

Herlon Iran Rosa

EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPOROS DE
Dicksonia sellowiana Hook. (Dicksoniaceae) EM
NITROGÊNIO LÍQUIDO, NA GERMINAÇÃO,
DESENVOLVIMENTO GAMETOFÍTICO E
ESTABELECIMENTO DE ESPORÓFITOS: ANÁLISES
MORFOFISIOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS

Dissertação submetida ao
Programa de Pós
Graduação em Biologia de
Fungos, Algas e Plantas da
Universidade Federal de
Santa Catarina para a
obtenção do Grau de Mestre
em Biologia de Fungos,
Algas e Plantas.

Orientador: Prof. Dra. Áurea
Maria Randi

Coorientador: Prof. Dra.
Carmen Simioni

**“Efeitos da criopreservação de esporos de
Dicksonia sellowiana Hook. (Dicksoniaceae) em
nitrogênio líquido, na germinação,
desenvolvimento gametofítico e estabelecimento
de esporófitos: análises morfofisiológicas e
ultraestruturais”**

por

Hérton Iran Rosa

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 12/PPGFAP/2017) do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:



Profª. Dra. Aurea Maria Randi

Prof. Dr. Elisandro Ricardo Drechsler Santos

Coordenador

Pos-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas - UFSC

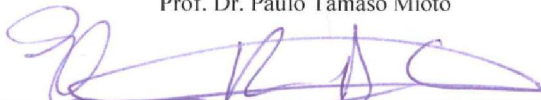
Prof. Dr. Jairo Lizandro Schmitt – Videoconferência



Profª. Dra. Zenilda Laurita Bouzon



Prof. Dr. Paulo Tamaso Miot



Prof. Dr. Elisandro Ricardo Drechsler dos Santos
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia de Fungos, Algas e Plantas

Florianópolis, 20 de abril de 2017.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rosa, Herlon Iran
Efeitos da criopreservação de esporos de
Dicksonia sellowiana Hook. (Dicksoniaceae) em
nitrogênio líquido, na germinação, desenvolvimento
gametofítico e estabelecimento de esporófitos :
análises morfofisiológicas e ultraestruturais /
Herlon Iran Rosa ; orientadora, Áurea Maria Randi,
coorientadora, Carmen Simioni, 2017.
94 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos,
Algas e Plantas, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2.
Fisiologia Vegetal. 3. Criopreservação. 4.
Fotossíntese. 5. Ultraestrutura. I. Randi, Áurea
Maria. II. Simioni, Carmen. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Biologia de Fungos, Algas e Plantas. IV. Título.

Dedico este trabalho à meus avós
paternos (*in memorian*) Ramílio e
Doralice, e à meus avós maternos
(*in memorian*) Laurentino e
Benvinda.

How I wish you were here.

“Todo aquele que se dedica ao estudo da ciência chega a convencer-se de que nas leis do Universo se manifesta um Espírito sumamente superior ao do homem, e perante o qual nós, com os nossos poderes limitados, devemos humilhar-nos.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Deus, o Criador dos mistérios que tentamos desvelar com nossa ciência, Aquele que nos dá o mover, e principalmente, Aquele que nos amou primeiro, Aquele que acredita em todos nós, ainda que alguns de nós não acreditemos n'Ele. À Ele toda honra e toda glória sejam dadas a cada momento!

À minha família, meu refúgio! À minha esposa Elisabeth, minha alma e à minha princesa Maria Eduarda, meu sonho realizado, que fazem da sua revigorante presença o lugar onde encontro paz, sossego e carinho.

Aos meus pais Neri e Sueli, e às minhas irmãs Cinara e Cintia, que sempre foram o meu esteio e que sempre incitaram o espírito crítico em nossa família, através das nossas longas discussões pós-almoço de domingo.

À minha orientadora Áurea Maria Randi, meu eterno agradecimento por ter aberto as portas e me deixado fazer parte da sua história, me ensinado o amor e o zelo pelas samambaias e pela fisiologia. Suas palavras de alento e correção nortearam essa etapa do caminho, fazendo-me acreditar no sucesso a cada desafio.

À minha co-orientadora Carmen Simioni, tenho tanto a agradecer que seria necessário mais um capítulo! A pessoa que iluminou cada etapa do trabalho de laboratório mesmo antes de me aceitar como co-orientando, e ainda me fez encontrar o equilíbrio em meio ao caos das análises e discussões. A pessoa que substituiu a palavra “não” de seu vocabulário por “como podemos fazer?”, e que é a própria expressão da serenidade e cooperativismo! Obrigado! Obrigado! Muitíssimo Obrigado!

Ao PPGFAP, aos professores e técnicos da Botânica por propiciar nosso crescimento e a melhoria contínua dos processos educativos, obrigado por ampliar tanto nossos horizontes.

Ao Lafisio, por propiciar toda a estrutura utilizada neste trabalho, em especial à Professora Neusa Steiner, que faz da busca pela perfeição (e nunca menos que isso) em cada etapa do trabalho o único caminho

possível para se encontrar a verdade, e com seu exemplo nos impele à mesma busca!

Ao Labcev, pelo auxílio nas preparações de material para análises de microscopia e teor de clorofilas, mas especialmente, pelo carinho e atenção de cada um para com todos. É sempre bom ter alguém com quem contar, e essa parece ser a filosofia adotada por todos neste laboratório. Não posso deixar de agradecer em especial à Carmen, à Elisa e à Débora que dedicaram tanto do seu tempo para que este trabalho tivesse maior qualidade.

Ao Lafic pela disponibilidade de uso do tambor de Nitrogênio Líquido para iniciar este trabalho, e do PAM para as análises de parâmetros fotossintéticos, em especial ao professor José e sua inquietude, seus questionamentos, sua forma de ver a ciência e de dialogar com os resultados.

Ao LCME pela ajuda com as análises de MEV, ponto crítico de CO₂, cortes ultrafinos e análises de MET, e pela disponibilidade de utilização do Confocal. Em especial à Suzane que dedicou tanto de seu tempo com as inúmeras e quase infinitas sessões de MEV, e à Eliane pelas inúmeras contribuições.

Ao LAMEB pelas análises de teores de clorofilas e carotenóides.

Aos meus amigos da Botânica, em especial à turma do PPGFAP 2015 e ao “Grupo do Rolê”, que trouxeram muita alegria durante essa nossa jornada. Mas muita alegria mesmo... Já os conhecia desde sempre, pelo menos foi assim que senti a cada vez que estávamos juntos... Nossa união permanecerá em nossos corações e a alegria fluirá sempre que lembrarmos de como foi bom estarmos juntos! Foi maravilhoso estar com vocês durante cada aula, cada saída de campo, cada “happy hour”, cada comemoração, e cada churrasco... É tanto para agradecer que quase não dá para entender como fizemos tanto em tão pouco tempo... E foi muito pouco tempo... Amo cada um de vocês!!!

À Anielly Zini, que se dispôs a sair de Florianópolis às 6h da manhã pra me ajudar com as coletas, sem perder jamais o sorriso, e à Deise Munaro, minha colega de Lafisio, minha parceira nas dificuldades e nas dúvidas, desde as mais básicas... Chegamos, finalmente!!!

Aos meus compadres Estácio e Letícia, que foram os meus primeiros incentivadores, as primeiras pessoas de que me lembro que achavam realmente que eu pudesse conseguir. Este mestrado começou com vocês, e eu apenas acreditei, afinal, vocês sempre sabem do que estão falando...

Aos meus colegas do CGAE por insistir na formação como objetivo de cada servidor, e claro, por segurar as pontas enquanto realizo este objetivo.

Aos colegas do SINASEFE por lutar incessantemente para que nosso trabalho seja valorizado e para que nossos direitos sejam respeitados. Nenhum direito a menos! À luta camaradas!

Ao Instituto Federal Catarinense pelo afastamento remunerado para pós-graduação que me garantiu recursos financeiros durante o mestrado.

RESUMO GERAL

A Mata Atlântica é um bioma brasileiro ameaçado pela perda de biodiversidade em decorrência da intensa exploração florestal, desmatamento, agropecuária e fragmentação das florestas nativas. *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) é uma samambaia arbórea, distribuída pela América Latina em Floresta Ombrófila Densa, e que ocorre no Brasil, na Mata Atlântica. Apresenta potencial paisagístico e farmacêutico, e devido à sua intensa extração nas últimas décadas, encontra-se atualmente ameaçada de extinção. A criopreservação é uma opção de conservação “*ex situ*” para proteger e conservar o patrimônio genético de espécies nativas ameaçadas e espécies de interesse comercial, sendo fundamental a prospecção de informações que subsidiem os protocolos de conservação e propagação para reinserção destas espécies no ambiente natural. Este estudo fornece informações sobre a propagação de *D. sellowiana* a partir de esporos criopreservados, e verifica se a criopreservação ou a esterilização de esporos deste protocolo causou algum comprometimento à germinação ou ao estabelecimento de plântulas. Utilizamos quatro tratamentos, a partir de esporos controle (C), esporos esterilizados superficialmente (ES), esporos não esterilizados superficialmente e criopreservados (CR) e esporos esterilizados superficialmente e criopreservados (CRE) de *D. sellowiana*. A germinação foi comparada por média (%), índice de velocidade de germinação (IVG) e taxa de crescimento relativo (TCR), e as análises de microscopias de luz (ML), eletrônica de varredura (MEV), eletrônica de transmissão (MET) e confocal possibilitaram comparar os efeitos da criopreservação e esterilização superficial nos níveis ultraestrutural e celular. O estabelecimento de esporófitos foi observado através de média de formação (%), índice de velocidade de emergência (IVE) e TCR, sendo complementadas pelas análises de seus padrões fotossintéticos através de Curvas Rápidas de Luz (CRL's), Densidade Integrada de Fluorescência (IntDen), e quanto aos conteúdos de clorofilas. Após 22 dias de inoculação, esporos dos tratamentos submetidos à esterilização superficial apresentavam IVG menor que os tratamentos não esterilizados, e a média de germinação dos tratamentos submetidos à criopreservação não diferiram do controle, embora os esporos somente criopreservados tenham maior média de germinação e os esporos somente esterilizados tenham a menor média de germinação. As análises dos esporos com MEV demonstraram apenas pequenas alterações superficiais nos esporos de tratamentos esterilizados. Através

do Confocal e MET verificou-se que não houve alterações na ultraestrutura em nenhum dos tratamentos. Estes dados confirmam que para esporos de *D. sellowiana* não ocorre aceleração da germinação após a criopreservação como em outras espécies de esporos de samambaias. Estas análises demonstram a eficiência do método de criopreservação em estabelecer esporófitos saudáveis, e fornecem informações eficazes para protocolos de conservação em bancos de germoplasma, bem como para projetos de reintrodução em ambiente natural.

Palavras-chave: Esporos – Esterilização – Fotossíntese – Gametófitos – Germinação – Germoplasma – Samambaias – Ultraestrutura

ABSTRACT

The Atlantic Forest is a Brazilian biome threatened by loss of biodiversity due to the intense forest exploitation, deforestation, agriculture and the fragmentation of native forests. *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) is a tree fern, distributed throughout Latin America in the Dense Ombrophilous Forest, occurring in Brazil, in the Atlantic Forest. It has landscaping and pharmaceutical potential, and due to its intense extraction in the last decades, is currently threatened with extinction. Cryopreservation is an ex situ conservation option to protect and conserve the genetic heritage of endangered native species and species of commercial interest, and it is fundamental to prospect information that supports the conservation and propagation protocols for reintroduction of these species into the natural environment. This study provides information on the propagation of *D. sellowiana* from cryopreserved spores, and verifies whether the cryopreservation or sterilization of spores of this protocol caused any compromise to germination or establishment of seedlings. We used four treatments, from control spores (C), surface sterilized spores (ES), surface non-sterilized spores and cryopreserved spores (CR) and surface sterilized and cryopreserved spores (CRE) of *D. sellowiana*. Germination was compared by mean (%), germination velocity index (IVG) and relative growth rate (TCR). By light microscopy (ML), scanning electron microscopy (MEV), transmission electron microscopy (MET) and confocal made it possible to compare the effects of cryopreservation and superficial sterilization at the ultrastructural and cellular levels. The establishment of sporophytes was observed through average formation (%), rate of emergence (IVE) and TCR, and complemented by the analysis of their photosynthetic patterns through Fast Light Curves (CRLs), Integrated Fluorescence Density (IntDen), and the contents of chlorophylls. After 22 days of inoculation, spores of the treatments submitted to superficial sterilization had lower IVG than the non-sterilized treatments, and the average germination of the treatments submitted to cryopreservation did not differ from the control, although the only cryopreserved spores had a higher germination average and spores Only the lowest germination average. MEV analyzes showed only small superficial changes in the spores of sterilized treatments. Through Confocal and MET it was verified that there were no alterations in the ultrastructure in any of the treatments. These data confirm that for spores of *D. sellowiana* there is no acceleration of

germination after cryopreservation as in other spores of fern species. These analyzes demonstrate the efficiency of the cryopreservation method in establishing healthy sporophytes and provide effective information for conservation protocols in germplasm banks as well as for reintroduction projects in the natural environment.

Keywords: Arborescent Ferns – Gametophytes – Germination – Germplasm – Photosynthesis – Sterilization – Spores – Ultra-structure

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 01** – Representação cladística das monilófitas em relação às licófitas e espermatófitas. 3
- Figura 02** – Ciclo de vida de samambaia homosporada *Pleopeltis lepidopteris* de la Sota (Polypodiaceae)..... 4
- Figura 03** – Espécimes de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) no Parque Nacional de São Joaquim..... 6

CAPÍTULO 01

- Figura 01** – Localização da Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Caraguatá e trajeto a partir de Florianópolis. 16
- Figura 02** – Organograma experimental 18
- Figura 03** – Microscopia Eletrônica de Varredura dos esporos de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) antes da inoculação em meio líquido: Aspecto superficial. 25
- Figura 04** – Microscopia de luz de esporos de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) no momento das contagens (6, 10, 14, 18 e 22 dias), vista superficial. 27
- Figura 05** – Microscopia Confocal de Varredura a Laser de esporos de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae), após 6 dias..... 29
- Figura 06** – Microscopia Eletrônica de Transmissão de esporos germinados de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) após 6 dias 31
- Figura 07** – Microscopia Eletrônica de Transmissão da célula protalial clorofilada de esporos de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) após 6 dias..... 33
- Figura 08** – Microscopia de Luz (**a-d**) e Microscopia Eletrônica de Varredura (**e-h**) de gametófitos cordiformes de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) com 90 dias..... 34

CAPÍTULO 02

Figura 01 – Organograma das análises de estabelecimento de esporófitos e fotossíntese de gametófitos e esporófitos de <i>Dicksonia sellowiana</i> Hook. (Dicksoniaceae).....	44
Figura 02 – Curva de formação de esporófitos (%) de <i>Dicksonia sellowiana</i> Hook.(Dicksoniaceae).....	50
Figura 03 – Índice de Velocidade de Emergência (IVE) de <i>Dicksonia sellowiana</i> Hook.(Dicksoniaceae).....	51
Figura 04 – Microscopia Confocal de Varredura a Laser de gametófitos cordiformes (a-d) e esporófitos jovens (e-h) de <i>Dicksonia sellowiana</i> Hook. (Dicksoniaceae).....	54
Figura 05 – Curvas Rápidas de Luz de gametófitos cordiformes de <i>Dicksonia sellowiana</i> Hook. (Dicksoniaceae).....	55
Figura 06 – Curvas Rápidas de Luz de esporófitos jovens de <i>Dicksonia sellowiana</i> Hook. (Dicksoniaceae).....	56
Figura 07 – Teores de clorofilas e carotenóides em <i>Dicksonia sellowiana</i> Hook. (Dicksoniaceae).....	57

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 01 – Germinação Média (%), Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Taxa de Crescimento Relativo (TCR) de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae)..26

CAPÍTULO 2

Tabela 01 – Análises do número de frondes por planta e do crescimento em altura de esporófitos de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) após 60 dias de verificação.52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C: Esporos Controle

Cfa: Clima Subtropical Úmido com Verão Quente

CITES : Comércio Internacional de Espécies de Fauna e Flora em Perigo de Extinção

CO₂: Dióxido de Carbono

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

CR: Esporos Criopreservados Não Esterelizados

CRE: Esporos Criopreservados e Esterelizados

CRL: Curvas Rápidas de Luz

DBO: Câmara Incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio

DMSO: Dimetil Sulfoxido

ES: Esporos Esterelizados

F: Fluorescência da amostra aclimatada às condições de claro

F₀: Fluorescência da amostra aclimatada às condições de escuro

F_m: Fluorescência máxima da amostra aclimatada às condições de escuro

F_m' : Fluorescência máxima verificada pelos pulsos de saturação

F_v/F_m: Rendimento Quântico Ótimo

HMDS: Hexametildisilazano

IBAMA : Instituto Brasileiro do Meio Ambiente

IntDen: Densidade Integrada

- IVE: Índice de Velocidade de Emergência
- IVG: Índice de Velocidade de Germinação
- LA: Luz Actínica
- LCME: Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
- LS: Luz Saturante
- MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura
- ML: Microscopia de Luz
- NL: Nitrogênio líquido
- PAM: Fluorímetro de Pulso Modulado
- PSI: Fotossintema I
- PSII: Fotossintema II
- rETR: Taxa de Transporte de Elétrons Relativa
- RLC: do inglês, Rapid Light Curves
- RPM: Rotação por minuto
- RPPN: Reserva Particular do Patrimônio Natural
- TCR: Taxa de Crescimento Relativo
- Y(II): Rendimento Quântico Efetivo
- Y(NO): Energia dissipada na forma de calor ou fluorescência
- Y(NPQ): Energia dissipada na forma de calor

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	xii
ABSTRACT	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE TABELAS.....	xviii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xx
1. INTRODUÇÃO GERAL	2
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos	11
Capítulo 1 – Efeito da criopreservação de esporos de <i>Dicksonia sellowiana</i> Hook. (Dicksoniaceae) em Nitrogênio Líquido na germinação e desenvolvimento gametofítico.....	12
RESUMO.....	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.1 Local de Coleta.....	15
2.2 Obtenção dos esporos.....	16
2.3 Tratamentos	17
2.3.1 Esterilização superficial dos esporos	17
2.3.2 Criopreservação dos esporos	17
2.4 Germinação dos esporos	18
2.5 Análises Fisiológicas.....	19

2.5.2 Índice de Velocidade de Germinação (IVG).....	19
2.5.3 Taxa de Crescimento Relativo (TCR) de gametófitos	20
2.5.4 Desenvolvimento gametofítico	20
2.6 Análises morfológicas e ultraestruturais.....	21
2.6.1 Microscopia de luz (ML)	21
2.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	21
2.6.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	22
2.6.4 Microscopia Confocal de Varredura à Laser.....	22
2.7 Análise estatística.....	23
3 RESULTADOS.....	24
4 DISCUSSÃO	35
5 CONCLUSÃO	38
Capítulo 2 – Aspectos da fotossíntese de gametófitos e esporófitos jovens de <i>Dicksonia sellowiana</i> Hook. (Dicksoniaceae) provenientes de esporos submetidos à criopreservação em nitrogênio líquido...39	
RESUMO	39
ABSTRACT	40
1 INTRODUÇÃO.....	41
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1 Obtenção dos gametófitos e esporófitos jovens de <i>Dicksonia sellowiana</i> Hook. (Dicksoniaceae) através do cultivo de esporos....	44
2.2 Análises de estabelecimento e crescimento de esporófitos de <i>D. sellowiana</i>	45
2.2.1 Curvas de formação de esporófitos	45
2.2.2 Índice de Velocidade de Emergência (IVE) de Esporófitos.....	45
2.2.3 Taxa de Crescimento Relativo (TCR) de Esporófitos	46

2.3 Análises de Parâmetros Fotossintéticos de Gametófitos Cordiformes e Esporófitos Jovens de <i>D. sellowiana</i>	46
2.3.1 Análise da autofluorescência dos cloroplastos através de imagens de microscopia confocal de varredura à laser	46
2.3.2 Parâmetros fotossintéticos através da Fluorescência da Clorofila <i>a</i>	47
2.3.3 Extração e dosagem de Clorofilas <i>a</i> e <i>b</i> , e Carotenóides	48
2.3.4 Análise estatística	49
3 RESULTADOS.....	50
3.1 Análises de estabelecimento e crescimento de esporófitos de <i>D. sellowiana</i>	50
3.1.1 Formação de Esporófitos.....	50
3.1.2 Análise do crescimento de esporófitos	52
3.2 Análises da Fotossíntese de Gametófitos e Esporófitos de <i>D. sellowiana</i>	52
3.2.1 Densidade Integrada de Fluorescência.....	52
3.2.2 Parâmetros fotossintéticos através da Fluorescência da Clorofila <i>a</i>	55
3.2.3 Extração e dosagem de Clorofilas <i>a</i> e <i>b</i> e Carotenóides	57
4 DISCUSSÃO.....	58
5 CONCLUSÕES	62
CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

1. INTRODUÇÃO GERAL

A Mata Atlântica é um bioma brasileiro que apresenta grande diversidade biológica, com altos níveis de endemismo e riqueza de espécies, e que sofreu severa exploração ao longo da ocupação urbana, restando apenas 7,26% de sua área, sendo atualmente incluída como um dos 34 *hot spots* de biodiversidade mundial (PILATTI *et al.*, 2011). Cerca de 70% da população brasileira vive neste bioma, gerando consequências típicas da urbanização como intensificação da agricultura, perda da diversidade e fragmentação ecológica (PILATTI *et al.*, 2011; HASSEL *et al.*, 2017). Evitar, atenuar e reverter as consequências antrópicas para a proteção de espécies nativas em ambientes ameaçados, depende do desenvolvimento de estratégias que preceituem sua utilização sustentável e as protejam contra a exploração excessiva em seus ambientes naturais e em áreas de conservação da diversidade genética (PILATTI *et al.*, 2011).

