

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPT° DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**GERMINAÇÃO, PROPAGAÇÃO “*in vitro*” E CRIOPRESERVAÇÃO DE
ESPOROS DE *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook.**

Gladys Daniela Rogge

**Florianópolis
(1999)**

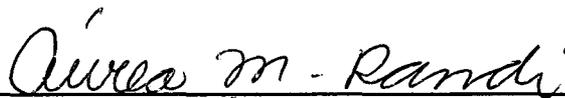
**"GERMINAÇÃO, PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E CRIOPRESERVAÇÃO
DE ESPOROS DE *DICKSONIA SELLOWIANA* (PRESL.) HOOK."**

POR

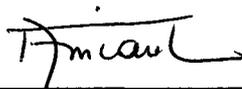
GLADYS DANIELA ROGGE

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

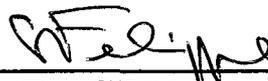
Comissão Examinadora:



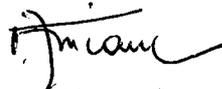
**Profa. Dra. Áurea Maria Randi - Orientadora
(BOT/CCB/UFSC)**



**Profa. Dra. Ana Maria Viana
(BOT/CCB/UFSC)**



**Prof. Dr. Gil Martins Felipe
(UNICAMP)**



**Prof. Ana Maria Viana
Coord. Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia
CCB-UFSC**

Florianópolis, setembro de 1999

Dedico este trabalho, àqueles que são especiais, pelo simples fato de existirem: minha família. Agradeço a vocês, pai (Carlos), mãe (Teresinha), irmã (Thais) e noivo (João), por todo amor, carinho e paciência que tiveram comigo nesta fase. O sucesso é nosso!

AGRADECIMENTOS

A Prof^a. Dr^a. ÁUREA MARIA RANDI, pela sua orientação, dedicação, paciência e carinho, que tornaram mais tranqüila esta “caminhada” e que muito contribuíram para minha formação profissional.

A Prof^a.Dr^a. ANA MARIA VIANA, pela co-orientação, colaboração com o material necessário e laboratórios, sem os quais esta dissertação ficaria comprometida.

A Prof^a.Dr^a. MARIA TEREZINHA S. PAULILO, pela presteza em colaborar com fontes bibliográficas e sugestões, que muito enriqueceram este trabalho.

Ao Prof. Dr. MÁRIO STEINDEL (MIP), pelo empréstimo do fotomicroscópio e pelas facilidades, no uso do nitrogênio líquido.

A Dr^a. NÁTIA ELEN AURAS, pelas correções e sugestões, que muito contribuíram para a redação deste trabalho.

A RESERVA DO PATRIMÔNIO NATURAL DE CARAGUATÁ, Antônio Carlos-SC, pela permissão e colaboração na coleta do material utilizado.

Aos PROFESSORES DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA, especialmente aos do

Departamento de Botânica (Pimenta, Moacyr, Edmilson, Sandra e Valdemar), pelo grande carinho, amizade e sólida base científica proporcionados.

A COORDENADORIA DE APERFEIÇOAMENTO DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

A todos os PROFESSORES E FUNCIONÁRIOS DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA, COLEGAS (Carlos, João Maurício, Bete, Juliana, Eduardo, Michel, Rafael, Jonice) e FUNCIONÁRIOS (Júlia, Nauro, Xisto, Ivoni) do Laboratório de Fisiologia Vegetal (Departamento de Botânica), pela amizade e incentivo, durante o período em que lá trabalhei.

Especialmente a VERA MARIA C. S. SANTOS, pela amizade e pelas caronas- Florianópolis/Joinville, que tornaram mais agradáveis e rápidas nossas viagens semanais.

SUMÁRIO

	PÁGINAS
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	08
LISTA DE ABREVIATURAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	15
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2. MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1. MATERIAL	32
2.2. MÉTODOS	32
2.2.1. Germinação de esporos	32
2.2.2. Esterilização de esporos	34
2.2.3. Criopreservação de esporos	37
2.2.4. Armazenamento de esporos em NL	37
2.2.5. Diferença de massas fresca e seca de amostras de esporos	38
2.2.6. Efeito dos meios líquidos de Dyer e MS, de concentrações salinas do meio MS e de sacarose na germinação e crescimento inicial de gametófitos	38
2.2.7. Efeito da sacarose sobre o cultivo in vitro de gametófitos em meios solidificados.	39
2.2.8. Efeito do BAP na germinação e crescimento inicial de gametófitos em meio líquido e meio sólido	40
2.2.9. Efeito da intensidade luminosa na germinação e crescimento inicial de gametófitos em meio líquido	41
2.2.10. Extração de açúcares e clorofilas de gametófitos	41
2.2.10.1. Extração de açúcares totais	41
2.2.10.2. Extração de clorofilas	42

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.1. Criopreservação e armazenamento de esporos em NL	44
3.2. Efeito dos meios líquidos de Dyer e MS, de concentrações salinas do meio MS e de concentrações de sacarose na germinação e crescimento inicial de gametófitos	53
3.3. Efeito de meios sólidos de Dyer e MS, de concentrações salinas do meio sólido MS e de sacarose no crescimento dos gametófitos produzidos no meio líquido de Dyer	64
3.4. Efeito de BAP na germinação e crescimento inicial de gametófitos em meio líquido e sólido	70
3.5. Efeito da intensidade luminosa na germinação e crescimento inicial de gametófitos em meio líquido	80
4. CONCLUSÕES	91
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
6. ANEXOS	106

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

- Tabela 1- Composição química do Meio de Dyer pág. 33
- Tabela 2- Testes de esterilização em esporos de *Dicksonia sellowiana* pág. 36
- Figura 1- Germinação de esporos de *D. sellowiana* imersos em NL por 15 minutos pág 45
- Figura 2- Germinação de esporos de *D. sellowiana* embebidos em solução de crioprotetor e imersos em NL por 15 minutos pág. 46
- Figura 3- Germinação de esporos de *D. sellowiana* imersos em NL por 15 dias pág. 47
- Figura 4- Germinação de esporos de *D. sellowiana* imersos em NL por 1 mês. pág. 48
- Figura 5- Germinação de esporos de *D. sellowiana* imersos em NL por 3 meses pág. 50
- Figuras 6-A- Germinação de esporos de *D. sellowiana* cultivados em meios de Dyer e MS líquidos acrescidos com 0, 1, 2, 3, 4 e 5% de sacarose pág.54
- Figura 6-B- Germinação de esporos de *D. sellowiana* após 14 dias de embebição em meios MS e Dyer líquidos acrescidos com 0, 1, 2, 3, 4 e 5% de sacarose pág. 55
- Figura 6-C- Germinação de esporos de *D. sellowiana* após 21 dias de cultivo em meios MS e Dyer líquidos acrescidos com 0, 1, 2, 3, 4 e 5% de sacarose pág. 57

- Figura 7- Massa fresca de gametófitos de *D. sellowiana* produzidos a partir de esporos cultivados durante 30 dias em meios de Dyer e MS líquidos acrescidos de sacarose a 0, 1, 2, 3, 4 e 5% pág. 58
- Figura 8- Massa seca de gametófitos de *D. sellowiana* produzidos a partir de esporos cultivados durante 30 dias em meios de Dyer e MS líquidos acrescidos de sacarose a 0, 1, 2, 3, 4 e 5% pág. 59
- Figura 9- Germinação de esporos de *D. sellowiana* cultivados em meio MS, MS $\frac{1}{2}$ e MS $\frac{1}{4}$ líquidos pág. 61
- Figura 10- Variação na massa fresca de gametófitos de *D. sellowiana* após 30 dias de cultivo em meio MS líquido e meio MS líquido nas diluições $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ pág. 62
- Figura 11- Variação na massa seca de gametófitos de *D. sellowiana* após 30 dias de cultivo em meio MS líquido e meio MS líquido nas diluições $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ pág. 63
- Figura 12- Variação na massa fresca de gametófitos de *D. sellowiana* produzidos a partir de gametófitos cultivados durante 60 dias em meios de Dyer líquido transferidos para os meios de Dyer e MS solidificados com 0,2% de Phytigel® e acrescidos de sacarose a 0, 1, 2, 3, 4 e 5% pág. 65
- Figura 13- Variação na massa seca de gametófitos de *D. sellowiana* produzidos a partir de gametófitos cultivados durante 60 dias em meios de Dyer líquido transferidos para os meios de Dyer e MS solidificados com 0,2% de Phytigel® e acrescidos de sacarose a 0, 1, 2, 3, 4 e 5% pág. 66
- Figura 14- Variação na massa fresca de gametófitos de *D. sellowiana* produzidos a partir de gametófitos cultivados durante 60 dias em meios de Dyer líquido transferidos para os meios MS e meio MS nas diluições $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ solidificados com 0,2% de Phytigel® pág. 68
- Figura 15- Variação na massa seca de gametófitos de *D. sellowiana* produzidos a partir de gametófitos cultivados durante 60 dias em meios de Dyer líquido transferidos para os meios MS e meio Ms nas diluições $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ solidificados com 0,2% de Phytigel® pág. 69

- Figura 16- Germinação de esporos de *D. sellowiana* cultivados em meio de Dyer acrescido de BAP nas concentrações 0M, 10^{-7} M, 5×10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M pág. 71
- Figura 17- Germinação de esporos de *D. sellowiana* cultivados em meio MS $\frac{1}{4}$ acrescido de BAP nas concentrações 0M, 10^{-7} M, 5×10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M pág. 73
- Figura 18- Variação na massa fresca de gametófitos de *D. sellowiana* após 28 dias de cultivo em meios MS $\frac{1}{4}$ e de Dyer acrescidos de BAP nas concentrações 0 M, 10^{-7} M, 5×10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M pág.74
- Figura 19- Variação da massa seca de gametófitos de *D. sellowiana* após 28 dias de cultivo em meios MS $\frac{1}{4}$ e de Dyer acrescidos de BAP nas concentrações 0 M, 10^{-7} M, 5×10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M pág. 76
- Figura 20- Variação da massa fresca de gametófitos de *D. sellowiana* após 32 dias de cultivo em meio de Dyer, transferidos por 68 dias para meio MS acrescido de 2% de sacarose, 0,2% de Phytigel™ e BAP nas concentrações 0 M, 10^{-7} M, 5×10^{-7} M e 10^{-6} M pág. 77
- Figura 21- Variação de massa seca de gametófitos de *D. sellowiana* após 32 dias de cultivo em meio de Dyer, transferidos por 68 dias para meio MS acrescido de 2% de sacarose, 0,2% de Phytigel™ e BAP nas concentrações 0 M, 10^{-7} M, 5×10^{-7} M e 10^{-6} M pág. 78
- Figura 22- Germinação de esporos de *D. sellowiana* cultivados em meio de Dyer por 49 dias sob redução de 50, 64, 80 e 95% na intensidade luminosa pág. 81
- Figura 23- Teor de açúcares solúveis totais presente em amostras de esporos e gametófitos de *D. sellowiana* cultivados em meio de Dyer por 48 dias sob redução de 50, 64, 80 e 95% na intensidade luminosa pág. 83
- Figura 24- Teor de clorofila **a** presente em amostras de gametófitos de *D. sellowiana* cultivados em meio de Dyer por 48 dias sob redução de 50, 64, 80 e 95% na intensidade luminosa..... pág. 84
- Figura 25- Teor de clorofila **b** presente em amostras de gametófitos de *D. sellowiana* cultivados em meio de Dyer por 48 dias sob redução de 50, 64, 80 e 95% na intensidade luminosa..... pág. 85

Figura 26- Teor de clorofila total presente em amostras de gametófitos de *D. sellowiana* cultivados em meio de Dyer por 48 dias sob redução de 50, 64, 80 e 95% na intensidade luminosa pág. 86

Figura 27- Variação da massa fresca de gametófitos de *D. sellowiana* após 90 dias de cultivo em meio de Dyer sob redução de 50, 64, 80 e 95% na intensidade luminosa pág. 88

LISTA DE ABREVIATURAS

- 1- AIA - Ácido Indolil Acético
- 2- ANA - Ácido Naftaleno Acético
- 3- BAP - 6-Benzilaminopurina
- 4- BM (MB)- Meio Basal
- 5- DMSO - Dimetilsulfóxido
- 6- IBA (AIB) - Ácido Indol-3-butírico
- 7- 2-iP - sopeniteniladenina
- 8- JA - Ácido Jasmônico
- 9- MCW - Metanol, Clorofórmio e Água.
- 10- MS - Meio de cultura de Murashige & Skoog
- 11- NL - Nitrogênio Líquido
- 12- 4-PU - 4-Piridil-N'-penilurea
- 13- TDZ - Thidiazuron

RESUMO

Dicksonia sellowiana (Presl.) Hook., (**xaxim**), samambaia arbórea do Sul e Sudeste do Brasil, característica da Floresta Ombrófila Densa, é explorada para a confecção de vasos e de solo orgânico. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de se estabelecer um protocolo inicial para o cultivo *in vitro* e criopreservação desta espécie. Com exceção dos esporos criopreservados com crioprotetor, todos os tratamentos de criopreservação apresentaram porcentagens de germinação superiores às obtidas no controle. Os meios MS e de Dyer líquidos, sem adição de sacarose, promoveram as maiores porcentagens de germinação de esporos de *D. sellowiana* e os gametófitos produzidos apresentaram a maior redução de massa seca. O meio MS solidificado promoveu incremento de masa fresca dos gametófitos superior ao meio de Dyer. A germinação de esporos, em meio de Dyer, após 21 dias de cultivo com BAP a $5 \times 10^{-7} M$, sobrepujou os valores do controle. A maior concentração de BAP induziu a menor porcentagem de germinação e de aumento de massa fresca. Houve aumento na germinação e nos teores de clorofila dos gametófitos cultivados nos menores níveis de luz (80 e 95% de redução da luz solar total) e aumento nos níveis de açúcares (80% de redução da luz solar total). Os maiores níveis de luz (50 e 64% de redução da luz solar total) retardaram a germinação e reduziram o desenvolvimento dos gametófitos.

ABSTRACT

Dicksonia sellowiana (Presl.) Hook., (**xaxim**), tree fern of South and Southern of Brazil, characteristic of Dense Umbrophilus Forest, is explored for make jars and organic soil. The purpose of this study was the creation of a initial protocol for *in vitro* culture and cryopreservation on this specie. With exception of spores cryopreserved with cryoprotector, all the treatments on cryopreservation showed higher percentages of germination than the control. The liquid MS and Dyer media without sucrose promoted the highest percentages of germination of *D. sellowiana* and the gametophytes produced showed the higher reduction in dry mass. The solidified MS medium promoted increase in the dry mass of the gametophytes, higher than the Dyer medium. The spore germination, in Dyer medium, after 21 days of culture with BAP $5 \times 10^{-7} \text{M}$, surpassed the control values. The higher concentration of BAP inhibited germination and increase in fresh mass. There was an increase in germination and chlorophyl levels in gametophytes cultured in low levels of light intensity (80 and 95% reduction of full sunlight) and an increase in sugar levels at 80% reduction of full sunlight. The highest levels of light intensity 50 and 64% reduction of full sunlight) delayed germination and decreased gametophytes development. This study is focussed on germination, development of *in vitro* propagation and cryopreservation systems for this species.

INTRODUÇÃO

Dicksonia sellowiana (Presl.) Hook. (Tryon & Tryon, 1982) é uma pteridófita terrestre, geralmente ereta, com cerca de 5m de altura, pertencente à família Dicksoniaceae. O nome desta espécie foi dado em homenagem a James Dickson, escocês, comerciante de sementes em Londres. Na América, essa espécie ocorre desde o sudeste do México, na América Central e na Venezuela, Colômbia, Sul da Bolívia, Paraguai, Uruguai e Regiões Sul e Sudeste do Brasil. Na América Tropical, ocorre na Floresta Ombrófila Densa (Tryon & Tryon, 1982). No Estado de Santa Catarina, Região Sul do Brasil, é conhecida como **xaxim bugio** ou simplesmente **xaxim** e cresce preferencialmente em lugares pantanosos, nas regiões serranas, podendo ocorrer também em encostas e excepcionalmente em banhados das baixadas. Nos campos das regiões serranas, cresce em araucarietos, podendo formar pequena mata de andar inferior com troncos grossos. Geralmente hospeda outras pteridófitas epífitas (Sehnem, 1978).

De acordo com Sehnem (1978), que classificou essa espécie como gênero da família Cyatheaceae, esta é uma espécie inconfundível pelo tronco com camada mais ou menos grossa de raízes adventícias.

Em todo o Brasil, seus troncos são comercializados em forma de vasos ou de solo vegetal, bastante utilizados para o cultivo das mais diversas espécies de plantas ornamentais. Entretanto, a produção desses vasos é feita através da extração indiscriminada do tronco dessas árvores e nada tem sido feito para a reposição ou preservação das matas de *Dicksonia sellowiana*, que vêm sendo devastadas por longo tempo. Há na literatura científica muito pouco a respeito

da fisiologia da reprodução dessa espécie, bem como de seu crescimento inicial e cultivo.

Torna-se, portanto, relevante o desenvolvimento de métodos que contribuam para otimizar a propagação e a conservação desta espécie.

Este trabalho teve como principal objetivo, desenvolver métodos de cultivo *in vitro* de gametófitos e de criopreservação de esporos de *Dicksonia sellowiana*, através de testes em meios enriquecidos com ágar, sacarose e citocininas, além de analisar o crescimento inicial de gametófitos sob diferentes intensidades luminosas.

1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nos últimos dez anos, estudos sobre o cultivo *in vitro* de pteridófitas têm sido realizados, sob diferentes pontos de vista e com diferentes objetivos. Pteridófitas têm sido cultivadas, a partir de esporos, para estudos da morfologia de gametófitos em desenvolvimento. A propagação, a partir de segmentos de rizomas, ou de segmentos de gametófitos e esporófitos, tem sido obtida com êxito, bem como a produção de calos e protoplastos, além da proliferação de gametófitos e esporófitos a partir de calos. Gametófitos têm sido cultivados *in vitro*, com a finalidade de se observar os padrões de reprodução sexuada e a variabilidade genética em diferentes espécies. Observa-se uma preocupação na comunidade científica em conservar e desenvolver técnicas de manejo de diversas espécies de pteridófitas comestíveis, ornamentais ou utilizadas para outras finalidades.

Nesta revisão bibliográfica, foi adotado o critério de ordem cronológica de publicação dos trabalhos, com a finalidade de abordar, de modo abrangente as principais linhas de pesquisa que visam estudar o manejo e a conservação de pteridófitas.

Camloh et al. (1989) estudaram a micropropagação de *Nephrolepis exaltata* e a influência de várias concentrações de 2iP, ANA e cinetina, adicionadas ao meio MS modificado. O maior número de ramos e a maior massa fresca foram obtidos com 0,5 μM de 2iP. Em diluições de BM (macroelementos diluídos de acordo com Loescher & Albrecht, 1979 apud Camloh et al., 1989), metade de sua concentração, contendo 0,5 μM de ANA e 5 μM cinetina,

promoveu o maior número de ramos. Para induzir o enraizamento, os ramos foram transferidos para BM completo ou diluído, sem reguladores de crescimento ou com adição de 6 ou 12 μM de AIA, sendo a maior porcentagem de ramos enraizados obtida em $\frac{1}{2}$ BM sem reguladores de crescimento.

Segundo Raghavan (1989), o meio líquido é geralmente superior para a germinação de esporos de pteridófitas, pois os meios solidificados afetam e retardam a quebra de cascas de esporos, a protusão do rizóide e, conseqüentemente, a formação inicial dos gametófitos.

Borelli et al. (1990) realizaram experimentos *in vivo* e *in vitro* para a propagação de pteridófitas através de esporos. Na cultura *in vivo*, utilizaram xaxim, esfagno, terriço e tijolo fragmentado, obtendo os melhores resultados com o xaxim e o esfagno. Para o cultivo *in vitro*, empregaram os meios MS modificado, de Jones, e solução de Knop modificada, obtendo as maiores porcentagens de germinação e formação de gametófitos nos meios de Jones e Knop. Os autores citam que, conjuntamente à questão comercial, é importante considerar o aspecto relacionado à preservação ambiental, dirigindo estudos no intuito de produzir estas plantas em níveis quantitativos e qualitativos adequados ao suprimento da demanda, na tentativa de equilibrar o *déficit* entre a retirada das plantas de seus *habitats* e sua reposição.

O comportamento gametofítico de *Woodwardia radicans* foi analisado em condições de cultura controlada por Carafa (1990), assim como a densidade populacional e a anteridiogênese na expressão sexual. Os resultados mostraram que o desenvolvimento não é afetado pela temperatura, enquanto a expressão sexual dos gametófitos é afetada pela densidade semeada, pela presença no meio de cultura de anteridiogênio e pelas condições nutricionais dos gametófitos.

Kuryama & Takeuchi (1990), obtiveram esporófitos a partir de subculturas de segmentos de gametófitos de *Equisetum arvense* cultivados em meio MS acrescido de citocininas (BAP apresentou os maiores efeitos). Embora as

citocininas desempenhem um papel chave na expressão dos genes esporofíticos na geração haplóide de *E. arvense*, nenhum ramo apogâmico pôde ser formado em meio sem açúcar, mesmo quando cultivados com suplemento exógeno de citocininas.

Uma nova técnica para o cultivo de gametófitos foi desenvolvida por Douglas & Sheffield (1990). Essa técnica consiste em imobilizar gametófitos em uma malha de poliuretano para o cultivo em meios líquidos em movimento. Os resultados apontaram para um aumento na massa seca superior ao observado em culturas líquidas.

Materi & Cumming (1991) relatam sobre a obtenção de esporófitos derivados de propágulos maduros de “samambaia avestruz” (*Matteuccia struthiopteris*), cultivando-os em ausência de carboidratos, o que resultou na expressão do fenótipo juvenil. A capacidade de cultivar folhas desse esporófito juvenil para produzir gametófitos por aposporia ou esporófitos por regeneração indicou que os esporófitos rejuvenescidos eram ontogeneticamente equivalentes, não apenas morfológicamente similares a esporófitos zigóticos juvenis. Tanto a aposporia quanto a regeneração foram promovidas em folhas cultivadas em meio de cultura semi-sólido. Comparando tratamentos com ausência ou adição de 1% de sacarose, a presença de sacarose promoveu um aumento na regeneração de esporófitos, mas reduziu o desenvolvimento apospórico. Esporófitos rejuvenescidos de diferentes clones e níveis poliplóides exibiram um grau semelhante de juvenilidade, e suas folhas expressaram uma capacidade similar para o desenvolvimento apospórico e regenerativo.

Amostras de gametófitos de *Platyserium bifurcatum*, iniciados de esporos cultivados *in vitro*, foram usadas por Camloh & Gogala (1992) para a determinação dos efeitos da adição de sacarose, ágar e pH no meio de cultura. O meio modificado de Miller suplementado com 4% de sacarose, 0 ou 0,6% de ágar e pH 5,5 propiciou as melhores condições de crescimento.

Whittier & Moyroud (1993) estudaram o efeito do baixo pH na germinação e no desenvolvimento dos gametófitos de *Ophioglossum palmatum*. A germinação desses esporos no escuro, que também ocorre em outros membros da família Ophioglossaceae, em um ambiente muito ácido, ajuda a explicar o *habitat* destes gametófitos na natureza (humus negro da base peciolar de couve e outros humus). Após a constatação de que o desenvolvimento destes gametófitos em cultura foi melhor em baixo pH, humus contendo fungos micorrízicos satisfizeram as necessidades para o crescimento. Embora a promoção do desenvolvimento de gametófitos por condições muito ácidas seja incomum em samambaias, parece que o baixo pH é um fator importante para o desenvolvimento de gametófitos de *Ophioglossum palmatum*.

Camloh (1993) conclui que há superioridade do meio líquido para o desenvolvimento inicial de gametófitos de *Platyserium bifurcatum*.

Whittier & Thomas (1993) estudaram o cultivo de gametófitos e esporófitos jovens de *Botrychium jenmanii*. Os esporos germinaram após 5 semanas, no escuro, em meio contendo arginina como fonte de nitrogênio. Ambos, anterídio e arquegônio, foram funcionais e a fertilização ocorreu em mais de 60% dos gametófitos submersos. Após 3 meses a raiz primária rompeu o gametófito seguida pela primeira folha. A primeira folha tornou-se estiolada ou dependente de fotossíntese quando desenvolveu-se no escuro ou na presença de luz, respectivamente.

Com relação à criopreservação, estudos tem demonstrado que esporos de *Cyathea spinulosa* sobreviveram após estocagem em nitrogênio líquido (-196°C). A máxima germinação dos esporos (93,5%), após a retirada do nitrogênio líquido, foi obtida após lento degelo a 30°C e depois de cultivo destes esporos em meio modificado de Knudson, sem sacarose. O cultivo em meio de Murashige e Skoog adicionado de sacarose e métodos de degelo rápido

resultaram em baixas porcentagens de germinação dos esporos (Agrawal et al., 1993).

Estudando a germinação dos esporos e o desenvolvimento gametofítico em três espécies de *Asplenium*, Pangua et al. (1994) observaram diferenças relevantes na temperatura necessária para a germinação e desenvolvimento sexual dessas espécies no solo. As espécies *A. trichomanes* e *A. scolopendrium* responderam de forma semelhante às variações de 5°C na temperatura entre 10 e 25°C e ambas germinaram a 10°C. A espécie *A. ruta-muraria* teve uma germinação lenta entre 15-25°C ou inibida à 10°C. Tanto as culturas de laboratório como as de campo das espécies *A. trichomanes* e *A. scolopendrium* produziram gametófitos femininos, masculinos e bissexuais, enquanto que as culturas de *A. ruta-muraria* produziram apenas gametófitos masculinos ou bissexuais.

Pasqual et al. (1994) relatam que, para a multiplicação *in vitro* de *Nephrolepis exaltata*, os melhores resultados quanto ao número de brotações foram obtidos na presença de 25% de sais e 30 g/l de sacarose, produzindo 2,6 novas brotações. Níveis de sacarose entre 15 e 30 g/l maximizaram a produção de folhas e a concentração de sais não teve efeito significativo nesse parâmetro. Observaram, ainda, que taxas mais elevadas de sacarose e sais inibiram o crescimento das folhas produzidas.

O desenvolvimento e a morfogênese de gametófitos foram estudados por Pérez-Garcia et al. (1994 a). A germinação dos esporos e o desenvolvimento do gametófito laminar de *Thelypteris rhachiflexuosa* e *Metaxya rostrata* (Pérez-Garcia et al. 1994 b) seguiram o padrão geral mencionado na bibliografia para outras espécies. A germinação foi do tipo observada em *Vittaria* e o desenvolvimento laminar do tipo observado em *Drynaria*. Em *Metaxya rostrata*, o anterídio pareceu similar àquele descrito previamente como típico das ciateáceas e foi observado que não houve crescimento de arquegônio após 270

dias de cultivo. Após um ano de estocagem no escuro, 40% da viabilidade dos esporos de *Lygodium heterodoxum* foi mantida, mas a germinação ocorreu apenas nos tratamentos com luz (Pérez-Garcia et al. 1994 c).

Esporófitos heterospóricos jovens de *Salvinia natans*, obtidos assepticamente através de co-culturas de gametófitos masculinos e femininos derivados de dois tipos de esporos (megásporos e micrósporos), foram utilizados para o isolamento e cultivo de protoplastos (Nakamura & Maeda, 1994). Os protoplastos isolados enzimaticamente de folíolos ou esporófitos juvenis foram cultivados em meio MS diluído (1/10) contendo 2,2 μM de ANA, 2,2 μM de BAP, 0,35 M de manitol e 0,05 M de sacarose. A divisão celular teve início após 6 dias de cultivo e foram observados agrupamentos compostos por 9-10 células após 30 dias de cultivo. Não houve divisão celular em meio de cultura sem regulador de crescimento.

