

VIABILIDADE DE ESPOROS DE *Dicksonia sellowiana* HOOK. (CYATHEALES, DICKSONIACEAE) E *Rumohra adiantiformis* (FORST.) CHING (POLYPODIALES, DRYOPTERIDACEAE) ARMazenados SOB REFRIGERAÇÃO

VIABILITY OF SPORES OF *Dicksonia sellowiana* HOOK. (CYATHEALES, DICKSONIACEAE) AND *Rumohra adiantiformis* (FORST.) CHING (POLYPODIALES, DRYOPTERIDACEAE) STORED UNDER REFRIGERATION

Romualdo Morelatto Begnini¹ & Áurea Maria Randi^{1,2}

RESUMO

Neste trabalho foi estudada a viabilidade de esporos de *Dicksonia sellowiana* e de *Rumohra adiantiformis*, armazenados sob refrigeração. Os esporos foram separados dos esporângios por filtragem em papel entretela e armazenados a 7 ± 1 °C. Esporos esterilizados superficialmente foram inoculados em frascos contendo 20 mL de meio mineral proposto por Mohr e modificado por Dyer, suplementado por Benlate[®] (25 mg.L⁻¹). A germinação ocorreu em sala de cultivo a 25 ± 2 °C ($30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de 16 horas. Os esporos de *Dicksonia sellowiana* mantiveram-se viáveis durante 4,5 anos, mas os armazenados por 6,0 anos haviam perdido a viabilidade. Esporos de *Rumohra adiantiformis* mantiveram-se viáveis durante 6,0 anos de armazenamento. Ambas as espécies produziram gametófitos após a germinação de esporos. Após três meses de cultivo foram observados gametófitos de *Dicksonia sellowiana* em início de fase cordiforme e após três meses os de *Rumohra adiantiformis* mostraram-se na fase adulta e apresentaram esporófito com a expansão da primeira folha. Após 10 meses de cultivo, 32,8 % dos gametófitos de *Rumohra adiantiformis* formaram esporófitos e após 12 meses, esses esporófitos apresentaram em média 4,3 folhas. Os resultados indicam que tanto esporos de *D. sellowiana* como de *R. adiantiformis* podem ser armazenados em bancos de germoplasma sob refrigeração, permanecendo viáveis por vários anos.

Palavras-chave: armazenamento; banco de germoplasma; esporos; pteridófitas; viabilidade.

Doi: 10.5007/2178-4574.2009v38p15

¹ UFSC, Departamento de Botânica, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

² Autora para correspondência: amrandi@ccb.ufsc.br



Este artigo de Acesso Livre, disponibilizado sob os termos da Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>) que permite uso não-comercial, distribuição e reprodução em qualquer meio, desde que este trabalho original seja devidamente citado.

ABSTRACT

In this work the viability of spores of *D. sellowiana* and *R. adiantiformis* stored under refrigeration was studied. The spores were removed and separated from debris by filtering through lens paper and stored in glass jars under refrigeration at 7 ± 1 °C. Superficially sterilized spores were sown in bottles containing 20 mL of mineral medium as proposed by Mohr, modified by Dyer and supplemented with Benomyl (25 mg.L^{-1}). The germination was conducted in growth room, at 25 ± 2 °C ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) and a 16 h-photoperiod. Spores of *D. sellowiana* remained viable during 4.5 years, but spores stored during 6.0 years lost viability. Spores of *Rumohra adiantiformis* remained viable during 6.0 years of storage. Both of them produced gametophytes after spore germination. Gametophytes of *D. sellowiana* in the beginning of the heartshape were observed after 3 months of culture, and some gametophytes of *Rumohra adiantiformis* were in the adult phase and presented sporophyte with the expansion of the first leaf. After 10 months of culture, 32.8% of the gametophytes of *Rumohra adiantiformis* formed sporophytes and after 12 months, these sporophytes presented 4.3 leaves. The results indicate that spores of *D. sellowiana* and *R. adiantiformis* can be dry stored, in banks of germplasm under refrigeration, remaining viable for several years.

Key words: germplasm bank; spores; storage; pteridophyte; viability.

INTRODUÇÃO

A conservação de germoplasma vegetal é de fundamental importância devido à erosão genética causada pela destruição de 'habitats', pela seleção natural e pelos agentes bióticos e abióticos. Enquanto muitas espécies estão em risco de extinção nas regiões temperadas, várias espécies vêm desaparecendo nos trópicos. A proteção de espécies frente à iminente extinção é, portanto, uma questão prioritária (Park *et al.* 1998).

