

Elisa Poltronieri Filipin

**CONSERVAÇÃO DE ESPOROS, GERMINAÇÃO E  
DESENVOLVIMENTO GAMETOFÍTICO DE *Pleopeltis  
lepidopteris*: ANÁLISES MORFOFISIOLÓGICAS E  
ULTRAESTRUTURAIS**

Dissertação submetida à Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

Orientadora: Prof. Dra. Áurea Maria Randi  
Coorientadora: Prof. Dra. Zenilda Laurita Bouzon

Florianópolis  
2015

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

FILIPIN, ELISA POLTRONIERI

CONSERVAÇÃO DE ESPOROS, GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO  
GAMETOFÍTICO DE *Pleopeltis lepidopteris*: ANÁLISES  
MORFOFISIOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS / ELISA POLTRONIERI  
FILIPIN ; orientadora, Áurea Maria Randi ; coorientadora,  
Zenilda Laurita Bouzon. - Florianópolis, SC, 2015.  
85 p.

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

Inclui referências

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2. Fisiologia  
Vegetal. 3. Conservação de esporos. 4. Germinação e  
desenvolvimento . 5. Morfofisiologia e ultraestrutura. I.  
Randi, Áurea Maria . II. Bouzon, Zenilda Laurita. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas. IV. Título.

“Uma boa ciência não pode acontecer  
sem um profundo investimento  
emocional por parte do cientista.”  
(Bárbara Macclintok)

## AGRADECIMENTOS

### **Meu respeito, amizade e sinceros agradecimentos:**

Ao meu marido Douglas Filipin, pelo apoio e amor;  
Aos meus pais Antonio e Leanir Poltronieri pelo incentivo de batalhar por nossos objetivos sempre “nada cai do céu”;  
A amizade construída aqui em Florianópolis com as oestinas Kátia A. Hoss e Carmem Simone, as demais oestinas Ana Paula Lando, Roberta Mara Royer, Isabel Brandalize e a baiana Camilla dos Reis;  
A “comadre” Márcia Regina Wolfart presente em todos os momentos;  
As demais “comadres” Bruna Trombini, Sandra Solivo, Taise Mittmann, Juliana Santos que sempre insentivaram esta jornada;  
Aos demais colegas discentes do Departamento de Botânica;  
A professora e orientadora Áurea Maria Randi, pelo carinho, paciência e conhecimentos transmitidos nesta jornada;  
A coorientadora professora Zenilda Bouzon, minha admiração pela pessoa e profissionalismo;  
Aos professores do Departamento de Botânica em especial aos Professores: Neusa Steiner, Marisa Santos, Ana Cláudia Rodrigues, José B. Barufi por ter tido a oportunidade de aprender com vocês;  
Aos Laboratórios de Fisiologia Vegetal, ao Laboratório de Microscopia Eletrônica-LCME em especialmente a técnica Eliana de Medeiros Oliveira, ao Laboratório do Departamento de Biologia Celular em especial ao Dr. Éder C. Schimidt que tanto auxiliou no processamento das minhas amostras para microscopia,  
A todos que mesmo distantes torceram por mim e de certa forma, contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Agradeço também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro em forma de bolsa.

À Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, por assim permitir a concretização deste trabalho.

Muito obrigada!

## RESUMO

*Pleopeltis lepidopteris* (Langsd. & Fisch) de la Sota (Polypodiaceae) é uma samambaia endêmica importante da vegetação de restingas do sul do Brasil. A vegetação de restinga vem sofrendo fortes ameaças com o aumento da especulação imobiliária, ocupação humana, a poluição e a extração. Esporos de *P. lepidopteris* foram coletados em setembro de 2013 e março de 2014 nas Dunas da Praia da Joaquina, Florianópolis, SC, Brasil. Para preservar eficazmente esporos de *P. lepidopteris* foram avaliados os efeitos de diferentes tratamentos na viabilidade dos esporos e desenvolvimento gametofítico. Foi analisada a viabilidade de esporos recém coletados em setembro de 2013. Os esporos foram armazenados: por um e oito meses nas frondes à temperatura ambiente; sob-refrigeração  $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ ; imersos em nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) não esterilizados e esterilizados superficialmente após degelo. Foram realizadas análises morfológicas de esporos e gametófitos por meio de microscopia de luz (ML), microscopia confocal de varredura a laser (MCVL), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Análises de conteúdo de pigmentos fotossintetizantes e fluorescência da clorofila a foram realizadas em gametófitos de 150 dias. Esporos de *P. lepidopteris* perdem rapidamente a viabilidade dentro de um mês e morrem após oito meses, quando armazenados à temperatura ambiente. Houve grande redução da viabilidade quando os esporos foram armazenados a  $7\pm 1^{\circ}\text{C}$  após oito meses. Em contraste, esporos sobreviveram e apresentaram as mais altas porcentagens de germinação quando armazenados em nitrogênio líquido indiferentemente da época de coleta. Esporos criopreservados analisados em MEV apresentaram a superfície e as ornamentações mais ásperas do que os esporos controles. A criopreservação aparentemente escarificou a superfície dos esporos. Houve aceleração e desenvolvimento normal de gametófitos oriundos de esporos criopreservados e surgimento antecipado de estruturas reprodutivas. Não houve diferença na ultraestrutura de esporos e gametófitos de ambos os tratamentos e nem nos conteúdos de pigmentos fotossintetizantes e nos parâmetros fotossintéticos obtidos a partir da análise da fluorescência da clorofila a. A criopreservação mostrou-se eficaz para a conservação ex situ em bancos de germoplasma de esporos de *Pleopeltis lepidopteris*, mantendo sua viabilidade e integridade fisiológica.

## IV

Palavras-chave: Samambaias, armazenamento, nitrogênio líquido, criopreservação, viabilidade, fisiologia vegetal.

## ABSTRACT

*Pleopeltis lepidopteris* (Langsd. & Fisch) de la Sota (Polypodiaceae) is an important endemic fern of the dunes vegetation of southern Brazil. The “restinga” vegetation has been suffering strong threats with the human occupation, pollution and extraction. Spores of *Pleopeltis lepidopteris* were collected in September 2013 and March 2014 in the dunes of Joaquina Beach, Florianópolis, SC, Brazil. To effectively preserve *Pleopeltis lepidopteris* spores the effects of different treatments of conservation were analysed. The viability of spores collected in September 2013 were analysed and compared to different methods of conservation: spores stored for eight months in the fronds at room temperature, spores stored under refrigeration at  $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ , spores immersed in liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) non-sterile or surface sterilized after thaw. Morphological analysis of spores and gametophytes were performed by light microscopy (ML), confocal laser scanning microscopy (CLSM), scanning electronic microscopy (SEM) and transmission electronic microscopy (MET). Analysis of photosynthetic pigments and fluorescence of chlorophyll *a* were performed in gametophytes of 150 days. Spores of *Pleopeltis lepidopteris* rapidly lose viability within a month and die after eight months when stored at room temperature. There was a great reduction of viability when the spores were stored at  $7\pm 1^{\circ}\text{C}$  after eight months. In contrast, spores survived and presented the highest percentage of germination when stored in liquid nitrogen regardless the period of collection. The surface of the cryopreserved spores analyzed by SEM was rougher than that of controls. Cryopreservation apparently scarified spore surface. There was acceleration of development of gametophyte grown from criopreserved spores and early onset of reproductive structures. There were no differences in the ultrastructure of spores and gametophytes of both treatments or in the photosynthetic pigment content and the photosynthetic parameters obtained from the analysis of chlorophyll *a* fluorescence. Cryopreservation was effective for the “*ex situ*” conservation in germplasm banks of spores of *Pleopeltis lepidopteris* spores, maintaining their viability and physiological integrity.

Keywords: Ferns, storage, liquid nitrogen cryopreservation, viability, plant physiology.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

**Figura 1.** Ciclo de vida de samambaia homosporada *Pleopeltis lepidopteris*. Autora: Elisa P. Filipin.....17

**Figura 2.** Aspecto geral de *Pleopeltis lepidopteris* **a.** Detalhe da fronde fértil face abaxial à esquerda e face adaxial a direita **b.**.....24

### CAPÍTULO I

**Figura 1.** Localização da área de coleta do material botânico. **a** Estado de Santa Catarina. **b** Ilha de Santa Catarina, SC. **c** Local da coleta nas Dunas da Praia da Joaquina. **d** Dunas com vegetação. **e** *Pleopeltis lepidopteris*.....28

**Figura 2.** Procedimento para a obtenção de esporos, inoculação, germinação e desenvolvimento de gametófitos de *Pleopeltis lepidopteris*. **a** Fronde fértil. **b** Liberação de esporos. **c** Esporos e esporângios. **d** Filtragem do material. **e** Esporos para inoculação e respectivos tratamentos: CT=controle; AM=temperatura ambiente; RE=sob-refrigeração; CE=criopreservado e esterilizado e CN=criopreservado e não esterilizado. **f** Quatro erlenmeyers por tratamento com meio de Dyer. **g** Frascos em sala de cultivo. **h** Lâminas com esporos germinados. **i** Esporos com rizoides. **j** Gametófitos com 30 dias a serem transferidos para substrato. **k-l** Preparo de substrato para cultivo de gametófitos em bandejas. **m** Gametófitos em desenvolvimento.....30

**Figura 3.** Início de germinação e desenvolvimento de gametófitos de *Pleopeltis lepidopteris*. **a** Esporo controle geminando após 4 dias. **b** Esporo criopreservado esterilizado geminando após 4 dias. **c** Gametófito controle com 8 dias. **d** Gametófito de esporo criopreservado com 8 dias. **e** Gametófito filamentososo controle com 30 dias. **f** Gametófito filamentososo de esporo criopreservado com 30 dias. **g** Gametófito controle cordiforme com 120 dias. **h** Gametófito de



esporo criopreservado cordiforme com 120 dias. **i** Detalhe de anterídios e anterozóides. **j** Gametófito controle com 160 dias. **k** Detalhe de arquegônios. **l** Gametófito de esporo criopreservado com 160 dias. **m** Gametófito controle com 212 dias. **n** Detalhe de arquegônios. **o** Gametófito de esporo criopreservado com 212 dias. **p** Detalhe de um arquegônio (Ar) sendo fecundado por anterozóides (At). (An) anterídio, (At) anterozoide, (Cp) celular protalial, (Gl) glóbulo de lipídeo, (T) tricoma, (R) rizóide, (M) meristema apical....36

## CAPÍTULO II

**Figura 1.** Secções transversais e longitudinais de esporos com quatro dias de cultivo de *Pleopeltis lepidopteris* em microscopia de luz. **a,b** esporos CT e **c,b** esporos CE, reação ao AT-O. **a** Esporo mostrando a primeira divisão celular. **b** Esporo mostrando início de protrusão de rizóide e a abertura da fissura da parede. **c** Esporo mostrando abertura da fissura da parede. **d** Esporo mostrando rizóide e primeira divisão celular da célula protanemal. (Cp) célula protemal, (Cr) célula rizoidal, (E) exina, (F) fissura, (I) intina, (O) ornamentação da parede celular, (P) perina, (Pc) parede celular, (N) núcleo, (R) rizóide, (V) vacúolo.....50

**Figura 2.** Secções transversais e longitudinais de gametófitos de *Pleopeltis lepidopteris* após 150 dias de cultivo. **a, c, e** Gametófito CT. **b, d, f** Gametófito CE. **a, b** Reação ao AT-O com forte reação metacromática indicando polissacarídeos ácidos na parede celular, núcleo, tricoma e anterozóides. **c, d** Reação ao CBB indicando a presença de proteínas no núcleo e tricoma. **e, f** Reação ao PAS indicando celulose na parede celular e amido nos cloroplastos. (An) anterídio, (At) anterozoide, (C) cloroplasto, (N) núcleo, (O) opérculo, (Pc) parede celular, (T) tricoma.....51

**Figura 3.** Fluorescência dos cloroplastos de gametófitos CT (**a**) e gametófitos CE (**b**) de *Pleopeltis lepidopteris*, captada por microscopia confocal de varredura a laser.....52

**Figura 4.** Esporos controles e criopreservados de *Pleopeltis lepidopteris* em microscopia eletrônica de varredura. **a, b** Esporos CT apresentando parede celular exina com ornamentações esféricas lisas, distribuídas irregularmente e fissura na região equatorial. **c, d** Esporos CE apresentando parede celular exina mais áspera, ornamentações

esféricas pontiaguda e fissura na região equatorial. (F) fissura, (Op) ornamentação da parede celular.....53

**Figura 5.** Gametófitos CT e CE de *Pleopeltis lepidopteris* com 150 dias, em microscopia eletrônica de varredura. **a,b,c** Gametófitos CT em vista abaxial, mostrando rizoides, meristema apical e tricomas na margem da lâmina. **b** Detalhe da superfície abaxial mostrando rizomas. **c** Gametófito espatulado-cordiforme, com meristema apical e rizóides. **d-i** Gametófitos CE. **d** Gametófito cordiforme com tricomas na superfície abaxial, meristema apical, vários arquegônios e muitos rizoides. **e** Detalhe de um arquegônio. **f, h** Gametófito espatulado-cordiforme em vista abaxial mostrando meristema apical e anterídios próximos aos rizoides. **g** Detalhe de vários anterídios com opérculo aberto. **i** Detalhe de anterídio fechado. (An) anterídio, (Ar) arquegônio, (Ca) célula anular, (Cb) célula basal, (Co) célula opercular, (M) meristema apical, (O) opérculo, (R) rizóide, (T) tricoma.....54

**Figura 6.** Esporos CT e CE de *Pleopeltis lepidopteris* com quatro dias de cultivo em microscopia eletrônica de transmissão. **a,b,c** Esporos CT. **d,e,f** Esporos CE. **a, d** Apresentaram em CT e CE as três camadas da parede celular, exina espessa e ornamentada, intina e perina delgada, fenda, vacúolos e mitocôndrias. **b** Detalhe do núcleo. **c** Detalhe de um cloroplasto com grânulos de amido e tilacóides. **e** Detalhe de mitocôndria e parede celular intina. **f** Detalhe da exina, da intina e cloroplasto. (A) grânulos de amido, (E) exina, (Fe) fenda, (I) intina, (M) mitocôndria, (N) núcleo, (O) ornamentação da parede celular, (P) perina, (Ti) tilacóide, (V) vacúolo.....56

**Figura 7.** Gametófitos de *Pleopeltis lepidopteris* oriundos de esporos CT e CE com 150 dias de cultivo em microscopia eletrônica de transmissão. **a, b, c** Gametófitos CT. **a** Parede celular, núcleo e nucléolo. **b** Parede celular, mitocôndrias, cloroplastos com plastoglôbulos e grânulos de amido. **c** Duas células divididas pela parede celular, plasmodesmos, cloroplastos com plastoglôbulos e grãos de amido. **d, e, f** Gametófitos CE. **d** Parede celular, plasmodesmos, mitocôndrias, núcleo com nucléolo, cloroplastos com plastoglôbulos e grânulos de amido. **e** Cloroplastos com grânulos de amido e tilacóides, mitocôndrias e peroxissomo. **f** Cloroplastos com granum, grânulos de amido e tilacóides. (A) grânulos de amido, (C)

cloroplasto, (G) granum, (M) mitocôndria, (N) núcleo, (Nu) nucléolo, (Pc) parede celular, (Pe) peroxissomos, (Pg) plastoglóbulo, (Pl) plasmodesmos, (Ti) tilacóide.....57

**Figura 8.** Curvas Rápidas de Luz (RLCs) de gametófitos CT (●) e CE (○) de *Pleopeltis lepidopteris* adaptados no escuro durante 30 min...60

**Figura 9.** Dissipação fotoquímica Y(II) e não-fotoquímica Y(NO) e Y(NPQ) em gametófitos CT(linha cheia) e CE (linha tracejada) de *Pleopeltis lepidopteris* em nove diferentes níveis de irradiância (E). Média ± Desvio padrão (n= 12).....60

## LISTA DE TABELAS

## CAPÍTULO I

**Tabela 1.** Germinação de esporos de *Pleopeltis lepidopteris* armazenados em diferentes condições pelo período de um e oito meses..... 32

**Tabela 2.** Área de gametófitos de *Pleopeltis lepidopteris*, oriundos de esporos controles e esporos criopreservados, pós 140 e 200 dias de cultivo.....34

**Tabela 3.** Estruturas reprodutivas em gametófitos de *Pleopeltis lepidopteris* após 140 e 200 dias de cultivo.....34

## CAPÍTULO II

**Tabela 1.** Teores de clorofilas e carotenoides em gametófitos CT e CE de *Pleopeltis lepidopteris* com 150 dias de cultivo.....58

**Tabela 2.** Parâmetros fotossintéticos a partir da fluorescência da clorofila *a* de gametófitos CT e CE de *Pleopeltis lepidopteris*.....59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AM - Esporos armazenados em temperatura ambiente
- AT-O - Azul de Toluidina
- CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CBB - Azul Brilhante de Coomassie
- CE - Esporos criopreservados esterilizados
- Cfa - Sistema de classificação do clima
- CN - Esporos criopreservados não esterilizados
- CT – Esporos controles (recém-coletados)
- DMSO - Dimetil Sulfóxido
- Ek - Irradiância de saturação
- ETR - Taxa de Transporte de Elétrons
- ETRmáx- Taxa Máxima de Transporte de Elétrons
- F - Fluorescência da amostra aclimatada às condições de escuro
- F' - Fluorescência da amostra aclimatada às condições de claro
- Fm - Fluorescência máxima da amostra após aclimatação ao escuro com todos os centros PSII fechados
- Fm' - Fluorescência máxima da amostra após aclimatação a luz com todos os centros PSII fechados
- Fo - Fluorescência mínima da amostra após aclimatação ao escuro com todos os centros PSII abertos
- Fo' Fluorescência mínima da amostra após aclimatação a luz com todos os centros PSII abertos
- Ft - Nível de fluorescência antes do pulso saturante de luz
- Fv/Fm - Rendimento Quântico Ótimo do PSII
- LA - Luz actínica
- LABCEV - Laboratório de Biologia Celular Vegetal
- LCME -Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
- LS - Luz saturante
- MCVL - Microscopia Confocal de Varredura a Laser
- MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
- ML - Microscopia de Luz
- NL - Nitrogênio Líquido
- PAM - Pulso de Amplitude Modulada
- PAR - Radiação Fotossinteticamente Ativa
- PAS - Ácido Periódico de Schiff

## XII

- PSI - Fotossistema I
- PSII - Fotossistema II
- RE - Esporos armazenados sob-refrigeração ( $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ )
- UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
- UR – Unidade relativa
- Y(II) - Rendimento Quântico Efetivo - conversão de energia fotoquímica no PS II
- Y(NO) - Rendimento quântico de perda de energia não-regulamentado não-fotoquímica no PS II
- Y(NPQ) - Rendimento quântico de perda de energia regulado não-fotoquímica no PS II
- $\alpha$  - ângulo registrado no início da curva da eficiência fotossintética
- $\beta$  – Fotoinibição

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>II</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>V</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>VI</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>VI</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>VI</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>X</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>X</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>16</b>
1.1 DIVERSIDADE DE SAMAMBAIAS .....	16
1.2 REPRODUÇÃO .....	17
1.3 MÉTODOS DE ARMAZENAMENTO DE ESPOROS .....	18
1.4 DESENVOLVIMENTO DE GAMETÓFITOS .....	20
1.5 <i>Pleopeltis lepidopteris</i> .....	22
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>26</b>
<b>VIABILIDADE DE ESPOROS DE <i>Pleopeltis lepidopteris</i></b>	
<b>(LANGSD. &amp; FISCH.) DE LA SOTA (POLYPODIACEAE) EM</b>	
<b>DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO.....</b>	<b>26</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
2.1 LOCAL DE COLETA.....	27
2.2 OBTENÇÃO DE ESPOROS.....	27
2.3 ARMAZENAMENTO E GERMINAÇÃO .....	28
2.4 CULTIVO DE GAMETÓFITOS .....	29
2.5 ANÁLISE DE GAMETÓFITOS POR MEIO DE	
MICROSCOPIA DE LUZ (ML).....	31
2.6 DETERMINAÇÃO DA ÁREA DOS GAMETÓFITOS.....	31
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	31
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
3.1 GERMINAÇÃO DE ESPOROS .....	32
3.2 ÁREA DE GAMETÓFITOS.....	33

3.3	ANÁLISE DE GAMETÓFITOS POR MEIO DE MICROSCOPIA DE LUZ (ML) .....	35
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
	<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>42</b>
	<b>CARACTERIZAÇÃO DE GAMETÓFITOS DE <i>Pleopeltis lepidopteris</i> (POLYPODIACEAE), UMA SAMAMBAIA DA RESTINGA, APÓS A CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPOROS: ANÁLISES MORFOLÓGICAS, ULTRAESTRUTURAIS E FISIOLÓGICAS.....</b>	<b>42</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
2.1	LOCAL DE COLETA .....	43
2.2	OBTENÇÃO DE ESPOROS .....	44
2.3	ARMAZENAMENTO E GERMINAÇÃO DE ESPOROS.....	44
2.4	CULTIVO DE GAMETÓFITOS .....	44
2.5	ANÁLISE DE ESPOROS E GAMETÓFITOS ATRAVÉS DA MICROSCOPIA DE LUZ (ML).....	44
2.6	ANÁLISE DOS GAMETÓFITOS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER.....	45
2.7	ANÁLISE DE ESPOROS E GAMETÓFITOS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....	45
2.8	ANÁLISE DE ESPOROS E GAMETÓFITOS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) .....	46
2.9	EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA DE GAMETÓFITOS .....	46
2.10	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS .....	48
2.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	48
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
3.1	GERMINAÇÃO DE ESPOROS.....	49
3.2	CARACTERIZAÇÃO DE ESPOROS E GAMETÓFITOS ATRAVÉS DA MICROSCOPIA DE LUZ (ML).....	49
3.3	QUANTIFICAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE CLOROPLASTOS EM MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER.....	52
3.4	CARACTERIZAÇÃO DOS ESPOROS E GAMETÓFITOS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	52
3.5	CARACTERIZAÇÃO DOS ESPOROS E GAMETÓFITOS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	55
3.6	PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS .....	58



3.7	CURVAS RÁPIDAS DE LUZ (RLC) A PARTIR DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA <i>a</i> DOS GAMETÓFITOS .....	59
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>5.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>65</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 DIVERSIDADE DE SAMAMBAIAS

As samambaias e as licófitas pertencem a dois grupos monofiléticos (samambaias e licófitas) respectivamente, com linhagens evolutivas distintas e aceitas na atualidade. Estudos moleculares têm esclarecido as relações filogenéticas destes grupos e, até pouco tempo atrás, era usado o termo Pteridophyta, que caiu em desuso, para designar esse grupo de plantas (Pryer *et al.*, 2001; Pryer *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2008).