Gametófitos isolados, originados de duas populações de *Dryopteris filix-mas*, foram cultivados em meio de cultura contendo diferentes quantidades de nutrientes (Korpelainen, 1994). Tanto a nutrição como a origem da população afetaram significativamente o crescimento, sexualidade, reprodução e mortalidade. O tamanho do gametófito foi decisivo na determinação sexual. Foi sugerido que o efeito do hormônio anteridiogênio, que é considerado como um importante fator na determinação sexual do gametófito, seria indireto: o anteridiogênio afetaria o tamanho dos gametófitos, que influenciaria a sua expressão sexual.

Camloh et al. (1994), estudaram a regeneração de plântulas de *Platyserium bifurcatum* a partir de folhas cultivadas *in vitro* em meio MS suplementado com 0,5 ou 10 μM de BAP. A organogênese ocorreu em todos os meios testados, com maior número de ramos nos meios acrescidos de BAP, embora o crescimento dos ramos nesse meio tenha sido mais lento. Para induzir ao enraizamento, os ramos foram transferidos para meios suplementados com 3-

13 μM de AIB, AIA ou ANA, sendo que o meio suplementado com 6 μM de IBA apresentou o melhor resultado. As plântulas, transferidas para o solo com sucesso, pareciam morfológicamente idênticas à planta doadora.

No intuito de desenvolver um método simples para o isolamento e cultivo de protoplastos de *Platyserium bifurcatum*, Camloh & Zel (1995) retiraram folhas jovens de esporófitos e cultivaram *in vitro*, antes de tratamento enzimático. Os protoplastos foram cultivados em meio MS, sem adenina sulfato, suplementado com mioinositol (0,01%), sacarose (3%) ágar Difto-Bacto (0,6%), manitol (0,5 M) e pH 5,7-5,8. Dois ml desse meio de cultura foram distribuídos em placas de Petri, sem reguladores de crescimento ou com 2,5 μM de ANA e 2 μM de BAP ou 2,5 μM de ANA e 5 μM de BAP. A taxa de divisão celular foi determinada após 4 e 8 dias de cultivo e as células foram examinadas. O aumento dos protoplastos foi maior quanto menor a quantidade de tecido incubada ou quanto maior a temperatura utilizada. Os reguladores de crescimento foram efetivos na indução da divisão celular, após 8 dias em cultivo, enquanto que em outras combinações dos reguladores de crescimento testados a porcentagem de células em divisão foi a mesma que no controle.

Materi et al. (1995), publicaram estudo sobre a poliploidização de esporófitos maduros (2n) da “samambaia avestruz” (*Matteuccia struthiopteris*), por meio de rejuvenescimento, permitindo a produção apospórica de gametófitos diplóides e unindo os gametófitos para a produção de esporófitos tetraplóides (4n). Os esporófitos adultos foram rejuvenescidos pelo cultivo de ápices durante 3 meses em meio MS líquido, sob condições de extrema falta de carboidrato (0,01% de sacarose). A aposporia foi induzida pelo cultivo de folhas retiradas dos ramos rejuvenescidos durante 2 meses em meio semi-sólido com ausência de sacarose, resultando na produção de gametófitos diplóides. Esses foram transferidos para meio fresco e cresceram até maturidade sexual por um ou dois meses, flutuando na superfície do meio líquido contendo 0,01% de sacarose, por

mais dois meses, para promover a abertura dos órgãos sexuais. A subsequente auto-fecundação resultou na produção de esporófitos tetraplóides em 11 dos 14 clones diplóides nos quais a poliploidização foi realizada.

Pérez-García et al. (1995), estudando o desenvolvimento gametofítico de *Lophosoria quadripinnata*, concluíram que a dormência variou entre 8 a 12 dias, com um padrão germinativo do tipo *Cyathea* e um desenvolvimento protalial do tipo *Adiantum*. Não foram obtidos esporófitos após três anos de cultivo.

O crescimento e as características reprodutivas de gametófitos clonais de *Dryopteris filix-mas* formados artificialmente foram estudados por Korpelainen (1995). A variação na densidade e nos níveis de nutrientes pareceu afetar a vida gametofítica e continuou a influenciar a viabilidade da geração de desenvolvimento esporofítico. Gametófitos hermafroditas foram consideravelmente maiores e apresentaram maior viabilidade que os masculinos. Diferenças nítidas entre o tamanho dos gametófitos dos clones foram observadas na plasticidade fenotípica. Nenhum efeito na expressão sexual dos gametófitos foi detectado com as densidades e níveis de nutrientes utilizados.

Kwa et al. (1995 a) pesquisaram a apogamia induzida por AIA em gametófitos de *Platyserium coronarium* cultivados *in vitro*. A porcentagem de apogamia, assim como o número total de esporófitos apogâmicos produzidos por grupos de gametófitos foram maiores na presença de 40 μM de AIA. Quando houve liberação de etileno e seu acúmulo no frasco de cultivo na presença de ótimos níveis de AIA, a porcentagem e o número total de esporófitos apogâmicos produzidos diminuiu significativamente.

Para o estudo do estabelecimento e análise fisiológica de culturas de calos fotoautotróficos de *Platyserium coronarium*, sob enriquecimento de CO_2 , Kwa et al. (1995 b) mantiveram os calos em meio MS suplementado com 2 μM de 2,4-D e com enriquecimento de CO_2 . A redução progressiva da sacarose do

meio resultou na redução do crescimento e num aumento no conteúdo de clorofila total. Foi observado um aumento na autofluorescência de cloroplastos, mas não no tamanho, com a redução dos níveis de sacarose do meio. A autofluorescência diminuiu com o aumento de 0,03% de CO₂. Segundo os autores, a exposição a altos níveis de CO₂ pode causar uma redução da capacidade fotossintética.

Gametófitos apospóricos de *Lygodium japonicum* foram induzidos diretamente de fragmentos de folíolos de esporófitos subcultivados e submetidos à propagação massal por Nakamura & Maeda (1995). Os gametófitos formaram arquegônios e anterídios, finalmente desenvolvendo esporófitos. O protalo induzido foi um material muito melhor para o isolamento de protoplastos que os esporófitos de tecidos intactos. Quando os protoplastos foram cultivados em meio MS ½ suplementado com 0,05 mg/l de ANA e 0,05 mg/l de BAP, começaram a divisão celular após 5 dias de cultivo. Após a transferência para meio MS, livre de reguladores de crescimento, os regenerantes finalmente formaram protalos.

Goller & Rybczynski (1995) esterilizaram esporos de *Cyathea australis* em 3% de cloramina com Tween e fizeram seu cultivo em meio de Anderson (1984, apud Goller & Rybczynski, 1995) solidificado. O aparecimento dos protalos foi observado após 3 meses da germinação dos esporos. A multiplicação dos protalos foi estimulada em meio MS suplementado com 0,25 mg/l de BAP, 0,50 mg/l de IBA, 0,50 mg/l de AIA, 1,0 mg/l de GA₃ e 30 g/l de sacarose. Pequenas quantidades de água foram colocadas na parte basal do gametófito para auxiliar a fertilização do arquegônio. Poucas semanas depois, a primeira plântula emergiu da base do gametófito.

A morfogênese da fase sexual de *Blechnum chilense* e *Blechnum cycadifolium* foi estudada por Pérez-García et al. (1996). Em ambas as espécies, os esporos são monoletes, elipsoidais, não clorofilados e a germinação é do tipo

observado em *Vittaria*. O padrão de desenvolvimento do protalo foi do tipo *Aspidium*, em *B. cycadifolium* para os tricomas unicelulares papilados e do tipo *Adiantum* em *B. chilense*, cujo protalo é nú. As primeiras folhas aparecem após 4 meses e meio em *B. chilense* e em *B. cycadifolium* após 7 meses de cultivo.

Randi (1996) cita que a máxima germinação de esporos de *Acrosticum danaeifolium* ocorre após 9 dias de embebição a 25°C e que os esporos mantiveram sua viabilidade por cerca de 3 anos estocados em frasco de vidro a 3°C. A germinação foi mais alta após 48 horas de embebição no escuro. Tratamento de 12 horas diárias de luz com alternância de temperatura (20°C-30°C) causou o mesmo efeito que a germinação em luz contínua. Os lipídios representaram cerca de 50% do peso dos esporos, seguidos por proteínas solúveis, açúcares solúveis e amido.

Camloh et al. (1996), na sequência de seus estudos envolvendo *Platyserium bifurcatum*, estudaram os efeitos do ácido jasmônico (JA) na germinação de esporos, desenvolvimento inicial de gametófitos e cultura de protoplastos de esporófitos. O JA não influenciou na germinação inicial dos esporos, nem na iniciação do rizóide primário, mas promoveu significativamente o desenvolvimento inicial de gametófitos. Esses pesquisadores concluíram que o JA deve estar envolvido nos estágios iniciais de desenvolvimento de *Platyserium bifurcatum*.

De acordo com Fernández et al. (1996 a), rizomas de esporófitos jovens de *Blechnum spicant* e *Pteris ensiformis*, cultivados em meio MS com BAP ou em combinação com ANA, dariam início a vários centros de proliferação localizados na epiderme e próximo ao parênquima destes órgãos após um mês em cultura. O subcultivo desses rizomas por um mês, em meios contendo reguladores de crescimento, permitiu a organização de centros internos de proliferação e a regeneração de um grande número de esporófitos. O subcultivo do material anteriormente mencionado induziu a mudança de fase e o

desenvolvimento de gametófitos apospóricos na superfície dos centros de proliferação. A adição de ANA ao meio de cultura promoveu a proliferação de corpos verdes globulares em *Blechnum spicant* e processos rizogênicos e calogênicos em *Pteris ensiformis*. Os corpos verdes globulares dos rizomas de *B. spicant* produziram numerosos esporófitos e, do ponto de vista da micropropagação, são um bom sistema para regenerar esporófitos nesta espécie.

A apogamia, ou seja, a formação de esporófitos haplóides a partir de células vegetativas do gametófito, de ocorrência natural em algumas samambaias, pode ser modificada pelas condições de cultura e pelos reguladores de crescimento. No cultivo de *Dryopteris affinis* sp. *affinis* em meio MS, variou-se a concentração de sacarose, ágar e pH. Observou-se que, adições de BAP (4,43 μ M) e ANA (0,53 μ M) aumentaram a proliferação dos esporófitos a partir de gametófitos (Fernández et al., 1996 b).

A regeneração gametofítica e esporofítica, a partir de gemas de escamas de *Platyserium bifurcatum*, foi estudada por Dolinsek & Camloh (1997). A regeneração teve início como um rizóide ou como proliferação de uma ou mais células de escamas em crescimentos indiferenciados, distinguíveis das células adjacentes por sua forma e coloração. Os mesmos converteram-se em ramos adventícios, gametófitos apospóricos ou permaneceram indiferenciados. A sacarose promoveu aumento da viabilidade e regeneração além de promover o desenvolvimento de rizóides, mas concentrações superiores a 0,1% tenderam a inibir a aposporia.

Culturas de suspensões celulares foram iniciadas a partir de calos derivados de gametófitos de *Platyserium coronarium* (Kwa et al., 1997). Dois tipos distintos de calos, diferenciados pela coloração, foram obtidos e as células da cultura em suspensão foram distribuídas em meio MS semi-sólido contendo 10 μ M de cinetina. Os gametófitos do calo verde escuro apresentaram uma rápida taxa de crescimento e de morfogênese quando comparados com o calo

esporofítico verde claro. O conteúdo total de clorofila, o tamanho dos cloroplastos dos calos esporofíticos e as culturas celulares em suspensão foram menores do que as dos calos gametofíticos.

Teng & Teng (1997) desenvolveram suspensão celular na qual esporófitos de *Platyserium bifurcatum* puderam ser regenerados diretamente de células de folhas ou indiretamente através de um estágio gametofítico apospórico sob as mesmas condições de cultivo. Células isoladas ou agregados de mais de 100 células desenvolveram gametófitos apospóricos que, mais tarde, deram origem a esporófitos. Na maioria dos casos apenas um esporófito foi regenerado de um gametófito. Agregados de 500-1000 ou mais células, por outro lado, regeneraram esporófitos diretamente. A interação intercelular foi considerada como sendo a causa fisiológica, e a separação das células das folhas a um certo nível direcionou diferentes padrões de regeneração.

Gametófitos de *Osmunda regalis* foram cultivados *in vitro* por Fernández et al. (1997 a) para determinação das condições ótimas de crescimento e desenvolvimento. O meio de cultura com baixas concentrações de amônia (Knop, Knudson ou $\frac{1}{4}$ Murashige e Skoog) foi mais efetivo para o crescimento desses organismos. A adição de sacarose e manitol, de mesmo potencial osmótico ao meio de cultura, inibiu ou aumentou, respectivamente, o crescimento e o desenvolvimento dos gametófitos, que apresentaram forte autotrofia *in vitro*. No escuro ocorreu o crescimento e formação de órgãos sexuais. A formação de gemas foi especialmente descrita pela primeira vez nessa espécie e esse processo não ocorreu sem sacarose no meio de cultura ou no escuro.

O crescimento de gametófitos de *Blechnum spicant* foi ótimo em meio MS líquido, com fotoperíodo de 16h, e não foi afetado pela variação do pH entre 4,7 e 8,7 nos experimentos realizados por Fernández et al. (1997 b). Houve inibição de anteridiogênese com AIB a 5 e 50 μM e BA a 50 μM .

Esporófitos de *Asplenium nidus* e *Pteris ensiformis* foram cultivados por Fernández et al., (1997 c) em meio MS suplementado com 4,4 μM de BAP. Os rizomas foram isolados e transferidos para meio MS livre de reguladores de crescimento. Em *P. ensiformis* os explantes do rizoma se desenvolveram em esporófitos e em *A. nidus* ocorreram tanto regeneração gametofítica quanto esporofítica.

O padrão germinativo de *Pteris berteriana* foi do tipo *Vittaria*, formando gametófitos filamentosos unisseriados de 3-5 células que resultaram em esporófitos (Mendoza et al., 1997). Em *Niphidium crassifolium* (Jaramillo et al., 1996), o desenvolvimento morfogênico foi semelhante ao de espécies da família Polypodiaceae, especialmente *Campyloneurum angustifolium*, com aparecimento de esporófitos após 90 dias da sementeira. Esporos de *Thyrsopteris elegans* (Pérez-García et al., 1997) apresentaram germinação observada em *Cyathea* e o desenvolvimento protálico correspondeu ao observado em *Drynaria*, com aparecimento de esporófitos após 200 dias de sementeira.

Em culturas de suspensão de células de folhas de *Platyserium bifurcatum*, a incorporação de carvão ativado aumentou o número de esporófitos regenerados, mesmo em meio sem reguladores de crescimento (Teng, 1997). O grau de aumento foi dependente do tamanho dos agregados celulares e da composição do meio. O máximo aumento foi observado em meio com 5,37 μM de ANA e 4,44 μM de BAP, de 9 para 1520 esporófitos. A adição de carvão ativado induziu a regeneração de esporófitos isolados (pouco comum), prevenção da formação de aglomerados de gametófitos e de brotos, além da prevenção da ocorrência da hiperidricidade dos esporófitos regenerados.

Thakur et al. (1998), utilizaram ramos laterais, originados em meristemas de rizomas, seccionados como explantes para rápida propagação *in vitro* de *Matteuccia struthiopteris*. Uma multiplicação meristemática muito

rápida foi obtida cultivando-se os explantes em meio MS ½ líquido suplementado com 2,0 mg/l de 4-PU e 0,5mg/l de TDZ. A multiplicação de primórdios dos ramo foi mais rápida em culturas em suspensão do que em meio sólido. A rizogênese e o crescimento de regenerantes foram melhor ativados em meio MS ¼ sólido, sem reguladores de crescimento, adicionado de 0,4% de ágar e 1,0% de carvão ativado.

Em um fragmento de floresta mesófila de montanha no México, as três espécies de pteridófitas arborescentes mais comuns (*Alsophila firma*, *Lophosoria quadripinnata* e *Sphaeropteris horrida*) foram selecionadas por Bernabe et al. (1999) para estudos *in vivo* e *in vitro*. Os autores tiveram o objetivo de determinar as porcentagens de germinação de esporos e de gametófitos que produzem esporófitos e de comparar o estabelecimento dos esporófitos no interior e na borda da floresta. A porcentagem de germinação de esporos variou entre 16 e 86% e o número de gametófitos que produziu esporófitos foi superior a 50%. A sobrevivência foi maior na borda do que no interior do bosque para *Lophosoria*, mas foi similar para os indivíduos de *Alsophila* e *Sphaeropteris*. A taxa de crescimento relativo foi maior na borda que no interior do bosque, para os esporófitos das três espécies estudadas. Os resultados sugeriram que a borda é um *habitat* apropriado para o estabelecimento de *Alsophila* e *Lophosoria*, mas que *Sphaeropteris* é, aparentemente, uma espécie de interior de bosque.

Estudos preliminares conduzidos sobre a germinação com esporos de *Dicksonia sellowiana* indicaram que são fotoblásticos positivos e atingiram a máxima porcentagem de germinação a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ em luz branca, após 8 ou 9 dias de embebição. A fase de pré-indução, para esporos induzidos por 24 horas de luz branca ou vermelha, foi de 72 horas. Os gametófitos crescidos em luz branca apresentaram formato plano e bidimensional, enquanto os crescidos sob luz vermelha mostraram aparência filamentosa. Verificou-se que houve correlação

entre a porcentagem de germinação e o número de horas diárias de luz branca de longa duração. Estudando o efeito das diferentes intensidades luminosas, foi observado que cortes de 57 e 98% da luz solar máxima produziram as menores porcentagens de germinação enquanto que cortes de 74, 79, 81 e 96% produziram porcentagens de germinação mais alta. Os esporos apresentaram 82% de germinação após 731 dias de armazenamento sob refrigeração a aproximadamente 10°C (Filippini et al., 1999).

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- MATERIAL:

Esporos de *Dicksonia sellowiana* foram coletados em 12 de março de 1998, de frondes férteis de plantas que ocorrem na Reserva Particular do Patrimônio Natural de Caraguatá, situada no município de Antônio Carlos, Estado de Santa Catarina.

Após a coleta, as frondes secaram sobre papel de filtro, em estufa com circulação de ar, em temperatura ambiente, durante 72 horas, para induzir a abertura dos esporângios e a liberação dos esporos. Posteriormente, os esporos foram separados dos esporângios, por filtragem em papel de lente e armazenados em frascos de vidro sob refrigeração (Randi, 1987).

2.2- MÉTODOS:

2.1.1- Germinação de esporos:

Para cada tratamento testado foram semeadas cerca de 50 mg de esporos, em 2 frascos erlenmeyers de 50 ml contendo 20 ml de meio de Dyer (Tabela 1), utilizando-se espátula. Todo o procedimento foi conduzido em capela de fluxo laminar.

Posteriormente, os erlenmeyers tampados com filme de polipropileno de uso doméstico Assafácil®, cortado em quadrados duplos (7x7 cm), fixos por elástico e filme de PVC. Os frascos foram mantidos em sala de cultura, a $25\pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de 74% e intensidade luminosa de $31,68 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, na altura dos erlenmeyers, providas nas lâmpadas fluorescentes brancas. O fotoperíodo utilizado foi de 16 horas. A germinação foi avaliada a cada 7 dias. Essas condições de cultivo foram mantidas em todos experimentos, incluindo o crescimento de gametófitos, com exceção dos conduzidos com iluminação natural.

Para cada tratamento foram preparadas 4 lâminas e foram contados 100 esporos por lâmina, em microscópio binocular e aumento de 400 vezes.

Tabela 1- Composição química do Meio de Dyer:

Componentes Químicos	Quantidade
MgSO ₄ .7H ₂ O	510 mg/l
KNO ₃	120 mg/l
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O.....	1440 mg/l
KH ₂ PO ₄	250 mg/l
Solução de FeSO ₄ .7H ₂ O e NaEDTA.....	1 ml.
Preparação da Solução de FeSO ₄ .7H ₂ O e NaEDTA: 33,2 g de NaEDTA, 3,65 g de NaOH e 25 g de FeSO ₄ .7H ₂ O para 1L de água destilada.	

2.2.2- Esterilização de esporos:

Uma série preliminar de diferentes tratamentos foi realizada, durante aproximadamente 2 meses, para a obtenção de um método ideal de esterilização de esporos. Foram testados os seguintes métodos de esterilização:

Método 1:

Os esporos foram imersos durante 10 minutos em soluções a 5, 10, 15 e 20% (v/v) de hipoclorito de sódio comercial, cujo teor de cloro ativo é de aproximadamente 2%. Após esse procedimento foi feita a lavagem com água autoclavada, esterilizada para a remoção do hipoclorito e filtragem sobre papel de filtro, a vácuo.

Método 2:

O material foi imerso durante 15 minutos em soluções de hipoclorito de sódio comercial a 10, 15 ou 25% (v/v), acrescidas de uma gota de detergente comercial, como agente surfactante. Após os tratamentos com hipoclorito, procedeu-se à lavagem do material com água destilada esterilizada, conforme descrito anteriormente. Os esporos foram, então, semeados em erlenmeyers de 50 ml, contendo 20 ml de solução de Dyer, acrescida de 100 mg/ml de Nistatina (Micostatin - Squibb - Bristol - Myers Squibb 500.000 UI).

Método 3:

O material foi embebido em água destilada, durante 24 horas, e então foi imerso em hipoclorito de sódio comercial a 25% (v/v), acrescido de 1 gota de Tween 20 (Labsynth), durante 20 minutos. Os esporos, posteriormente lavados em água destilada esterilizada, foram filtrados a vácuo e semeados em solução de Dyer acrescida de 100 mg/ml ou 500 mg/ml de Nistatina.

Método 4:

Os esporos foram pulverizados com álcool etílico comercial, a 70% (v/v), por 5 segundos e, após, foram lavados em solução de hipoclorito de sódio comercial, a 30, 40 ou 50% (v/v), durante 20 minutos, passando em seguida pelo processo de lavagem em água autoclavada descrito anteriormente. A seguir, foram semeados em meio de Dyer acrescido de 500 mg/ml de Nistatina.

Método 5:

Os esporos não esterilizados foram semeados diretamente em meio de Dyer, contendo 2% (m/v) de sacarose, e acrescido de Benomyl a 0,005 ou 0,01% (v/v).

Em virtude de todos os métodos de esterilização testados até essa etapa não terem sido bem sucedidos, foi adotada, então, a série de métodos descrita na Tabela 2. Não houve contaminação dos esporos esterilizados quando foram empregados os métodos b, c, d, i, k e l.

O melhor método de esterilização foi finalmente definido como sendo a imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial, a 35% (v/v), durante 60 minutos, contendo uma gota de Tween 20, seguida de lavagem em água esterilizada. Esse passou a ser o método de esterilização padrão, adotado nos experimentos posteriores envolvendo a germinação de esporos e o cultivo de gametófitos *in vitro*.

Tabela 2- Testes de esterilização em esporos de *Dicksonia sellowiana*.

Tratamento	Hipoclorito Comercial com Tween 20		Cloramina T (Riedel)	
	Concentração %	Duração (minutos)	Concentraçã o %	Duração (minutos)
A	60	10	-	-
B	20	60	-	-
C	30	60	-	-
D	20	120	-	-
E	30	120	-	-
F	30	120	5	10
G	20	120	10	10
H	30	120	10	10
I	40	10	5	10
J	60	10	5	10
K	20	60	5	10
L	30	60	5	10
M	40	10	10	10
N	60	10	10	10
O	20	60	10	10
P	30	60	10	10

2.2.3- Criopreservação de esporos

Foram realizados dois experimentos envolvendo a criopreservação de esporos, previamente esterilizados, conforme descrito em 2.2.2. Os esporos foram depositados em criofrascos de polipropileno autoclavados, com capacidade para 1 ml, submersos em nitrogênio líquido (NL) por 15 minutos, e foram submetidos a dois métodos de degelo: (1) rápido, sendo imersos em água a 45°C, por 5 minutos, ou (2) lento, em temperatura ambiente, segundo Agrawal et al. (1993), contendo ou não crioprotetor. A solução de crioprotetores foi composta de Dimetil Sulfoxido (DMSO-Nuclear®) a 15% (v/v), em glicerol a 1M (Withers & King, 1979 apud Bhojwani & Razdan, 1983), diluídos em meio de Dyer. Amostras de esporos foram embebidas em solução de crioprotetores por 2 horas. Os esporos, tratados com solução de crioprotetores, congelados ou não, foram levados novamente à câmara de fluxo laminar, para uma nova lavagem com água destilada autoclavada e filtrados a vácuo, antes da semeadura em meio de Dyer para a avaliação da germinação.

2.2.4- Armazenamento de esporos em NL

Amostras de esporos foram acondicionadas em criofrascos, como descrito em 2.2.3 e foram mantidas imersas em tambor de nitrogênio líquido durante os períodos de 15, 30, e 90 dias. Após cada período de armazenamento, amostras foram submetidas ao degelo rápido e ao degelo lento, conforme descrito anteriormente, e procedeu-se à análise da germinação, conforme descrito em 2.1.2.

2.2.5- Diferença das massas fresca e seca de amostras de esporos

Amostras de esporos esterilizados foram distribuídas em pequenos frascos de vidro, previamente esterilizados, cujo peso era conhecido. Utilizou-se pequena espátula de aço, em forma de colher, como medida. Cada frasco recebeu uma numeração. Os frascos contendo as amostras foram tampados, tendo sido esse procedimento realizado em capela de fluxo laminar. As amostras contidas nos frascos foram, então, pesadas, tendo o peso dos frascos vazios sido subtraído do peso dos frascos que continham as amostras, para se conhecer o peso da massa fresca das amostras de esporos. O peso médio das amostras foi de aproximadamente 100 mg.

2.2.6- Efeito dos meios líquidos de Dyer e MS, de concentrações salinas do meio MS e de sacarose na germinação e crescimento inicial de gametófitos

Para o experimento envolvendo o efeito da concentração do meio, amostras de esporos, cujos pesos das massas frescas eram conhecidos, foram distribuídas em erlenmeyers contendo 20 ml de meio MS- Murashige-Skoog (Sigma®) em concentração salina total ou reduzida de $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$. Foram utilizadas 8 repetições por tratamento. Um mês após o início do experimento, os gametófitos foram filtrados a vácuo, pesados e secos em estufa com circulação de ar, a 70°C, durante 48 horas. Os pesos das massas fresca e seca foram avaliados e o material eliminado.

Para o estudo da influência dos meios de Dyer e MS acrescidos de sacarose na germinação de esporos e crescimento inicial de gametófitos de *D. sellowiana*, acrescentou-se esta fonte de carbono aos meios nas concentrações 0,

1, 2, 3, 4 e 5% (m/v). Procedeu-se como já descrito e foram utilizadas 8 repetições de amostras de esporos, com pesos de massa fresca conhecidos. Após 1 mês, os pesos das massas fresca e seca foram avaliados.

Paralelamente, foram feitas curvas de germinação para os esporos embebidos em meio MS com as concentrações salinas reduzidas sem adição de sacarose e em meios de Dyer ou MS, com concentração salina total, acrescidos de sacarose (0, 1, 2, 3, 4 e 5%-m/v). Utilizaram-se amostras de esporos de peso de massa fresca conhecido, distribuídas em 3 erlenmeyers por tratamento, sendo selecionados 2 para a confecção de lâminas e avaliação da germinação.