As pteridófitas constituem importante grupo de organismos da flora brasileira. A literatura cita um número de espécies de pteridófitas variando de 9.000 a 12.000, das quais cerca de 3.250 ocorrem nas Américas (Tryon & Tryon 1982, Windisch, 1992). Destas, aproximadamente 30% podem ser encontradas em território brasileiro. As regiões Sul e Sudeste do Brasil contêm cerca de 600 espécies e abrigam um dos centros de endemismo e especiação de pteridófitas no Continente Sul-Americano (Tryon 1972).

Diversas espécies de samambaias têm sido exploradas indiscriminadamente nas últimas décadas, devido às suas características ornamentais, medicinais ou para a confecção de vasos e solos. Outras são potencialmente úteis para a recuperação de encostas degradadas. Há na literatura poucas informações a respeito da biologia de muitas dessas espécies. Nesse sentido torna-se necessário o conhecimento de germinação, visando seu manejo e conservação.

A samambaia arbórea *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook. (Polypodiopsida, Cyatheales, Dicksoniaceae) (Smith *et al* 2006) é caracterizada pelo seu tronco de aproximadamente 5 metros de altura formado por diversas camadas de raízes adventícias e faz parte da lista de espécies ameaçadas de extinção devido à exploração indiscriminada atualmente proibida pela legislação ambiental (IBAMA 1992). Ocorre na América Central, Venezuela, Colômbia, sul da Bolívia, Paraguai, Uruguai e regiões sul e sudeste do Brasil. (Tryon 1972, Sehnem 1978, Tryon & Tryon 1982). Dados de Santos (2002) mostram que em 2002 existiam no Paraná, 15 unidades industriais produzindo mensalmente cerca de 1,1 milhões de vasos de xaxim, provenientes da extração de aproximadamente 140 mil plantas. De 1990 a 1995 o Brasil foi o maior exportador mundial de *D. sellowiana*, com remessas prosseguindo até 1997, ano em que 104 companhias estavam registradas.

Rumohra adiantiformis (Forst.) Ching, conhecida por samambaia preta, é uma pteridófita pertencente à família Dryopteridaceae (Polypodiopsida, Polypodiales) (Smith *et al* 2006) onde todas as plantas são homosporadas e originam gametófitos verdes com numerosos rizóides na superfície central inferior. Esta pteridófita é uma espécie terrestre que cresce em uma variedade de habitats, ocorrendo em solos arenosos e desencapados bem como em áreas com arbustos, nas florestas ou sobre rochas. Ocorre desde o nível do mar até altitudes acima de 2.400 m, nos Andes Peruvianos (Kato 1974, Tryon & Tryon 1982). Esta planta tornou-se muito popular na composição de arranjos florais por causa do período excepcional da vida das folhas após o corte (Milton & Moll 1988). A maioria da produção mundial das folhas de *Rumohra adiantiformis* ocorre nos EUA, no estado da Flórida, onde o cultivo é realizado em condições controladas (Stamps *et al.* 1994). Entretanto, na República da África do Sul e no Brasil, onde existem as populações naturais da espécie, a extração é feita diretamente no campo (Milton & Moll 1988, Bauldalf *et al.* 2007).

Esporos aclorofilados de pteridófitas assemelham-se às sementes ortodoxas, que podem ser desidratadas e armazenadas por vários anos em bancos de germoplasma (Pence 2000). O objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade de esporos de *Dicksonia sellowiana* e de *Rumohra adiantiformis*, armazenados sob refrigeração durante vários períodos e a partir desses resultados gerar informações úteis para a formação de bancos de esporos e sua conservação e manejo.

MATERIAL E MÉTODOS

Os esporos de *Dicksonia sellowiana* foram coletados de três populações diferentes, em áreas de Floresta Ombrófila Mista e Floresta Ombrófila Densa da Encosta Atlântica, no estado de Santa Catarina: Floresta Nacional (FLONA) de Três Barras, situada a 26°06'23" de latitude sul e 59°19'20" de longitude oeste, em 30/08/1999; em uma propriedade particular de Urupema, situada a 27°57'25" de latitude sul e 49°53'33" de longitude oeste, em 30/08/1999 e na Reserva Particular do Patrimônio Natural de Caraguatá em 06/09/2003. A RPPN de Caraguatá está

localizada no Estado de Santa Catarina, entre os Municípios de Antônio Carlos, São João Batista, Biguaçu, Major Gercino e Angelina.

