



GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PROPÁGULOS DE

Marchantia chenopoda

MARIA ELIZA MELARE

CAMPINAS

Estado de São Paulo

1990

este exemplar corresponde à redação final de
ter dependida pela candidata Maria Eliza Melare
& aprovada pela Comissão Julgadora.
M^a Fátima D. A. Pereira
23/05/90

GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PROPÁGULOS DE

Marchantia chenopoda

MARIA ELIZA MELARE

Orientadora: Maria de Fátima D. A. Pereira

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas na Área de
Fisiologia Vegetal.

CAMPINAS

Estado de São Paulo

1990

Trebnaz, K. & Zwadzki, T. 1985. Light-triggered action potentials in the
liverwort *Conocephalum conicum*. *Physiol. Plant.* 64:482-486.

O mistério da vida me causa
a mais forte emoção.
É o sentimento que suscita a beleza
e a verdade, cria a arte
e a ciência.
Se alguém não conhece esta sensação
ou não pode mais
experimentar espanto ou surpresa,
já é um morto vivo,
e seus olhos se cegaram.

A. Einstein

Dedico este trabalho a meus pais Honório Melare e Maria L. da Conceição L. Melare, e ao meu irmão José Renato Melare, pelo amor e apoio que sempre me deram, me orientando no sentido da verdade e da honestidade.

Dedico também a Edelson Archangelo, pelo sentido novo que trouxe a minha vida e ao meu trabalho, ajudando-me na descoberta do amor e da beleza de se estar vivo e feliz.

AGRADECIMENTOS

Em especial à Dra. Maria de Fátima D. A. Pereira, pela orientação paciente e amiga, e pelo apoio.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, na pessoa da Dra. Olga Yano, pelo fornecimento do material biológico utilizado nesse trabalho.

A todos os amigos e companheiros de departamento, que de modo direto ou indireto, colaboraram para a realização desta pesquisa.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro, na forma de Bolsa de Estudos.

SUMÁRIO

I. Introdução.....	1
II. Material e métodos	
1. Material Biológico.....	12
2. Metodologia	
2.1. Métodos Gerais.....	12
2.2. Obtenção de diferentes tipos de luz.....	13
2.3. Efeito de períodos contínuos de exposição à luz branca, vermelho, vermelho-extremo e azul.....	13
2.4. Efeito de diferentes períodos de exposição à luz branca e vermelho no crescimento.....	13
2.5. Efeito de exposições curtas à luz vermelha.....	14
2.6. Efeito da temperatura.....	14
2.7. Efeito do período de armazenamento.....	14
2.8. Efeito do pré-lavagem.....	15
2.9. Efeito das condições de formação dos propágulos dentro das cestas.....	15
2.10. Efeito da solução mineral.....	16
2.11. Efeito do AIA.....	16
2.12. Aplicação de etrel e de etileno gasoso.....	17
2.13. Utilização de Perclorato de Mercúrio.....	18
2.14. Efeito do AgNO_3	18

2.15. Dosagem de etileno liberado por propágulos.....	19
2.16. Contagem de células.....	19
2.17. Aplicação de 6-BA e cinetina.....	20
2.18. Aplicação do GAg.....	21
2.19. Efeito da luz branca e escuro contínuos na formação de propágulos dentro das cestas.....	21
2.20. Efeito do etrel e AIA na formação de propágulos den- tro das cestas.....	21
2.21. Dosagem de etileno liberado por cestas.....	22
3. Análise estatística.....	22

III. RESULTADOS

A. Propágulos

1. Efeito de luz.....	23
2. Efeito da temperatura.....	32
3. Efeito do período de armazenamento.....	32
4. Efeito da pré-lavagem.....	34
5. Influência das condições ambientais durante a formação dos propágulos nas cestas.....	34
6. Efeito de solução mineral.....	38
7. Efeito de substâncias de crescimento	
7.1. AIA.....	38
7.2. Etileno	
7.2.1. Aplicação de etrel e etileno gasoso.....	41