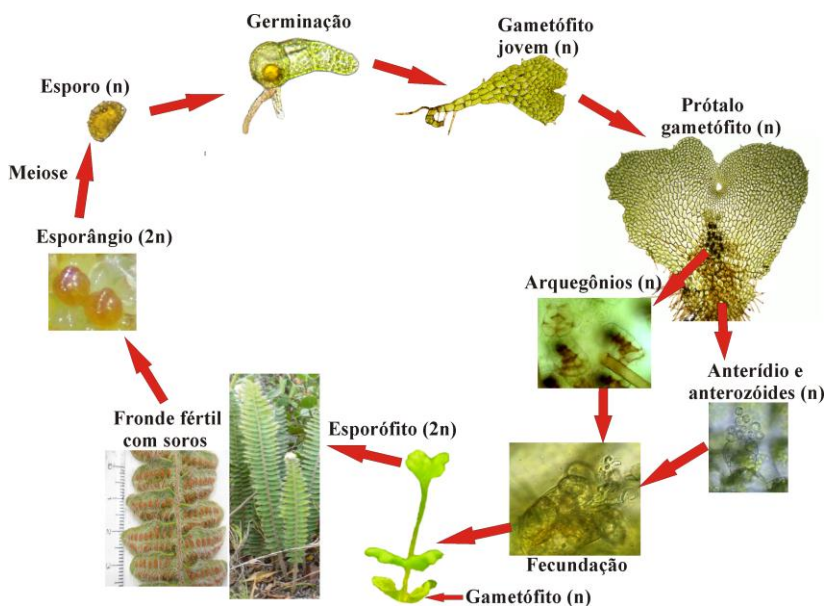
As samambaias e as licófitas apresentam cerca de 13.600 espécies (Moran, 2008). Aproximadamente 3.250 ocorrem nas Américas (Windisch, 1992). O Brasil é um dos principais centros de endemismo e diversidade de samambaias e licófitas do continente americano e do mundo (Tryon, 1972; Tryon & Tryon, 1982), sendo encontradas principalmente nas regiões Sul e Sudeste (Windisch, 1996) predominantemente nas áreas de domínio do bioma Floresta Atlântica, o mais ameaçado no país (Labiak & Prado, 1998; Morellato & Haddad, 2000). De acordo com Windisch (1992), são escassas as informações sobre conservação das espécies de samambaias no Brasil, o que ainda permanece nos dias atuais.

Segundo a Lista de Espécies da Flora do Brasil (Prado & Sylvestre, 2014), podem ser encontradas 1.224 espécies de licófitas e samambaias no território brasileiro sendo que 468 espécies são endêmicas. Para o Estado de Santa Catarina estão registradas 402 espécies de licófitas e samambaias (Forzza *at al.*, 2010), e boa parte do conhecimento desse grupo no Sul do Brasil pode ser encontrada nas obras de Sehnem (1967a-c; 1968a-b; 1970a-b; 1971; 1972; 1974; 1978; 1979a-g; 1984).

Nas últimas décadas há relatos que indicam um declínio na população de samambaias e, provavelmente uma das causas são as mudanças ambientais que podem ocasionar rápido processo de destruição de seus habitats, ameaçando principalmente o ciclo reprodutivo (Ibars & Estrelles, 2012).

## 1.2 REPRODUÇÃO

Os esporos são a unidade de dispersão das samambaias sendo principalmente dispersos pela gravidade, vento e eventualmente pela água (Dyer, 1979; Raghavan, 2005). A maioria das espécies de samambaias (Classe Polypodiopsida) (Smith *et al.*, 2006) é homosporada, isto é, produz apenas um tipo de esporo com uma marcada alternância de gerações heteromórficas em seu ciclo de vida (Fig. 1). Apresentam uma fase gametofítica haploide, na qual ocorrem trocas gênicas, geralmente efêmeras com duração de alguns dias ou semanas, e a fase esporofítica que é diploide, mais conspícua, perene, chegando a durar muitos anos dependendo da espécie (Tryon & Tryon, 1982; Moran, 2008; Forzza *et al.*, 2010)



**Figura 1.** Ciclo de vida de samambaia homosporada *Pleopeltis lepidopteris*. Autora: Elisa P. Filipin.

A viabilidade dos esporos de samambaias depende diretamente das condições ambientais as quais estão expostos durante um determinado período de tempo (Esteves & Dyer, 2003). Outro fator crucial na viabilidade dos esporos está relacionado à composição das

substâncias de reserva, que variam consideravelmente entre as espécies (Dyer, 1979). Os esporos de samambaias são semelhantes às sementes quanto à dormência, longevidade e viabilidade (Lloyd & Klekowski, 1970; Windham *et al.*, 1986; Banks, 1999; Hor *et al.*, 2005; Ballesteros, 2010).

Quando esporos apresentam proteínas como principal fonte de reserva, quantidade de água elevada e cloroplastos são classificados como esporos verdes ou clorofilados, e se assemelham às sementes recalcitrantes, pois não toleram dessecação, sendo difícil armazená-los às temperaturas abaixo de 0°C, pois podem ocorrer danos celulares irreversíveis (Roberts, 1973; Kato, 1976; Berjak & Pammenter, 2008). Em contraste, os esporos não verdes ou aclorofilados são comparáveis às sementes ortodoxas (Roberts, 1973); podendo ser armazenados por um longo período. Isso se deve a alta quantidade de lipídios e baixa quantidade de água (Dyer, 1979).

### 1.3 MÉTODOS DE ARMAZENAMENTO DE ESPOROS

Os esporos apresentam características que os tornam ideais para conservação *ex situ* em bancos de germoplasmas. Sua produção é imensa, são fáceis de obter, requerem pouco espaço de armazenamento e germinam sem cultura rigorosa (Dyer, 1979; Raghavan, 2005). Há plasticidade na viabilidade de esporos após diferentes condições e períodos de armazenamento. Lloyd & Klekowski (1970) calcularam a variação na viabilidade de esporos clorofilados e esporos aclorofilados ao longo de períodos de armazenamento, observando o contraste marcante entre *Equisetum* (Equisetaceae) 12 a 24 dias de viabilidade e algumas espécies de *Asplenium* (Aspleniaceae) até 48 anos. Esporos de *Polypodium vulgare* L. (Polypodiaceae) morrem após sete anos armazenados a 4°C (Smith & Robinson, 1975). Em esporos de *Acrosticum danaefolium* Langsd. & Fisch. (Pteridaceae), a viabilidade manteve-se após três anos de armazenamento sob-refrigeração (Randi, 1996). Esporos de *Cyathea delgadii* Sternb. (Cyatheaceae) (Simabukuro *et al.*, 1998) e *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (Dennstaedtiaceae) permanecem viáveis por vários anos, quando armazenados a 4°C (Ashcroft e Sheffield, 2000). Esporos de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) apresentaram alta porcentagem de germinação após um período de 731 dias armazenados a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  (Filippini *et al.*, 1999).

A criopreservação é a conservação de material biológico em temperatura ultra baixa (-196°C) geralmente em nitrogênio líquido (Karth, 1985, Benson *et al.*, 1998). Em temperaturas ultra baixas todos os processos metabólicos são desativados, paralisando também a deterioração biológica e permitindo a conservação durante longos períodos (Benson *et al.*, 1998). Segundo Harding *et al.* (1997) e Benson *et al.* (1998), a técnica de criopreservação apresenta limitação, envolvendo uma série de estresses que podem destruir o material vegetal. Os autores enfatizam a importância da manutenção da estabilidade fenotípica e genética do material criopreservado por longo período nos programas de conservação de germoplasma. A criopreservação tornou-se um valioso método para a conservação de recursos genéticos vegetais, porém é preciso aperfeiçoar protocolos para garantir a regeneração completa de plantas a partir das estruturas criopreservadas (Sakai, 1995; Harding *et al.*, 1997; Yongjie *et al.*, 1997). Crioprotetores como o dimetilsulfóxido, glicerol, sacarose e prolina são utilizados em alguns germoplasmas, cujas células apresentam elevados teores de água, para evitar a formação de cristais de gelo e manter a viabilidade durante a criopreservação (Lynch & Benson, 1991).

Nos últimos anos, o armazenamento em nitrogênio líquido (NL) tem sido aplicado com sucesso para a conservação de germoplasma incluindo: suspensões celulares (Panis *et al.*, 1990; Yongjie *et al.*, 1997), calos, gemas apicais e laterais, meristemas (Niwata, 1995), pólen (Lora *et al.*, 2006; Tandon, 2007; Li *et al.*, 2008), sementes (Hirano, 2005; Hor, 2005; Kholina & Voronkova, 2008), embriões somáticos e zigóticos (Marin & Duran-Vila, 1988; Pence, 2004; Radhamani & Chandel, 1992), produtos biotecnológicos (Stushnoff, 1987) e esporos de samambaias (Agrawal *et al.*, 1993; Pence, 2000; Rogge *et al.*, 2000; Ballesteros *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2010).

Os esporos aclorofilados apresentam características peculiares para a criopreservação. Por apresentarem baixo teor de água, podem ser diretamente imersos em NL por longo prazo, sem a necessidade de crioprotetores (Agrawal *et al.*, 1993; Rogge *et al.*, 2000; Ballesteros *et al.*, 2006; Brum & Randi, 2006).

A criopreservação de esporos de samambaias já foi utilizada por diversos autores. Por exemplo, Agrawal *et al.* (1993) criopreservaram esporos de *Cyathea spinulosa* Wall. ex Hook (Cyatheaceae) durante três

dias em NL e estes sobreviveram. Esporos aclorofilados de 33 espécies e clorofilados de cinco espécies sobreviveram ao armazenamento em NL durante 52 e 75 meses (Pence, 2000). Esporos de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) sobreviveram após imersão de uma hora, um e três meses em NL (Rogge *et al.*, 2000). Esporos de *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Dryopteridaceae) continuaram viáveis após 90 dias armazenados em NL (Brum & Randi, 2006). Esporos de algumas espécies de *Alsophila* (Cyatheaceae) também mantiveram viabilidade após 12 meses de imersão em NL (Xu *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010). Ballesteros *et al.* (2012) armazenaram criogenicamente ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) esporos de *Polystichum lonchitis* (L.) Roth (Dryopteridaceae) previamente desidratados em sílica gel e observaram que a viabilidade foi mantida após três anos. Segundo Ballesteros (2011) e Ballesteros *et al.* (2012), além de manter alta viabilidade, os esporos apresentaram germinação mais rápida e crescimento gametofítico normal após imersão em NL.

#### 1.4 DESENVOLVIMENTO DE GAMETÓFITOS

O desenvolvimento de gametófitos foi bastante estudado em Polypodiaceae tendo como maior objetivo subsidiar estudos taxonômicos podendo-se citar como exemplos os trabalhos de Stokey, (1959); Nayar, (1962); Atkinson & Stokey, (1964); Atkinson & Stokey, (1970); Nayar & Kaur, (1971); Tryon & Tryon, (1982); Ranal, (1993); Reyes & Pérez-García, (1994); Ramirez & Pérez-García, (1998); Reyes *et al.*, (2003); Viviani *et al.* (2009); Vázquez-Pérez *et al.*, (2012).

Não há registros de estudos de desenvolvimento de gametófitos após criopreservação de esporos. Os dados da literatura relatam que após armazenamento criogênico os esporos mantêm a viabilidade, havendo aceleração da germinação e desenvolvimento gametofítico inicial normal (Rogge *et al.*, 2000; Ballesteros, 2006; Ballesteros, 2011; Ballesteros *et al.*, 2012). De acordo com Ballesteros *et al.* (2012), além de investigar e atestar a viabilidade dos esporos é crucial atestar a manutenção da integridade genética através do estudo do desenvolvimento gametofítico. Outra forma de avaliar uma cultura regenerada, após determinado tratamento, é através do estudo de aspectos fisiológicos como os teores de pigmentos fotossintéticos e a eficiência fotossintética.

De acordo com Marengo (2005), a deficiência de clorofilas e carotenóides pode gerar uma considerável redução nas taxas fotossintéticas e, conseqüentemente, no metabolismo primário. Quando a radiação é intensa, o excesso de energia pode danificar o organismo e os carotenoides desempenham um papel essencial na foto proteção, protegendo as moléculas de clorofilas contra a foto-oxidação (Duarte, 2003; Taiz & Zeiger, 2010). Nos últimos anos uma metodologia vem sendo usada para compreender melhor a fisiologia e ecofisiologia das plantas por meio da análise da fluorescência da clorofila *a*. Segundo Genty *et al.* (1989) diversos parâmetros fotossintéticos podem ser mensurados através da fluorescência emitida pela clorofila *a*, principalmente para realização de diversas análises em condições de estresse natural ou induzido experimentalmente. As metodologias atuais permitem a realização das medições da emissão de fluorescência da clorofila *a*, podendo fornecer informações rápidas a respeito da transferência de elétrons, conversão e dissipação da energia luminosa do Fotossistema II, sempre mantendo a integridade do material vegetal utilizado nas análises (Bilger *et al.* 1995).

De acordo com Maxwell & Johnson (2000), a energia da luz absorvida em uma folha pelas moléculas de clorofila pode seguir três destinos: pode ser usada para conduzir a fotossíntese (energia fotoquímica); o excesso de energia pode ser dissipado na forma de calor; a energia também pode ser emitida como fluorescência. Ainda, segundo os autores, estes três processos ocorrem em competição, de tal forma que qualquer aumento na eficiência de um destes parâmetros resultará em uma diminuição no rendimento dos outros dois. Portanto, as informações sobre as alterações na eficiência fotoquímica e na dissipação de calor podem ser obtidas medindo-se a emissão de fluorescência da clorofila *a* (Maxwell & Johnson, 2000).

Os fluorímetros de amplitude modulada (PAM) realizam medições rápidas e precisas de diversos parâmetros fotossintéticos associados à fluorescência da clorofila *a* (Genty *et al.*, 1989; Krause & Weis, 1991; Bilger *et al.*, 1995; Gloag *et al.*, 2007). A utilização de curvas rápidas de luz (RLC) através da fotossíntese *versus* irradiância (Ritchie, 2008) é útil na investigação da integridade do aparato fotossintético das plantas (White & Critchley, 1999). Segundo White & Critchley (1999), as Curvas Rápidas de Luz (RLC) podem mostrar aclimação do aparato fotossintético ao escuro e sua resposta aos pulsos de intensidades crescentes de luz, possibilitando estimar a Taxa de

Transporte de Elétrons (ETR) do PSII, entre outros parâmetros fotossintéticos (Van Kooten & Snel, 1990; Krause & Weis, 1991; Gloag *et al.*, 2007). Sendo assim, diferenças na emissão da fluorescência podem evidenciar alterações no processo de fotossíntese.

### 1.5 *Pleopeltis lepidopteris*

A espécie estudada neste trabalho é a samambaia *Pleopeltis lepidopteris* (Langsd. & Fisch.) de la Sota (Fig. 2) pertencente a classe Polypodiopsida, ordem Polypodiales, família Polypodiaceae (Sota, 1965; Tryon & Tryon, 1982; Smith *et al.*, 2006). A espécie é nativa e endêmica da região Sul (PR, SC, RS) do Brasil e áreas adjacentes como Paraguai, Uruguai e Argentina (Labiak & Hirai, 2014; Smith & Tejero-Díez, 2014). Segunda a Resolução CONAMA nº 261/99 (CONAMA, 1999), é considerada uma espécie herbácea e um dos principais elementos da flora vascular da vegetação de restinga. As “restingas” são habitats característicos do litoral brasileiro, também conhecidas como formações pioneiras com influência marinha com longas faixas de depósitos arenosos marinhos ocupando aproximadamente 79% da costa brasileira, sendo a principal formação costeira da Floresta Ombrófila Densa fazendo parte do Bioma Floresta Atlântica (Suguio & Tessler, 1984; Lacerda *et al.*, 1982; Rizzini, 1992). De acordo com Veloso *et al.* (1991) as “restingas” abrigam espécies arbóreas, arbustivas e herbáceas apresentando variações fisionômicas observadas desde as praias até os pontos mais interiores da planície costeira.

Para que uma espécie se estabeleça nas restingas, principalmente nas dunas móveis e semifixas, Bresolin (1979) e Scarano *et al.* (2002) relatam alguns fatores que podem ser limitantes às plantas como: a pobreza de nutrientes, falta de água no substrato, capacidade de suportar o excesso de cloreto de sódio, intensa luminosidade que oxida clorofilas e aumenta a temperatura foliar; a temperatura do solo; a competição; a herbivoria; doenças e infecções por fungos. A espécie deve apresentar algumas características morfológicas como: porte reduzido ou rasteiro; sistema radicular profundo; folhas reduzidas e revestidas com uma camada de cera; limbo em geral de consistência coriácea e brilhante que reflete os raios solares (Bresolin, 1979; Caruso, 1990).

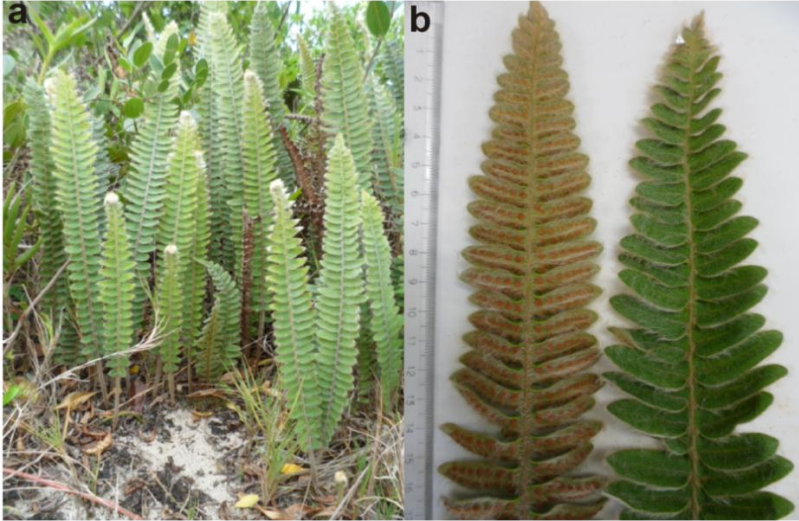


No entanto, a especulação imobiliária, ocupação humana, a poluição e a extração são os principais fatores que vêm perturbando os habitats de restinga (Lacerda *et al.*, 1993; Lacerda *et al.*, 1982; Rocha *et al.*, 2003; Rocha *et al.*, 2004). Com tais impactos, os resultados são sucessivas modificações da paisagem, extinção de comunidades de plantas e até mesmo de animais ao longo de toda a costa, mesmo sendo protegidos por legislação (Araújo & Henriques, 1984; Rocha *et al.*, 2003). Apesar da pressão antrópica e da perda de área sofrida por estes habitats, sabe-se que as restingas apresentam uma considerável diversidade biológica (Rocha *et al.*, 2004).