Esporos de *Rumohra adiantiformis* foram coletados em restinga na Área de Proteção Ambiental da Ilha Comprida, estado de São Paulo, no corredor de biodiversidade da Serra do Mar, em 26/08/1999 e abril de 2000. A APA da Ilha Comprida está localizada na Planície Litorânea, ao sul do litoral paulista. A Ilha Comprida é uma longa e estreita restinga da Região Estuarina-Lagunar Cananéia/Iguape/ Paranaguá, a poucos metros de altura acima do nível do mar e cerca de 70 km de comprimento por 3 km de largura. A APA corresponde a toda a área da ilha-município, com área de 17.527,00 ha.

Após a coleta, as frondes secaram sobre papel de filtro, em temperatura ambiente durante 72 horas, para induzir a abertura dos esporângios e liberação dos esporos. Posteriormente, os esporos foram separados dos esporângios, com auxílio de um pincel. O material foi filtrado em entretela de papel (TNT® ou papel de lente) e os esporos foram armazenados em frascos de vidro hermeticamente tampados, sob refrigeração a 7 ± 1 °C.

Para obtenção de gametófitos, esporos foram esterilizados superficialmente pela imersão durante 20 minutos, em solução de hipoclorito de sódio comercial (Q-Boa®, com 2% de cloro ativo) a 05, 15 ou 20%, conforme a espécie e o tempo de armazenamento 10%, acrescida de uma gota de detergente líquido comercial e em seguida enxaguados em água destilada autoclavada e filtrados sobre papel de filtro com auxílio de bomba de vácuo. A seguir foram inoculados em frascos “erlenmeyers” contendo 15mL de solução nutritiva de Mohr (1956), modificada por Dyer (1979), acrescida de Benlate® a 0,1% para evitar contaminação por fungos. A solução foi previamente esterilizada em autoclave por 20 minutos a uma temperatura de 120°C. Os esporos germinaram em sala de cultivo a 25 ± 2 °C ($30\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de 16 horas.

Para obtenção de esporófitos, foram utilizados esporos de *D. sellowiana* coletados em 06/09/2003 e de *R. adiantiformes* coletados em 26/08/99. Os esporos de ambas as espécies foram inoculados em 06/12/2006. Em 02/05/2007, gametófitos de *R. adiantiformes* foram transferidos para quatro bandejas de polietileno transparente com tampa (50 gametófitos por bandeja), contendo substrato constituído de composto comercial Húmus Aduplan® e nitossolo vermelho distrófico (terra roxa estruturada) na proporção de 1:1 (volume:volume); não foram obtidos gametófitos de *D.sellowiana* com desenvolvimento e em número adequados para as análises. O substrato foi previamente esterilizado em autoclave por 60 minutos a uma temperatura de 120°C. As bandejas foram mantidas em sala de crescimento, com irradiância de aproximadamente $22\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ao nível da solução nutritiva e temperatura de 25 ± 2 °C. A iluminação foi obtida pelo uso de lâmpadas fluorescentes brancas em regime de 16h de luz. Os esporófitos de *R. adiantiformes* foram transferidos individualmente (25/10/07), para vasos de 125mL contendo o substrato utilizado anteriormente e

acondicionados em bandejas plásticas transparentes com tampa, para evitar ressecamento e mantidos nas mesmas condições anteriormente citadas. Gametófitos frescos de ambas as espécies, com 3 meses de idade, foram colocados sobre lâminas com água e cobertos com lamínulas para observação em MO equipado com fotoautomático. Os esporos de ambas as espécies foram inoculados em 14/03/2006 e os gametófitos fotografados em 07/06/2006.

