



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL



“EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPOROS EM NITROGÊNIO LÍQUIDO
NO DESENVOLVIMENTO DE GAMETÓFITOS DE *Dicksonia sellowiana* Hook.”

PATRÍCIA ALMEIDA BARROSO MOREIRA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis – SC
Fevereiro de 2005

Patrícia Almeida Barroso Moreira

**“EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPOROS EM NITROGÊNIO LÍQUIDO
NO DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE *Dicksonia sellowiana* Hook.”**

Dissertação de Mestrado

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina

Orientadora: Pr^{fa} Dr^a Áurea Maria Randi

Co-Orientadora: Pr^{fa} Dr^a Marisa Santos

Florianópolis - 2005

**Esforço constante,
Esforço incansável,
A busca de metas claras
Com esforço sincero é o único caminho,
Para a realização pessoal.
(Dalai Lama)**

Agradecimentos

Aos meus pais EDUARDO e LUCY que sempre acreditaram em mim e me apoiaram incondicionalmente para que eu alcançasse todos os meus sonhos;

À minha irmãzinha LUÍZA pela nossa amizade e carinho;

Ao meu marido ISRAEL e ao meu filho BRENO, que muitas vezes deixaram de me ter em sua companhia para que chegasse até aqui, mas foi graças a seu amor que consegui;

À minha professora Dr^o ÁUREA MARIA RANDI, que muito além de orientadora também se revelou uma grande amiga;

À professora Dr^o MARISA SANTOS, sua co-orientação e seus bons conselhos otimistas;

Ao PAULO SÉRGIO SCHRVEITZER, administrador da Reserva do Patrimônio Natural do Caraguatá por ter colaborado com as coletas que deram início a este trabalho;

À ROSANE HIENDLMAYER pela sua ajuda excepcional e seu coleguismo na nossa aventura à cavalo;

À TAGIANE ARIOLI e suas “mãos de fada”, que permitiram a obtenção de cortes excelentes;

À VERA, nossa secretária amiga sempre pronta a ajudar os alunos;

À FIRMA FORTE, pelos momentos de alegria e amizade ao longo destes anos, a força motriz da vida;

À todos os professores do curso de Biologia Vegetal pela aquisição do conhecimento que nos foi passado com tanto brilhantismo;

À professora DR^o MARIA LEONOR D'EL REI SOUZA, por ter me despertado a paixão pela botânica na 1^o fase do curso de Agronomia.

À CAPES pela bolsa de final de curso, que possibilitou garantias de término ao mesmo;

Agradeço a DEUS, a energia divina que alimenta minha alma e me orienta soberanamente pela caminhada da vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	10
LISTA DE ABREVIACÕES	11
RESUMO	12
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO	14
2.OBJETIVOS.....	26
2.1 - OBJETIVOS GERAIS.....	26
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. MATERIAL	27
3.2. MÉTODOS	29
3.2.1. <i>Germinação de Esporos</i>	29
3.2.2. <i>Germinação de esporos armazenados por longo tempo sob refrigeração</i>	32
3.2.3. <i>Criopreservação de Esporos</i>	32
3.2.4. <i>Desenvolvimento dos Gametófitos</i>	33

3.2.5. <i>Análise morfo-anatômica dos gametófitos</i>	35
3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. GERMINAÇÃO DE ESPOROS:.....	39
4.1.1. <i>Teste de germinação de esporos recém-coletados</i>	39
4.1.2. <i>Germinação e tempo médio de germinação de esporos armazenados sob refrigeração por 54 meses:</i>	43
4.1.3. <i>Germinação e tempo médio de germinação de esporos controle e esporos criopreservados em nitrogênio líquido:</i>	47
4.2. ANÁLISE MORFO-ANATÔMICA DE ESPOROS E GAMETÓFITOS:.....	51
6. CONCLUSÕES	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Ciclo de Vida de uma samambaia homosporada.....	17
2. Mapa de Santa Catarina e localização do município de Antônio Carlos.....	27
3. Indivíduos de <i>D. sellowiana</i> Hook.. da RPPN do Caraguatá.....	28
4. Indivíduos de <i>D. sellowiana</i> Hook.. da RPPN do Caraguatá.....	28
5. Esporos de <i>D. sellowiana</i> Hook.. inoculados em meio de cultura.	31
6. Esporos recém-coletados de <i>D. sellowiana</i> Hook.. , observados em microscopia óptica (400x).....	39
7. Germinação de esporos de <i>D. sellowiana</i> Hook.. cultivados sob fotoperíodo de 16 horas, a temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$	41
8. Germinação de esporos de <i>D. sellowiana</i> Hook.. armazenados em refrigeração a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 54 meses, cultivados em meio Dyer sob fotoperíodo de 16 horas, a temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$	44
09.Germinação de esporos controle (CT) e criopreservados (CRIO) de <i>D.</i> <i>sellowiana</i> Hook..	49
10.Esporos do tratamento controle fotografados em MO (400x)	52

11.Esporos do tratamento de criopreservação, MO (400x)	52
12.Esporos controle observados em MEV (2000x).....	52
13.Esporos controle observados em MEV (1000x).....	52
14.Esporos do tratamento de criopreservação, observados em MEV (2000x)..	52
15.Esporos do tratamento de criopreservação, observados em MEV (1000x)...	52
16.Células protalias de gametófito controle, ao MO (400x).....	55
17.Células protalias de gametófito controle, ao MO (400x).....	55
18.Gametófitos provenientes de esporos criopreservados.....	55
19.Gametófitos provenientes de esporos e controle	55
20.Anterídeos (setas) de gametófitos do tratamento controle.....	55
21.Anterídeos (setas) de gametófitos do tratamento criopreservação	55
22.Arquegônios (setas) de gametófitos do tratamento controle.....	55
23.Arquegônios (setas) de gametófitos do tratamento criopreservação	55

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro		Página
01	Composição química do Meio de DYER.....	30
02	Reagentes para fixação das amostras de gametófitos.....	36

Tabela		Página
01	Composição química do substrato utilizado para o cultivo de gametófitos e esporófitos jovens de <i>Dicksonia sellowiana</i> Hook.	34
02	Valores médios de germinação e esporos inviáveis <i>D. sellowiana</i> Hook.	40
03	Valores médios de germinação e de esporos inviáveis observados em esporos armazenados por 54 meses.....	45

LISTA DE ABREVIACÕES

DMSO	Dimetilsulfóxido
HMDS.....	hexametildesilane
MEV.	microscopia eletrônica de varredura
MO.....	microscopia ptica
N.L.	nitrogênio líquido

Efeito da criopreservação de esporos em nitrogênio líquido no desenvolvimento de plantas de *Dicksonia Sellowiana* Hook.

**Autora: Patrícia Almeida Barroso Moreira
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Áurea Maria Randi**

RESUMO

Dicksonia sellowiana Hook.. (Dicksoniaceae) é uma samambaia arbórea popularmente conhecida como “xaxim” ou samambaiçu imperial. É uma das espécies ameaçadas de extinção da lista oficial do IBAMA (06/62). Com o intuito de desenvolver um protocolo seguro e eficaz para a manutenção desta espécie em bancos de germoplasma, este trabalho procurou analisar o efeito do armazenamento criogênico no desenvolvimento de plantas produzidas a partir de esporos imersos em nitrogênio líquido. Para verificar a eficiência do método na manutenção da viabilidade dos esporos e na estabilidade genética, quatro amostras de 50 mg de esporos recém-coletados foram colocadas em criotubos de polipropileno de 1ml que foram imersos em nitrogênio líquido durante uma hora. Esporos controle e criopreservados foram esterilizados superficialmente utilizando-se solução a 20% de hipoclorito de sódio comercial (2% de cloro ativo). Esporos esterilizados foram inoculados em frascos cônicos contendo 20ml of meio líquido de Dyer e foram mantidos em sala de crescimento ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) sob fotoperíodo de 16 horas. Após 30 dias de cultivo, os gametófitos jovens foram transferidos para solo constituído de terra roxa, com adição de composto orgânico termofílico na proporção de 3:1. Quando atingiram a fase cordiforme, 200 gametófitos foram transferidos para 4 bandejas (50 por bandeja) contendo o mesmo solo e a porcentagem de formação de esporófitos foi acompanhada semanalmente. Dez gametófitos da fase cordiforme foram fixados em glutaraldeído e observados sob microscopia óptica e eletrônica. A criopreservação não alterou a porcentagem de germinação e o tempo médio de germinação. Estudos anatômicos sob MO e MEV não evidenciaram diferenças entre os tratamentos.

**EFFECT OF THE CRYOPRESERVATION OF SPORES IN LIQUID NITROGEN IN
THE DEVELOPMENT OF PLANTS OF DICKSONIA SELLOWIANA HOOK.**

Author: Patrícia Almeida Barroso Moreira

Adviser: Prof^a. Dr^a. Áurea Maria Randi

ABSTRACT

Dicksonia sellowiana Hook. (Dicksoniaceae) is a tree fern popularly known as “xaxim” or samambaiçu imperial. It is one of the endangered species of the official list of IBAMA (06/62). With the aim of developing a safe and effective protocol for the maintenance of this species in germplasm banks, this work tried to analyze the effect of cryogenic storage in the development of plants produced from spores immersed in liquid nitrogen. To verify the effectiveness of this method in the maintenance of spore viability and genetic stability, four samples of 50mg of recently-collected fresh spores were placed in 1ml sterile polypropylene cryotubes, plunged into liquid nitrogen (LN) cryocans and held for one hour. Control and cryopreserved spores were surface sterilized using a 20% solution of commercial bleach (2% of active chlorine). Sterilized spores were sown in conical flasks containing 20ml of liquid Dyer medium and were kept in a growth chamber ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) under a 16-hour photoperiod. After 30 days' cultivation, young gametophytes were transferred to sterilized red soil with the addition of organic compost in the proportion of 3:1. When they reached a heart shape, 200 gametophytes were transferred to four trays (50 gametophytes for each tray) containing the same soil and the percentage of sporophyte formation was evaluated every week. Ten heart shape gametophytes of each treatment were fixed in glutaraldehyde for observation under optical and electronic microscopy. Anatomical studies of gametophytes under OM and SEM did not evidence differences between treatments.

