae). **Rev. Biol. Trop.** 46(3): 587-93.
- RANAL, M. A. 1999. Effects of temperature on spore germination in some fern species from semideciduous mesophytic forest. **Amer. Fern J.** 89(2): 149-58.
- RANDI, A M. & Felipe, G. M. 1988. Germinação de esporos de *Cyathea delgadii* Sternb. sob luz azul e aplicações longas de vermelho. **Revta brasil Biol.** 48: 979-984.
- RANDI, A M. 1996. Photosensitivity viability and storagereserves in spores of *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch. (Pteridaceae). **Revta. brasil. Bot.** 19(1): 105-8.
- REYNOLDS, T. L. 1982. Effects of cyanide, salicylhidroxamic acid, and temperature on respiration and germination of spores of the fern *Sphaeropteris cooperi*. **Plant Physiol.** 54: 52-7.

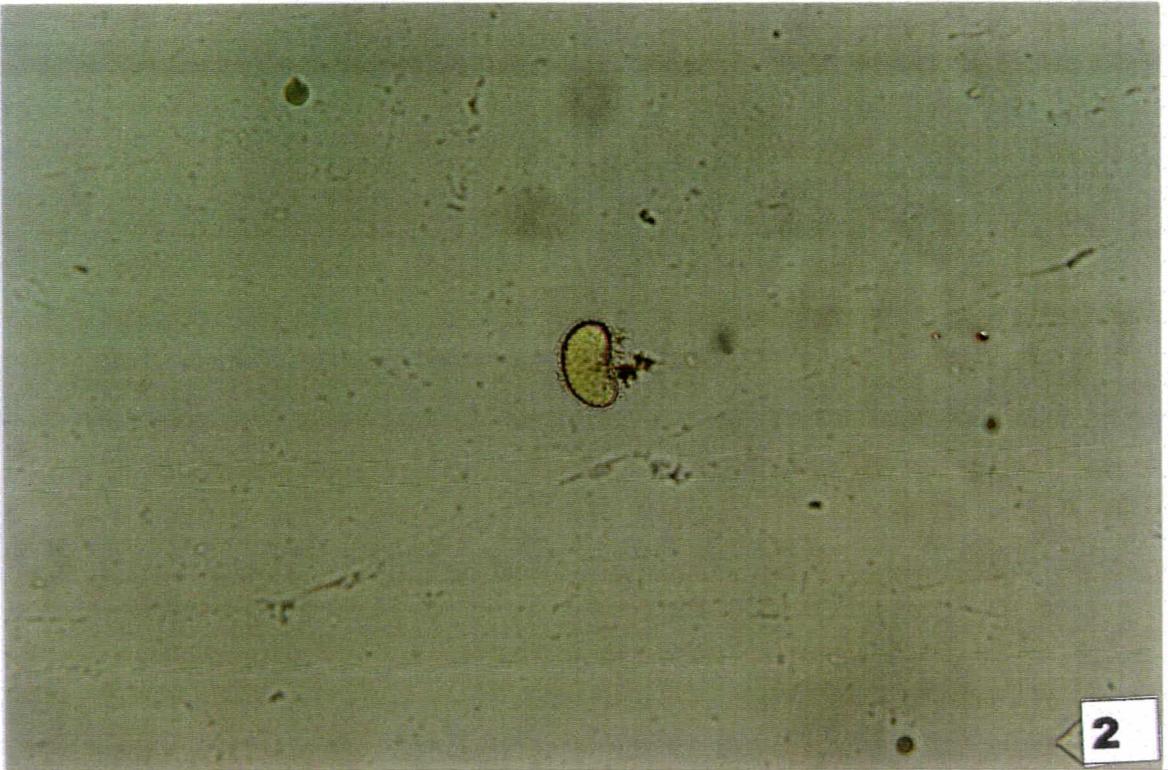
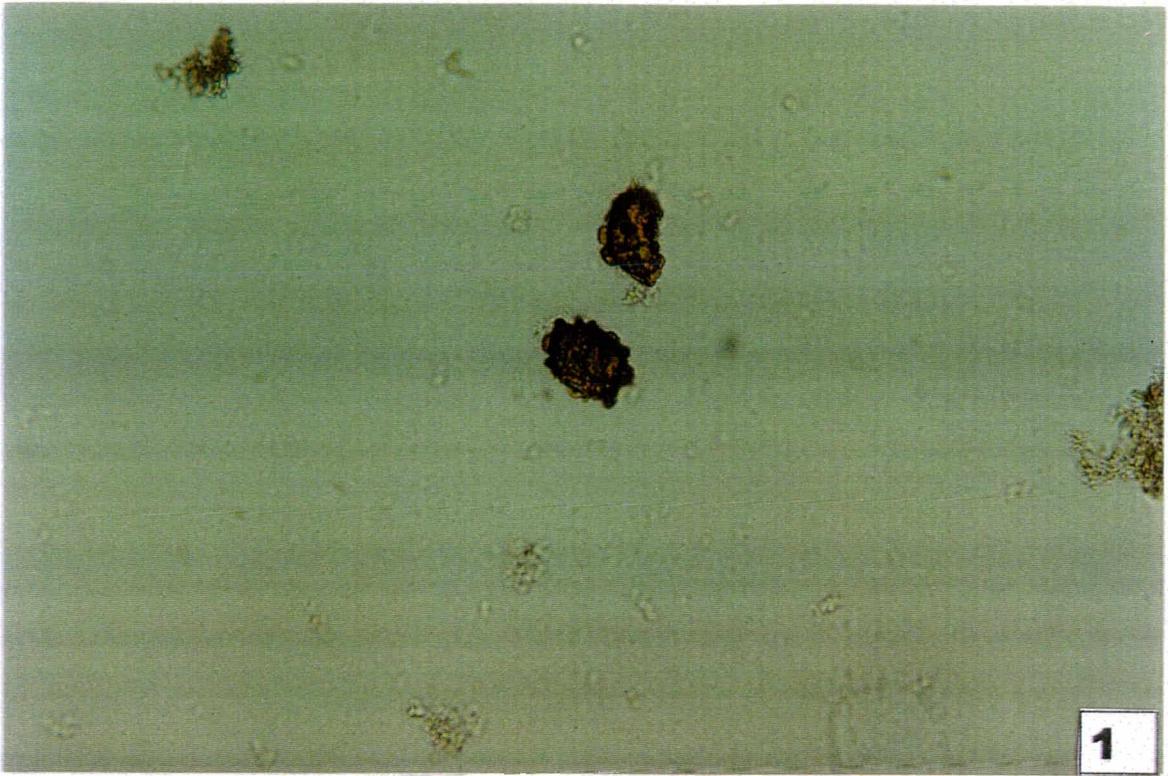
- RIBEIRO, R. C. S.; JEKKELE, Z.; MULLIGAN, B. J.; COCKING, E. C.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. & LYNCH, P. T. 1996. Regeneration of fertile plants from cryopreserved cell suspensions of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Science*. p.115-12.
- ROGGE, G. D. 1999. Germinação, propagação “in vitro” e criopreservação de esporos de *Dicksonia sellowiana* (Presl) Hook. **Dissertação de mestrado**. Fpolis.
- ROGGE, G. D., VIANA, A. M. & RANDI, A. M. 2000. Cryopreservation of spores of *Dicksonia sellowiana*: An endangered tree fern indigenous to South and Central America. **Cryoletters** 21: 223-30.
- SACKS, E. J. & CLAIR, A. St. 1996. Cryogenic storage of tomato pollen: Effect on fecundity. **HortScience** 31(3): 447-8.
- SHANNON, J. C. 1968. A procedure for the extraction and fractionation of carbohydrates from immature *Zea mays* Kernels. **Res. Bul.** (Purdue). 842: 1-8.
- SIMABUKURO, E. A.; DYER A. F. & FELIPE, G. M. 1998. The effect of sterilization and storage conditions on the viability of the spores of *Cyathea delgadii*. **Amer. Fern J.** 88(2): 72-80
- SMITH, D. L. & ROBINSONS, P. M. 1975. The effects of spore age on germination and gametophyte development of *Polypodium vulgare* L. grown under red and blue light. **New Phytol.** 72: 101-8.
- SNEDECOR, G. N. 1962. **Statistical methods**. Iowa State University Press, Iowa.
- STAMPS, R.H.; NELL, T.A. & BARRET, J.E.1994. Production temperatures influence growth and physiology of leatherleaf fern. **HortScience** 29(2): 67-70.
- STANWOOD, P. C. & SOWA, S. 1995. Evaluation of onion (*Allium cepa* L.) seed after 10 years of storage at 5, -18 and -196°C. **Crop Science** 35(3): 852-6.