RESULTADOS

Esporos de *D. sellowiana* permaneceram viáveis durante 4,5 anos, mas não ocorreu germinação para esporos armazenados durante 6,0 anos (Tabela 1). Esporos de *D. sellowiana* armazenados durante três anos mostraram inibição parcial de germinação quando esterilizados superficialmente com solução de hipoclorito de

Tabela 1. Porcentagem de germinação de esporos de *Dicksonia sellowiana* coletados em locais e épocas diferentes, após diferentes períodos de armazenamento e diferentes métodos de esterilização superficial. Esporos germinaram em câmara de germinação a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ($30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de 16 horas. dp=desvio padrão

| Local de coleta | Data de coleta | Tempo de armazenagem | Método de esterilização | Dias de cultivo | Germinação % \pm dp |
|-----------------|----------------|----------------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------------|
| Três Barras | 30/08/1999 | 3,0 anos | Hipoclorito de sódio 20% -20 min | 18 | 27 \pm 3 |
| Três Barras | 30/08/1999 | 3,0 anos | Hipoclorito de sódio 5% - 20 min | 18 | 78 \pm 2 |
| Urupema | 30/08/1999 | 6,0 anos | Hipoclorito de sódio 5% - 20 min | 20 | 0 |
| Urupema | 30/08/1999 | 4,5anos | Hipoclorito de sódio 5% - 20 min | 15 | 62 \pm 6 |
| Antônio Carlos | 06/09/2003 | 20 dias | Hipoclorito de sódio 20% - 20 min | 20 | 79 \pm 3 |
| Antônio Carlos | 06/09/2003 | 2,0 anos | Hipoclorito de sódio 5%, -20 min | 20 | 70 \pm 3 |

sódio à 20% durante 20 minutos atingindo 27 ± 3 % de germinação, mas os mesmos esporos atingiram 78 ± 2 % de germinação quando esterilizados superficialmente com solução de hipoclorito de sódio à 5% durante 20 minutos (Tabela 1). Os esporos de *R. adiantiformis* coletados em agosto de 1999 e em abril de 2000, armazenados sobre refrigeração durante 6,0 anos ainda mostraram uma alta porcentagem de germinação (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis*, após diferentes períodos de armazenamento e diferentes métodos de esterilização superficial. Esporos germinaram em câmara de germinação a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ($30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de 16 horas. dp=desvio padrão.

| Local de coleta | Data de coleta | Tempo de armazenagem | Método de esterilização | Dias de cultivo | Germinação % \pm dp |
|--------------------|----------------|----------------------|--------------------------------|-----------------|-----------------------|
| Ilha Comprida - SP | 26/08/1999 | 7 meses | Hipoclorito de sódio 15%-20min | 10 dias | 97 ± 1 |
| Ilha Comprida - SP | 26/08/1999 | 8 meses | Hipoclorito de sódio 15%-20min | 10 dias | 97 ± 1 |
| Ilha Comprida - SP | 26/08/1999 | 9 meses | Hipoclorito de sódio 15%-20min | 10 dias | 97 ± 1 |
| Ilha Comprida - SP | 26/08/1999 | 10 meses | Hipoclorito de sódio 15%-20min | 10 dias | 97 ± 1 |
| Ilha Comprida - SP | 26/08/1999 | 6 anos | Hipoclorito de sódio 5%-20min | 21 dias | 69 ± 3 |
| Ilha Comprida - SP | 04/2000 | 6 anos | Hipoclorito de sódio 5%-20min | 14 dias | 82 ± 7 |