7.2.2. Determinação de etileno liberado.....	45
7.2.3. AgNO_3	48
7.2.4. Perclorato de Mercúrio.....	48
7.3. Contagem de células.....	51
7.4. Giberelina.....	51
7.5. Citocininas.....	57
 B. Talos	
1. Efeito de luz.....	60
2. AIA e etrel.....	60
3. Dosagem de etileno endógeno.....	63
 IV. DISCUSSÃO	65
 V. CONCLUSÕES.....	79
 VI. RESUMO.....	80
 VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

I. INTRODUÇÃO

Marchantia chenopoda é uma hepática da família Marchantiaceae comum em áreas tropicais e sub-tropicais, portanto em locais quentes e úmidos. O nome hepática advem do fato de algumas plantas deste grupo exibirem um hábito de crescimento que faz com que as plantas se ramifiquem e lembrem os lobos do fígado humano.

São plantas relativamente pequenas, muitas delas menores do que 2 cm, não passando, a maioria, de 20 cm de comprimento. São notavelmente sensíveis à poluição, especialmente ao dióxido de enxofre. A ausência de tecidos vasculares pode ser o fator responsável pelo tamanho reduzido. Consequentemente, não possuem folhas, caules e raízes verdadeiras.

As hepáticas em geral possuem alternância de gerações, ou seja, duas fases reprodutivas: gametofítica e esporofítica. O gametófito adulto é maior e sempre independente quanto à nutrição, taloso e plagiotrópico, plano, ramificado, com simetria dorsiventral, ao passo que os esporófitos são menores (Parihar, 1966).

O ápice de cada ramo é chanfrado e uma região de crescimento está situada na base de cada segmento. Em muitas espécies de Marchantiales, podem ocorrer brotações em resposta a traumatismos ocorridos nesta região do gametófito (Vianna, 1981). Na superfície dorsal, ao longo da nervura mediana, situam-se os órgãos de reprodução vegetativa.

A reprodução vegetativa pode ocorrer de diversas maneiras e nessa família ocorre através de estruturas denominadas propágulos ou gemas.

(figura 1). Estes se desenvolvem em estruturas especiais denominadas cestas ou receptáculos, em forma de taça (Parihar, 1966).

Crescimento, diferenciação e morfogênese são regulados por diversos mecanismos que promovem o desenvolvimento intrínseco das sucessivas fases do ciclo de vida das plantas superiores e inferiores. Tor-na-se simples dizer que esse desenvolvimento envolve um contínuo re-encaminhamento dos padrões metabólicos sob a influência de fatores en-dógenos, mas é ainda difícil dizer como essas mudanças se processam (De Greef & Fredericq, 1983).

Se os eventos de desenvolvimento são controlados por mudanças nas concentrações de substâncias de crescimento e se estas são influencia-das por fatores ambientais (como luz, por exemplo), devem ocorrer mu-danças no nível dessas substâncias de crescimento, acompanhando os diversos estádios de desenvolvimento da planta. O estímulo luminoso induziria um certo processo, ou então, agiria como fator de orientação (Haupt, 1965).

A luz poderia agir aumentando a sensibilidade dos tecidos aos hormônios e, inversamente, a aplicação do hormônio pode intensificar a sensibilidade à luz. Fitocromo e substâncias de crescimento frequen-temente parecem acelerar taxas de reações ou então sincronizar proces-sos mutuamente dependentes (Haupt, 1965).

Há também indicações de que o fitocromo atua a nível de membranas e/ou estruturas a ela ligadas e essas alterações podem afetar a sensi-bilidade do tecido intacto à ação hormonal (Marmé, 1977). Segundo Trebaez & Zawadzki (1985) a luz poderia agir iniciando potenciais de ação indispensáveis para a ocorrência de uma fotorresposta.