Samambaias são plantas vasculares sem sementes, que possuem ciclo de vida com alternância de gerações, sendo uma delas a fase gametofítica, haplóide, efêmera e geralmente inconspícua e a outra, a fase esporofítica, diplóide, de maior complexidade anatômica e com período vital mais longo (RAGHAVAN, 1989). Em termos taxonômicos, samambaias podem ser classificadas como monilófitas (SMITH *et al.*, 2006).

As monilófitas e licófitas possuem distribuição mundial e estão muito presentes na flora brasileira, especialmente na Mata Atlântica (SEHNEM, 1978; FERNANDES, 2000). Estas plantas foram por muito tempo, agrupadas como Pteridófitas, mas recentes estudos moleculares (Fig. 01) demonstraram que licófitas e monilófitas possuem linhagens evolutivas distintas (SCHNEIDER *et al.*, 2016; SMITH *et al.*, 2006, 2008). Ocorre que licófitas e monilófitas partilham de várias características comuns em plantas vasculares, como a presença de tecido vascular, porém apresentam também características comuns entre plantas mais basais, como ausência de sementes e dispersão por esporos. Assim a adoção do termo Pteridófitas ainda remete ao estudo deste grupo, e embora parafilético, ainda pode ser apropriado abordar a biologia de ambas as linhagens de forma conjunta (SCHNEIDER *et al.*, 2016).

Registros fósseis demonstram que essas plantas já existiam durante o Devoniano, há cerca de 400 milhões de anos, e que foram

dominantes nos ambientes tropicais e subtropicais entre 380 e 290 milhões de anos atrás, embora a grande maioria das famílias e espécies atualmente existentes só tenham aparecido no início do Cretáceo (PRYER *et al.* 2004).

As samambaias ocorrem em uma enorme diversidade de ambientes, sendo encontradas nas regiões tropicais e também nas temperadas, do nível do mar às elevadas altitudes, e desde situações sub-desérticas às regiões costeiras e de manguezal (PAGE *et al.*, 1992; RATHINASABAPATHI, 2006).

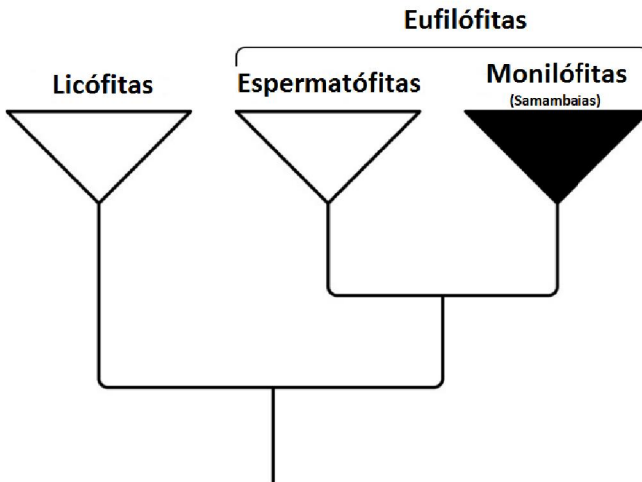


Figura 01 – Representação cladística das monilófitas em relação às licófitas e espermatófitas. Fonte: adaptado de Smith et al. (2006).

As samambaias homosporadas apresentam esporos que são produzidos nos esporângios (Fig. 02) por meiose e depois são dispersos. Após a germinação, tais esporos quase sempre produzem gametófitos de coloração verde, que podem ser bissexuados, possuindo neste caso tanto anterídios quanto arquegônios; ou podem ser unissexuados. Dentro dos anterídios são produzidos numerosos anterozóides espiralados e

multiflagelados, que quando maduros e com o adequado suprimento de água, são liberados através do rompimento dos anterídios. Os anterozóides então nadam em direção ao arquegônio, fecundam a oosfera e o zigoto resultante começa a dividir-se imediatamente. O embrião jovem cresce e se diferencia diretamente em um esporófito jovem, obtendo sua nutrição inicialmente a partir do gametófito, até que possa sozinho, adquirir um nível de fotossíntese para manter-se (RAVEN *et al.*, 2001).

Seu sistema de reprodução sexual é estritamente dependente de água, o que confere a esse grupo de plantas uma grande sensibilidade às mudanças ambientais, especialmente em habitats vulneráveis, e por isso podem também servir como organismos-modelo preditivos de integridade ecológica (IBARS & ESTRELLES, 2012; BERGERON *et al.*, 2014).

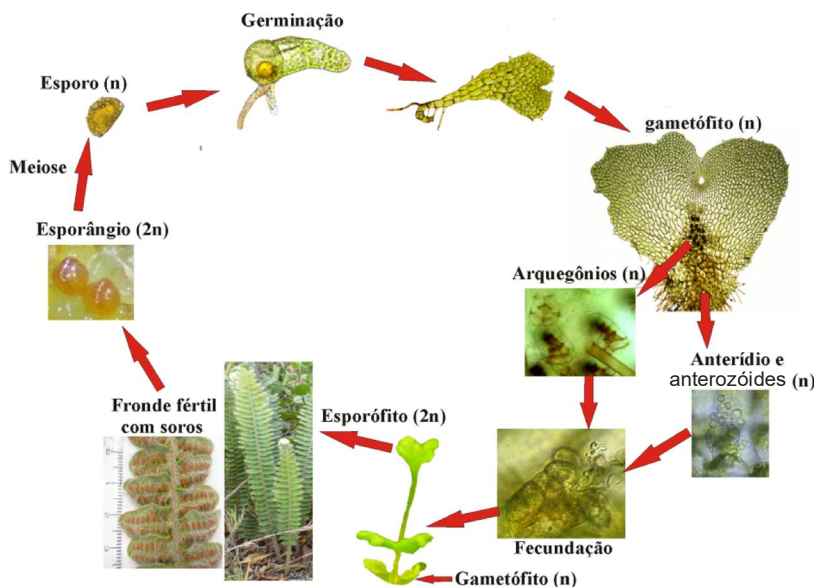


Figura 02 – Ciclo de vida de samambaia homosporada *Pleopeltis lepidopteris* de la Sota (Polypodiaceae) Fonte: Filipin (2015)

O potencial econômico de samambaias não se restringe ao seu emprego no mercado de plantas ornamentais, havendo registros da utilização de *Matteuccia struthiopteris* (L.) Todaro (Onocleaceae) na

gastronomia (RAVEN *et al.* 2001), da utilização de *Pteris vittata* L. (Pteridaceae) na fitorremediação de solos contaminados com arsênico (XIE *et al.* 2009), além de haver pesquisas recentes demonstrando que o extrato das folhas de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) poderia possuir compostos com aplicação na indústria farmacêutica (RATTMANN *et al.*, 2009; 2011; 2012).

Dicksonia sellowiana Hook. (Dicksoniaceae) é uma samambaia arbórea, monilófita, da ordem Cyatheaales, conhecida popularmente como xaxim, xaxim-bugio, ou samambaiçu-imperial, e ocorre num amplo território da América Latina, desde o sudeste do México até o Uruguai, incluindo partes da Venezuela, Colômbia, Paraguai e Brasil. Pode alcançar 6 metros de altura e ocorre entre 60 m e 3.500 m acima do nível do mar, tendo maior propagação em lugares pantanosos nas serras, encostas serranas e ocasionalmente nos banhados das baixadas (FERNANDES, 2000). A espécie possui um cáudice arborescente envolvido por uma bainha de raízes adventícias bastante espessa (Fig 03). Suas frondes podem atingir 2,40 m de comprimento, possuem estípites longos em indivíduos jovens e sésseis ou curtíssimo-peciolados nos adultos, com lâminas bipinadopinatífidas a pinatissectas, com ápice agudo ou acuminado (SEHNEM, 1978). No estado catarinense, propaga-se na Floresta Ombrófila Mista, geralmente associada a Araucárias. (TRYON, 1970, 1972; KLEIN, 1978; SEHNEM, 1978; TRYON & TRYON, 1982; FERNANDES, 2000; GASPER *et al.*, 2011).



Figura 03 – Espécimes de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) no Parque Nacional de São Joaquim. (Fonte: Acervo do autor, 2015)

Nos pontos de inserção das folhas de *D. sellowiana* desenvolvem-se filamentos amarelos, lanosos e abundantes, que podem ser usados de forma medicinal como hemostáticos (PIO CORRÊA, 1931). Algumas comunidades indígenas utilizam as frondes para tratar doenças de pele, asma e doenças parasitárias (MARTINS-RAMOS *et al.*, 2010). O extrato obtido das folhas demonstrou grande potencial na indução de relaxamento vascular e hipotensão em ratos, em estudo feito para averiguar sua eficácia no tratamento de asma (RATTMANN *et al.*, 2009). Seu tronco fibroso retém bastante água, mantendo-se úmido por um grande período de tempo, o que o torna um substrato excelente para o cultivo de orquídeas (SILVA, 1986). E é justamente a utilização de seu cáudice para fabricação de vasos, placas, palitos e substrato para cultivo de bromélias e orquídeas que, ao longo de décadas de extrativismo, colocaram essa espécie na lista oficial de espécies sob risco de extinção no Brasil (MMA, 1998).

Seu crescimento se dá de forma muito lenta. Em estudo sobre o crescimento do cáudice de *D. sellowiana*, Schmitt *et al.*, (2009) analisaram por três anos o crescimento de 37 indivíduos e observaram que a média anual de crescimento foi de 4,78 cm/ano⁻¹. O extrativismo, associado ao lento crescimento, pode acarretar o desaparecimento das plantas adultas de *D. sellowiana*, o que além de comprometer esta espécie, geraria efeitos sobre outras formações vegetais, seja pela drástica redução de matéria orgânica disponibilizada no solo ou pela menor disponibilidade de micro-habitats para várias espécies epífitas (SEHNEM, 1978; FERNANDES, 2000; CORTEZ, 2001; SCHMITT *et al.*, 2005; FRAGA *et al.*, 2008).

As recentes mudanças ambientais causadas pela degradação de seus habitats e principalmente pelo extrativismo de *D. sellowiana* podem ameaçar seu ciclo reprodutivo (IBARS & ESTRELLES, 2012). Por estes motivos esta espécie foi incluída na lista de espécies brasileiras ameaçadas de extinção do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, portaria IBAMA nº 37-N/92), no Livro Vermelho da Flora do Brasil (MARTINELLI & MORAES, 2013) e também no apêndice II do CITES (Comércio Internacional de Espécies de Fauna e Flora em Perigo de Extinção) e teve sua comercialização proibida pelo CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) através da resolução 278/2001.

A elaboração de estratégias de conservação desta samambaia arbórea ameaçada de extinção depende de subsídios disponibilizados por estudos que possam esclarecer os estágios iniciais do desenvolvimento, especialmente em seu habitat natural (SCHNEIDER *et al.*, 2016). Por outro lado, os estudos que efetivamente forneçam dados sobre estratégias de gestão de conservação de samambaias são escassos, e estes dados têm uma interpretação mais complexa em comparação às plantas com flores, o que se deve aos seus dois ciclos de vida livre: a fase gametofítica e a fase esporofítica (GOMES *et al.*, 2006).

Os esporos de *D. sellowiana* são tetraédricos, triletes, possuem uma fissura trirradial comum em esporos triletes, que representa o ponto de ligação com os demais esporos do quarteto, dentro do esporângio. A parede que encapsula o esporo possui três camadas, sendo a interna conhecida como intina, recobrimdo a intina existe a espessa exina, que forma ornamentações em sua superfície, as quais tem sido usadas para a taxonomia, e uma camada externa conhecida como perina. O principal

componente da exina é o polímero esporopolenina (RAGHAVAN, 1989).

Em esporos de samambaias homosporadas como *D. sellowiana* as principais substâncias de reservas são lipídios, mas os esporos também podem conter açúcares, aminoácidos, hormônios, minerais, além de proteínas específicas como a calmodulina, relacionada à divisão celular, aumento do volume celular e movimentos citoplasmáticos. Com o término da fase da esporogênese o esporo maduro possui as informações necessárias para que a germinação se inicie assim que encontre as condições favoráveis de luminosidade ou obscuridade e umidade (RAGHAVAN, 1989). Proteínas classificadas como globulinas foram encontradas em esporos de *Matteuccia struthiopteris* (TEMPLEMAN *et al.*, 1987, SHUTOV *et al.*, 1998), *Onoclea sensibilis* (Onocleaceae) e *Osmunda cinnamomea* (Osmundaceae), e são geralmente relacionadas com a preservação estrutural durante estresses hídricos (TEMPLEMAN *et al.* 1990; SEKI *et al.*, 2007; GIRIBALDI *et al.*, 2010).

O primeiro passo para que se possa obter uma cultura asséptica de esporos de samambaias é a sua esterilização superficial, e a escolha do método deve evitar ao máximo as perdas de material no processo, mantendo a viabilidade e eliminando possível contaminação (DYER, 1979; WU, 2009). Rogge (1999) observou que a melhor concentração de hipoclorito de sódio para a esterilização superficial de esporos recém coletados de *D. sellowiana* destinados ao cultivo “*in vitro*” foi 30% durante 30 minutos, em meios com adição de sacarose. Suzuki (2003) obteve 78,5% de germinação em esporos de *D. sellowiana* armazenados por 1160 dias sob refrigeração de $7\pm 1^{\circ}\text{C}$, após esterilização em hipoclorito de sódio a 5%, porém observou inibição parcial da germinação (27%) quando esporos foram esterilizados em hipoclorito de sódio a 20%, o que mostrou que esporos conservados por vários anos tornam-se mais suscetíveis aos danos causados pela esterilização. Fillipini *et al.* (1999) analisaram a germinação de esporos de *D. sellowiana*, armazenados à temperatura de 10°C por 731 dias observaram 81,75% de germinação, e ainda que estes valores não diferiram dos valores encontrados para esporos recém coletados. Begnini & Randi (2009) testaram a germinação de esporos de *D. sellowiana* armazenados sob refrigeração ($7\pm 1^{\circ}\text{C}$) durante 4,5 anos e observaram que ainda estavam viáveis, mas os armazenados sob refrigeração por 6,0 anos haviam perdido a viabilidade. Os autores confirmaram que com o aumento da idade dos esporos, estes se tornam

mais sensíveis à esterilização superficial com hipoclorito de sódio comercial.

Com relação ao desenvolvimento gametofítico “*in vitro*” de *D. sellowiana*, Renner & Randi (2004) cultivaram esporos em meios de Dyer e MS, acrescidos de 0 a 5% de sacarose. A massa seca foi maior em gametófitos de 30 dias de idade, cultivados em meio Dyer com adição de 3% a 5% de sacarose e em meio MS com adição de 2% de sacarose. As autoras testaram também o efeito de diferentes níveis de luz solar na germinação e observaram que a germinação foi mais alta sob 5% e 20% da luz solar cujos gametófitos após 49 dias de cultivo apresentaram os maiores níveis de açúcares solúveis totais e clorofilas.

Suzuki *et al.* (2005) analisaram o efeito de alguns tipos de substratos no desenvolvimento de gametófitos de *D. sellowiana* que apresentavam variações de pH e de minerais, e apontaram como ideal ao desenvolvimento inicial o nitossolo vermelho distrófico adicionado de composto orgânico termofílico (3:1) cujo pH é 5,2, sendo que neste substrato os primeiros esporófitos surgiram após 84 dias de cultivo. *D. sellowiana* parece preferir substratos com baixo pH, pobres em alumínio e com altos níveis de fósforo, potássio, cálcio e nitrogênio (SUZUKI *et al.* 2005).

A criopreservação é a conservação de material biológico em temperatura ultra baixa (-196°C) geralmente em nitrogênio líquido (NL) (KARTHA, 1985, BENSON *et al.*, 1998). Em temperaturas ultra baixas todos os processos metabólicos são desativados, paralisando também a deterioração biológica e permitindo a conservação durante longos períodos (BENSON *et al.*, 1998). Segundo Harding *et al.* (1997) e Benson *et al.* (1998), a técnica de criopreservação apresenta limitação, envolvendo uma série de estresses que podem destruir o material vegetal. Os autores enfatizam a importância da manutenção da estabilidade fenotípica e genética do material criopreservado por longo período nos programas de conservação de germoplasma. A criopreservação tornou-se um valioso método para a conservação de recursos genéticos vegetais, porém é preciso aperfeiçoar protocolos para garantir a regeneração completa de plantas a partir das estruturas criopreservadas (SAKAI, 1995; HARDING *et al.*, 1997; YONGJIE *et al.*, 1997; PILATTI *et al.*, 2011; MIKULA *et al.*, 2015). Crioprotetores como o dimetilsulfóxido, glicerol, sacarose e prolina são utilizados em alguns germoplasmas, quando as células apresentam elevados teores de

água, para evitar a formação de cristais de gelo e manter a viabilidade durante a criopreservação (LYNCH & BENSON, 1991).

A criopreservação de esporos de samambaias em NL já foi utilizada por diversos autores. Agrawal *et al.* (1993) foram os pioneiros a publicar um artigo sobre a criopreservação de samambaias. Estes autores criopreservaram esporos de *Cyathea spinulosa* Wall. ex Hook. (Cyatheaceae) durante três dias em NL e estes sobreviveram e foram os pioneiros a publicar um artigo sobre a criopreservação de esporos de samambaias. Esporos aclorofilados de 33 espécies e clorofilados de cinco espécies sobreviveram ao armazenamento em NL durante 52 e 75 meses, mas o desenvolvimento gametofítico não foi acompanhado (PENCE, 2000). Esporos de *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Dryopteridaceae) continuaram viáveis após 90 dias armazenados em NL (BRUM & RANDI, 2006). Esporos de algumas espécies de *Alshophila* (Cyatheaceae) também mantiveram viabilidade após 12 meses de imersão em NL (XU *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2010). Ballesteros *et al.* (2012) armazenaram criogenicamente (-196°C) esporos de *Polystichum lonchitis* (L.) Roth (Dryopteridaceae) previamente desidratados em sílica gel e observaram que a viabilidade foi mantida após três anos. Segundo Ballesteros *et al.* (2011) e Ballesteros *et al.* (2012), além de manter alta viabilidade, os esporos apresentaram germinação mais rápida e crescimento gametofítico normal após imersão em NL. Filipin *et al.* (2016) e Filipin *et al.* (2017) criopreservaram esporos de *Pleopeltis lepidopteris* de la Sota (Polypodiaceae) em NL e observaram que o método acelerou a germinação e o desenvolvimento gametofítico, mas que os gametófitos mostraram desenvolvimento normal com o desenvolvimento de gametângios.

Com relação à criopreservação de esporos de *D. sellowiana*, Rogge *et al.* (2000) observaram que os esporos sobreviveram 90 dias em nitrogênio líquido, sem a necessidade de adição de crioprotetores e mostraram que houve maior germinação em relação aos esporos controle, no caso de esporos recém coletados. No entanto, as autoras não analisaram os efeitos da criopreservação dos esporos no desenvolvimento gametofítico ou no estabelecimento de esporófitos.

O presente trabalho trata, portanto, do estudo do desenvolvimento gametofítico e esporofítico de esporos criopreservados de *D. sellowiana*, como uma das estratégias para a sua conservação “*ex situ*” em bancos de germoplasma, com o objetivo de responder às seguintes perguntas: a

criopreservação altera a ultraestrutura ou a organização sub-celular dos esporos de *D. sellowiana*? A criopreservação interfere negativamente no comportamento fotossintético de gametófitos e esporófitos obtidos de esporos criopreservados de *D. sellowiana*?

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Comparar morfofisiologicamente o desenvolvimento gametofítico inicial e o estabelecimento de esporófitos jovens de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) após esterilização superficial e criopreservação de seus esporos

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o desenvolvimento inicial dos gametófitos provenientes de esporos controle, esporos esterilizados e esporos criopreservados em Nitrogênio líquido (24 horas), esterilizados e não esterilizados.
- Verificar o surgimento de estruturas reprodutivas em gametófitos de todos os tratamentos, bem como a emergência de esporófitos.
- Comparar a fotossíntese de gametófitos com gametângios e de esporófitos jovens provenientes de todos os tratamentos.

Capítulo 1 – Efeito da criopreservação de esporos de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) em Nitrogênio Líquido na germinação e desenvolvimento gametofítico.

RESUMO

A *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) é uma samambaia arbórea ameaçada de extinção, que ocorre no sul do Brasil em Mata de Araucárias, com crescimento lento e latente potencial farmacêutico e paisagístico. Seus esporos são aclorofilados e podem ser imersos em Nitrogênio Líquido (NL) sem a necessidade de crioprotetores. É preciso entender melhor estes mecanismos de proteção naturais, especialmente por prover a proteção necessária ao congelamento direto em NL, sem crioprotetores. Com o objetivo de verificar se a criopreservação causa alguma alteração ultraestrutural ou fisiológica em esporos criopreservados e/ou esterelizados, foram utilizados esporos controle (C), esporos esterilizados superficialmente (ES), esporos não esterilizados superficialmente e criopreservados (CR) e esporos esterilizados superficialmente e criopreservados (CRE) de *D. Sellowiana*. Esporos e gametófitos provenientes de todos os tratamentos foram analisados quanto ao seu percentual de germinação média (%), Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Taxa de Crescimento Relativo (TCR), e ainda através das análises de microscopias, que possibilitaram comparar os efeitos da criopreservação e esterilização superficial nos níveis ultraestrutural e celular. Após 22 dias de inoculação, esporos dos tratamentos submetidos à esterilização superficial apresentavam IVG menor que os tratamentos não esterilizados, e a média de germinação dos tratamentos submetidos à criopreservação não diferiram do controle, embora tenham diferido entre si. As análises dos esporos com Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) demonstram pequenas alterações na superfície dos esporos de tratamentos esterilizados. Por meio da Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e da Microscopia Confocal se pôde demonstrar que não houve nenhuma alteração na sua ultraestrutura. Estes dados confirmam que para esporos de *D. Sellowiana* não ocorre aceleração da germinação após a criopreservação como em esporos de outras espécies de samambaias. Assim a inclusão de esporos de *D. sellowiana* em

bancos de germoplasma pode garantir a propagação de indivíduos semelhantes fisiologicamente e morfológicamente, garantindo a sobrevivência da espécie e subsidiando informações relevantes para a conservação “*ex situ*”.

