

EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO, DA ESTERILIZAÇÃO SUPERFICIAL E DE AMBOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO GAMETOFÍTICO INICIAL DE ESPOROS DE *DICKSONIA SELLOWIANA* HOOK. (DICKSONIACEAE):

Estratégias de Conservação e Recuperação e Mecanismos Fisiológicos

Herlon Iran Rosa¹; Áurea Maria Randi²

RESUMO

Esporos de *D. sellowiana* foram imersos em Nitrogênio Líquido por 24h, tendo sido ou não, previamente esterilizados superficialmente em hipoclorito de sódio. Foi avaliado e caracterizado morfológicamente o desenvolvimento inicial, estabelecendo a curva de germinação. A criopreservação de esporos desta espécie tem demonstrado algumas características peculiares, pois não são necessários crioprotetores, e parece ocorrer uma aceleração na germinação, bem como no desenvolvimento gametofítico. A esterilização superficial dos esporos também parece interferir na germinação, retardando-a, mas parece evitar o surgimento de organismos competidores e parasitas durante o desenvolvimento gametofítico. Todos os tratamentos apresentaram estruturas reprodutivas após 180 dias da germinação.

Palavras-chave: Conservação. Fisiologia. Samambaia.

INTRODUÇÃO

A *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) é uma samambaia arbórea que ocorre em florestas úmidas da América Latina e está ameaçada de extinção no Brasil (MMA, 1998), principalmente pela extração do seu tronco para produção de vasos e outros produtos ornamentais. Possui ainda um crescimento bastante lento que é outro obstáculo para sua manutenção e recuperação. Este estudo propõe a observação de possíveis efeitos da criopreservação sobre o desenvolvimento inicial dos gametófitos de *D. sellowiana*, com o intuito de identificar se a criopreservação interfere na germinação ou em algum estágio do desenvolvimento inicial.

Seu tronco fibroso retém bastante água, mantendo-se úmido por um grande período de tempo, o que o torna um substrato excelente para o cultivo de orquídeas (Silva, 1986). Em consequência destas características e do interesse comercial, esta samambaia tem sofrido intensa extração para a venda de seu tronco, que é utilizado

¹ Mestrando do Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas, Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas; Universidade Federal de Santa Catarina. E-mail: herlon.rosa@posgrad.ufsc.br

² Professora Titular do Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas; Universidade Federal de Santa Catarina. E-mail: amrandi@ufsc.br

na confecção de vasos e outros produtos para floriculturas principalmente, e é considerada em perigo de extinção (MMA, 1998). Seu crescimento se dá de forma muito lenta, levando um período de 15 a 18 anos para que o estágio ideal de extração comercial seja atingido (Lorenzi & Sousa, 1996).

O extrativismo associado ao lento crescimento acarreta o desaparecimento das plantas adultas de *D. sellowiana*, o que além de comprometer esta espécie, gera efeitos sobre outras formações vegetais pela diminuição da disponibilidade de micro-habitats para várias espécies epífitas (Fernandes, 2000). As recentes mudanças ambientais causadas não apenas pelo extrativismo da *D. sellowiana*, mas principalmente pela degradação de seus habitats pode ameaçar seu ciclo reprodutivo, que é extremamente dependente de umidade (Ibars & Estrelles, 2012). Ainda assim os estudos que efetivamente forneçam dados sobre estratégias de gestão de conservação de samambaias são escassos, e estes dados têm uma interpretação mais complexa em comparação às plantas com flores, o que se deve aos seus dois ciclos de vida livre: a fase gametofítica e a fase esporofítica (Gomes et al., 2006).

Com relação à germinação de esporos de *Dicksonia. Sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae), Fillipini et al. (1999) analisaram amostras armazenadas por 15 dias e obtiveram 88,25% de germinação, e em amostras armazenadas por 731 dias obtiveram 81,75% de germinação, o que evidencia que estatisticamente os valores não diferiram entre si. Rogge (1999) observou que a melhor concentração de hipoclorito de sódio para a esterilização superficial de esporos recém coletados de *D. sellowiana* foi a de 30% durante 30 minutos, para o cultivo in vitro em meios com adição de sacarose. Suzuki (2003) obteve 78,5% de germinação após 16 dias de cultivo em esporos esterilizados em hipoclorito de sódio a 5%, que estavam armazenados por 1160 dias sob refrigeração de $7 \pm 1^\circ\text{C}$. Begnini & Randi (2009) testaram a germinação de esporos de *D. sellowiana* armazenados durante 4,5 anos e observaram que ainda estavam viáveis, mas os armazenados por 6,0 anos haviam perdido a viabilidade. Os autores confirmaram que com o aumento da idade dos esporos, estes tornam-se mais sensíveis à esterilização superficial com hipoclorito de sódio comercial.