- SUGAI, M. & FURUYA, M. 1985. Action spectrum in ultraviolet and blue light region for the inhibition of red-light induced spore germination in *Adiantum capillus-veneris* L. **Plant & Cell Physiol.** 25: 26:953-56.
- SUGAI, M., TOMIZAWA, K., WATANAVA, M. & FURUYA, M. 1984. Action between 250 and 800 nanometers for the photoinduced inhibition of spore germination in *Pteris vittata*. **Plant & Cell. Physiol.** 25: 205-12.
- TOMIZAWA, K., SUGAI, M. & MANABE, K. 1983. Relationship between germination and Pfr level in spores of fern *Lygodium japonicum*. **Plant. & Cell. Physiol.** 24: 1043-48.
- TOWILL, L. R. 1978. Temperature and photocontrol of *Onoclea* spore germination. **Plant Physiol.** 62: 116-19.
- TOWILL, L. R., & IKUMA, H. 1975. Photocontrol of germination of *Onoclea* spores. II Analysis of germination processes by mean of anaerobiosis. **Plant. Physiol.** 55: 105-54.
- TRYON, R. & TRYON, A F. 1982. Dicksoniaceae. p. 138-154. In: R. Tryon & A F. Tryon (Eds) Fern and allied plants with special reference to Torpical America. Springer, New York.
- TRYON, R.M.; STOLZE, R.G. 1991. Pteridophyta of Peru. **Botany**, 27.
- WILSON, A, T. VICKERS, M. & MANN, L. R. B. 1979. Metabolism in dry pollen – a novel technique for studying anhidrobiosis. **Naturwissenschaften** 66: 53-4.
- YEH, D. M. & WANG, H. M. 2000. Effects of irradiance on growth, net phothosynthesis and indoor performance of the shade-adapted plant, maidenhair fern. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology** 75(3): 293-8.