Palavras-chave: *ex situ* – Gametófitos – Germoplasma – Samambaia Arborescente – Ultraestrutura

ABSTRACT

The *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) is a tree fern threatened with extinction, occurring in southern Brazil in Araucaria's Forests, with slow growth, latent pharmacological and landscape potential. Their spores are non green and can be immersed in Liquid Nitrogen (NL) without the need for cryoprotectants. These natural protection mechanisms need to be better understood, especially by providing the necessary protection for direct freezing in NL, without cryoprotectants. In order to verify if cryopreservation caused any ultrastructural or physiological changes in cryopreserved and / or sterilized spores, control spores (C), surface sterilized spores (ES), surface non sterilized spores and cryopreserved spores (CR) and surface sterilized spores and cryopreserved (CRE) of *D. Sellowiana*. Spores and gametophytes from all treatments were analyzed for their Mean of Germination (%), Germination Speed Index (IVG) and Relative Growth Rate (TCR), and also through the microscopy analysis, which made it possible to compare the effects of cryopreservation and superficial sterilization at the ultrastructural and cellular levels. After 22 days of inoculation, spores of the treatments submitted to superficial sterilization presented lower IVG than the non-sterilized treatments, and the average germination of the treatments submitted to cryopreservation did not differ from the control, although they differed from each other. Spore analyzes with Scanning Electron Microscopy (MEV) demonstrate small changes in the surface of the spores of sterilized treatments.

Electron Transmission Electron Microscopy (MET) and Confocal Microscopy showed that there was no change in its ultrastructure. These data confirm that for spores of *D. Sellowiana* there is no acceleration of germination after cryopreservation as in spores of other species of ferns. Thus the inclusion of spores of *D. sellowiana* in germplasm banks can guarantee the propagation of similar individuals physiologically and morphologically, guaranteeing the survival of the species and subsidizing information relevant to “*ex situ*” conservation.

Keywords: Arborescente Fern - *ex situ* - Gametophyte - Germplasm - Ultrastructure

1. INTRODUÇÃO

Dicksonia sellowiana Hook. (Dicksoniaceae) é uma samambaia arborescente que ocorre em florestas úmidas da América Latina, em altitudes superiores à 60m (TRYON & TRYON, 1982), cujo tronco é recoberto por raízes adventícias e tricomas densos (FERNANDES, 2000), e por isso foi durante muito tempo utilizado para a confecção de vasos ou substrato para a produção de plantas ornamentais (GOMES *et al.*, 2006), o que levou à inclusão desta espécie no Apêndice II do CITES (MMA, 1998) e no Livro Vermelho da Flora do Brasil (MARTINELLI & MORAES, 2013).

Especialmente por se tratar de uma espécie ameaçada de extinção é que se faz necessário incrementar o entendimento sobre sua fisiologia, permitindo desenvolver estratégias de conservação e propagação adequadas (BERNABE *et al.*, 1999; MIKULA *et al.*, 2009). A criopreservação de esporos em nitrogênio líquido pode ser uma estratégia de conservação muito útil, tanto com relação às espécies de interesse econômico quanto a espécies ameaçadas, que podem ser armazenadas em bancos de germoplasma (BENSON *et al.*, 1998; PENCE, 2000; BALLESTEROS *et al.*, 2012).

Esporos de algumas espécies de samambaias, como *D. sellowiana*, são aclorofilados e em geral toleram dessecação como sementes ortodoxas (BALLESTEROS & WALTERS, 2007; PENCE, 2008; BARNICOAT *et al.*, 2010). Já foram estudadas diversas espécies de samambaias cujos esporos podem ser armazenados em NL, e a maioria destes são esporos aclorofilados (AGRAWAL *et al.*, 1993; PENCE, 2000; BRUM & RANDI, 2006; BALLESTEROS & WALTERS, 2007; FIORI *et al.*, 2009; BALLESTEROS *et al.*, 2012; FILIPIN *et al.*, 2016).

Estudos envolvendo microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) são ideais para averiguar alterações ultraestruturais após estresses e caracterizar possíveis alterações, sendo ainda raros na literatura quando relacionados a samambaias (FILIPIN *et al.*, 2016). Tais estudos permitem também verificar a interferência causada pela esterilização superficial do esporo, considerada fundamental para culturas de esporos de samambaias (CAMLOH, 1999; SIMABUKURO *et al.*, 1998).

Os esporos de samambaias são células grandes, que acumulam lipídios, proteínas e outras substâncias de reserva para sua manutenção e sobrevivência sob condições adversas (RAGHAVAN, 1989). Esporos aclorofilados quiescentes apresentam baixo conteúdo de água, o que associado à presença de determinadas proteínas, podem ser parte de uma estratégia adaptativa que permite a sua alta dessecação, contribuindo para sua preservação em baixas temperaturas e em nitrogênio líquido (RAGHAVAN, 2005).

Este trabalho teve como objetivo caracterizar as alterações ultraestruturais, sub-celulares e fisiológicas do desenvolvimento gametofítico a partir de esporos de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae), provenientes ou não de criopreservação, previamente submetidos à esterilização ou não.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de Coleta

Fronde férteis de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) foram coletadas de 15 indivíduos diferentes em 02 de setembro de 2015

na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) do Caraguatá, no município de Antonio Carlos, situado à latitude 27°31'01" sul e longitude 48°46'03" Oeste, em Santa Catarina. A reserva esta localizada na divisa com os municípios de Biguaçu, São João Batista e Major Gercino, a uma altitude entre 420m e 903m (Fig. 01). A vegetação local é a Floresta Ombrófila Densa e o clima é Cfa de Köppen, ou mesotérmico úmido, com as temperaturas entre 10°C e 30°C.



Figura 01 – Localização da Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Caraguatá e trajeto a partir de Florianópolis. Fonte: www.caraguata.com.br, acessado em 25 de junho de 2015.

Uma das frondes férteis coletadas foi depositada no Herbário Flor e tombada sob código FLOR0057930 em 08 de setembro de 2015.

2.2 Obtenção dos esporos

Após a coleta, as frondes foram acondicionadas em uma bandeja plástica, recoberta por uma camada de papel de filtro para secagem e liberação de esporos, sob temperatura ambiente, o que induz a abertura dos esporângios e a liberação dos esporos.

Após dez dias, os esporos foram separados dos esporângios por filtragem em papel entretela e armazenados em frascos de vidro escuro com tampa, sob refrigeração a $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ até o início do experimento (RANDI, 1987 modificado).

2.3 Tratamentos

Para entender os efeitos da criopreservação em nitrogênio líquido sobre a germinação de esporos de *D. sellowiana* e evitar os possíveis efeitos conjugados da esterilização superficial dos esporos com a criopreservação em NL, o experimento foi observado em quatro tratamentos diferentes: C – esporos controle; ES – esporos esterilizados superficialmente; CR – esporos não esterilizados superficialmente e criopreservados; CRE – esporos esterilizados superficialmente e criopreservados.

2.3.1 Esterilização superficial dos esporos

Foi utilizado o protocolo de esterilização superficial para esporos frescos de acordo com Suzuki (2003), em que os esporos foram imersos por 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio comercial a 10% (v/v), acrescida de uma gota de detergente comercial, e então submetidos à três lavagens consecutivas em água destilada autoclavada. Por fim, os esporos foram filtrados a vácuo sobre papel de filtro, com auxílio de porta filtro de policarbonato tipo Holder 50 mm, e secaram sob temperatura ambiente. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar.

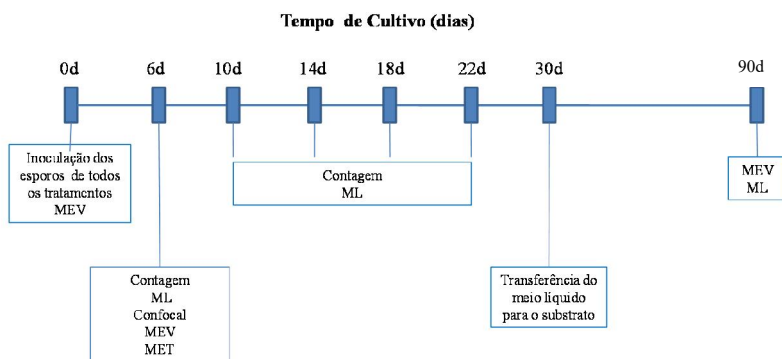
2.3.2 Criopreservação dos esporos

Esporos controle e esporos previamente esterilizados superficialmente foram depositados separadamente em criofrascos de polipropileno autoclavados com capacidade para 2 ml, no dia 05 de abril

de 2016 e foram mantidos completamente imersos em tambor de nitrogênio líquido lacrado por 24 horas, sendo então submetidos a degelo sob temperatura ambiente. Não foram utilizados crioprotetores (ROGGE *et al.* 2000).

2.4 Germinação dos esporos

Toda a vidraria utilizada, bem como a solução nutritiva, foram previamente esterilizadas em autoclave por 30 minutos a uma temperatura de 120°C. Foram inoculados em cada tratamento, com auxílio de espátula de alumínio, 50 mg de esporos por frasco tipo Erlenmeyer (n=5), contendo 20 ml de solução de Mohr (1956) modificada por Dyer (1979), conforme o protocolo adaptado de Renner & Randi (2004). Os frascos foram então tampados com filme de polipropileno fixados com elásticos e transferidos para a câmara de germinação tipo DBO com irradiância à altura dos frascos de aproximadamente $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. A iluminação foi feita com lâmpadas fluorescentes brancas 15W e o fotoperíodo de 16 horas à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, conforme protocolo de Renner & Randi (2004). O material foi mantido nestas condições por 30 dias, até a fase do gametófito filamentoso. Durante o período experimental foram realizadas análises fisiológicas, morfológicas e ultraestruturais, conforme a Figura 02.



90d

Figura 02 – Organograma experimental

As análises fisiológicas realizadas neste capítulo basearam-se nas contagens aferidas a cada tempo, conforme a Figura 02, e compreendem a média de germinação (%), o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e a Taxa de Crescimento Relativo (TCR), enquanto as análises morfológicas, ultraestruturais e sub-celulares foram baseadas nas imagens de microscopias de luz, confocal e eletrônicas de varredura (MEV) e transmissão (MET).

2.5 Análises Fisiológicas

2.5.1 Percentual de germinação

A germinação de esporos de *D. sellowiana* foi acompanhada a cada quatro dias, a partir do sexto dia de inoculação dos esporos (RENNER & RANDI, 2004). Foram preparadas cinco lâminas de cada tratamento e efetuada a contagem de 100 esporos por lâmina, em microscópio binocular com aumento de 40 vezes, para verificar o momento de estabilização da curva de germinação, considerando-se germinados os esporos que apresentavam protusão de rizóide ou células protonemais, conforme o protocolo adaptado de Randi (1987).

2.5.2 Índice de Velocidade de Germinação (IVG)

A velocidade de germinação foi verificada a partir da equação proposta por Maguire (1962), a seguir:

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \dots + \frac{G_n}{N_n}$$

Onde:

G = número de esporos germinados na 1ª contagem, nas subsequentes até a última contagem.

N = número de dias decorridos desde a inoculação na 1ª contagem, nas subsequentes até a última contagem.

2.5.3 Taxa de Crescimento Relativo (TCR) de gametófitos

Gametófitos provenientes de todos os tratamentos foram coletados a intervalos regulares de tempo (6 e 10 dias), as amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, “overnight” a temperatura de 4°C. Posteriormente, foram desidratadas em séries crescentes de etanol (BOUZON, 2006), e em seguida infiltradas com historesina (Leica Historesin, Heidelberg, Alemanha), e então foram feitas secções com 5 µm de espessura, realizadas em micrótomo manual modelo Leica RM 2135, com navalha de tungstênio e posteriormente o material foi corado com azul de Toluidina (AT-O) a 0,5%, pH 3,0, para a visualiação geral da estrutura. As amostras foram fotografadas em microscópio de luz (Leica DM500), equipado com o sistema de captura de Imagem Optacam OPTHD Software (v. 3.7.6815) e realizadas 40 medições de cada tratamento, medindo desde a fissura da parede do esporo até a extremidade do gametófito filamentososo.

A TCR foi calculada de acordo com a equação: $(\text{Log}_{10} L_2 - \text{Log}_{10} L_1) / t_2 - t_1$ onde L_1 é o logaritmo do comprimento do gametófito no tempo 1 e L_2 é o logaritmo do comprimento do gametófito no tempo 2 (BERNABE *et al.*, 1999). O tempo 1 (t_1) foi o dia da primeira aferição, com 6 dias decorridos desde a inoculação, e o tempo 2 (t_2) foi definido pela avaliação seguinte, 10 dias após a inoculação. O crescimento linear dos gametófitos foi medido em µm.

2.5.4 Desenvolvimento gametofítico

Decorridos 30 dias em meio de cultivo líquido, os gametófitos filamentosos obtidos de cada tratamento foram transferidos, com o auxílio de pipetas autoclavadas individuais, para bandejas de polipropileno transparente com tampa (n=8), contendo substrato nitossolo vermelho distrófico com adição de composto orgânico na

proporção de 3:1 (SUZUKI *et al.* 2005), previamente esterilizado em autoclave (60 min a 120°C) recoberto com tecido entretela autoclavado e completamente aderido ao substrato. Este procedimento foi todo realizado em câmara de fluxo laminar.

As bandejas com os gametófitos permaneceram em câmara de germinação tipo DBO nas mesmas condições aplicadas aos testes de germinação.

2.6 Análises morfológicas e ultraestruturais

2.6.1 Microscopia de luz (ML)

Para o acompanhamento do desenvolvimento até a fase reprodutiva e registros fotográficos, foram preparadas lâminas com material fresco de amostras de gametófitos e analisadas em microscopia de luz, por meio de microscópio de luz DM 2500 (Leica, Wetzlar, Alemanha), equipado com câmera DFC 295 (Heerbrugg, Alemanha) e software (Leica Application Suite 3.7.0, Suíça).

2.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Amostras de esporos e de gametófitos apresentando gametângios de todos os tratamentos foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5%, sacarose 2%, tamponada com cacodilato 0,1 M (pH 7,2 em temperatura ambiente por 4 a 10h), lavadas no mesmo tampão, e desidratadas em séries etílicas graduais. Após a desidratação, os gametófitos que apresentaram gametângios foram submetidos ao ponto crítico de CO₂, enquanto os esporos foram submetidos ao HMDS (BOZZOLA & RUSSEL, 1991), uma vez que as dimensões microscópicas deste material dificultam a utilização do ponto crítico de CO₂. As amostras secas foram aderidas sobre suportes de alumínio, com auxílio de fita de carbono dupla-face e cobertas com 20 nm de ouro, em metalizador marca Baltec, modelo CED 030. Posteriormente as amostras puderam ser observadas e fotografadas em Microscópio

Eletrônico de Varredura (MEV), marca Jeol, modelo JSM-6390LV, do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) – UFSC.

2.6.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Gametófitos com 6 dias de inoculação em meio de cultivo foram pré-fixadas em solução de gluteraldeído 2,5%, sacarose 2%, tamponada com cacodilato 0,1 M (pH 7,2 em temperatura ambiente por 4 a 10h) Em seguida, o material foi lavado por 3 vezes (30 minutos cada lavagem) no mesmo tampão. As amostras então foram centrifugadas por 5 minutos após cada lavagem (2.000 rpm) e o pellet formado incluído em Agar (2%, 60°C). Após a inclusão em ágar, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio (O_5O_4) 1%, em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 por 4 a 8 horas, sob temperatura ambiente (BOZZOLA & RUSSEL, 1991 modificado). Após serem lavados novamente no mesmo tampão, os gametófitos foram desidratados em uma série de concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), por 30 minutos em cada concentração, sendo que na última série (100%) a acetona foi trocada três vezes. O material foi então infiltrado com resina Spurr (SPURR, 1969) em séries graduais de acetona-resina Spurr durante quatro dias, sendo então submetidos a duas infiltrações em resina pura por 12 horas, e polimerizado em estufa a 70°C por 24 horas. As secções ultrafinas foram realizadas em ultramicrotomo Leica acoplado à navalha de diamante, e contrastadas por 10 minutos com acetato de uranila 1% e posteriormente por 10 minutos com citrato de chumbo 1%, de acordo com Reynolds (1963). As amostras foram observadas e fotografadas em MET, marca Jeol, modelo JEM 1011 do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) – UFSC.

2.6.4 Microscopia Confocal de Varredura à Laser

Amostras de gametófitos com 6 dias de inoculação em meio de cultivo foram analisadas em microscopia confocal de varredura à laser (Leica TCS SP-5, Wetzlar, Alemanha) para os registros fotográficos. As amostras foram depositadas em lâminas seladas com esmalte. A autofluorescência dos cloroplastos foi observada em um comprimento

de onda de excitação com laser (gás argônio) de 488 nm (violeta) e com um espectro de emissão de 600 a 750 nm (ZITTA *et al.*, 2013), e a autofluorescência da parede celular foi observada em um comprimento de onda de excitação com laser (gás argônio) de 488 nm (violeta) e com um espectro de emissão de 500 a 550 nm. As amostras foram observadas e fotografadas no microscópio Leica HCX PLAPO lambda, com objetiva 63x/1,4-0,6 em óleo de imersão, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) – UFSC. As imagens foram processadas através do programa LAS AF-Lite (Leica).

2.7 Análise estatística

Os resultados obtidos a partir da germinação foram expressos em porcentagem da média, e para cada dia de avaliação foram calculados média e desvio padrão (SOKAL & ROHLF, 1969). Todos os resultados foram analisados pelos testes de normalidade de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade e homocedasticidade (SANTANA & RANAL, 2004). Os dados que não seguiram a distribuição normal ou não apresentavam homocedasticidade foram transformados em Log_{10} e novamente submetidos aos testes de normalidade e homocedasticidade. A comparação dos tratamentos foi efetuada através de análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparação de médias de Tukey (5%), quando normais e homocedásticos (FERREIRA e BORGHETTI, 2009). Os dados que não apresentaram normalidade ou homocedasticidade mesmo após a transformação logarítmica, foram submetidos ao teste não paramétrico de Freadman (mais de dois tratamentos) (ZAR, 1996; SANTANA & RANAL, 2004). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os resultados foram analisados pelos softwares Excel, R e BioEstat.

3 RESULTADOS

Os esporos de todos os tratamentos de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae), quando observados através da MEV, não apresentaram diferenças na sua morfologia externa (Fig. 03). As granulações da exina de esporos de *D. sellowiana* são mais evidentes nos esporos dos tratamentos não esterilizados, C e CR (Fig. 03a,b,e,f), diferentemente dos tratamentos ES e CRE (Fig. 03c,d,g,h) que apresentavam estas granulações em menor quantidade. A fissura tri-radial da parede dos esporos pode ser observada nos detalhes ampliados (Fig. 03e-h), demonstrando a remoção dos depósitos de materiais inclusive do interior destas fissuras.

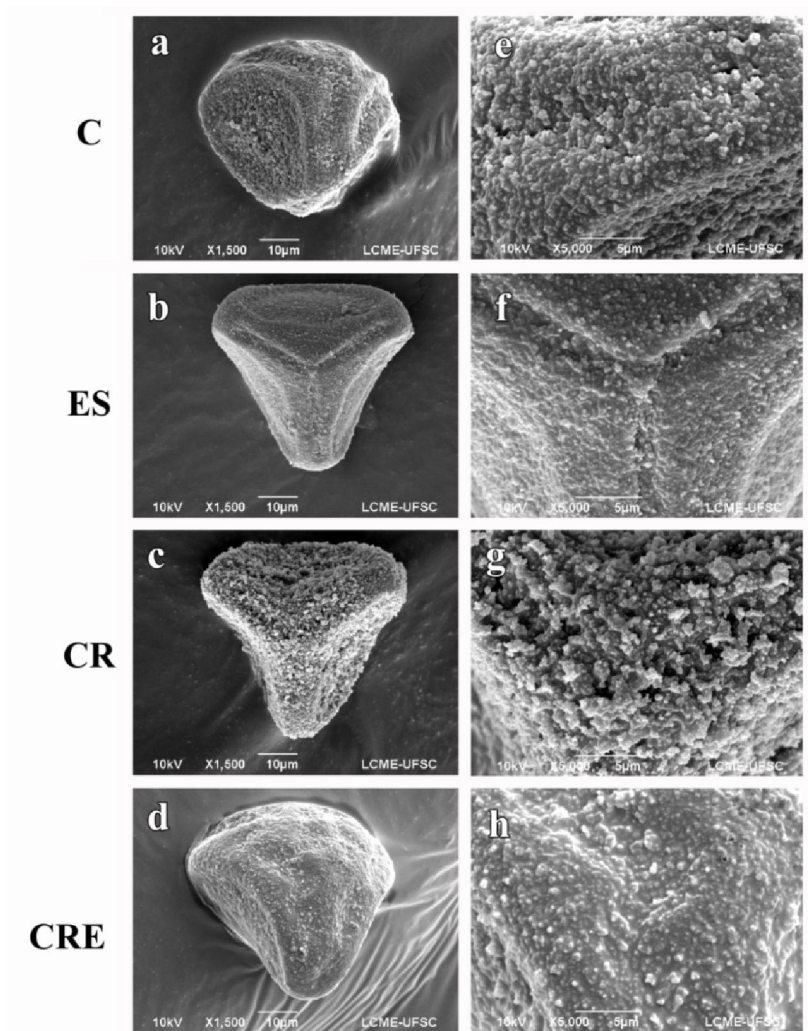


Figura 03 – Microscopia Eletrônica de Varredura dos esporos de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) antes da inoculação em meio líquido: Aspecto superficial. Nota-se que a granulação na superfície dos esporos parece mais evidente nos tratamentos C e CR, que não foram superficialmente esterilizados (a,b,e,f) – C: esporos controle; ES: esporos esterilizados superficialmente; CR: esporos não esterilizados superficialmente e criopreservados; CRE: esporos esterilizados superficialmente e criopreservados.