Com relação ao desenvolvimento gametofítico, Renner & Randi (2004) cultivaram esporos de *D. sellowiana* a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ em fotoperíodo de 16 horas, em meios de Dyer e MS, acrescidos de 0 a 5% de sacarose. A massa seca foi maior em gametófitos de 30 dias de idade, cultivados em meio Dyer com adição de 3% a 5% de sacarose e em meio MS com adição de 2% de sacarose. As autoras testaram também o efeito de diferentes níveis de luz solar na germinação e observaram que a germinação foi mais alta sob 5 e 20% da luz solar cujos gametófitos após 49 dias de cultivo apresentaram os maiores níveis de açúcares solúveis totais e clorofilas.

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

A criopreservação é a conservação de material biológico em temperatura ultra baixa (-196°C) geralmente em nitrogênio líquido (NL) (Kantha, 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).

A criopreservação de esporos de samambaias em NL já foi utilizada por diversos autores. Agrawal *et al.* (1993) criopreservaram esporos de *Cyathea spinulosa* Wall. ex Hook (Cyatheaceae) durante três dias em nitrogênio líquido (NL) e estes sobreviveram, e foram os pioneiros a publicar um artigo sobre a criopreservação de esporos de samambaias. Esporos de *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Dryopteridaceae) continuaram viáveis após 90 dias armazenados em NL (Brum & Randi, 2006). Filipin (2015) criopreservou esporos de *Pleopeltis lepidopteris* (Langsd. & Fisch.) de la Sota (Polypodiaceae) em NL e observou que o método acelerou a germinação e o desenvolvimento gametofítico, mas que os gametófitos mostraram desenvolvimento normal, com o desenvolvimento de gametângios.

Com relação à criopreservação de esporos de *D. sellowiana*, Rogge *et al* (2000) observaram que os esporos sobreviveram após imersão de uma hora, um mês e três meses em nitrogênio líquido, sem a necessidade de adição de crioprotetores. No entanto, as autoras não analisaram os efeitos da criopreservação dos esporos no desenvolvimento gametofítico, o que será objeto de estudo deste trabalho.

A análise do desenvolvimento inicial tem o intuito de descrever o comportamento desde a germinação até o surgimento de estruturas reprodutivas, aferindo desta forma que a criopreservação é um método seguro de armazenamento para os esporos de *D. sellowiana*.

PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

A coleta de frondes férteis de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) foi realizada na Reserva Particular do Patrimônio Natural do Caraguatá, em Antonio Carlos-SC, em 02/09/2015. Uma fronde foi seca em estufa à 40°C \pm 2 por 6 dias e dela foi montada uma exsicata que foi então depositada no Herbário Flor sob tombo FLOR0057930 em 08 de setembro de 2015. As demais frondes foram acondicionadas em bandejas plásticas grandes revestidas com papel filtro, por oito dias, desde a data da coleta. Foram então coletados os esporos depositados no

fundo das bandejas, tomando-se o cuidado de escovar cada raque com pincel largo e macio, a fim de auxiliar no desprendimento dos esporos.

O material recolhido foi então filtrado em papel entretela, separando assim os esporos dos esporângios que os revestiam. Foram obtidos 146g de esporos que foram armazenados em frascos de vidro âmbar, e mantidos sob refrigeração a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, no Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFSC. No dia 30 de setembro foi realizada a esterilização superficial em câmara de fluxo laminar, dos esporos a serem usados no experimento de análise do desenvolvimento. A esterilização superficial foi efetuada deixando os esporos repousando por 30 minutos em solução de hipoclorito de sódio comercial, em concentração de 10%, adicionando uma gota de detergente comercial. Após a secagem, parte destes esporos esterilizados foi depositada em um criofrasco de 1,0ml, e em outro criofrasco de 1,0 ml foram colocados esporos não esterilizados superficialmente. Ambos foram armazenados por 24h em tambor de nitrogênio líquido no Laboratório de Ficologia da UFSC. O tambor permaneceu fechado durante todo este período.