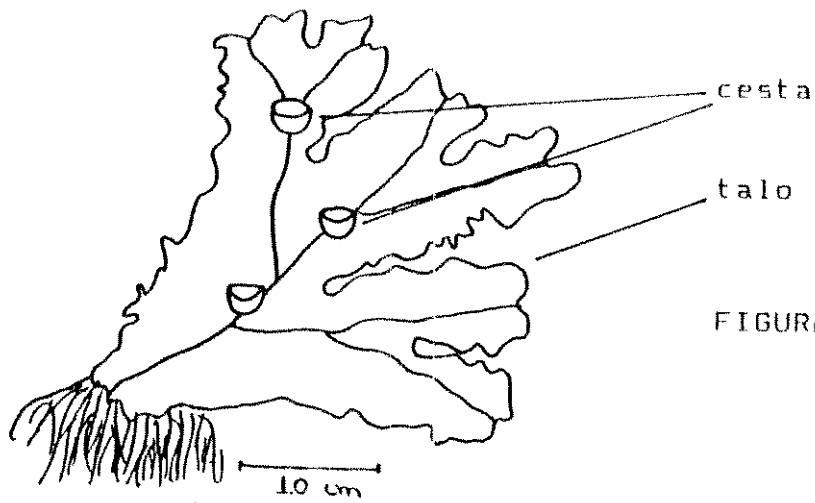
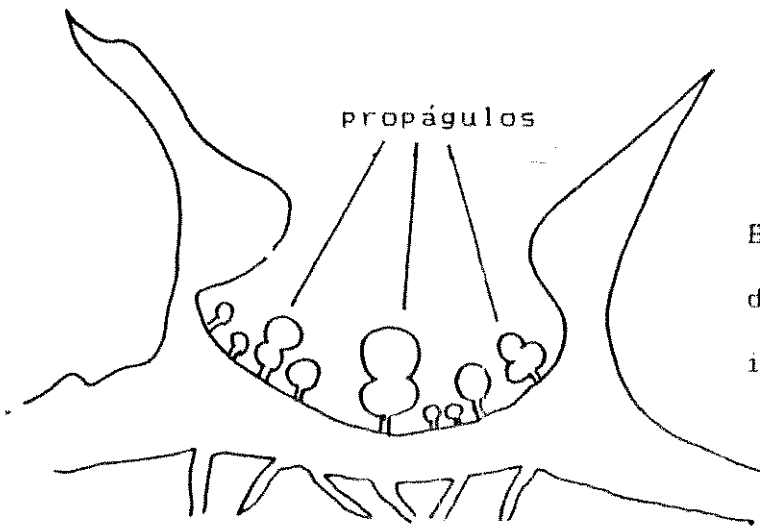


FIGURA 1: A: Talo contendo cestas



B: Esquema de um corte longitudinal de cesta contendo propágulos em início de formação.

Portanto, a luz além de necessária para a fotossíntese e consequentemente para o crescimento de vegetais como fator energético, está ainda envolvida em processos de desenvolvimento como fator morfogênico.

A germinação de propágulos bem como o seu posterior desenvolvimento em talos pode estar condicionada aos mesmos fatores controladores de germinação de sementes de plantas superiores, onde o fenômeno é mais estudado. No entanto não são tão comuns as referências a estudos com briófitas.

Em 1966, Fredericq & De Greef, estudando o efeito da luz, no final do fotoperíodo em Marchantia polymorpha (hepática), verificou que a última irradiação de luz vermelha (V) ou vermelho-extremo (VE) determinava o tipo de crescimento observado nos talos, sugerindo fortemente que tanto a orientação como o crescimento dos talos, seriam controlados pelo sistema fitocromo.

Outros autores, como Sugai & Furuya (1967) estudando o efeito da luz na germinação de esporos de Pteris vittata observaram que a luz V era efetiva na promoção da germinação de esporos dessa espécie enquanto que luz azul e VE inibiam esse processo. Observaram também que o efeito promotor de germinação do V era completamente revertido pelo VE, sugerindo o envolvimento do fitocromo, através da reação de baixa energia. Cerca de 50% da fotorreversibilidade inicial era perdida após 6 horas de escuro, resposta típica do sistema fitocromo.

Taylor & Bonner (1967) mostraram que o pigmento envolvido nas respostas morfogênicas em Mesotaenium (alga) e Sphaerocarpus (hepática) era realmente o fitocromo.