1 INTRODUÇÃO

A pteridófita arbórea *Dicksonia sellowiana* Hook. também conhecida como samambaiçu-imperial, pertence à classe das *Filicineae*, ordem *Filicales*, sub-ordem *Eufilicineae* e a família *Dicksoniaceae*. As pteridófitas são criptogâmicas vasculares. As samambaias fazem parte das filicíneas, que são também denominadas fetos, graças à forma que tomam suas folhas quando novas (PEREIRA, 1981).

Segundo Sehnem (1978) a *Dicksonia sellowiana* encontra-se amplamente distribuída na América Latina. Existem ocorrências desta espécie do sudoeste do México, passando pela Venezuela até a Colômbia, sul da Bolívia, Paraguai, Uruguai e sudeste do Brasil (TRYON & TRYON, 1982). No Brasil, ocorre nos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, crescendo em altitudes que variam de 60m (ao sul de sua área de distribuição, no RS) até 2200 m, na Serra do Itatiaia, RJ (PIO CORRÊA, 1931; FERNANDES, 1997).

Em Santa Catarina, relatos de Klein (1978) referem-se a associação de *D. sellowiana* à Araucárias na submata baixa e pouco densa da Floresta dos Faxinais, onde predominam mirtáceas e aquifoliáceas entremeadas por taquarais e carazais, estando presente na Serra do Tabuleiro e no extremo Noroeste Catarinense.

A samambaiçu – imperial (*D. sellowiana*) em geral apresenta um estipe (caule) que pode alcançar até 5 metros e medir cerca de 50cm de diâmetro. Suas frondes chegam a 2 metros de comprimento, sendo bipinadas pinatisectas. Apresentam um tronco levíssimo, utilizado na confecção de cercas vivas, vasos, etc.; e parece que a umidade aumenta a sua durabilidade (PEREIRA, 1981).

A reprodução das pteridófitas ocorre em duas fases, uma assexuada e a outra sexuada. Durante a etapa da reprodução assexuada, na face abaxial das folhas de *D. sellowiana*, encontram-se grupos de pequenos corpúsculos chamados soros. Estes possuem uma coloração ferruginosa. Os soros se constituem de numerosos sacos denominados esporângios, que contêm os elementos reprodutores denominados esporos. Amadurecendo os esporângios, suas paredes (indúcio) rompem-se, lançando os esporos ao solo. Quando encontram terreno propício principalmente quanto a umidade e á temperatura, germinam formando o prótalo, uma pequena lâmina clorofilada de mais ou menos 1 cm de diâmetro que possui a forma de um coração. Possuindo clorofila e os pequenos filamentos (rizóides) pelos quais absorve água e sais minerais do solo, é capaz de realizar fotossíntese e, portanto, viver independente da planta mãe. Com a formação do prótalo, entra-se na fase sexuada da reprodução. Na face inferior do prótalo, formam-se os anterídios, órgãos reprodutivos masculinos e arquegônios, órgãos reprodutivos femininos. No interior dos órgãos sexuais femininos são produzidas as oosferas (células sexuais femininas) e no interior dos órgãos sexuais masculinos (anterídios) são produzidos os

anterozóides (células sexuais masculinas). Os anterozóides nadando dentro de uma gota de chuva ou orvalho até o arquegônio, dirigem-se à oosfera, fecundando-a. O ovo ou zigoto formado, depois de desenvolvido, culminará em uma plantinha. Esta plantinha inicialmente se nutrirá do prótalo até que possua folhas e raízes que permitam sua vida independente (PEREIRA, 1981).

Portanto, durante o ciclo de vida das pteridófitas (figura 1) são dois indivíduos que atuam: o esporófito, vegetal que nasce do prótalo, e que possui este nome porque dá origem assexuadamente aos esporos, e possui número cromossômico $2n$; e o gametófito ou prótalo, que é o vegetal transitório cuja denominação tem como causa o fato de produzir gametas, possuindo número de cromossomos n , significando que do esporófito para o gametófito ocorreu uma redução (PEREIRA, 1981).

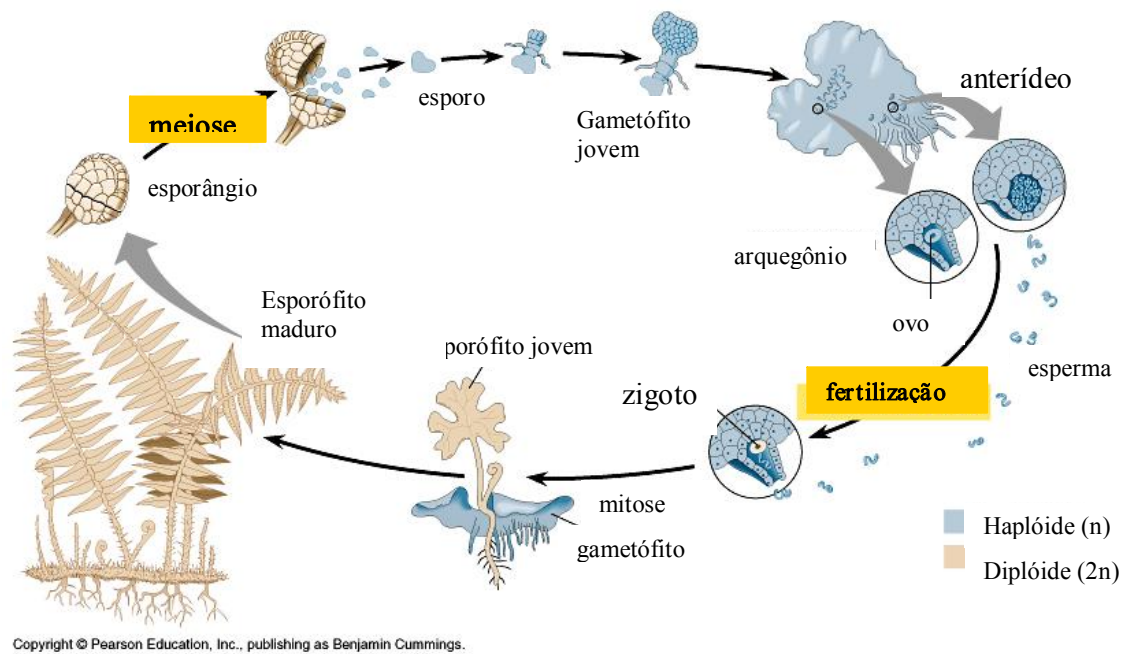


Figura 01. Ciclo de vida de pteridófitas homosporada. Extraído de Taiz & Zeiger, 1991.

A fase esporofítica é mais duradoura, totalmente diferenciada, com várias estruturas especializadas que permitem maximizar a absorção, translocação e retenção de água, podendo alcançar vários centímetros ou metros de altura, nas espécies arbóreas. Embora não haja dados sobre o desenvolvimento de gametófitos em áreas tropicais sazonalmente secas, os resultados obtidos em um estudo feito por Ranal (1999 a,b) indicaram que nestes ambientes o fator limitante mais importante para o estabelecimento de samambaias é a água e não a temperatura.

A água certamente é um fator preponderante no sucesso da reprodução gametofítica. Page (1979) afirma ser a água o elemento mais importante para a liberação dos anterozóides, pelo menos o mínimo necessário para a formação de um filme contínuo entre o anterídio e o arquegônio, mas não muito a ponto dos anterozóides liberados serem totalmente diluídos.

Nas pteridófitas homosporadas podem ocorrer vários sistemas de cruzamento, variando desde autofecundação até fecundação cruzada, em função de parâmetros ecológicos, tais como densidade populacional e decréscimo no agrupamento de gametófitos, bem como fatores abióticos, como a umidade do solo (FARRAR & GOOCH, 1975; McCÁUDICEY *et al.*,1985; SOLTIS & SOLTIS, 1987; KORPELAINE N, 1995).

As unidades de dispersão em pteridófitas são os esporos, que no caso de *D. sellowiana* são tetraédricos ou triletes, com as laterais achatadas e superfície

densamente granulada (TRYON & TRYON, 1982; SEHNEM, 1978). As espécies do gênero *Dicksonia* possuem um número médio de esporos por esporângio de 64 (HOLTTUM & SEM, 1961; apud FERNANDES, 1997).

Segundo Dyer (1979) a produção de esporos de samambaias adultas pode ser imensa. Em *Pteridium* sp. (Filicales) uma simples folha pode render mais de um grama de esporos e o conteúdo de uma folha pode apresentar cerca de 300 milhões de esporos. O mesmo autor também verificou que os esporos destas espécies podem conter como principal componente de reserva lipídios ou compostos protéicos. Em esporos com alta quantidade de lipídios, a coloração é amarelada e a quantidade de água é baixa apresentando índices inferiores a 5% na massa fresca total.

Os esporos podem germinar diretamente em contato com a água, no escuro completo, em resposta a determinado tratamento luminoso ou por ação de hormônios de crescimento; as substâncias orgânicas necessárias à germinação provêm do metabolismo das reservas do próprio esporo (RAGHAVAN, 1989).