Após terem sido inoculados, observou-se através dos dados de germinação média (%) dos esporos de *D. sellowiana* que não houve diferenças estatísticas entre o Controle e nenhum dos tratamentos, em nenhuma das verificações (Tabela 01). Entretanto desde o 6º dia de germinação existiram diferenças estatísticas entre o tratamento CR (21,6%) com maior germinação e ES (12%) com menor germinação, os quais formaram grupos distintos em todas as observações. Com 6 dias o tratamento CRE (14,2%) era similar ao C (17,8%). Foram observados três grupos estatísticos de germinação, com os tratamentos CR e ES sempre distintos, e os tratamentos C e CRE formando um grupo intermediário. Na última contagem, com 22 dias de cultivo, o tratamento C apresentou 84,6% de germinação, enquanto o tratamento ES apresentou 74,8% , o tratamento CR 86,4% e o tratamento CRE obteve 77% de germinação.

Tabela 01 – Germinação Média (%), Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Taxa de Crescimento Relativo (TCR) de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae). Germinação média (\pm D.P.; $p \leq 0,05$; $n=500$). IVG (\pm D.P.; $p \leq 0,05$; $n=500$). TCR (\pm D.P.; $p \leq 0,05$; $n=40$). Letras diferentes demonstram diferenças significativas entre os tratamentos, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tratamento	Dias				
	6	10	14	18	22
Média	17,8 ab $\pm 3,56$	64,8 ab $\pm 7,73$	79,8 ab $\pm 5,59$	82,8 ab $\pm 5,26$	84,6 ab $\pm 5,55$
C	IVG 2,97 ab $\pm 0,59$	9,45 a $\pm 0,77$	15,15 a $\pm 0,50$	19,75 a $\pm 0,62$	22,77 a $\pm 0,65$
	TCR (μm)	0,12 a $\pm 0,01$			
Média	12,00 b $\pm 2,55$	55,20 b $\pm 5,12$	70,60 b $\pm 3,65$	72,40 b $\pm 6,02$	74,80 b $\pm 5,02$
ES	IVG 2 b $\pm 0,42$	7,52 b $\pm 0,68$	12,56 b $\pm 0,55$	16,59 b $\pm 0,57$	19,26 b $\pm 0,66$
	TCR (μm)	0,14 a $\pm 0,01$			
Média	21,60 a $\pm 3,78$	68,80 a $\pm 5,67$	83,00 a $\pm 4,64$	85,80 a $\pm 4,76$	86,40 a $\pm 5,46$
CR	IVG 3,6 a $\pm 0,63$	10,48 a $\pm 0,99$	16,41 a $\pm 1,18$	21,18 a $\pm 1,07$	24,26 a $\pm 1,17$
	TCR (μm)	0,10 a $\pm 0,01$			
Média	14,20 ab $\pm 4,21$	56,60 b $\pm 3,65$	70,80 b $\pm 5,85$	75,80 b $\pm 4,15$	77,00 b $\pm 5,48$
CRE	IVG 2,37 ab $\pm 0,70$	8,03 b $\pm 0,49$	13,08 b $\pm 0,85$	17,29 b $\pm 0,84$	20,04 b $\pm 0,74$
	TCR (μm)	0,13 a $\pm 0,01$			

Os valores de IVG demonstram que no início da germinação, com 6 dias, o controle não difere de nenhum dos tratamentos, embora os tratamentos CR e ES sejam estatisticamente divergentes (Tab. 01). Porém, a partir do 10º dia, o IVG apresentado pelos tratamentos sem esterilização (C e CR) foi significativamente maior que o IVG apresentado pelos tratamentos esterilizados (ES e CRE). Este padrão permaneceu até os 22 dias de cultivo, quando o IVG do tratamento C era 22,77 e o tratamento ES apresentava o IVG de 19,26, o tratamento CR possuía um IVG de 24,26 e o tratamento CRE apresentava o IVG de 20,04. Esses resultados mostram que a esterilização tem efeito de inibir ou retardar parcialmente a germinação de esporos. No entanto, a TCR dos gametófitos filamentosos não apresentou diferença estatística entre os tratamentos.

Analisando-se a morfologia percebeu-se que nem a esterilização e nem a criopreservação afetaram o desenvolvimento inicial dos esporos. Em todos os tratamentos, com 6 dias, alguns esporos já apresentavam a parede do esporo rompida e/ou protusões de rizóide (Fig. 04a-d). Aos 10 dias já se podiam visualizar gametófitos filamentosos com 2 a 5 células clorofiladas (Fig. 04e-h), os quais estavam mais alongados aos 14 dias (Fig. 04i-l), e começavam a apresentar divisões laterais aos 18 dias (Fig. 04o). Aos 22 dias foram observados gametófitos espatulados em todos os tratamentos (Fig. 04q-t).

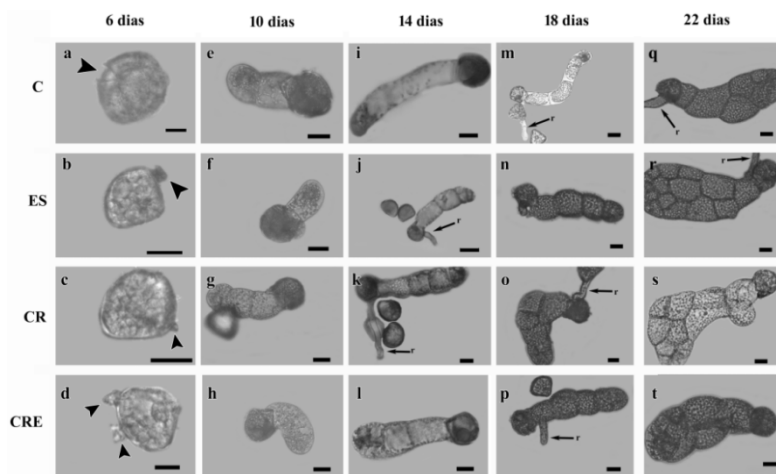


Figura 04 – Microscopia de luz de esporos de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) no momento das contagens (6,

10, 14, 18 e 22 dias), vista superficial. As cabeças de setas apontam para as aberturas na parede do esporo, e as setas apontam protusões de rizóide. **C**: esporos controle; **ES**: esporos esterilizados superficialmente; **CR**: esporos não esterilizados superficialmente e criopreservados; **CRE**: esporos esterilizados superficialmente e criopreservados. Barras de Escala 30 μ m.

Pela microscopia confocal de varredura a laser, nenhuma alteração da autofluorescência e organização dos cloroplastos entre os tratamentos foi visualizada. Aos 6 dias verificou-se a presença de cloroplastos autofluorescentes (cor vermelha) já formados em esporos com rompimento de parede ou protusão de rizóide em todos os tratamentos (Fig. 05a-d). Pôde-se notar que havia grande acúmulo de cloroplastos nas células com maior atividade metabólica durante o desenvolvimento inicial, e ocorreu intensa acumulação de cloroplastos nas células clorofiladas, porém em baixíssima quantidade nas células rizoidais (Fig. 05e-h).

Foi possível visualizar em todos os tratamentos esporos aparentemente não germinados, sem a abertura da fissura (dados não mostrados). Observou-se a autofluorescência da parede dos esporos (cor verde) devido à natureza bioquímica da esporopolenina.

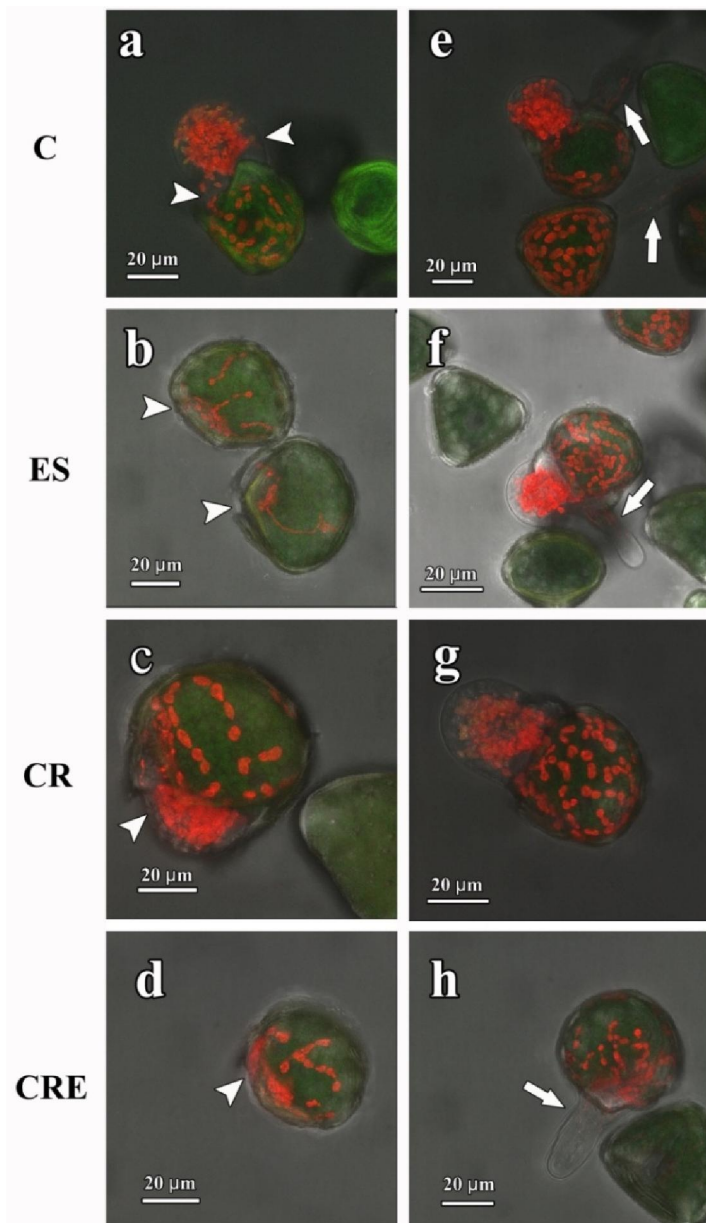


Figura 05 – Microscopia Confocal de Varredura a Laser de esporos de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae), após 6

dias. Nas figuras **a-d** observa-se cloroplastos autofluorescentes próximos à região da divisão celular (**cabeças de setas**), e também distribuídos no interior das células clorofiladas. Nas figuras **e-h** nota-se grande concentração de cloroplastos nas células protonemais, e em menor quantidade nas células rizoidais (**setas**). Observação da autofluorescência da parede dos esporos (**verde**) e dos cloroplastos (**vermelho**). **C**: esporos controle; **ES**: esporos esterilizados superficialmente; **CR**: esporos não esterilizados superficialmente e criopreservados; **CRE**: esporos esterilizados superficialmente e criopreservados.

As análises de MET aos 6 dias após a inoculação em meio de cultivo mostram em detalhes a espessa exina da parede do esporo, bem como a célula protalial dos gametófitos filamentosos em início de desenvolvimento, não sendo evidenciadas alterações estruturais entre os tratamentos (Fig. 06). O esporo de *D. sellowiana* apresenta uma exina espessa, ornamentada com granulações eletrondensas presentes na superfície externa da parede, além de um citoplasma com grande quantidade de corpos de lipídios.

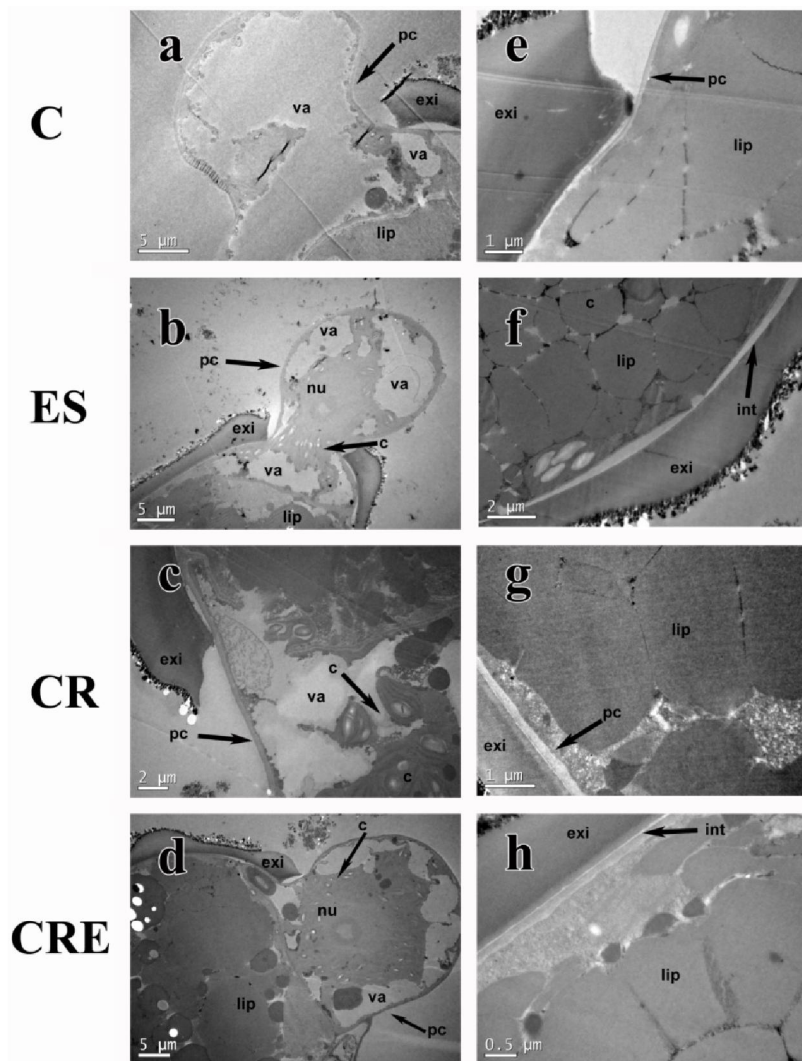


Figura 06 – Microscopia Eletrônica de Transmissão de esporos germinados de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) após 6 dias. **a-d**: Visão geral do esporo germinado; **e-h**: Detalhe da estrutura da parede do esporo e das substâncias de reserva em seu interior. Legenda das imagens: pc=parede celular; va=vacuólo; exi=exina, lip=corpos lipídicos; nu=núcleo; c=cloroplasto; int=intina. **C**: esporos controle; **ES**: esporos esterilizados superficialmente; **CR**: esporos não esterilizados superficialmente e

criopreservados; **CRE**: esporos esterilizados superficialmente e criopreservados.

A ultraestrutura das células dos gametófitos filamentosos com 6 dias não diferiu entre os tratamentos, como pode ser visto, em razão das similaridades de sua estrutura, pela distribuição e integridade de organelas em cada tratamento (Fig. 07). A parede celular parece apresentar o mesmo espessamento em todos os tratamentos (Fig. 07a-d). Nota-se ainda a presença de vacúolos com material eletrondenso em seu interior (Fig. 07e-h), possivelmente originários da célula original do esporo, bem como cloroplastos com tilacóides bem organizados e geralmente armazenando grãos de amido (Fig. 07i-l). É possível ainda observar mitocôndrias, corpos de Golgi e retículos endoplasmáticos rugosos, indicando intensa atividade da célula (Fig. 07c,f,h,j,k).

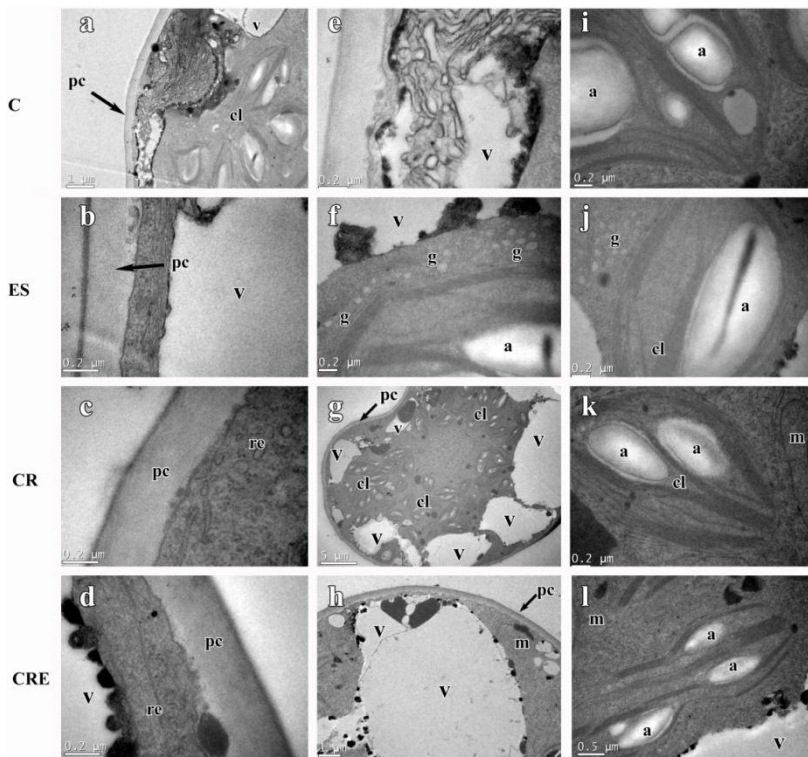


Figura 07 – Microscopia Eletrônica de Transmissão da célula protalial clorofilada de esporos de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) após 6 dias. **a-d**: Detalhe da parede celular (**pc**); **e-h**: Detalhe da célula com os vacúolos (**v**) contendo material eletrondenso em seu interior; **i-l**: Detalhe dos cloroplastos (**cl**) evidenciando grãos de amido e tilacóides bem organizadas. Nota-se a presença de retículos endoplasmáticos rugosos (**re**) próximos à parede celular (07d), corpos de golgi (**g**) próximos à vacúolos e cloroplastos (07f,j), grãos de amido em cloroplastos (**a**) e mitocôndrias (**m**) pelo citoplasma (07h,k,l). **C**: esporos controle; **ES**: esporos esterilizados superficialmente; **CR**: esporos não esterilizados superficialmente e criopreservados; **CRE**: esporos esterilizados superficialmente e criopreservados.

Decorridos 72 dias do experimento, gametófitos do tratamento controle apresentavam estruturas reprodutivas, e aos 90 dias todos os

tratamentos tinham a presença de gametângios visíveis através de microscopia de luz (Fig. 08a-d) e de microscopia eletrônica de varredura, com a visualização dos arquegônios (Fig. 08e-h).

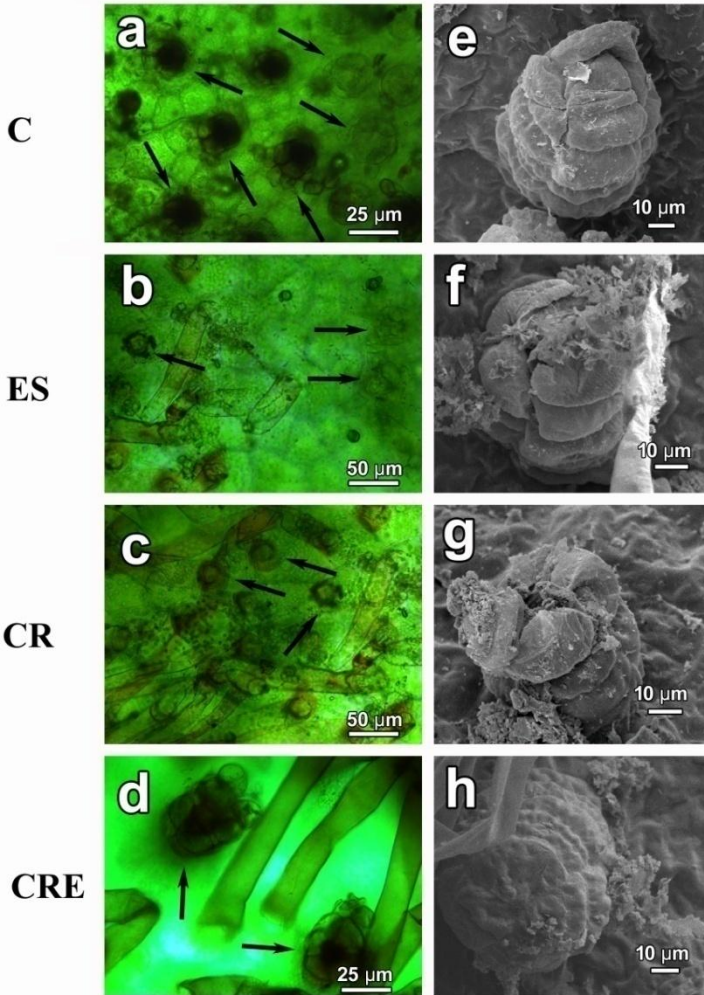


Figura 08 – Microscopia de Luz (a-d) e Microscopia Eletrônica de Varredura (e-h) de gametófitos cordiformes de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) com 90 dias. Detalhes de

arquegônios localizados na face abaxial (**setas**). **C**: esporos controle; **ES**: esporos esterilizados superficialmente; **CR**: esporos não esterilizados superficialmente e criopreservados; **CRE**: esporos esterilizados superficialmente e criopreservados.

4 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo confirmam que a criopreservação mantém a viabilidade dos esporos de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae), corroborando com os estudos de Rogge *et al.* (2000). No entanto, Rogge *et al.* (2000) não analisaram os efeitos da criopreservação dos esporos no desenvolvimento gametofítico ou esporofítico dessa importante espécie da flora da América do Sul, ameaçada de extinção (MMA, 1998). Esse método também é eficiente para a conservação de esporos aclorofilados de diversas espécies de samambaias, (AGRAWAL *et al.*, 1993; PENCE, 2000; BRUM & RANDI, 2006; BALLESTEROS *et al.*, 2012).