2.2.7-Efeito da sacarose sobre o cultivo *in vitro* de gametófitos em meios solidificados

Esporos esterilizados, conforme descrito anteriormente, foram semeados em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de Dyer, acrescido de Benomyl a 0,01%. Após 2 meses, amostras de gametófitos foram retiradas dos tubos de ensaio, em câmara de fluxo laminar, e foram colocadas por alguns segundos sobre papel de filtro autoclavado para retirada do excesso de umidade. O peso da massa fresca foi obtido. Utilizaram-se 5 repetições por tratamento. O peso médio da massa fresca de amostras de gametófitos foi de 100mg. Essas amostras foram, então, transferidas para frascos tipo “baby food” (Sigma®) de 100 ml, contendo 20 ml de meio Dyer, suplementado com sacarose a 0, 1, 2, 3, 4 e 5% (m/v), acrescido de Benomyl a 0,01% e solidificado com Phytigel® (Sigma®) a 0,2% (m/v). Os gametófitos foram cuidadosamente separados com pinças. Acrescentaram-se 5 ml de água autoclavada sobre os gametófitos já transferidos para os novos meios, a fim de propiciar umidade necessária ao

desenvolvimento. Procedeu-se da mesma maneira para as amostras transferidas para o meio MS, acrescido de sacarose a 0, 1, 2, 3, 4 e 5% e de meio MS $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ sem adição de sacarose. As culturas foram matidas sob intensidade luminosa foi de $45,45 \mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ e o fotoperíodo de 16 horas. Após 130 dias de cultivo, as massas fresca e seca foram avaliadas.

2.2.8-Efeito do (BAP) na germinação e crescimento inicial de gametófitos em meio líquido e meio sólido

Aos meios líquidos de Dyer e MS $\frac{1}{4}$ foi acrescido BAP nas concentrações de 0 M, 10^{-7}M , $5 \times 10^{-7}\text{M}$, 10^{-6}M e 10^{-5}M . Para cada concentração, foram feitas 10 repetições. Amostras de esporos esterilizados, cuja massa fresca inicial era conhecida, foram distribuídas nos erlenmeyers contendo os meios. A germinação foi avaliada semanalmente. As massas fresca e seca foram avaliadas após 30 dias.

Para se verificar o crescimento inicial dos gametófitos em meio sólido, o meio MS foi solidificado com Phytigel® a 0,2%, acrescido de sacarose a 2% e BAP, nas concentrações 0 M, 10^{-7}M , $5 \times 10^{-7}\text{M}$, 10^{-6}M e 10^{-5}M . Para cada concentração, foram utilizados 10 potes tipo “baby food”, contendo 10ml de meio. Gametófitos obtidos a partir de material semeado 30 dias em meio líquido de Dyer foram pesados, conforme descrito em 4.2.4. Os gametófitos foram transferidos para o meio solidificado e foi adicionado um filme d’água de 5ml à superfície do meio. As culturas foram mantidas nas condições mencionadas no item 2.2.1. Após 60 dias em meio solidificado, os gametófitos foram retirados, pesados e secos, em estufa a 70°C , durante 48 horas, para avaliação do peso da massa seca.

2.2.9-Efeito da intensidade luminosa na germinação e crescimento inicial de gametófitos em meio líquido

Amostras de esporos esterilizados (vide 2.1.3) foram semeadas conforme 2.1.2. Quatro caixas de 50cm x 50cm foram revestidas com tela “sombrite” para reduzir a luminosidade total em 50, 64, 80 e 95% e mantidas em condições ambientais, nas dependências do Departamento de Botânica da UFSC, 90 dias.

Os erlenmeyers contendo os esporos, foram acondicionados em bandejas plásticas perfuradas, que permaneceram dentro das caixas no decorrer do experimento. Após 90 dias em meio de cultura líquido (Dyer), os gametófitos dos 10 erlenmeyers de cada uma das caixas, os quais continham massa inicial de esporos conhecida, foram filtrados a vácuo, pesados e a massa fresca foi obtida. O crescimento de gametófitos foi avaliado por meio da quantificação de incremento de massa fresca.

Paralelamente procedeu-se à avaliação semanal da germinação e à coleta, em períodos de 0 e 48 dias, de amostras para a determinação de açúcares solúveis totais e clorofilas.

2.2.10- Extração de açúcares e clorofilas de gametófitos

2.2.10.1.Extração de açúcares totais

Três amostras de esporos, de peso inicial conhecido, foram utilizadas para as extrações, após 48 dias de crescimento sob caixas de sombrite. As amostras foram maceradas separadamente em gral a seco até sua homogeneização. Adicionaram-se 4 ml de MCW (metanol-Omnisolv®EM

Science/clorofórmio- Merck®/água, na proporção 12:5:3-v/v), segundo adaptação do método de Shannon (1968). Após centrifugação por 5 minutos a 2000g, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e o precipitado extraído novamente com 2 ml de MCW. O sobrenadante foi acrescido ao anterior. O extrato foi quantificado e fracionado na seguinte proporção: 4 partes do extrato, 1 parte de clorofórmio e 1,5 partes de água. Após centrifugação, por 10 minutos, a fase superior (aquosa) foi retirada, com o auxílio de uma pipeta Pasteur e o volume foi medido em tubo de centrifugação graduado. As fases aquosas foram guardadas em frascos escuros sob refrigeração.

Açúcares solúveis totais foram dosados das fases aquosas, utilizando-se o reagente de Antrona (McCready et al., 1950). Foram dissolvidos 200mg de antrona (Vetec®) em 100 ml de ácido sulfúrico (Merck®) 95% (v/v). Aguardou-se uma hora. Aliquotas de 1 ml dos extratos foram acrescidas de 2 ml do reagente de antrona. Os tubos de ensaio foram agitados e aquecidos em banho-maria até a ebulição, durante 5 minutos. Os cálculos de açúcares solúveis totais foram obtidos a partir dos resultados da curva padrão, na qual foram usadas concentrações de 20 a 100 µg de glicose por mililitro. A absorbância foi lida a 620nm.

2.2.10.2. Extração de clorofilas

Três amostras de gametófitos de peso conhecido foram utilizadas para as extrações, após 48 dias de cultivo sob caixas de sombrite. Após maceração dos gametófitos a seco, em graal, adicionaram-se 5 ml de acetona (Merck®) a 80%. O conteúdo foi transferido para tubos de centrifugação revestidos com papel alumínio e vedados com filme de PVC. Mais 5 ml de acetona 80% foram adicionados ao graal para a retirada completa dos resíduos, e estes foram

adicionados aos tubos de centrifugação. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2000g. O sobrenadante foi transferido para frasco escuro. Ao precipitado foram adicionados 10 ml de acetona 80% (v/v) e procedeu-se à nova centrifugação, conforme descrito anteriormente. Os sobrenadantes foram agrupados e os volumes medidos, em proveta, completando-se com acetona até 20ml. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 645 e 663 nm, conforme Arnon (1949).

O conteúdo de clorofila foi calculado pela seguinte equação:

$$C = (20,2 \times D_{645} + 8,02 \times D_{663}) \times \frac{\text{volume - extrato}}{1000\text{ml} \times \text{Peso - tecido} / g} = \text{mg clorofila/g tecido}$$

2.3-ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos experimentos de germinação, os valores obtidos em porcentagem foram transformados em valores angulares (arco seno $\sqrt{\%}$). Os resultados foram apresentados em tabelas ou figuras e as análises estatísticas foram realizadas após a transformação dos dados (Snedecor, 1962). Foram realizadas a análise de variância simples ou multifatorial e o Teste de Tukey. Calculou-se a DMS_{5%} quando era detectada diferença significativa entre os tratamentos.

Nos experimentos de dosagens bioquímicas, os resultados foram obtidos a partir de curvas padrões de concentrações conhecidas das substâncias a serem dosadas, cujo coeficiente de correlação r foi calculado.

Os testes e análises estatísticas foram realizados obedecendo-se as recomendações de Snedecor (1962) e as tabelas utilizadas foram as de Fisher e Yates (1971).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- CRIOPRESERVAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE ESPOROS EM NL

A Figura 1 mostra a curva de germinação de esporos de *D. sellowiana* imersos durante 15 minutos em NL. Após 21 dias, houve aumento nas porcentagens de germinação de esporos imersos em NL e degelados rápida ou lentamente em relação ao controle.

A Figura 2 representa a curva de germinação, nas mesmas condições que a curva anterior, de esporos previamente embebidos em solução de crioprotetor que posteriormente foram imersos em NL. A porcentagem de germinação dos esporos embebidos em solução de crioprotetor, mas que não foram imersos em NL, foi alta. Entretanto, não houve germinação dos esporos embebidos em solução de crioprotetor DMSO e que posteriormente foram imersos em NL.

A Figura 3 mostra a curva de germinação de esporos de *D. sellowiana* mantidos em NL sem crioprotetor durante 15 dias. Após 10 e 20 dias de embebição no meio de Dyer, esporos do controle apresentaram porcentagens de germinação significativamente maiores do que os imersos em NL. Entretanto, após 30 dias de embebição, os esporos imersos em NL apresentaram porcentagens de germinação estatisticamente superiores aos esporos do controle, independentemente do tipo de degelo utilizado.

A Figura 4 mostra a curva de germinação de esporos de *D. sellowiana* mantidos em NL durante 1 mês. Após 10 e 20 dias de cultivo, observou-se que as

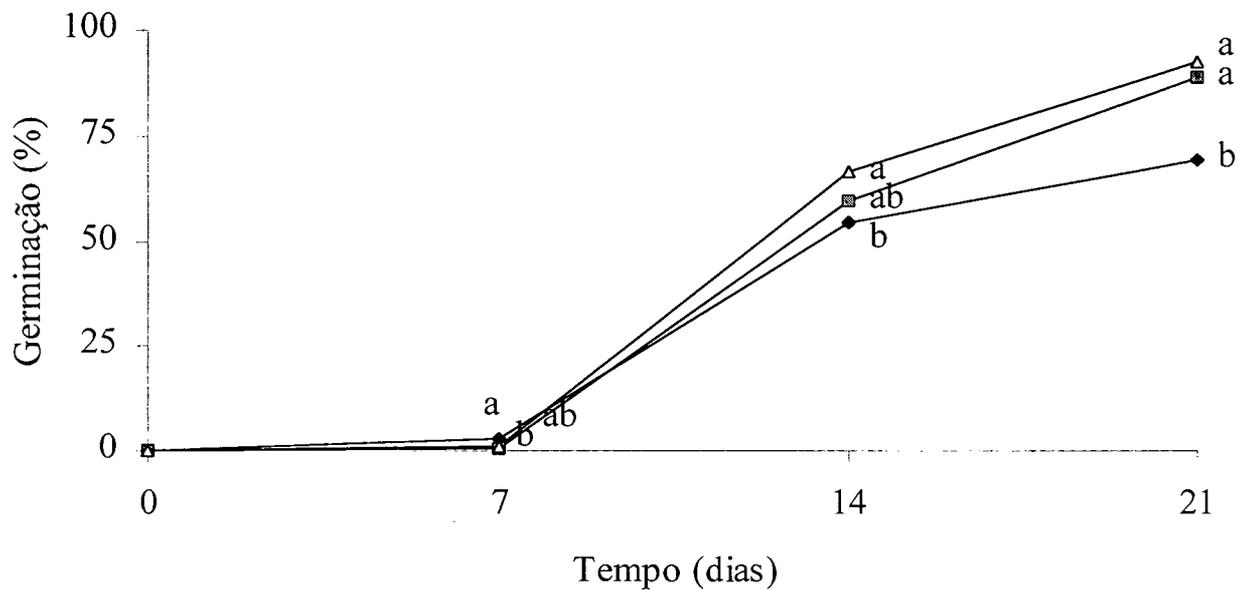


Figura 1- Germinação de esporos de *D. sellowiana* imersos em NL por 15 minutos. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, para cada dia de avaliação de germinação.

◆-controle (material que não foi imerso em NL)

■-degelo lento

▲-degelo rápido

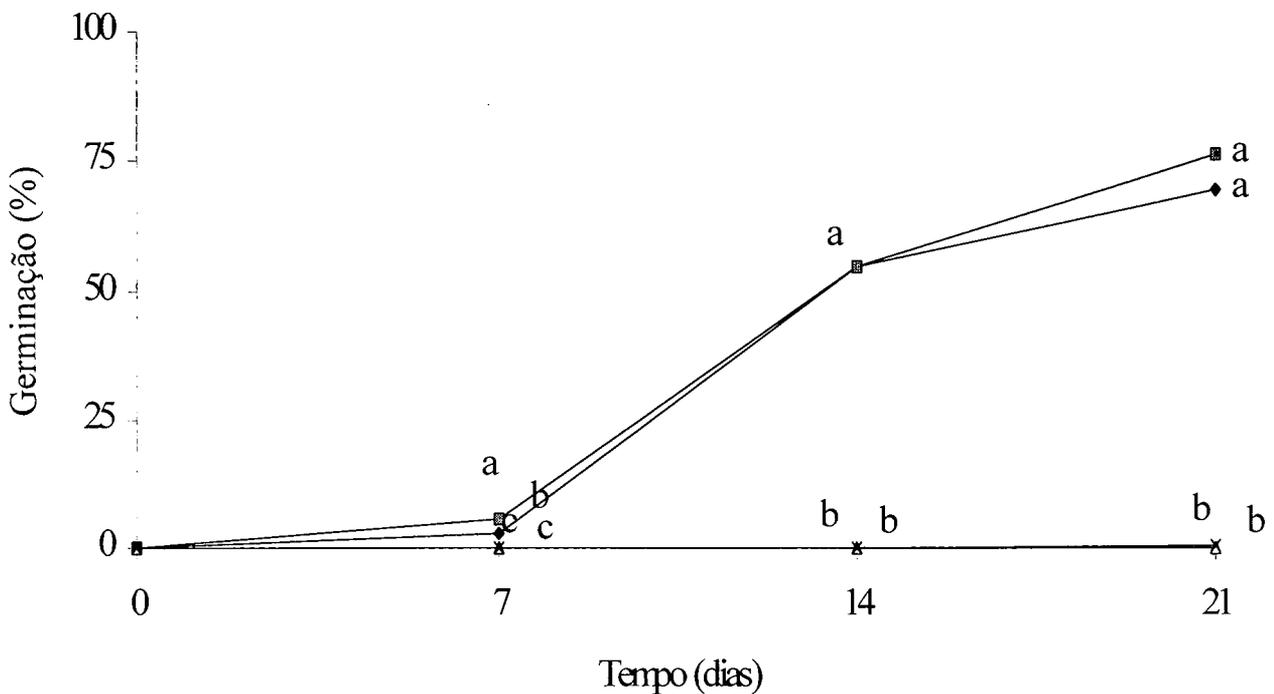


Figura 2- Germinação de esporos de *D. sellowiana* embebidos em solução de crioprotetor e imersos em NL por 15 minutos. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, para cada dia de avaliação de germinação.

◆-controle (material que não foi imerso em NL mas em solução de crioprotetor)

■-controle (material que não foi imerso em NL nem em solução de crioprotetor)

×-degelo lento

▲-degelo rápido

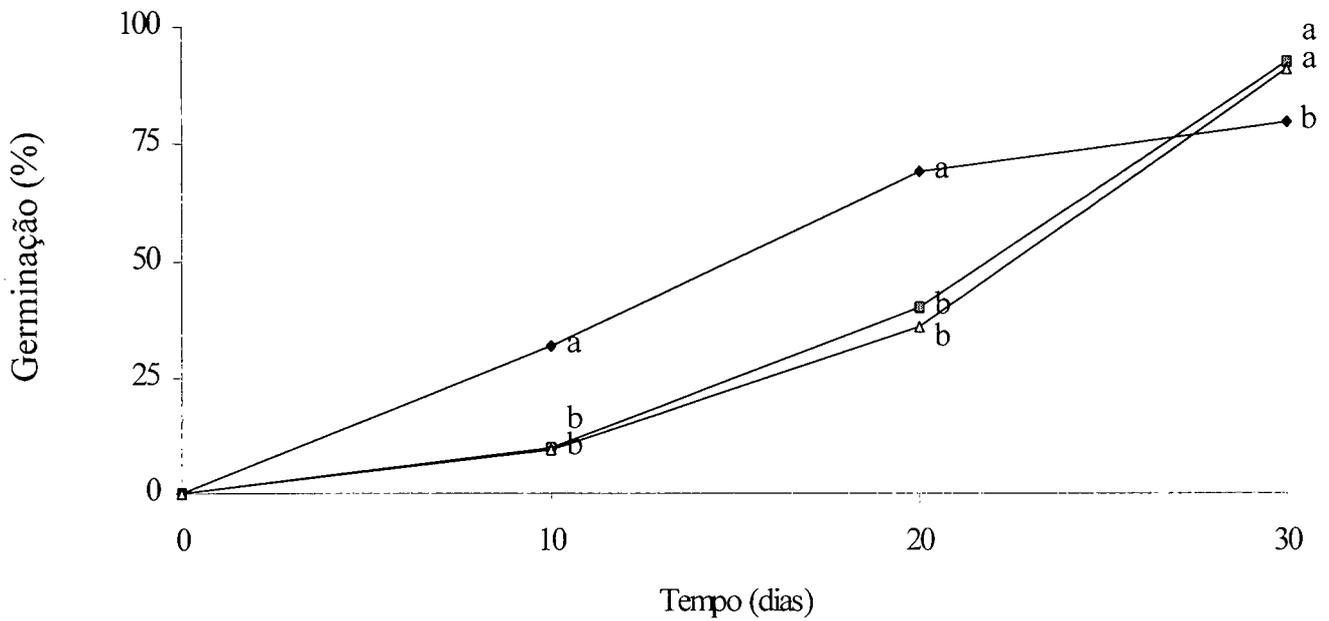


Figura 3- Germinação de esporos de *D. sellowiana* imersos em NL por 15 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, para cada dia de avaliação de germinação.

◆-controle (material que não foi imerso em NL)

■-degelo lento

▲-degelo rápido

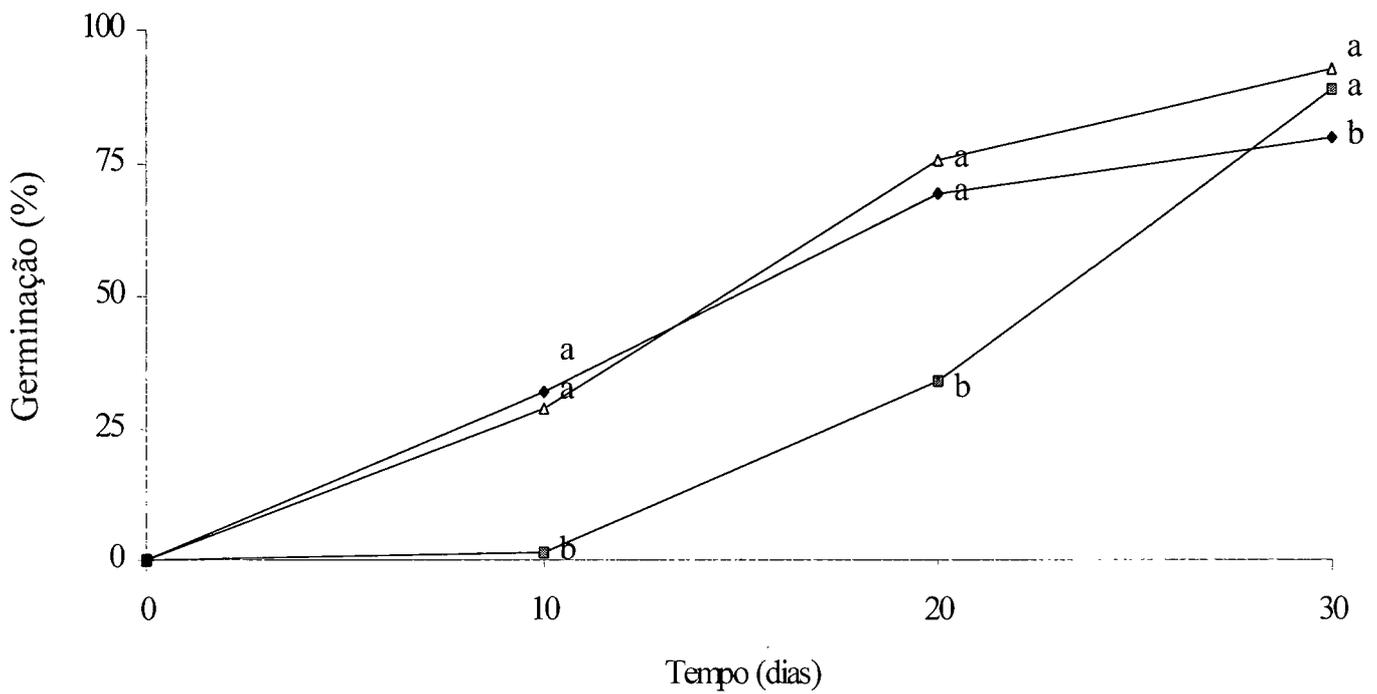


Figura 4- Germinação de esporos de *D. sellowiana* imersos em NL por 1 mês. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, para cada dia de avaliação de germinação.

◆-controle (material que não foi imerso em NL)

■-degelado lento

▲-degelado rápido

porcentagens de germinação foram maiores para esporos do controle e esporos imersos em NL, cujo degelo foi rápido, sendo estatisticamente inferior para os esporos imersos em NL, cujo degelo foi lento. Após 30 dias, a porcentagem de germinação do controle foi inferior às dos esporos imersos em NL, degelados rápida ou lentamente.

A Figura 5 mostra a curva de germinação de esporos de *D. sellowiana* mantidos em NL durante 3 meses. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os esporos do controle e os esporos imersos em NL, que foram submetidos aos degelos lento e rápido, após 10 e 20 dias de embebição em meio de Dyer. Entretanto, após 30 dias de embebição, as porcentagens de germinação de esporos imersos em NL e submetidos aos degelos lento e rápido foram estatisticamente superiores a de esporos do controle.

A criopreservação é a estocagem de células vivas em temperaturas ultra-baixas, normalmente em nitrogênio líquido. Este método de conservação a longo prazo é muito utilizado na manutenção de culturas de interesse econômico, e também é um importante componente de programas de biotecnologia vegetal (Benson et al., 1998). A viabilidade celular é mantida, durante o processo de criopreservação, por meio da aplicação de crioprotetores. Para a maioria das culturas vegetais, o uso de misturas com crioprotetores, como dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, sacarose e prolina, resulta em um aumento na sobrevivência após o degelo, quando comparado ao uso de apenas um crioprotetor, como o DMSO (Lynch & Benson, 1991).

A germinação de esporos de *Dicksonia sellowiana* criopreservados em NL ocorreu em todos os tratamentos, sem a necessidade de crioprotetor. Em esporos congelados em NL, a porcentagem de germinação foi superior após 21 dias.

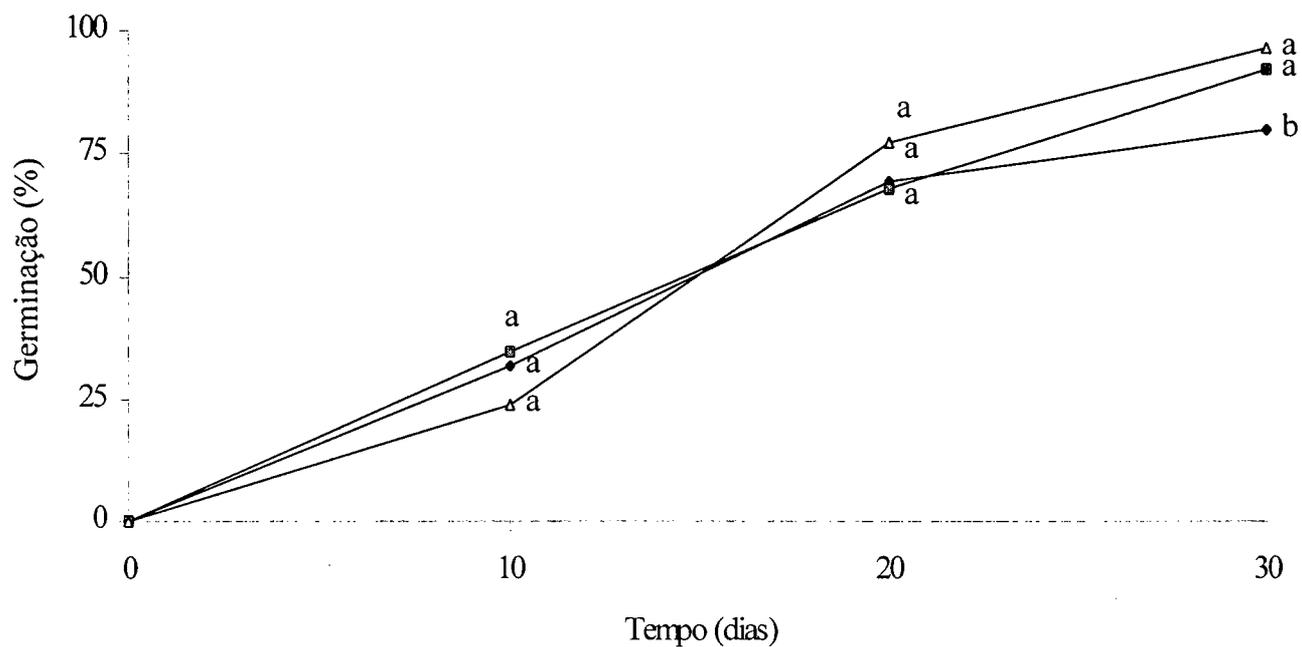


Figura 5- Germinação de esporos de *D. sellowiana* imersos em NL por 3 meses.

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, para cada dia de avaliação de germinação.

◆-controle (material que não foi imerso em NL)

■-degelado lento

▲-degelado rápido

Igualmente ocorreu nos degelos rápido ou lento, quando comparada ao controle. Agrawal et al. (1993), observaram esse comportamento apenas para esporos de *Cyathea spinulosa* congelados em NL e degelados lentamente.

Segundo Bhojwani & Razdan (1983), o DMSO é o crioprotetor mais efetivo para plantas e pode ser associado com sucesso ao glicerol. Entretanto, não houve germinação de esporos de *Dicksonia sellowiana* pré-tratados com a solução de crioprotetor, em oposição aos dados obtidos por Mycock et al. (1995), para embriões somáticos das espécies *Manihot esculenta*, *Coffea arabica* e *Phoenix dactylifera*, que apresentaram melhor recuperação com crioprotetores, independente do tratamento. Já os embriões somáticos de *Pisum sativum*, recuperaram-se melhor da criopreservação, quando pré-tratados com os crioprotetores glicerol e sacarose, e submetidos a uma desidratação parcial (Mycock et al., 1995).

O modo de ação dos crioprotetores ainda não é completamente conhecido. Supõe-se que poderiam reduzir a quantidade de sais de uma célula e restringir a formação de cristais de gelo, ou retirar água das células, deixando-as parcialmente plasmolisadas (George, 1993). A ausência de germinação dos esporos pré-tratados com a solução crioprotetora pode ter ocorrido pela retirada excessiva de água dos esporos, já que os esporos de *D. sellowiana* apresentam, em média, apenas 7% de água. Outra hipótese possível é a de que a solução de crioprotetores estaria hidratando os esporos antes do tratamento em NL, inviabilizando seu metabolismo após a criopreservação. Tais fatos poderiam ter causado danos celulares irreversíveis. Conclui-se que os esporos de *Dicksonia sellowiana* não necessitam de crioprotetores para criopreservação, podendo inclusive ser irreversivelmente prejudicados em sua presença.

Bhojwani & Razdan (1983) citam que, a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, a célula fica completamente inativa e, se os procedimentos para o congelamento e o degêlo forem observados, a recuperação de células e órgãos viáveis com capacidade de desenvolvimento em condições normais pode possibilitar sua estocagem em NL

indefinidamente, desde que seja feita uma constante suplementação de NL para manutenção da temperatura.

Segundo George (1993), uma criopreservação com sucesso deve permitir que valiosos germoplasmas sejam preservados por longos períodos. Esse autor cita ainda que muitos artigos descrevem a regeneração de plantas de uma proporção de explantes, após um breve período a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, mas que poucos descrevem com sucesso a estocagem por longos períodos.

Hanna & Towill (1995) citam a importância do armazenamento a longo prazo de estocagem como sendo o maior objetivo em programas de pesquisa, já que muitos estudos, na literatura, falam sobre armazenamento por curtos períodos e mostram sobrevivência ao NL, mas não trazem informação sobre armazenamento por longos períodos.