Foram realizados os seguintes tratamentos: CTR (Controle) esporos não esterilizados superficialmente, CRY (Criopreservado) esporos criopreservados não esterilizados superficialmente, CES (Controle esterilizado superficialmente) e CRE (Criopreservado esterilizado superficialmente).

Para analisar o desenvolvimento gametofítico, em 01 de outubro de 2015 foram inoculados 50mg de esporos em cada um dos 32 erlenmeyers contendo 20ml de solução nutritiva de Mohr (1956) modificada por Dyer (1979). Toda a vidraria utilizada, bem como a solução nutritiva, foram previamente esterilizadas em autoclave por 20 minutos a uma temperatura de 120°C . Esse procedimento foi completamente realizado em capela de fluxo laminar. Os erlenmeyers foram tampados com filme de polipropileno de uso doméstico da marca Assafácil® e transferidos para a câmara de cultivo com irradiância à altura dos frascos de aproximadamente $22 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A iluminação foi feita com lâmpadas fluorescentes brancas 15W e o fotoperíodo de 16 horas à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. O material foi mantido nestas condições por 30 dias, até a fase do gametófito filamentosos. Foram então transferidas dos erlenmeyers para bandejas de polipropileno transparente com tampa, contendo substrato nitossolo vermelho distrófico com adição de composto orgânico na proporção de 3:1, proposto por

Suzuki *et al.* (2005), previamente esterilizado em autoclave (60 min a 120°C). As bandejas com os gametófitos permaneceram em câmara de germinação, nas mesmas condições.

Para analisar o desenvolvimento gametofítico, gametófitos provenientes de ambos os tratamentos foram coletados a intervalos regulares de tempo e montados lâminas com material fresco e capturadas 40 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).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A data para início da contagem dos esporos e estabelecimento da curva de germinação foi programada para o 6º dia de inoculação. A partir do 6º dia, a contagem foi realizada a cada 4 dias, até o estabelecimento da curva de germinação.

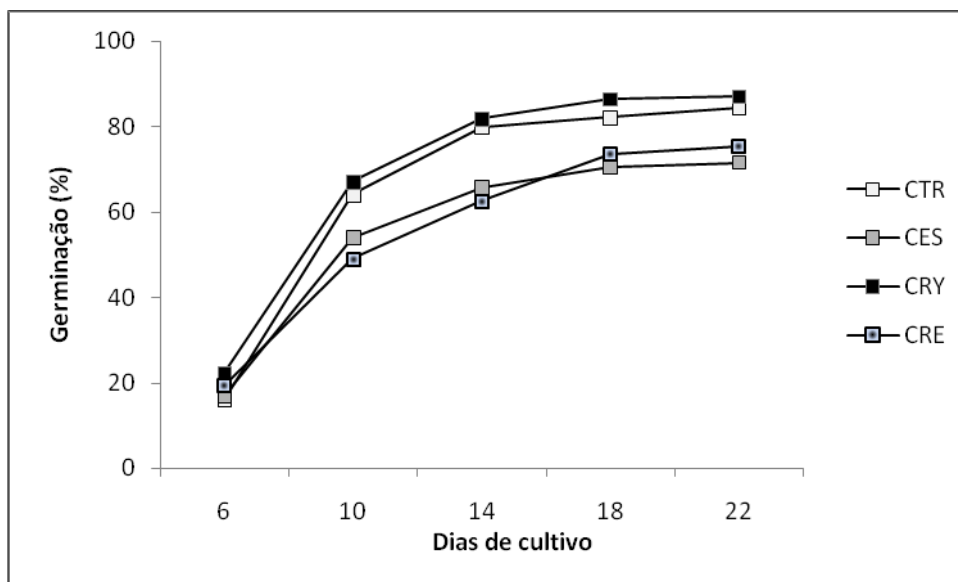


Figura 1. Curva de germinação de esporos de *Dicksonia sellowiana*. Início: 01/10/2015. Tratamentos CTR (Controle) esporos não esterilizados superficialmente; CRY (Criopreservado) esporos criopreservados não esterilizados superficialmente; CES (Controle esterilizado superficialmente) e CRE (Criopreservado esterilizado superficialmente).