A esterilização superficial de esporos de samambaias é um procedimento utilizado em estudos de germinação para eliminar ou reduzir a contaminação por fungos e bactérias (RENNER & RANDI, 2004; DE BRUM & RANDI, 2006; BEGNINI & RANDI, 2009; VIVIANI *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2009; BARNICOAT *et al.*, 2011; VARGAS & DROSTE, 2014). Observou-se neste trabalho que a esterilização superficial inibiu parcialmente a germinação em comparação à germinação de esporos controle, não esterilizados, o que já foi também verificado em outros estudos (HAMILTON & CHAFFIN, 1998; SIMABUKURO *et al.*, 1998; CAMLOH, 1999). A cultura de esporos não esterilizados também simplifica os processos de propagação, tornando-os mais acessíveis e simples de executar, para estabelecer plântulas de *D. sellowiana*. Mikula *et al.* (2009) criopreservaram esporos de *Cyathea australis* Domin. (Cyatheaceae) por 24 horas e verificaram que a média de germinação não sofreu alterações após a criopreservação, mas quando os esporos foram previamente esterilizados, houve uma grande perda de viabilidade. Camloh (1999) cultivou esporos de *Platyserium bifurcatum* (Cav.) C. Chr.

(Polypodiaceae) armazenados por longos períodos e observou um decréscimo de 40% na germinação quando previamente esterilizados, e quando armazenados sem esterilização a germinação ocorreu normalmente. Ainda assim, a esterilização superficial de esporos de samambaias é o método mais seguro quando se deseja uma cultura de gametófitos sem contaminações ou com baixa contaminação (SIMABUKURO *et al.*, 1998; CAMLOH, 1999).

A imersão de esporos sem crioprotetores em NL como foi utilizado neste trabalho, também já foi utilizada com sucesso em outros trabalhos (AGRAWAL *et al.*, 1993; PENCE, 2000; ROGGE *et al.* 2000). O principal risco da técnica de resfriamento rápido é a formação de cristais de gelo intracelularmente, que podem danificar a célula, inviabilizando a técnica (MROGINSKI *et al.*, 1993), o que não ocorreu em *D. sellowiana* possivelmente por que esporos aclorofilados, em geral, possuem baixíssimo conteúdo relativo de água (DYER, 1979). As análises de microscopia confocal não demonstraram alterações entre os tratamentos, mas a partir das autofluorescências da parede do esporo e dos cloroplastos pôde-se identificar esporos não germinados e gametófitos em diferentes fases do desenvolvimento, diferenciando-os pelo número de células e pelo acúmulo de cloroplastos. As imagens de MET demonstraram que não houve danos ultraestruturais em nenhum dos tratamentos e a organização sub-celular foi semelhante, não tendo sido observada nenhuma anomalia nas organelas de nenhum dos tratamentos. A comparação do desenvolvimento gametofítico foi sincrônica entre todos os tratamentos e obedeceu ao mesmo padrão encontrado por Suzuki (2003) para esta espécie, demonstrando a eficiência do método da criopreservação em preservar as características fenotípicas.

Neste estudo verificamos que a criopreservação não alterou a germinação de esporos não esterilizados de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae), assim como Mikula *et al.* (2009) em estudos com esporos de *Cyathea australis* Domin. (Cyatheaceae), uma samambaia arbórea ameaçada de extinção na Tasmânia. Li *et al.* (2010) trabalharam com três espécies de *Alsophila* (Cyatheaceae) ameaçadas na China, e constataram que a criopreservação de esporos é mais eficaz em manter a viabilidade que a armazenagem sob 4° ou -18°. Entretanto, há trabalhos que relacionam uma aceleração na germinação e desenvolvimento inicial após a criopreservação (ROGGE *et al.*, 2000; RENNER & RANDI, 2004; FILIPIN *et al.*, 2016). Rogge *et al.* (2000) trabalhando com germinação “*in vitro*” de esporos criopreservados de *D. sellowiana* em meio com adição de sacarose, verificaram um aumento na

germinação destes esporos, o que não foi verificado neste trabalho, possivelmente porque os parâmetros de esterilização e de cultura tenham sido diferentes neste estudo.

Morfológicamente neste trabalho houve apenas sutis diferenças no acúmulo de material na parede dos esporos submetidos à esterilização, observadas pelo MEV. Os esporos de *Dicksonia sellowiana* Hook. são tetraédricos, possuem lobos proeminentes com uma grande depressão entre os braços da fissura, que possui aproximadamente $\frac{3}{4}$ do raio do esporo. A camada mediana do esporo (exina) é até três vezes mais espessa que a interna (intina), e sua superfície possui granulações apresentando pequenas perfurações. Não foi possível identificar claramente a presença da camada mais externa da parede do esporo (perina) neste trabalho, possivelmente em função do atrito gerado pelo processo de obtenção dos esporos, mas a perina geralmente é formada por uma camada transparente, com deposição de material granuloso em seu exterior (COELHO & ESTEVES, 2008).

A viabilidade dos esporos criopreservados também pode ser comprovada pela análise ultraestrutural, onde nenhuma alteração foi observada na parede celular e no interior do citoplasma que apresentou organelas celulares íntegras. Este resultado também foi observado por Filipin et al.(2016) em esporos de *Pleopeltis lepidopteris* De La Sota (Polypodiaceae) criopreservados. Estes autores também destacam a presença de grande quantidade de corpos de lipídios como material de reserva no interior dos esporos, corroborando ao nosso estudo em que também foram observados inúmeros corpos de lipídios e proteínas no esporo. Esse material de reserva também foi visualizado no interior dos vacúolos da célula protalial do gametófito filamentoso. Segundo Raghavan (1989), a hidrólise desse material de reserva é que gera a energia para a germinação.

Os apontamentos dados por este trabalho evidenciam que a criopreservação mantém a viabilidade e o vigor de esporos de *D. sellowiana*, e ainda permite o desenvolvimento gametofítico normal, com o surgimento de gametângios, mantendo a integridade fenotípica do material criopreservado, atendendo aos requisitos de programas de conservação de germoplasma (HARDING *et al.*, 1997; BENSON *et al.*, 1998). Com isso podemos garantir informações para subsidiar projetos de conservação desta espécie em bancos de germoplasma, ajudando assim a evitar sua extinção.

5 CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste trabalho nos permitem concluir que a criopreservação de esporos de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) em nitrogênio líquido é um método adequado para a conservação “*ex situ*” dessa espécie, uma vez que foi possível verificar que não houve alterações morfológicas ou ultraestruturais em esporos criopreservados, os quais germinaram e se desenvolveram de acordo com o tratamento controle, atestando a eficiência do método de criopreservação de esporos desta espécie, conforme descrito por Rogge *et al.* (2000).

Capítulo 2 – Aspectos da fotossíntese de gametófitos e esporófitos jovens de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) provenientes de esporos submetidos à criopreservação em nitrogênio líquido.

RESUMO

A Mata Atlântica é um bioma brasileiro ameaçado pela perda de biodiversidade em decorrência da intensa exploração florestal, desmatamento, agropecuária e fragmentação das florestas nativas. *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) é uma samambaia arbórea ameaçada de extinção, que ocorre em floresta ombrófila mista, na Mata Atlântica. Esta samambaia apresenta potencial paisagístico e farmacêutico. A criopreservação é uma opção de conservação “*ex situ*” para proteger e conservar o patrimônio genético de espécies nativas ameaçadas e espécies de interesse comercial, sendo fundamental a prospecção de informações que subsidiem os protocolos de conservação e propagação desta espécie. Com o objetivo de verificar se esporos criopreservados e/ou esterelizados causam algum comprometimento ao estabelecimento de plântulas, utilizamos gametófitos cultivados há 100 dias, a partir de esporos controle (C), esporos esterilizados superficialmente (ES), esporos não esterilizados superficialmente e criopreservados (CR) e esporos esterilizados superficialmente e criopreservados (CRE) de *D. sellowiana*. Gametófitos e esporófitos de todos os tratamentos foram analisados quanto ao seu percentual de formação de esporófitos, seu Índice de Velocidade de Emergência (IVE), crescimento em altura (TCR) e tiveram seus padrões fotossintéticos comparados através de curvas rápidas de luz (CRL's), intensidade de fluorescência (IntDen), e quanto à concentração de clorofilas. Isto nos permitiu verificar que os esporófitos provenientes de criopreservação com prévia esterilização apresentaram maior percentual de formação de esporófitos e maior IVE. Além disso, observaram-se diferenças nos padrões fotossintéticos entre gametófitos e esporófitos. Estes resultados demonstram a eficiência do método de criopreservação aqui proposto em estabelecer esporófitos saudáveis e com vigor, fornecendo informações eficazes e com baixo grau de complexidade, para protocolos de conservação em germoplasma, bem como para projetos de conservação e reintrodução em ambiente natural.

Palavras-chave: Curvas Rápidas de Luz – Densidade Integrada de Fluorescência –Esporófitos – Pigmentos Fotossintéticos –Samambaias Aborescentes

ABSTRACT

The Atlantic Forest is a Brazilian biome threatened by the loss of biodiversity due to intense forest exploitation, deforestation, agriculture and the fragmentation of native forests. *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) is a tree fern threatened with extinction, occurring in mixed ombrophilous forest in the Atlantic Forest. This fern presents landscape and pharmaceutical potential. Cryopreservation is an “*ex situ*” conservation option to protect and conserve the genetic patrimony of endangered native species and species of commercial interest, and it is fundamental to prospect for information that supports the conservation and propagation protocols of this species. In order to verify if cryopreserved and / or sterilized spores cause some compromise to the establishment of seedlings, we used gametophytes grown 100 days ago, from control spores (C), surface sterilized spores (ES), surface non - sterilized spores and cryopreserved spores CR) and surface sterilized and cryopreserved spores (CRE) by *D. sellowiana*. Gametophytes and sporophytes of all treatments were analyzed for their percentage of sporophyte formation, their Index of Emergency Speed (IVE), growth in height (TCR) and had their photosynthetic patterns compared through fast light curves (CRLs) Integrated Fluorescence Density (IntDen), and the concentration of chlorophylls. This allowed us to verify that sporophytes from cryopreservation with previous sterilization had a higher percentage of sporophyte formation and higher IVE. In addition, differences in photosynthetic patterns between gametophytes and sporophytes were observed. These results demonstrate the efficiency of the cryopreservation method proposed here in establishing healthy and vigorous sporophytes, providing effective and low complexity information for conservation protocols in

germplasm, as well as for conservation and reintroduction projects in the natural environment.

Keywords: Arborescent Ferns – Integrated Fluorescence Density - Photosynthetic Pigments – Rapid Light Curves – Sporophytes

1 INTRODUÇÃO

Dicksonia sellowiana Hook. (Dicksoniaceae) é uma samambaia arborescente ameaçada de extinção (MMA, 1998) devido à extensiva extração de seu tronco, fibroso e denso, ideal para o cultivo de orquídeas (SILVA, 1986) e muito utilizado para a confecção de vasos, ou ainda para a produção de substrato. Pode ser encontrada desde o sul do México e América Central, na Colômbia, Venezuela, Peru, Bolívia, Paraguai, Argentina, Uruguai e Brasil, geralmente em regiões de maior altitude, geralmente acima de 60 m do nível do mar (SEHNEM, 1978; TRYON & TRYON, 1982). No Brasil *D. sellowiana* ocorre na Mata Atlântica, um ecossistema brasileiro que tem sofrido intensa degradação nas últimas décadas devido à exploração florestal e ocupação urbana, e por isso esta espécie consta no Livro Vermelho da Flora do Brasil (PILATTI *et al.*, 2011; MARTINELLI & MORAES, 2013).

O estabelecimento de bancos de germoplasma para armazenamento de espécies ameaçadas é uma estratégia fundamental para garantir a manutenção destas espécies (PENCE, 2000; HIGA *et al.*, 2011; PILATTI *et al.*, 2011; HARDING *et al.*, 2013). Recentes trabalhos confirmam que a *D. sellowiana* possui potencial também para a indústria farmacêutica, por apresentar compostos que podem ser utilizados na produção de medicamentos para asma, hipertensão e doenças dermatológicas (RATTMANN *et al.*, 2009, 2011, 2012). Para isto é imprescindível o desenvolvimento de protocolos de conservação e propagação que garantam não apenas a manutenção, mas a viabilidade e o vigor do patrimônio genético, logrando êxito na reintrodução em ambiente natural, sendo necessário avaliar quaisquer efeitos indesejáveis advindos dos métodos de conservação (SIMABUKURO *et al.*, 1998).

A criopreservação de esporos em nitrogênio líquido pode ser uma forma eficiente de conservação (BENSON *et al.*, 1998; PENCE, 2000; BALLESTEROS *et al.*, 2012), em especial para espécies ameaçadas como *D. sellowiana*. Esporos aclorofilados de samambaias podem ser armazenados em nitrogênio líquido (AGRAWAL *et al.*, 1993; SIMABUKURO *et al.*, 1998; PENCE, 2000; ROGGE *et al.*, 2000; DE BRUM & RANDI, 2006; BALLESTEROS & WALTERS, 2007; RECHENMACHER *et al.*, 2010; BALLESTEROS *et al.*, 2012; FILIPIN *et al.*, 2016) e geralmente toleram dessecação como sementes ortodoxas (BALLESTEROS & WALTERS, 2007; PENCE, 2008; BARNICOAT *et al.*, 2010). Rogge *et al.* (2000) criopreservaram esporos de *D. sellowiana* durante 90 dias em nitrogênio líquido, sem a necessidade de adição de crioprotetores. No entanto, as autoras não observaram os efeitos da criopreservação no estabelecimento de esporófitos.

A propagação de samambaias por meio de germinação de esporos tem sido amplamente estudada nos últimos anos (SIMABUKURO *et al.*, 1998; ARENS, 2001; RANIL *et al.*, 2010; RECHENMACHER *et al.*, 2010; MARTÍNEZ *et al.*, 2014; MIKULA *et al.*, 2015; FILIPIN *et al.*, 2016). Entretanto, estes estudos se dedicaram somente à fase inicial de germinação, com poucos estudos sobre o início da fase esporofítica (BERNABE *et al.*, 1999; HIENDLMEYER & RANDI, 2007; PENCE, 2015). As samambaias possuem alternância de ciclos de vida e assim, padrões fisiológicos distintos entre as fases gametofítica e esporofítica. Bernabe *et al.* (1999) estudaram o crescimento de esporófitos jovens de *Alsophila firma* (Baker) D.S.Conant (Cyatheaceae) quanto à condições de luminosidade em interior e borda de floresta e observaram que as condições ideais de luminosidade para gametófitos são diferentes para esporófitos jovens, uma vez que gametófitos daquela espécie necessitam de ambientes úmidos e sombreados para se desenvolver, enquanto ambientes mais iluminados levaram a um maior crescimento de esporófitos. Hiendlmeyer & Randi (2007; 2010) observaram a germinação e a formação de esporófitos em quatro espécies de samambaias, sendo duas espécies arbóreas, porém, tal como Bernabe *et al.* (1999), não utilizaram esporos criopreservados. Suzuki *et al.* (2005) acompanharam a formação de esporófitos de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) e observaram o surgimento dos primeiros indivíduos aos 84 dias após a germinação, e ainda estimaram o crescimento médio mensal em 0,225 cm/mês sob 10% de luz solar, porém também não foram utilizados esporos criopreservados.

Estudos que observem efeitos de longo prazo em samambaias submetidas à estresses pré-germinativos são escassos. Pence (2015) acompanhou a formação de esporófitos obtidos a partir de esporos criopreservados de *Asplenium scolopendrium* var. *americanum* Kartesz & Ghandi (Aspleniaceae) durante 46 meses, porém não verificou a fisiologia destes esporófitos.

Em relação aos parâmetros fotossintéticos há poucos estudos com gametófitos de samambaias provenientes de criopreservação (FILIPIN *et al.*, 2016) e especificamente sobre a transição para a fase esporofítica são inexistentes. No estudo de Filipin *et al.*, 2016 não foram observadas diferenças nos pigmentos fotossintéticos, mas gametófitos provenientes de esporos criopreservados apresentaram maior F_v/F_m que os esporos controle. Para esporófitos maduros, os parâmetros fotossintéticos foram analisados somente em estudos com estresses hídricos ou radiação ultravioleta (MINARDI *et al.*, 2014; VOYTENA *et al.*, 2014), não sendo encontrado na literatura nenhum estudo sobre os parâmetros fotossintéticos em esporófitos provenientes de esporos criopreservados.

Assim, este estudo complementa a compreensão sobre a fisiologia da fase esporofítica de *D. sellowiana* a partir de esporos criopreservados, e de forma inédita fornece um panorama de longo prazo do desenvolvimento desta espécie após armazenamento criogênico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As etapas da metodologia aqui descritas se deram a partir da execução das análises descritas no organograma da Figura 01, em que a partir da germinação os esporos se desenvolvem até a fase reprodutiva, ocasião em que se iniciam as análises deste trabalho, que ampliam a compreensão da fotossíntese em gametófitos na fase reprodutiva e em esporófitos jovens, por meio de análises com Fluorímetro de Pulso Modulado (PAM), Conteúdo de Clorofilas Totais e Intensidade de Fluorescência por Área, através de imagens de Microscopia Confocal. Observar e comparar a formação de esporófitos, e ainda o crescimento de esporófitos complementam esta análise sobre a fisiologia de gametófitos em fase reprodutiva e esporófitos jovens de *D. sellowiana*

submetidos à criopreservação por imersão direta de seus esporos previamente esterilizados superficialmente ou não.

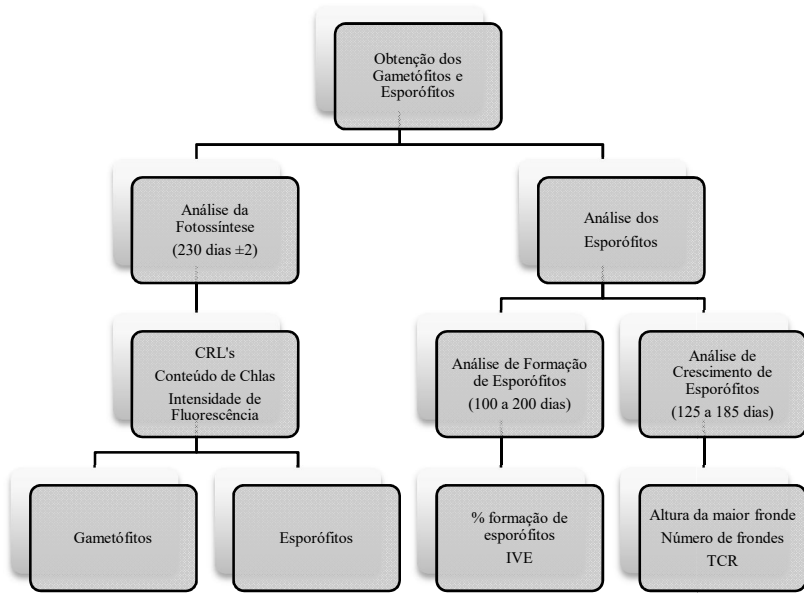


Figura 01 – Organograma das análises de estabelecimento de esporófitos e fotossíntese de gametófitos e esporófitos de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae). SIGLAS: CRL's=Curvas Rápidas de Luz; IVE=Índice de Velocidade de Emergência; TCR=Taxa de Crescimento Relativo

2.1 Obtenção dos gametófitos e esporófitos jovens de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) através do cultivo de esporos

As etapas que permitiram obter os gametófitos e esporófitos jovens utilizados neste estudo seguiram os mesmos procedimentos já relatados nos itens 2.1 a 2.7 do capítulo 1.

2.2 Análises de estabelecimento e crescimento de esporófitos de *D. sellowiana*

2.2.1 Curvas de formação de esporófitos

Aos 95 dias de cultivo (10 de julho de 2016), quando gametângios foram observados em todos os tratamentos, foi realizada uma repicagem aleatória de 200 gametófitos de cada tratamento para quatro bandejas transparentes de polietileno (n=4), contendo o mesmo substrato utilizado anteriormente (sem o tecido entretela), sendo transplantados 50 gametófitos por bandeja para avaliar a porcentagem de formação de esporófitos. O aparecimento de esporófitos foi analisado a cada 5 dias, a fim de se obter o percentual de formação de esporófitos para cada tratamento (VIVIANI, 2007 adaptado).

2.2.2 Índice de Velocidade de Emergência (IVE) de Esporófitos

A velocidade de emergência de esporófitos foi verificada pela expressão proposta por Maguire (1962), a seguir:

$$IVE = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \dots + \frac{G_n}{N_n}$$

Onde:

G = número de esporófitos formados/estabelecidos na 1ª contagem, nas subsequentes até a última contagem.

N = número de dias decorridos desde a inoculação na 1ª contagem, e nas subsequentes até a última contagem.

2.2.3 Taxa de Crescimento Relativo (TCR) de Esporófitos

Para a análise do crescimento foram utilizados 20 esporófitos de cada tratamento, obtidos a partir da metodologia já mencionada em 2.2.1 e após 125 dias de cultivo, transferidos individualmente para mini-vasos de 125 ml de volume com o mesmo substrato já utilizado, em delineamento completamente casualizado. Os mini-vasos foram acondicionados em caixas de polietileno transparente com tampa, do tipo confeitaria, para evitar seu dessecação (VIVIANI, 2007). A taxa de crescimento relativo (TCR) foi calculada de acordo com a equação: $(\log_{10} L_2 - \log_{10} L_1) / t_2 - t_1$ onde L_1 é o logaritmo decimal da altura da fronde no tempo 1 e L_2 é o logaritmo decimal da altura da fronde no tempo 2 (BERNABE *et al.*, 1999). O tempo 1 (t_1) foi o dia da primeira aferição, com a implantação do experimento, e o tempo 2 (t_2) foi definido pela avaliação seguinte após 60 dias. De cada indivíduo foi analisado o número de frondes por planta e altura da maior fronde.