Ainda com relação às plantas inferiores, existem, em pteridófitas estudos bastante detalhados sobre o controle de germinação de esporos e desenvolvimento de protalos pela luz (Furuya, 1983). Também foi demonstrado em Lunularia cruciata que a luz influencia fortemente a germinação de propágulos (Válio & Schwabe, 1969) e também o crescimento dos talos. Nesse caso o fitocromo também estaria envolvido como o pigmento fotorreceptor (Schwabe & Válio, 1970).

Esporos de Onoclea sensibilis também são sensíveis à luz branca e vermelha. Towill & Ikuma (1973), entretanto, não observaram a reversibilidade V-VE. Eles concluíram, com seus experimentos, que o fitocromo seria mascarado por um segundo pigmento que poderia também estar operando como fotorreceptor. No entanto, os autores não fizeram nenhuma proposta quanto à natureza desse pigmento.

Estudos recentes têm revelado que, além do fitocromo, um outro fotorreceptor para o azul também estaria envolvido no controle dos processos morfogênicos em plantas inferiores. Cooke et al (1987) mostraram que esporos de Ceratopteris richardii (samambaia) germinam em luz V e esse efeito é revertido pelo VE. Luz azul também pode inibir a resposta de germinação causada pelo V, sendo esse efeito não revertido por uma subsequente irradiação com VE. Os autores sugerem que o fitocromo, nesse caso, seja o fotorreceptor primário para a germinação de esporos dessa espécie mas outro fotorreceptor para o azul também estaria envolvido. A natureza desse pigmento não está totalmente esclarecida.

Além da luz, temperatura e nutrientes presentes no solo podem controlar o desenvolvimento de vegetais, pois esses fatores, juntamen-

te com água e oxigênio, são essenciais para o crescimento da planta. Diferentes sementes têm diferentes faixas de temperaturas, dentro das quais são capazes de germinar, havendo sempre uma temperatura ótima para a germinação (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1975).

Entretanto a germinação não pode ser caracterizada como um simples efeito de temperatura. Sendo um processo complexo, mudanças na temperatura ambiental afetam certamente cada passo metabólico separadamente e, no final, podem afetar a taxa de germinação das espécies, aumentando ou diminuindo-a. Dessa forma, em plantas superiores regimes de temperatura regulam a germinação por alterar a velocidade das reações bioquímicas e mudar os estados físicos dos componentes celulares (Côme & Tissaoui, 1973). Em plantas inferiores a temperatura também tem um efeito marcante. Em Lunularia cruciata, por exemplo, a produção dos rizóides é dependente da temperatura e da luz. Se propágulos forem transferidos para o escuro, após 2 horas de luz, cerca de 50% vão produzir rizóides e estes são formados em temperaturas variando de 20°C a 25°C. Fora destes limites, a porcentagem cai para zero. (Valio & Schwabe, 1969).

Além de alterar a velocidade das reações metabólicas, a temperatura pode ainda ser um fator limitante para o desenvolvimento das espécies, principalmente por alterar a quantidade de água disponível no sistema, levando a dessecação dos estagios vegetativos, especialmente de plantas inferiores, embora nem todos os tecidos respondam da mesma forma (Sussman, 1965).

As condições de armazenamento das sementes de plantas superiores também podem afetar a porcentagem de germinação em luz ou escuro, au-

mentando-a ou inibindo-a. A maioria das sementes mantém sua viabilidade mesmo após um determinado período de armazenamento (Bewley & Black, 1986).

A taxa de germinação de sementes de plantas superiores pode ainda ser alterada pela presença de inibidores de germinação, que levariam a dormência de certas espécies. Válio & Schwabe (1970) revelaram que o inibidor ativo em Lunularia cruciata era o ácido lunulárico, que seria encontrado em maiores quantidades em tratamentos de dias longos, inibindo o crescimento de propágulos nesse fotoperíodo.

O efeito promotor da lavagem na germinação de sementes tem sido amplamente observado em várias culturas que apresentam dormência devido à presença de inibidores no tegumento (Heydecker et al, 1971). A lavagem das sementes, no entanto, pode diminuir a taxa de germinação das espécies, devido à retirada de substâncias promotoras da germinação (Lagoa, 1989).