Os esporos de *D. sellowiana* se mostram fotoblásticos positivos para germinar e o desenvolvimento inicial dos indivíduos é mais efetivo com menores níveis de luminosidade em experimentos *in vitro* (FILIPINI *et al.* 1999; ROGGE, 1999). As autoras observaram um aumento inicial na germinação e nos teores de clorofila de gametófitos submetidos às menores quantidades de luz (5% e 20%), enquanto os tratamentos com maiores quantidades de luz (36% e

50%) apresentaram um retardamento inicial na germinação e uma redução no crescimento e desenvolvimento dos gametófitos.

D. sellowiana, tem sido fortemente extraída de nossas reservas naturais para a confecção de produtos para a floricultura, como vasos e placas para o cultivo de ornamentais, pois seu tronco formado por feixes da bainha vascular tem sido utilizado como substrato neste setor da agricultura há muitos anos. Este fator tem colocado a espécie na lista oficial do IBAMA como uma das muitas espécies de nossa flora em perigo de extinção (PORTARIA IBAMA N° 6-N, 1992).

Devido a intensa atividade extrativista de espécies florestais nativas, tornou-se importante a aplicação de técnicas de cultura de tecidos vegetais para a conservação de germoplasma, permitindo que o material vegetal de uma determinada espécie esteja disponível para sua utilização futura. Com isso, as coleções de germoplasma passaram a ter papel fundamental para a conservação de espécies ameaçadas de extinção. A possibilidade de obter plantas inteiras a partir de células isoladas, de tecidos e de órgãos de plantas pelo uso de técnicas de cultura de tecidos levou ao estabelecimento dos bancos de germoplasma *in vitro*. A conservação *in vitro* envolve manutenção de culturas em crescimento ativo através de subculturas periódicas de gemas e segmentos nodais. Todavia, essa técnica permite conservar o germoplasma vegetal somente por curto período de tempo (nove a dose meses) dependendo do procedimento ou da espécie de planta. A criopreservação é a única técnica disponível na atualidade

com potencial para garantir a conservação em longo prazo do germoplasma de espécies problemáticas (BENSON *et al.*,1998).

Técnicas diferentes têm sido utilizadas em cada caso, incluindo criopreservação de protoplastos, suspensões celulares, calos, gemas apicais e laterais, meristemas, sementes, embriões somáticos e zigóticos, esporos e produtos biotecnológicos (culturas produtoras de metabólitos secundários de interesse econômico e linhagens celulares geneticamente modificadas) constituindo-se em métodos valiosos para a conservação de recursos genéticos vegetais (SAKAI, 1995; HARDING *et al.*, 1997). O emprego da criopreservação permite a rápida multiplicação e armazenamento de germoplasma de plantas em ambiente asséptico, livre de patógenos, otimizando o espaço físico e a mão-de-obra e facilitando a troca nacional de germoplasma.

A criopreservação é definida como a conservação de material biológico (células viáveis, tecidos e órgãos) em temperaturas ultrabaixas, geralmente em nitrogênio líquido à -196°C , ou, em sua fase de vapor, a -150°C . Nessa temperatura todos os processos metabólicos, como respiração e atividade enzimática, são desativados o que permite assegurar a conservação de material biológico durante longos períodos, já que temperaturas ultrabaixas reduzem o metabolismo celular paralisando a deterioração biológica. (BENSON *et al.*, 1998).

Essa técnica envolve uma série de estresses que podem destruir o material vegetal, promovendo modificações nas culturas regeneradas. A manutenção da

estabilidade fenotípica do material criopreservado por longo período é desejada nos programas de conservação de germoplasma (HARDING *et al.*, 1997; BENSON *et al.*, 1998). Segundo dados morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e moleculares, obtidos até o momento, Withers & Williams (1998) indicam que a criopreservação não ameaça a estabilidade genética, demonstrando a validade desta metodologia.

A criopreservação pode ser útil na conservação de esporos de pteridófitas ameaçadas de extinção. Esporos de mais de 40 espécies de samambaias são capazes de sobreviver após exposição ao nitrogênio líquido, possuindo a vantagem de não necessitarem de adição de crioprotetores durante os procedimentos (AGRAWAL *et al.*, 1993; ROGGE *et al.*, 2000 e PENCE, 2000). Segundo Pence (2000), esporos de samambaias são candidatos ao armazenamento em longo prazo em baixas temperaturas, incluindo o nitrogênio líquido.

O grande desafio para o criobiologista é realizar um congelamento sem a formação de cristais de gelo no interior das células. A formação de gelo no meio intracelular causa ruptura do sistema de membranas celulares, resultando em perda de semipermeabilidade e da compartimentalização celular; em consequência disso, as células entram em colapso e morrem. A injúria mecânica sofrida pelas células advém de dois fenômenos: o comportamento peculiar da água, que se expande ao congelar, e a formação dos cristais de gelo (WITHERS *et al.*, 1998). No entanto, evitar a formação desses cristais não é uma tarefa fácil,

porque alguns tecidos vegetais usados para criopreservação apresentam altos teores de água em suas células.

A preservação fenotípica, bioquímica, molecular ou cromossomal já foi observada, Por exemplo, em embriões somáticos criopreservados de palmeiras (ENGELMANN, 1991), pólen de tomate (SACKS & CLAIR, 1996) e sementes de algodão (GONZÁLEZ-BENITO *et al.*, 1998). O êxito de um bom protocolo de criopreservação, está baseado em seis pontos críticos (WITHERS, 1985): i- pré-congelamento, que inicia vários dias antes do congelamento e consiste em manipular as condições de cultivo *in vitro* para aumentar a tolerância ao congelamento, adicionando-se ao meio de cultura, compostos com atividade osmorreguladora, ou outros aditivos; ii- crioproteção, que consiste em tomar alguns cuidados que permitam a célula suportar o congelamento, cuidados esses associados principalmente à toxidez dos crioprotetores; iii- resfriamento, que consiste na diminuição da temperatura que prepara o explante para o congelamento; iv- conservação, a qual se dá em nitrogênio líquido a -196°C na fase líquida ou a -150°C na fase de vapor; v- descongelamento, que é a fase de recuperação do material estocado; vi- recuperação, que serve para avaliar a viabilidade do desenvolvimento após o período de congelamento e conservação.

O resfriamento pode ser realizado de duas maneiras: i- lento, onde o material é congelado de forma gradual, com a temperatura reduzindo-se de $0,1$ a $3^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Desta forma ocorre uma desidratação celular protetora, de maneira que os cristais de gelo se formem extracelularmente, não danificando a célula e

não provocando a lise celular. Este método é o mais recomendado em vegetais, porém é dependente do emprego de um freezer com temperatura escalonada, equipamento este normalmente muito caro; ii- rápido, onde o material vegetal é colocado diretamente no nitrogênio líquido e a velocidade de diminuição da temperatura é da ordem de $1000^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. No resfriamento rápido, um dos principais riscos é a formação de cristais de gelo intracelularmente, os quais podem danificar a célula, inviabilizando assim toda técnica (MROGINSKI *et al.*, 1993). Para Withers & Williams (1998), geralmente, é mais difícil se obter resultados satisfatórios com resfriamento rápido do que com o lento.

O descongelamento é tão importante quanto o resfriamento (WITHERS & WILLIAMS, 1998), podendo tornar falho todo o esforço do resfriamento, do congelamento e do armazenamento se não forem tomados os cuidados necessários (MROGINSKI *et al.*, 1993). O descongelamento rápido, é necessário para evitar a recristalização de gelo, na qual os pequenos cristais crescem a tamanhos que danificam a célula. Isso pode ser feito com banhos, de 1 a 2 minutos de duração, em água a 40°C , tomando-se o cuidado de inserir gradualmente meio de cultura para diluir as substâncias crioprotetoras. Também pode ser utilizada corrente de ar quente, a qual descongela o material mais rapidamente (MROGINSKI *et al.*, 1993).

Esporos de *Dicksonia sellowiana* Hook., sobreviveram ao armazenamento em nitrogênio líquido sem a necessidade de solução de crioprotetores após quinze minutos, quinze dias, um mês e três meses. Foram descongelados à

temperatura ambiente. Em todos os tratamentos, as porcentagens de germinação foram maiores do que no controle (ROGGE *et al.*, 2000). As mesmas autoras observaram que esses esporos apresentam apenas 7% de água, o que explica a boa adequação da criopreservação para a sua conservação em longo prazo, sem a adição de crioprotetores. A criopreservação parece inclusive promover a germinação de alguns esporos dormentes de *Dicksonia sellowiana* (ROGGE *et al.*, 2000).

Os resultados até agora obtidos por diversos pesquisadores indicam o potencial da metodologia de criopreservação de germoplasma de pteridófitas. Esporos podem ser utilizados para manter grandes quantidades de linhagens genéticas em um espaço restrito, reduzindo custos de manutenção e mão de obra. A mesma metodologia pode ser aplicada com alterações para preservação de culturas de tecidos esporofíticos e gametofíticos (PENNY, 2001).

O estudo morfo-anatômico e fisiológico na fase gametofítica de *D. sellowiana* após a criopreservação, possui caráter inédito e essencial para que se possa recomendar a criopreservação como um método seguro e eficaz na conservação do germoplasma desta espécie. Sendo este, o intuito deste trabalho, onde procuramos proporcionar informações que enriqueçam o universo científico-acadêmico e sua utilização prática para a conservação de nossa biodiversidade vegetal.

2.OBJETIVOS

2.1 - Objetivos Gerais

Acompanhar o desenvolvimento de gametófitos provenientes de esporos criopreservados e compará-lo com o desenvolvimento de gametófitos provindos de esporos não criopreservados de *Dicksonia sellowiana* Hook..