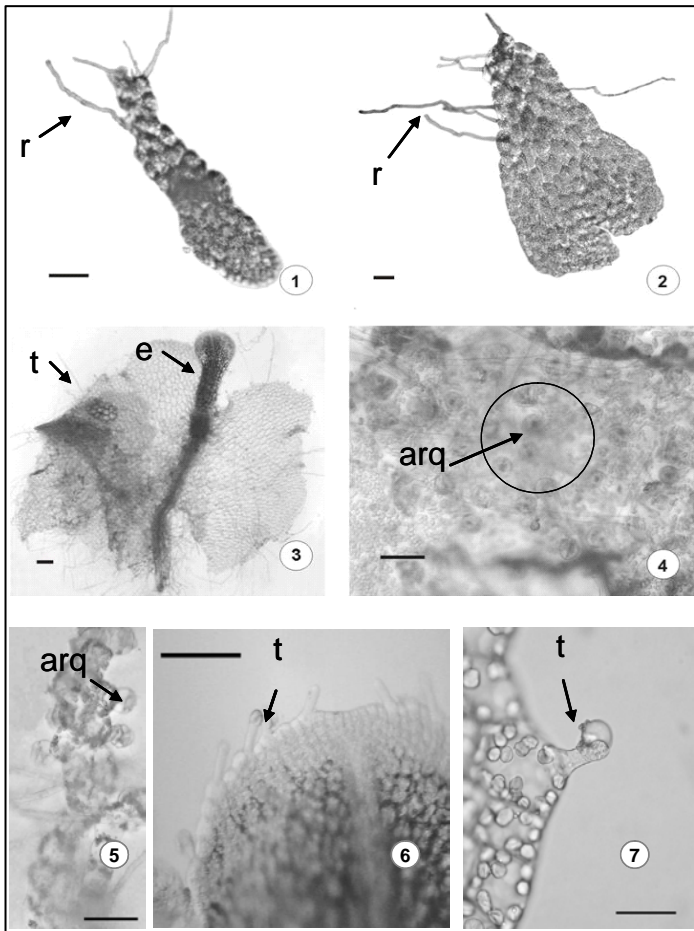
Os esporos de *D.sellowiana* armazenados sob refrigeração produziram gametófitos com aspecto morfológico normal atingido a fase cordiforme (Figuras 1 e 2). Já, esporos de *R. adiantiformis* produziram gametófitos com aspecto normal atingindo a fase cordiforme (Figuras 3, 4 e 6) e gametófitos amorfos (Figura 5). Os gametófitos de *R. adiantiformis* que atingiram a fase cordiforme produziram esporófitos mostrando a primeira folha expandida (Figuras 3 e 6).

Os gametófitos de *R. adiantiformis* que atingiram a fase cordiforme produziram após 10 meses de cultivo, 32,8% de esporófitos que apresentaram após 12 meses de cultivo, uma média de 4 folhas e a altura média da maior folha foi de 7,0 cm (Tabela 3).

A figura 8 ilustra curvas típicas de germinação de esporos de *D. sellowiana* coletados em 06/09/2003 e inoculados em 20/09/2005 (Fig. 8A) e de *R. adiantiformis* (Figs 8B e 8C) coletados em 26/08/1999 e em abril de 2000 e inoculados em 18/11/2005 em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas. A germinação de esporos de *D. sellowiana* armazenados durante dois anos sob refrigeração atingiu a estabilização entre 12 a 15 dias de cultivo observando-se $70 \pm 3\%$ de germinação. A germinação dos esporos de *R. adiantiformis* armazenados durante aproximadamente 6 anos estabilizou entre 12 a 14 dias de cultivo. Os esporos de *R. adiantiformis* coletados em agosto de 1999, começaram a germinar após 5 dias de cultivo e atingiram $69 \pm 3\%$ de germinação enquanto que os coletados em abril de 2000, começaram a germinar mais tarde, entre 7 e 10 dias de cultivo, porém atingiram $82 \pm 7\%$ de germinação após aproximadamente 6 anos de armazenamento sob refrigeração.

Tabela 3. Porcentagem, número de frondes e altura da maior fronde de esporófitos obtidos a partir da germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Dryopteridaceae) armazenados sob refrigeração durante 6 anos. Os esporos foram inoculados em 06/12/2006.

| | Data da avaliação | Tempo de inoculação meses | Média \pm desvio padrão |
|--------------------------------|----------------------|------------------------------|------------------------------|
| Esporófitos (%) | 09/10/2007 | 10 | $32,8 \pm 23,6$ |
| Número de frondes | 04/12/2007 | 12 | $4,3 \pm 1,4$ |
| Altura da maior fronde (cm) | 04/12/2007 | 12 | $7,1 \pm 3,1$ |



Figuras 1-7. Gametófitos de *Dicksonia sellowiana* obtidos de esporos coletados em 06/09/2003 e de *Rumohra adiantiformis* obtidos de esporos coletados em 26/08/1999. Os esporos de ambas as espécies foram inoculados em 14/03/2006 e os gametófitos fotografados em 07/06/2006. **1.** Gametófito de *D. sellowiana* em fase espatulada. **2.** Gametófito de *D. sellowiana* em início de fase cordiforme. **3.** Gametófito de *R. adiantiformes* com início de desenvolvimento de esporófito. **4.** Arquegônios de *R. adiantiforme*. **5.** Gametófito amorfo de *R. adiantiformes* portando arquegônios. **6.** Detalhe do ápice da primeira folha do esporófito de *R. adiantiformes* com tricomas marginais. **7.** Detalhe de um tricoma marginal aparentemente glandular, no gametófito de *R. adiantiformis*. arq = arquegônio, e = esporófito, r = rizóide, t = tricoma. Barras = 200 μ