Além de ser uma das principais espécies da flora de restingas *Pleopeltis lepidopteris* é uma planta medicinal do Sul da América, cujas partes terapêuticas utilizadas são frondes, raízes e rizomas. O medicamento fitoterápico denominado Rheumoflora®, com único registro em 1924, é indicado como analgésico e anti-inflamatório, associa a Cainca (*Chiococca brachiata* - Rubiaceae) e *Pleopeltis lepidopteris* que possuindo em sua composição glicosídeos (samambaína), saponinas, alcalóides, ácidos orgânicos (ácido lepidiptérico, ácido lepdoptânico), salicilatos, resinas, fitosteróis, óleos essenciais, substâncias albuminóides, entre outros compotos (Gazda *et al.*, 2006).

Viviani & Randi (2008) analisaram o efeito de temperatura, pH e luz na germinação de esporos de *Pleopeltis lepidopteris* e observaram que não houve diferença nas porcentagens de germinação entre os pHs 4,0 a 6,7 mas a germinação foi inibida a 30°C e as maiores porcentagens ocorreram a 22 e 8% de luz natural, sendo inibida sob maiores intensidades luminosas. Em outro estudo Viviani *et al.* (2009) acompanharam os desenvolvimentos gametofítico e esporofítico iniciais da espécie sob microscopia de luz. Contudo, estudos sobre a viabilidade de esporos em diferentes condições de armazenamento não foram realizados.

O presente trabalho teve a finalidade de analisar o efeito de alguns métodos de armazenamento sobre a viabilidade de esporos, sobretudo, a criopreservação em nitrogênio líquido e acompanhar o desenvolvimento gametofítico após o tratamento, visando esta técnica em bancos de esporos de samambaias.



**Figura 2.** Aspecto geral de *Pleopeltis lepidopteris* **a.** Detalhe da fronde fértil face abaxial à esquerda e face adaxial a direita **b.**

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a viabilidade de esporos submetidos a diferentes métodos de armazenamento, com ênfase na criopreservação em nitrogênio líquido e o desenvolvimento gametofítico inicial como método para a conservação “*ex situ*” em bancos de germoplasma.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a porcentagem de germinação de esporos de *P. lepidopteris* em diferentes métodos de armazenamento;
- Analisar o desenvolvimento inicial dos gametófitos provenientes de esporos controles e de esporos criopreservados e esterilizados;
- Analisar a histoquímica dos esporos controles e criopreservados em início de germinação e de gametófitos provenientes destes esporos;

- Analisar a morfologia de esporos controles e criopreservados e de gametófitos provenientes destes esporos;
- Analisar a morfologia de esporos controles e criopreservados em início de germinação e de gametófitos provenientes destes esporos;
- Quantificar a fluorescência da clorofila em gametófitos provenientes de esporos controles e de esporos criopreservados e esterilizados;
- Avaliar a eficiência fotossintética de gametófitos provenientes de esporos controles e de esporos criopreservados e esterilizados;
- Avaliar o conteúdo de clorofila *a*, *b*, clorofilas totais e carotenoides em gametófitos provenientes de esporos controles e de esporos criopreservados e esterilizados;
- Analisar a área celular e o surgimento das estruturas reprodutivas de gametófitos provenientes de esporos controles e de esporos criopreservados e esterilizados.

## CAPÍTULO I

### VIABILIDADE DE ESPOROS DE *Pleopeltis lepidopteris* (LANGSD. & FISCH.) DE LA SOTA (POLYPODIACEAE) EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

#### 1. INTRODUÇÃO

Os estudos sobre viabilidade e conservação de esporos de várias espécies de samambaias, bem como sobre o desenvolvimento de gametófitos, vêm sendo conduzidos há décadas (Dyer, 1979; Page *et al.*, 1992; Dyer & Lindsay, 1996, Pence, 2000; Pence, 2008a; Pence, 2008b). Geralmente os esporos recém-coletados são armazenados em temperatura ambiente em herbários ou em temperaturas baixas sob-refrigeração. No entanto, esses métodos causam rápida perda de viabilidade dependendo da espécie (Beri & Bir, 1993; Camloh, 1999).

Esporos de várias espécies foram armazenados em diferentes condições e períodos de armazenamento, apresentando plasticidade na viabilidade (Lloyd & Klekowski, 1970; Smith & Robinson, 1975; Randi, 1996; Simabukuro *et al.*, 1998; Ashcroft e Sheffield, 2000; Filippini *et al.*, 1999), o mesmo observado quando armazenados em nitrogênio líquido (Agrawall *et al.*, 1993; Ballesteros *et al.*, 2012). Os esporos aclorofilados por apresentarem baixo teor de água, podem ser imersos diretamente em NL por longo prazo, sem a necessidade de crioprotetores, conforme observado por Rogge *et al.* (2000) e Brum & Randi (2006).

Viviani & Randi (2008) trabalharam com esporos de *Pleopeltis lepidopteris*, coletados nas dunas da praia da Joaquina, Florianópolis, SC e observaram as mais altas porcentagens de germinação nas temperaturas de 20 e 25°C e sob 22 e 8% de luz solar plena. As autoras estudaram também o desenvolvimento gametofítico e observaram estruturas reprodutivas após 120 dias de cultivo; a germinação é do tipo *Vittaria* e o desenvolvimento é do tipo *Drynaria* (Viviani *et al.*, 2009). No entanto, não há relatos na literatura sobre a conservação dos esporos dessa importante espécie das restingas.

Para que ocorra sucesso na conservação *ex situ* por meio do estabelecimento dos esporos em bancos de germoplasma é preciso investigar e atestar a viabilidade dos esporos (Ballesteros, 2010 e

Ballesteros *et al.*, 2012), para garantir a manutenção da integridade genética e capacidade de desenvolvimento (Page *et al.*, 1992; Banks, 1999).

A esterilização superficial de esporos de samambaias é um procedimento utilizado em estudos de germinação para eliminar ou reduzir a contaminação por fungos e bactérias (Renner & Randi, 2004; Brum & Randi, 2006; Begnini & Randi, 2009; Viviani *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010; Barnicoat *et al.*, 2011; Vargas & Droste, 2014). No entanto, alguns procedimentos de esterilização podem reduzir a porcentagem de germinação de esporos (Hamilton & Chaffin, 1998; Simabukuro *et al.*, 1998; Camloh, 1999).

Este trabalho teve como objetivo testar alguns métodos de conservação de esporos de *Pleopeltis lepidopteris* e analisar os percentuais de germinação após diferentes períodos e condições de armazenamento, e comparar o desenvolvimento gametofítico a partir da germinação de esporos recém-coletados e criopreservados em nitrogênio líquido.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

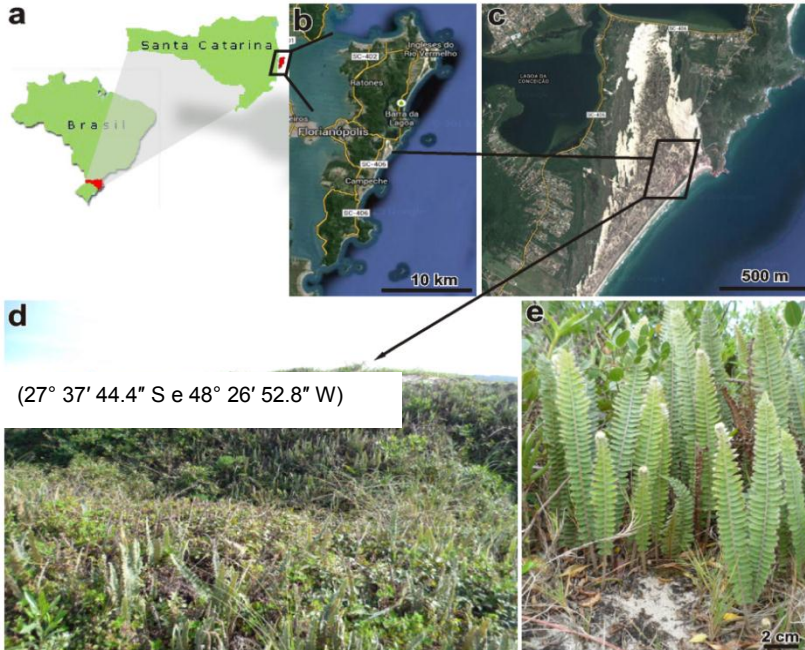
### 2.1 LOCAL DE COLETA

Frondes férteis de *Pleopeltis lepidopteris* (aproximadamente cinquenta) foram coletadas aleatoriamente de diferentes plantas em setembro de 2013 nas Dunas da Praia da Joaquina (27° 37' 44.4" S e 48° 26' 52.8" W) no litoral leste da Ilha de Santa Catarina, Brasil (Fig. 1). O clima da região é subtropical úmido com verões quentes e chuvas distribuídas durante o ano, com temperatura média anual entre 19-20°C e precipitação média anual entre 2500-2700 mm (Pandolfo *et al.*, 2002).

### 2.2 OBTENÇÃO DE ESPOROS

Para a liberação de esporos, as frondes de *Pleopeltis lepidopteris* (Fig. 2a, b), secaram sobre bandejas plásticas revestidas com papel de filtro à temperatura ambiente (25°C e 66%UR) por dez

dias Os esporos foram separados por meio de filtragem em papel entretela com auxílio de um pincel (Fig. 2c,d).



**Figura 1.** Localização da área de coleta do material botânico. **a** Estado de Santa Catarina. **b** Ilha de Santa Catarina, SC. **c** Local da coleta nas Dunas da Praia da Joaquina. **d** Dunas com vegetação. **e** *Pleopeltis lepidopteris*.

### 2.3 ARMAZENAMENTO E GERMINAÇÃO

Alíquotas de aproximadamente 50mg de esporos foram armazenadas durante um e oito meses nos seguintes tratamentos: 1) AM= temperatura ambiente nas frondes; 2) RE= sob-refrigeração a  $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ , dentro de frascos de vidro; 3) CE= esporos imersos em nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) em criotubos e esterilizados superficialmente após degelo; 4) CN= esporos imersos em nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) em criotubos e após degelo não esterilizados (Fig. 2e).

Esporos foram esterilizados superficialmente em solução de hipoclorito de sódio comercial (10%), acrescida de uma gota de

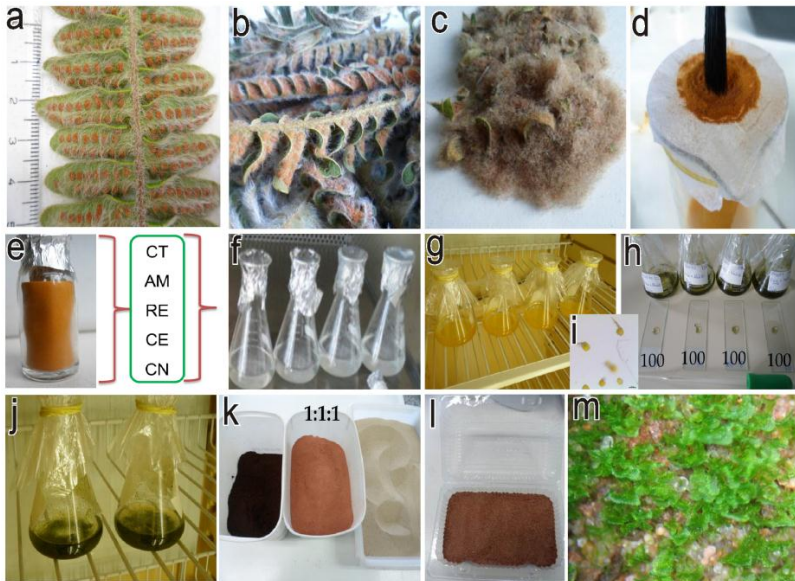
detergente líquido comercial durante 20 minutos, e posteriormente lavados em água destilada autoclavada e filtrados a vácuo sobre papel de filtro (Viviani & Randi, 2008). Para cada tratamento foram utilizados quatro frascos erlenmeyers (50 ml) cada um contendo 20 ml de solução de Mohr (1956), modificada por Dyer (1979). Aproximadamente 10mg de esporos foram inoculados em cada frasco com auxílio de espátula de alumínio. Os frascos foram selados com filme de polipropileno de uso doméstico da marca Assafácil®, fixos com elástico e transferidos para sala de cultivo (Fig. 2f, g), com fotoperíodo de 16 horas ( $22 \mu\text{moles. m}^2.\text{s}^{-1}$ ) à temperatura de  $25\pm 2^\circ\text{C}$  (Viviani & Randi, 2008). A radiação fotossinteticamente ativa (PAR) foi provida por duas lâmpadas fluorescentes brancas (Philips, F40D), dispostas horizontalmente a 30 cm dos frascos. Os esporos foram cultivados nessas condições por 30 dias. A germinação foi avaliada no 4º e 16º dia de cultivo, sendo que para cada dia de avaliação foram preparadas quatro lâminas (réplicas) para cada tratamento, sendo avaliados 100 esporos por lâmina. Algumas gotas da solução nutritiva contendo os esporos foram colocadas sobre lâmina recoberta com lamínula. A germinação foi avaliada em microscópio de luz com aumento de 40 vezes. Foram considerados germinados os esporos que apresentaram protrusão de rizoide (Fig. 2i).

Esporos recém-coletados foram inoculados logo após terem sido separados das frondes e filtrados em papel entretela. Esse material foi utilizado como controle (CT) para os demais tratamentos. As porcentagens de germinação dos demais tratamentos foram comparadas à obtida para os esporos recém-coletados. Os esporos criopreservados e após degelo lento em temperatura ambiente foram esterilizados e então inoculados nos frascos (CE), assim como para esporos criopreservados e após degelo foram inoculados sem a esterilização superficial (CN).

## 2.4 CULTIVO DE GAMETÓFITOS

Após 30 dias de cultivo em meio líquido, os gametófitos originados de esporos controles (CT) e de esporos criopreservados esterilizados (CE) foram transferidos para bandejas de polipropileno transparente com tampa, contendo substrato composto de areia, húmus de minhoca Vitaplan® e latossolo vermelho distrófico na proporção de 1:1:1, previamente esterilizado em autoclave (60 min a  $120^\circ\text{C}$ ) previamente esterilizado em autoclave (60 min a  $120^\circ\text{C}$ ). As bandejas

permaneceram em câmara de germinação com fotoperíodo de 16 h ( $22 \mu\text{moles f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  (Viviani & Randi, 2008) (Fig. 2.j-m).



**Figura 2.** Procedimento para a obtenção de esporos, inoculação, germinação e desenvolvimento de gametófitos de *Pleopeltis lepidopteris*. **a** Fronde fértil. **b** Liberação de esporos. **c** Esporos e esporângios. **d** Filtragem do material. **e** Esporos para inoculação e respectivos tratamentos: CT=controles; AM=temperatura ambiente; RE=sob-refrigeração; CE=criopreservados e esterilizados e CN=criopreservados e não esterilizados. **f** Quatro erlenmeyers por tratamento com meio de Dyer. **g** Frascos em sala de cultivo. **h** Lâminas com esporos germinados. **i** Emissão de rizoides. **j** Gametófitos com 30 dias a serem transferidos para substrato. **k-l** Preparo de substrato para cultivo de gametófitos em bandejas. **m** Gametófitos em desenvolvimento no substrato.



## 2.5 ANÁLISE DE GAMETÓFITOS POR MEIO DE MICROSCOPIA DE LUZ (ML)

Para acompanhar o desenvolvimento gametofítico, foram preparadas lâminas de material fresco com 4, 8, 30, 120, 160 e 212 dias de cultivo que foi fotografado em microscópio de luz (Leica DM2500) com câmera fotográfica digital (Leica, DFC295) acoplada.

## 2.6 DETERMINAÇÃO DA ÁREA DOS GAMETÓFITOS

Para analisar o desenvolvimento gametofítico através da área, gametófitos provenientes de esporos CT e CE, foram coletados após 140 e 200 dias de cultivo. Os gametófitos foram dispostos em placa de Petry com água para remoção de fragmentos de substrato com auxílio de agulhas e microscopia estereoscópica. Foram montadas lâminas com material fresco e capturadas 80 imagens de cada tratamento em microscópio de luz DM 2500 (Leica, Wetzlar, Alemanha), equipado com câmera DFC 295 (Heerbrugg, Alemanha) e software (Leica Application Suite 3.7.0, Suíça). A área dos gametófitos foi medida em  $\mu\text{m}^2$ .

Também foram verificadas as estruturas reprodutivas formadas nos gametófitos oriundos de esporos CT e CE, após 140 e 200 dias de cultivo. Foram analisadas 10 amostras com oito gametófitos para cada tratamento (n=80).

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para se comparar dois tratamentos foi utilizado o teste “t” de Student, sempre que os dados apresentaram normalidade. Para se comparar mais de dois tratamentos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparação de médias de Tukey (5%). Quando os dados de germinação não apresentaram normalidade ou homogeneidade, mesmo após a transformação angular, foram aplicados testes não paramétricos de Mann-Whitney, para dois tratamentos e Freadman para mais de dois tratamentos (Zar, 1996; Santana & Ranal, 2004). Os resultados foram analisados pelos softwares Excel, BioEstat 5.0 e Assistat a 5% de probabilidade.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 GERMINAÇÃO DE ESPOROS

Após quatro dias de cultivo as maiores porcentagens de germinação foram observadas em esporos armazenados durante um mês e oito meses em nitrogênio líquido, não esterilizados após o degelo (CN), e em esporos recém-coletados (CT) (Tab. 1). Esporos armazenados em nitrogênio líquido durante um mês, esterilizados superficialmente após degelo, e esporos armazenados à temperatura ambiente, apresentaram menores porcentagens de germinação no quarto dia de avaliação. Observou-se também uma redução considerável na porcentagem de germinação dos esporos armazenados durante oito meses em refrigeração. Os esporos armazenados à temperatura ambiente perderam totalmente a viabilidade no início da contagem após oito meses.

**Tabela 1.** Germinação de esporos de *Pleopeltis lepidopteris* armazenados em diferentes condições pelo período de um e oito meses.

Tratamentos	Germinação (%)			
	4 Dias de cultivo		16 Dias de cultivo	
CT	68,5 ± 1,29a		90,7 ± 1,71cd	
Tempo de armazenamento				
	1 Mês	8 Meses	1 Mês	8 Meses
CE	49 ± 2,94c	46,7 ± 1,71c	89,0 ± 0,82d	90,2 ± 0,5c
CN	72,7 ± 2,99a	65,5 ± 1,29b	97,0 ± 2,45a	95 ± 0,82ab
AM	31,5 ± 1,29d	0,0 ± 0,0f	75,0 ± 1,41e	0,0 ± 0,0g
RE	65 ± 2,58b	17,7 ± 1,26e	93,0 ± 2,58b	64,7 ± 0,96f
Fr	157		75,6667	
p	< 0,0001		< 0,0001	

Médias seguidas por letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos entre colunas do 4º e 16º dia de cultivo pelo teste de Friedman ( $p < 0.05$ ). CT=esporos controle recém-coletados; CE= esporos criopreservados e esterilizados; CN= esporos criopreservados não esterilizados; AM= esporos mantidos nas frondes em temperatura ambiente; RE= esporos mantidos sob-refrigeração. Fr= Teste de Friedman. p= nível de significância. Média  $\pm$  Desvio Padrão (n= 100).

Após 16 dias de cultivo (Tab. 1), as maiores porcentagens de germinação foram observadas para esporos criopreservados durante um e oito meses e não esterilizados após o degelo (CN), e para esporos armazenados durante um mês em refrigeração (RE), seguidas de esporos criopreservados durante um e oito meses, e esterilizados após o degelo (CE) cuja germinação foi semelhante a dos esporos controles (CT). Observou-se, assim como no 4º dia de cultivo, uma redução considerável na porcentagem de germinação dos esporos armazenados sob-refrigeração durante oito meses (RE) após 16 dias de cultivo. Os esporos armazenados à temperatura ambiente (AM) perderam totalmente a viabilidade após oito meses de armazenamento aos 16 dias de cultivo

### 3.2 ÁREA DE GAMETÓFITOS

Gametófitos crescidos a partir de esporos controles, após 140 e 200 dias de cultivo, apresentaram área muito inferior aos gametófitos crescidos a partir de esporos criopreservados (Tab. 2).