## 9 – ANEXOS

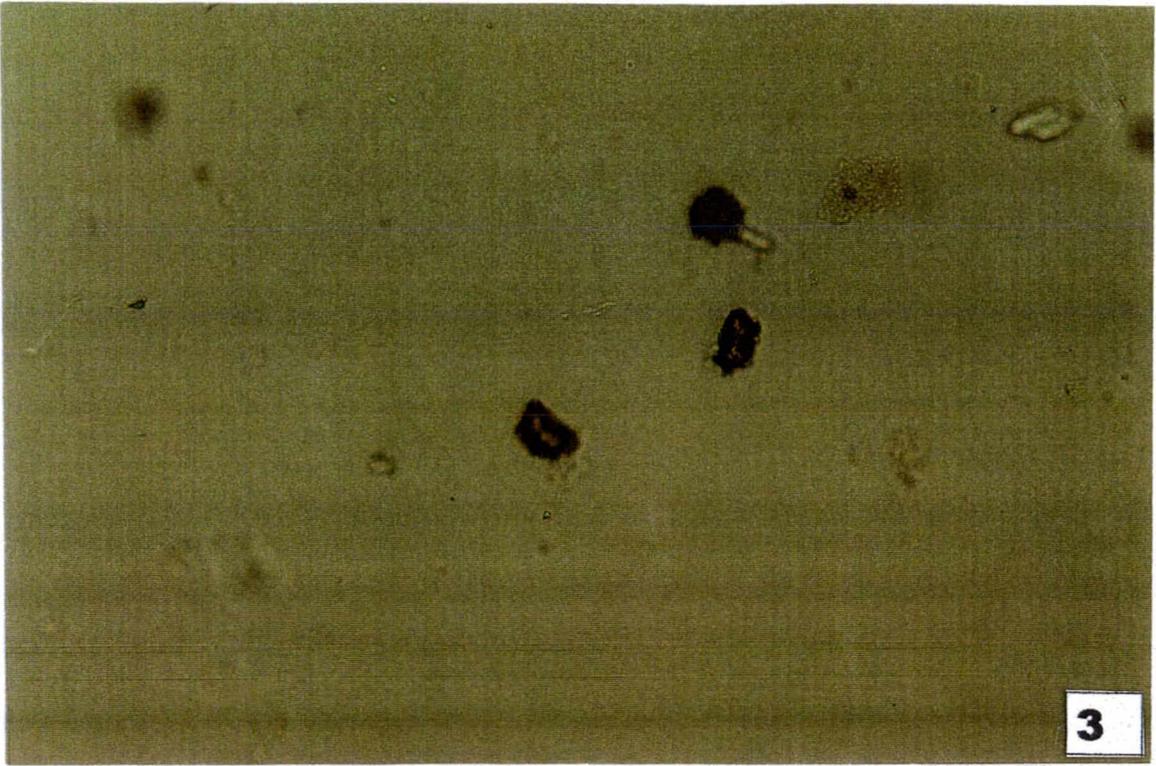
### PRANCHA 1-

Esporos não esterilizados (1), esterilizados mostrando alteração da exina (2), cultivados em meio Dyer líquido, sob luz branca, fotoperíodo de 16 horas, temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , densidade de fluxo de fótons de  $31,68\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Fotografias obtidas com microscópio de fluorescência (Bx40 – Olympus- PM20 – Exposure Control Unit) com aumento de 10 – 40x.



## PRANCHA 2 –

Esporos não esterilizados, após 4 dias de cultivo (3) e esporo germinado, apresentando rizóides e célula protálica conservando a exina do esporo (4), cultivados em meio Dyer líquido, sob luz branca, fotoperíodo de 16 horas, temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , densidade de fluxo de fótons de  $31,68\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Fotografias obtidas com microscópio de fluorescência (Bx40 – Olympus-PM20 – Exposure Control Unit) com aumento de 10 – 40x.



PRANCHA 3 –

Esporófitos de *Rumohra adiantiformis* após 20 semanas de cultivo, em meio aos gametófitos, apresentando a primeira fronde bilobulada (5) e esporófito após 45 semanas de cultivo (6), cultivados em solo Plantimax®, sob luz branca, fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 °C  $\pm$  2, densidade de fluxo de fótons de 31,68  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Fotografias obtidas com máquina fotográfica Sony Digital MCV – FD 73, 640 x 480.