A germinação iniciou sua estabilização após 14 dias da inoculação (Figura 1), quando os tratamentos CTR e CRY alcançaram 79,75% e 81,75% respectivamente, e os tratamentos CES e CRE alcançaram respectivamente 65,75% e 62,50%, valores que se mantiveram nas duas contagens seguintes. Aos 22 dias os tratamentos CTR e CRY atingiram 84,25% e 87% respectivamente enquanto que os tratamentos CES e CRE atingiram 71,50% e 75,25% respectivamente.

Estes dados foram semelhantes aos obtidos por Suzuki (2001), e Rogge (2004), com maior proximidade com os obtidos por Filipini (1999). No presente estudo foram utilizados esporos recém coletados frescos. Na figura 2 podemos observar três etapas distintas do desenvolvimento gametofítico, desde a protrusão do rizóide, passando a desenvolver as primeiras células protonemais, até o início das divisões laterais do gametófito.

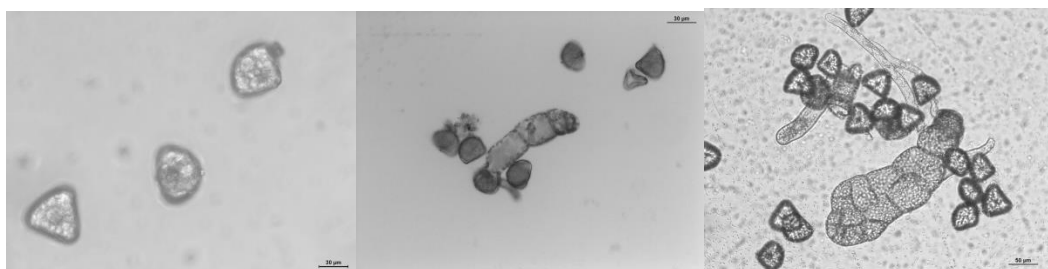


Figura 2. Esporos controle (CTR) recém germinados, com 6 dias acima, à esquerda; no centro, gametófito com 10 dias já apresenta rizóide protuberante e cloroplastos; abaixo, com 18 dias, os gametófitos já na fase filamentosa, com divisões celulares laterais. Visualizados em microscópio de luz, aumento de 40x.

Decorridos 30 dias da inoculação dos esporos, os gametófitos já se encontravam na fase filamentosa. No segundo mês de cultivo em substrato, os gametófitos eram mais abundantes nos tratamentos CTR e CRY. Considerando que a curva de germinação demonstrou que estes dois tratamentos apresentaram maior percentual de germinação, era esperado que também no substrato houvesse maior desenvolvimento de gametófitos. Isto foi o que se observou de fato nas bandejas dos tratamentos CTR e CRY (Figura 4).

Nos tratamentos onde os esporos foram esterilizados superficialmente não houve surgimento de microorganismos concorrentes, embora seu desenvolvimento tenha se dado de forma mais lenta. Os tratamentos criopreservados apresentaram desenvolvimento normal, embora a presença de fungos Ascomycotas tenha sido verificada no tratamento CRY. O tratamento CRE demonstrou desenvolvimento

gametofítico normal, desde o início da germinação até a estabilização da curva de germinação, com divisões celulares laterais, e sem a visualização de microorganismos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos através da curva de germinação evidenciam que não houve interferência negativa da criopreservação, da esterilização superficial, e mesmo destes dois agentes em conjunto. Todos os tratamentos tiveram altos valores de percentual de germinação, ainda que a criopreservação pareça contribuir para acelerar a germinação e o desenvolvimento inicial, e a esterilização superficial pareça ter tido um efeito retardante.