Observou-se que aos 140 dias de cultivo, gametófitos oriundos dos esporos criopreservados, apresentaram anterídios e arquegônios, enquanto que gametófitos provenientes de esporos controles não apresentaram nenhuma estrutura reprodutiva (Tab. 3). Após 200 dias de cultivo, gametófitos provenientes dos esporos criopreservados apresentaram novamente maior média de estruturas reprodutivas em relação aos gametófitos controles.

**Tabela 2.** Área de gametófitos de *Pleopeltis lepidopteris*, oriundos de esporos controles e esporos criopreservados, pós 140 e 200 dias de cultivo.

Tratamentos	Dias de cultivo	
	Área do gametófito Média ( $\mu\text{m}^2$ )	
	140 Dias	200 Dias
CT	156,73 $\pm$ 63,44b	2224,73 $\pm$ 733,55b
CE	371,38 $\pm$ 170,57a	3799,21 $\pm$ 1465,66a
p	< 0,0001	< 0,0001

Médias seguidas por letras diferentes na coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos pelo teste de Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ). CT= de esporos controles recém-coletados; CE= esporos criopreservados e esterilizados. p=nível de significância. Média  $\pm$  Desvio Padrão (n= 80).

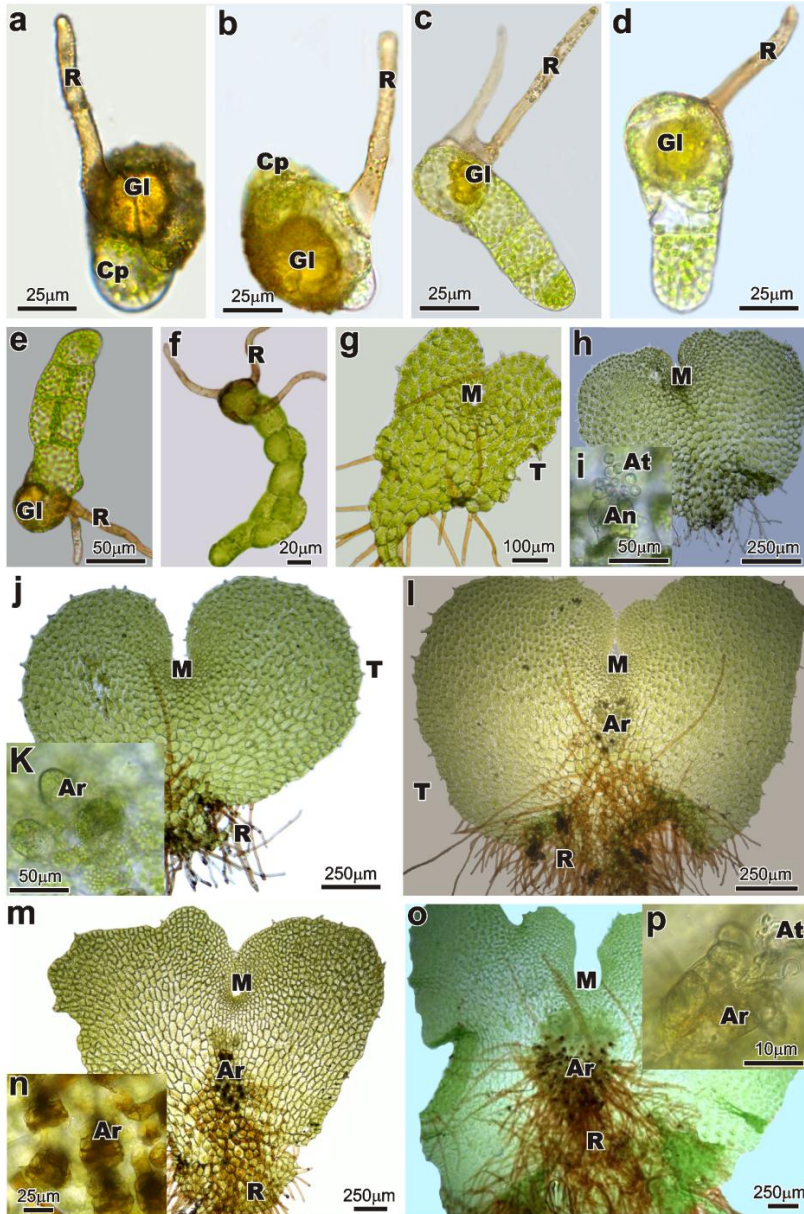
**Tabela 3.** Estruturas reprodutivas em gametófitos de *Pleopeltis lepidopteris* após 140 e 200 dias de cultivo.

Tratamentos	Gametófitos com estruturas reprodutivas	
	Média (%)	
	140 Dias	200 Dias
CT	0,0 $\pm$ 0,0a	0,37 $\pm$ 0,49a
CE	0,26 $\pm$ 0,44b	0,81 $\pm$ 0,40b
p	< 0,0001	< 0,0001

Médias seguidas por letras diferentes na coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos pelo teste de “t” de Student ( $p < 0.05$ ). CT= de esporos controles recém-coletados; CE= esporos criopreservados e esterilizados. p= nível de significância. Média  $\pm$  Desvio Padrão (n= 80)

### 3.3 ANÁLISE DE GAMETÓFITOS POR MEIO DE MICROSCOPIA DE LUZ (ML)

Gametófitos oriundos de esporos CT de *Pleopeltis lepidopteris* e de esporos CE apresentaram o mesmo padrão de germinação e desenvolvimento (Fig. 3). Observou-se que a germinação iniciou entre três e quatro dias de cultivo (Fig. 3a, b). Os gametófitos com oito dias de cultivo apresentaram de três a quatro células clorofiladas nos dois tratamentos (Fig. 3c, d). Com 16 dias de cultivo apresentaram a fase filamentosa em ambos os tratamentos (Fig. 3e, f). Gametófitos com 30 dias de cultivo apresentavam forma cordiforme com vários rizoides e células protonemais com muitos cloroplastos. Porém observou-se uma antecipação de ocorrência de estruturas reprodutivas em gametófitos oriundos dos esporos criopreservados após 120 dias de cultivo. Os gametófitos que cresceram a partir dos esporos controles não se apresentaram na fase reprodutiva após esse período (Fig. 3g, h, i). No entanto, os gametófitos dos dois tratamentos apresentaram um padrão morfológico cordiforme-reniforme aos 160 dias de cultivo, com amplas asas, meristema apical, tricomas marginais, arquegônios e anterídios (Fig. 3j, l, k). Após 212 dias de cultivo os gametófitos de ambos os tratamentos apresentaram asas mais amplas e estruturas reprodutivas com muitos arquegônios na região central da superfície abaxial, entre os rizoides; o meristema apical é muito nítido (Fig. 3m, o). Detalhes de arquegônios são mostrados na figura 3n e um arquegônio sendo fecundado é mostrado na figura 3p.



**Figura 3.** Início de germinação e desenvolvimento de gametófitos de *Pleopeltis lepidopteris*. **a** Esporo controle geminando após 4 dias. **b** Esporo criopreservado esterilizado geminando após 4 dias. **c** Gametófito

controle com 8 dias. **d** Gametófito de esporo criopreservado com 8 dias. **e** Gametófito filamentosso controle com 30 dias. **f** Gametófito filamentosso de esporo criopreservado com 30 dias. **g** Gametófito controle cordiforme com 120 dias. **h** Gametófito de esporo criopreservado cordiforme com 120 dias. **i** Detalhe de anterídios e anterozoides. **j** Gametófito controle com 160 dias. **k** Detalhe de arquegônios. **l** Gametófito de esporo criopreservado com 160 dias. **m** Gametófito controle com 212 dias. **n** Detalhe de arquegônios. **o** Gametófito de esporo criopreservado com 212 dias. **p** Detalhe de um arquegônio (Ar) sendo fecundado por anterozoides (At). (An) anterídio, (At) anterozoide, (Cp) celular protalial, (Gl) glóbulo de lipídeo, (T) tricoma, (R) rizóide, (M) meristema apical.

#### 4. DISCUSSÃO

Esporos recém-coletados de *Pleopeltis lepidopteris* alcançaram 90,7% de germinação após 16 dias de cultivo em meio de Dyer, enquanto que a porcentagem máxima encontrada para essa espécie no trabalho realizado por Viviani *et al.* (2009) foi de 35,7%, aos 28 dias de cultivo. Esporos do presente estudo e de Viviani *et al.* (2009) foram coletados nas Dunas da Praia da Joaquina, Florianópolis, SC, e a germinação ocorreu nas mesmas condições de cultivo. O que diferiu foi ano e a estação de coleta dos esporos. No presente estudo os esporos foram coletados na estação da primavera ao final do mês de setembro de 2013. Já, no estudo de Viviani *et al.* (2009) o material foi coletado na estação de outono no mês de maio de 2005. Provavelmente essa diferença no potencial de germinação indica sazonalidade da espécie na produção de esporos viáveis. Santos *et al.* (2010) trabalharam com esporos de *Gleichenella pectinata* (Willd.) Ching (Gleicheniaceae) coletados entre março a novembro de 2004 e observaram variações nas porcentagens de germinação entre os esporos de diferentes coletas. Evidências apontam que a formação de esporos deve ser influenciada pelas alterações climáticas sazonais, tais como temperaturas, fotoperíodo, períodos de chuvas ou estiagem, local de coleta dos esporos e populações (Camloh & Gogala 1992; Camloh, 1993; Camloh, 1999; Sheffield *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2010).

Os esporos de *Pleopeltis lepidopteris* não sobreviveram quando armazenados por oito meses em temperatura ambiente (média anual de

21°C). Tal fato foi verificado também para outras espécies de samambaias, como em esporos de *Athyrium filix-femina* (L.) Roth (Athyriaceae) perderam a viabilidade após um ano quando armazenados a 25°C (Ballesteros *et al.*, 2012). Assim como, esporos de *Polystichum lonchitis* (L.) Roth (Dryopteridaceae), *Notholaena marantae* (L.) R. Br. (Pteridaceae) e *Thelypteris palustris* Schott (Thelypteridaceae) perderam totalmente a viabilidade após três anos de armazenamento. O mesmo autor relata que esporos de *Pteris vittata* L. (Pteridaceae) sobreviveram após três anos de armazenamento a 25°C. Quando esporos de *Pteris vittata* L. (Pteridaceae) foram armazenados a 20°C por 100 dias, sofreram redução de 30% na porcentagem de germinação e no conteúdo de açúcares solúveis totais (Beri & Bir, 1993). Esporos de *Culcita macrocarpa* C. Presl. (Dicksoniaceae) e *Woodwardia radicans* (L.) Sm. (Blechnaceae) respectivamente, morreram após seis meses e um ano de armazenamento a 20°C (Quintanilla *et al.*, 2002).

Neste trabalho, observou-se redução significativa das porcentagens de germinação de esporos de *Pleopeltis lepidopteris* após o período de armazenamento de oito meses em refrigeração, o que indica ser este um método inadequado para a manutenção da viabilidade de esporos por longo período. Resultados semelhantes foram encontrados em esporos de várias espécies de samambaias. Randi (1996) relatou uma redução de 50% na germinação de esporos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch. (Pteridaceae), após dois anos de armazenamento sob-refrigeração.

De acordo com Wilson *et al.* (1979) e Raghavan (2005), durante o armazenamento em baixas temperaturas a atividade metabólica e a desidratação são reduzidas e as substâncias de reserva necessárias à germinação e ao desenvolvimento gametofítico são gradualmente consumidas e assim os esporos perdem a capacidade de germinar (Beri & Bir, 1993; Camloh, 1999). No entanto, esporos de algumas espécies permanecem viáveis após serem armazenados sob-refrigeração, como registrado em *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) cujos esporos mantiveram-se viáveis após dois anos de armazenamento a 7±1°C apresentando 82% de germinação (Filippini *et al.*, 1999), após 4,5 anos apresentaram 62% de germinação, mas os armazenados por seis anos perderam a viabilidade (Begnini & Randi, 2009).

Esporos de *Culcita macrocarpa* C. Presl (Culcitaceae) armazenados a 5°C durante um ano atingiram somente 9% de



germinação (Quintanilla *et al.*, 2002). Esporos de *Polypodium vulgare* (L.) (Polypodiaceae) permaneceram viáveis após sete anos armazenados a 4°C, embora a viabilidade tenha diminuído (Smith & Robinson, 1975). Esporos de *Cyathea delgadii* (Sternb.) (Cyatheaceae) (Simabukuro *et al.*, 1998) e *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (Dennstaedtiaceae) permanecem viáveis quando armazenados sob-refrigeração por vários anos (Ashcroft & Sheffield, 2000). Esporos de algumas espécies de *Adiantum* têm sua viabilidade preservada quando armazenados sob-refrigeração (Aragon & Pangua, 2004). Esporos de *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Dryopteridaceae) mantiveram-se viáveis durante seis anos de armazenamento sob-refrigeração (Begnini & Randi, 2009).

De acordo com Dyer (1979) esporos aclorofilados geralmente apresentam alto teor de lipídios e aproximadamente 5% de água, características que os tornam ideais para o armazenamento criogênico e conservação em longo prazo. De acordo com Lloyd & Klekowski (1970) e Windham *et al.*, (1986) esporos não verdes parecem ser análogos a sementes ortodoxas e podem ser armazenados por vários anos.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a criopreservação de esporos de *Pleopeltis lepidopteris* em nitrogênio líquido (-196°C) sem a adição de crioprotetores foi eficiente em preservar a viabilidade, sendo que a porcentagem de germinação foi superior quando comparada a de esporos armazenados por oito meses sob-refrigeração. Resultados semelhantes foram encontrados em várias espécies de samambaias, como *Cyathea spinulosa* Wall. ex Hook. (Cyatheaceae) (Agrawal *et al.*, 1993), *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) (Rogge *et al.*, 2000), *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Dryopteridaceae) (Brum & Randi, 2006), *Alsophila spinulosa* (Hook.) Tryon e *Alsophila gigantea* Wallich. ex Hook (Li *et al.*, 2010).

Os resultados em relação à área de gametófitos controles e provenientes de esporos criopreservados de *Pleopeltis lepidopteris* mostraram uma considerável diferença entre os tratamentos, tornando-se a análise da área uma ferramenta eficaz para comparar o crescimento. Do mesmo modo, a avaliação do surgimento de estruturas reprodutivas fornece valiosas informações sobre o desenvolvimento de gametófitos após o armazenamento de esporos em NL. Na literatura há poucos registros de estudos sobre o desenvolvimento de gametófitos a partir de

esporos criopreservados em NL, sendo essa uma informação inovadora e promissora na comparação de tratamentos de armazenamento de esporos.

A germinação de *Pleopeltis lepidopteris* é do tipo *Vittaria* e o padrão de desenvolvimento gametofítico é do tipo *Drynaria*, descritos por Nayar & Kaur (1968, 1969, 1971) para a maioria dos gêneros de Polypodiaceae. O padrão *Vittaria* de germinação é um tipo de germinação polar, onde a primeira divisão resulta em células desiguais. A primeira menor é em paralelo ao plano equatorial do esporo e forma a célula rizoidal e a segunda célula é perpendicular ao eixo polar do esporo. Em seguida o padrão de desenvolvimento é do tipo *Drynaria* que se caracteriza pelo estabelecimento de um meristema apical após a formação de tricomas marginais.

Estudo morfoanatômico de gametófitos de *Pleopeltis lepidopteris* já foi realizado por Viviani *et al.* (2009). Porém, as autoras observaram o desenvolvimento gametofítico até 120 dias de cultivo. No presente trabalho foram analisados gametófitos crescidos a partir de esporos recém-coletados e esporos criopreservados, até 212 dias de cultivo. Aos 30 dias de cultivo, os gametófitos analisados por Viviani *et al.* (2009) apresentavam-se na fase laminar-espátulada, enquanto que no presente estudo apresentaram-se ainda na fase filamentosa. Aos 120 dias de cultivo, Viviani *et al.* (2009) registraram gametófitos na fase cordiforme evidenciando a região meristemática, tricomas unicelulares que crescem a partir de células marginais da lâmina do prótalo e estruturas reprodutivas. No presente trabalho, os gametófitos de *P. lepidopteris* com 120 dias de cultivo, crescidos a partir de esporos controles, não apresentaram nenhuma estrutura reprodutiva. Já os gametófitos oriundos de esporos criopreservados apresentaram anterídios. Aos 160 dias de cultivo, os gametófitos controles de *P. lepidopteris* apresentaram as primeiras estruturas reprodutivas. Conseqüentemente houve uma aceleração de desenvolvimento de gametófitos provenientes de esporos criopreservados em relação ao desenvolvimento gametofítico de esporos controles. Esta diferença no desenvolvimento de gametófitos provavelmente esteja relacionada ao fato de que os esporos imersos em nitrogênio líquido apresentaram aceleração da germinação e conseqüentemente, crescimento antecipado dos gametófitos em relação aos esporos controles.

Por meio da análise da germinação e do desenvolvimento gametofítico, conclui-se por este trabalho que, a criopreservação foi eficiente para a manutenção da viabilidade dos esporos, promovendo uma aceleração da germinação e do desenvolvimento gametofítico e o surgimento de estruturas reprodutivas.

## CAPÍTULO II

### CARATERIZAÇÃO DE GAMETÓFITOS DE *Pleopeltis lepidopteris* (POLYPODIACEAE), UMA SAMAMBAIA DA RESTINGA, APÓS A CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPOROS: ANÁLISES MORFOLÓGICAS, ULTRAESTRUTURAIS E FISIOLÓGICAS

#### 1. INTRODUÇÃO

*Pleopeltis lepidopteris* é uma espécie de samambaia homosporada que apresenta esporos aclorofilados (Viviani & Randi, 2008), fáceis de obter, que apresentam produção imensa, sendo um excelente material biológico de estudo (Dyer, 1979; Raghavan, 1989; Dyer & Lindsay, 1996) para a conservação *ex situ* em bancos de germoplasma (Ashcroft & Sheffield, 2000; Pence, 2004; Pence, 2008a; Pence, 2008b; Ballesteros, 2010). Os esporos aclorofilados apresentam características semelhantes às sementes ortodoxas e mostram aumento da viabilidade quando armazenados em baixas temperaturas (Lloyd & Klekowski, 1970; Windham *et al.*, 1986; Ballesteros *et al.*, 2012).

A conservação criogênica consiste em armazenar o material biológico em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , ou na sua fase de vapor a  $-150^{\circ}\text{C}$  (Kartha, 1985), o que desativa os processos metabólicos paralisando a atividade biológica e permitindo a conservação durante longos períodos (Benson *et al.*, 1998). Essa técnica envolve uma série de estresses que podem destruir o material vegetal ou modificar as amostras após o procedimento. No entanto, espera-se que o material criopreservado mantenha estabilidade genética e fenotípica por longo período (Harding *et al.*, 1997; Benson *et al.*, 1998).

O armazenamento em nitrogênio líquido preservou a viabilidade de esporos de diversas espécies de samambaias sem a necessidade de crioprotetores (Agrawal *et al.*, 1993; Pence, 2000; Rogge *et al.*, 2000; Brum & Randi, 2006, Li *et al.*, 2010; Ballesteros *et al.*, 2012). No entanto, a maioria dos estudos sobre conservação criogênica de esporos de samambaias avaliou a viabilidade de esporos após o armazenamento, mas não o desenvolvimento gametofítico (Ballesteros *et al.*, 2012). Portanto, para confirmar a eficiência do método na conservação de germoplasma em nitrogênio líquido é necessária a

manutenção da viabilidade de esporos, bem como, que sejam aptos a gerar gametófitos capazes de se reproduzir mantendo a capacidade de desenvolvimento (Page *et al.*, 1992; Banks, 1999, Aragon & Pangua, 2004; Pence, 2008a, Pence, 2008b; Ballesteros, 2010).

Poucos são os estudos que avaliaram o desenvolvimento de gametófitos após o armazenamento em nitrogênio líquido. Brum & Randi (2006), observaram desenvolvimento normal de gametófitos oriundos de esporos criopreservados de *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Dryopteridaceae). Da mesma forma, Li *et al.* (2010) acompanharam a germinação e observaram o desenvolvimento normal de *Alsophila gigantea* Wall. ex Hook. e *Alsophila spinulosa* Wall. ex Hook. (Cyatheaceae) após um ano de armazenamento criogênico dos esporos. Análises ultraestruturais são importantes ferramentas que contribuem para caracterizar o desenvolvimento da planta após um determinado tratamento. São poucos os estudos que envolvem ferramentas como a microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Li *et al.*, 2010; Bonomo *et al.*, 2013) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Makgomol & Sheffield, 2001) para avaliar gametófitos de samambaias.