2.3 Análises de Parâmetros Fotossintéticos de Gametófitos Cordiformes e Esporófitos Jovens de *D. sellowiana*

2.3.1 Análise da autofluorescência dos cloroplastos através de imagens de microscopia confocal de varredura à laser

Amostras de gametófitos em fase reprodutiva e de esporófitos jovens (230 dias) foram analisadas em microscopia confocal de varredura a laser (Leica TCS SP-5, Wetzlar, Alemanha) para os registros fotográficos da autofluorescência dos cloroplastos e posterior quantificação da densidade integrada de fluorescência, que é a intensidade de fluorescência por área, com o software ImageJ, versão 1.5i.

As amostras de todos os tratamentos foram depositadas em lâminas seladas com esmalte e previamente aclimatadas por 30 minutos ao escuro completo. A excitação das células foi feita pelo laser 488 nm, e os espectros de emissão entre 600 nm a 750 nm. As imagens foram processadas através do programa LAS AF-Lite (Leica). Foram utilizados quatro gametófitos e quatro esporófitos de cada tratamento.

Em cada indivíduo analisado foi estabelecida uma área elíptica na margem, abrangendo um cloroplasto, e desta área foi mensurada a intensidade de fluorescência, repetindo-se este procedimento em dez pontos de cada indivíduo, perfazendo 40 análises por tratamento (FILIPIN *et al.*, 2016 modificado).

As amostras foram fotografadas no microscópio Leica HCX PLAPO lambda, com objetiva 63x/1,4-0,6 em óleo de imersão, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) – UFSC.

2.3.2 Parâmetros fotossintéticos através da Fluorescência da Clorofila *a*

As amostras de gametófitos com gametângios e esporófitos jovens (230 dias) de todos os tratamentos foram previamente aclimatadas por 30 minutos ao escuro completo. A emissão da fluorescência da clorofila *a* foi mensurada através de um fluorímetro de pulso com amplitude modulada (Junior PAM, Walz, Effeltrich, Germany) equipado com uma fibra ótica de 1,5 mm de diâmetro e um diodo azul (465nm) como fonte de luz.

Utilizando o método do pulso de saturação de luz foram obtidas medidas da fluorescência emitidas pelos gametófitos e esporófitos em diferentes estados fisiológicos, levando em consideração os valores que seguem (WHITE & CRITCHLEY, 1999; MAXWELL & JOHNSON, 2000; BAKER, 2008): F , F_0 (fluorescência da amostra aclimatada às condições de claro e escuro, respectivamente); F_m , F_m' (fluorescência máxima após aclimação ao escuro e ao claro, respectivamente). Os dados obtidos foram posteriormente utilizados para calcular os parâmetros fotoquímicos e não-fotoquímicos. Para estas análises foram utilizadas 4 réplicas de cada tratamento, sendo que três curvas rápidas de luz foram feitas em amostras independentes de cada tratamento, totalizando 12 curvas por tratamento ($n=12$). Utilizando-se a opção “Rapid Light Curve” (RLC), as curvas de luz foram obtidas com a aplicação de uma série de oito pulsos de luz saturante (LS), cada um deles seguidos de uma exposição de luz actínica (LA) crescente (2-3000 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ RFA) com intervalos de 0,8s (GENTY *et al.*, 1989). Todos os parâmetros foram calculados através do software WinControl (v3.18 - Walz). A área sob as curvas rápidas de luz foi medida permitindo a

comparação destes valores e assim, do padrão fotossintético de cada tratamento.

Para estimar a eficiência fotoquímica máxima calculou-se o rendimento quântico ótimo pela equação F_v/F_m , em que F_m é o valor da fluorescência máxima e F_v é a diferença entre a fluorescência máxima e a fluorescência inicial de planta aclimatada ao escuro. A estimativa da proporção de luz absorvida pela clorofila associada ao PSII que é usada nas reações fotoquímicas, ou rendimento quântico efetivo ($Y(II)$) é obtida pela equação $\Delta F/F_m' = (F_m' - F_t)/F_m'$, onde F_m' é a fluorescência máxima verificada pelos pulsos de saturação e ΔF é a diferença entre F_m' e a fluorescência total.

O excesso de radiação que não é utilizada nos processos fotoquímicos, dissipa-se de duas maneiras, conhecidas como vias de dissipação não-fotoquímicas: $Y(NO)$ é a fração de energia dissipada passivamente na forma de calor ou fluorescência, especialmente quando o PSII está com seus centros de reação fechados e é calculada pela equação $Y(NO) = F/F_m$ onde a fluorescência é dividida pela fluorescência máxima da planta aclimatada ao escuro; $Y(NPQ)$ é a fração de energia dissipada na forma de calor por regulação de mecanismos de fotoproteção e dissipação não-fotoquímica, e pode ser aferido pela fórmula $(F_m - F_m')/F_m'$ onde F_m é a fluorescência máxima da planta aclimatada ao escuro, e F_m' é a fluorescência máxima nos picos de saturação de luz. Assim tem-se que $Y(II)+Y(NO)+Y(NPQ)=1$ (KRAMER *et al.*, 2004; KLUGHAMMER & SCHREIBER, 2008).

2.3.3 Extração e dosagem de Clorofilas *a* e *b*, e Carotenóides

Foram utilizadas três amostras de 100 mg de gametófitos em fase reprodutiva e esporófitos jovens de cada tratamento, para extração e quantificação de clorofilas e carotenóides, conforme Wellburn (1994). As amostras foram colocadas em tubos de ensaio, e acrescidas 3 ml de DMSO (Dimetilsulfóxido), e incubadas à 40°C por 45 min. Em seguida, os extratos foram distribuídos em microplaca de 96 poços (250 µl) e as leituras de absorbância foram realizadas no espectrofotômetro (Multileitora Infinite M200 TECAN), em 480 nm, 649 nm e 665 nm. As

quantificações de clorofilas e carotenóides (n=8) foram realizadas de acordo com as equações estabelecidas por Wellburn (1994):

$$\text{Chla } a = 12.47 * (\text{A665}) - 3.62 * (\text{A649})$$

$$\text{Chla } b = 25.06 * (\text{A649}) - 6.5 * (\text{A665})$$

$$\text{Carotenóides} = ((1000 * \text{A480}) - (1.29 * \text{Chla } a) - (53.78 * \text{Chla } b)) / 220$$

Os resultados foram expressos em $\mu\text{g/g}$ de massa fresca.

2.3.4 Análise estatística

Os resultados obtidos a partir da formação de esporófitos foram primeiramente expressos em porcentagem da média e para cada dia de avaliação foram calculados média e desvio padrão (SOKAL & ROHLF, 1969). Todos os resultados foram analisados pelos testes de normalidade de Shapiro-Wilk, para verificação da homocedasticidade e das variâncias (SANTANA & RANAL, 2004). Os dados que não seguiram a distribuição normal ou não apresentavam homocedasticidade foram transformados em Log 10 e novamente submetidos aos testes de normalidade e homocedasticidade. A comparação dos tratamentos foi efetuada através de análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparação de médias de Tukey (5%), quando normais e homocedásticos (FERREIRA e BORGHETTI, 2009). Os dados que não apresentaram normalidade ou homocedasticidade, mesmo após a transformação logarítmica, foram submetidos ao teste não paramétrico de Freadman (mais de dois tratamentos) (ZAR, 1996; SANTANA & RANAL, 2004). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os resultados foram analisados pelos softwares Excel, R e BioEstat.

Para comparar curvas rápidas de luz quantitativamente, usando estatística paramétrica, serão utilizados parâmetros descritivos como rendimento quântico ótimo (Fv/Fm), taxa de transporte de elétrons (ETR) e dissipação de energia (Y). Esses parâmetros serão calculados pela equação de Platt (PLATT *et al.* 1980) usando o software Win Control 3.0.

3 RESULTADOS

3.1 Análises de estabelecimento e crescimento de esporófitos de *D. sellowiana*

3.1.1 Formação de Esporófitos

Analisando o percentual de formação de esporófitos, os tratamentos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas após 100 dias de cultivo. Mas no decorrer do período experimental pôde-se observar que o tratamento CRE foi o que apresentou maior formação de esporófitos (Fig. 02).

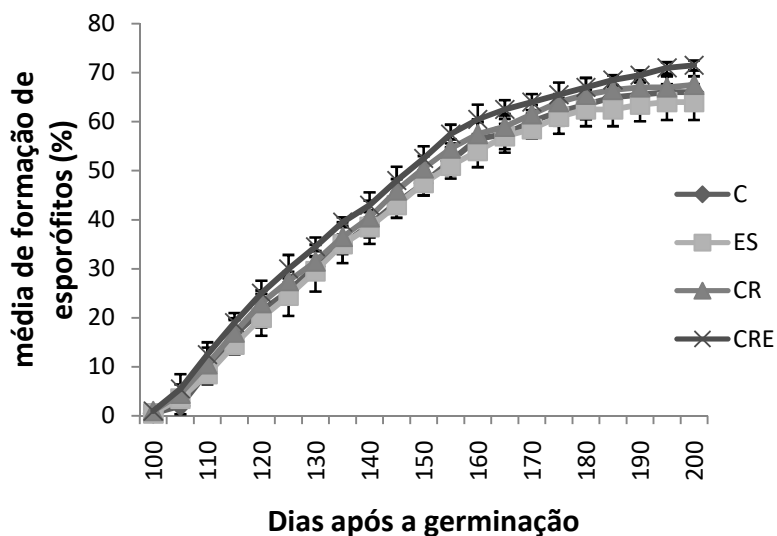


Figura 02 – Curva de formação de esporófitos (%) de *Dicksonia sellowiana* Hook.(Dicksoniaceae). **C**: esporos controle; **ES**: esporos esterilizados superficialmente; **CR**: esporos não

esterilizados superficialmente e criopreservados; **CRE**: esporos esterilizados superficialmente e criopreservados. $p \leq 0,05$. (média \pm DP, $n=200$).

Com relação à velocidade de emergência (Figura 03) nota-se que inicialmente os tratamentos também não apresentaram diferenças. Mas a partir dos 120 dias de cultivo até o final do período experimental (200 dias) o tratamento CRE apresentou sempre maior velocidade de emergência em relação aos demais tratamentos, diferindo estatisticamente do controle. O tratamento ES apresentou menor velocidade de emergência desde os 120 dias e o tratamento CR demonstrou padrão intermediário de velocidade de emergência, sem diferenças estatísticas para nenhum grupo.

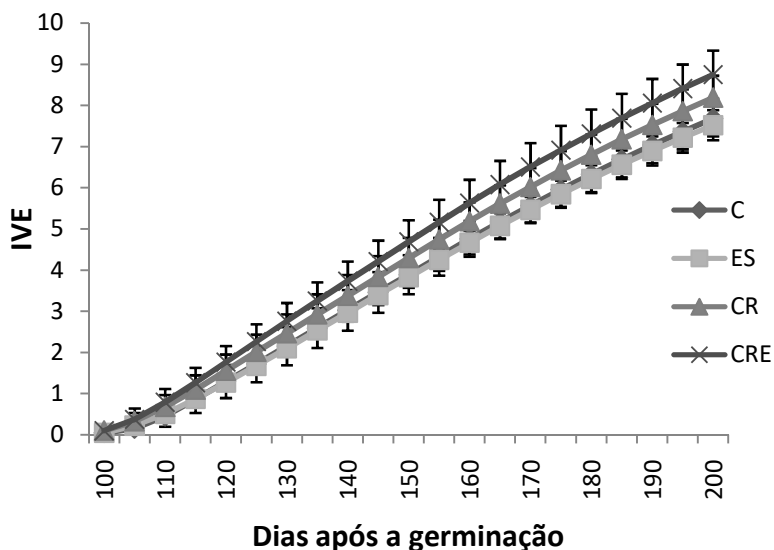


Figura 03 – Índice de Velocidade de Emergência (IVE) de *Dicksonia sellowiana* Hook.(Dicksoniaceae). **C**: esporos controle; **ES**: esporos esterilizados superficialmente; **CR**: esporos não esterilizados superficialmente e criopreservados; **CRE**: esporos esterilizados superficialmente e criopreservados. $p \leq 0,05$. (média \pm DP, $n=200$).

3.1.2 Análise do crescimento de esporófitos

Em relação à comparação da TCR (Tabela 01), não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos, levando em conta os 60 dias analisados. A altura da maior fronde apresentou uma média de 17,95 cm e nenhuma diferença estatística foi observada entre os tratamentos. Verificou-se ainda que todos os tratamentos possuíam em média o mesmo volume de frondes, sem a existência de diferenças estatísticas.

Tabela 01 – Análises do número de frondes por planta e do crescimento em altura de esporófitos de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) após 60 dias de verificação. $p \leq 0,05$ (média \pm DP, n=20). C: esporos controle; ES: esporos esterilizados superficialmente; CR: esporos não esterilizados superficialmente e criopreservados; CRE: esporos esterilizados superficialmente e criopreservados. Letras iguais demonstram que não há diferenças estatísticas.

	C	ES	CR	CRE
Nº Frondes	1,13 \pm 1,06a	0,73 \pm 0,70a	1,67 \pm 0,72a	1,67 \pm 0,98a
Maior Fronde (cm)	17,40 \pm 5,50a	16,80 \pm 2,24a	18,60 \pm 3,09a	19,00 \pm 2,90a
TCR	0,0050 \pm 0,0013a	0,0052 \pm 0,0006a	0,0052 \pm 0,0008a	0,0052 \pm 0,0007a

3.2 Análises da Fotossíntese de Gametófitos e Esporófitos de *D. sellowiana*

3.2.1 Densidade Integrada de Fluorescência

Quando analisados através da microscopia confocal, as amostras de gametófitos dos tratamentos C (Fig. 04a) e CR (Fig. 04c)

apresentaram células com uma aparente maior densidade dos cloroplastos em relação aos tratamentos ES (Fig. 04b) e CRE (Fig. 04d), os quais apresentaram regiões sem a presença de cloroplastos. Para estes gametófitos, em relação à quantificação da densidade integrada de fluorescência, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos (Fig. 04i). Já as amostras de esporófitos (Fig. 04e-h) apresentaram células com cloroplastos aparentemente menores comparadas aos gametófitos e distribuídos irregularmente pelo citoplasma, sendo que os tratamentos CR e CRE apresentaram um maior espaçamento dos cloroplastos pelo citoplasma. Ao quantificarmos a densidade integrada de fluorescência (Fig. 04j), o tratamento CR apresentou os maiores valores, e os demais tratamentos não diferiram do controle (C).

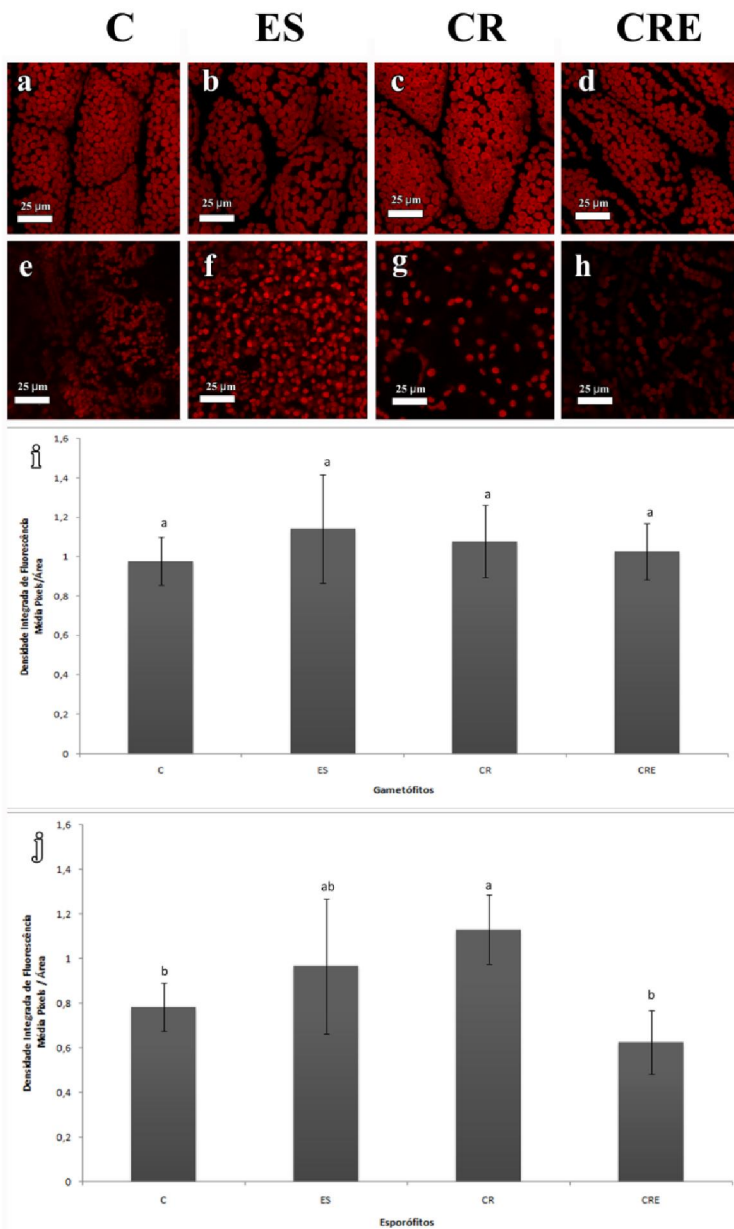


Figura 04 – Microscopia Confocal de Varredura a Laser de gametófitos cordiformes (a-d) e esporófitos jovens (e-h) de

Dicksonia sellowiana Hook. (Dicksoniaceae). Cloroplastos autofluorescentes em vermelho. Média da densidade integrada de autofluorescência (pixels/área) de cloroplastos em gametófitos cordiformes (i) e esporófitos jovens (j). C: esporos controle; ES: esporos esterilizados superficialmente; CR: esporos não esterilizados superficialmente e criopreservados; CRE: esporos esterilizados superficialmente e criopreservados. $p \leq 0,05$ (média \pm DP, n=40).

3.2.2 Parâmetros fotossintéticos através da Fluorescência da Clorofila *a*

Através das curvas rápidas de luz em gametófitos (Fig. 05) observamos a dissipação de energia através dos parâmetros de rendimento quântico ótimo (F_v/F_m), rendimento quântico efetivo ($Y(II)$), dissipação não fotoquímica em fluorescência e calor ($Y(NO)$) e da dissipação não fotoquímica em calor pelos mecanismos de fotoproteção ($Y(NPQ)$). Todos os parâmetros observados em gametófitos cordiformes de *D. sellowiana* ficaram estatisticamente semelhantes ao controle.

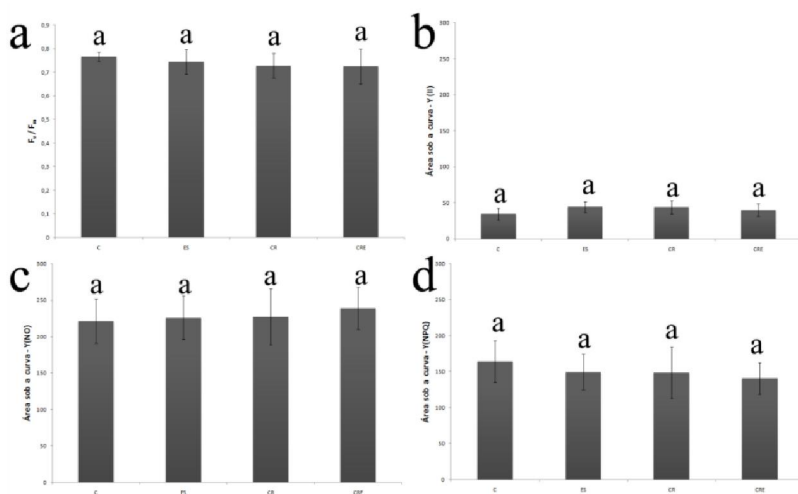


Figura 05 – Curvas Rápidas de Luz de gametófitos cordiformes de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae). Rendimento quântico ótimo (a), absorção da energia pelo PSII (b) e dissipação não-

fotoquímica da energia (c,d) C: esporos controle; ES: esporos esterilizados superficialmente; CR: esporos não esterilizados superficialmente e criopreservados; CRE: esporos esterilizados superficialmente e criopreservados. $p \leq 0,05$ (média \pm DP, n=12).

As curvas rápidas de luz de esporófitos jovens de *D. sellowiana* (Fig. 06), permitiram analisar os mesmos parâmetros fotossintéticos verificados em gametófitos cordiformes. Porém, para esporófitos jovens (Fig. 06a), o rendimento quântico ótimo (F_v/F_m) apontou diferenças entre os tratamentos ES, com o menor e CRE com o maior rendimento quântico ótimo, embora nenhum tratamento tenha diferido significativamente do controle (C). O rendimento quântico efetivo (Y(II)) não apresentou diferenças entre os tratamentos (Fig. 06b), assim como a dissipação não fotoquímica (Y(NO)) relativa aos centros de reação do PSII fechados (Fig. 06c). Quanto à dissipação não fotoquímica em calor pelos mecanismos de fotoproteção (Y(NPQ)), observou-se que o tratamento CRE não diferiu estatisticamente (Fig. 06d) do controle (C), mas apresentou as menores taxas de Y(NPQ), enquanto o tratamento CR apresentou as maiores taxas de Y(NPQ).