Contudo, nem sempre a ocorrência de substâncias inibidoras no tegumento implica em que as mesmas tenham um efeito inibidor na germinação dessas sementes. Neste caso, segundo Válio (1973) o inibidor poderia estar favorecendo o estabelecimento dessa espécie atuando na inibição da germinação de outros indivíduos, reduzindo a competição com outras plântulas (efeito alelopático).

A presença de inibidores pode afetar a distribuição de certas espécies, favorecendo algumas e impedindo a ocorrência de outras, de acordo com a sensibilidade dessas espécies ao inibidor (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1979).

Além da presença de substâncias presentes no tegumento e dos fatores ambientais, deve-se considerar também o controle exercido por fatores endógenos nos processos de desenvolvimento, como as substâncias de crescimento. Tais sinais do ambiente devem ser traduzidos em quantidades de substância de crescimento, de forma que sob condições ideais de crescimento, haja um aumento da produção da substância envolvida (Bandurski, 1984).

O efeito de certos fatores fisiológicos e de desenvolvimento na produção de etileno tem sido examinado em muitos sistemas. Rohwer & Schierle (1982) estudando a interação entre a luz e etileno verificou que a luz poderia agir reduzindo a produção em segmentos de plantas e promovê-la em plantas intactas, dependendo da espécie utilizada. Segundo Edwards (1972) o etileno inibe totalmente a germinação no escuro de esporos de samambaias mas, em luz branca, seu efeito é revertido em cerca de 50%.

Em Marchantia polymorpha, por exemplo, a produção de etileno é estimulada pela luz branca, e esta pode ser controlada por uma irradiação de VE terminal (Veroustraete et al, 1982).

Estudos têm sido feitos no sentido de se esclarecer o mecanismo pelo qual o etileno está envolvido no controle do desenvolvimento de algumas espécies. Em plântulas de ervilha, por exemplo, muitos processos que dependem da divisão celular, são inibidos pelo etileno, como o alongamento de raízes laterais (Apelbaum & Burg, 1972). Em plantas inferiores, segundo Edwards & Miller (1972), esporos de Onoclea sensibilis não tratados com etileno atingem rapidamente o máximo de germinação em baixas intensidades luminosas, enquanto que maiores in-

tensões são necessárias para germinação em culturas tratadas com o gás. Os autores propõem que o mecanismo dessa inibição pelo etileno pode envolver inibição de atividade cromática (replicação cromossômica) ou possivelmente a formação de precursores de ácidos nucleicos.

Além do etileno, auxinas parecem estar envolvidas no controle da germinação de muitas espécies de plantas inferiores. Em propágulos de Lupularia cruciata (De La Rue & Narayanaswami, 1957) foi verificado que estes não germinam enquanto estão na taça devido à auxina que se difunde basipetamente do meristema apical do talo.

Segundo Ward et al (1978), o nível de AIA (ácido indolil-3-acético) em tecidos vegetais pode regular o nível de etileno. Em plantas superiores tal efeito é bastante estudado, sendo que o AIA induziria a produção de ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico), que seria então convertido a etileno.

Também em plantas inferiores, como Eunaria hygrometrica, estudos revelam que o conteúdo de ACC e a formação de etileno são promovidos por AIA exógeno (Rower & Bopp, 1985).

Outras substâncias de crescimento como citocininas e giberelinas têm sido relacionadas ao controle do desenvolvimento de plantas superiores e inferiores.

Em plantas superiores, o efeito de citocininas tem sido relacionado com a indução de divisão celular, embora outros efeitos tenham sido descritos.

Em sementes de feijão, por exemplo, a aplicação de 6-BA induz a atividade enzimática, durante o processo germinativo. O envolvimento das citocininas nesse processo, seria o controle da síntese ou ativa-

ção de enzimas utilizadas na degradação e mobilização das reservas, como a amilase (Metivier & Paulilo, 1980).

Em hepáticas estudos revelaram que a aplicação de citocininas causa uma mudança na forma de crescimento na região de ramificação (Bopp, 1984). Entretanto tais referências não são tão comuns quando se analisa o envolvimento de hormônios no controle do desenvolvimento de espécies inferiores.