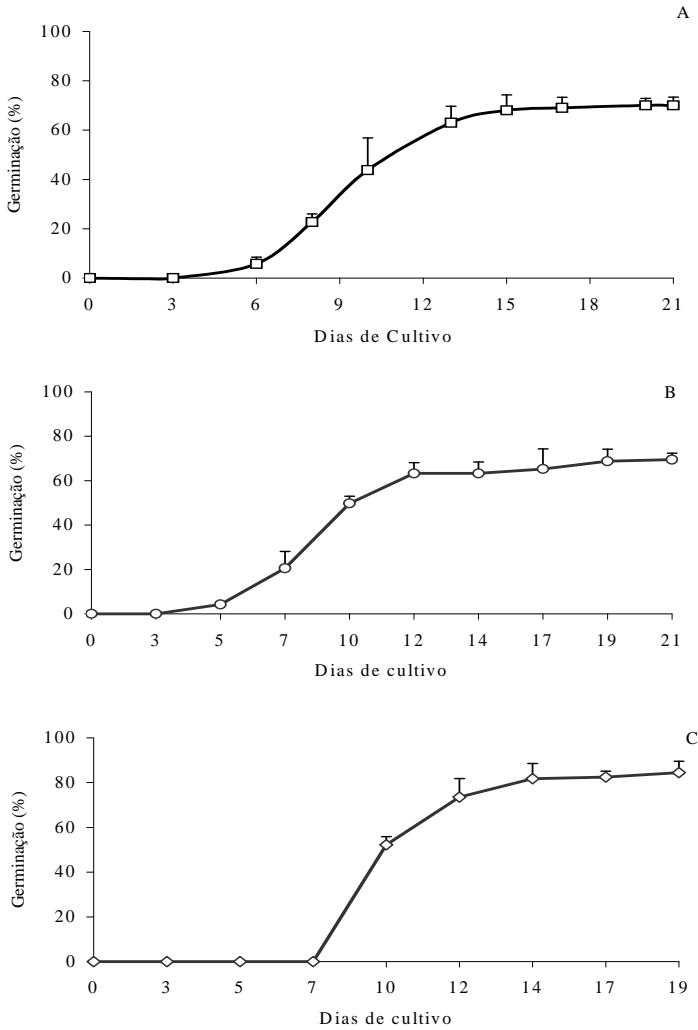


Figura 8 - Germinação de esporos de *Dicksonia sellowiana* coletados em 06/09/2003 e inoculados em 20/09/2005 (A); de esporos de *Rumohra adiantiformis* coletados em 26/08/1999 e inoculados em 18/11/2005 (B); de esporos de *Rumohra adiantiformis* coletados em Abril de 2000 e inoculados em 05/05/2006 (C). Barras = desvio padrão.

DISCUSSÃO

A porcentagem de germinação de esporos pode sofrer muitas variações, dependendo dos diferentes táxons estudados, idade dos esporos, época e local de coleta, condições de cultivo, condições de armazenamento e tempo de armazenamento (Camloh & Gogala 1992, Camloh 1993, Camloh 1999, Sheffield *et al.* 2001).

A preservação de esporos sob refrigeração é um método muito comum de armazenamento. De acordo com Pence (2000), a preservação 'ex situ' de esporos pode ser um importante instrumento para a manutenção de pteridófitas no ambiente. A autora armazenou por mais de 75 meses, esporos de 33 espécies, dentre elas *R. adiantiformis*, em temperaturas de 4°C, -20 °C ou em nitrogênio líquido à temperatura de -196°C e observou que esporos de algumas espécies não perderam a viabilidade quando armazenados por mais de 75 meses nos três métodos testados, mas que os esporos de *R. adiantiformis* não germinaram em nenhum dos tratamentos. No entanto, no trabalho de Pence, não há menção sobre a data de coleta dos esporos dessa espécie, que poderiam estar inviáveis quando do início dos testes. Quintanilla *et al.* (2002) também atestaram a eficiência do armazenamento de esporos a seco em baixas temperaturas, para cinco espécies de pteridófitas ameaçadas de extinção.