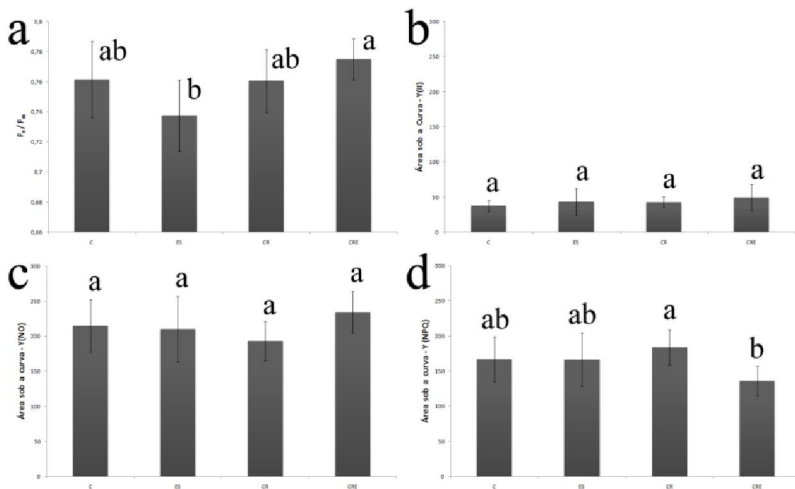


Figura 06 – Curvas Rápidas de Luz de esporófitos jovens de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae). Rendimento quântico ótimo (a), absorção da energia pelo PSII (b) e dissipação não-fotoquímica da energia (c,d) C: esporos controle; ES: esporos

esterilizados superficialmente; **CR**: esporos não esterilizados superficialmente e criopreservados; **CRE**: esporos esterilizados superficialmente e criopreservados. $p \leq 0,05$ (média \pm DP, $n=12$).

3.2.3 Extração e dosagem de Clorofilas *a* e *b* e Carotenóides

Em relação aos teores da clorofila *a* (Fig. 07a), os valores encontrados para gametófitos do tratamento ES foram significativamente menores em relação ao controle (C), enquanto os demais tratamentos foram estatisticamente semelhantes entre estes e entre si. Por outro lado, os teores de clorofila *b* em gametófitos foram significativamente maiores no tratamento ES que nos demais tratamentos, o que se repetiu para as clorofilas totais (Fig. 07a). O balanço das concentrações mostra que é maior a concentração de clorofila *b* nos tratamentos C e ES e o inverso ocorre no tratamento CRE. A razão clorofilas *a/b* em gametófitos foi maior nos tratamentos criopreservados (C-074; ES-050; CR-1,06; CRE-1,13).

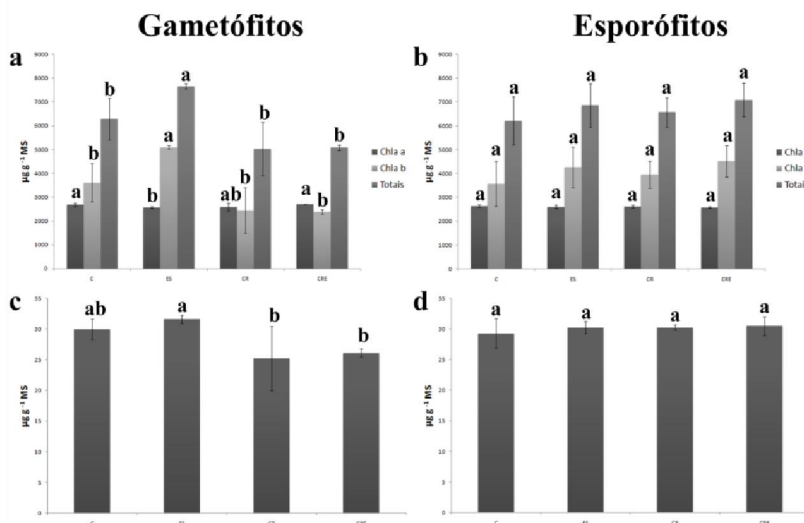


Figura 07 – Teores de clorofilas e carotenóides em *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae). **C**: esporos controle; **ES**: esporos esterilizados superficialmente; **CR**: esporos não esterilizados superficialmente e criopreservados; **CRE**: esporos

esterilizados superficialmente e criopreservados. $p \leq 0,05$ (média \pm DP, $n=8$). Letras diferentes demonstram diferenças significativas entre os tratamentos.

Em esporófitos não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos nos teores de clorofila *a* e clorofila *b*, bem como em clorofilas totais (Fig. 07b). As concentrações de clorofila *b* foram sempre maiores que as de clorofilas *a*. A razão clorofilas *a/b* foi semelhante para todos os tratamentos (CR-0,74; ES-0,61; CR-0,66; CRE-0,57).

Quanto aos teores de carotenóides em gametófitos houve dois grupos distintos estatisticamente, no qual o tratamento ES apresenta maior concentração em oposição aos tratamentos CR e CRE, com as menores concentrações (Fig. 07c). O controle não diferiu de nenhum dos grupos. Em esporófitos não houve diferenças estatísticas (Fig. 07d).

4 DISCUSSÃO

Este estudo confirma, de forma inédita, o estabelecimento de esporófitos jovens de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) saudáveis, obtidos por meio de esporos criopreservados com e sem prévia esterilização superficial, ratificando a eficiência do método de criopreservação de esporos desta espécie, descrito por Rogge *et al.* (2000). Percebeu-se ainda que os gametófitos cordados obtidos de esporos criopreservados previamente esterilizados demonstraram maior velocidade de emergência e maior percentual de formação de esporófitos, o que não havia sido objeto de estudo de Rogge *et al.* (2000). Suzuki *et al.* (2005) estudaram a formação de esporófitos jovens de *D. sellowiana*, mas não a partir de esporos criopreservados, e obtiveram aproximadamente 70% de esporófitos formados após 203 dias de cultivo. A eficácia da criopreservação de esporos aclorofilados de samambaias foi comprovada em diversas espécies (AGRAWAL *et al.*, 1993; PENCE, 2000; BRUM & RANDI, 2006; LI *et al.*, 2010; BALLESTEROS *et al.*, 2012), mas estudos relacionados à efeitos da criopreservação na fase reprodutiva de gametófitos ou sobre a formação de esporófitos jovens não são frequentes (DE BRUM & RANDI, 2006,

PENCE, 2015). Filipin *et al.* (2016) trabalhando com *Pleopeltis lepidopteris* de la Sota (Polypodiaceae) observaram ainda que a criopreservação de esporos recém-coletados em nitrogênio líquido por 4 horas promoveu o crescimento gametofítico e o surgimento de gametângios, mas as autoras não acompanharam o surgimento de esporófitos.

A formação de esporófitos foi estudada por Hiendlmeyer & Randi (2010) em duas espécies de samambaias arbóreas do gênero *Cyathea* (Cyatheaceae) e estas pesquisadoras verificaram que aos 200 dias os percentuais de formação de esporófitos estavam próximos a 70% para *C. delgadii* e 30% para *C. corcovadensis*, sendo que *C. corcovadensis* ainda apresentou valores de frondes por planta significativamente menores, não tendo havido diferenças na TCR ou altura da maior fronde, corroborando ao observado neste estudo. No entanto as autoras não utilizaram plântulas obtidas de esporos criopreservados. Plântulas de *Tabebuia heptaphylla* Toledo (Bignoniaceae) obtidas de sementes criopreservadas em NL não apresentaram diferenças das plântulas do controle (HIGA *et al.*, 2011). Pence (2015) trabalhou com germinação e criopreservação de esporófitos de *Asplenium scolopendrium* var. *americanum* Kartesz & Ghandi (Aspleniaceae) e verificou que os gametófitos cultivados *in vitro* não produziram esporófitos, apenas os gametófitos cultivados em solo, o que ocorreu 6 meses após o transplante (repicagem) e se intensificou a partir do 33º mês, atingindo 74% de esporófitos formados aos 46 meses de acompanhamento.

Com relação à formação de esporófitos jovens de *D. sellowiana* obtidos a partir de esporos germinados, Goller *et al.* (2007) obtiveram esporófitos jovens de *D. sellowiana* 6 meses após a germinação de esporos, sem verificar contudo, aspectos fisiológicos relacionados ao vigor ou percentual de formação de esporófitos. Suzuki *et al.* (2005) estudaram estes aspectos para *D. sellowiana* e averiguaram o surgimento de esporófitos com 84 dias, o que é bem próximo do que encontramos neste estudo, e estimaram ainda o percentual de formação de esporófitos em 84,67% aos 245 dias, considerando que aos 203 dias este percentual era de 70%, o que é também muito próximo do que encontramos, demonstrando que os métodos de criopreservação e propagação empregados neste trabalho são eficazes em manter as características fisiológicas da espécie na germinação, no desenvolvimento gametofítico e no estabelecimento de plântulas saudáveis.

Filipin *et al.* (2016) estudaram a densidade integrada da intensidade de autofluorescência dos cloroplastos em gametófitos de *P. lepidopteris*, cujos esporos foram submetidos à criopreservação, e verificaram maior fluorescência nestes gametófitos em relação aos gametófitos controle. Isto contrasta com o verificado neste estudo, em que não houve diferença na densidade de fluorescência de gametófitos entre os tratamentos. Entretanto, *P. lepidopteris* é uma samambaia de restinga enquanto *D. sellowiana* é uma samambaia com preferência por sub-bosque, o que pode explicar o comportamento distinto da fluorescência destas espécies, ainda que em muitos casos a preferência por sub-bosque possa não estar relacionada a condições de baixa tolerância à irradiação, mas da adaptação à deficiência hídrica no início da germinação (OSPINA *et al.*, 2015). Por outro lado, os esporófitos jovens de *D. sellowiana* do tratamento CR também apresentaram densidade integrada de fluorescência maior, mas os valores obtidos para os esporófitos do tratamento CRE não diferiram dos valores encontrados para os esporófitos do tratamento C, sendo impossível inferir efeitos da criopreservação neste caso. A aferição de parâmetros de fotoinibição ajuda a entender estes diferentes padrões fotossintéticos entre espécies de habitats diferentes, e permite comparar a efetiva capacidade de fotoproteção entre espécies ou entre tratamentos, podendo ser medido pelo método de pulso de saturação com fluorímetro PAM (Walz), que tem sido amplamente utilizado para análises fotossintéticas em plantas pela multiplicidade de parâmetros (KLUGHAMMER & SCHREIBER, 2008).

Dos parâmetros obtidos pelo método de pulso de saturação, o rendimento quântico ótimo (F_v/F_m), que avalia a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II, permite comparar a capacidade de fotoproteção entre os tratamentos e seu decaimento indica a ocorrência de fotodanos (KLUGHAMMER & SCHREIBER, 2008). Filipin *et al.* (2016) estudaram gametófitos cordiformes obtidos de esporos criopreservados de *P. lepidopteris*, que é uma samambaia de restinga e observaram que a criopreservação alterou positivamente o rendimento quântico ótimo, o que não ocorreu para *D. sellowiana*, em que não houve diferenças neste parâmetro. Isto comprova que o método de conservação utilizado em nosso trabalho não altera a capacidade máxima do fotossistema II de gametófitos cordiformes de *D. sellowiana*. Os esporófitos jovens de *D. sellowiana* obtidos de esporos criopreservados também não diferiram do controle, e apresentaram valores de F_v/F_m muito próximos dos observados por Volkova *et al.* (2011) para esporófitos adultos de *Dicksonia antarctica* Labill.

(Dicksoniaceae) e de *Cyathea australis* Domin. (Cyatheaceae). Os parâmetros de dissipação da energia identificam as vias e quantificam a energia empregada em cada uma delas, como o Y(NO) que é parte da energia luminosa dissipada em calor e fluorescência pelos centros de reação fechados, o Y(NPQ) que é a parcela da energia luminosa dissipada em calor como forma de proteção, por vias não fotoquímicas, e o Y(II) que é a parte da energia luminosa absorvida pela clorofila associada ao fotossistema II usada nas reações fotoquímicas (KLUGHAMMER & SCHREIBER, 2008; KRAMER *et al.*, 2004).

Gametófitos de *D. sellowiana* não apresentaram alterações nos parâmetros de dissipação de energia, mas os esporófitos jovens apontaram valores de Y(NPQ) menores para o tratamento CRE, resultando em baixos valores para o rateio Y(NPQ)/Y(NO), o que pode ter ocorrido em virtude deste tratamento ter submetido os esporos aos estresses de esterilização e criopreservação. Estes baixos valores do rateio Y(NPQ)/Y(NO) são percebidos em todos os tratamentos, com maior ênfase em CRE, e também denotam baixa capacidade de fotoproteção, em que altas irradiâncias resultam em fotodanos (KLUGHAMMER & SCHREIBER, 2008), refletindo o padrão fotossintético da espécie que na natureza prefere áreas de sub-bosque. Quanto ao Y(II), os dados não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos para gametófitos cordados ou para esporófitos jovens.

O conteúdo de clorofilas totais em gametófitos evidenciou que os tratamentos criopreservados mantiveram o mesmo padrão verificado para o controle. O tratamento ES apresentou maiores concentrações de clorofilas a que os demais tratamentos. O conteúdo de carotenóides de gametófitos também foi maior no tratamento ES em relação aos tratamentos criopreservados (CR-CRE), mas nenhum tratamento diferiu do controle. Já o conteúdo de clorofilas totais e carotenóides em esporófitos não apresentaram diferença entre os tratamentos. Estudos demonstraram que muitas espécies em condições de estresse mantêm inalterados seus conteúdos de pigmentos, e a variação destas concentrações entre espécies é verificada com maior incidência (SHERWIN & FARRANT, 1998; JADHAV *et al.*, 2011). Rogge *et al.* (2000) verificaram um aumento nas concentrações de clorofilas em gametófitos de *D. sellowiana* conforme a oferta de luminosidade diminui. A razão clorofilas *a/b* em gametófitos e esporófitos jovens de *D. sellowiana* foi menor que o padrão comum em plantas, que é geralmente em torno de 3:1 (VICAS *et al.*, 2010). Essa baixa razão verificada para *D. sellowiana* é característica de plantas sombreadas, aumentando assim os comprimentos de onda que podem ser capturados,

ou podem ainda ser respostas a condições de estresse ou poluição (TRIPATHI & GAUTAM, 2007; SUMANTA *et al.*, 2014). Volkova *et al.* (2009) trabalhando com duas samambaias arbóreas verificaram que a razão de clorofilas *a/b* diminuiu em resposta à exposição por longo prazo à sombra ou oscilações luminosas. As análises realizadas através do conjunto de análises de fotossíntese deste estudo reforçam que as características próprias da espécie, como a adaptação para áreas sombreadas, não sofrem interferência pelo método de criopreservação e propagação propostos.

5 CONCLUSÕES

A partir dos dados apresentados neste trabalho é possível concluir que a conservação de esporos de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) em nitrogênio líquido é um método conveniente para a conservação “*ex situ*” dessa espécie, uma vez que foi possível a obtenção de esporófitos a partir do cultivo de esporos criopreservados, e os parâmetros fisiológicos destes tratamentos não foram inferiores aos do tratamento controle, ratificando a eficiência do método de criopreservação de esporos desta espécie, como descrito por Rogge *et al.* (2000).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A esterilização superficial inibiu parcialmente a germinação em contraste com a criopreservação, e embora estes fatores estressores tenham apresentado valores discrepantes entre si, os valores foram semelhantes estatisticamente ao controle.

A organização sub-celular não sofreu modificações relevantes em nenhum dos tratamentos, e sua organização celular demonstrou organelas íntegras e semelhantes.

Todos os tratamentos apresentaram formação de esporófitos, porém a velocidade de emergência foi maior no tratamento criopreservado esterilizado. Não houve diferenças no crescimento de esporófitos e nem no volume de frondes.

A fotossíntese de gametófitos cordiformes foi semelhante entre os tratamentos, porém os esporófitos provenientes de criopreservação e esterilização demonstraram menor fluorescência, e maior acúmulo de clorofilas *b* em relação à clorofilas *a*, enquanto esporófitos provenientes somente de esterilização ou somente de criopreservação apresentaram padrões semelhantes ao tratamento controle.

O comportamento fisiológico de *D. sellowiana* demonstrou diferentes padrões ao longo do tempo, demonstrando a necessidade de estudos de longo prazo para a verificação e entendimento dos possíveis efeitos estressores ao longo do tempo.

Os apontamentos dados por este trabalho poderiam ser complementados por projetos estudos de proteômica que melhorem o entendimento do comportamento fisiológico desta espécie durante a criopreservação. Em trabalhos futuros, a observação de questões ecológicas relacionadas com a espécie poderiam verificar com maior exatidão as características de adaptação desta com os ambientes sombreados do interior da floresta e encostas úmidas, bem como entender suas preferências relacionadas à altitude e latitude.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrawal, D.C.; Pawar, S.S.; Mascarenhas, A.F.; **Cryopreservation of spores of *Cyathea spinulosa* (Wall. ex Hook) an endangered fern.** *Journal of Plant Physiology*, 142 (1993) 124-126.

Arens, N. C., & Baracaldo, P. S. **Distribution of tree ferns (Cyatheaceae) across the successional mosaic in an Andean cloud forest, Narino, Colombia.** *American Fern Journal*, 60-71, (1998).

Arens, N. C. **Variation in performance of the tree fern *Cyathea caracasana* (Cyatheaceae) across a successional mosaic in an Andean cloud forest.** *American Journal of Botany*, 88 (2001), 545-551.

Baker, N.R.; **Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis *in vivo*.** *Annual Review of Plant Biology*, 59 (2008), 89-113.

Ballesteros, D.; Estrelles, E.; Walters, C.; Ibars, A.M.; **Effect of storage temperature on green spore longevity for the ferns *Equisetum ramosissimum* and *Osmunda regalis*.** *CryoLetters*, 32 (2011), 89-98.

Ballesteros, D.; Estrelles, E.; Walters, C.; Ibars, A.M.; **Effects of temperature and desiccation on *ex situ* conservation of nongreen fern spores.** *American Journal of Botany*, 99 (2012), 721-729.

Ballesteros, D., & Walters, C. **Calorimetric properties of water and triacylglycerols in fern spores relating to storage at cryogenic temperatures.** *Cryobiology*, 55(1), 1-9, (2007).

Barnicoat, H., Cripps, R., Kendon, J., & Sarasan, V. **Conservation in vitro of rare and threatened ferns—case studies of biodiversity hotspot and island species.** *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47(1), 37-45, (2011).

Begnini, R.M.; Randi, A.M.; **Viabilidade de esporos de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Cyatheales, Dicksoniaceae) e *Rumohra adiantiformis* (FORST.) Ching. (Polypodiales, Dryopteridaceae) armazenados sob refrigeração.** *Revista de Botânica*, 38 (2009), 15-27.

Benson, E.E.; Lynch, P.T.; Stacey, G.N.; **Advances in plant cryopreservation technology: current applications in crop plant**

- biotechnology.** Agricultural Biotechnological News Information, 10 (1998), 133-141.
- Bergeron, A., & Pellerin, S. **Pteridophytes as indicators of urban forest integrity.** *Ecological Indicators*, 38, 40-49, (2014).
- Bernabe, N.; Williams-Linera, G.; Palacios-Rios, M. **Tree ferns in the interior and at the edge of a Mexican cloud Forest remant: Spore germination and sporophyte survival and establishment.** *Biotropica*, 31 (1999) 88.
- Bouzon, Z.L.; **Histoquímica e ultra-estrutura da ontogênese dos tetrasporângios de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Rodophyta, Gigartinales).** *Revista Brasileira de Botânica*, 29, (2006), 229-238.
- Bozzola, J.J.; Russel, L.D.; **Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologists.** Boston, Jones and Barlett Publ., (1991) 542.
- Brum, F.M.R.; Randi, A.M.; **Germination of spores and growth of gametophytes and sporophytes of *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Dryopteridaceae) after spore cryogenic storage.** *Revista Brasileira de Botânica*, 29 (2006), 489-495.
- Camloh, M. **Spore age and sterilization affects germination and early gametophyte development of *Platycerium bifurcatum*.** *American Fern Journal*, (1999), 124-132.
- Coelho, C., & Esteves, L. **Morfologia de esporos de pteridófitas do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (São Paulo, Brasil).** *Hoehnea*, (2008), 387-393.
- Cortez, L. **Pteridofitas epifitas encontradas en Cyatheaceae y Dicksoniaceae de los bosques nublados de Venezuela.** *Gayana Botânica*, 58 (2001), 13-23.
- Dyer, A.F.; **The culture of ferns gametophytes for experimental investigation.** In: Dyer, A.F.; *The experimental biology of ferns.* London Academic. (1979) 253-305.
- Fernandes, I.; **Taxonomia dos representantes de Dicksoniaceae no Brasil.** *Pesquisas - Botânica*, 50 (2000), 5-26.

Ferreira, A. G., & Borguetti, F. ***Germinação: do básico ao aplicado.*** Artmed Editora, (2009).

Filipin, E.P.; **Conservação de esporos, germinação e desenvolvimento gametofítico de *Pleopeltis lepidopteris*: análises morfofisiológicas e ultraestruturais.** Florianópolis. Dissertação de Mestrado (Biologia de Fungos, Algas e Plantas), Universidade Federal de Santa Catarina, (2015).

Filipin, E. P., Schmidt, É. C., Barufi, J. B., Bouzon, Z. L., & Randi, Á. M. **The Gametophyte of *Pleopeltis lepidopteris* (Langsd. & Fisch.) de la Sota (Polypodiaceae), a Fern from Restinga, after Spore Cryopreservation: Morphological, Ultrastructural, and Physiological Analyses.** *International Journal of Plant Sciences*, (2016) 177(3), 294-303.

Filipin, E. P., Simioni, C., Schmidt, É. C., & Randi, Á. M. ***Pleopeltis lepidopteris* Langsd. & Fisch.(Polypodiaceae), an endemic fern from Brazilian “restingas”: viability of spores under different storage conditions.** *Brazilian Journal of Botany*, 1-7, (2017). doi:10.1007/s40415-016-0332-5.

Filippini, E.C.P.; Duz, S.R.; Randi, A.M.; **Light and storage on the germination of spores of *Dicksonia sellowiana* (PRESL) Hook., Dicksoniaceae.** *Revista Brasileira de Botânica*, 22 (1999), 21-26.