São encontrados na literatura vários trabalhos sobre o controle da germinação e desenvolvimento de muitas espécies vegetais por giberelinas. Sabe-se que giberelinas têm influência na germinação de sementes de algumas espécies, por controlar a síntese de amilase e protease. Um dos seus efeitos clássicos é o de alongamento do caule de muitas espécies superiores.

Em plantas inferiores diferentes tipos de giberelinas foram encontradas, sugerindo que possam ser importantes no controle da germinação de algumas espécies, bem como do seu desenvolvimento posterior. Em *L. cruciata*, por exemplo, a aplicação de GA₃ causa inibição do crescimento dos propágulos em luz (Schwabe & Válio, 1970).

A escolha de *Marchantia chenopoda* como objeto de estudo deveu-se ao fato de que existem poucos trabalhos na literatura sobre o controle do desenvolvimento de espécies inferiores. Seu pequeno tamanho e sua rápida germinação, permitiram o uso de muito material em pouco espaço e, conseqüentemente, um grande número de repetições. Além disso, plantas inferiores podem, talvez, simplificar o estudo das reações metabólicas realizados em plantas superiores pela própria característica dos tecidos envolvidos.

Esse trabalho teve como objetivo determinar se o processo de germinação de plantas inferiores é também controlado pelos mesmos fatores que controlam tais processos em plantas superiores. Para isso procurou-se verificar as condições de luz, temperatura e presença de substâncias inibidoras, bem como o envolvimento de substâncias de crescimento, na germinação de propágulos e seu desenvolvimento inicial. Foram ainda estudados alguns aspectos da formação de propágulos no interior dos receptáculos, com o objetivo de se verificar se os fatores controladores dos processos germinativos são os mesmos que controlam a formação destes dentro dos receptáculos.

II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Material Biológico

Os talos adultos de Marchantia chenopoda fornecidos pelo Instituto de Botânica de São Paulo, foram colocados em bandejas com terra e mantidos em câmara úmida em Casa de Vegetação.

II.2. Metodologia

II.2.1. Métodos Gerais

Os propágulos foram retirados dos receptáculos com auxílio de pincel fino e então mantidos em placas de Petri contendo água destilada para evitar a dessecação.

Para montagem dos experimentos os propágulos foram colocados em placas de Petri com 5 cm de diâmetro com uma folha de papel de filtro umedecida com água destilada. Foram utilizadas 4 placas por tratamento com 10 propágulos por placa e mantidas em câmara de germinação a 25°C, em luz branca contínua ou escuro contínuo.

O crescimento foi analisado através do aumento em área (mm^2) cujas medidas foram obtidas com auxílio de microscópio estereoscópico, com retículo micrométrico na ocular.

II.2.2. Obtenção de diferentes tipos de luz

a. luz branca foi obtida com lâmpadas fluorescentes brancas Gro-lux de 20w, marca Sylvania

b. luz vermelha foi obtida pelo uso de lâmpada fluorescente branca e filtro formado por 2 folhas de papel celofane vermelho

c. luz azul foi obtida pelo uso de lâmpada fluorescente branca e filtro formado por 2 folhas de papel celofane azul

d. vermelho-extremo, obtido utilizando-se lâmpada incandescente de 40 W e filtro formado por 3 folhas de papel celofane azul e 2 folhas de papel celofane vermelho

II.2.3. Efeito de períodos contínuos de exposição à luz branca, vermelha, vermelho-extremo e azul

Os propágulos foram colocados nas condições de crescimento descritas no item II.2.1. e mantidos continuamente em luz branca, vermelho, vermelho-extremo, azul e escuro e o crescimento analisado durante 21 dias.

II.2.4. Efeitos de diferentes períodos de exposição à luz branca e vermelha

Foram testados períodos de 48, 72, 96 e 120 horas de luz branca e luz vermelha, sendo os propágulos mantidos nas condições de crescimento descritas no item II.2.1.. Após esse período, os propágulos foram

transferidos para o escuro até se completarem 14 dias do início do experimento. Depois do período de escuro, foram novamente transferidos para luz branca e luz vermelha, respectivamente, até que se completassem 21 dias do início dos experimentos.