No presente trabalho, esporos de *D. sellowiana* estavam viáveis após 4,5 anos de armazenamento sob refrigeração e de *R. adiantiformes* após 6,0 anos. Os esporos de *D. sellowiana* armazenados durante 3,0 anos mostraram-se sensíveis à esterilização superficial em solução de hipoclorito de sódio comercial a 20%, havendo uma grande redução na porcentagem de germinação nessas condições experimentais. Já, a esterilização superficial com hipoclorito de sódio a 5% manteve uma alta porcentagem de germinação, que foi semelhante à encontrada para esporos armazenados durante 20 dias. Portanto, a esterilização de esporos frescos ou armazenados por poucos dias pode ser feita utilizando-se concentrações mais elevadas de hipoclorito de sódio, enquanto que para esporos armazenados por muitos meses ou anos, deve ser feita utilizando-se menores concentrações de hipoclorito, respeitando-se as características de cada espécie.

Simabukuro *et al.* (1998) comentam que antes da germinação de esporos armazenados a seco, para evitar a contaminação por fungos, há necessidade de esterilizar superficialmente os esporos. Camloh (1993, 1999) observou que as maiores porcentagens de germinação de *Platyserium bifurcatum* (Cav.) C. Chr. ocorreram quando esporos não esterilizados foram utilizados, porém houve contaminação após 10 dias de cultivo. Esporos de *R. adiantiformis* não esterilizados, armazenados durante 90 dias em nitrogênio líquido, apresentaram aceleração da germinação em relação aos esporos controle, mas os esporos previamente esterilizados apresentaram uma forte inibição da germinação após a criopreservação em nitrogênio líquido (Brum & Randi 2006). Filippini *et al.* (1999) observaram que esporos de *D. sellowiana* apresentaram 82% de germinação após dois anos de armazenamento sob refrigeração. Rogge *et al.* (2000) criopreservaram esporos de *D.*

sellowiana previamente esterilizados superficialmente por três meses em nitrogênio líquido e mostraram um aumento da porcentagem de germinação em relação aos esporos do controle. A esterilização superficial pode de fato atrasar ou reduzir a germinação de esporos, mas é necessária para a obtenção de altas porcentagens de gametófitos.

De acordo com Pérez-Garcia & Fraille (1986), o padrão de germinação de *D. sellowiana* é do tipo *Vittaria*, proposto por Nayar & Kaur 1971. O desenvolvimento gametofítico de *D. sellowiana* é do tipo *Adiantum*, descrito por Nayar & Kaur (1969), cujo gametófito produz uma célula central meristemática (célula obconica) que produz uma lamina espatulada que se transforma em gametófito cordiforme, sem tricomas.

Não há estudos na literatura sobre o desenvolvimento gametofítico de *R. adiantiformis*, sendo possível que a presença de gametófitos amorfos deva-se ao envelhecimento dos esporos.

Esporos de *R. adiantiformis* armazenados durante 6 anos produziram esporófitos. No entanto, Brum & Randi (2006) observaram que esporos dessa espécie armazenados por um período de alguns meses, produziram após 9,5 meses, esporófitos com 8,8 folhas, apresentando a maior folha bem mais desenvolvida, medindo em média 23,9 cm. Os resultados obtidos no presente trabalho podem indicar que esporos armazenados por seis anos, permanecem viáveis, mas há um retardamento no crescimento dos esporófitos, como consequência do envelhecimento dos esporos.

Os esporos de *D. sellowiana* armazenados sob refrigeração por três anos e os de *R. adiantiformis* armazenados durante 6 anos atingiram a estabilização um pouco mais tarde do que esporos armazenados por poucos dias. Segundo Filippini *et al* (1999), os esporos recém coletados de *D. sellowiana* são fotoblásticos positivos e atingem a máxima porcentagem de germinação a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ em luz branca após sete dias de inoculação e permaneceram viáveis após dois anos de armazenamento sob refrigeração apresentando 82% de geminação após 10 dias de inoculação. Para *R. adiantiformis*, Brum & Randi (2002) observaram que a germinação de esporos recém-coletados atingiu a estabilização após 10 dias de cultivo.