Fiori, C. C. L., Santos, M., & Randi, Á. M. **Aspects of gametophyte development of *Dicksonia sellowiana* Hook (Dicksoniaceae): an endangered tree fern indigenous to South and Central America.** *American Fern Journal*, 99(3), 207-216, (2009).

Fraga, L. L., Silva, L. B. D., & Schmitt, J. L. **Composition and vertical distribution of epiphytic pteridophytes on *Dicksonia sellowiana* Hook.(Dicksoniaceae), in mixed ombrophylous forest in Southern Brazil.** *Biota Neotropica*, 8 (2008).

Gasper, A. L. D., Sevegnani, L., Vibrans, A. C., Uhlmann, A., Lingner, D. V., Verdi, M., ... & Klemz, G. **Inventory of *Dicksonia sellowiana* Hook. in Santa Catarina.** *Acta Botanica Brasilica*, 25(2011), 776-784.

Genty, B.; Briantais, J.M.; Baker, N.R.; **The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching**

of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990 (1989), 87-92.

Giribaldi, M.; Gény, L.; Delrot, S.; Schubert, A.; **Proteomic analysis of the effects of ABA treatments on ripening *Vitis vinifera* berries.** *Journal of Experimental Botany*, 61 (2010) 2447-2458

Goller, K., & Rybczynski, J. J. **Gametophyte and sporophyte of tree ferns in vitro culture.** *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 76(3), (2007).

Gomes, G.S.; Randi, A.M.; Puchalski, A.; Santos, D.S.; Reis, M.S.; **Variability in the germination of spores among and within natural populations of the endangered tree fern *Dicksonia sellowiana* Hook. (Xaxim).** *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49 (2006), 1-10.

Gordon, E.M.; McCandless, E.L.; **Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse.** In: Harvey, M.J.; McLachlan, J.; (eds.) *Chondrus crispus*. Nova Scotia Institute of Science, Halifax, (1973), 111-133.

Hamilton, R., & Chaffin, C. **The effect of surface sterilization on cultures of *Ceratopteris richardii* gametophytes.** *American Fern Journal*, 81-85, (1998).

Hannickel, A., Silva, M., Barros, H., & Albuquerque, M. **Image J como ferramenta para medida da área de partículas de magnetita em três escalas nanométricas.** *CIT*, 4 (2002), 16-26.

Harding, K.; Benson, E.E.; Clacher, K.; **Plant conservation biotechnology: An overview.** *Agro Food Industry HiTech*, (1997), 25-29.

Harding, K., Benson, E. E., Nunes, E. D. C., Pilatti, F. K., Lemos, J., & Viana, A. M. **Can biospecimen science expedite the ex situ conservation of plants in megadiverse countries? A focus on the flora of Brazil.** *Critical reviews in plant sciences*, 32(6), 411-444, (2013).

Hassell, J. M., Begon, M., Ward, M. J., & Fèvre, E. M. **Urbanization and Disease Emergence: Dynamics at the Wildlife–Livestock–**

Human Interface. *Trends in Ecology & Evolution*, 32(1), 55-67, (2017).

Hiendlmeyer, R., & Randi, A. M. **Response of spores and young gametophytes of *Cyathea delgadii* Sternb.(Cyatheaceae) and *Blechnum brasiliense* Desv.(Blechnaceae) to different light levels.** *Acta bot. bras.*, 21 (2007), 909-915.

Hiendlmeyer, R., & Randi, A. M. **Potential for Spore Germination, Sporophyte Formation and Growth of Young Sporophytes of Four Fern Species from the Atlantic Forest (Brazil).** *American Fern Journal*, 100 (2010), 207-218.

Higa, T. C., Paulilo, M. T. S., Benson, E. E., Pedrotti, Ê., & Viana, A. M. **Developing seed cryobank strategies for *Tabebuia heptaphylla* (Bignoniaceae), a hardwood tree of the Brazilian South Atlantic Forest.** *CryoLetters*, 32(4), 329-338, (2011).

Ibars, A.M.; Estrelles, E.; **Recent developments in *ex situ* and *in situ* Conservation of Ferns.** *Fern Gazette*, 19 (2012), 67-86.

Ingram, J.; Bartels, D.; **The molecular basis of dehydration tolerance in plants.** *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47 (1996) 377-403.

Jadhav, B., Shaikh, S. D., & Dongare, M. **Phytochemical studies in eleven species of ferns from Satara District of Maharashtra (India).** *Recent Research in Science and Technology*, 3(2011).

Kartha, K.K.; **Meristem culture and germoplasm preservation.** In: Kartha, K.K. (Ed.) *Cryopreservation of plant cells and organs.* Boca Ratón, Florida, CRC Press, (1985), 115-134.

Klein, R.M.; **Mapa Fitogeográfico do Estado de Santa Catarina.** *Flora Ilustrada Catarinense*, (1978), 24.

Klughhammer, C., & Schreiber, U. **Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method.** *PAM Application Notes*, 1(2), (2008).

- Kramer, D. M., Johnson, G., Kierats, O., & Edwards, G. E. **New fluorescence parameters for the determination of Q A redox state and excitation energy fluxes.** *Photosynthesis Research*, 79(2), 209-218, (2004).
- Li, Y.; Zhang, Y.L.; Jiang, C.D.; Wang, T.; Wang, Q.; Shi, L.; **Effect of storage temperature on spore viability and early gametophyte development of three vulnerable species of *Alsophila* (Cyatheaceae).** *Austrian Journal Botany*, 58 (2010) 89-96.
- Liu-Smith, F., Krasieva, T. B., Liu, J., Liu, J., & Meyskens Jr, F. L. **Measuring Redox Status of Melanoma Cells.** *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*, (2016).
- Lorenzi, H.; Sousa, H.M.; **Plantas ornamentais no Brasil.** Nova Odessa: Plantarum, (1996) 1-650.
- Lucero, H. A., Patterson, S., Matsuura, S., & Ravid, K. **Quantitative histological image analyses of reticulin fibers in a myelofibrotic mouse.** *Journal of biological methods*, 3 (2016).
- Lynch, P.T.; Benson, E.E.; **Cryopreservation, a method for maintaining the plant regeneration capability of rice cells suspension cultures.** In: Proceedings of the second international rice genetics meeting. IRRI, Los Baños, (1991) 321-332.
- Maguire, J. D. **Speed of germination—aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor.** *Crop science*, 2 (1962), 176-177.
- Martinelli, G., & Moraes, M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro, (2013).
- Martínez, O. G., Tanco, M. E., Prada, C., & Guerra, R. **Gametophytic phase of *Alsophila odonelliana* (Cyatheaceae).** *Nordic Journal of Botany*, 32 (2014), 92-97.
- Martins-Ramos, D., Bortoluzzi, R. L. C., & Mantovani, A. **Plantas medicinais de um remascente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana, Urupema, Santa Catarina, Brasil.** *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 12 (2010), 380-397.

Maxwell, K.; Johnson, G.N.; **Chlorophyll fluorescence: a practical guide**. *Journal of Experimental Botany*, 345 (2000), 659-668.

Mikuła, A., Jata, K., & Rybczyński, J. J. **Cryopreservation strategies for *Cyathea australis* (R. BR.) domin.** *CryoLetters*, 30 (2009), 429-439.

Mikuła, A., Pożoga, M., Tomiczak, K., & Rybczyński, J. J. **Somatic embryogenesis in ferns: a new experimental system.** *Plant cell reports*, 34(5), 783-794, (2015).

Minardi, B. D., Voytena, A. P. L., Santos, M., & Randi, Á. M. **Water stress and abscisic acid treatments induce the CAM pathway in the epiphytic fern *Vittaria lineata* (L.) Smith.** *Photosynthetica*, 52(3), 404-412, (2014).

Ministério do Meio Ambiente; **Primeiro relatório nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica**. Brasília: Brasil, (1998), 1-40.

Mohr, H.; **Die Abängigkeit des Protonemawachstums und der Protonemapolarität bei farmen vom licht.** *Planta*, 47 (1956), 127-156.

Mroginski, L. A., & Scocchi, A. M. **Somatic embryogenesis of Argentine cassava varieties.** *Working Document (CIAT). no. 123*, (1993)

Ospina, K. R., Briones, O., & Pérez-García, B. **Spore germination of three tree fern species in response to light, water potential, and canopy openness.** *American Fern Journal*, 105 (2015), 59-72.

Page, C.N.; Dyer, A.F.; Lindsay, S.; Mann, D.G.; **Conservation of pteridophytes – The *ex situ* approach**. In Ide, J.M.; Jermy, A.C.; Paul, A.M.; [eds.] *Fern horticulture: Past, present and future perspectives*. Intercept, Andover, UK (1992) 268-278.

Pence, V.C.; **Survival of chlorophyllous and nonchlorophyllous fern spores trough exposure to liquid nitrogen.** *American Fern Journal*, 90 (2000), 119-126.

Pence, V. C. **Cryopreservation of bryophytes and ferns.** In *Plant cryopreservation: A practical guide* (pp. 117-140). Springer New York, (2008).

Pence, V. C. **Propagation and Cryopreservation of *Asplenium scolopendrium* var. *americanum*, the American Hart's-Tongue Fern.** *American Fern Journal*, 105 (2015), 211-225.

Pio, C. M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil.** *Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro*, (1931).

Pilatti, F. K., Aguiar, T., Simões, T., Benson, E. E., & Viana, A. M. **In vitro and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil.** *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47 (1), 82-98, (2011).

Platt, T.; Gallegos, C.L.; Harrison, W.G.; **Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton.** *Journal of Marine Research*, 38, (1980), 687-701.

Pryer, K.M.; Schuettpelz, E.; Wolf, P.G.; Schneider, H.; Smith, A.R.; Cranfill, R.B.; **Phylogeny and evolution of ferns (monilophytes) with a focus on the early leptosporangiate divergences.** *American Journal of Botany*, 91 (2004) 1582-1598.

Raghavan, V.; **Developmental biology of fern gametophytes.** Cambridge University Press, (1989) Cambridge.

Raghavan, V.; **Development biology of fern gametophytes.** Cambridge University Press, (2005).

Randi, A.M.; **Aspectos morfogênicos, bioquímicos e citoquímicos durante a germinação de esporos de *Cyathea delgadii* Sternb.** Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1987.

Ranil, R. H. G., Pushpakumara, D. K. N. G., Janssen, T., Fraser-Jenkins, C. R., & Wijesundara, D. S. A. **Conservation Priorities for Tree Ferns (*Cyatheaceae*) in Sri Lanka.** *Taiwania*, 56 (2011), 201-209.

Rathinasabapathi, B. **Ferns represent an untapped biodiversity for improving crops for environmental stress tolerance.** *New physiologist*, 172 (2006) 385-390.

Rattmann, Y. D., Crestani, S., Lapa, F. R., Miguel, O. G., Marques, M. C., da Silva-Santos, J. E., & Santos, A. R. **Activation of muscarinic receptors by a hydroalcoholic extract of *Dicksonia sellowiana* Presl.**

Hook (Dicksoniaceae) induces vascular relaxation and hypotension in rats. *Vascular pharmacology*, 50 (2009), 27-33.

Rattmann, Y. D., Mendéz-Sánchez, S. C., Furian, A. F., Paludo, K. S., de Souza, L. M., Dartora, N., & Iacomini, M. **Standardized extract of *Dicksonia sellowiana* Presl. Hook (Dicksoniaceae) decreases oxidative damage in cultured endothelial cells and in rats.** *Journal of ethnopharmacology*, 133 (2011), 999-1007.

Rattmann, Y. D., Anselm, E., Kim, J. H., Dal-Ros, S., Auger, C., Miguel, O. G., & Schini-Kerth, V. B. **Natural product extract of *Dicksonia sellowiana* induces endothelium-dependent relaxations by a redox-sensitive Src-and Akt-dependent activation of eNOS in porcine coronary arteries.** *Journal of vascular research*, 49 (2012), 284-298.

Raven, P.H.; Evert, R.F.; Eichhorn, S.; **Biologia Vegetal**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A., (2001) 434-447.

Rechenmacher, C., Schmitt, J. L., & Droste, A. **Spore germination and gametophyte development of *Cyathea atrovirens* (Langsd. & Fisch.) Domin (Cyatheaceae) under different pH conditions.** *Braz. J. Biol.*, 70 (2010), 1155-1160.

Renner, G.D.R.; Randi, A.M.; **Effect of sucrose and irradiance on germination and early gametophyte growth of the endangered tree fern *Dicksonia sellowiana* Hook (Dicksoniaceae).** *Acta Botânica Brasileira*, 18 (2004), 375-380.

Reynolds, E.S.; **The use of lead citrate at high pH as a electron-opaque stain in electron microscopy.** *The Journal of Cell Biology*, 17, (1963), 208-212.

Rogge, G.D.; **Germinação, propagação “in vitro” e criopreservação de esporos de *Dicksonia sellowiana* (PRESL) Hook.** Florianópolis. Dissertação de mestrado (Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, 1999.

Rogge, G.D.; Viana, A.M.; Randi, A.M.; **Cryopreservation of spores of *Dicksonia sellowiana*. An endangered tree fern indigenous to South and Central America.** *CryoLetters*, 21 (2000), 223-230.

- Sakai, A.; **Cryopreservation of germplasm of woody plants**. In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry*, 32 (1995) 53-69.
- Santana, D.G.; Ranal, M.A.; **Análise da germinação: um enfoque estatístico**. Edição UnB, (2004), 248.
- Schmitt, J. L., Budke, J. C., & Windisch, P. G. **Aspectos florísticos e ecológicos de pteridófitas epifíticas em cáudices de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Pteridophyta, Dicksoniaceae), São Francisco de Paula, RS, Brasil**. *Pesquisas, Série Botânica*, 56 (2005), 161-172.
- Schmitt, J. L., Schneider, P. H., & Windisch, P. G. **Crescimento do cáudice e fenologia de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) no sul do Brasil**. *Acta Botanica Brasilica*, 23 (2009), 289-291.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. **NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis**. *Nature methods*, 9 (2012), 671.
- Schneider, H., Smith, A. R., Hovenkamp, P., Prado, J., Rouhan, G., Salino, A., ... & Field12, A. R. **A community-derived classification for extant lycophytes and ferns**. The Pteridophyte Phylogeny Group (2016), *Journal of Systematics and Evolution* 54 (6): 563–603.
- Schreiber, U.; Endo, T.; Mi, H-L.; Asada, K.; **Quenching analysis of chlorophyll fluorescence by the saturation pulse method: particular aspects relating to the study of eukaryotic algae e cyanobacteria**. *Plant Cell Physiology*, 36 (1995), 873-882.
- Sehnm, A.; **Ciateáceas**. *Flora Ilustrada Catarinense*, (1978) 1-114.
- Seki, M.; Umezawa, T.; Urano, K.; Shinozaki, K.; **Regulatory metabolic networks indrought stress responses**. *Current Opinion in Plant Biology*, 10 (2007) 296-302.
- Sevegnani, L.; Gasper, A.L.; Bonet, A.; Sobral, M.G.; Vibrans, A.C.; Verdi, M.; Santos, A.S.; Dreveck, S.; Korte, A.; Schmitt, J.; Cadorin, T.; Lopes, C.P.; Cagliione, E.; Torres, J.F.; Meyer, L.; **Flora vascular da floresta ombrófila densa em Santa Catarina**. *Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina*, (2013), cap.4.

Sherwin, H. W., & Farrant, J. M. **Protection mechanisms against excess light in the resurrection plants *Craterostigma wilmsii* and *Xerophyta viscosa*.** *Plant Growth Regulation*, 24(3), 203-210, (1998).

Shutov, A.D.; Braun, H.; Chesnokov, Y.V.; Äumlein, H.; **A gene encoding a vicilin-like protein is specifically expressed in fern spores: Evolutionary pathway of seed storage globulins.** *European Journal of Biochemistry*. 252 (1998) 79-89.

Silva, W.; **O cultivo de orquídeas no Brasil.** Nobel, Campinas, SP, (1986), 1-96.

Simabukuro, E. A., Dyer, A. F., & Felipe, G. M. **The effect of sterilization and storage conditions on the viability of the spores of *Cyathea delgadii*.** *American Fern Journal*, (1998), 72-80.

Sokal, R. R., & Rohlf, F. J. ***The principles and practice of statistics in biological research*** (pp. 399-400). San Francisco: WH Freeman and company, (1969).

Smith, D.L.; Pryer, K.M.; Schettpelz, E.; Korall, P.; Schneider, H.; Wolf, P.G.; **A classification for extant ferns.** *Taxon*, 55 (2006) 705-731.

Smith, A. R., Pryer, K. M., Schuettpelz, E., Korall, P., Schneider, H., & Wolf, P. G. **Fern classification.** *Biology and evolution of ferns and lycophytes.* *Cambridge University Press, Cambridge*, (2008) 417-467.

Spurr, A.R.; **A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy.** *Journal of Ultrastructure Research*, 26 (1969), 31.

Sumanta, N., Haque, C. I., Nishika, J., & Suprakash, R. **Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents.** *Research Journal of Chemical Sciences ISSN, 2231, 606X*, (2014).

Suzuki, C.C.L.F.; **Desenvolvimento gametofítico e estudo de diferentes níveis de luz no crescimento de plântulas de *Dicksonia sellowiana* (PRESL) Hook. (Pteridófita – Dicksoniaceae).** Florianópolis. Dissertação de mestrado (Recursos Genéticos Vegetais), Universidade Federal de Santa Catarina, (2003).

- Suzuki, C.C.L.F.; Paulilo, M.T.; Randi, A.M.; **Substrate and irradiance affect the early growth of the endangered tropical tree fern *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae).** *American Fern Journal*, 95 (2005), 115-125.
- Templeman, T.S.; DeMaggio, A.E.; Stetler, D.A.; **Biochemistry of Fern Spore Germination: Globulin Storage Proteins in *Matteuccia struthiopteris* L.** *Plant Physiology*, 85 (1987) 343-349.
- Templeman, T.S.; DeMaggio, A.E.; **Biochemistry of Fern Spore Proteins: Globulin Storage Proteins in *Onoclea sensibilis* and *Osmunda cinnamomea*.** *American Journal of Botany*, 77 (1990), 284-287.
- Tripathi, A. K., & Gautam, M. **Biochemical parameters of plants as indicators of air pollution.** *Journal of Environmental Biology*, 28(1), 127, (2007).
- Tryon, R.M.; **Development and evolution of ferns floras of Oceanic Islands.** *Biotropica*, 2 (1970), 76-84.
- Tryon, R.M.; **Endemic areas and geographic speciation in Tropical American Ferns.** *Biotropica*, 4 (1972), 121-131.
- Tryon, R.; Tryon, A.F.; **Ferns and allied plants with special reference to Tropical America.** New York: Springer-Verlag, (1982), 144-149.
- Vicas, S., Laslo, V., Pantea, S., & Bandici, G. **Chlorophyll and carotenoids pigments from Mistletoe (*Viscum album*) leaves using different solvents.** *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie*, 17(2010), 213-218.
- Viviani, D. **Desenvolvimento inicial de *Polypodium lepidopteris* (LANGDS & FISCH) Kunze (Polypodiaceae): germinação de esporos e morfoanatomia de gametófitos e esporófitos.** Florianópolis. Dissertação de mestrado (Recursos Genéticos Vegetais), Universidade Federal de Santa Catarina, (2007).
- Volkova, L., Tausz, M., Bennett, L. T., & Dreyer, E. **Interactive effects of high irradiance and moderate heat on photosynthesis, pigments, and tocopherol in the tree-fern *Dicksonia antarctica*.** *Functional Plant Biology*, 36(12), 1046-1056, (2009).

Volkova, L., Bennett, L. T., & Tausz, M. **Diurnal and seasonal variations in photosynthetic and morphological traits of the tree ferns *Dicksonia antarctica* (Dicksoniaceae) and *Cyathea australis* (Cyatheaceae) in wet sclerophyll forests of Australia.** *Environmental and experimental botany*, 70(1), 11-19, (2011).

Voytena, A. P. L., Minardi, B. D., Barufi, J. B., Santos, M., & Randi, Á. M. **Pleopeltis pleopeltifolia (Polypodiopsida, Polypodiaceae), a poikilochlorophyllous desiccation-tolerant fern: anatomical, biochemical and physiological responses during water stress.** *Australian Journal of Botany*, 62(8), 647-656, (2015).

Wellburn, A. R. **The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution.** *Journal of plant physiology*, 144(1994), 307-313.

White, A.; Critchley, C. **Rapid light curves: A new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus.** *Photosynthesis Research*, 59, (1999), 63-72.

Wu, H., Chen, P. T., Yuan, L. P., & Chen, L. Q. (2009). **An efficient method for surface sterilization and sowing fern spores in vitro.** *American Fern Journal*, (2009) v. 99 n. 3, p. 226-230.

Xie, Q. E., Yan, X. L., Liao, X. Y., & Li, X. **The arsenic hyperaccumulator fern *Pteris vittata* L.** *Environmental science & technology*, 43 (2009).

Xu, Y.; Liu, Y.; Shi, L.; **Cryopreservation of spores of *Alsophila gigantea* var. *gigantea* Wall. ex Hook.** *Plant Physiology Communications*, 42 (2006), 55-57.

Yongjie, W.; Engelmann, F.; Frattarelli, A.; Damiano, C.; Withers, L.A.; **Cryopreservation of strawberry cell suspension cultures.** *CryoLetters*, 18 (1997) 317-324.

Zar, J.H.; **Biostatistical Analysis.** Upper Saddle River, Prentice Hall, 3a.ed., (1996).

Zitta, C. S., Rover, T., Hayashi, L., & Bouzon, Z. L. **Callus ontogeny of the *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) brown**

tetrasporophyte strain. *Journal of applied phycology*, 25(2), 615-629, (2013).

<http://www.caraguata.com.br>, acessado em 25/06/2015.