2.2 - Objetivos Específicos

Considerando os esporos criopreservados e não criopreservados:

- 1-Determinar porcentagens e tempo médio de germinação.
- 2- Avaliar porcentagem e tempo médio de germinação de esporos armazenados por longo período sob refrigeração..
- 3- Analisar a morfo-anatomia de gametófitos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Esporos de *Dicksonia sellowiana* Hook., foram coletados de frondes férteis de plantas que ocorrem na Reserva Particular do Patrimônio Natural de Caraguatá, situada no município de Antônio Carlos/SC, na data de 06 de Setembro de 2003. O município de Antônio Carlos – SC possui latitude 27°31'01" Sul e longitude 48°46'03" Oeste, o clima é considerado Cfa de Köppen, ou seja, mesotérmico úmido com temperatura média entre 10°C e 30°C. A figura 2 mostra o mapa de Santa Catarina e o posicionamento deste município.



Figura 02. Mapa de Santa Catarina e localização do município de Antônio Carlos. Fonte: www.estudiologia.hpg.ig.com.br/estado_23.htm

As figuras 03 e 04 mostram os indivíduos de *D. sellowiana*, dos quais foram coletadas frondes férteis para o início dos trabalhos.

Após a coleta, as frondes foram postas para secar por 72 horas sobre papel de filtro, em estufa com circulação de ar, em temperatura ambiente, para induzir a abertura dos esporângios e liberação dos esporos. Posteriormente, os esporos foram separados dos esporângios por filtragem em papel entretela e armazenados em frascos de vidro âmbar sob refrigeração a $7 \pm 1^{\circ}\text{C}$.



Figuras 03 e 04 – Indivíduos de *Dicksonia sellowiana* Hook.. presentes na Reserva Particular do Patrimônio Natural do Caraguatá. 06/Setembro/2002. Fotografia de Patrícia A. B. Moreira.

3.2. Métodos

3.2.1. Germinação de Esporos

Esporos foram esterilizados em solução de hipoclorito de sódio comercial a 20% durante 20 minutos e posteriormente lavados em água destilada autoclavada e filtrados a vácuo, sobre papel filtro. Este procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar, onde o material permaneceu até a secagem completa. Para os tratamentos foram utilizados aproximadamente 50 mg (\pm 200.000 esporos) de esporos, que foram inoculados em quatro frascos erlenmeyers por tratamento, utilizando-se espátula. Cada frasco de 50 ml recebeu 20ml de solução de Mohr (1956), modificada por Dyer (1979), (Quadro 1) . Ao meio de cultura foi acrescentado Benlate[®] 0,01%, para evitar o aparecimento de fungos. Todo o procedimento foi conduzido em capela de fluxo laminar.

Quadro 1 – Composição química do Meio de DYER

<i>Ingredientes</i>	<i>Quantidade</i>
Sulfato de Magnésio.....	510 mg.L ⁻¹
Nitrato de Potássio.....	120 mg.L ⁻¹
Nitrato de Cálcio.....	1440 mg.L ⁻¹
Fosfato de Potássio Dibásico.....	250 mg.L ⁻¹
Solução de FeSO ₄ .7H ₂ O e NaEDTA.....	1 ml

Água destilada até completar 1 litro.

Preparação: mistura-se todos os ingredientes.

Solução de FeSO₄.7H₂O e NaEDTA:

- 33,2 g de NaEDTA
- 3,65 g de hidróxido de sódio
- 25 g de sulfato de ferro
- Água destilada até completar 1 litro

Preparação: Mistura-se todos os ingredientes

Os frascos foram tampados com filme de polipropileno de uso doméstico Assafácil[®], fixos por elástico e filme de PVC (figura 05), e mantidos em sala de cultura a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de 74% e intensidade luminosa de $30,00 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, na altura dos erlenmeyers, provindas de lâmpadas fluorescentes brancas. Os frascos foram distribuídos aleatoriamente nas

prateleiras. O fotoperíodo foi de 16 horas. A germinação foi avaliada a cada 4 dias até o 20º dia, para a obtenção de curvas de germinação. Foram preparadas 4 lâminas e foram contados 100 esporos por lâmina, em microscópio binocular e aumento de 100 vezes. Foram considerados esporos germinados os que apresentaram protrusão de rizóides; inviáveis os que se mostraram translúcidos e viáveis os esporos de coloração amarela, porém não germinados.

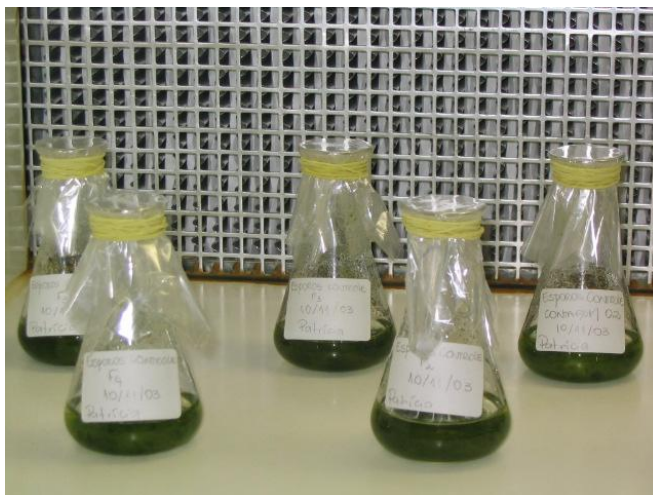


Figura 05 – Esporos de *D. sellowiana* Hook. inoculados em meio de cultura, segundo Dyer 1979.

Os resultados foram expressos em curvas de germinação e utilizados para o cálculo do tempo médio de germinação (\bar{t}), que é obtido pela equação: $\bar{t} = \frac{\sum (tn)}{\sum n}$ onde \bar{t} é o tempo médio em dias, iniciando pelo dia 0 e n é o número de esporos que completaram a germinação no dia t (LABOURIAU, 1983).

3.2.2. Germinação de esporos armazenados por longo tempo sob refrigeração:

Esporos coletados em 30/08/1999, no município Catarinense de Urupema, e armazenado em geladeira a $\pm 4^{\circ}\text{C}$, por um período de 1657 dias (54 meses), foram colocados para germinar sob as mesmas condições descritas no item 3.2.1.

A esterilização anterior à inoculação dos esporos em meio Dyer foi realizada com hipoclorito de sódio a 5%, pois de acordo com Suzuki *et al.*(2003), esporos armazenados por longo tempo tornam-se sensíveis ao hipoclorito de sódio, podendo inviabilizar a germinação.

3.2.3. Criopreservação de Esporos.

Em 10 de Novembro de 2003, os esporos foram previamente esterilizados conforme descrito em 3.2.1. e armazenados em criotubos de polipropileno com capacidade para 1 ml, que foram colocados em nitrogênio líquido durante uma hora e descongelados lentamente à temperatura ambiente (AGRAWAL *et al.* 1993, ROGGE *et al.*, 2000). Os esporos germinaram conforme os procedimentos descritos no item 3.2.1.

3.2.4. Desenvolvimento dos Gametófitos

Gametófitos foram obtidos de esporos controle e esporos que foram criopreservados durante uma hora, no dia 10/11/2003. Os esporos foram inoculados em meio de Dyer, conforme os procedimentos descritos em 3.2.1., e após um mês de cultivo em meio líquido, os gametófitos oriundos da germinação dos esporos, foram transferidos para solo constituído de mistura de terra roxa estruturada e composto orgânico termofílico (tabela 01) na proporção de 3:1, e se desenvolveram em sala de cultivo.

Tabela 1. Composição química do substrato utilizado para o cultivo de gametófitos e esporófitos jovens de *Dicksonia sellowian* Hook. . Análise realizada pela CIDASC - SC, laudo n°07462 (SUZUKI, 2003).

Parâmetros Analisados	Terra Roxa + Composto
pH	5.2 baixo
P (ppm)	+50 alto
K (ppm)	450 alto
Matéria Orgânica %	0.9 baixo
Al (cmolc/l)	-----
Ca (cmolc/l)	4.8 alto
H +Al (cmolc/l)	3.90
N Total %	0.26
Capacidade de Troca de Cátions (cmolc/l)	12.88 alta

3.2.5. Análise morfo-anatômica dos gametófitos

Amostras de gametófitos cordiformes, visíveis a olho nu (aproximadamente 1 mm), com 133 dias de cultivo, foram fixadas para melhor preservação das estruturas e posterior estudo e documentação em microscopias óptica e eletrônica de varredura. A fixação das amostras de gametófitos foi feita em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato de sódio 0,1M, em pH 7,2 (vide Quadro 2) . Gametófitos foram conservados em etanol 70°GL, em tubos de polietileno tipo "ependorf".

Quadro 2 – Reagentes para fixação das amostras de gametófitos

Glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M – pH 7,2 (BOZZOLA & RUSSEL, 1991)

Ingredientes:

glutaraldeído 25% – 5 ml

tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,2..... – 45 ml

Solução A – 2,76 g de Fosfato de sódio monobásico monoidratado
completar com água destilada até 100 ml

Solução B – 5,37 g de Fosfato de sódio dibásico heptaidratado
completar com água destilada até 100 ml

Preparação: Para preparar tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 devem ser misturadas as soluções A e B: A – 28 ml e B – 72 ml (volume final – 100 ml). Depois adicionar os 5 ml de glutaraldeído em 45 ml da solução final de tampão fosfato. Manter sob refrigeração.

Procedimento de uso: O material deve permanecer na solução de fixação por 2 a 3 horas. Posteriormente lavar por 3 vezes em tampão fosfato e desidratar em etanol: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70° GL – ½ hora em cada. Pode ser conservado em etanol 70°GL.

Amostras fixadas, desidratadas e mantidas em etanol 70°GL, foram lavadas em água destilada para preparação de lâminas temporárias. As análises foram feitas em microscópio óptico marca Carl Zeiss Jena, modelo Loboal 4, no Laboratório de Anatomia Vegetal. Para registro de imagens também foram feitas fotomicrografias em microscópio óptico marca Leica, modelo RM 2125, equipado com fotoautomático, no mesmo laboratório.