Os resultados obtidos no presente trabalho complementam as informações já existentes na literatura sobre a conservação dessas duas espécies de pteridófitas e indicam que tanto esporos de *D. sellowiana* como de *R. adiantiformis* podem ser armazenados em bancos de germoplasma sob refrigeração permanecendo viáveis por vários anos, mas se fazem necessárias informações adicionais sobre o vigor de esporófitos obtidos de esporos armazenados por vários anos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baldauf, C.; Hanazaki, N. & Reis, M.S. 2007. Caracterização etnobotânica dos sistemas de manejo de samambaia-preta (*Rumohra adiantiformis* (G. Forst)

- Ching - Dryopteridaceae) utilizados no sul do Brasil. **Acta Botanica Brasiliense** **21**:823-834.
- Brum, F.M.R. & Randi, A.M. 2002. High irradiance and temperature inhibit the germination of spores of the fern *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Dryopteridaceae). **Revista Brasileira de Botânica** **25**:391-396.
- 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. **Science Horticulture** **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.
- Dyer, A.F. 1979. The culture of fern gametophytes for experimental investigation. In: Dyer A.F. (Ed.). **The experimental biology of ferns**. London, Academic Press, p.253-305.
- Filippini, E.C.P.; Duz, S.R. & Randi, A.M. 1999. Light and storage on the germination of spores of *Dicksonia selowiana* (Presl.) Hook., Dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Botânica** **22**: 21-26.
- IBAMA, 1992. Portaria IBAMA Nº6 que estabelece a Lista Oficial de espécies da Flora Brasileira ameaçadas de extinção.
- Kato, M. 1974. A note on the systematic position of *Rumohra adiantiformis*. **Acta of Phytotaxonomy and Geobotany** **26**:52-57.
- Milton, S.J. & Moll, E.J. 1988. Effects of harvesting on frond production of *Rumohra adiantiformis* (Pteridophyta: Aspidiaceae) in South Africa. **Journal of Applied Ecology** **25**: 725-43.
- Mohr, H. 1956. Die Abhängigkeit des Protonemapolarität bei Farnen von Licht. **Planta** **47**:127-158.
- Nayar, B.K. & Kaur, S. 1969. Type of prothallial development in homosporous ferns. **Phytomorphology** **19**:179-188.
- Nayar, B.K. & Kaur, S. 1971. Gametophytes of homosporous ferns. **Botanical Review** **37**: 295-396.
- Park, Y. S.; Barrett, J. D. & Bonga, J.M. 1998. Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **34**:231-239.
- Pence, V.C. 2000. Survival of chlorophyllous and nonchlorophyllous fern spores through exposure to liquid nitrogen. **American Fern Journal** **90**: 119-126.

- Pérez-García B. & Frayle, M. E. 1986. El gametofito de *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hooker. **Biotica** **11**: 281-287.
- Quintanilla, L.G.; Amigo, J.; Paungua, E. & Pajarón, S. 2002. Effect of storage method on spore viability in five threatened fern species. **Annals of Botany** **90**:461-567.
- Rogge, G.D., Viana, A.M., Randi, A.M. 2000. Cryopreservation of spores of *Dicksonia sellowiana*. An endangered tree fern indigenous to South and Central America. **Cryoletters** **21**: 223-230.
- Santos, A.J. 2002. **Análise da cadeia produtiva e comercialização do Xaxim (*Dicksonia sellowiana*) no Estado do Paraná**. Dissertação de Mestrado (Economia e Política Florestal). Universidade Federal do Paraná. Curitiba. Brasil.
- Sehnen, A. 1978. As filicíneas do Sul do Brasil, sua distribuição geográfica, sua ecologia e suas rotas de migração. **Pesquisas Botânicas** **31**: 1-108.
- 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 spores of *Cyathea delgadii*. **American Fern Journal** **88**:124-132.
- Smith, A.R.; Pryer, K.M.; Schuettpelz, E.; Korall, P.; Schneider, H & Wolf, P.G. 2006. A classification for extant ferns. **Taxon** **55**: 705-731.
- Stamps, R.H., Nell, T.A. & Barret, J.E. 1994. Production temperatures influence growth and physiology of leatherleaf fern. **HortScience** **29**:67-70.
- Tryon, R.M. 1972. Endemic areas and geographical speciation in tropical American ferns. **Biotropica** **4**:121-131.
- Tryon, R.M. & Tryon, A.F. 1982. **Ferns and allied plants with special reference to Tropical America**. Springer-Verlag, New York.
- Windisch, P.G. 1992. **Pteridófitas da região Norte-ocidental do Estado de São Paulo** (Guia para estudo e excursões). 2. ed. São José do Rio Preto: UNESP.