Ferramentas eficientes para avaliar a integridade de uma planta após diferentes tratamentos são as análises fisiológicas, através do desempenho fotossintético, que consistem em avaliar os parâmetros obtidos a partir da fluorescência emitida pela clorofila *a* (Genty *et al.*, 1989).

Este trabalho teve como objetivo descrever características morfo-histológicas, ultraestruturais e fisiológicas de esporos de *Pleopeltis lepidopteris* recém-coletados e armazenados em nitrogênio líquido visando avaliar a criopreservação como método para a conservação dessa importante espécie de restinga.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 LOCAL DE COLETA**

As frondes férteis de *Pleopeltis lepidopteris* foram coletadas no mesmo local relatado no item 2.1 do capítulo I. Porém, a coleta foi realizada em Março de 2014.

## 2.2 OBTENÇÃO DE ESPOROS

Os procedimentos utilizados para coleta e obtenção de esporos estão descritos nos itens 2.1 e 2.2 do capítulo I.

## 2.3 ARMAZENAMENTO E GERMINAÇÃO DE ESPOROS

Os tratamentos realizados foram: CT= esporos recém-coletados e CE= esporos armazenados durante quatro horas em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  e esterilizados após o degelo. O procedimento de esterilização, inoculação e germinação são descritos no item 2.3 do capítulo I.

## 2.4 CULTIVO DE GAMETÓFITOS

Gametófitos provenientes de esporos controles (CT) e de esporos criopreservados e esterilizados após degelo (CE) foram cultivados conforme descrito no item 2.4 do capítulo I.

## 2.5 ANÁLISE DE ESPOROS E GAMETÓFITOS ATRAVÉS DA MICROSCOPIA DE LUZ (ML)

Foram analisados esporos em início de germinação, com quatro dias de cultivo e gametófitos com 150 dias de cultivo. As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2, “overnight” a temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  (Schmidt *et al.*, 2009). Posteriormente, foram desidratadas em séries crescentes de etanol (Bouzon, 2006). Em seguida, foram infiltradas com historesina (Leica Historesin, Heidelberg, Alemanha).

Secções com  $5\mu\text{m}$  de espessura, foram realizadas em micrótomo manual modelo Leica RM 2135, com navalha de tungstênio e posteriormente o material reagiu a diferentes técnicas histoquímicas. Foi utilizado Azul de Toluidina (AT-O) a 0,5%, pH 3,0, para identificar polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia (Gordon & McCandless, 1973). Ácido Periódico de Schiff (PAS) foi utilizado para identificar a presença de polissacarídeos neutros (amido e celulose)

(Gahan,1984). Azul brilhante de Coomassie (CBB) a 0,05% foi utilizado para observação de proteínas totais (Gahan, 1984). As amostras foram fotografadas em microscópio Epifluorescente (Olympus BX 41), equipado com o sistema de captura de Imagem Q Capture Pro 5.1 Software (Qimaging Corporation, Austin, TX, EUA).

## 2.6 ANÁLISE DOS GAMETÓFITOS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER

Gametófitos de *Pleopeltis lepidopteris* com 150 dias de cultivo foram analisados em microscópio confocal de varredura a laser (Leica TCS SP-5, Wetzlar, Alemanha) do LCME da UFSC. As amostras foram depositadas em lâminas seladas com esmalte de unha incolor. Foram analisadas em microscópio Leica HCX PLAPO lambda com objetiva 63x/1,4-0,6 em óleo de imersão. A excitação das células foi feita pelo laser azul a 448nm e os espectros de emissão entre 600 a 685nm. As imagens foram processadas através do programa LAS AF-Lite (Leica). A partir destas imagens foi quantificada autofluorescência dos cloroplastos. Foram usados cinco gametófitos de cada tratamento e estabelecida uma área elíptica na margem de cada indivíduo, abrangendo uma célula e analisados três pontos dentro desta área, perfazendo um total de 15 análises por tratamento.

## 2.7 ANÁLISE DE ESPOROS E GAMETÓFITOS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Amostras de esporos controles (CT), esporos criopreservados (CE) e gametófitos provenientes destes esporos respectivamente com 150 dias, foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, sacarose 2% e solução tampão de cacodilato 0,1M (pH 7,2) *overnight* a temperatura de 4°C (Schmidt *et al.*, 2009). Após três lavagens no mesmo tampão, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) 1% em tampão cacodilato 0,1M por 4 horas. A seguir, foram lavadas em tampão cacodilato 0,1M, desidratadas em séries crescentes de álcool etanólico e secas em ponto crítico de CO<sub>2</sub> (EM-CPD-030, Leica, Heidelberg, Alemanha). Após, foram aderidas ao suporte de alumínio, com fita de carbono dupla face, e revestidas com 20nm de ouro, em metalizador marca Baltec, modelo CED 030. As amostras foram

analisadas e registradas em MEV modelo Jeol (JSM) 6390LV SEM (JEOL Ltd., Tokyo, Japão) a 10 KV no LCME da UFSC.

## 2.8 ANÁLISE DE ESPOROS E GAMETÓFITOS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Amostras de esporos controles (CT), esporos criopreservados (CE) com quatro dias de cultivo e gametófitos provenientes destes esporos respectivamente com 150 dias, foram fixadas e pós-fixadas conforme protocolo utilizado para MEV. Em seguida as amostras foram desidratadas em séries crescentes de acetona e infiltradas em resina Spurr (Spurr, 1969). As secções semi-finas (700 nm) foram coradas com azul de toluidina (AT-O) e registradas em microscópio de luz. As secções ultrafinas (70 nm) foram contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo, de acordo com procedimentos de Reynolds (1963). Após foram analisadas e registradas em TEM modelo Jeol (JEM) 1011 (JEOL Ltd., Tokyo, Japão, a 80Kv), no LCME da UFSC.

## 2.9 EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA DE GAMETÓFITOS

As emissões da fluorescência da clorofila *a* de gametófitos com 150 dias de cultivo provenientes de esporos controles (CT) e de esporos criopreservados (CE), aclimatados por 30 mim no escuro, foram obtidas com auxílio de um fluorímetro de pulso com amplitude modulada Junior-PAM (Walz, Effeltrich, Alemanha) equipado com uma fibra óptica de 1,5mm de diâmetro e um díodo azul (465nm) como fonte de luz. Foram utilizadas quatro bandejas por tratamento e realizadas três curvas rápidas de luz por bandeja, totalizando doze curvas por tratamento.

Utilizando o método de pulso de saturação de luz foi medida a fluorescência emitida pelos gametófitos levando-se em consideração os seguintes valores:  $F$ ,  $F'$  (fluorescência da amostra aclimatada às condições de escuro e de claro, respectivamente);  $F_0$ ,  $F_0'$  (fluorescência mínima após aclimação ao escuro e claro, respectivamente);  $F_m$ ,  $F_m'$  (fluorescência máxima após aclimação às condições de escuro e claro, respectivamente);  $F_t$  (nível de fluorescência imediatamente antes do pulso saturante de luz, em condição de luz actínica) (White & Critchley,



1999; Maxwell & Johnson, 2000). Tais medidas foram posteriormente utilizadas para calcular os parâmetros fotoquímicos e não fotoquímicos.

Os parâmetros  $Y(II)$ , ETR,  $Y(NO)$ , e  $Y(NPQ)$  foram calculados com o software WINCONTROL (V.3.18) (WALZ, Germany) (Genty *et al.*, 1989). Foram calculados: rendimento quântico ótimo ( $F_v/F_m$ ), rendimento quântico efetivo ( $Y$ ) da fotossíntese (fótons da luz incidente utilizados para conduzir as reações fotoquímicas da fotossíntese) e a taxa de transporte de elétrons (ETR) entre PSII e PSI. Os parâmetros não fotoquímicos  $Y(NO)$  e  $Y(NPQ)$  foram também analisados para avaliar a perda de energia em forma de calor (Holt *et al.* 2004).

Usando a opção “Rapid Light Curve” (RLC), as curvas de luz foram obtidas com a aplicação de uma série de nove pulsos de luz saturante (LS) com duração de 8s cada, seguidos de exposição à luz actínica (LA) crescente (2000-3000  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) com intervalos de 0,8s (Genty *et al.*, 1989). A partir das curvas obtidas, foram analisados os seguintes parâmetros com ajustes das curvas às equações de Platt *et al.* (1980): taxa máxima de transporte de elétrons ( $ETR_{\text{max}}$ ), eficiência fotossintética ( $\alpha_{\text{ETR}}$ ) e irradiância de saturação ( $E_k$ ). O valor de  $E_k$  foi obtido pela equação  $ETR_{\text{max}}/\alpha_{\text{ETR}}$  (Ralph & Gademann, 2005). A taxa de transporte de elétrons (ETR) é uma estimativa da fotossíntese bruta e é definida como:  $ETR = \Phi_{\text{PSII}} \times \text{PAR} \times (0,5) \times (\text{absortância calculada ou } 0,84)$ , onde,  $\Phi_{\text{PSII}}$  é o rendimento quântico efetivo do Fotossistema II, PAR é a radiação fotossinteticamente ativa ( $\mu\text{moles. m}^{-2} \text{s}^{-1}$  RFA), 0,5 é o coeficiente padrão para a absorção estimada de luz entre o PSI/PSII, considerando que 50% dos fótons são absorvidos pelo PSII (Figueroa *et al.*, 2003). Os fatores de absortância padrão foram calculados para gametófitos de *Pleopeltis lepidopteris*, sendo encontrados para gametófitos controle:  $Abt = 0,897582$  e gametófitos de esporos criopreservados:  $Abt = 0,897565$ . O fator absortância padrão (0,84) é utilizado quando não se calcula o valor real em experimento usando plantas (Bjorkman & Demmig 1987; Runcie & Durako 2004), pois nem toda a radiação que chega até as folhas é absorvida pelas moléculas de clorofila, já que alguns fótons podem ser transmitidos e outros refletidos.

## 2.10 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS

Gametófitos controles e criopreservados foram coletados para a extração dos pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a*, *b*, totais e carotenoides). Os pigmentos foram extraídos de três amostras de 100 mg de massa fresca em 10 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) a 40°C, durante 1 hora. As leituras de absorvância foram realizadas no espectrofotômetro modelo 100-20 (Hitachi, Co, Japão) 480nm, 649nm e 665nm. A quantificação de clorofilas e carotenoides foi realizada de acordo com as equações descrita por Wellburn (1994). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g g}^{-1}$  MF.

$$\text{Cl } a = (12,19 * A_{665}) - (3,45 * A_{649})$$

$$\text{Cl } b = (21,99 * A_{649}) - (5,32 * A_{665})$$

$$\text{Cl totais} = \text{Cl } a + \text{Cl } b$$

$$\text{Carotenoides} = (1000 * A_{480} - 2,14 * \text{Cl } a - 70,16 * \text{Cl } b) / 220$$

## 2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizadas análises descritivas (médias e desvio padrão). Para se comparar dois tratamentos foi utilizado o teste “t” de Student, sempre que os dados apresentaram normalidade. Quando não apresentaram normalidade, os dados foram transformados em raiz quadrada. Para se comparar mais de dois tratamentos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparação de médias de Tukey (5%) (Zar, 1996; Santana & Ranal, 2004). Os resultados foram analisados pelos softwares Excel e BioEstat 5.0 a 5% de probabilidade.

Para comparar RLCs quantitativamente, usando estatística paramétrica, alguns parâmetros descritivos foram utilizados: eficiência fotossintética ( $\alpha$ ), taxa fotossintética máxima ( $\text{ETR}_{\text{max}}$ ) e fotoinibição ( $\beta$ ). Esses parâmetros foram calculados pela equação de Platt (Platt *et al.* 1980) usando software Origin v. 5.0.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 GERMINAÇÃO DE ESPOROS

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a germinação de esporos de *Pleopeltis lepidopteris* recém-coletados ( $91 \pm 1,8$ ) (CT) e de esporos criopreservados ( $89,8 \pm 1,7$ ) (CE) após 16 dias de cultivo.

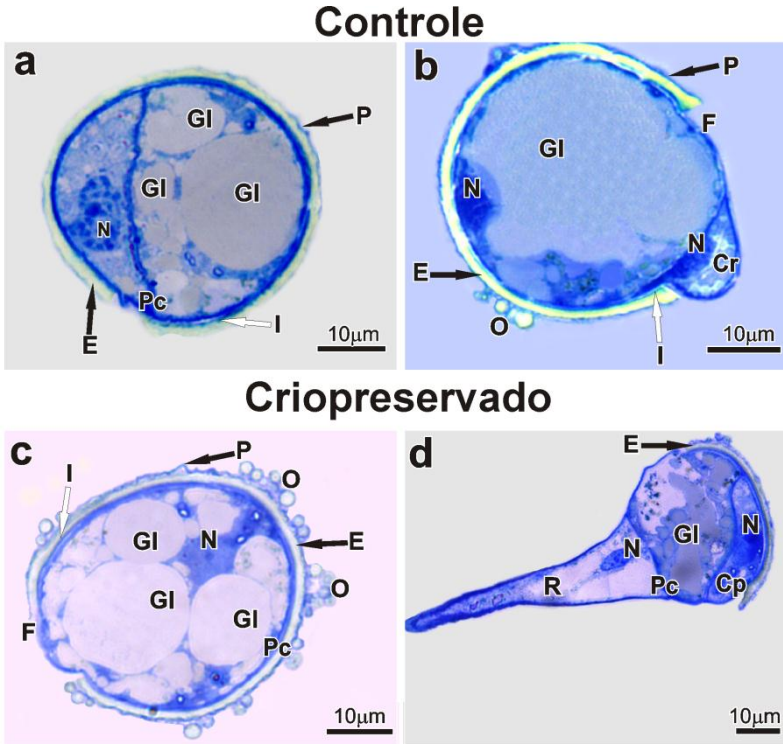
#### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DE ESPOROS E GAMETÓFITOS ATRAVÉS DA MICROSCOPIA DE LUZ (ML)

Os esporos CT e CE de *Pleopeltis lepidopteris* com quatro dias de cultivo apresentaram reação metacromática na camada mais externa da parede celular ao reagir com AT-O (Fig. 1). Os esporos apresentaram três nítidas camadas na parede celular: a intina delgada que apresentou reação metacromática forte, a exina mais espessa e que não reagiu ao AT-O e a perina que reagiu mais fracamente ao AT-O (Fig. 1b, c). Observou-se uma ornamentação esférica distribuída assimetricamente na exina (Fig.1c).

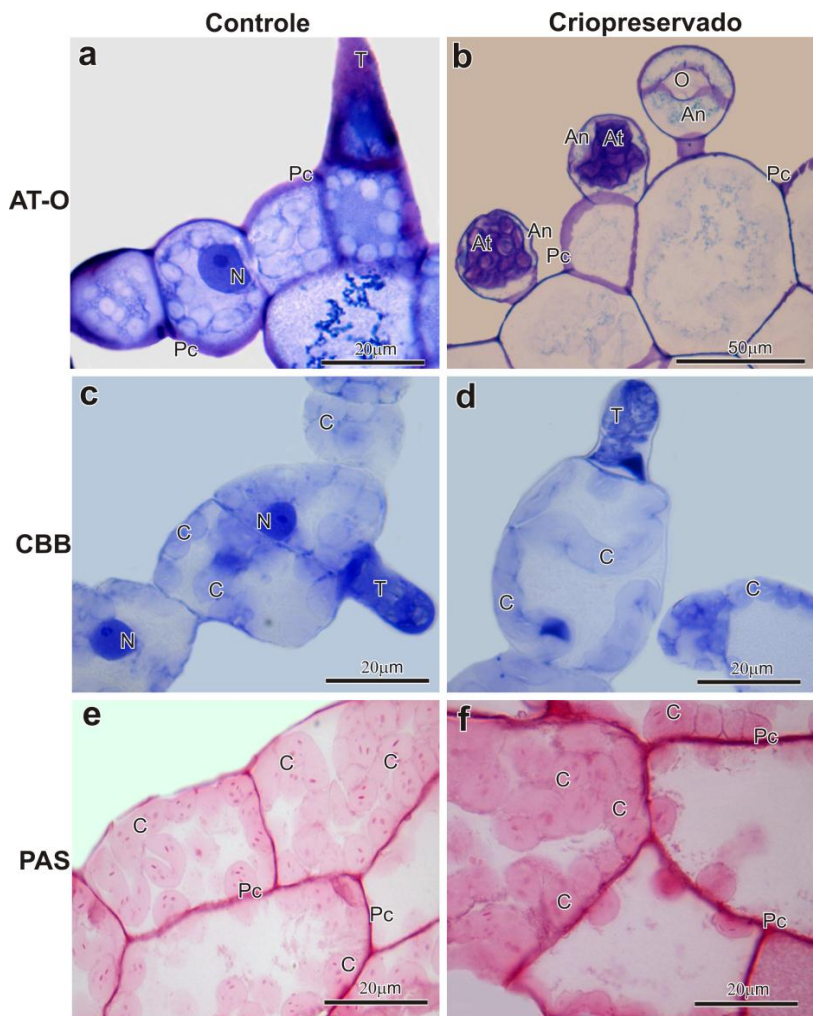
Aos quatro dias de cultivo os esporos controles apresentaram o primórdio da primeira célula rizoidal e a abertura da fissura da parede celular (Fig 1b), mas em alguns esporos criopreservados já havia um rizóide e a primeira divisão da célula protonemal (Fig. 1d). Os esporos apresentaram glóbulos de lipídeos em ambos os tratamentos (Fig. 1).

Secções de gametófitos de 150 dias provenientes de esporos CT e esporos CE apresentaram reação metacromática ao AT-O na parede celular (Fig. 2a, b), no tricoma, no núcleo (Fig. 2a) e nos anterozóides em gametófitos CE (Fig. 2b), indicando a presença de polissacáridos ácidos. Anterozóides observados em gametófitos CE indicam uma provável aceleração no desenvolvimento em relação aos gametófitos controles (CT).

As secções de gametófitos CT e CE apresentaram uma reação positiva ao CBB, indicando a presença de proteínas nos tricomas e núcleos (Fig. 2c, d). As secções exibiram uma forte reação ao PAS nas paredes celulares indicando celulose, polissacarídeos neutros no citoplasma e grãos de amido nos cloroplastos (Fig. 2e, f).



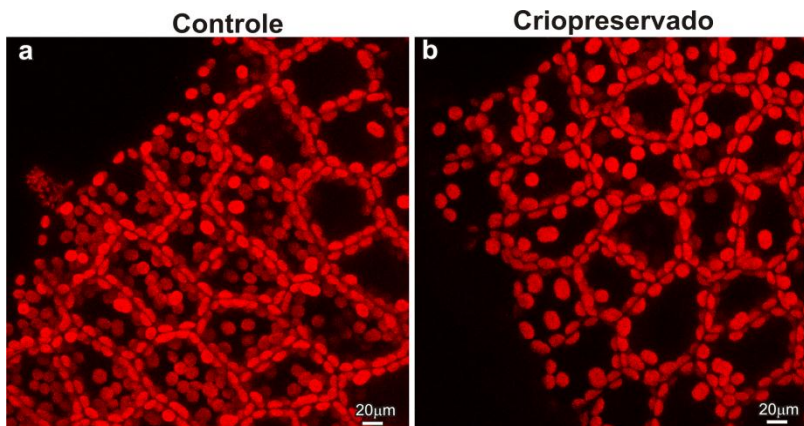
**Figura 1.** Seções transversais e longitudinais de esporos com quatro dias de cultivo de *Pleopeltis lepidopteris* em microscopia de luz. **a,b** esporos CT e **c,b** esporos CE, reação ao AT-O. **a** Esporo mostrando a primeira divisão celular. **b** Esporo mostrando início de protrusão de rizóide e a abertura da fissura da parede. **c** Esporo mostrando abertura da fissura da parede. **d** Esporo mostrando rizóide e primeira divisão celular da célula protanemal. (Cp) célula protemal, (Cr) célula rizoidal, (E) exina, (F) fissura, (GI) glóbulos de lipídeos; (I) intina, (O) ornamentação da parede celular, (P) perina, (Pc) parede celular, (N) núcleo, (R) rizóide.



**Figura 2.** Secções transversais e longitudinais de gametófitos de *Pleopeltis lepidopteris* após 150 dias de cultivo. **a, c, e** Gametófito CT. **b, d, f** Gametófito CE. **a, b** Reação ao AT-O com forte metacromasia indicando polissacarídeos ácidos na parede celular, núcleo, tricoma e anterozóides. **c, d** Reação ao CBB indicando a presença de proteínas no núcleo e tricoma. **e, f** Reação ao PAS indicando celulose na parede celular e amido nos cloroplastos. (An) anterídio, (At) anterozoide, (C) cloroplasto, (N) núcleo, (O) opérculo, (Pc) parede celular, (T) tricoma.