Algumas amostras fixadas, desidratadas e mantidas em etanol 70°GL, seguiram o processo de total desidratação em série etílica (etanol 80°, 90°, 96° e duas vezes em 100°GL). Posteriormente as amostras secaram com HMDS (hexametildesilane) para se evitar o colapso das estruturas, como meio substitutivo de ponto crítico de CO₂ (BOZZOLA & RUSSEL, 1991). As amostras secas foram colocadas sobre suportes de alumínio, com auxílio de fita de carbono dupla face, e cobertas com 20 nm de ouro, em metalizador Baltec, modelo CED 030. A documentação foi efetivada em Microscópio Eletrônico de Varredura, marca Phillips, modelo XL30, pertencente ao Laboratório de Materiais do Centro Tecnológico da UFSC.

3.3. Análise Estatística

Os resultados foram analisados pelos softwares Excel (Microsoft) e Statgraphics (1993) . Os resultados de germinação foram expressos como porcentagem, mas para a análise estatística foram transformados em valor angular ($\arcseno \times \sqrt{\%}$) para normalizar os dados conforme sugerido por Santana & Ranal (2000).

O teste t-Student foi utilizado para se comparar material criopreservado e controle (SOKAL, 1969).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Germinação de esporos:

4.1.1. Teste de germinação de esporos recém-coletados

Um teste preliminar para determinação do potencial germinativo dos esporos coletados, foi realizado em 26 de outubro de 2003. O tempo médio de germinação (\bar{t}) dos esporos foi de 10,93 dias.

A figura 06 mostra esporos de *D. sellowiana* considerados viáveis.

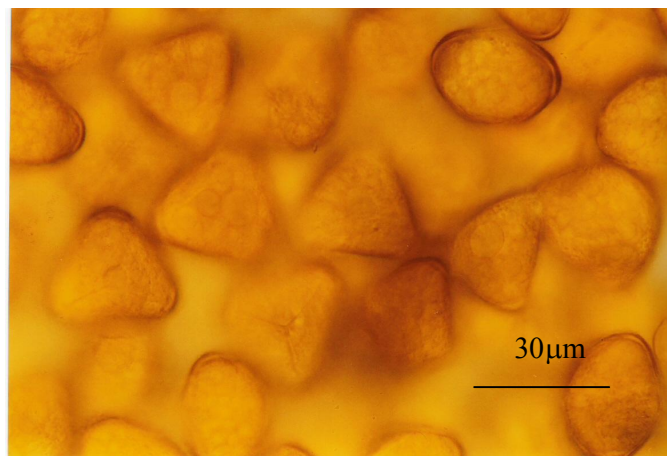


Figura 06 - Esporos recém-coletados de *D. sellowiana* Hook., observados em microscopia óptica (400x).

A tabela 2 mostra as porcentagens médias de germinação e de esporos viáveis e inviáveis da amostra analisada.

Tabela 2: Valores médios de germinação e de esporos inviáveis de *Dicksonia sellowiana* Hook. (xaxim), recém-coletados e germinados em meio Dyer.

	Dias de Cultivo		
Germinação (%)	8	16	20
	45,5±4,79	63,5±5,16	79±4,08
Esporos Inviáveis (%)			5±4,96

A figura 07 mostra a curva de germinação de esporos de *D. sellowiana* coletados em 06/09/2003 na Reserva do Patrimônio Natural do Caraguatá, no município de Antônio Carlos - SC. O teste teve início no dia 26/09/2003. Após 16 dias de cultivo em meio Dyer os esporos alcançaram 79% de germinação.

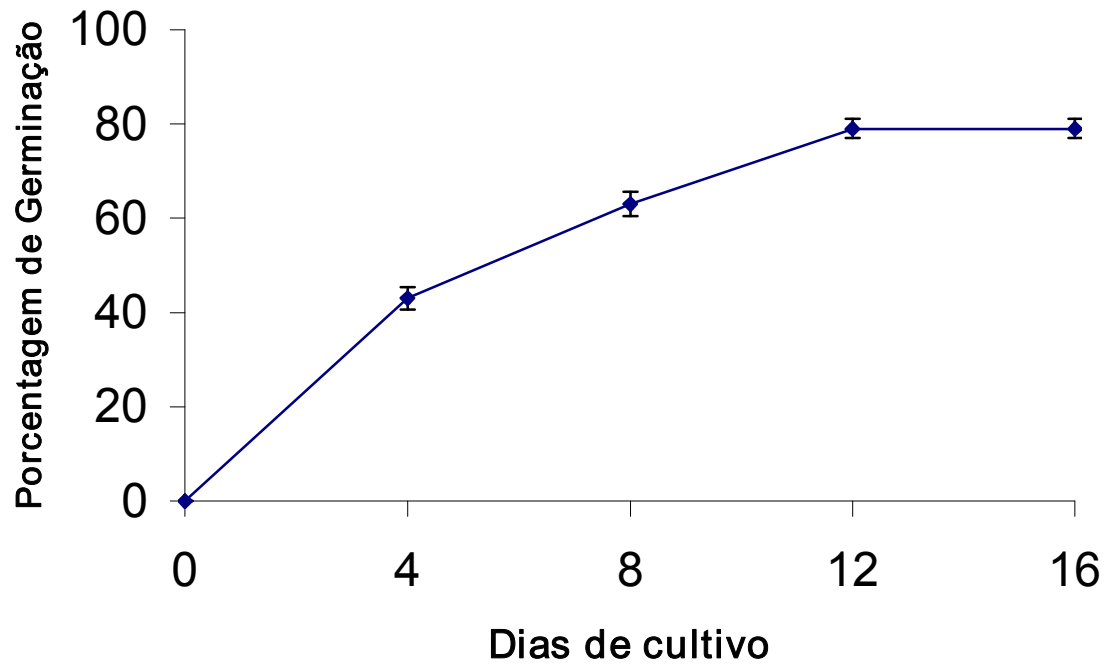


Figura 07- Germinação de esporos de *D. sellowiana* HooK., recém-coletados e cultivados sob fotoperíodo de 16 horas, a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Foram observados poucos esporos inviáveis, sendo que estes foram identificados por não apresentarem coloração característica amarela, ou por alterações em sua morfologia. Segundo Gomes *et al.*(2001), esporos recém coletados de populações naturais do município de Urupema – SC apresentaram porcentagem média de germinação de 89%; enquanto que a porcentagem média de esporos inviáveis desta amostragem situava-se em torno de 3,5%.

As porcentagens de germinação de esporos de *D. sellowiana* encontradas neste trabalho foram ligeiramente inferiores às encontradas por Filipini *et al.* (1999) que também analisaram a germinação de esporos coletados na Reserva do Patrimônio Natural de Caraguatá. Esta diferença nas porcentagens de germinação pode ser uma decorrência da época de coleta dos esporos.

4.1.2. Germinação e tempo médio de germinação de esporos armazenados sob refrigeração por 54 meses:

A figura 08 mostra a curva de germinação de esporos coletados em 30/08/1999, no município Catarinense de Urupema, e armazenado em geladeira a $\pm 4^{\circ}\text{C}$, por um período de 1657 dias (54 meses). A esterilização anterior à inoculação dos esporos em meio Dyer foi realizada com hipoclorito de sódio a 5%, pois de acordo com Suzuki *et al.*(2003) esporos com 1160 dias de armazenamento quando submetidos a esterilização com hipoclorito de sódio a 20% durante 30 minutos atingiram 27% de germinação, porém quando a concentração de hipoclorito foi reduzida para 5% durante 30 minutos a germinação alcançou 78,5% após 16 dias de cultivo. Desta forma foi demonstrado que os esporos de *D. sellowiana* mantêm viabilidade alta quando conservados em geladeira, apresentando 62% de germinação; porém são sensíveis a altas concentrações de hipoclorito durante o processo de esterilização.

Filippini *et al.* (1999) verificaram que esporos de *D. sellowiana* após 731 dias de armazenamento sob refrigeração a aproximadamente 10°C , apresentaram cerca de 82% de germinação.

Os dados encontrados neste experimento foram semelhantes aos dados de germinação e viabilidade encontrados nos outros experimentos deste trabalho.

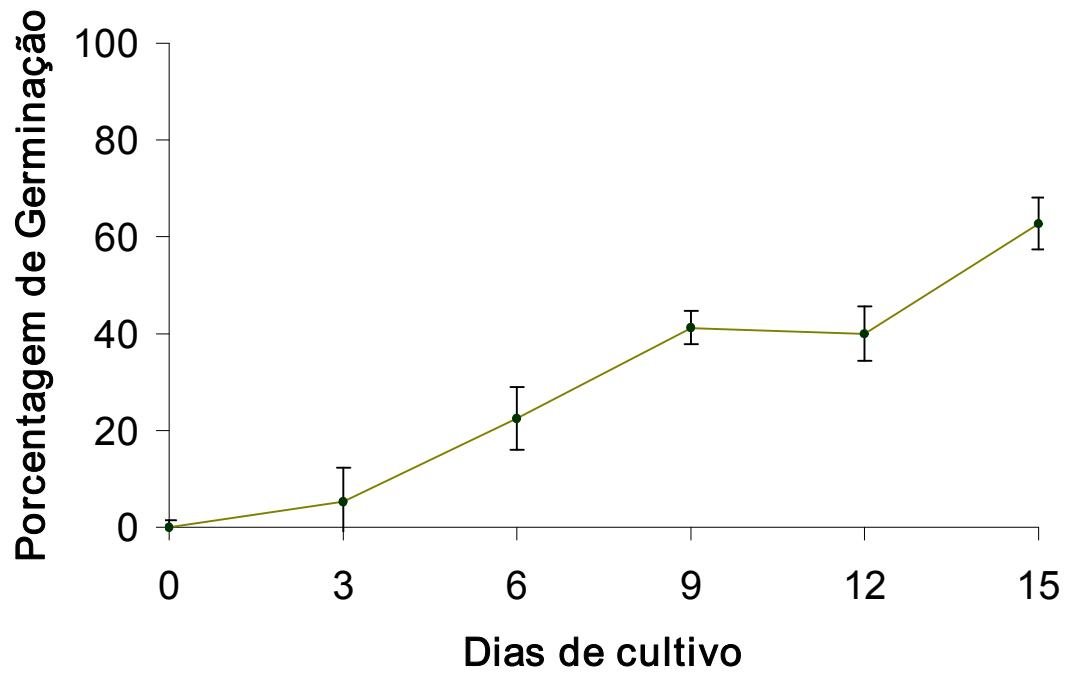


Figura 08- Germinação de esporos de *D. sellowiana* Hook. armazenados em refrigeração a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ por 54 meses, cultivados em meio Dyer sob fotoperíodo de 16 horas, a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