Segundo Lynch et al. (1994), a duração do armazenamento criogênico não afeta o potencial embriogênico de suspensões celulares reestabelecidas de material degelado, recuperando-se mais rapidamente após o degelo do que as culturas não embriogênicas.

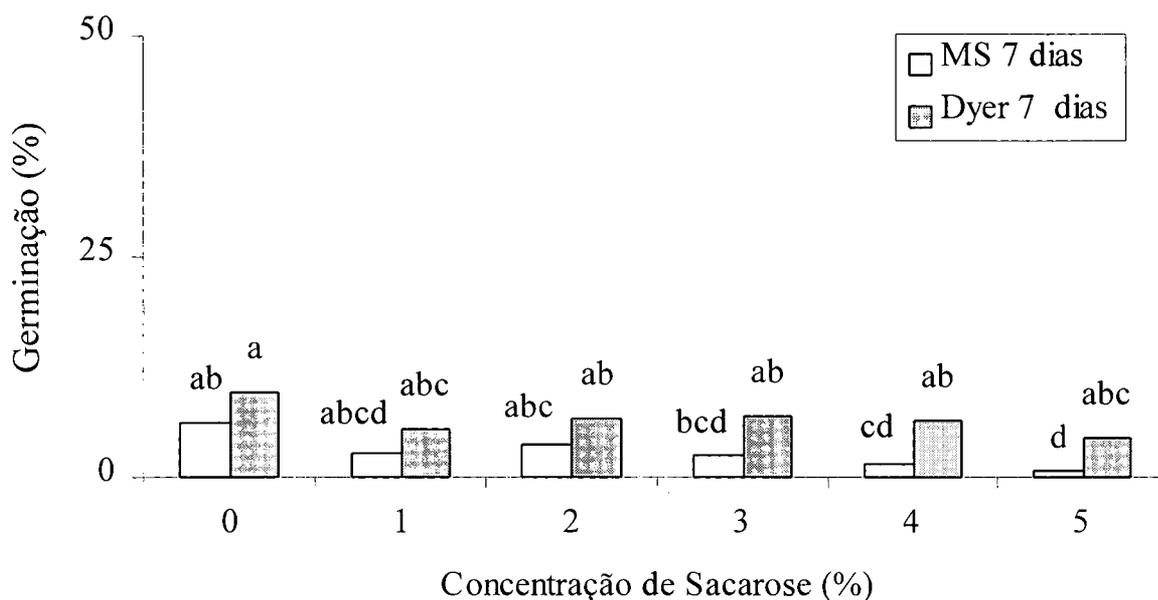
Nos experimentos com esporos de *Dicksonia sellowiana*, envolvendo períodos maiores de armazenamento em NL (15, 30 e 90 dias), observou-se grande viabilidade do material, superando, após 30 dias, até mesmo a capacidade germinativa dos esporos não congelados, confirmando as observações de Bhojwani & Razdan (1983). Esse comportamento germinativo superior dos esporos de *Dicksonia sellowiana*, pode ter sido causado em decorrência de estresse osmótico, a que são submetidos com o congelamento, acelerando a absorção de água e, conseqüentemente, a germinação.

3.2- EFEITO DOS MEIOS LÍQUIDOS DE DYER E MS, DE CONCENTRAÇÕES SALINAS DO MEIO LÍQUIDO MS E DE CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE GAMETÓFITOS

As Figuras 6-A e 6-B mostram as porcentagens de germinação de esporos de *D. sellowiana*, após 7 e 14 dias de cultivo nos meios Dyer e MS, acrescidos de 0, 1, 2, 3, 4 e 5% de sacarose.

A Figura 6-A mostra que os esporos cultivados por 7 dias em meio de Dyer, sem adição de sacarose ou acrescido de 1, 2, 3, 4, e 5 % de sacarose, apresentaram porcentagens de germinação estatisticamente semelhantes entre si. Já para os esporos que germinaram em meio MS, houve diferença significativa entre as porcentagens de germinação dos meios cujas concentrações de sacarose foram 0%, 4% e 5%. Quando se compara o meio de Dyer com o meio MS, observa-se que as porcentagens de germinação foram estatisticamente superiores para os esporos que germinaram em meio de Dyer, acrescido de 4 e 5% de sacarose, e inferiores para os esporos que germinaram em meio MS, acrescido das mesmas concentrações de sacarose.

A Figura 6-B mostra que esporos de *D. sellowiana*, cultivados por 14 dias em meio de Dyer, sem adição de sacarose, apresentaram porcentagens de germinação estatisticamente superiores aos demais tratamentos. Esporos cultivados em meio MS, sem adição de sacarose, apresentaram porcentagens de germinação estatisticamente semelhantes aos esporos cultivados em meio de Dyer, com adição de 1 e 2 % de sacarose. Da mesma forma, esporos cultivados em meio de Dyer, com adição de 3, 4 e 5 % de sacarose, não apresentaram porcentagens de germinação estatisticamente diferentes entre si. A germinação em meio de Dyer foi sempre estatisticamente superior à germinação em meio MS, em todas as concentrações de sacarose, após 14 dias.



Figuras 6-A, B e C- Germinação de esporos de *D. sellowiana* cultivados em meios de Dyer e MS líquidos acrescidos com 0, 1, 2, 3, 4 e 5% de sacarose após 7 dias de cultivo (A), 14 dias de cultivo (B) e 21 dias de cultivo (C). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, para cada dia de avaliação de germinação.

6-A- Germinação de esporos de *D. sellowiana* após 7 dias de cultivo em meios de Dyer e MS líquidos acrescidos com 0, 1, 2, 3, 4 e 5% de sacarose.

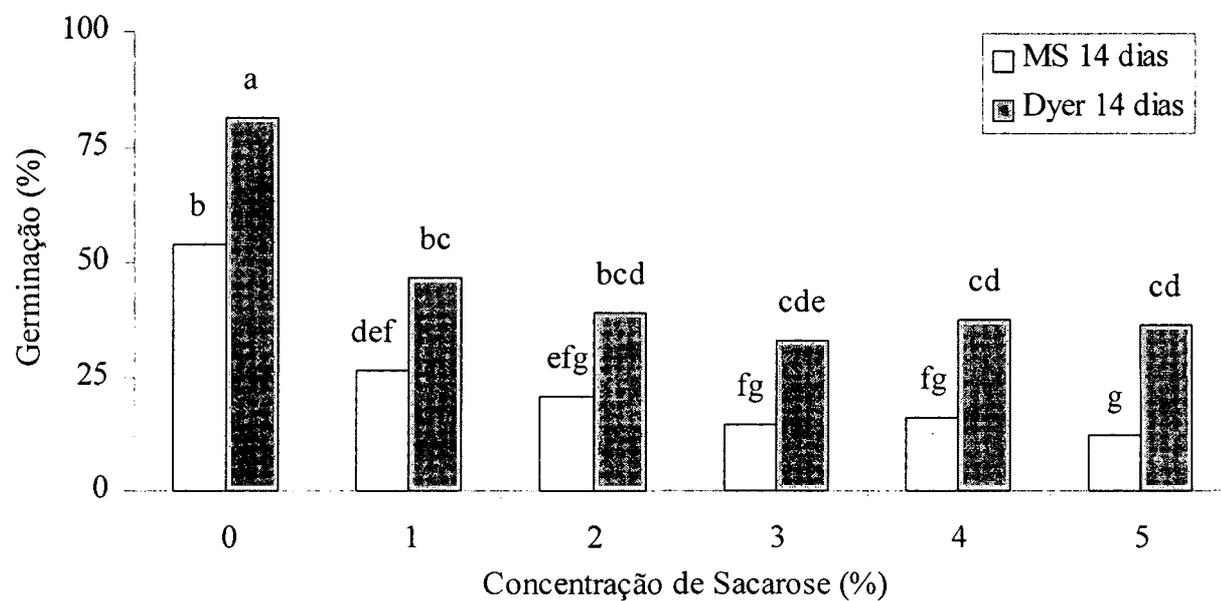


Figura 6-B- Germinação de esporos de *D. sellowiana* após 14 dias de cultivo em meios MS e Dyer líquidos acrescidos com 0, 1, 2, 3, 4 e 5% de sacarose.

Após 21 dias de cultivo (Figura 6-C), as maiores porcentagens de germinação de esporos de *D. sellowiana* ocorreram para esporos cultivados nos meios MS e de Dyer, sem adição de sacarose. Os esporos cultivados em ambos os meios com adição de sacarose apresentaram porcentagens de germinação estatisticamente semelhantes entre si.

A Figura 7 mostra o incremento em massa fresca de gametófitos de *D. sellowiana*, produzidos a partir de esporos cultivados durante 30 dias, em meios de Dyer e MS acrescidos de sacarose a 0, 1, 2, 3, 4 e 5%. Observa-se que os menores incrementos em massa fresca ocorreram para gametófitos que cresceram em meio de Dyer e MS, sem adição de sacarose, e em meio MS com adição de 5% de sacarose, que apresentaram aumento de massa fresca estatisticamente inferiores aos demais tratamentos. Não houve diferença estatisticamente significativa no incremento de massa fresca de gametófitos cultivados em meio de Dyer com adição de 1, 2, 3, 4 e 5% de sacarose, e em meio MS com adição de 1, 2, 3 e 4% de sacarose. Nota-se que a ausência de sacarose e concentração de 5% de sacarose causaram os menores incrementos de massa fresca de gametófitos crescidos em meio MS, o que não foi verificado para o meio de Dyer.

A Figura 8 mostra a variação na massa seca para gametófitos de *D. sellowiana* originados de esporos cultivados por 30 dias em meios líquidos de Dyer e MS acrescidos de 0, 1, 2, 3, 4 e 5% de sacarose. O aumento de massa seca foi estatisticamente superior para gametófitos crescidos em meio de Dyer, quando comparados aos gametófitos crescidos em meio MS, com exceção dos meios acrescidos de 2% de sacarose. Os gametófitos cultivados em meio de Dyer, suplementado com 5% de sacarose, apresentaram aumento de massa estatisticamente semelhante aos cultivados em meios suplementados com 3 e 4% de sacarose. Já os cultivados em meios suplementados com 1 e 2% de sacarose apresentaram aumento de massa inferior aos cultivados em sacarose 5%, mas

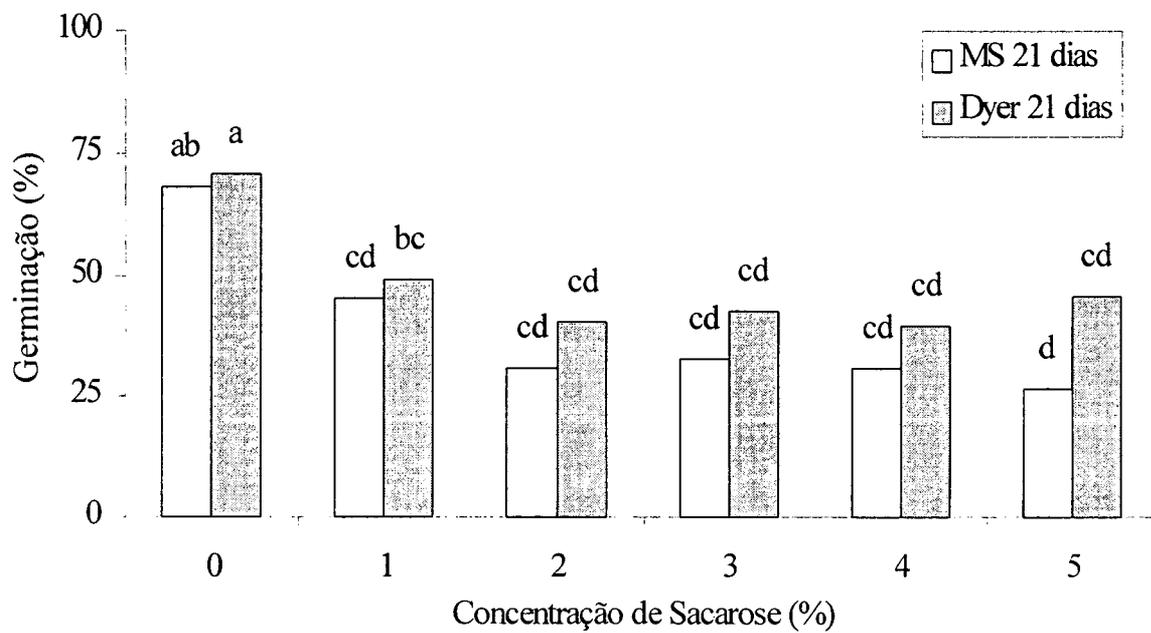


Figura 6-C- Germinação de esporos de *D. sellowiana* após 21 dias de cultivo em meios MS e Dyer líquidos acrescidos com 0, 1, 2, 3, 4 e 5% de sacarose

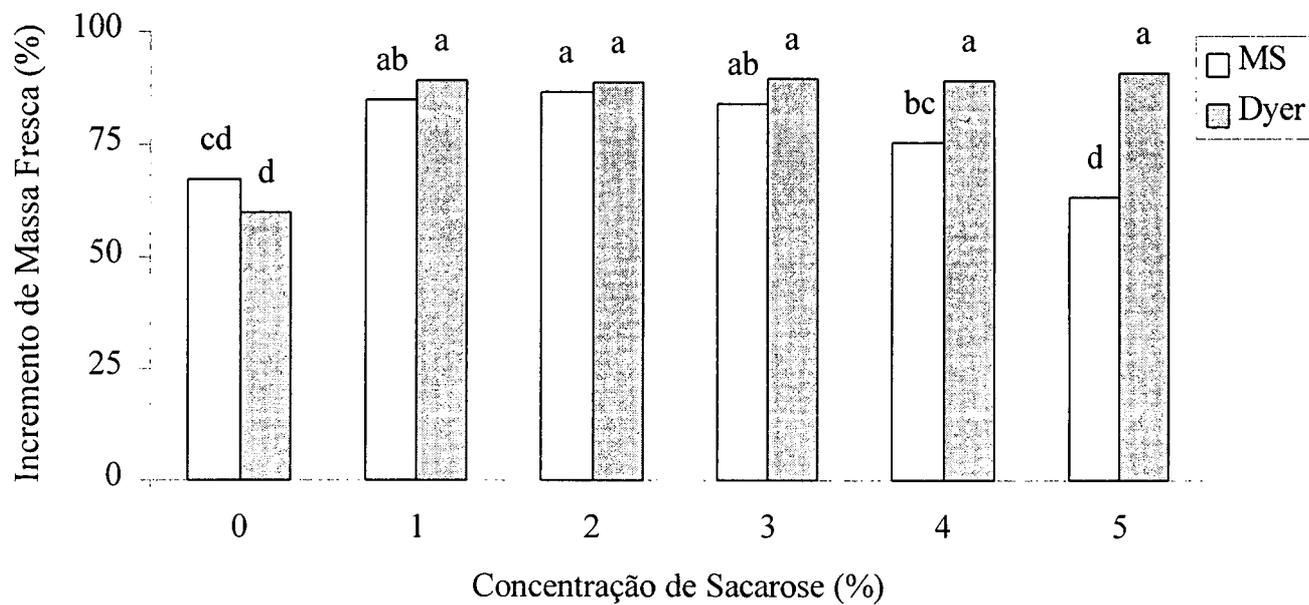


Figura 7- Massa fresca de gametófitos de *D. sellowiana* produzidos a partir de esporos cultivados durante 30 dias em meios de Dyer e MS líquidos acrescidos de sacarose a 0, 1, 2, 3, 4 e 5%. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

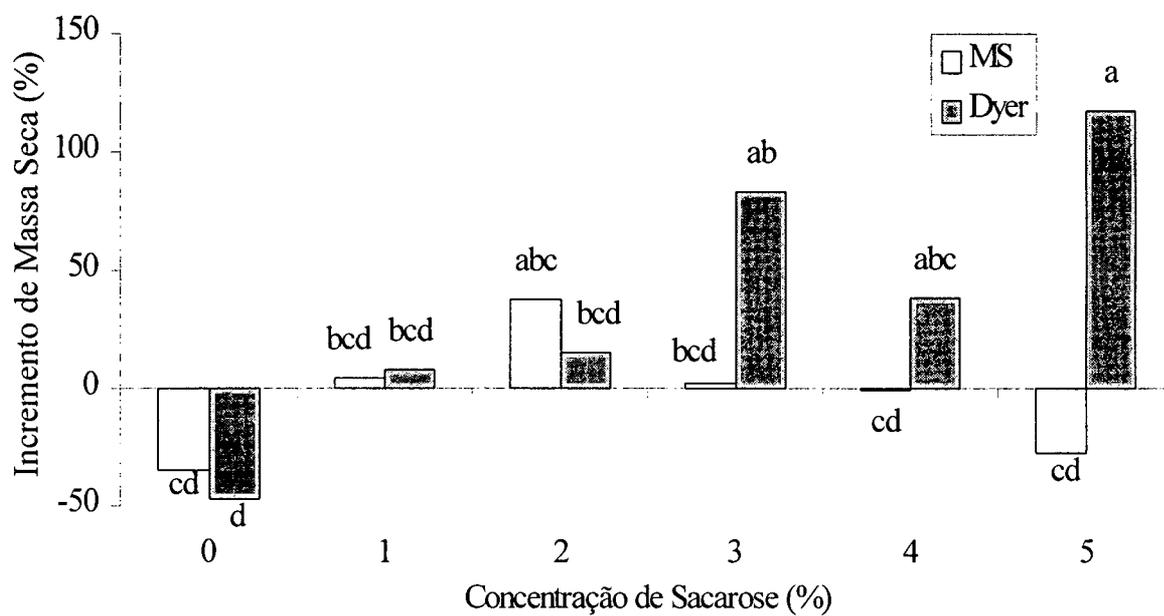


Figura 8- Massa seca de gametófitos de *D. sellowiana* produzidos a partir de esporos cultivados durante 30 dias em meios de Dyer e MS líquidos acrescidos de sacarose a 0, 1, 2, 3, 4 e 5%. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

semelhantes aos crescidos com 3 e 4% de sacarose. Os tratamentos onde os gametófitos cresceram em meios de Dyer e MS sem adição de sacarose apresentaram a maior redução de massa seca em relação ao peso inicial dos esporos, o mesmo sendo observado para o meio MS com adição de 5% de sacarose.

A Figura 9 mostra a germinação de esporos de *D. sellowiana* cultivados em meio MS e meio MS diluído a $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ da concentração salina total. Após 7 dias, as porcentagens de germinação dos tratamentos MS $\frac{1}{4}$ e MS $\frac{1}{2}$ foram estatisticamente semelhantes. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos MS $\frac{1}{2}$ e MS, mas houve diferença entre os tratamentos MS e MS $\frac{1}{4}$. Após 14 dias, as porcentagens de germinação de esporos cultivados em meio MS $\frac{1}{2}$ e MS $\frac{1}{4}$ não diferiram estatisticamente entre si, mas diferiram do tratamento MS. Após 21 dias, observa-se diferença estatisticamente significativa entre a germinação de esporos em meio MS e MS $\frac{1}{2}$. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a germinação em meio MS e meio MS $\frac{1}{4}$.

A Figura 10 mostra a porcentagem de aumento de massa fresca de gametófitos de *D. sellowiana* provenientes de esporos cultivados em meio MS e meio MS diluído a $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ durante 30 dias. As porcentagens de aumento de massa não diferem estatisticamente entre si para os tratamentos MS $\frac{1}{2}$ e MS. Também não houve diferença estatisticamente significativa entre o aumento de massas de gametófitos crescidos em meio MS e meio MS $\frac{1}{4}$. Entretanto, houve diferença significativa entre o aumento de massas de gametófitos crescidos em meio MS $\frac{1}{2}$ e MS $\frac{1}{4}$.

A Figura 11 mostra que houve redução de massa seca para gametófitos de *D. sellowiana* originados de esporos, cultivados por 30 dias em meio MS líquido e meio MS líquido nas diluições $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$. Observou-se uma redução da massa seca de gametófitos, quando comparada ao peso inicial dos esporos para todos os tratamentos.

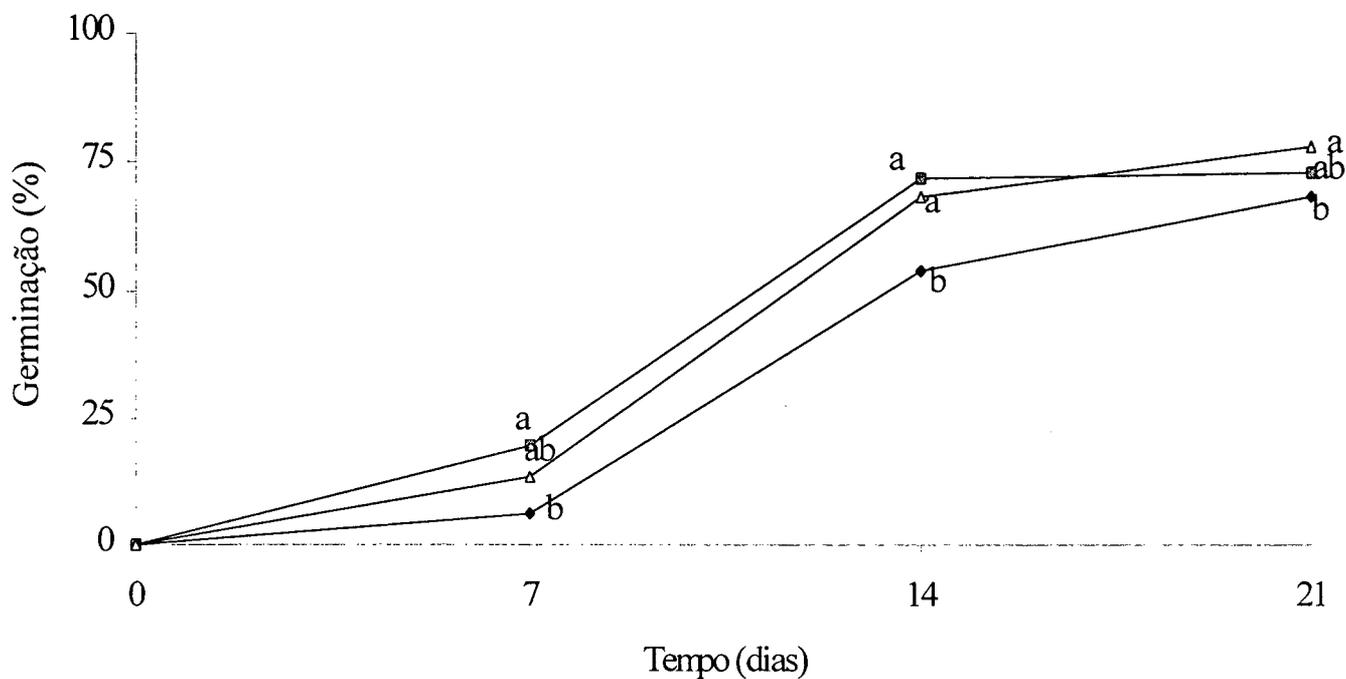


Figura 9- Germinação de esporos de *D. sellowiana* cultivados em meio MS, MS $\frac{1}{2}$ e MS $\frac{1}{4}$ líquidos. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, para cada dia de avaliação de germinação.

◆MS

▲MS $\frac{1}{2}$

■MS $\frac{1}{4}$

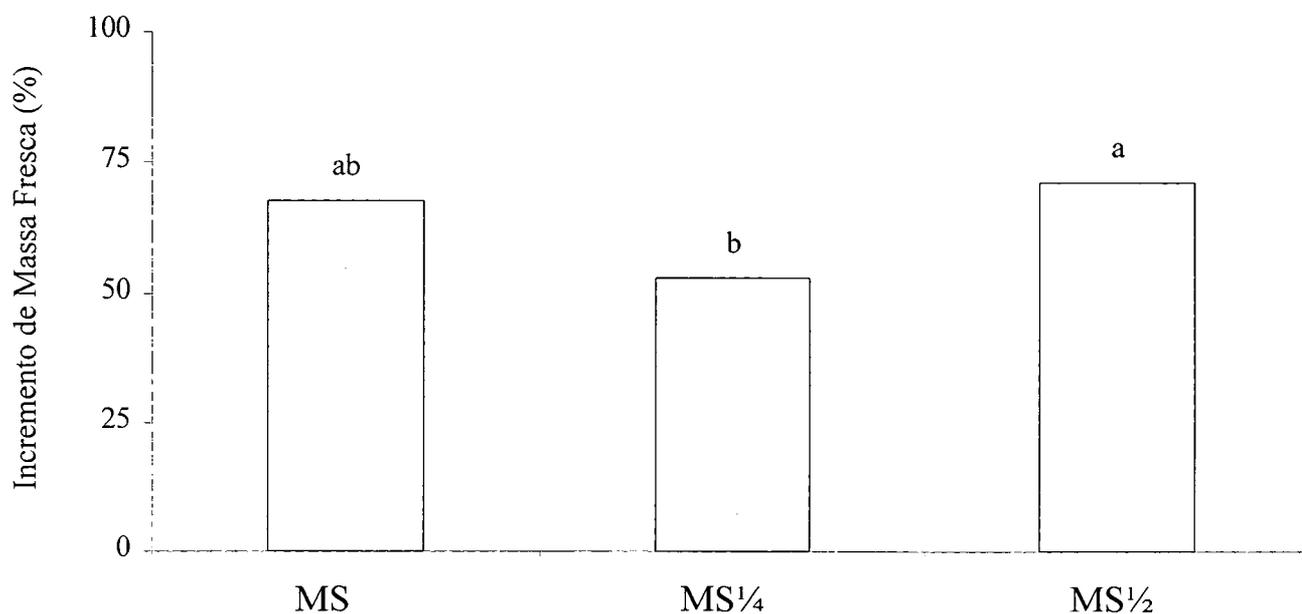


Figura 10- Variação na massa fresca de gametófitos de *D. sellowiana* após 30 dias de embebição em meio MS líquido e meio MS líquido nas diluições $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

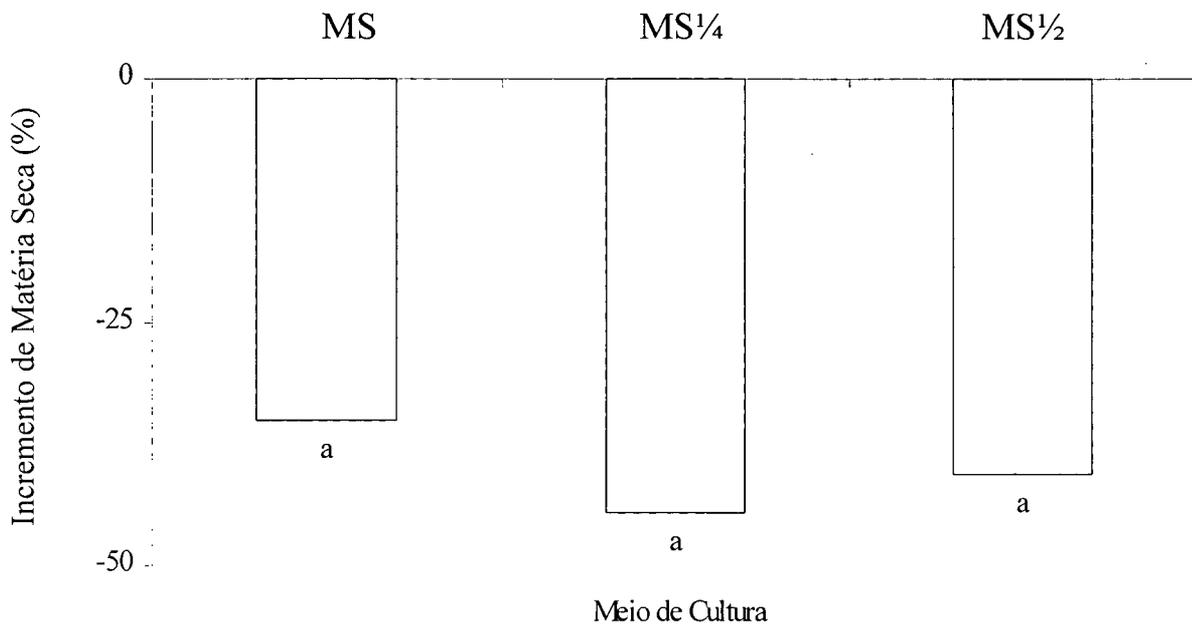


Figura 11- Variação na massa seca de gametófitos de *D. sellowiana* após 30 dias de cultivo em meio MS líquido e meio MS líquido nas diluições $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos.