II.2.5. Efeito de exposições curtas à luz vermelha

Mantidos nas mesmas condições descritas do item II.2.1., propágulos foram submetidos a 2 horas de luz vermelha e depois transferidos para o escuro, onde foram mantidos por 22 horas, após esse período de escuro, nova exposição de 2 horas foi feita e assim subsequentemente por 3 e 5 dias, quando então foram transferidos para o escuro até que se completassem 14 dias desde o início dos experimentos.

II.2.6. Efeito da temperatura

Os propágulos foram preparados conforme descrição do item II.2.1. e mantidos em temperaturas constantes de 15°C, 20°C, 25°C, 30°C e 35°C, durante 14 dias sob luz branca contínua em câmara de germinação.

II.2.7. Efeito do período de armazenamento

Propágulos retirados dos receptáculos foram armazenados em frascos escuros com água destilada, à temperatura ambiente por períodos de até 130 dias.

Após o armazenamento, foram colocados para germinar em luz branca e escuro contínuos, segundo as condições descritas no item II.2.1.. Esse efeito foi analisado durante um período de 14 dias, tendo como controle propágulos recém-colhidos dos receptáculos.

II.2.8. Efeito da pré-lavagem

Os propágulos foram colocados em frascos de 200 ml cobertos com gaze e algodão lavados em água corrente por 6 horas. Após esse período foram mantidos conforme o item II.2.1, e o crescimento analisado durante 14 dias.

II.2.9. Efeito das condições de formação dos propágulos dentro das cestas

Porções apicais de talos com aproximadamente 5 mm de tamanho contendo cestas foram removidas e colocadas em placas de Petri com 5 cm de diametro com uma folha de papel de filtro umedecida com água destilada. Foram utilizadas 4 placas por tratamento e em cada uma foram colocados 8 secções de talos contendo cestas e mantidas em luz branca e escuro contínuos. Após a formação dos propágulos dentro das cestas, estes foram removidos com auxílio de pincel fino e colocados para crescer segundo as mesmas condições descritas no item II.2.1.. Como controle, utilizaram-se propágulos formados em condições naturais (em casa de vegetação).

II.2.10. Efeito da solução mineral

Propágulos retirados dos receptáculos foram colocados sobre solução nutritiva mineral utilizada em hepáticas (Válvio, 1969) sendo alguns dos sais modificados. Os propágulos foram mantidos em luz branca e escuro contínuos.

A solução nutritiva foi preparada com a seguinte composição:

Sais	mg/250 ml
NaNO_3	0,114
Na_2HPO_4	0,0148
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,158
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0277
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0312
K_2SO_4	0,0462
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,001

A solução de cloreto de ferro foi somente adicionada no momento da montagem do experimento.

II.2.11. Efeito do AIA

Os propágulos foram mantidos nas mesmas condições de crescimento descritas no item II.2.1., sendo o papel de filtro umedecido com solu-

ções de diferentes concentrações de ácido indolil-3-acético (AIA). As concentrações usadas foram $10^{-3}M$, $10^{-4}M$, $10^{-5}M$, $10^{-6}M$ e os propágulos mantidos em luz branca e escuro contínuos.

Sendo o AIA uma substância rapidamente oxidada em presença de luz, esta foi reaplicada após 7 dias do início dos experimentos.

Para tal, o papel de filtro contendo os propágulos foi cuidadosamente retirado com auxílio de pinça e então embebido em H_2O destilada, para efetuar a lavagem e evitar um possível excesso da solução de AIA; depois disso, foram colocados sobre papel absorvente para secagem e então recolocados nas placas de Petri, onde nova solução foi aplicada.

II.2.12. Aplicação de etrel e de etileno gasoso

Com o intuito de estudar o envolvimento do etileno no crescimento inicial de talos, propágulos foram mantidos em presença de soluções de etrel com diferentes concentrações ($3 \times 10^{-3}M$, $10^{-3}M$, $7 \times 10^{-4}M$, $5 \times 10^{-4}M$, $10^{-4}M$, $10^{-5}M$ e $10^{-6}M$) e mantidos em luz e escuro contínuos.