Isto aponta para a existência de um mecanismo fisiológico natural que permite aos esporos desta espécie manter a viabilidade mesmo após a criopreservação, uma vez que não foram necessários crioprotetores. O decurso do desenvolvimento demonstrou, com o surgimento de estrutura reprodutiva em todos os tratamentos aos 180 dias de inoculação, que o método de criopreservação relatado neste trabalho não interfere negativamente na germinação ou desenvolvimento inicial, sendo eficiente como método para conservação em bancos de germoplasma

Por se tratar de uma espécie ameaçada de extinção, e ainda pelas evidências farmacológicas e etnobotânicas acerca desta espécie, é de interesse ímpar que se estabeleçam estratégias que garantam a conservação desta espécie, o que é a grande contribuição deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Agrawall, D.C.; Pawar, S.S.; Mascarenhas, A.F.; **Cryopreservation of spores of *Cyathea spinulosa* (Wall. ex Hook) an endangered fern.** Journal of Plant Physiology, 142 (1993) 124-126.
- Ballesteros, D.; Estrelles, E.; Walters, C.; Ibars, A.M.; **Effect of storage temperature on green spore longevity for the ferns *Equisetum ramosissimum* and *Osmunda regalis*.** CryoLetters, 32 (2011), 89-98.

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

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

Benson, E.E.; Lynch, P.T.; Stacey, G.N.; **Advances in plant cryopreservation technology: current applications in crop plant biotechnology.** Agricultural Biotechnological News Information, 10 (1998), 133-141.

Bernabe, N.; Williams-Linera, G.; Palacios-Rios, M. **Tree ferns in the interior and at the edge of a Mexican cloud Forest remant: Spore germination and sporophyte survival and establishment.** Biotropica, 31 (1999) 88.

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

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

Farias-Soares, F.L.; Burrieza, H.P.; Steiner, N.; Maldonado, S.; Guerra, M.P.; **Immunoanalysis of dehydrins in *Araucaria angustifolia* embryos.** Protoplasma, 250 (2013), 911-918.

Fernandes, I.; **Taxonomia dos representantes de Dicksoniaceae no Brasil.** Pesquisas - Botânica, 50 (2000), 5-26.

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

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

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

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

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

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

Li, Y.; Zhang, Y.L.; Jiang, C.D.; Wang, T.; Wang, Q.; Shi, L.; **Effect of storage temperature on spore viability and early gametophyte development of three vulnerable species of *Alsophila* (Cyatheaceae).** Austrian Journal Botany, 58 (2010) 89-96.

Lorenzi, H.; Sousa, H.M.; **Plantas ornamentais no Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, (1996) 1-650.

Lynch, P.T.; Benson, E.E.; **Cryopreservation, a method for maintaining the plant regeneration capability of rice cells suspension cultures**. In: Proceedings of the second international rice genetics meeting. IRRI, Los Baños, (1991) 321-332.

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

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

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

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

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

Raghavan, V.; Kamalay, J.C.; **Expression of two cloned mRNA sequences during development and germination of spores of the sensitive fern, *Onoclea sensibilis* L.** Planta, 189 (1993) 1-9.

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

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

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

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

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

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

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

Reserva Natural do Patrimônio Particular Caraguatá, disponível em www.caraguata.com.br acessado em 25 de junho de 2015.

Sakai, A.; **Cryopreservation of germplasm of woody plants**. In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry*, 32 (1995) 53-69.

Sehnem, A.; **Ciateáceas**. *Flora Ilustrada Catarinense*, (1978) 1-114.

Sevegnani, L.; Gasper, A.L.; Bonet, A.; Sobral, M.G.; Vibrans, A.C.; Verdi, M.; Santos, A.S.; Dreveck, S.; Korte, A.; Schmitt, J.; Cadorin, T.; Lopes, C.P.; Caglione, E.; Torres, J.F.; Meyer, L.; **Flora vascular da floresta ombrófila densa em Santa Catarina**. *Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina*, (2013), cap.4.

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

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

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

Suzuki, C.C.L.F.; Paulilo, M.T.; Randi, A.M.; **Substrate and irradiance affect the early growth of the endangered tropical tree fern *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae)**. *American Fern Journal*, 95 (2005), 115-125.

Templeman, T.S.; DeMaggio, A.E.; Stetler, D.A.; **Biochemistry of Fern Spore Germination: Globulin Storage Proteins in *Matteuccia struthiopteris* L.** *Plant Physiology*, 85 (1987) 343-349.

Tryon, R.M.; **Endemic areas and geographic speciation in Tropical American Ferns**. *Biotropica*, 4 (1972), 121-131.

Tryon, R.; Tryon, A.F.; **Ferns and allied plants with special reference to Tropical America**. New York: Springer-Verlag, (1982), 144-149.

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

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