A tabela 03 mostra que houve aumento na porcentagem de esporos inviáveis em comparação aos esporos recém coletados. Os esporos inviáveis não possuíam mais coloração amarela. No entanto não apresentavam anomalias quanto à morfologia. Possivelmente o que ocorreu foi o consumo das reservas devido o longo tempo de armazenamento. Segundo Wilson *et all* (1979), durante o período de armazenamento, a atividade metabólica continua em níveis menores e os substratos endógenos necessários para a germinação e desenvolvimento estarão sendo gradualmente consumidos.

Tabela 3. Valores médios de germinação e de esporos inviáveis observados em esporos armazenados por 54 meses.

Germinação	Dias de cultivo		
	6	12	18
%	5,25 ± 2,98	41,25 ± 14,17	62,75 ± 12,91
Esporos inviáveis	22,75 ± 10,81		

O tempo médio de germinação desta amostra foi de 16,07 dias. Portanto, houve também um retardo no tempo médio de germinação (t) em comparação aos esporos recém coletados, cujo (t) foi de aproximadamente 13 dias. A germinação alcançada após 18 dias de cultivo foi de 62,75%, demonstrando que após 4 anos e 6 meses de armazenamento houve uma redução de 30% na viabilidade germinativa.

Randi (1996) verificou uma redução de 50% na germinação de esporos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd & Fisch, após 2 anos de armazenamento a temperatura de $3\pm 1^{\circ}\text{C}$. Já, esporos de *D. sellowiana* mostraram alta viabilidade após um maior período de armazenamento sob refrigeração. Beri & Bir (1993) observaram que esporos de *Pteris vittata* L. sofreram redução de 30% da germinação, decréscimo nos teores de açúcares solúveis totais, proteínas e aminoácidos livres após 20 dias de armazenamento, afetando o desenvolvimento protonemal. Camloh (1993), observou que esporos de *Platyserium bifurcatum* L, quando esterilizados e armazenados por longos períodos, sofreram decréscimo de 40% na germinação e atraso na formação do rizóide. Entretanto, quando armazenados, e sem esterilização, a germinação ocorreu normalmente.

4.1.3. Germinação e tempo médio de germinação de esporos controle e esporos criopreservados em nitrogênio líquido:

Os esporos de *D. sellowiana*, quando viáveis apresentam-se com coloração amarela, o que segundo Dyer (1979), representa esporos com alta quantidade de lipídios e porcentagem de água em geral inferior a 5% da massa fresca total. Portanto, com esta pequena quantidade de umidade, os esporos não necessitam de substâncias crioprotetoras para a imersão em nitrogênio líquido, conforme verificado por Rogge *et al.* (1999).

Agrawal *et al.* (1993) após criopreservar esporos de *Cyathea spinulosa* por um período de 72 horas, obtiveram germinação máxima de 93,5% para esta espécie. Brum (2001) observou que esporos de *Rumohra adiantiformis*, criopreservados, germinaram com sucesso sem crioproteção, provavelmente devido aos baixos teores de água, comportando-se como sementes ortodoxas.

O tempo médio de germinação observado para os esporos controle foi de 13,36 dias e para os esporos submetidos a criopreservação foi de 13,84 dias. Não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Na figura 09, observou-se que os esporos submetidos ao tratamento criogênico em nitrogênio líquido não apresentaram diferença estatisticamente

significativa quanto a germinação, em comparação aos esporos controle após 16 dias de cultivo. A porcentagem de germinação de esporos controle após 16 dias de cultivo atingiu 78%, enquanto que a de esporos criopreservados atingiu 76,75% . No entanto, após o 8º dia de cultivo, as porcentagens de germinação foram menores para os esporos criopreservados. Rogge *et al* (2000) observaram que após 21 dias de cultivo houve aumento da porcentagem de germinação de esporos imersos em nitrogênio líquido, em relação ao controle. Porém, as autoras utilizaram esterilização mais rigorosa e nesse caso a criopreservação aparentemente quebrou a dormência induzida pela esterilização.

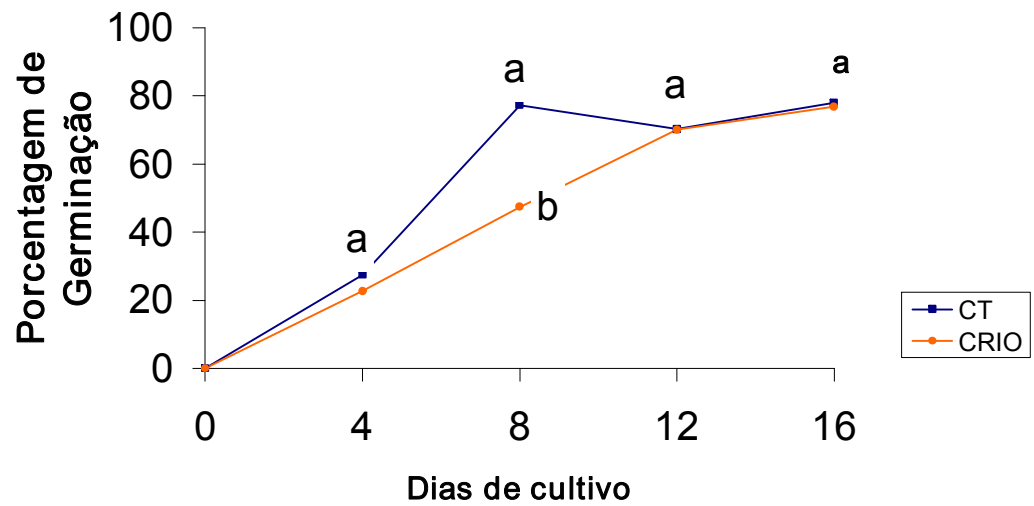


Figura 09- Germinação de esporos controle (CT) e criopreservados (CRIO) de *D. sellowiana* Hook.. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa pelo teste t a 5% .

Brum (2001) observou inibição da germinação de esporos de *Rumohra adiantifórmis*, submetidos a esterilização e crioproteção e posterior imersão em NL. A autora também verificou que, esporos não esterilizados, não crioprotetidos, suportaram a criopreservação durante o período de 90 dias, e apresentaram maior velocidade de germinação em comparação ao tratamento controle.

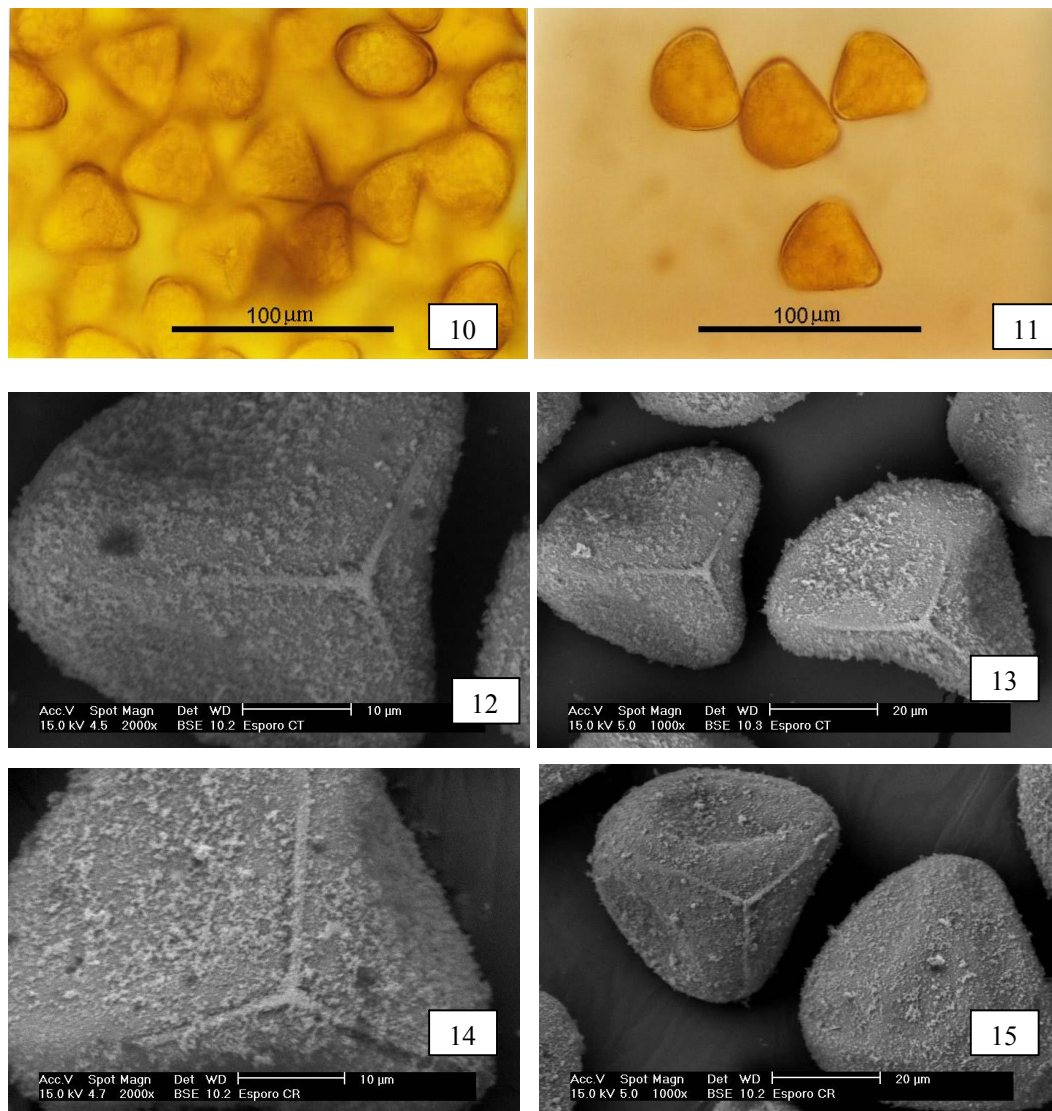
4.2. Análise morfo-anatômica de Esporos e Gametófitos:

As observações dos esporos de *Dicksonia sellowiana* em microscopia óptica evidenciaram que estes possuem uma coloração amarela bastante característica, com formato tetraédrico e depressões nas faces laterais.