3.3-EFEITO DE MEIOS SÓLIDOS DE DYER E MS, DE CONCENTRAÇÕES SALINAS DE MEIOS SÓLIDOS MS E DE SACAROSE NO CRESCIMENTO DOS GAMETÓFITOS PRODUZIDOS NO MEIO LÍQUIDO DE DYER

A Figura 12 mostra o aumento de massa fresca de gametófitos de *D. sellowiana*, cultivados por 60 dias em meio de Dyer líquido e transferidos para os meios MS e de Dyer, acrescidos de 0, 1, 2, 3, 4 e 5% de sacarose e solidificados com 0,2% de Phytigel® (Sigma). Após 130 dias em meio solidificado, os gametófitos crescidos em meio MS acrescido ou não de sacarose apresentaram porcentagens de incremento de massa fresca estatisticamente superiores aos gametófitos crescidos em meio de Dyer, com exceção dos gametófitos crescidos em ambos os meios acrescidos de 4% de sacarose. As porcentagens de aumento de massa fresca estatisticamente maiores foram apresentadas por gametófitos cultivados em meio MS, acrescido de 1, 2, 3 e 4% de sacarose e de Dyer, acrescido de 4% de sacarose. As porcentagens de incremento de massa fresca estatisticamente menores foram apresentadas pelos gametófitos crescidos em meios MS e de Dyer, sem adição de sacarose e de Dyer com adição de 3 e 5% de sacarose.

A Figura 13 mostra a porcentagem de variação de massa seca de gametófitos de *D. sellowiana*, cultivados por 60 dias em meio de Dyer transferidos para os meios MS e de Dyer acrescidos de 0, 1, 2, 3, 4 e 5% de sacarose e solidificados com 0,2% de Phytigel® (Sigma). Após 130 dias de desenvolvimento em meio solidificado, as maiores porcentagens de aumento de massa seca foram obtidas com gametófitos cultivados em meio MS,

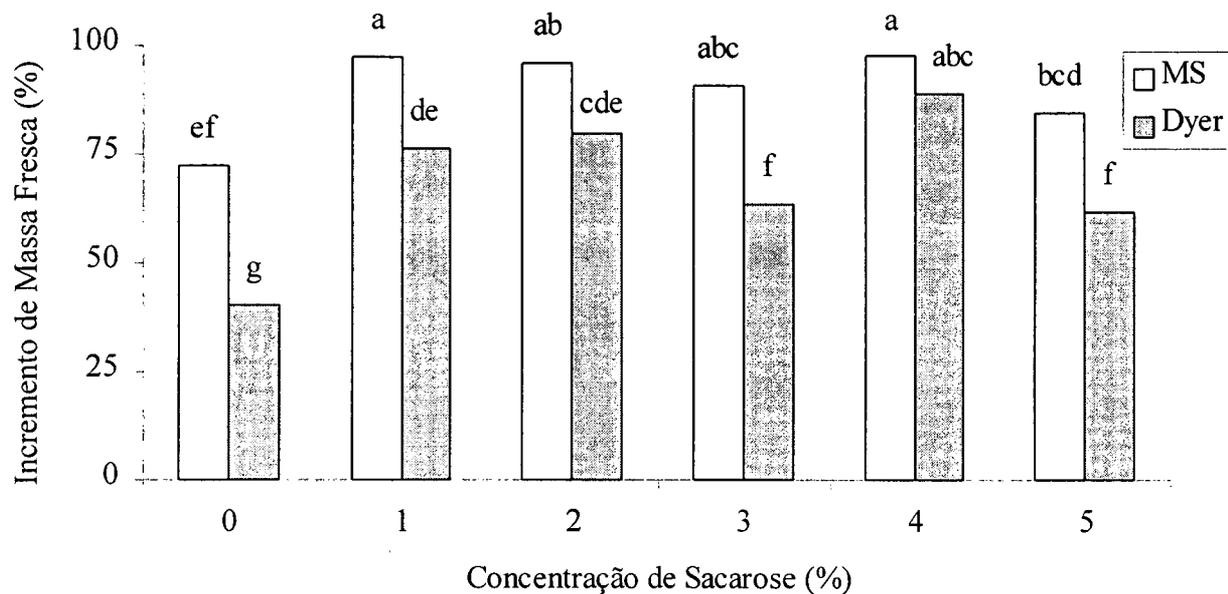


Figura 12- Variação na massa fresca de gametófitos de *D. sellowiana* produzidos a partir de gametófitos cultivados durante 60 dias em meios de Dyer líquido transferidos para os meios de Dyer e MS solidificados com 0,2% de Phytigel® e acrescidos de sacarose a 0, 1, 2, 3, 4 e 5%. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

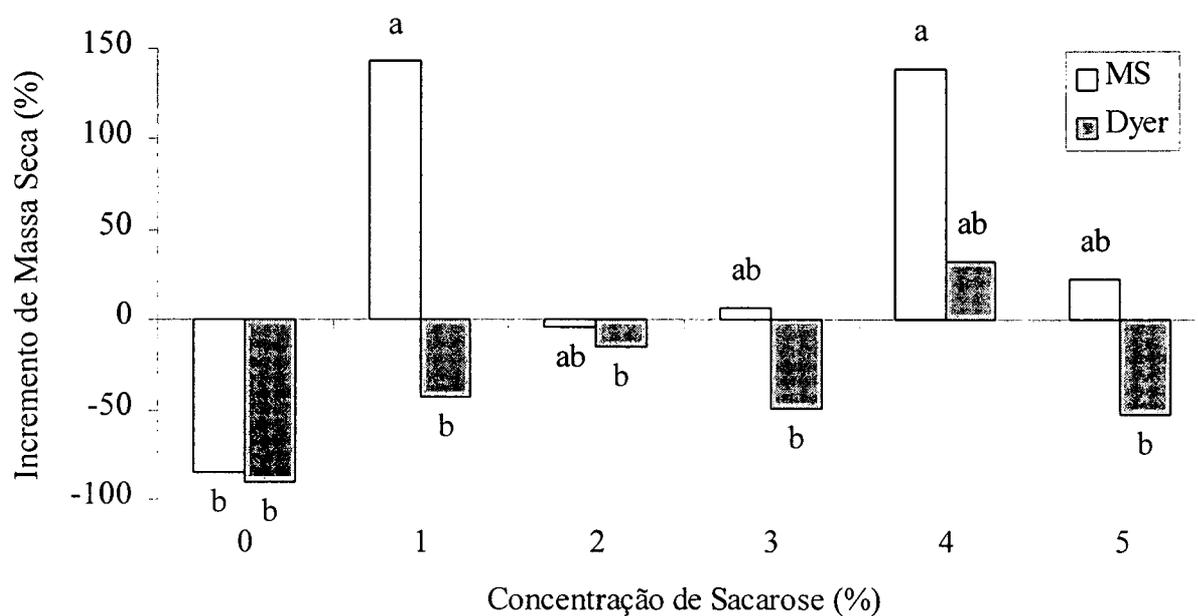


Figura 13- Variação na massa seca de gametófitos de *D. sellowiana* produzidos a partir de gametófitos cultivados durante 60 dias em meios de Dyer líquido transferidos para os meios de Dyer e MS solidificados com 0,2% de Phytigel® e acrescidos de sacarose a 0, 1, 2, 3, 4 e 5%. Dados após 130 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

suplementado com 1, 3, 4 e 5% de sacarose. Houve aumento de massa seca apenas para gametófitos cultivados em meio de Dyer, suplementado com 4% de sacarose. Observa-se que o meio MS, acrescido de sacarose, foi mais eficiente que o meio de Dyer na promoção do crescimento de gametófitos.

A Figura 14 mostra o incremento de massa fresca de gametófitos de *D. sellowiana*, cultivados por 60 dias em meio de Dyer líquido e transferidos para os meios MS com a concentração salina total ou diluída $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$, solidificados com 0,2% de Phytigel® (Sigma). Após 130 dias de desenvolvimento em meio solidificado, não houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem de incremento de massa fresca, para gametófitos crescidos em meio MS ou meio MS com a concentração salina total ou reduzida.

A Figura 15 mostra a variação na massa seca de gametófitos de *D. sellowiana*, cultivados por 60 dias em meio de Dyer líquido, e transferidos para os meios MS e meio MS nas diluições $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ solidificados com 0,2% de Phytigel® (Sigma). Após 130 dias, gametófitos crescidos em todos os tratamentos apresentaram redução estatisticamente significativa de massa inicial. Gametófitos crescidos em meio MS apresentaram redução de massa seca estatisticamente menor do que os outros tratamentos.

Camloh (1993) enfatiza a necessidade de uma esterilização eficaz para um estudo mais prolongado dos gametófitos de *Platyserium bifurcatum*, que apresentaram desenvolvimento estatisticamente superior em meio líquido, quando comparado ao solidificado, não havendo necessidade de sacarose para seu crescimento inicial. Os resultados obtidos com *D. sellowiana* estão de acordo com os de Camloh (1993), onde também foram testados vários métodos de esterilização, e onde as porcentagens de germinação foram estatisticamente superiores em meio líquido sem adição de sacarose.

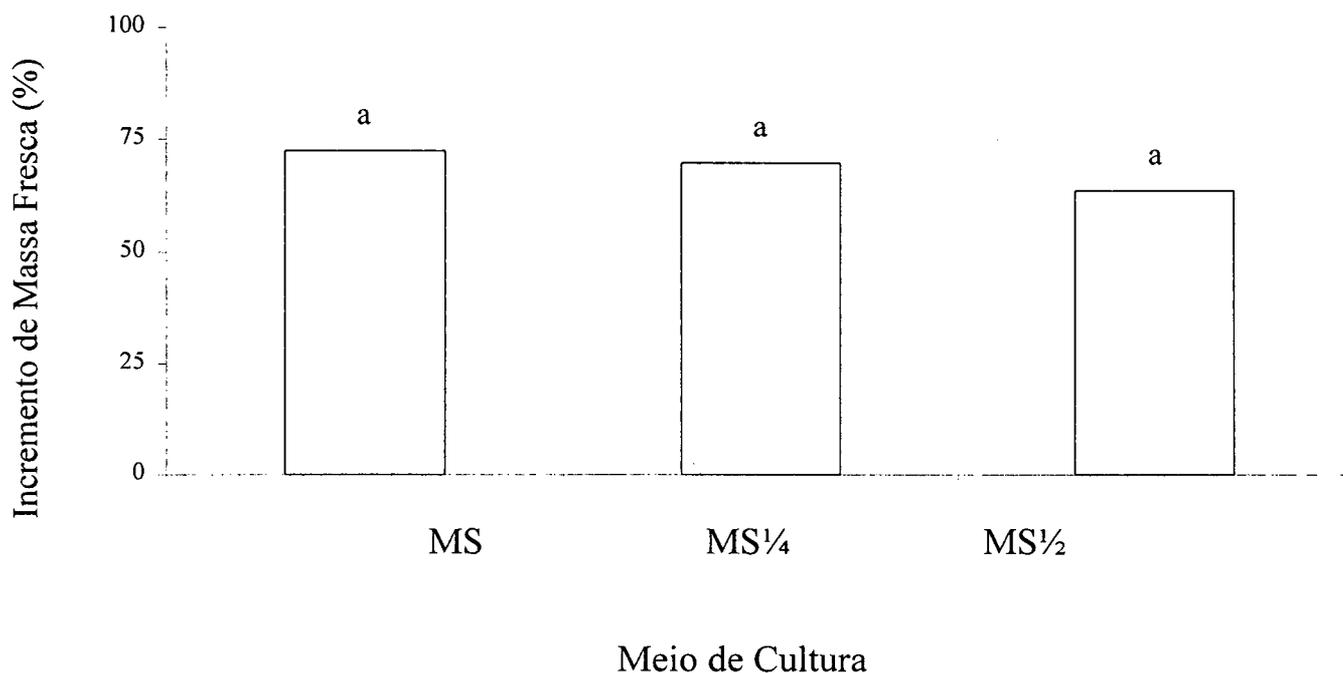


Figura 14- Variação na massa fresca de gametófitos de *D. sellowiana* produzidos a partir de gametófitos cultivados durante 60 dias em meios de Dyer líquido transferidos para os meios MS e meio Ms nas diluições $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ solidificados com 0,2% de Phytigel®. Dados após 130 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

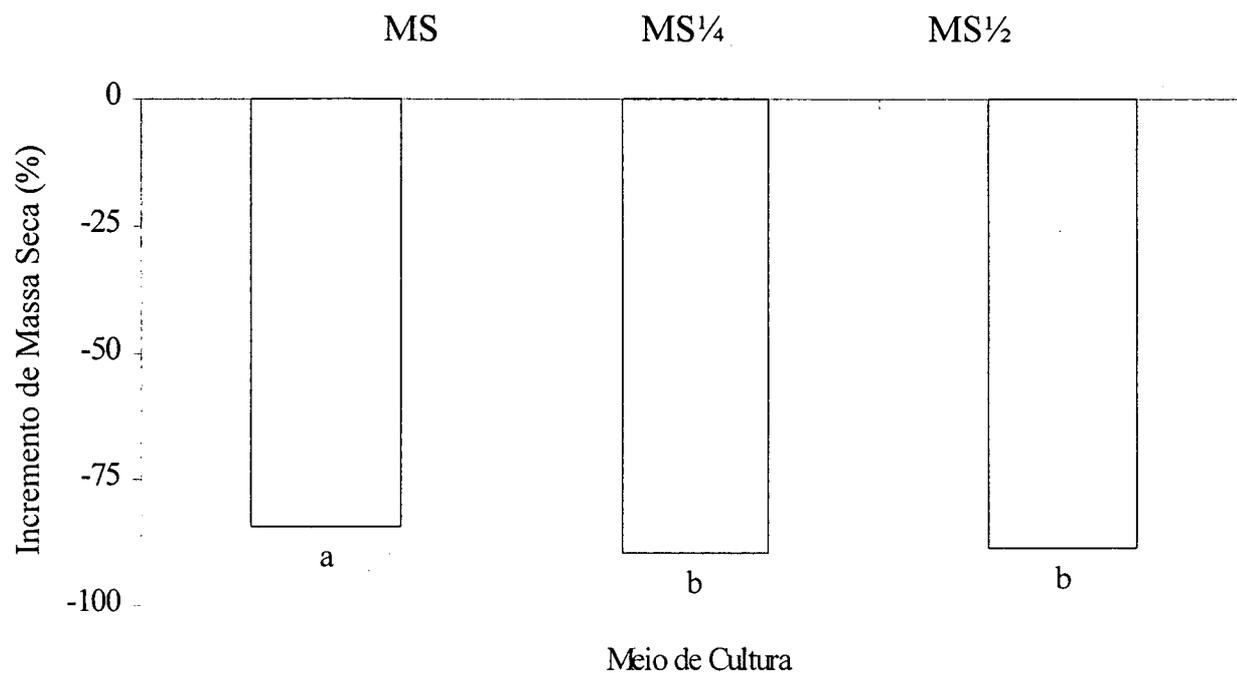


Figura 15- Variação na massa seca de gametófitos de *D. sellowiana* produzidos a partir de gametófitos cultivados durante 60 dias em meios de Dyer líquido transferidos para os meios MS e meio Ms nas diluições $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ solidificados com 0,2% de Phytigel®. Dados após 130 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

Fernández et al. (1997 a) observaram que gametófitos de *Osmunda regalis* L. cresceram melhor em meio KP (Knop) diluído enquanto que o crescimento foi inibido em meio MS e MS^{1/2}, cujos potenciais osmóticos são mais negativos. O mesmo pode ter ocorrido para os gametófitos de *D. sellowiana*, já que o meio MS apresenta maior concentração de sais do que o meio Dyer. Quando gametófitos de *D. sellowiana* foram cultivados por 60 dias em meio Dyer e subcultivados por 130 dias em meios Dyer ou MS solidificados e acrescidos de sacarose, o meio MS mostrou-se superior ao Dyer, promovendo aumento de massa fresca e seca. A presença de sacarose e a constituição salina do meio mostraram-se essenciais em promover o crescimento de gametófitos.

3.4- EFEITO DE BAP NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE GAMETÓFITOS EM MEIO LÍQUIDO E SÓLIDO

A Figura 16 mostra a germinação de esporos de *D. sellowiana* cultivados durante 21 dias, em meio de Dyer acrescido de BAP, nas concentrações 0 M, 10^{-7} M, 5×10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M. Após 7 dias de cultivo em meio de Dyer, a porcentagem de germinação dos esporos, cultivados em meio com BAP, na concentração 10^{-7} M, foi estatisticamente semelhante ao tratamento sem adição desta citocinina. Esses valores foram estatisticamente superiores aos demais tratamentos. As porcentagens de germinação, após 7 dias, para os demais tratamentos com adição de citocinina, não diferiram estatisticamente entre si. Após 14 dias de cultivo dos esporos em meio de Dyer, os tratamentos sem adição de BAP e com adição de BAP a 10^{-7} M apresentaram porcentagens de germinação

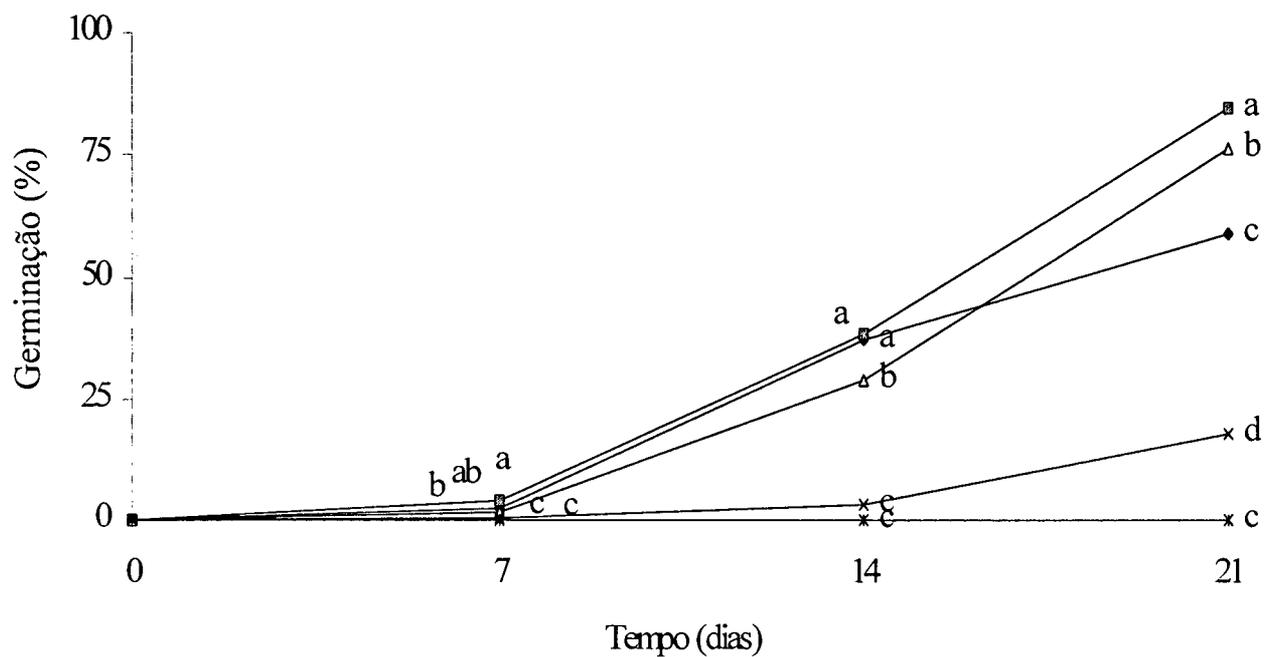


Figura 16- Germinação de esporos de *D. sellowiana* cultivados em meio de Dyer acrescido de BAP nas concentrações 0M, 10^{-7} M, 5×10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, para cada dia de avaliação de germinação.

◆ 0 M

■ 10^{-7} M

▲ 5×10^{-7} M

× 10^{-6} M

+ 10^{-5} M

estatisticamente superiores, quando comparadas aos demais tratamentos. As maiores concentrações do regulador de crescimento apresentaram porcentagens de germinação estatisticamente inferiores, após 14 dias de cultivo em meio de Dyer. Após 21 dias de cultivo em meio de Dyer, a porcentagem de germinação apresentou-se estatisticamente superior para amostras de esporos crescidas em meio com adição de BAP a 10^{-7} M. Houve um aumento na porcentagem de germinação de amostras de esporos cultivados em meio de Dyer, com BAP a 5×10^{-7} M, após 21 dias de cultivo, sobrepujando os valores do controle. As maiores concentrações de BAP resultaram em porcentagens de germinação estatisticamente inferiores, sendo que a maior concentração causou inibição total da germinação.

A Figura 17 mostra a germinação de esporos de *D. sellowiana* cultivados durante 21 dias, em meio MS $\frac{1}{4}$ acrescido de BAP, nas concentrações 0 M, 10^{-7} M, 5×10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M. Após 7 e 14 dias de cultivo, as porcentagens de germinação foram estatisticamente semelhantes para esporos cultivados em meio MS $\frac{1}{4}$, acrescido de 10^{-7} M e 5×10^{-7} M, e superiores aos demais tratamentos. A maior concentração de BAP (10^{-5} M) foi a que causou maior inibição na germinação, em todas as avaliações. Após 14 dias de cultivo, os gametófitos crescidos em meio MS $\frac{1}{4}$ sem adição de BAP e com adição de BAP na concentração 10^{-6} M, não diferiram estatisticamente entre si. Após 21 dias de cultivo, os tratamentos sem adição de BAP e com adição de BAP 10^{-7} M não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as porcentagens de germinação, sendo os valores superiores aos dos demais tratamentos. A maior concentração de BAP induziu inibição total de germinação em todos os dias de avaliação.

A Figura 18 mostra a porcentagem de aumento de massa fresca para gametófitos cultivados por 28 dias, em meio MS $\frac{1}{4}$ e Dyer, acrescidos de BAP nas concentrações 0 M, 10^{-7} M, 5×10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M. O maior incremento de massa ocorreu em gametófitos crescidos em meio MS $\frac{1}{4}$ acrescido de 10^{-7} M e 5×10^{-7} M de

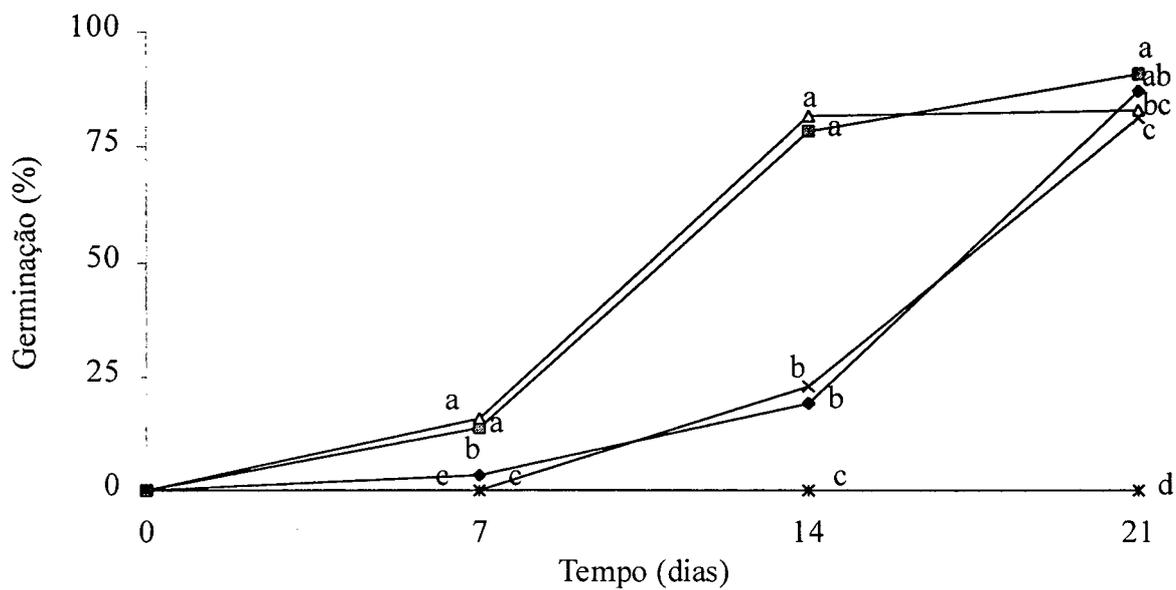


Figura 17- Germinação de esporos de *D. sellowiana* cultivados em meio MS ¼ acrescido de BAP nas concentrações 0M, 10⁻⁷M, 5x10⁻⁷M, 10⁻⁶M e 10⁻⁵M. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, para cada dia de avaliação de germinação.

◆ 0M

■ 10⁻⁷M

▲ 5x10⁻⁷M

× 10⁻⁶M

+ 10⁻⁵M

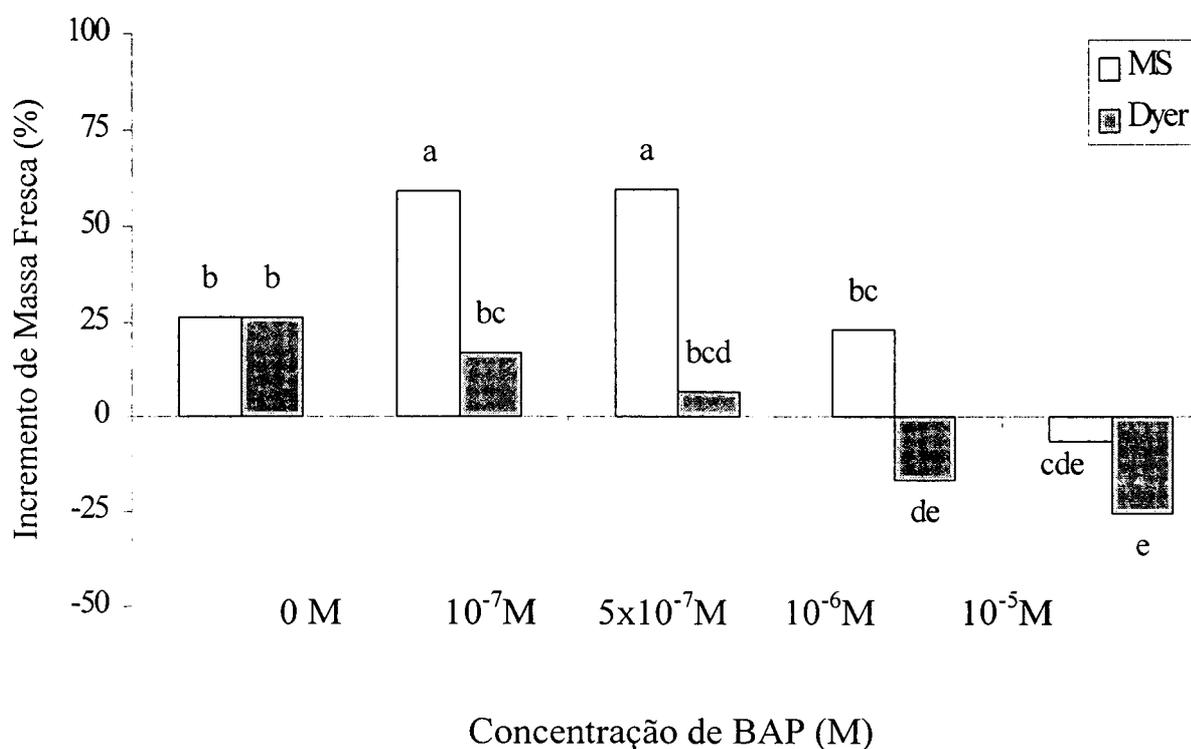


Figura 18- Variação na massa fresca de gametófitos de *D. sellowiana* após 28 dias de cultivo em meios MS $\frac{1}{4}$ e de Dyer acrescidos de BAP nas concentrações 0 M, 10^{-7} M, 5×10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

BAP. Os gametófitos cultivados por 28 dias, em meio de Dyer acrescido de 10^{-6} M de BAP e em meios MS $\frac{1}{4}$ e de Dyer acrescidos de BAP a 10^{-5} M, apresentaram redução estatisticamente significativa na porcentagem de incremento de massa fresca, quando comparada à massa inicial de esporos. Gametófitos cultivados por 28 dias, em meios MS $\frac{1}{4}$ e Dyer sem adição de BAP, não apresentaram diferenças no incremento de massa fresca, que foi semelhante ao meio MS acrescido de 10^{-6} M e meio Dyer acrescido de 10^{-7} M e 5×10^{-7} M de BAP.