### 3.3 QUANTIFICAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE CLOROPLASTOS EM MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER

Os gametófitos provenientes de esporos CT e de esporos CE apresentaram intensa fluorescência dos cloroplastos discóides localizados principalmente na margem das células (Fig. 3a, b). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na intensidade da fluorescência das clorofilas em cloroplastos dos gametófitos controles ( $125.8 \pm 9.8$  pixels) e gametófitos de esporos criopreservados ( $136.3 \pm 23.3$  pixels).

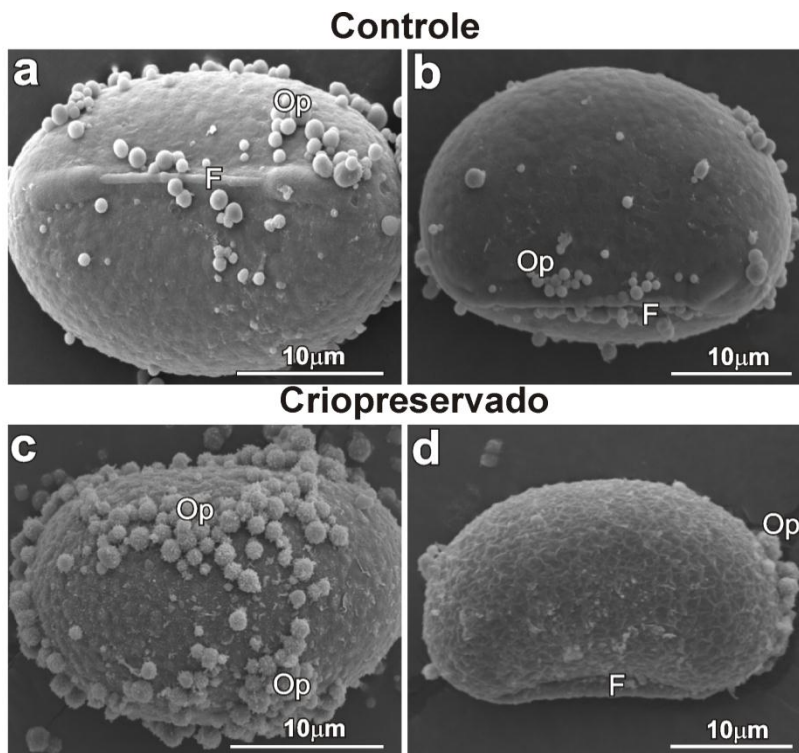


**Figura 3.** Fluorescência dos cloroplastos de gametófitos CT (a) e gametófitos CE (b) de *Pleopeltis lepidopteris*, captada por microscopia confocal de varredura a laser.

### 3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ESPOROS E GAMETÓFITOS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

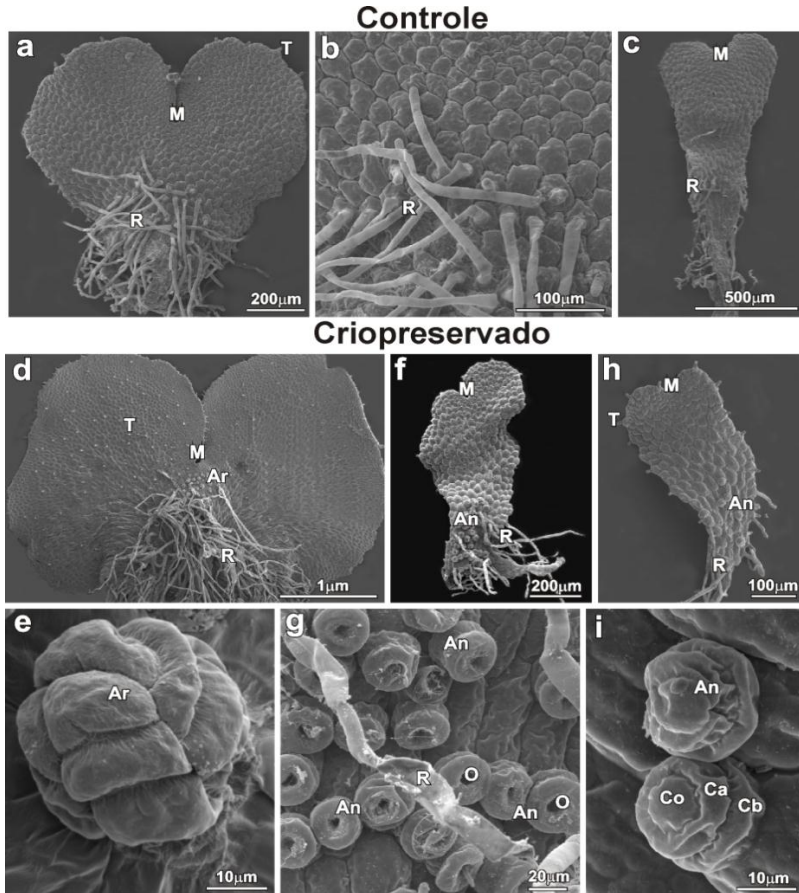
Esporos CT apresentaram ornamentações, esféricas e lisas na exina da parede celular (Fig. 4a, b), enquanto os esporos CE apresentaram ornamentações mais ásperas e pontiagudas (Fig. 4c, d).

Não foram observadas alterações nos padrões morfológicos de gametófitos provenientes de esporos CT e CE aos 150 dias de cultivo (Fig. 5).



**Figura 4.** Esporos controles e criopreservados de *Pleopeltis lepidopteris* em microscopia eletrônica de varredura. **a, b** Esporos CT apresentando parede celular exina com ornamentações esféricas lisas, distribuídas irregularmente e fissura na região equatorial. **c, d** Esporos CE apresentando parede celular exina mais áspera, ornamentações esféricas pontiaguda e fissura na região equatorial. (F) fissura, (Op) ornamentação da parede celular.

Entretanto, nos gametófitos controles não foram verificadas estruturas reprodutivas (Fig. 5a, b, c). Em contraste, os gametófitos provenientes de esporos CE, na fase espatulada-cordiforme apresentaram anterídios (Fig. 5f, h). Alguns anterídios já haviam liberado anterozoides tornando o opérculo visível (Fig. 5g) e outros permaneciam fechados, apresentando as células: basal, anular e opercular (Fig. 5i). Também foi possível verificar gametófitos cordiformes com arquegônios (Fig. 5d, e).



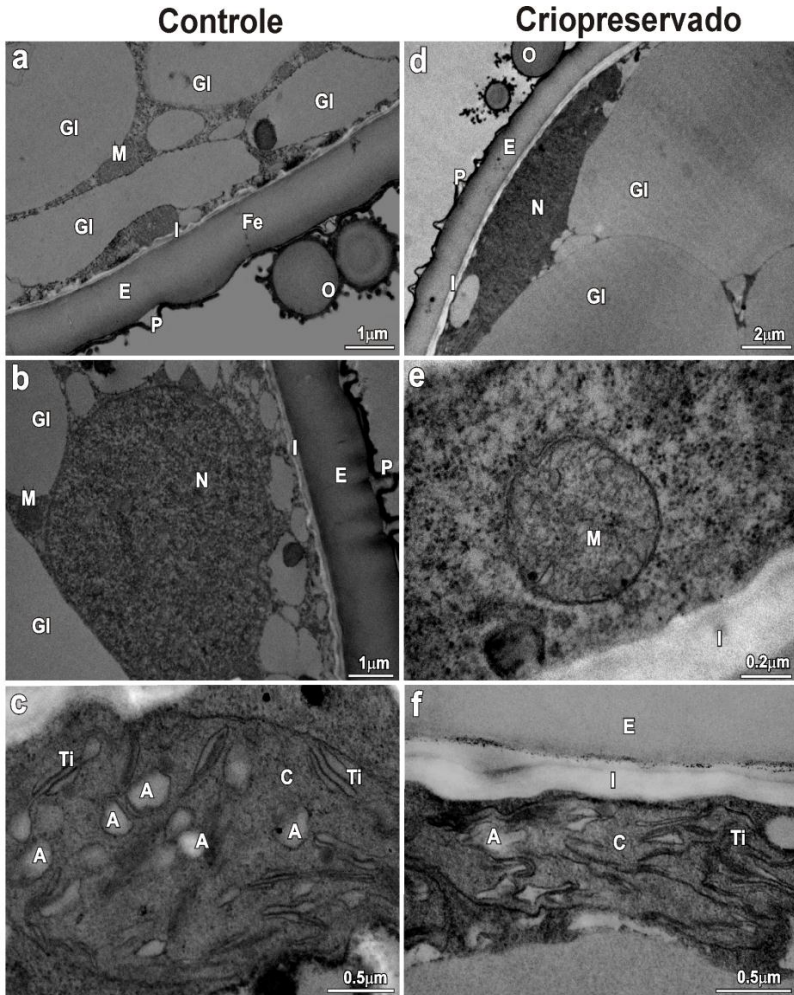
**Figura 5.** Gametófitos CT e CE de *Pleopeltis lepidopteris* com 150 dias, em microscopia eletrônica de varredura. **a,b,c** Gametófitos CT em vista abaxial, mostrando rizoides, meristema apical e tricomas na margem da lâmina. **b** Detalhe da superfície abaxial mostrando rizomas. **c** Gametófito espatulado-cordiforme, com meristema apical e rizoides. **d-i** Gametófitos CE. **d** Gametófito cordiforme com tricomas na superfície abaxial, meristema apical, vários arquegônios e muitos rizoides. **e** Detalhe de um arquegônio. **f, h** Gametófito espatulado-cordiforme em vista abaxial mostrando meristema apical e anterídios próximos aos rizoides. **g** Detalhe de vários anterídios com opérculo aberto. **i** Detalhe de anterídio fechado. (An) anterídio, (Ar) arquegônio, (Ca) célula anular, (Cb) célula basal, (Co) célula opercular, (M) meristema apical, (O) opérculo, (R) rizoide, (T) tricoma.



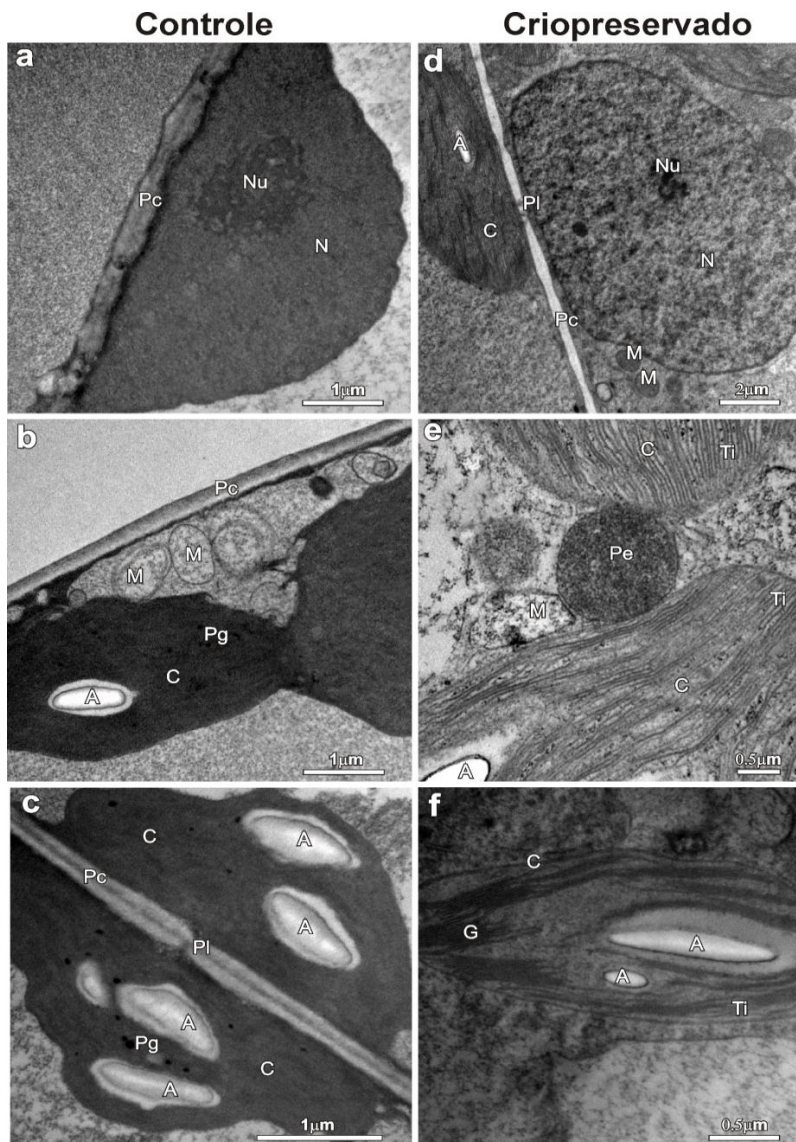
### 3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS ESPOROS E GAMETÓFITOS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Aos quatro dias de cultivo, em secções de esporos controles (Fig 6a) e esporos criopreservados (Fig 6d) observaram-se as três camadas da parede celular, perina, exina espessa e ornamentada e intina mais delgada. Também foram observados: núcleo, mitocôndrias, vários vacúolos (Fig.6b, c, e, f), cloroplasto apresentando poucos tilacóides e pequenos grânulos de amido (Fig.6c, f).

Os gametófitos com 150 dias de cultivo, oriundos de esporos CT (Fig. 7a, b, c) e esporos CE (Fig. 7d, e, f) apresentaram parede celular com presença de plasmodesmos, núcleo com nucléolo e inúmeras mitocôndrias. Os cloroplastos apresentaram grandes grânulos de amido (Fig 7b, c, e, f) e plastoglóbulos foram observados em cloroplastos de gametófitos controles (CT) (Fig. 8b, c). Foram observados tilacóides e granum bem evidenciados em cloroplastos de gametófitos provenientes de esporos CE, bem como uma organela esférica entre cloroplastos e mitocôndrias, possivelmente um peroxissomo (Fig. 8e, f).



**Figura 6.** Esporos CT e CE de *Pleopeltis lepidopteris* com quatro dias de cultivo vistos em microscopia eletrônica de transmissão. **a,b,c** Esporos CT. **d,e,f** Esporos CE. **a, d** Apresentaram em CT e CE as três camadas da parede celular, exina espessa e ornamentada, intina e perina delgada, fenda, glóbulos de lipídeos e mitocôndrias. **b** Detalhe do núcleo. **c** Detalhe de um cloroplasto com grânulos de amido e tilacóides. **e** Detalhe de mitocôndria e parede celular intina. **f** Detalhe da exina, da intina e cloroplasto. (A) grânulos de amido, (E) exina, (Fe) fenda, (Gl) glóbulos de lipídeos; (I) intina, (M) mitocôndria, (N) núcleo, (O) ornamentação da parede celular, (P) perina, (Ti) tilacóide.



**Figura 7.** Gametófitos de *Pleopeltis lepidopteris* oriundos de esporos CT e CE com 150 dias de cultivo em microscopia eletrônica de transmissão. **a, b, c** Gametófitos CT. **a** Parede celular, núcleo e nucléolo. **b** Parede celular, mitocôndrias, cloroplastos com plastoglobulos e grânulos de amido. **c** Duas células divididas pela

parede celular, plasmodesmos, cloroplastos com plastoglóbulos e grãos de amido. **d, e, f** Gametófitos CE. **d** Parede celular, plasmodesmos, mitocôndrias, núcleo com nucléolo, cloroplastos com plastoglóbulos e grânulos de amido. **e** Cloroplastos com grânulos de amido e tilacóides, mitocôndrias e peroxissomo. **f** Cloroplastos com granum, grânulos de amido e tilacóides. (A) grânulos de amido, (C) cloroplasto, (G) granum, (M) mitocôndria, (N) núcleo, (Nu) nucléolo, (Pc) parede celular, (Pe) peroxissomos, (Pg) plastoglóbulo, (Pl) plasmodesmos, (Ti) tilacóide.

### 3.6 PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os teores de clorofila *a*, *b*, clorofila total e carotenóides de gametófitos com 150 dias de cultivo, oriundos de esporos controles e criopreservados (Tab. 1).

**Tabela. 1** Teores de clorofilas e carotenoides em gametófitos CT e CE de *Pleopeltis lepidopteris* com 150 dias de cultivo.

Pigmentos	CT		CE	p
	$\mu\text{g g}^{-1}$ MF			
<b>Cl <i>a</i></b>	875,00 ± 126,00	885,00 ± 96,00		0,72
<b>Cl <i>b</i></b>	436,00 ± 77,00	432,00 ± 52,00		0,84
<b>Cl total</b>	1313,00 ± 200,00	1317,00 ± 147,00		0,94
<b>Carotenoides</b>	181,00 ± 24,00	180,00 ± 24,00		0,95

Médias seguidas por letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos pelo teste de “t” de Student ( $p < 0.05$ ). Média ± Desvio Padrão (n= 30).

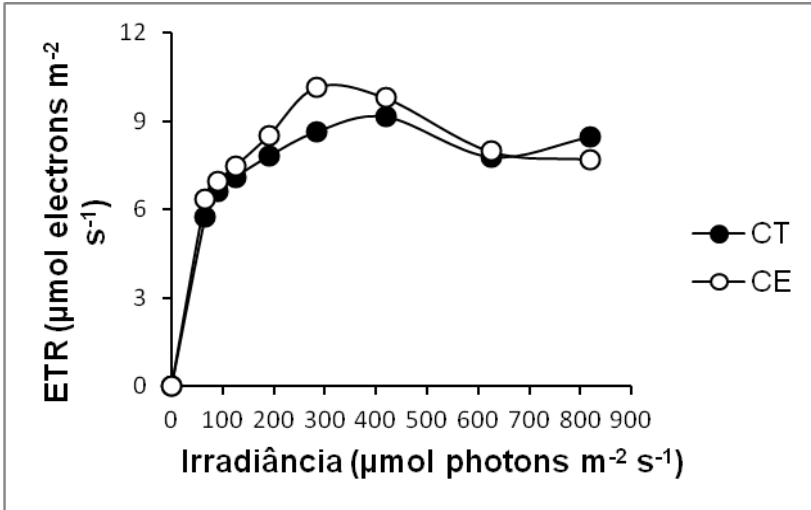
### 3.7 CURVAS RÁPIDAS DE LUZ (RLC) A PARTIR DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* DOS GAMETÓFITOS

Com exceção do parâmetro  $F_v/F_m$ , que foi maior em gametófitos de esporos criopreservados, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (Tabela 2. Fig. 9). Os resultados da dissipação fotoquímica e não-fotoquímica em ambos os tratamentos mostraram que o rendimento quântico efetivo (YII) apresentou uma rápida saturação com baixa irradiância (PAR). Os resultados de dissipação não-fotoquímica Y(NO) e Y(NPQ) em ambos os tratamentos mostraram que os gametófitos apresentaram baixa fotoproteção limitando a dissipação de energia em excesso (Fig.10).

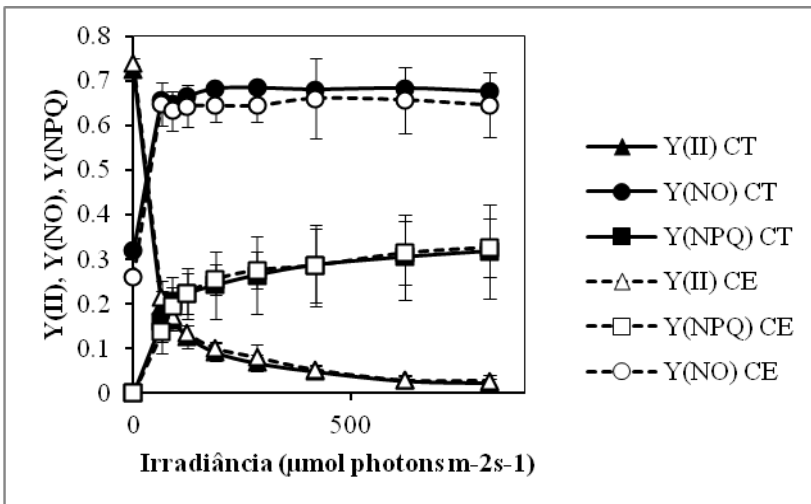
**Tabela 2.** Parâmetros fotossintéticos a partir da fluorescência da clorofila *a* de gametófitos CT e CE de *Pleopeltis lepidopteris*.