Quando analisados sob microscopia eletrônica de varredura apresentaram-se conforme a descrição de Tryon & Tryon (1982), ou seja, triletes, com pequenas depressões adjacentes às faces, e de superfície densamente granulada. Segundo Dyer (1979) a periderme do esporo é revestida por polissacarídeos de parede conhecidos como esporopolenina.

Estas características também foram referidas por Sehnem (1978) e Tryon & Tryon (1982). Conforme Dyer (1979), a coloração amarela em esporos indica que estes possuem lipídios, como principal material de reserva, e são aclorofilados, mas possuem proplastídeos que darão origem a cloroplastos no início do metabolismo de germinação.

Não foi verificada nenhuma alteração na superfície ou na forma dos esporos controle em comparação aos esporos submetidos ao tratamento da criopreservação (Prancha 1 – figuras 10 a 15).



Prancha 01- Esporos de *Dicksonia sellowiana* Hook.. Figura 10- Esporos do tratamento controle fotografados em MO (400x). Figura 11- Esporos do tratamento de criopreservação, MO (400x). Figuras 12 e 13- Esporos controle observados em MEV (2000x e 1000x, respectivamente). Fig. 14 e 15 – Esporos do tratamento de criopreservação, observados em MEV (2000x e 1000x, respectivamente).

Após a germinação dos esporos, em meio de cultura líquido (Dyer), iniciou-se o desenvolvimento gametofítico. Existe uma disparidade muito grande quanto ao tempo de duração da fase gametofítica. Aos 30 dias após a inoculação podem ser encontrados esporos ainda recém-germinados, gametófitos na fase filamentosa e gametófitos iniciando a fase laminar.

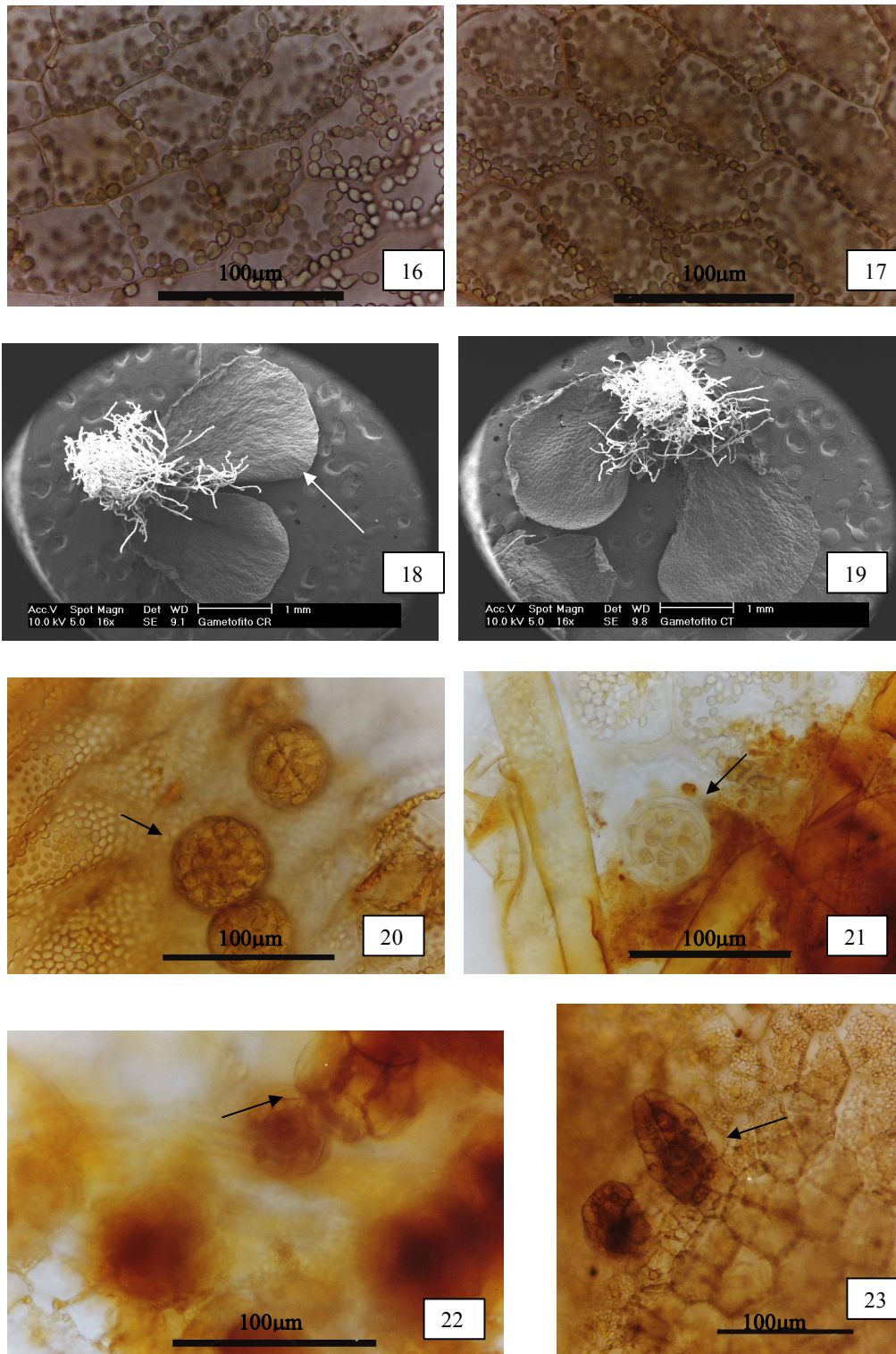
Com aproximadamente 45 dias de cultivo, as células protaliais dos gametófitos de *D. sellowiana* são assimétricas e nota-se a presença de vários rizóides. Estes são abundantes, hialinos, longos, não clorofilados, de coloração pardo-clara, localizados na superfície ventral do gametófito. Não foi verificada a formação de tricomas nos prótalo analisados em MO e nem em MEV (figuras 16 e 17). Não foram verificadas diferença entre os tratamentos.

Mendoza (1999) verificaram a formação de gametófitos na fase laminar aos 18 dias de cultivo para *Lygodium heterodoxum* e *Lygodium venustum* (schizaeaceae). Pela descrição deste autor a morfologia dos gametófitos destas espécies assemelham-se as características morfológicas dos gametófitos de *D. sellowiana*, não ocorrendo tricomas e com rizóides hialinos e sem cloroplastos.

A forma cordata, caracterizada pelo surgimento das expansões laterais na lâmina do prótalo e com evidente meristema apical central, foi evidenciada aos 45 dias de cultivo. A região meristemática caracteriza-se por apresentar um grupamento denso de células com tamanho reduzido, em comparação as demais células protaliais. Suzuki (2003) verificou que após 30 dias da sementeira, os gametófitos de *D. sellowiana* apresentaram-se como um prótalo laminar

espatulado, o que também foi constatado neste experimento. A autora afirma que a lâmina do prótalo, contendo grande número de cloroplastos, mantém-se uniestratificada em toda a fase gametofítica e expande-se através de sucessivas divisões celulares.

Nas análises estruturais, em MO (prancha 02- figuras 16 e 17), e ultra-estruturais, em MEV (prancha 02- figuras 18 e 19), dos gametófitos dos tratamentos, controle e criopreservados, não foram constatadas diferenças.



Prancha 02-Gametófitos de *Dicksonia sellowiana* Hook.. Figura 16- Células protalias de gametófito controle, ao MO (400x). Fig.17- Células protalias de gametófito do tratamento de criopreservação, ao MO (400x). Figuras 18 e 19- Gametófitos provenientes de esporos criopreservados e controle ao MEV, respectivamente. Figuras 20 e 21- Anterídeos (setas) de gametófitos dos tratamentos, controle e criopreservados, respectivamente. Figuras 22 e 23- Arquegônios (setas) de gametófitos dos tratamentos, controle e criopreservados, respectivamente.

Estruturas reprodutivas foram observadas tanto no tratamento controle como no tratamento de criopreservação. Investigações realizadas em microscopia óptica, em gametófitos após 45 dias de cultivo, revelaram a presença de anterídeos (prancha 02 – figuras 20 e 21) e arquegônios (prancha 02- figuras 22 e 23), próximos à região meristemática dos gametófitos, onde estavam geralmente encobertos por rizóides numerosos e longos.