A Figura 19 mostra a variação na massa seca de gametófitos cultivados por 28 dias, em meio MS $\frac{1}{4}$ e Dyer, acrescidos de BAP nas concentrações 0 M, 10^{-7} M, 5×10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M. Todos os tratamentos apresentaram redução na porcentagem de massa seca dos gametófitos, quando comparados com a massa inicial de esporos. Em meio de Dyer, concentrações crescentes de BAP causaram reduções diretamente proporcionais na massa seca.

A Figura 20 mostra a porcentagem de incremento de massa fresca para gametófitos cultivados por 32 dias, em meio líquido de Dyer, transferidos para meio MS acrescido de 2% de sacarose, 0,2% de Phytigel e BAP nas concentrações 0 M, 10^{-7} M, 5×10^{-7} M e 10^{-6} M, durante 68 dias. Após 68 dias, observou-se um aumento da massa fresca dos gametófitos em todos os tratamentos, sendo os maiores obtidos pelo tratamento sem adição de BAP e com a adição de 10^{-7} M de BAP. O menor aumento de massa fresca foi apresentado pelos gametófitos crescidos em meio acrescido de 10^{-6} M de BAP, ou seja, a maior concentração utilizada no experimento.

A Figura 21 mostra a porcentagem de incremento de massa seca para gametófitos cultivados por 32 dias, em meio líquido de Dyer, transferidos para meio MS acrescido de 2% de sacarose, 0,2% de Phytigel e BAP nas concentrações 0 M, 10^{-7} M, 5×10^{-7} M e 10^{-6} M por 68 dias. Houve incremento de massa seca em todos os tratamentos. Não houve diferença estatisticamente

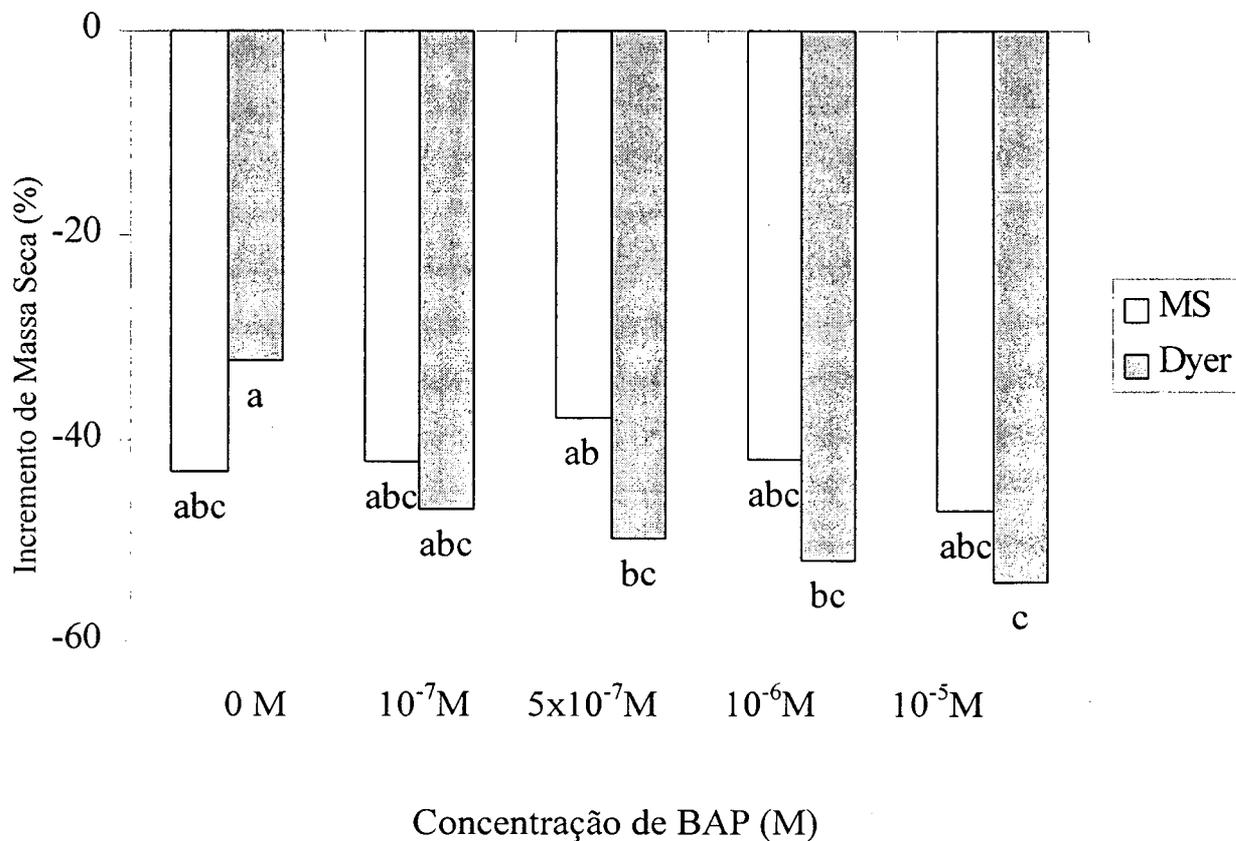


Figura 19- Variação da massa seca de gametófitos de *D. sellowiana* após 28 dias de cultivo em meios MS $\frac{1}{4}$ e de Dyer acrescidos de BAP nas concentrações 0 M, 10^{-7} M, 5×10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

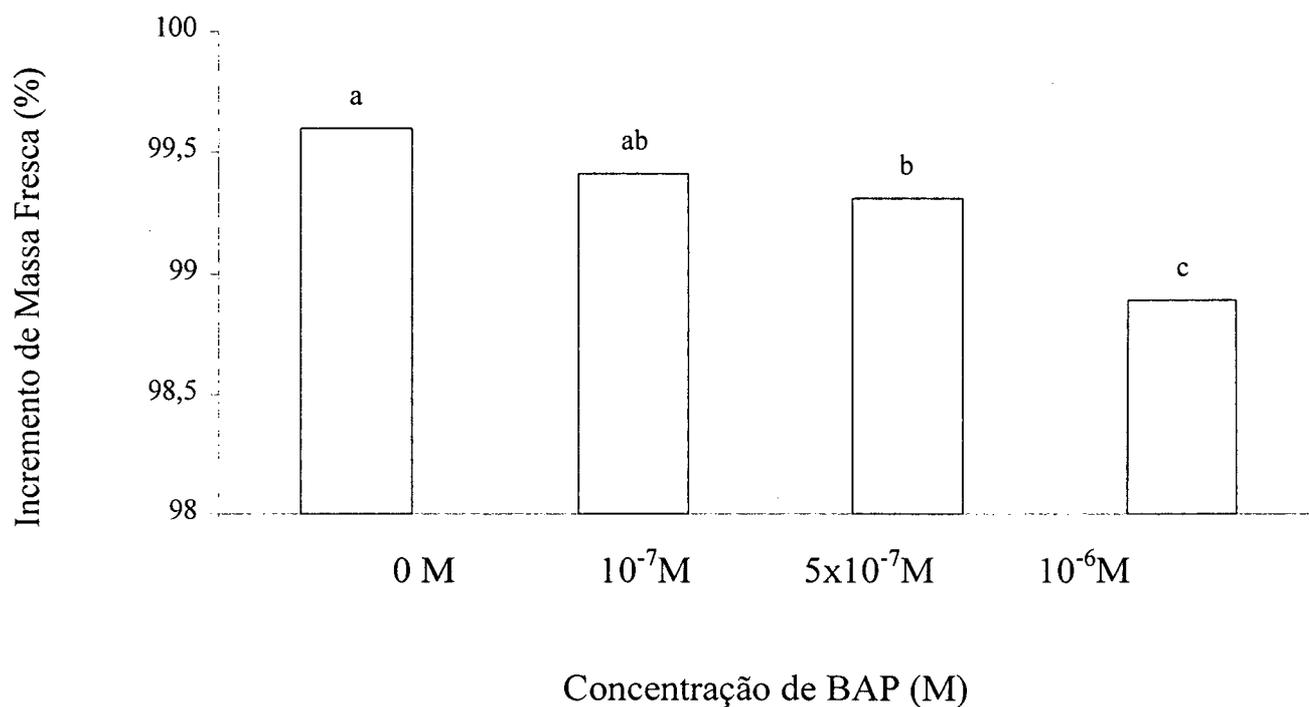


Figura 20- Variação da massa fresca de gametófitos de *D. sellowiana* após 32 dias de cultivo em meio de Dyer, transferidos por 68 dias para meio MS acrescido de 2% de sacarose, 0,2% de Phytagel™ e BAP nas concentrações 0 M, 10^{-7} M, 5×10^{-7} M e 10^{-6} M. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

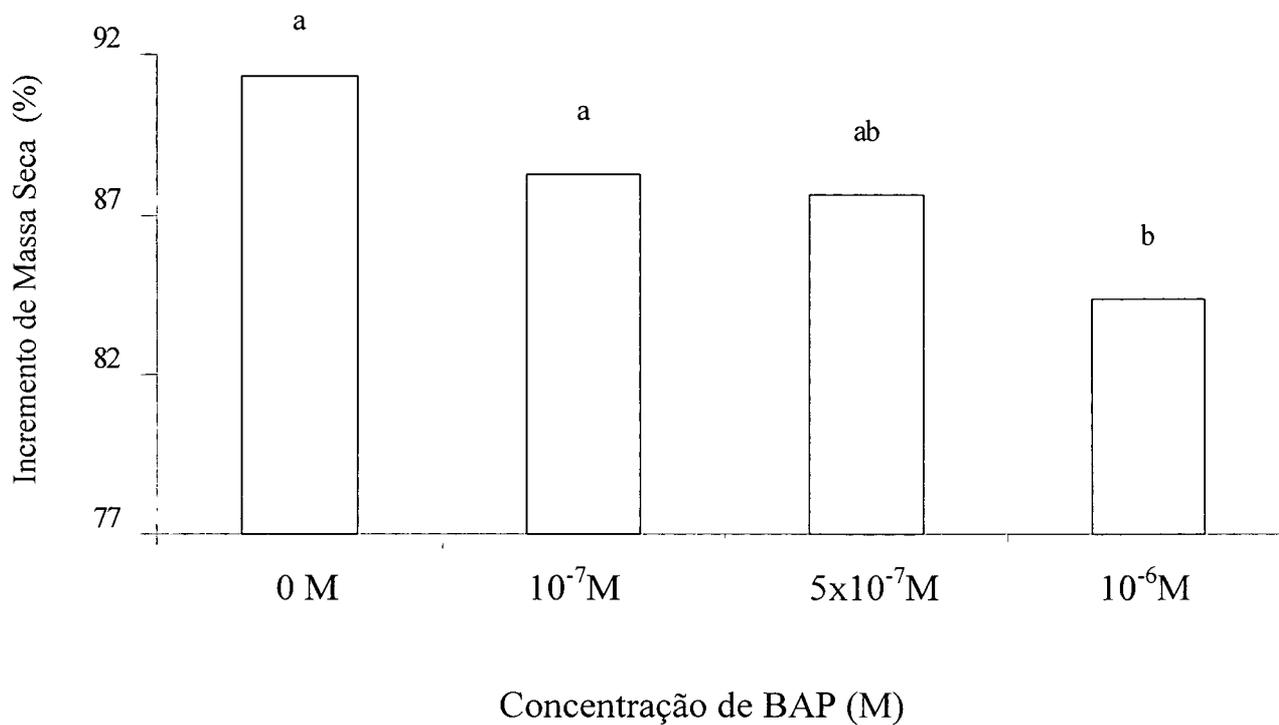


Figura 21- Variação de massa seca de gametófitos de *D. sellowiana* após 32 dias de cultivo em meio de Dyer, transferidos por 68 dias para meio MS acrescido de 2% de sacarose, 0,2% de Phytagel™ e BAP nas concentrações 0 M, 10^{-7} M, 5×10^{-7} M e 10^{-6} M. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

significativa no incremento de massa seca de gametófitos crescidos na presença de BAP, na concentrações $10^{-7}M$ e $5 \times 10^{-7}M$ ou na ausência desta citocinina sintética, porém, o menor incremento foi obtido na presença de BAP a $10^{-6}M$.

O BAP a $10^{-7}M$ promoveu a germinação de esporos de *D. sellowiana* em meio de Dyer, após 21 dias de cultivo. O BAP não teve efeito na promoção de germinação de esporos de *D. sellowiana* em meio MS $\frac{1}{4}$. Após 28 dias de cultivo em meio de MS $\frac{1}{4}$ acrescidos ou não de BAP a $10^{-7}M$, $5 \times 10^{-7}M$ e $10^{-6}M$ produziram aumento de massa fresca. Gametófitos cultivados por igual período em meio Dyer, acrescidos de 0, $10^{-7}M$ e $5 \times 10^{-7}M$, também produziram aumento de massa fresca. Os tratamentos $10^{-5}M$ em meio MS e $10^{-5}M$ e $10^{-6}M$ em meio Dyer apresentaram redução da massa fresca. Todos os tratamentos em ambos os meios produziram redução de massa seca.

Quando gametófitos cultivados por 32 dias em meio Dyer líquido foram transferidos por 68 dias para meio MS solidificado com 0,2% de *Phytigel* e acrescido de sacarose a 2% e BAP a 0, $10^{-7}M$, $5 \times 10^{-7}M$ e $10^{-6}M$, o menor aumento em massa fresca foi apresentado pelos gametófitos crescidos em meio MS, acrescido de BAP a $10^{-6}M$, o mesmo sendo constatado para a massa seca. Entretanto, em decorrência da limitação da duração destes experimentos, não foi possível observar se o BAP teria algum efeito em acelerar o surgimento de esporófitos de *D. sellowiana*.

Kuriyama et al. (1990) estudaram o efeito de citocininas na produção de esporófitos a partir de gametófitos de *Equisetum arvense*, concluíram que BAP foi a mais efetiva citocinina sintética na produção de ramos esporofíticos nessa cultura.

O crescimento de gametófitos de *Blechnum spicant* foi ótimo em meio MS líquido, com 16 horas de fotoperíodo, e não foi afetado por alterações entre 4,7 e 8,7 no pH (Fernández et al., 1997 b), fato confirmado neste trabalho, para

D. sellowiana em meio MS solidificado. Gametófitos de *Dryopteris affinis* sp. *affinis* foram cultivados em meio MS, onde variações na composição do meio, açúcar, ágar e diferentes valores de pH foram testados. A adição de benziladenina (4,43 μ M) e ácido naftaleno acético (0,53 μ M) aumentou a proliferação dos gametófitos de *Dryopteris affinis* sp. *affinis* (Fernández et al., 1996 b). Entretanto, neste trabalho, não foi testada a interação entre citocininas e auxinas na proliferação de gametófitos.

3.5- EFEITO DA INTENSIDADE LUMINOSA NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE GAMETÓFITOS EM MEIO LÍQUIDO

A Figura 22 mostra curvas de germinação de esporos de *D. sellowiana* cultivados durante 49 dias, em meio de Dyer, sob caixas revestidas com tela “sombrite”, para reduzir a luminosidade total em 50, 64, 80 e 95%, e mantidas em condições ambientais, nas dependências do departamento de Botânica da UFSC. Não houve germinação após 7 dias. Após 14 dias de cultivo em meio de Dyer, as porcentagens de germinação de esporos em caixas com 80 e 95% de redução da luminosidade não diferiram estatisticamente entre si, sendo maiores que as dos outros tratamentos. Também não houve diferença estatisticamente significativa entre as porcentagens de germinação de esporos cultivados em meio de Dyer e submetidos à reduções de luminosidade de 50 e 64%. Após 21 dias de cultivo em meio de Dyer, a porcentagem de germinação de esporos, sob redução de 80% de luminosidade, foi estatisticamente superior àquelas dos outros tratamentos. Esporos cultivados em meio de Dyer, sob redução de 95% de luminosidade, apresentaram porcentagens de germinação estatisticamente superiores às porcentagens de germinação dos esporos mantidos sob redução de 50 e 64% da luminosidade, após 21 dias. Após 28 dias de cultivo em meio de

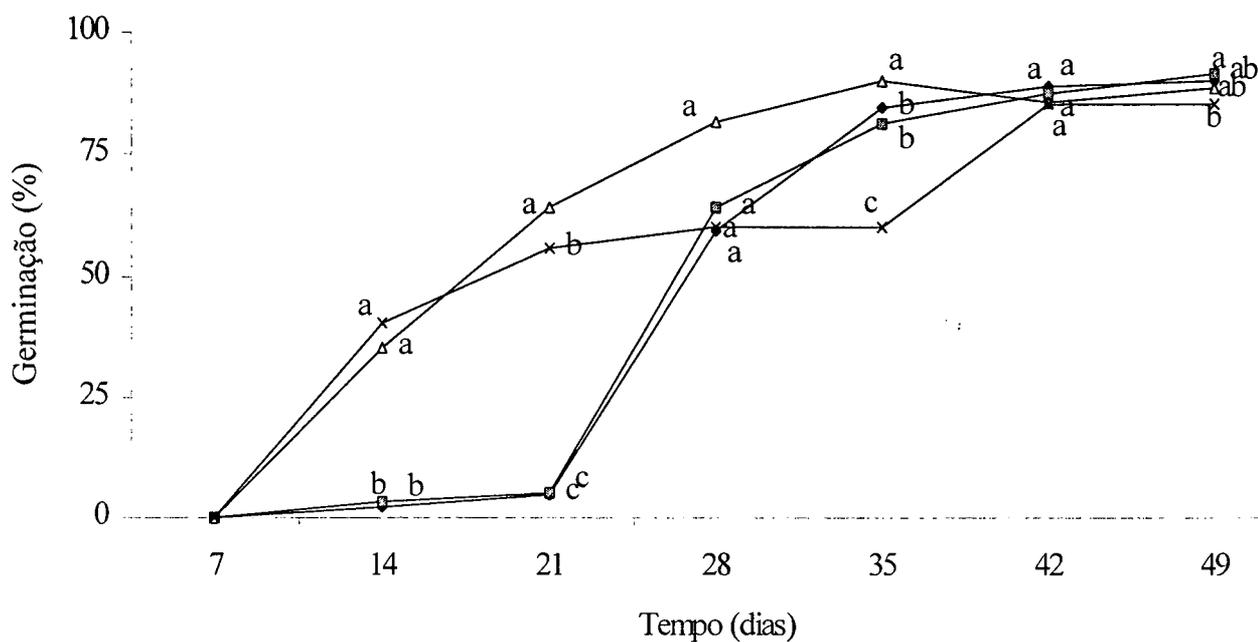


Figura 22- Germinação de esporos de *D. sellowiana* cultivados em meio de Dyer por 49 dias sob redução de 50, 64, 80 e 95% na intensidade luminosa. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, para cada dia de avaliação de germinação.

- ◆ redução de 50% da luminosidade total
- redução de 64% da luminosidade total
- ▲ redução de 80% da luminosidade total
- ✕ redução de 95% da luminosidade total

Dyer, não houve diferença estatisticamente significativa entre as porcentagens de germinação nos diferentes tratamentos. Após 35 dias, a porcentagem de germinação foi estatisticamente superior para esporos mantidos sob redução de 80% da luminosidade total. Esporos cultivados em meio de Dyer e mantidos sob redução de 50 e 64% de luminosidade apresentaram porcentagens de germinação estatisticamente semelhantes entre si, após 35 dias. A porcentagem de germinação de esporos mantidos sob 95% de redução da luminosidade foi estatisticamente inferior àquelas dos demais tratamentos, após 35 dias, mantendo a média de germinação de duas semanas anteriores. Após 42 dias de cultivo em meio de Dyer, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. Entretanto, após 49 dias, a porcentagem de germinação de esporos cultivados em meio de Dyer e mantidos sob redução de 64% da luminosidade total foi estatisticamente superior à germinação de esporos mantidos sob redução de 95% da luminosidade.

A Figura 23 representa o teor de açúcares solúveis totais contido em amostras de gametófitos de *D. sellowiana* cultivados em meio de Dyer, por 48 dias, e crescidos em intensidades luminosas reduzidas à 50, 64, 80 e 95% da intensidade luminosa total. O maior teor de açúcares foi observado em gametófitos crescendo com 80% de redução da luz total.

A Figura 24 mostra o teor de clorofila **a** presente em amostras de gametófitos de *D. sellowiana*, provenientes de esporos que germinaram em meio de Dyer, por 48 dias, com reduções de luminosidade de 50, 64, 80 e 95%. Houve um aumento estatisticamente significativo de clorofila **a**, nas amostras de gametófitos de *D. sellowiana* crescidos sob redução de luminosidade de 80 e 95%. Este padrão estatístico voltou a se repetir para os teores de clorofila **b** (Figura 25) e de clorofila total (Figura 26).

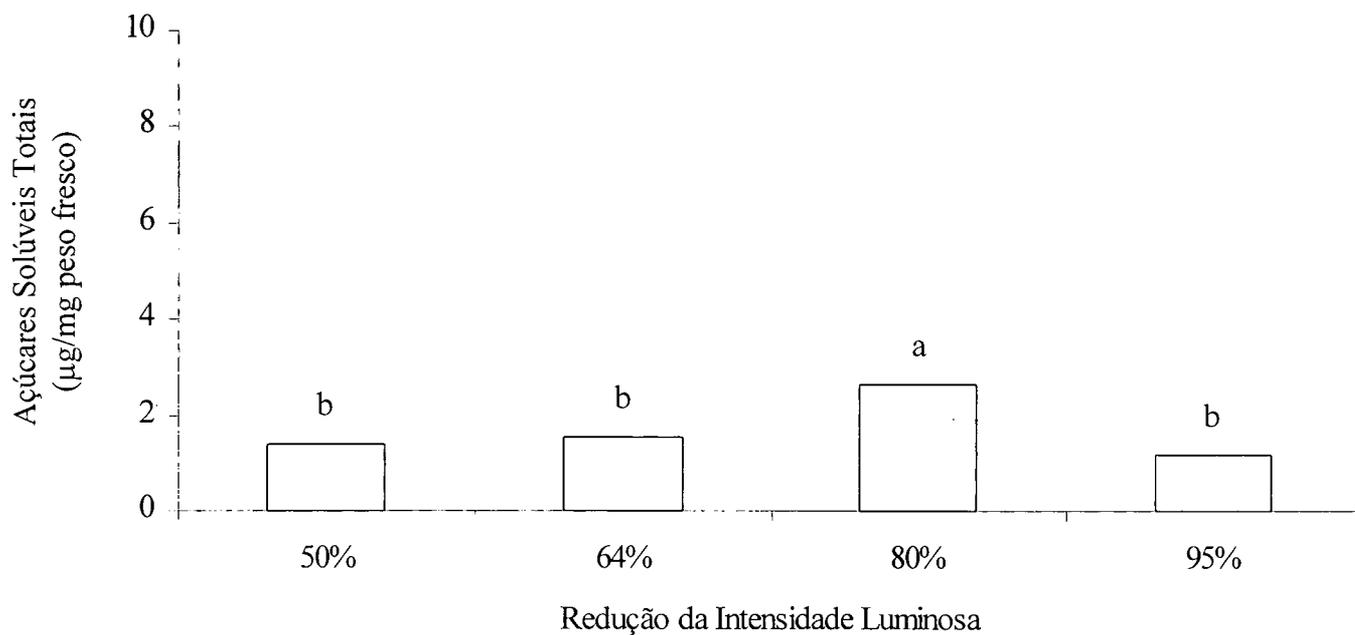


Figura 23- Teor de açúcares solúveis totais presente em amostras de esporos e gametófitos de *D. sellowiana* cultivados em meio de Dyer por 48 dias sob redução de luminosidade de 50, 64, 80 e 95%. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

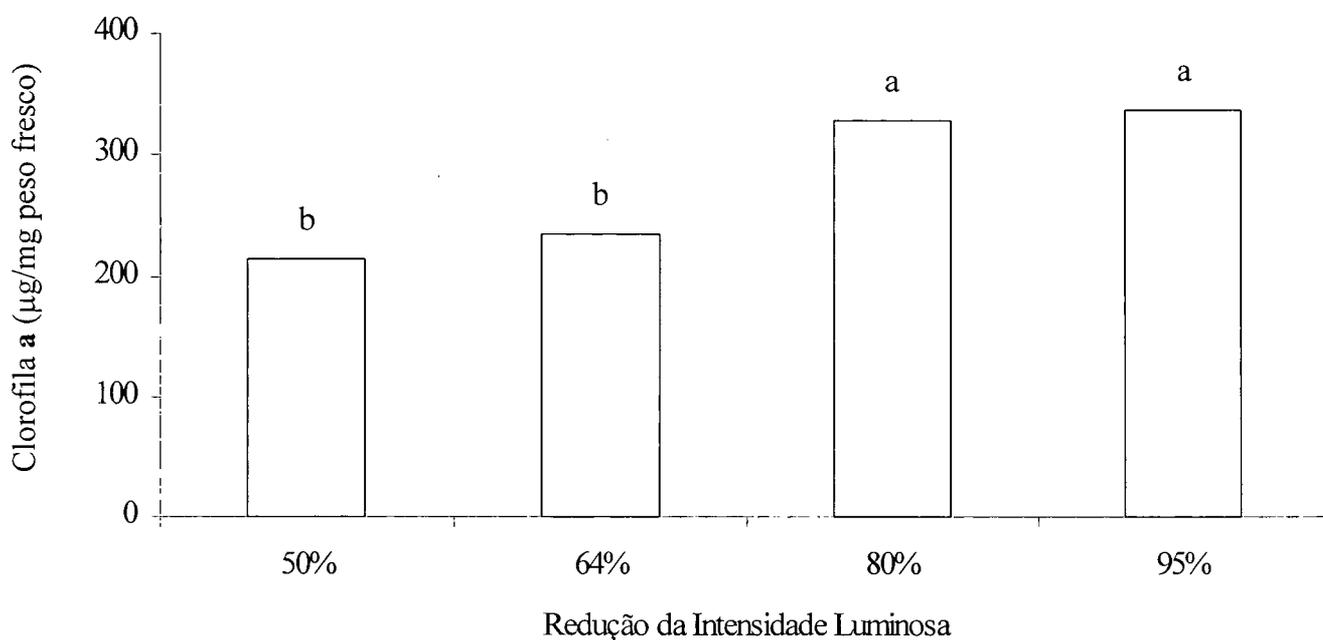


Figura 24- Teor de clorofila **a** presente em amostras de gametófitos de *D. sellowiana* cultivados em meio de Dyer por 48 dias sob redução de luminosidade de 50, 64, 80 e 95%. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