Parâmetros	CT	CE	<i>p</i>
<b>Alpha (<math>\alpha</math>)</b>	0,075 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,252
<b>ETR<sub>max</sub></b> $\mu\text{mol electrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$	10,29 ± 2,51	11,16 ± 2,22	0,377
<b><math>E_k</math></b> $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$	136,05 ± 20,88	140,93 ± 28,89	0,639
<b><math>\beta</math></b>	18,78 ± 3,05	18,65 ± 5,28	0,899
<b><math>F_v/F_m</math></b>	0,724b	0,739a	0,007
<b>n amostral/n° curvas</b>	3/12	3/12	

Médias seguidas por letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos pelo teste de “t” de Student ( $p < 0.05$ ). Média ± Desvio Padrão (n= 12).



**Figura 8.** Curvas Rápidas de Luz (RLCs) de gametófitos CT (●) e CE (○) de *Pleopeltis lepidopteris* adaptados no escuro durante 30 min.



**Figura 9.** Dissipação fotoquímica Y(II) e não-fotoquímica Y(NO) e Y(NPQ) em gametófitos CT (linha cheia) e CE (linha tracejada) de *Pleopeltis lepidopteris* em nove diferentes níveis de irradiância (E). Média  $\pm$  Desvio Padrão (n = 12).

#### 4. DISCUSSÃO

Os esporos de *Pleopeltis lepidopteris* criopreservados em nitrogênio líquido (NL) mantiveram sua viabilidade. Assim como esporos aclorofilados de outras espécies de samambaias mantiveram-se viáveis após a imersão direta em nitrogênio líquido (Agrawal *et al.*, 1993; Rogge *et al.*, 2000; Ballesteros *et al.*, 2012). Estes esporos por apresentarem baixo teor de água e considerável quantidade de reservas lipídicas se assemelham às sementes ortodoxas (Roberts, 1973; Dyer, 1979) o que permitem que sejam armazenados em nitrogênio líquido (Benson *et al.*, 1998) e os tornam ótimo material para conservação em banco de germoplasma.

Apresentaram as organelas celulares integras em ambos os tratamentos, permitindo assegurar que a técnica de criopreservação é eficaz. A presença de estruturas globulares em esporos germinando observadas em MET, ML e as imagens de material fresco observadas em ML, no primeiro capítulo mostram que dentro dessas estruturas globulares há lipídios de reserva. Resultados observados em esporos de diferentes espécies da família Polypodiaceae mostraram lipídios como principal fonte de reserva (Reyes & Pérez-García, 1994; Bhattacharyya & Sem, 1992; Pérez-García *et al.*, 1998; Ramirez & Pérez-García, 1998). Material lipídico também é encontrado como fonte de reserva na microalga verde *Chlorella vulgaris*, cujas imagens de MET mostram gotículas de vários tamanhos, de coloração cinza clara (Pribyl, *et al.*, 2013).

Diversos organismos vivos apresentam lipídios, que possuem uma região apolar e são solúveis em solventes orgânicos, mas são insolúveis em água (Murphy, 2004). De modo geral dois grandes grupos de lipídios são sintetizados nas células: lipídios polares e lipídios neutros. Enquanto lipídios polares são os componentes principais das membranas, os lipídios neutros são constituídos principalmente de triacilglicerol (TAG), esteróis, ésteres de esteróis, monoacilglicerol (MAG), e diacilglicerol (DAG), e são frequentemente armazenados em gotas de lípideo na região citosólica (Harwood e Jones, 1989; Lung *et al.*, 2006).

Corroborando com os dados da literatura, as imagens de ML e MET mostram gotas lipídicas de volumes variáveis no citosol de esporos de *Pleopeltis lepidopteri*. Esta acumulação de lipídios é uma fonte de

carbono e reserva de energia para as células (Li et al 2011; Wang et al., 2009).

Detalhes da germinação de esporos foram relatados em estudo realizados por Raghavan (2005), que mostraram a ultraestrutura de esporos e gametófitos de *Blechnum spicant* (L.) Roth (Blechnaceae), *Onoclea sensibilis* (L.) (Onocleaceae), *Polypodium vulgare* (L.) (Polypodiaceae) e *Adiantum cappilus-veneris* (L.) (Pteridaceae), sendo que a primeira divisão celular origina duas células distintas, um rizoide e uma célula protonemal, que estabelecem a polaridade gametofítica. Segundo o autor, o primeiro sinal do estabelecimento da polaridade é a migração do núcleo da célula protonemal para o polo proximal; o núcleo do rizoide fica confinado à sua base e a célula protonemal desenvolve abundância de cloroplastos, fato também observado neste trabalho.

A parede celular do esporo de *P. lepidopteris* mostrou três nítidas camadas: a intina apresentou reação metacromática forte, a exina não reagiu e a perina reagiu mais fracamente ao AT-O. De acordo com Raghavan (2005), a intina é uma fina camada sobre a membrana plasmática do esporo é tem natureza celulósica. A exina é a camada mais resistente da parede celular, formada de polímeros contendo carotenoides, conhecidos como esporopolenina. A parede pode ser ornamentada e frequentemente usada para a caracterização taxonômica das samambaias. Em poucos casos ocorre uma terceira camada, a perina ou perisporo, apresentando-se como um fino envelope de natureza polissacaríca formando uma mucilagem quando o esporo é embebido. Segundo Li *et al.* (2010), a parede celular confere uma proteção aos esporos que suportam o armazenamento em LN por longos períodos e mantém a integridade dos constituintes celulares, o que confere defesa e impede que o conteúdo intercelular seja perdido (Lloyd & Klekowski, 1970).

Viviani *et al.* (2009) analisaram a morfologia dos esporos de *Pleopeltis lepidopteris* em MEV e relataram que os esporos são monoletes e apresentam depósitos esféricos lisos, dispersos ou densamente agrupados na superfície do perisporo papilado-granulado, o que foi observado no presente estudo. No entanto os esporos criopreservados de *P. lepidopteris* apresentaram a superfície da parede celular, mais áspera e irregular do que nos esporos controles e as ornamentações esféricas são mais ásperas e pontiagudas. A criopreservação em nitrogênio líquido alterou fisicamente a parede do



esporo, simulando um tratamento de escarificação, que possivelmente facilitou a absorção de água durante a embebição do esporo.

Alguns esporos criopreservados de *P. lepidopteris* mostraram maior desenvolvimento de rizóides e também a primeira divisão celular da célula protonemal ocorreu mais cedo do que nos esporos controles. A escarificação da parede dos esporos observada pela análise em MEV pode explicar a aceleração do desenvolvimento gametofítico em esporos criopreservados de *P. lepidopteris*. Vários autores relatam que além de manter a viabilidade dos esporos, após o armazenamento criogênico, há aceleração da germinação e desenvolvimento gametofítico inicial (Rogge *et al.*, 2000; Ballesteros *et al.*, 2006; Brum & Randi, 2006; Li *et al.*, 2010; Ballesteros *et al.*, 2012).

Os gametófitos de *P. lepidopteris* analisados aos 150 dias de idade em MET em ambos os tratamentos, apresentaram as organelas celulares íntegras, indicando que a criopreservação preservou as características dos esporos, inferindo-se que sua integridade tenha sido mantida, o que é desejável em bancos de germoplasma (Pence, 2004; Pence, 2008a; Pence, 2008b). Da mesma forma, análises em MEV de gametófitos de ambos os tratamentos mostraram integridade do desenvolvimento, porém, observou-se que no tratamento CE os gametófitos estavam mais desenvolvidos e exibiram mais precocemente estruturas reprodutivas que não foram observadas em gametófitos controles (CT). Estudo realizado por Li *et al.*, (2010) relata somente que esporos criopreservados por 12 meses produziram gametófitos com desenvolvimento normal em *Alsophila spinulosa* (Hook.) Tryon e *Alsophila gigantea* Wallich ex Hook. Resultados semelhantes foram verificados por Ballesteros *et al.* (2012) para gametófitos de *Polystichum lonchitis* (L.) Roth (Dryopteridaceae) e *Ceterach officinarum* Willd. (Aspleniaceae). O mesmo autor afirma que o armazenamento de esporos em NL é o melhor método para garantir um desenvolvimento normal de gametófitos.

Não houve diferença na fluorescência dos gametófitos de *Pleopeltis lepidopteris*, de 150 dias de idade e nem nos teores de pigmentos fotossintéticos entre os tratamentos. Os teores de clorofilas encontrados no presente trabalho (CT= 875,00 Cla e 436,00 Cib  $\mu\text{g g}^{-1}$  MF) diferem dos encontrados em gametófitos crescidos a partir de esporos recém-coletados de *Acrostichum danaeifolium* (Langsd. & Fisch.) (Pteridaceae) (CT= 213,73 Cla e 138,98 Cib  $\mu\text{g g}^{-1}$  MF) (Randi

*et al.*, 2014). No entanto, os gametófitos de *A. daneifolium* tinham apenas 34 dias de cultivo quando foram analisados.

Não há relatos na literatura sobre parâmetros fotossintéticos de gametófitos de samambaias. Neste estudo, além de comparar gametófitos de *Pleopeltis lepidopteris* com 150 dias de idade, oriundos de esporos recém-coletados e esporos criopreservados, obteve-se resultados inéditos à cerca da capacidade fotossintética de gametófitos de uma samambaia da restinga. Os gametófitos controles do presente estudo apresentaram uma  $ETR_{max}$  (10,29) e um  $E_k$  (136,05), valores baixos quando comparados aos encontrados em esporófitos controles de duas samambaias epífitas:  $ETR_{max}$  (97,10) e  $E_k$  (1.653,00) para *Vittaria lineata* (L.) Smith (Pteridaceae) e  $ETR_{max}$  (75,70) e  $E_k$  (1.208,50) para *Elaphoglossum luridum* (Fée) Christ (Dryopteridaceae) (Minardi *et al.* 2014a; 2014b). Os resultados encontrados para gametófitos de *P. lepidopteris* no presente trabalho mostraram que a fotossíntese satura com baixa irradiância, estando de acordo com os encontrados por Viviani & Randi (2008) para a germinação de esporos, que foi inibida por altos níveis de radiação solar. Neste trabalho, não houve diferença nos parâmetros fotossintéticos entre os tratamentos, demonstrando que a criopreservação de esporos não interferiu nos aspectos da fotossíntese analisados para gametófitos de *P. lepidopteris*.

Por meio das análises realizadas em esporos e gametófitos de *Pleopeltis lepidopteris* pode-se indicar que a criopreservação de esporos em nitrogênio líquido é eficaz em conservar os esporos mantendo sua integridade morfológica e fisiológica em gametófitos.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Houve diferença no tempo de viabilidade de esporos de *Pleopeltis lepidopteris* em função dos métodos e períodos de armazenamento analisados. Quando armazenados em refrigeração e à temperatura ambiente houve perda considerável da viabilidade, indicando que tais métodos de armazenamento não são adequados para conservação dos esporos dessa espécie.

Os esporos de *P. lepidopteris* apresentaram as maiores porcentagem de germinação após armazenamento criogênico em nitrogênio líquido, demonstrando que essa técnica de conservação foi o método mais eficaz para a preservação da viabilidade.

Para se inferir que o método de armazenamento criogênico dos esporos é realmente eficaz não somente para a manutenção da viabilidade, mas também para o desenvolvimento gametofítico, foram realizadas análises morfofisiológicas de esporos em início de germinação e do desenvolvimento gametofítico. O presente estudo mostrou que não houve alterações morfológicas e fisiológicas entre o material controle e o material criopreservado. Análises inovadoras realizadas no presente estudo e de grande importância foram: o estudo da área de gametófitos e o surgimento de estruturas reprodutivas. As análises mostraram que a criopreservação promoveu a germinação e desenvolvimento dos gametófitos em relação ao controle.

As análises dos teores de clorofilas e carotenoides e dos parâmetros obtidos a partir das curvas rápidas de luz, não mostraram diferenças entre os gametófitos de ambos os tratamentos.

No presente estudo foram observadas alterações na parede dos esporos criopreservados, por meio da análise em MEV. Sugere-se que a criopreservação atuou como uma escarificação, uma vez que acelerou a germinação e desenvolvimento gametofítico.

A combinação dos estudos morfofisiológicos de esporos e gametófitos de *P. lepidopteris*, indicou que a criopreservação em nitrogênio líquido é um método eficaz para a conservação dos esporos em bancos de germoplasma.

## 6. REFERÊNCIAS

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

Aragon, C.F. & Pangua, E. 2004. Spore viability under different storage conditions in four rupicolous *Asplenium* (L.) taxa. **American Fern Journal** **94**: 28-38.

Araújo, D.S.D. & Henriques, R.P.B. 1984. Análise florística das restingas do Estado do Rio de Janeiro. In: Lacerda, LD. de *et al.* (orgs.). **Restingas: Origem, Estrutura e Processos**. Niterói, CEUFF. p.159-194.

Ashcroft, C.J. & Sheffield, E. 2000. The effect of spore density on germination and development in *Pteridium*, monitored using a novel culture technique. **American Fern Journal** **90**: 91-99.

Atkinson, L.R. & Stokey, A.G. 1964. Comparative morphology of the gametophyte of homosporous ferns. **Phytomorphology** **14**: 51-70.

Atkinson, L.R. & Stokey, A.G. 1970. Gametophyte of *Polypodium chnoodes*. **Phytomorphology** **20**: 363-367.

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

Ballesteros, D. & Walters, C. 2007b. Water properties in fern spores: sorption characteristics relating to water affinity, glassy states, and storage stability. **Journal of Experimental Botany** **58**: 1185-1196.

Ballesteros, D. 2008. Conservacion *ex situ* de esporas de pteridofitos. In: Bacchetta G, Bueno Sanchez A, Fenu G, Jimenez-Alfaro B, Mattana E, Piotto B, Virevaire M (eds) **Conservacion ex situ de plantas silvestres**. Principado de Asturias. La Caixa, Oviedo, pp 221-224.

Ballesteros, D. 2010. Conservation of Fern Spore. In: A. Kumar, H. Fernández and A. Rivilla-Bahilo (Eds.), **Working with Ferns**. Issues and Applications, Springer, New York, New York, USA. pp.165-172.

- Ballesteros, D.; Estrelles, E. & Ibars, A.M. 2006. Responses of pteridophyte spores to ultrafreezing temperatures for long-term conservation in germplasm banks. **Fern Gazette** **17**: 293-302.
- Ballesteros, D.; Estrelles, E.; Walters, C. & Ibars, A.M. 2011. Effect of storage temperature on green spore longevity for the ferns *Equisetum ramosissimum* and *Osmunda regalis*. **CryoLetters** **32**: 89-98.
- Ballesteros, D.; Estrelles, E.; Walters, C. & Ibars, AM. 2012. Effects of temperature and desiccation on *ex situ* conservation of nongreen fern spores. **American Journal of Botany** **99**: (4) 721-729.
- Banks, J.A. 1999. Gametophyte development in ferns. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** **50**: 163-186.
- Barnicoat, H.; Cripps, R.; Kendon, J. & Sarasan, V. 2011. Conservation in vitro of rare and threatened ferns case studies of biodiversity hotspot and island species. **In Vitro Cellular and Developmental Biology** **47**: 37-45.
- Begnini, R.M. & Randi, A.M. 2009. Viabilidade de esporos de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Cyatheales, Dicksoniaceae) e *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Polypodiales, Dryopteridaceae) armazenados sob-refrigeração. **Insula** **38**: 15-27.
- Benson, E.E.; Lynch, P.T. & Stacey, G.N. 1998. Advances in plant cryopreservation technology: current applications in crop plant biotechnology. **Agricultural Biotechnological News Information** **10**: 133-141.
- Beri, A. & Bir, S.S. 1993. Germination of stored spores of *Pteris vittata* L. **American Fern Journal** **83**: 73-8.
- Bhattacharyya, A.K. & Sen, T. 1992. Structure and ontogenia of gametophytes of *Lepisorus* (J.Sm.) Ching and *Pleopeltis* Willdenow. **Indian Fern Journal** **9**: 66-75.
- Bilger, W.; Schreiber, U. & Bock, M. 1995. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia**. **102** (4): 425-432.

Björkman, O. & Demmig, B. 1987. Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plant species of diverse origins. **Planta**. 170,489–504.

Bonomo, M.C.; Martínez, O.G.; Tanco, M.E.; Cardozo, R. & Avilés, Z. 2013. Spores germination and gametophytes of *Alsophila odonelliana* (Cyatheaceae) in different sterile media. **International Journal of Experimental Botany** 82: 119-126.

Bouzon, Z.L. 2006. Histoquímica e ultra-estrutura da ontogênese dos tetrasporângios de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Rhodophyta, Gigartinales). **Revista Brasileira de Botânica** 29: 229-238.

Bresolin, A. 1979. Flora da restinga da Ilha de Santa Catarina. **Insula** 10: 1-54.

Brum, F.M.R. & Randi, A.M. 2006. Germination of spores and growth of gametophytes and sporophytes of *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Dryopteridaceae) after spore cryogenic storage. **Revista Brasileira de Botânica** 29: 489-495.

Camloh, M. & Gogala, N. 1992. In vitro culture of *Platyserium bifurcatum* gametophytes. **Scientia Horticulturae** 51:343-346.

Camloh, M. 1993. Spore germination and early gametophyte development of *Platyserium bifurcatum*. **American Fern Journal** 83: 79-85.

Camloh, M. 1999. Spore age and sterilization affects germination and early gametophyte development of *Platyserium bifurcatum*. **American Fern Journal** 89: 124-132.

Caruso, M.M.L. 1990. **O desmatamento da Ilha de Santa Catarina de 1500 aos dias atuais**. 2ª Ed. Editora da UFSC, Florianópolis, 160p.

CONAMA. 1999. **Conselho Nacional do Meio Ambiente**. Resolução 261, que trata dos estágios sucessionais de vegetação de restinga para o estado de Santa Catarina. 12p.

Constantino, S.; Santamaria, L.M. & Hodson, E. 2000. Storage and *in vitro* germination of tree fern spores. **Botany Garden Micropropagation 24**: 58–60.

Duarte, C.C. 2003. Detecção óptica da eficiência quântica da fotossíntese. 109 p. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Pernambuco.

Dyer, A.F. & Lindsay, S. 1996. Soil spore banks, a new resource for conservation. In J. M. Camus, M. Gibby & R. J. Johns, (eds). **Pteridology in Perspective**, pp: 153-160.

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

Esteves, L.M.; & Dyer, A.F. 2003. The vertical distributions of live and dead fern spores in the soil of a semi-natural woodland in Southeast Scotland and their implications for spore movement in the formation of soil spore banks. In: Chandra, S. & Srivastava, M. (Org.). **Pteridology in the New Millennium**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 261-282.

Figuroa, F.; Nygard, C.; Ekelund, N. & Gómez, I. 2003. Photobiological characteristics and photosynthetic UV responses in two *Ulva* species (Chlorophyta) from southern Spain. **Journal Photochem Photobiol 72**: 35-44.

Filippini, E.C.P.; Duz, S.R. & Randi, A.M. 1999. Light and storage on the germination of spores of *Dicksonia sellowiana*. **Revista Brasileira de Botânica 22**: 1, 21-26.

Forzza, R.C. *et al.* 2010. Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil. Rio de Janeiro: **Instituição de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. v.1.

Gahan, P.B. 1984. Plant histochemistry and cytochemistry: An introduction. **Academic, London**.

Gazda, V.; Gomes-Carneiro, M.R.; Barbi, N.S.; Paumgarten, F.J.R. 2006. Toxicological evaluation of an ethanolic extract from *Chiococca alba* roots. **Journal of Ethnopharmacology 105**:187-195.

Genty, B.; Briantais, J.M. & Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**. **990**: 87-92.

Gloag, R.S.; Ritchie, R.J.; Chen, M.; Larkum, A.W.D. & Quinnell, R.G. 2007. Chromatic photoacclimation, photosynthetic electron transport and oxygen evolution in the chlorophyll d-containing oxyphotobacterium *Acaryochloris marina*. **Biochimica et Biophysica Acta**. **1767**: (2) 127-35.

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

Hamilton, R. & Chaffin, C. 1998. The effect of surface sterilization on cultures of *Ceratopteris richardii* gametophytes. **American Fern Journal** **88**: 81-85.

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

Harwood, J.L. & Jones, A.L. 1989. Lipid metabolism in algae. **Advances Botanical Research**, 16:1-53. in

Hirano, T.; Godo, T.; Mii, M. & Ishikawa, K. 2005. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. **Plant Cell Reports**. 23, 534–539. doi:10.1007/s00299-004-0893-9.

Holt, N.E.; Fleming, G.R. & Niyogi, N.K. 2004. Toward an understanding of the mechanism of non-photochemical quenching in green plants. **Biochemistry** **43**: 8281-8289.