Mendoza *et al.* (1999b) verificaram a formação dos anterídeos entre 28-32 dias após a germinação e de arquegônios, entre 32-35 dias na espécie *Lygodium heterodoxum* Kunze. Suzuki (2003) analisando gametófitos de *Dicksonia sellowiana*, após 90 dias de cultivo, em MEV, evidenciou apenas a presença de arquegônios, mencionando que os anterídeos poderiam estar ocultados pelos rizóides. A mesma autora notou uma abertura no centro das células apicais dos arquegônios, que provavelmente corresponderia à estrutura que possibilita a entrada dos anterozóides. No presente estudo também constatou-se esta abertura entre as quatro células apicais.

6. CONCLUSÕES

1. A criopreservação não afetou o tempo médio de germinação dos esporos.
2. A porcentagem média de germinação dos esporos não foi alterada pelo tratamento de criopreservação.
3. Os estudos morfo-anatômico dos gametófitos em microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura não evidenciaram diferenças entre os gametófitos oriundos de esporos controle e de gametófitos oriundos de esporos criopreservados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, D.C., PAWAR, S.S., & MASCARENHAS, AF. 1993. Cryopreservation of spores of *Cyathea spinulosa* Wall. ex. Hook. f. An endangered tree fern. **Journal Plant Physiology**, v.142, p.124-126.
- BERI, A. & BIR, S.S. 1993. Germination of stored spores of *Pteris vittata* L. **Amer. Fern J.** 83:73-8.
- BENSON, E.E., LYNCH, P.T., & STACEY, G.N. 1998. Advances in plant cryopreservation technology: current applications in crop plant biotechnology. **Ag Biotech News Inf.**, v.10, n.5, p.133-141.
- BOZZOLA, J.J. & RUSSEL, L.D. 1991. **Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologists.** Boston, Jones and Barlett Publ. 542p.
- BRUM, F. M. R., RANDI, A.M. 2001. **Efeitos de diferentes níveis de luz, temperaturas e criopreservação na germinação de crescimento inicial de Rumohra andiantiformis (FORST.) Ching (Dryopteridaceae).** 86f. Dissertação Mestrado (Biologia Vegetal). Universidade Federal de Santa Catarina.
- CAMLOH, M. 1993. Spore germination and early gametophyte development of *Platyterium bifurcatum*. **American fern Journal.** 83 (3): 79-85

- DYER, A.F. 1979. The culture of fern gametophytes for experimental investigation. In: **The experimental biology of ferns**. in Dyer. London. Academic. p.253-305.
- ENGELMANN, F. 1991. In vitro conservation of tropical plant germoplasm - a review. **Euphytica**, v.57, p.227-43.
- FARRAR, D. R. & GOOCH, R.D. 1975. Fern reproduction at Woodman Hollow, Central Iowa: preliminary observation and a consideration of the feasibility of studying fern reproductive biology in nature. **Proc. Iowa Acad. Sci.**, v.82, p. 119-122.
- FERNANDES, I. 1997. **Taxonomia e Fitogeografia da Cyatheaceae e Dicksoniaceae nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil**. São Paulo. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.
- FILIPPINI, E. C. de P.; DUZ, S.R.; & RANDI, A. M. 1999. Light and storage on the germination of spores of *Dicksonia sellowiana*. **Rev. Bras. Bot.**, v.22, n.1, p.21-26.
- GONZALES-BENITO, M. E., CARVALHO, J. M. F. C., PÉREZ, C. 1998. Effect of desiccation and cryopreservation on the germination of embryonic axes and seeds of cotton. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, p.17-20.
- HARDING, K., BENSON, E.E., CLACHER, K. 1997. Plant conservation biotechnology: An overview. **Agro-Food-Industry Hi-Tech**, p.25-29.

- KLEIN, R.M. 1978. Mapa fitogeográfico do Estado de Santa Catarina. **Flora Ilustrada Catarinense**, 24p.
- KOPERLAIEN, H. 1995. Growth and reproductive characteristics in artificially formed clonal gametophytes of *dryopteris filix-max*. **Pl. Syst. Evol.**, n.196, p.195-206.
- KRAUS, J.E. & ARDUIN, M. 1997. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédia, R.J. Ed. Universidade Rural, 198p.
- LABOURIAU, L.G. 1983. **A germinação das sementes**. Série de Biologia, Monografia 24. Programa Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, Washington. 174p.
- McCÁUDICEY, D. E.; WHITTIER, D.P., & REILLY, L.M. 1985. Inbreeding and the rate of self-fertilization in a grape fern, *Botrychium dissectatum*. **Amer. J. bot.**, n.72, v.12, p.1978-1998.
- MENDOZA, A. 1999. Desarrollo protálico de *Lygodium heterodoxum* y *Lygodium venustum* (Schizaeaceae). **Revta. Biol. Trop.** 47 (1-2): 83-92.
- MOHR, H. 1956. Die Abhängigkeit des Protonemapolarität bei Farnen von Licht. **Planta**, v.47, p.127-158.

- MROGINSKI, L.A., ROCA, W.M., KARTHA, K.K. 1993. Crioconservación del germoplasma plantas. In: ROCA, W.M., MROGINSKI, L.A. **Cultivo de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones**. Cali:CIAT. 253p.
- PAGE, C.N. 1979. Experimental aspects of fern ecology. In: DYER, A. F. (ed.) **The experimental biology of ferns**. London: acad. Press.
- PENCE, V.C. 2000. Survival of schlorophyllous and nonchlorophyllous fern spores through exposure to liquid nitrogen. **American Fern Journal**, v.90, p.119-126.
- PEREIRA, A.1981.**Samambaias**. 2ªedição. Nobel. São Paulo – SP, p489.
- PÉREZ-GARCÍA, B., MENDOZA, A., JARAMILLO, I.R., & RIBA, R. 1999. Morfogénesis de la fase sexual de seis espécies mexicanas del género *Dryopteris* (Dryopteridaceae). **Rev. Biol. Trop.**, 47:69-81.
- PIO CORRÊA, M. 1931. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, v.2,pp.209-210.
- PORTARIA DO IBAMA**. 1992. n. 6 –n.
- RAGHAVAN , V. 1989. **Developmental biology of fern gametophytes**. Cambridge University Press, Cambridge.
- RANAL, M. 1999 a. Estado da arte e perspectiva d peridologia no Brasil: ecologia e fisiologia. In: 50º Congresso Nacional de Botânica, Blumenau. **Anais ...p.310-311**

- RANAL, M. 1999b. Effects of temperature on spore germination in some fern species from semideciduous. Mesophytic forest. **Amer. Fern J. n. 89**, p. 149-158.
- RANDI, A.M., & CROZIER, A. 1991. Gibberellins, indole-3-acetic acid and the germination of spores of the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb. **Revista Brasil. Bot.**, v.14, p. 67-72.
- RANDI, A. M. 1996. Photosensitivity, viability and storage reserves in spores of *acrostichum danaeifolium* Langsd. & fisch. (Pteridaceae). **Rev. Brasileira Bot.** 19 (1); 105-8.
- ROGGE, G.D. 1999. Germinação, propagação in vitro e criopreservação de esporos de *Dicksonia sellowiana* (Presl) Hook.. **Dissertação de mestrado.** UFSC.
- ROGGE, G.D., VIANA, A. M., & RANDI, A. M. 2000. Cryopreservation of spores of *Dicksonia sellowiana*. Na endangered tree fern indigenous to South and Central America. **Cryoletters**, v.21, p.223-230.
- SACKS, E.J., & CLAIR, A.S. 1996. Cryogenic storage of tomato pollen: Effect on fecundity. **HortScience**, v.31, n.3, p.447-448.
- SAKAI, A. 1995. Cryopreservation of germoplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y.P.S., ed, **Biotechnology in agriculture and forestry**, v.32, Cryopreservation of plant germoplasm I, Springer-Verlag, Berlin, Heierlberg, New York, p.53-69.

SANTANA, D.G. & RANAL, M. A. 2000. Análise estatística na germinação. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** (Edição especial) 12:205-237.

SEHNEN, A. 1977. As filicíneas do Sul do Brasil, sua distribuição geográfica, sua ecologia e suas rotas de migração. **Pesquisas Botânicas**, v.31, p.1-108.

SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J. 1969. **Biometry**. San Francisco. Freeman and Company, 776p.

SOLTIS, D.E. & SOLTIS, P.S. 1987. Polyploidy and breeding systems in homosporous Pteridophyta: a reevaluation. **Am. Nat.**, v.130, p.219-232.

STATGRAPHICS Statistical Graphics System.1993. Ed. Statistical graphics corporation portions copyright version 7.

SUZUKI, C. **Desenvolvimento Gametofítico e Estudo de diferentes níveis de luz no crescimento de plântulas de Dicksonia sellowiana (PRESL) HOOK.. (Pteridófita – Dicksoniaceae)**. Tese de Mestrado PPGBVE. 2003

TAIS, L. ; ZEIGER, E.. 1991. **Plant physiology**. Benjamin/Cummings, Redwood City.

TRYON, R. AND A. F. TRYON. 1982. Dicksoniaceae. *In* R. Tryon and A F. Tryon (Eds.) **Fern and allied plants with special reference to Tropical America**. Springer-Verlag, New York, EUA. pp138-154

WILSON, A.T., VICKERS, M. & MANN, L. R. B. 1979. Metabolism in dry pollen – a novel technique for studying anhydrobiosis. Dry pollen . **Naturwissenschaften** 66:53-4.

WITHERS, L.A. 1985. Cryopreservation and storage of germoplasm. **Plant Cell Reports**, oxford, p. 169-191.

WITHERS, L.A., & WILLIAMS, J.T. 1998. Conservação in vitro de recursos de plantas. In TORRES et al. [ED]. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA, v.1, p.297-330.