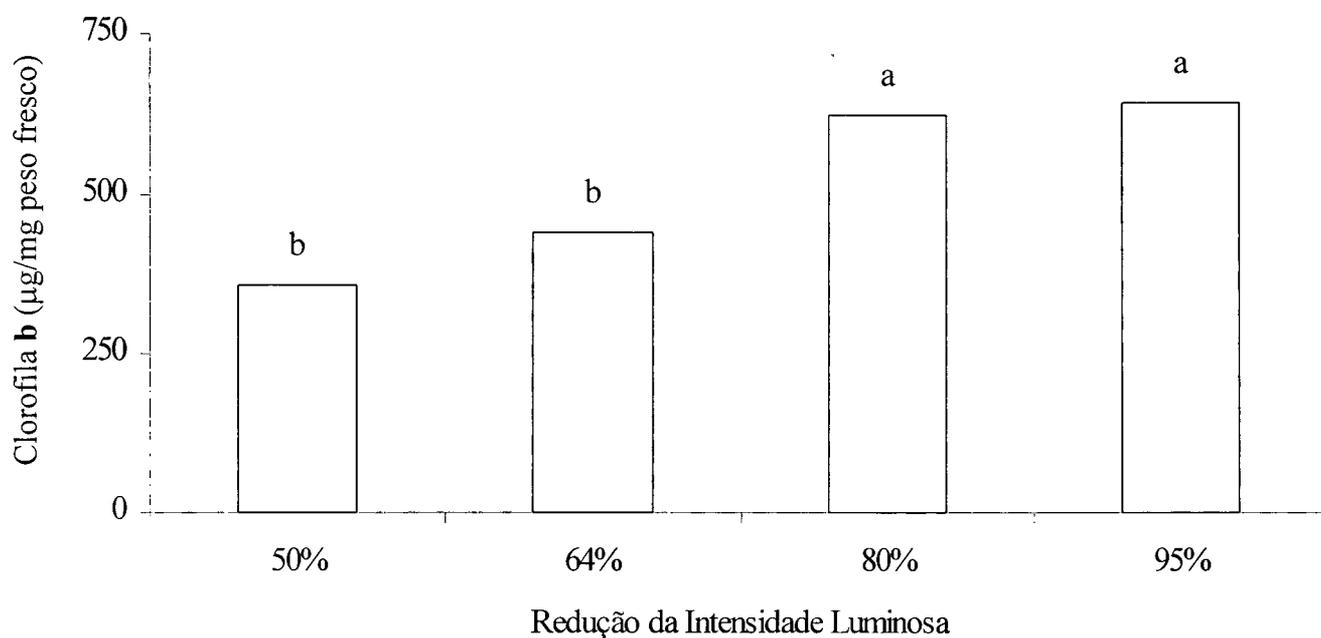


Figura 25- Teor de clorofila **b** presente em amostras de gametófitos de *D. sellowiana* cultivados em meio de Dyer por 48 dias sob redução de luminosidade de 50, 64, 80 e 95%. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

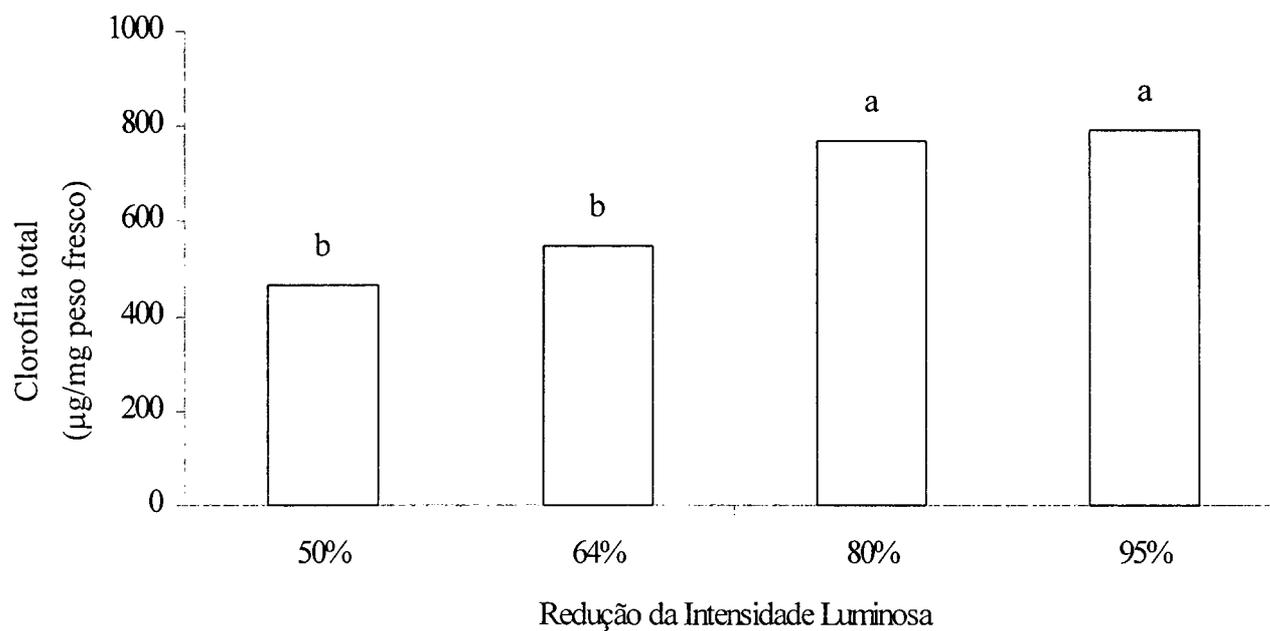


Figura 26- Teor de clorofila total presente em amostras de gametófitos de *D. sellowiana* cultivados em meio de Dyer por 48 dias sob redução de luminosidade de 50, 64, 80 e 95%. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

A Figura 27 mostra a porcentagem de aumento de massa fresca de gametófitos de *D. sellowiana* provenientes de esporos cultivados em meio de Dyer, por 48 dias, sob caixas cobertas com tela “sombrite”. Nota-se um aumento de massa fresca estatisticamente significativo para gametófitos de *D. sellowiana* crescidos sob a maior redução de luminosidade total, ou seja, 95%. As massas frescas de gametófitos crescidos sob reduções intermediárias de luminosidade (64 e 80%) não diferiram estatisticamente entre si. Entretanto, gametófitos de *D. sellowiana* cultivados em meio de Dyer sob redução de luminosidade de 50% apresentaram menor massa fresca do que os que cresceram sob redução de 80% e 95% de luminosidade, não diferindo dos crescidos sob redução de 64% da luz total.

As florestas apresentam muitas variações nos ambientes luminosos, e isto pode afetar a comunicação entre os animais, entre animais e vegetais, a fotossíntese e a morfogênese vegetal. A estrutura das florestas leva a quatro principais *habitats* quando o sol não está encoberto por nuvens: mata fechada, mata, pequenas brechas e grandes brechas de luminosidade. Estes são caracterizados pelos espectros de luz verde-amarelo, azul-cinza, avermelhado e branco, respectivamente (Endler, 1993).

Na América Tropical, a espécie *Dicksonia sellowiana* ocorre na Floresta Ombrófila Densa (Tryon & Tryon, 1982).

Os esporos de *Dicksonia sellowiana* são fotoblásticos positivos e atingem a máxima porcentagem de germinação a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ em luz branca após sete dias de cultivo, (Filippini et al., 1999). Neste trabalho, foram necessários métodos rigorosos de desinfecção para tornar possível o posterior subcultivo de gametófitos em meios enriquecidos com sacarose. Dessa maneira, a germinação mostrou-se mais lenta, e as avaliações foram realizadas semanalmente ou a cada 10 dias, sendo que os experimentos de germinação duravam 3 semanas ou mais, dependendo dos tratamentos.

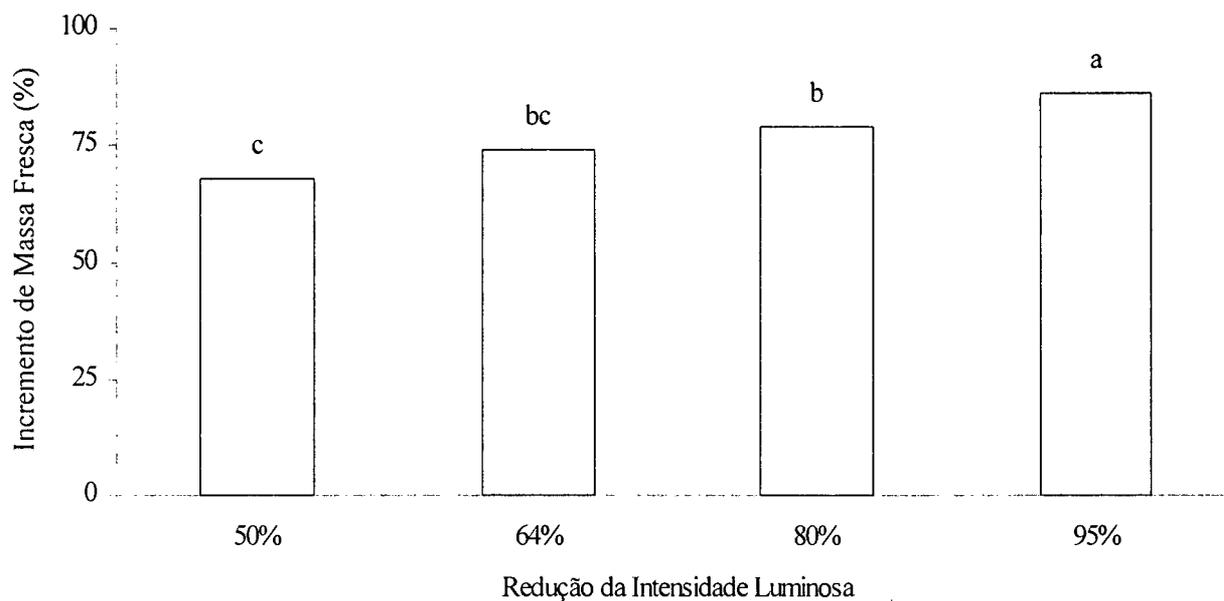


Figura 27- Variação da massa fresca de gametófitos de *D. sellowiana* após 90 dias de cultivo em meio de Dyer sob redução de luminosidade de 50, 64, 80 e 95%. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

Quando esporos de *D. sellowiana* foram cultivados durante 49 dias sob redução de intensidade luminosa de 50, 64, 80 e 95%, em condições ambientais de temperatura e insolação, os valores de porcentagem de germinação foram muito próximos nos 4 tratamentos, mas redução de 64% da luminosidade total propiciou germinação estatisticamente superior à redução de 95% de luminosidade. Entretanto, inicialmente, as maiores porcentagens de germinação ocorreram nas maiores reduções de intensidade luminosa (80 e 95%) o que está de acordo com Filippini et al. (1999) que obtiveram porcentagens de germinação mais altas com reduções de intensidade luminosa de 74, 81 e 96%, após 10 dias de cultivo.

Neste trabalho, o retardamento da germinação pode ter ocorrido devido ao processo de esterilização bem como às condições ambientais a campo durante o experimento.

Gametófitos de *D. sellowiana*, cultivados sob redução de luminosidade de 80 e 95%, mostraram maiores teores de clorofilas totais do que os cultivados com reduções de luminosidade de 50 e 64%.

Nada há, na literatura científica, sobre os níveis de clorofila em pteridófitas, tornando inédito este trabalho. Assim sendo, utilizamos estudos feitos com algumas angiospermas, que mostraram comportamento semelhante ao das pteridófitas para a discussão dos resultados.

Por exemplo, sementes de *Citrus paradisi* e *Citrus sinensis* germinaram sem redução de luminosidade (luz solar total) ou sombreamento de 50% e 90%. O conteúdo de clorofila total nas folhas foi maior nas plântulas crescidas com 90% de redução da intensidade luminosa (Syvertsen & Smith, 1984).

Observou-se maior teor de açúcares solúveis totais em gametófitos de *D. sellowiana* crescendo sob 80% de redução da luz solar total máxima o que poderia indicar ser esta uma espécie que necessita de sombreamento para seu desenvolvimento inicial.

Este estudo sobre *D. sellowiana* não teve por objetivo investigar o desenvolvimento de gametófitos e o aparecimento de esporófitos, sob diferentes níveis de luminosidade, sendo que respostas a tais condições de ambiente podem vir a ser avaliadas em trabalhos futuros.

4-CONCLUSÕES

- 1- As maiores porcentagens de germinação de esporos de *D. sellowiana* foram obtidas após 14 e 21 dias, por meio de imersão em NL, por 15 minutos e degelo rápido ou lento.
- 2- Não houve germinação dos esporos embebidos em solução de crioprotetor DMSO e que posteriormente haviam sido imersos em NL, independentemente do degelo utilizado.
- 3- Após 30 dias de cultivo, os esporos imersos por 15, 30 e 90 dias, em NL apresentaram porcentagens de germinação estatisticamente superiores aos esporos do controle, independentemente do tipo de degelo utilizado.
- 4- As maiores porcentagens de germinação de esporos de *D. sellowiana* foram obtidas por meio de cultivo em meios MS e Dyer líquidos e sem adição de sacarose, após 21 dias.

- 5- A ausência de sacarose ou concentrações de 4 a 5% de sacarose causaram redução de massa fresca de gametófitos cultivados por 30 dias em meio MS, o que não foi verificado para o meio de Dyer.
- 6- Gametófitos que cresceram por 30 dias em meios de Dyer e MS sem adição de sacarose apresentaram a maior redução de massa seca, o mesmo sendo observado para o meio MS com adição de 5% de sacarose. Observou-se redução da massa seca de gametófitos quando comparada ao peso inicial dos esporos para todos os tratamentos em meio MS e MS diluído ($\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$) líquidos.
- 7- Gametófitos sub-cultivados por 130 dias em meios de Dyer e MS solidificados e acrescidos de sacarose foram provenientes de cultivo durante 60 dias em meio líquido de Dyer. O meio MS acrescido de sacarose (1 a 5%) apresentou-se mais eficiente em promover o crescimento de gametófitos, do que o meio de Dyer.
- 8- Houve um aumento na porcentagem de germinação de amostras de esporos cultivados em meio de Dyer, com BAP a 10^{-7} M e 5×10^{-7} M, após 21 dias de cultivo, sobrepujando os valores do controle.
- 9- Após 21 dias de cultivo em meio MS $\frac{1}{4}$ acrescido de BAP, não houve diferença nas porcentagens de germinação do controle e de BAP a 10^{-7} M, que foram maiores que para os demais tratamentos

- 10- Houve redução de massa seca de gametófitos cultivados por 28 dias em meio MS $\frac{1}{4}$ e Dyer, acrescidos de BAP a 10^{-7} , 5×10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} M.

- 11- Os maiores níveis de luz (50 e 64% de redução da luz total) causaram um retardamento inicial na germinação e uma redução no crescimento e desenvolvimento dos gametófitos.

- 12- Houve um aumento inicial na germinação e nos teores de clorofila dos gametófitos cultivados nos menores níveis de luz (80 e 95% de luz total) e aumento nos níveis de açúcares, quando cultivados com redução de 80% da luz total.

5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, D.C., PAWAR, S.S., & MASCARENHAS, A F. 1993. Cryopreservation of spores of *Cyathea spinulosa* Wall. ex. Hook.f. na endangered tree fern. J. Plant Physiol. 142: 124-126.
- ARNON, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24: 1-15.
- BENSON, E. E.; LYNCH, P. T. & STACEY, G. N. 1998. Advances in plant cryopreservation technology: current applications in crop plant biotechnology. AgBiotech News and Information . 10(5): 133N-141N.
- BERNABE, N.; WILLIAMS-LINERA, G. & PALACIOS-RIOS, M. 1999. Tree ferns in the interior and at the edge of a mexican cloud forest remnant: spore germination and sporophytes survival and establishment. Biotropica. 31(1): 83-88.
- BHOJWANI, S. S. & RAZDAN, M. K. 1983. Development in crop science (5)-plant tissue culture: theory and practice. 4^a ed. Ed. Elsevier – Amsterdam, The Netherlands. 373-385p.

- BORELLI, F.P., CASTRO, C.E.F., MATTHES, L.A.F. TOMBOLATO, A F.C. & NAGAI, V. 1990. Propagação de pteridófitas *in vitro* e *in vivo* através de esporos. Bragantia (IAC). 49(2): 205-219.
- CAMLOH, M., GOGALA, N. & RUZIE, R. 1989. The micropropagation of *Nephrolepis exaltata*. Bioloski vestnik. 37(3): 23-32.
- CAMLOH, M. & GOGALA, N. 1992. *In vitro* culture of *Platycerium bifurcatum* gametophytes. Scientia Horticulturae . 51: 343-346.
- CAMLOH, M. 1993. Spore germination and early gametophyte development of *Platycerium bifurcatum*. American Fern Journal. 83(3): 79-85.
- CAMLOH, M.; GOGALA, N. & RODE, J. 1994. Plant regeneration from leaf explants of the fern *Platycerium bifurcatum in vitro*. Scientia Horticulture. 56: 257-266.
- CAMLOH, M. & ZEL, J. 1995. Isolation and first divisions of *Platycerium bifurcatum* protoplasts. Acta Pharm. . 45: 301-304.

CAMLOH, M.; RAVNIKAR, M. & ZEL, J. 1996. Jasmonic acid promotes division of fern protoplasts, elongation of rhizoids and development of gametophytes. Physiologia Plantarum . 97: 659-664.

CARAFÀ, A. M. 1990. Gametophyte development of *Woodwardia radicans* (L.) Sm.: effect of population density and antheridiogen on Sex expression. Giornale Botanico Italiano. 124: 571-580.

DOLINŠEK, J. A. & CAMLOH, M. 1997. Gametophyte and sporophytic regeneration from bud scales of the fern *Platycerium bifurcatum* (Cav.) C. Chr. *in vitro*. Annals of Botany . 80: 23-28.

DOUGLAS, G. E. & SHEFFIELD, E. 1990. A new technique for the culture of fern gametophytes. Plant Cell Reports. 8: 632-634.

DYER, A. F. 1979. The culture of fern gametophytes for experimental investigation. In: The experimental biology of ferns. London. Academic. p.253-305.

ENDLER, J. A. 1993. The color of light in forests and its implications. Ecological Monographs . 63 (1): 1-27.

- FERNÁNDEZ, H.; BERTRAND, A. M. & TAMÉS, R. S. 1996 a. Micropropagation and phase change in *Blechnum spicant* and *Pteris ensiformis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 44: 261-265.
- FERNÁNDEZ, H.; BERTRAND, A. M. & TAMÉS, R. S. 1996 b. Influence of tissue culture conditions on apogamy in *Dryopteris affinis* sp. *affinis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture . 45: 93-97.
- FERNÁNDEZ, H.; BERTRAND, A. M. & TAMÉS, R. S. 1997 a. Gemmation in cultured gametophytes of *Osmunda regalis*. Plant Cell Reports. 16: 358-362.
- FERNÁNDEZ, H.; BERTRAND, A. M.; FEITO, I. & TAMÉS, R. S. 1997 b. Gametophyte culture *in vitro* and antheridiogen activity in *Blechnum spicant*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 50: 71-74.
- FERNÁNDEZ, H.; BERTRAND, A. M. & TAMÉS, R. S. 1997 c. Plantlet regeneration in *Asplenium nidus* L. and *Pteris ensiformis* L. by homogenization of BA treated rhizomes. Scientia Horticulture. 68: 243-247.
- FILIPPINI, E.C.P; DUZ, S.R. & RANDI, A.M. 1999. Light and storage on the germination of spores of *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook., Dicksoniaceae. Revista Brasileira de Botânica. 22(1): 21-26.

- FISHER, R. A. & YATES, F. 1971. Tabelas estatísticas para pesquisa em biologia, medicina e agricultura. São Paulo. Ed. Polígono e EDUSP. 150p.
- GEORGE, E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture- the technology (part.1) 2^oed. Ed. Exegetics Limited, England. 173-180p.
- GOLLER, K. & RYBCZYNSKI, J. J. 1995. *In vitro* culture used for woody fern *Cyathea australis* (R. Br.) domin vegetative propagation. Acta Societatis Botanicorum Poloniae .64(1): 13-17.
- GOTTSCHALK, K. W. 1994. Shade, leaf growth and crown development of *Quercus rubra*, *Quercus velutina*, *Prunus serotina* e *Acer rubrum* seedlings. Tree Physiology . 14: 735-749.
- HANNA, W. W. & TOWILL, L. E. 1995. Long-term pollen storage. Plant Breeding Reviews . 13: 179-207.
- HISCOX, J.D. & ISRAELSTAN, G.F. 1979 A method for extration of chlorophil from leaf without maceration. Can J. Bot. 57: 1332-1334.

- JAMARILLO, I.R., PÉREZ-GARCIA, B. & MENDOZA, A. 1996. Desarrollo del gametofito y del esporofito joven de *Niphidium crassifolium* (Filicales: Polypodiaceae s.str.) Revista. Biol. Trop. 44(2): 485-490.
- KORPELAINEN, H. 1994. Growth, Sex determination and reproduction of *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott gametophytes under varying nutritional conditions. Bot. J. Linnean Society. 114: 357-366.
- KORPELAINEN, H. 1995. Growth and reproductive characteristics in artificially formed clonal gametophytes of *Dryopteris filix-mas* (Dryopteridaceae). Pl. Syst. Evol. 196: 195-206.
- KURIYAMA, A & TAKEUCHI, M. 1990. Regulatory factors to affect sporophytic shoot formation of *Equisetum arvense* induced by exogenously supplied cytokinin. J. Plant Physiol. 137: 233-237.
- KURYAMA, A.; SUGAWARA, Y.; MATSUSHIMA, H. & TAKEUCHI, M. 1990. Production of sporophytic structures from gametophytes by cytokinin in *Equisetum arvense*. Naturwissenschaften . 77: 31-32.
- KWA, S. H.; WEE, Y. C.; LIM, T. M. & KUMAR, P. P. 1995 a. IAA-induced apogamy in *Platycerium coronarium* (Koenig) Desv. gametophytes cultured *in vitro*. Plant Cell Reports. 14: 598-602.

- KWA, S. H.; WEE, Y. C.; LIM, T. M. & KUMAR, P. P. 1995 b. Establishment and physiological analyses of photoautotrophic callus cultures of the fern *Platycerium coronarium* (Koenig) Desv. under CO₂ enrichment. Journal of Experimental Botany. 46(291): 1535-1542.
- KWA, S. H.; WEE, Y. C.; LIM, T. M. & KUMAR, P. P. 1997. Morphogenetic plasticity of callus reinitiated from cell suspension cultures of the fern *Platycerium coronarium*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture . 48: 37-44.
- LYNCH, P. T. & BENSON, E. E. 1991. Cryopreservation, a method for maintaining the plant regeneration capability of rice cell suspension cultures. In: Rice Genetics Vol. II, Proceedings of the Second International Rice Genetics, IRRI, Los Banos, Philippines, pp 321-332.
- LYNCH, P. T.; BENSON, E. E.; JONES, J.; COCKING, E. C.; POWER, J. B. & DAVEY, M. R. 1994. Rice cell cryopreservation: the influence of culture methods and the embryogenic potential of cell suspensions on post-thaw recovery. Plant Science . 98: 185-192.
- MATERI, D. M. & CUMMING, B. C. 1991. Effects of carbohydrate deprivation on rejuvenation, apospory, and regeneration in ostrich fern (*Matteuccia struthiopteris*) sporophytes. Can. J. Bot.. 69: 1241-1245.

- MATERI, D. M.; DIONNE, L. A. & CUMMING, B. C. 1995. *In vitro* polyploidization of mature ostrich fern sporophytes through rejuvenation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 42: 27-31.
- McCREADY, R.M., GUGGOLZ, J., SILVIERA, V.&OWENS, H.S.1950. Determination of starch and amylose in vegetables. Anal. Chem.22:1156-1158.
- MENDOZA, A ,PÉREZ-GARCIA, B., JAMARILLO, I.R. & RICCI, M. 1996-1997. Desarrollo del gametofito de *Pteris berteriana* (Pteridaceae: Pterideae).Revista Biol. Trop. 44(3)/45(1): 51-57.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- MYCOCK, D. J.; WESLEY-SMITH, J. & BERJAK, P. 1995. Cryopreservation of somatic embryos of four species with and without cryoprotectant pre-treatment. Annals of Botany . 75: 331-336.
- NAKAMURA, M. & MAEDA, M. 1994. Isolation and culture of protoplasts from young sporophytes of *Salvinia natans* aseptically obtained by co-culture of female and male gametophytes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 36: 237-242.

- NAKAMURA, M. & MAEDA, M. 1995. Gametophytes derived from sporophytic tissues in a fern, *Lygodium japonicum* L. 1. Introduction of the gametophytes and their protoplast isolation. J. Plant Physiol. 145: 185-188.
- PANGUA, E.; LINDSAY, S. & DYER, A. 1994. Spore germination and gametophyte development in three species of *Asplenium*. Annals of Botany. 73: 587-593.
- PASQUAL, M.; HOSHIKA, E. & ISHIDA, J. S. 1994. Influência de diferentes concentrações de sacarose e sais minerais sobre a multiplicação *in vitro* de *Nephrolepis exaltata*. Pesq. Agropec. Bras. . 29(11): 1681-1684.
- PÉREZ-GARCÍA, B.; RIBA, R. & MENDOZA, A. 1994 a Observaciones del gametofito de *Thelypteris rhachiflexuos* Riba (Thelypteridaceae). Acta Botánica Mexicana. 28: 63-69.
- PÉREZ-GARCÍA, B.; MENDOZA, A. & RIBA, R. 1994 b. Desarrollo gametofítico de *Metaxya rostrata* (Filicales: Metaxyaceae). Revista Biol. Trop. 42(3): 455-460.

- PÉREZ-GARCÍA, B.; FRAILE, M. E. & MENDOZA, A. 1995. Desarrollo del gametofito de *Lophosoria quadripinnata* (Filicales: Lophosoriaceae). Revista de Biol. Trop. .43(1-3): 55-60.
- PÉREZ-GARCÍA, B.; MENDOZA, A. & RICCI, M. 1996. Morfogénesis de la fase sexual de *Blechnum chilense* y *Blechnum cycadifolium* (Pterophyta: Blechnaceae). Revista de Biología Tropical. 44(2): 491-497.
- PÉREZ-GARCÍA, B., MENDOZA, A., RIBA, R. & RICCI, M. 1996-1997. Morfogénesis del gametofito del helecho *Thyrsopteris elegans* (Filicales: Thyrsopteridaceae). Revista Biol. Trop. 44(3)/45(1): 59-65.
- RAGHAVAN, V. 1989. Developmental biology of fern gametophytes. Cambridge University Press, Cambridge.
- RANDI, A. M. 1987. Aspectos morfogênicos, bioquímicos e citoquímicos durante a germinação de esporos de *Cyathea delgadii* Sternb. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 192p.
- RANDI, A. M. & FELIPPE, G. M. 1988. Efeito do armazenamento de esporos, da aplicação de DCMU e da pré-embebição em PEG na germinação de *Cyathea delgadii*. Ciência e Cultura. 40(5): 484-489.