Hor, Y. L.; Kim, Y.J.; Ugap, A.; Chabrilange, N.; Sinniah, U.R.; Engelmann, F. & Dussert, S. 2005. Optimal hydration status for cryopreservation of intermediate oily seeds: Citrus as a case study. **Annals of Botany**. **95**: 1153-1161. doi:10.1093/aob/mci126.

Ibars, A.M. & Estrelles, E. 2012. Recent developments in *ex situ* and *in situ* Conservation of ferns. **Fern Gazette** **19**: (3)67-86.



- Kartha, K.K. 1985. Meristem culture and germplasm preservation. In: Kartha, K.K. (Ed.) **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton, Florida, CRC Press, pp.115-134.
- Kholina, A.B. & Voronkova, N.M. 2008. Conservation the gene pool of Far Eastern plants by means of seed cryopreservation. **Biological Bulletin 35**: 262-269. doi:10.1134/S1062359008030060.
- Krause, G.H. & Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology 42**: 313-349.
- Labiak, P.H. & Hirai, R.Y. 2014. Polypodiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB111504>>. Acesso em: 29 Mai. 2014.
- Labiak, P.H. & Prado, J. 1998. Pteridófitas epífitas da Reserva Volta Velha, Itapoá, Santa Catarina, Brasil. **Boletim do Instituto de Botânica 11**: 1-79.
- Lacerda, L.D.; Araújo, D.S.D. & Maciel, N.C. 1982. Restingas Brasileiras: uma bibliografia. Rio de Janeiro, **Fundação José Bonifácio**. p 55.
- Lacerda, L.D.; Araújo, D.S.D. & Maciel, N.C. 1993. Dry coastal ecosystems of the tropical Brazilian coast. In: Mararel, E. Van der (Ed.), **Dry Coastal-ecosystems: Africa, Asia, Oceania**. Elsevier, Amsterdam, pp. 477-493.
- Li, B.L.; Shang, X.Q. & Liu, Y. 2008. Viability of *Paeonia lactiflora* pollen after four years of cryopreservation. **Jounal Beijing For University. 30**: (6)145-147.
- Li, Y.; Han, D.; Sommerfeld, M. & Hu, Q. 2011. Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. **Bioresour Technol 102**:123-129.
- Li, Y.; Zhang, Y.L.; Jiang, C.D.; Wang, T.; Wang, Q. & Shi, L. 2010. Effect of storage temperature on spore viability and early gametophyte

development of three vulnerable species of *Alsophila* (Cyatheaceae). **Austrian Journal Botany** **58**: 89-96.

Lloyd, R.M.; Klekowski, E.J.Jr. 1970. Spore germination and viability in pteridophyta: evolutionary significance of chlorophyllous spores. **Biotropica** **2**:129-137.

Lora, J.; Oteyza, M.A.P.; Fuentetaja, P. & Hormaza, J.I. 2006. Low temperature storage and in vitro germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) pollen, **Science Horticulturae** **108**: 91-94.

Lung, Shiu-Cheung, & Randall J.W. 2006. "Diacylglycerol acyltransferase: a key mediator of plant triacylglycerol synthesis." **Lipids**, **41**:1073-1088.

Lynch, P.T. & Benson, E.E. 1991. Cryopreservation, a method for maintaining the plant regeneration capability of rice cells suspension cultures. **In Proceedings of the Second International Rice Genetics Meeting**. IRRI, Los Banos, p.321-332.

Makgomol, K. & Sheffield, E. 2001. Gametophyte morphology and ultrastructure of the extremely deep shade fern, *Trichomanes speciosum*. **New Phytologist** **151**: 243-225.

Marengo, R.A. & Lopes, N.F. 2005. Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral. **Viçosa - MG, Editora UFV**. 451 p.

Marin, M.L. & Duran-Vila, N. 1988. Survival of somatic embryos and recovery of plants of sweet orange *Citrus sinensis* L. Osb. after immersion in liquid nitrogen. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** **14**: 51-57.

Maxwell, K. & Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. **Journal of experimental botany** **345**: 659-668.

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

- Minardi, B.D.; Voytena, A.P.L.; Santos, M. & Randi, Á.M. 2014b. The Epiphytic Fern *Elaphoglossum luridum* (Fée) Christ.(Dryopteridaceae) from Central and South America: Morphological and Physiological Responses to Water Stress. **The Scientific World Journal**.
- Mohr, H. 1956. Die Abhängigkeit des Protonemapolarität bei Farnen von Licht. **Planta**. 47:127-158.
- Moran, R.C. 2008. Diversity, biogeography and floristics. *In*: T. A. Ranker & C. H. Haufler (eds). *Biology and evolution of ferns and lycophytes*. **Cambridge University Press**. 201-221.
- Morellato, L.P.C. & Haddad, C.F.B. 2000. The Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica** 32: 786-792.
- Murphy, D. 2004. **Plant lipids: Biology, utilisation and manipulation**. Oxford, UK: Blackwell.
- Nayar, B.K. & Kaur, S. 1968. Spore germination in homosporous ferns. **J. Palynol.** 4: 1-14.
- Nayar, B.K. & Kaur, S. 1969. Types of protalial development in homosporous ferns. **Phytomorphology** 19: 179-188.
- Nayar, B.K. & Kaur, S. 1971. Gametophytes of homosporous ferns. **Botany of Review** 37: 367-372.
- Nayar, B.K. 1962. Morphology of spores and prothalli of some species of Polypodiaceae. **Botany Gazeta** 123: 223-232.
- Niwata, E. 1995. Cryopreservation of meristems of garlic *Allium sativum* (L.) and high subsequent regeneration. **CryoLetters** 16: 102-107.
- Page, C.N.; Dyer, A.F.; Lindsay, S. & Mann, D.G. 1992. Conservation of pteridophytes — The *ex situ* approach. *In* J. M. Ide, A. C. Jermy, and A. M. Paul [eds.], **Fern horticulture: Past, present and future perspectives**, 268-278. Intercept, Andover, UK.
- Pandolfo, C.; Braga, H.J.; Silva Júnior, V.P.; Massignan, A.M.;Pereira, E.S.; Thomé, V.M.R; Valci, F.V. **Atlas climatológico do Estado de Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 2002. CD-ROM.

Panis, B.; Withers, L.A. & De Langhe, E. 1990. Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants. **CryoLetters** **11**: 337-350.

Pence, V.C. 2008a. Cryopreservation of bryophytes and ferns. In B.M. Reed (ed.), **Plant cryopreservation: A practical guide**, 117-140. Springer, New York, New York, USA.

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

Pence, V.C. 2004. *Ex situ* conservation methods for bryophytes and pteridophytes. In: Guerrant EO, Havens K, Maunder M (eds) **Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild**. Island Press, Washington, pp 206–227.

Pence, V.C. 2008b. *Ex situ* conservation of ferns and lycophytes — Approaches and techniques. In T. A. Ranker and C. H. Haufl er (eds.). **Biology and evolution of ferns and lycophytes**. Cambridge University Press, 284-300.

Pérez-García, B.; Riba, R.; Mendoza, A. & Reyes, I.J. 1998. Compared gametophytic development of three species of *Phlebodium* (Polypodiaceae, s.str.). **Revista de Biología Tropical** **46**: 1059-1067.

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

Prado, J. & Sylvestre, L. 2014. Pteridófitas. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000007>.

Přibyl, P.; Cepák, V. & Zachleder, V. 2013. Production of lipids and formation and mobilization of lipid bodies in *Chlorella vulgaris*. **Journal of Applied Phycology**, **25**: 2, 545-553.

Pryer, K.M.; Schneider, H.; Smith, A.R.; Cranfill, R.; Wolf, P.G.; Hunt, J.S. & Sipes, S.D. 2001. Horsetails and ferns are a monophyletic group and the closest living relatives to seed plants. **Nature** **409**: 618-622.

- Pryer, K.M.; Schuettpelz, E.; Wolf, P.G.; Scheneider, H.; Smith, A.R. & Cranfill, R.B. 2004. Phylogeny and evolution of ferns (monilophytes) with a focus on the early leptosporangiate divergences. **American Journal of Botany** **91**: (10) 1582-1598.
- Quintanilla, L.G.; Amigo, J.; Pangua, E. & Pajarón, S. 2002. Effect of storage method on spore viability in five threatened fern species. **Annals of Botany** **90**: 461-467.
- Radhamani, J. & Chandel, K.P.S. 1992. Cryopreservation of embryonic axes of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). **Plant Cell Reports** **11**: 204-206.
- Raghavan, V. 2005. Developmental biology of fern gametophytes (Vol. 20). Cambridge University Press.
- Ralph, P.J. & Gademann, R. 2005. Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity. **Aquatic Botany** **82**: 222-237.
- Ramírez, M.D.R. & Pérez-García, B. 1998. Fase gametofítica del helecho *Microgramma nitida* (Polypodiaceae). **Revista de biología tropical** **46**: 587-593.
- Ranal, M.A. 1993. Desenvolvimento de *Polypodium hirsutissimum* Raddi (Pteridophyta, Polypodiaceae) em condições naturais. **Acta Botanica Brasilica** **7**: 3-15.
- Randi, A.M. 1996. Photosensitivity, viability and storage reserves in spores of *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch. (Pteridaceae). **Revista Brasileira de Botânica** **19**: (1) 1058.
- Randi, A.M.; Freitas, M.C.A.; Rodrigues, A.C.; Maraschin, M. & Torres, M.A. 2014. Acclimation and photoprotection of young gametophytes of *Acrostichum danaeifolium* to UV-B stress. **Photosynthetica** **52**: 50-56.
- Renner, G.D.R. & Randi, A.M. 2004. Effects of sucrose and irradiance on germination and early gametophyte growth of the endangered tree fern *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae). **Acta Botanica Brasilica** **18**: 375-380.

Reyes, J.I. & Pérez-García, B. 1994. Morfología y estrategias reproductivas del gametofito de *Polypodium lepidotrichum* (Fée) Maxon (Polypodiaceae). **Acta Botanica Mexico** **28**: 71-78.

Reyes, J.R.; Pérez-García, B. & Mendoza, A. 2003. Morfogénesis de los gametofitos de especies mexicanas de *Pleopeltis* (Polypodiaceae, subfamilia Pleopeltoideae). **Revista de Biología Tropical** **51**: 321-332.

Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**. 17 (1): 208-212.

Ritchie, R.J. 2006. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. **Photosynthesis Research** **89**: 27-41.

Ritchie, R.J. 2008. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol or ethanol solvents. **Photosynthetica**, **46**: 115–126.

Rizzini, C.T. 1992. Tratado de fitogeografía do Brasil: aspectos ecológicos e florísticos. São Paulo, **Âmbito Cultural Edições**.

Roberts, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science Technology** **1**: 499–514.

Rocha, C.F.D.; Bergallo, H.G.; Alves, M.A.S. & Van Sluys, M. 2003. A biodiversidade nos grandes remanescentes florestais do Estado do Rio de Janeiro e nas restingas da Mata Atlântica. **São Carlos, Editora RiMa**.

Rocha, C.F.D.; Nunes-Freitas, A.F.; Rocha-Pessôa, T.C. & Cogliatti-Carvalho, L. 2004. Habitat disturbance in Brazilian Coastal sand dune vegetation and present richness and diversity of bromeliad species. **Vidalia** **2**: 50-56.

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

Runcie, J.W. & Durako, M.J. 2004. Among-shoot variability and leaf specific absorptance characteristics affect diel estimates of *in situ* electron transport of *Posidonia australis*. **Aquatic Botany** **80**:209–220.

Sakai, A. 1995. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry. vol 32. Cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, pp 53-69.

Santana, D.G. & Ranal, M.A. 2004. Análise da germinação: um enfoque estatístico. **Edição UnB**. p.248.

Santos, E.P.G.; Lehmann, D.R.M.; Santos, M. & Randi, Á.M. 2010. Spore germination of *Gleichenella pectinata* (Willd.) Ching (Polypodiopsida-Gleicheniaceae) at different temperatures, levels of light and pH. **Brazilian Archives of Biology and Technology** **53**: 1309-1318.

Schmidt, E.C.; Scariot, L.A.; Rover, T. & Bouzon, Z.L. 2009. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. **Micron** **40**: 860-869.

Schreiber, U.; Endo, T.; Mi, H-L. & Asada, K. 1995. Quenching analysis of chlorophyll fluorescence by the saturation pulse method: particular aspects relating to the study of eukaryotic algae and cyanobacteria. **Plant Cell Physiology** **36**: 873-882.

Sehnem, A.S.J. 1967a. Maratiáceas. Flora Ilustrada Catarinense. **Itajaí, HBR.**

Sehnem, A.S.J. 1967b. Osmundáceas. Flora Ilustrada Catarinense. **Itajaí, HBR.**

Sehnem, A.S.J. 1967c. Plaglogiriáceas. Flora Ilustrada Catarinense. **Itajaí, HBR.**

Sehnem, A.S.J. 1968a. Apleniáceas. Flora Ilustrada Catarinense. **Itajaí, HBR.**

Sehnem, A.S.J. 1968b. Blecnáceas. Flora Ilustrada Catarinense. **Itajaí, HBR.**

Sehnm, A.S.J. 1970a. Glequeniáceas. Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí, HBR.

Sehnm, A.S.J. 1970b. Polipodiáceas. Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí, HBR.

Sehnm, A.S.J. 1971. Himenofiláceas. Flora Ilustrada Catarinense. **Itajaí, HBR.**

Sehnm, A.S.J. 1972. Pteridáceas. Flora Ilustrada Catarinense. **Itajaí, HBR.**

Sehnm, A.S.J. 1974. Esquizeáceas. Flora Ilustrada Catarinense. **Itajaí, HBR.**

Sehnm, A.S.J. 1978. Ciateáceas. Flora Ilustrada Catarinense. **Itajaí, HBR.**

Sehnm, A.S.J. 1979a. Aspidiáceas. Flora Ilustrada Catarinense. **Itajaí, HBR.**

Sehnm, A.S.J. 1979b. Davaliáceas. Flora Ilustrada Catarinense. **Itajaí, HBR.**

Sehnm, A.S.J. 1979c. Marsiliáceas. Flora Ilustrada Catarinense. **Itajaí, HBR.**

Sehnm, A.S.J. 1979d. Ofioglossáceas. Flora Ilustrada Catarinense. **Itajaí, HBR.**

Sehnm, A.S.J. 1979e. Parkeriáceas. Flora Ilustrada Catarinense. **Itajaí, HBR.**

Sehnm, A.S.J. 1979f. Psilotáceas. Flora Ilustrada Catarinense. **Itajaí, HBR.**

Sehnm, A.S.J. 1979g. Salviniáceas. Flora Ilustrada Catarinense. **Itajaí, HBR.**

Sehnm, A.S.J. 1984. Equisetáceas. Flora Ilustrada Catarinense. **Itajaí, HBR.**



- Sheffield, E.; Douglas, G.E.; Hearne, S.J.; Huxham, S. & Wynn, J.M. 2001. Enhancement of fern spore germination and gametophyte growth in artificial media. **American Fern Journal** **91**:179-186.
- Simabukuro, E.A.; Dyer, A.F. & Felipe, G.M. 1998. The effect of sterilization and storage conditions on the viability of the spores of *Cyathea delgadii*. **American Fern Journal** **88**: 2, 72-80.
- Smith, A.R. & Tejero-Díez, J.D. 2014. *Pleopeltis* (Polypodiaceae) una redefinición genérica y novedades nomenclaturales. **Botanical Sciences** **92**: (1), 43-58.
- Smith, A.R.; Pryer, K.M.; Schuettpelz, E.; Korall, P.; Schneider, H. & Wolf, P.G. 2008. Fern classification. In: Ranker, T.A. & Haulfer, C.H. (eds.) **Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes**. Cambridge University Press, Cambridge, p. 417-461.
- Smith, D.L. & Robinson, P.M. 1975. The effects of spore age on germination and gametophyte development in *Polypodium vulgare* L. **New Phytol** **74**: 101-108.
- Smith, D.L.; Pryer, K.M.; Schettpelz, E.; Korall, P.; Schneider, H. & Wolf, P.G. 2006. A classification for extant ferns. **Taxon** **55**: 705-731.
- Sota, E.R. 1965. Las especies escamosas del género *Polypodium* L. (S.Str.) en Brasil. **Revista del Museo de La Plata: Botanica**. **42**: 243-271.
- Spurr, A.R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructure Research** **26**: 31.
- Stokey, A.G. 1959. *Polypodium pectinatum* and *P. plumula* - Polypodiaceae or Grammitidiaceae. **American Fern Journal** **49**: 142-146.
- Stushnoff, C. 1987. Cryopreservation of apple genetic resources. **Canadian Journal of Plant Science** **67**: 1151-1154.
- Suguio, K. & Tessler, M.G. 1984. Planícies de cordões litorâneos Quaternários do Brasil: origem e nomenclatura. In: Lacerda, L.D.; Araujo, D.S.D.; Cerqueira, R. & Turc, B. (orgs.). **Restingas: origem, estrutura e processos**. CEUFF, Niterói. Pp. 15-25.

Taiz, L. & Zeiger, E. 2010. **Plant Physiology**. 5.ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 782 p.

Tandon, R.; Chaudhury, R. & Shivanna, K.R. 2007. Cryopreservation of oil palm pollen. **Journal Current Science** **92**: 182-183.

Tryon, R.M. 1972. Endemic areas and geographic speciation in tropical American ferns. **Biotropica** **4**: 121-131.  
<http://dx.doi.org/10.2307/2989774>

Tryon, R.M., & Tryon, A.F. 1982. Ferns and allied plants with special reference to tropical America. **Springer-Verlag**, 715-722.

Van Kooten, O. & Snel, J.F.H. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research** **25**: (3) 147-150.

Vargas, I.B.D. & Droste, A. 2014. Propagación in vitro de *Cyathea atrovirens* (Cyatheaceae): almacenamiento de esporas y condiciones de esterilización. **Revista de Biología Tropical** **62**: 359-368.

Vázquez -Pérez, N.; Mendoza-Ruiz, A. & Pérez-García, B. 2012. Morfogénesis de la fase sexual de siete taxa epífitas de *Polypodium* (Polypodiaceae) de México. **Acta Botanica Mexicana** **98**: 5-21.

Veloso, H.P.; Rangel Fo, A.L.R. & Lima, J.C.A. 1991. Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. Rio de Janeiro. **IBGE - DERMA**. 124 p.

Viviani, D. & Randi, Á.M. 2008. Effects of pH, temperature and light on spore germination and growth analysis of Young sporophytes of *Polypodium lepdopteris* (Pteridophyta, Polypodiaceae). **Rodriguésia** **59**: 751-760.

Viviani, D.; Santos, M.; Randi, Á.M. 2009. Desenvolvimento inicial de *Pleopeltis lepdopteris* (Polypodiaceae, Polypodiopsidia). **Rodriguésia** **60**: 735-746.

Wang, Z.T.; Ullrich, N.; Joo, S.; Waffenschmidt, S. & Goodenough, U. 2009. Algal lipid bodies: Stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starch-less *Chlamydomonas reinhardtii*. **Eukaryot Cell** **8**:1856–1868.

- Wellburn, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal Plant Physiology** **144**: 307–313.
- White, A. & Critchley, C. 1999. Rapid light curves: A new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. **Photosynthesis Research** **59**: 63–72.
- Wilson, A.T.; Vickers, M. & Mann, L.R.B. 1979. “Metabolism in dry pollen –anovel technique for studing anhidrobiosis”. Dry polle, **Naturwissenschaften** **66**. pp.534.
- Windham, M.D.; Wolf, P.G. & Ranker, T.A. 1986. Factors affecting prolonged spore viability in herbaceous collections of three species of *Pellaea*. **American Fern Journal** **76**:141–148.
- Windisch, P.G. 1992. Pteridófitas da região Norte-ocidental do Estado de São Paulo (Guia para estudo e excursões). 2ª ed. **UNESP, São José do Rio Preto**.
- Windisch, P.G. 1996. Towards assaying biodiversity in Brazilian Pteridophytes. In: Bicudo, C. E. M. & Menezes, N. A. (eds.). **Biodiversity in Brazil – a first approach**. CNPq, São Paulo. P. 109-117.
- Xu, Y.; Liu, Y.; & Shi, L. 2006. Cryopreservation of spores of *Alsophila gigantea* var. *gigantea* Wall. ex Hook. **Plant Physiol Commun.** 42:55–57.
- Yongjie, W.; Engelmann, F.; Frattarelli, A.; Damiano, C. & Withers, L.A. 1997. Cryopreservation of strawberry cell suspension cultures. **CryoLetters**, 18: 317-324.
- Zar, J.H. 1996. **Biostatistical Analysis**, 3 ed., Upper SaddJe River, Prentice Hall.