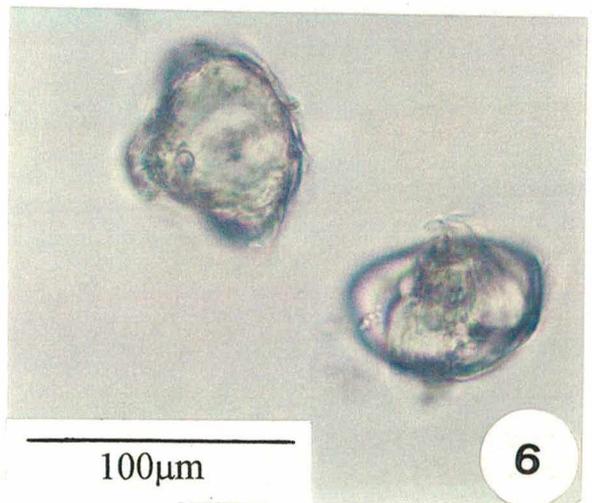
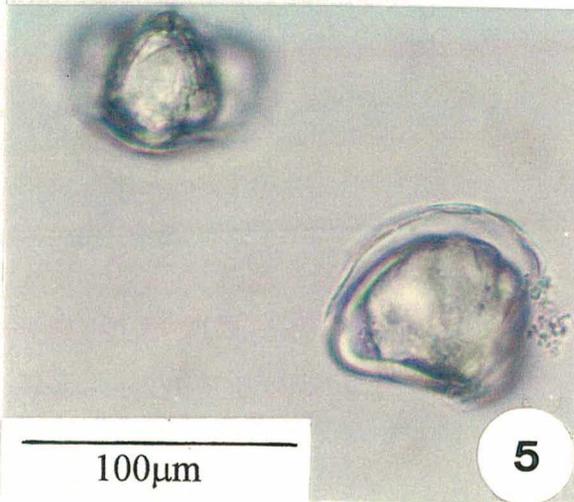
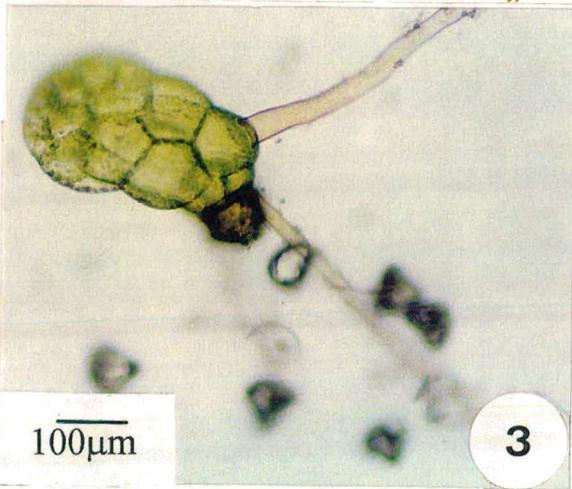
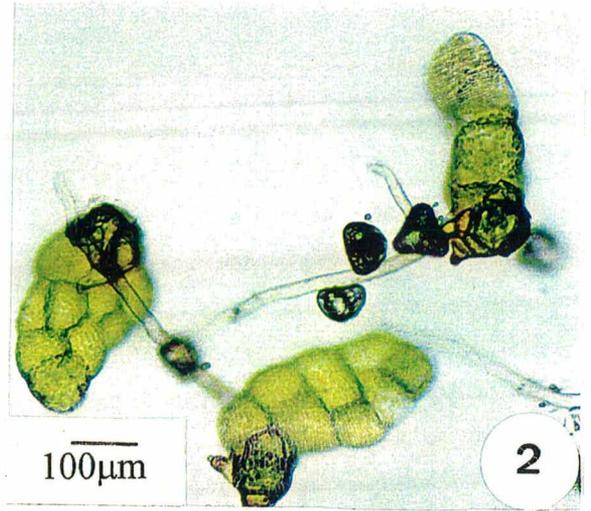
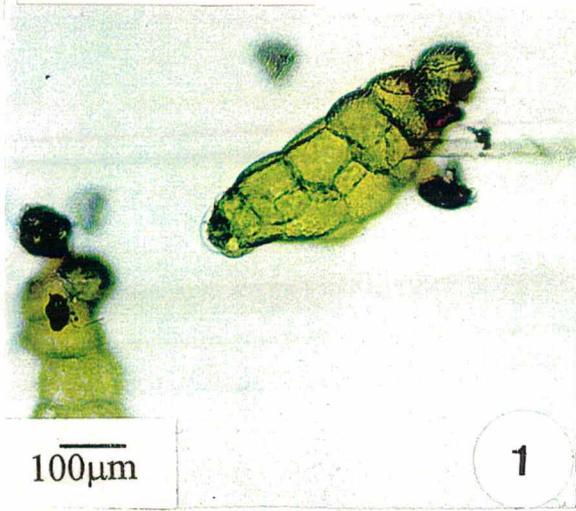
- RANDI, A. M. 1996. Photosensitivity, viability and storage reserves in spores of *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch. (Pteridaceae). Revista Brasileira de Botânica. 19(1): 105-108.
- SEHNEM, A.S.J. 1978. Ciateáceas. Flora Ilustrada Catarinense. Herbário Barbosa Rodrigues. Itajaí. SC. 01-09p.
- SHANNON, J.C. 1968. A procedure for the extraction and fractionation of carbohydrates from immature *Zea mays* kernels. Res.Bul.(Purdue). 842:1-8.
- SNEDECOR, G.N. 1962. Statistical methods. Iowa State University Press, Iowa.
- STANWOOD, P. C. & SOWA, S. 1995. Evaluation of onion (*Allium cepa* L.) seed after 10 years of storage at 5, -18, and -196°C. Crop Science. 35(3): 852-856.
- SYVERTSEN, J. P. & SMITH, M. L. Jr. 1984. Light acclimation in *Citrus* leaves. I. Changes in physical characteristics, chlorophyll, and nitrogen content. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109(6): 807-812.
- TENG, W.-L. 1997. Activated charcoal affects morphogenesis and enhances sporophyte regeneration during leaf cell suspension culture of *Platycerium bifurcatum*. Plant Cell Reports. 17: 77-83.

- TENG, W. -L. & TENG, M. -C. 1997. *In vitro* regeneration patterns of *Platycerium bifurcatum* leaf cell suspension culture. Plant Cell Reports. 16: 820-824.
- THAKUR, R. C.; HOSOI, Y. & ISHII, K. 1998. Rapid *in vitro* propagation of *Matteuccia struthiopteris* (L.) Todadro – an edible fern. Plant Cell Reports. 18: 203-208.
- TRYON, R. & TRYON, A.F. 1982. Ferns and allied plants with special reference to Tropical America. Springer-Verlag. New.York. 144-149p.
- WHITTIER, D. P. & MOYROUD, R. 1993. The promotion of spore germination and gametophyte development in *Ophioglossum palmatum* by low pH. American Fern Journal. 83(2): 41-46.
- WHITTIER, D. P. & THOMAS, R. D. 1993. Gametophytes and young sporophytes of *Botrychium jenmanii* in axenic culture. Int. J. Plant Sci. 154(1): 68-74.

6- ANEXOS

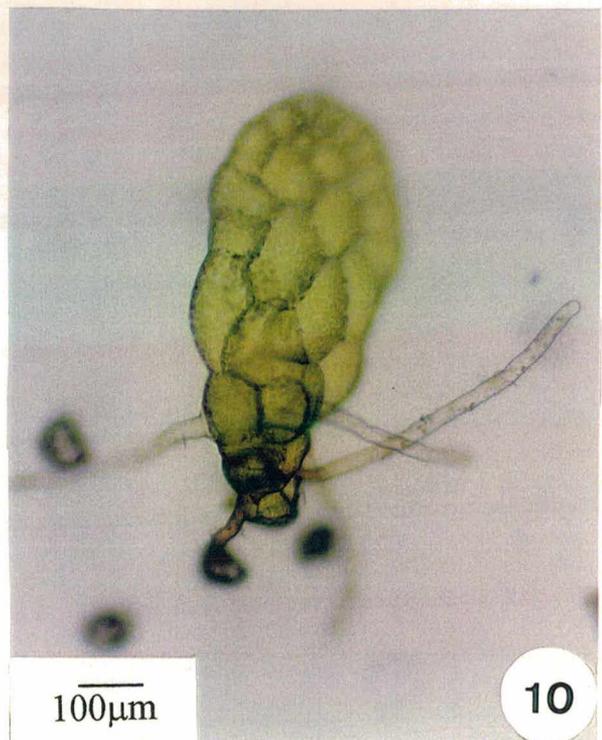
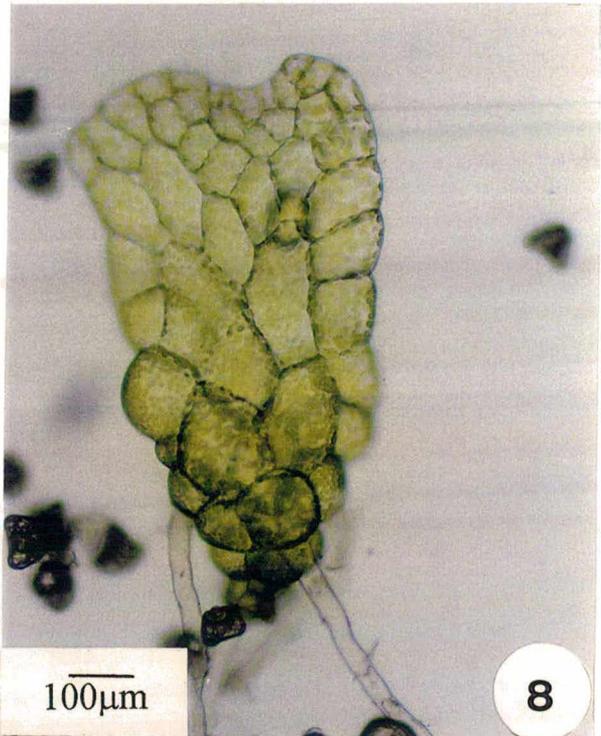
PRANCHA 1-

Gametófitos de *Dicksonia sellowiana* cultivados por 30 dias, em meio Dyer líquido (1), embebidos previamente por duas horas em solução crioprotetora (2), previamente imersos em NL e degelados de forma rápida (3), previamente imersos por 15 minutos em NL e degelados de forma lenta (4), embebidos previamente por duas horas em solução crioprotetora, imersos por 15 minutos em NL e degelados de forma rápida (5) e lenta (6), cultivados sob luz fluorescente branca, em fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Fotografias obtidas com microscópio de fluorescência (Bx40 – Olympus-PM20- Exposure Control Unit), com aumento de 10-40X.



PRANCHA 2-

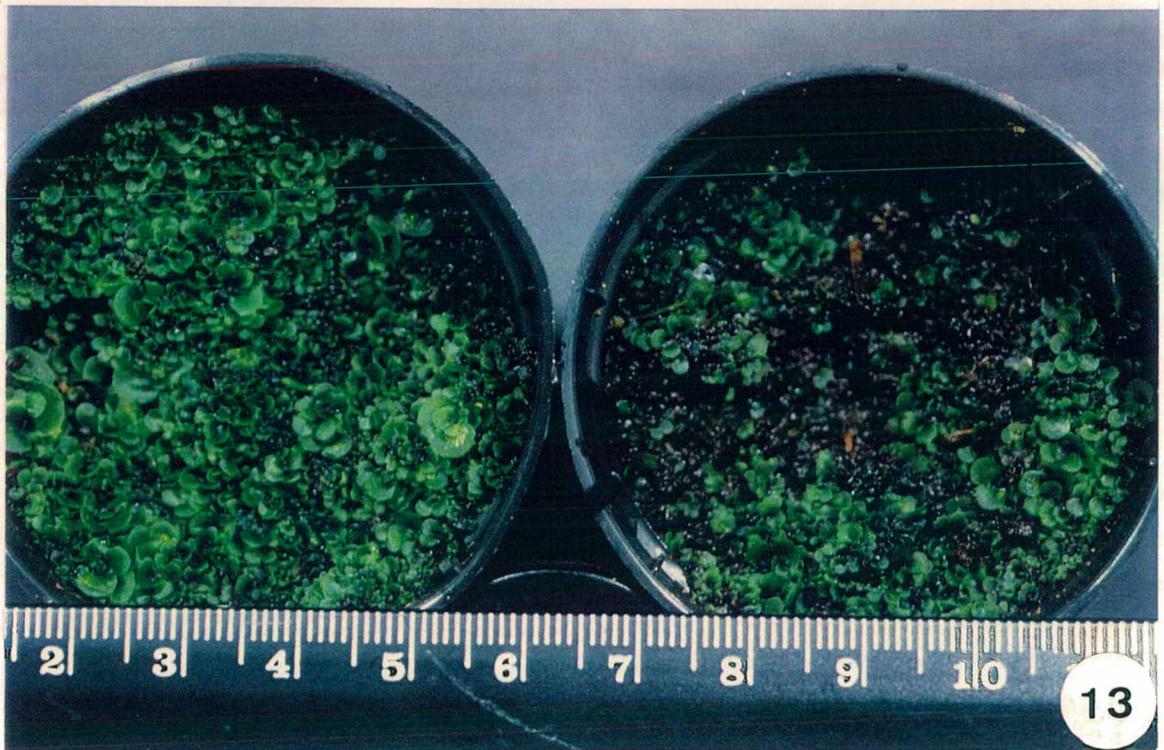
Gametófitos de *Dicksonia sellowiana* cultivados por 40 dias em meio Dyer líquido. Os esporos foram previamente imersos por 15 dias em NL, degelados de forma rápida (7) e lenta (8), previamente imersos por 30 dias em NL, degelados de forma rápida (9) e lenta (10), cultivados sob luz fluorescente branca, em fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Fotografias obtidas com microscópio de fluorescência (Bx40 – Olympus- PM20- Exposure Control Unit), com aumento de 10X.



PRANCHA 3-

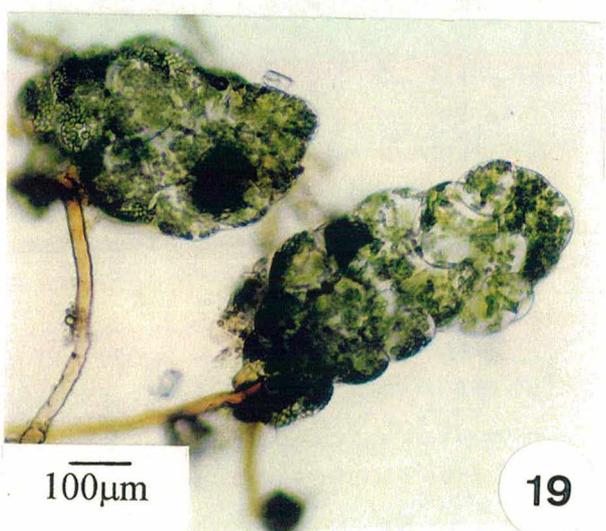
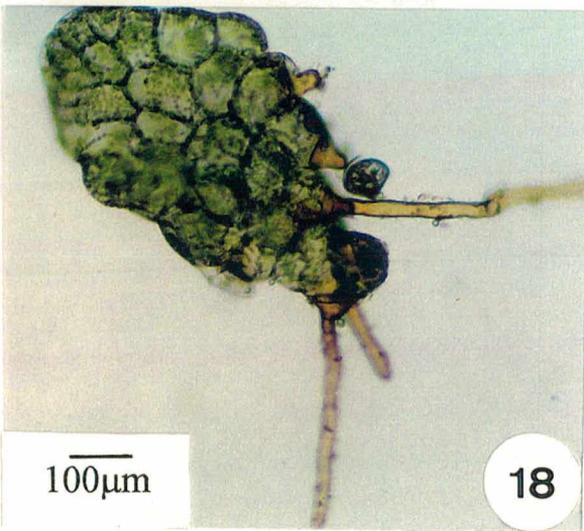
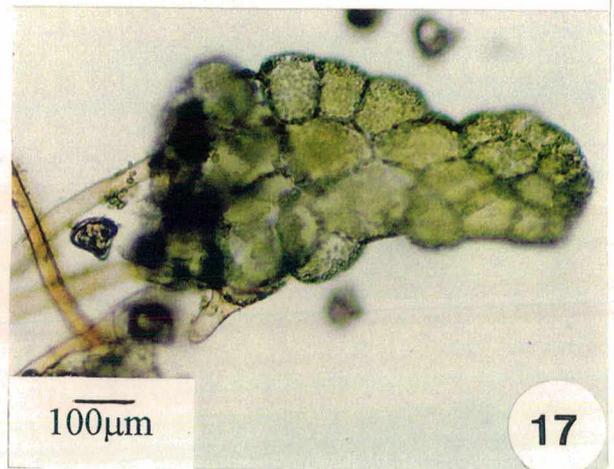
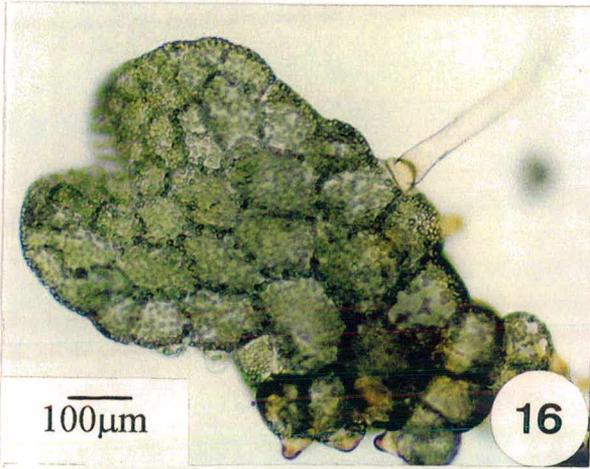
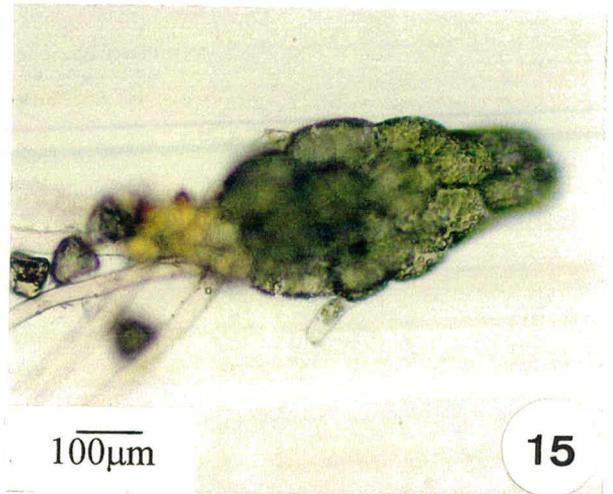
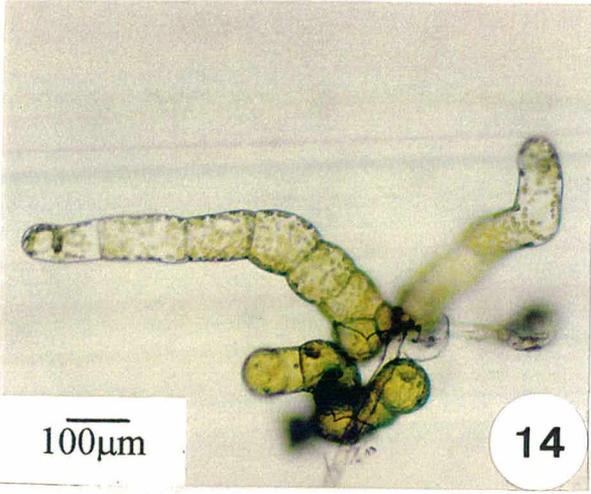
Gametófitos de *Dicksonia sellowiana* cultivados por 40 dias em meio Dyer líquido. Os esporos foram previamente imersos por 90 dias em NL, degelados de forma rápida (11) e lenta (12), cultivados sob luz fluorescente branca, em fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Fotografias obtidas com microscópio de fluorescência (Bx40 – Olympus- PM20- Exposure Control Unit), com aumento de 10X.

Gametófitos de *Dicksonia sellowiana* com 120 dias em vaso com solo coquim (13). Esporos foram previamente imersos por 15 minutos em NL, degelados de forma rápida (vaso à direita) ou lenta (vaso à esquerda) e cultivados em meio Dyer por 60 dias sob luz fluorescente branca, em fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.



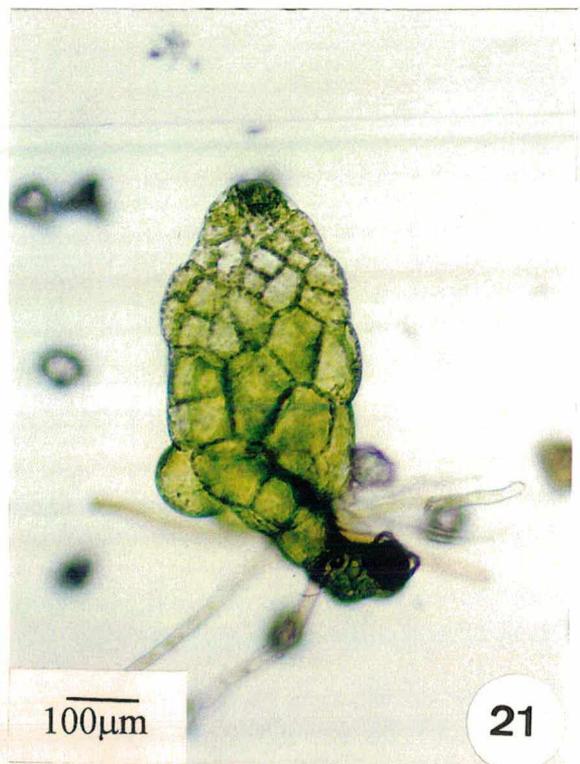
PRANCHA 4-

Gametófitos de *Dicksonia sellowiana* cultivados por 35 dias em meio Dyer líquido sem sacarose (14), acrescido de 1% de sacarose (15 de 2% de sacarose (16), de 3% de sacarose (17), de 4% de sacarose (18) e de 5% de sacarose (19). Fotografias obtidas com microscópio de fluorescência (Bx40 – Olympus- PM20- Exposure Control Unit), com aumento de 10X.



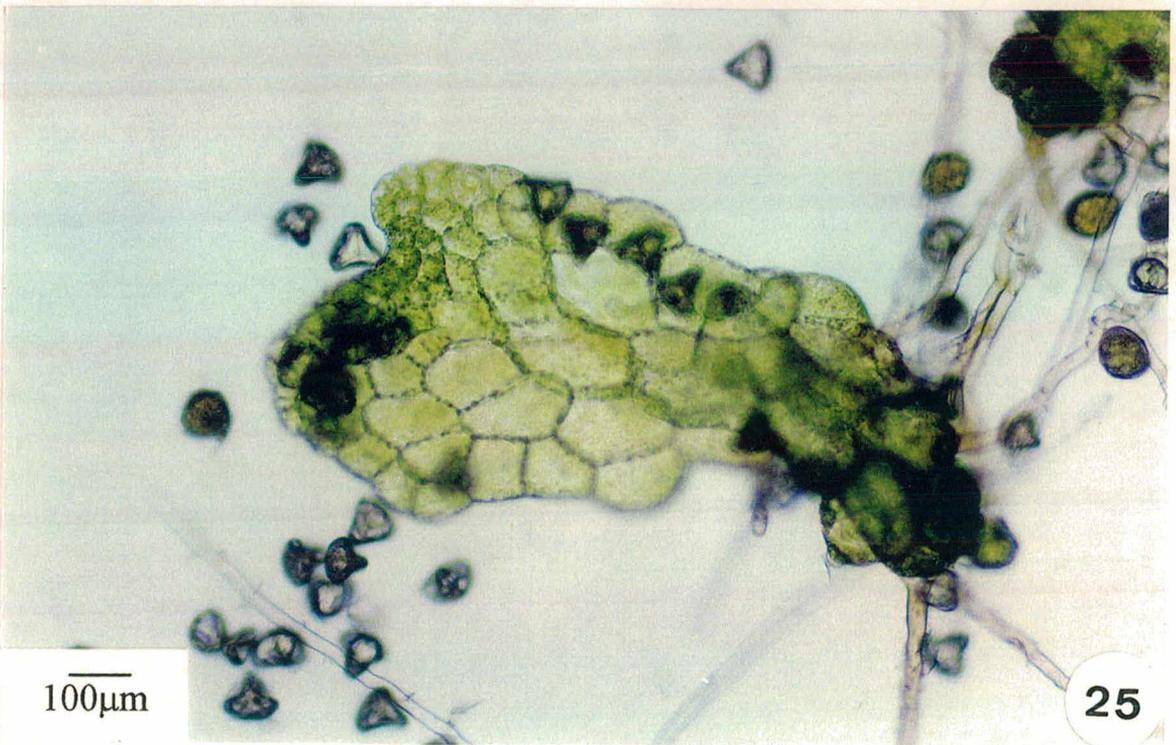
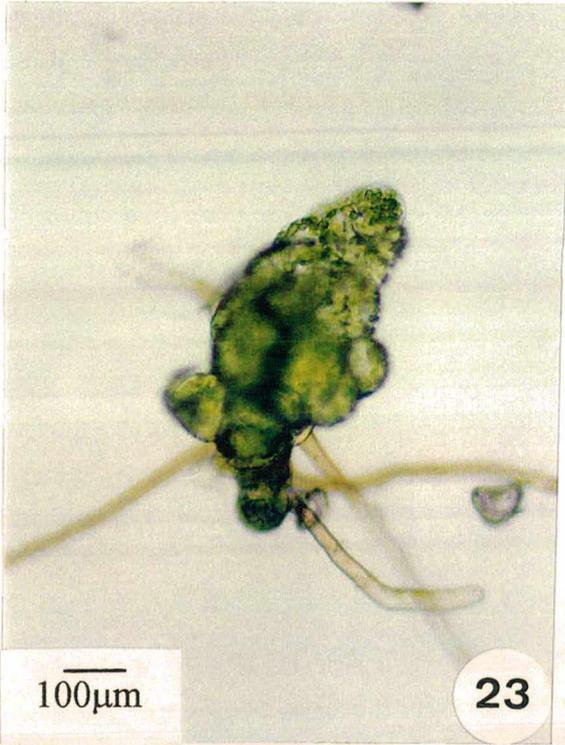
PRANCHA 5-

Gametófitos de *Dicksonia sellowiana* cultivados por 35 dias em meio MS líquido sem sacarose (20), acrescido 1% de sacarose (21) e acrescido de sacarose 2% (22), sob luz fluorescente branca, em fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Fotografias obtidas com microscópio de fluorescência (Bx40 – Olympus- PM20- Exposure Control Unit), com aumento de 10X.



PRANCHA 6-

Gametófitos de *Dicksonia sellowiana* cultivados por 35 dias em meio MS líquido acrescido de 3% de sacarose (23), de 4% de sacarose (24) e de 5% de sacarose (25), sob luz fluorescente branca, em fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Fotografias obtidas com microscópio de fluorescência (Bx40 – Olympus- PM20- Exposure Control Unit), com aumento de 10X.



PRANCHA 7-

Potes tipo “baby-food” contendo gametófitos de *Dicksonia sellowiana* com 120 dias em meio MS solidificado, acrescido de sacarose a 0, 1, 2, 3, 4 e 5%. Os esporos foram cultivados previamente por 60 dias em meio Dyer líquido (26). Esporos (7 dias) e gametófitos (21 dias) de *Dicksonia sellowiana* cultivados em erlenmeyers contendo 20 ml de meio Dyer líquido (27).



26



27

PRANCHA 8-

Gametófitos de *Dicksonia sellowiana* com 90 dias em bandeja com solo coquim. Os gametófitos são resultado da homogeneização entre vários tratamentos cultivados em meio líquido de Dyer (28) ou MS (29) com adição de sacarose (0, 1, 2, 3, 4 e 5%).



PRANCHA 9-

Gametófitos e esporófitos de *Dicksonia sellowiana* com 210 dias de cultivo (30 e 31). O material é resultado da homogeneização entre gametófitos obtidos através de vários testes de germinação, cultivados inicialmente em meio Dyer, incluindo esporos coletados em 1995, 1996 e 1998.



PRANCHA 10-

Figura 32- Esporófito de *Dicksonia sellowiana* em vaso com solo coquim.
Plântula com 240 dias de cultivo.



PRANCHA 11-

Gametófitos de *Dicksonia sellowiana* cultivados por 100 dias em meio Dyer líquido sob redução de 50% da luminosidade total (33), 64% da luminosidade total (34), 80% da luminosidade total (35) e 95% da luminosidade total. Fotografias obtidas com microscópio de fluorescência (Bx40 – Olympus-PM20- Exposure Control Unit), com aumento de 10X.