A aplicação de etileno gasoso em propágulos crescendo em luz branca também foi feita. Propágulos foram colocados em vidros pequenos com tampa de borracha e vedados com parafilme e filme de PVC. O espaço interno foi preenchido com bolinhas de vidro até que o volume interno fosse igual a 6 ml e sobre elas foi colocada uma folha de papel de filtro umedecida com água destilada contendo 10 propágulos por vidro. Foram aplicados 2 ml de etileno gasoso na concentração de 10 ppm e foram usadas como controle amostras sem aplicação do gás fechadas hermeticamente e amostras abertas. O crescimento foi medido atra-

vés do aumento em área após 5, 7 e 11 dias.

II.2.13. Utilização de perclorato de mercúrio

Propágulos foram colocados em frascos erlenmeyer de 125 ml e vedados com filme de PVC. Para diminuir o volume interno, foram colocadas bolinhas de vidro até que fosse deixado livre o volume de 100 ml.

Sobre as bolinhas colocou-se um tubo de vidro de 5 ml, contendo 1.0 ml das soluções de perclorato 0.25 M e água destilada (controle). Sobre a superfície ao redor do tubo de vidro foi colocada uma folha de papel de filtro umedecido com água destilada contendo 20 propágulos e os resultados verificados após 5, 7 e 10 dias.

A solução foi preparada modificando a descrita por Abeles (1973). A 70 ml de água destilada foram misturados vagarosamente (com auxílio de bastão) 180 ml de ácido perclórico. Depois disso, adicionaram-se 54,0 gramas de óxido de mercúrio. A solução final foi filtrada através de fibra de vidro.

II.2.14. Efeito do AgNO_3

Os propágulos foram mantidos nas mesmas condições de crescimento descritas no item II.2.1. e colocados em diferentes concentrações de AgNO_3 . Foram utilizadas as concentrações de $0.6 \times 10^{-5} \text{M}$, $1.5 \times 10^{-5} \text{M}$ e $3 \times 10^{-5} \text{M}$.

II.2.15. Dosagem de etileno liberado por propágulos

Os propágulos foram colocados em vidros pequenos com tampa de borracha e vedados com parafilme e filme de PVC. Para diminuir o espaço interno do vidro e concentrar a amostra este foi preenchido com bolinhas de vidro até que o volume interno fosse de 6.0 ml. Sobre as bolinhas foi colocada uma folha de papel de filtro umedecida com água destilada ou AIA $10^{-4}M$ com 10 e 60 propágulos por vidro. Foram utilizados 12 repetições por tratamento, mantidos em luz branca ou escuro contínuos por 5, 7 e 11 dias.

Para se efetuarem as medidas de etileno liberado 1 ml de ar coletado das amostras foi injetado em um cromatógrafo Varian, modelo 2.240-D, equipado com coluna de Poropak T, com dimensões de 1 m x 0.2 mm (diâmetro interno) e detector de ionização de chama. O forno do aparelho foi mantido a $110^{\circ}C$ e o gás de arraste utilizado foi o Nitrogênio.

A concentração desejada de etileno padrão (5 ppm) foi obtida com auxílio de uma seringa (1 ml), retirando-se 0.3 ml de etileno (gás) do balão e injetando-se em um vidro cujo volume interno era de 600 ml, obtendo-se assim uma mistura de 500 ppm, fazendo-se posteriores diluições.

II.2.16. Contagem de células

Foi feita a estimativa do número de células de propágulos com 0, 4, 6, 8, 11 e 14 dias, segundo o método para separação de células des-

crito por Brown & Rickless (1949).

Os propágulos foram colocados para crescer em placas de Petri de 10 cm de diâmetro com uma folha de papel de filtro umedecida com água ou com a solução cujo efeito se estava verificando. Foram utilizadas 4 placas contendo 40 propágulos cada uma. As placas foram mantidas em caixas "gerbox" em câmara de germinação a 25°C em luz branca contínua.

Após diferentes períodos de crescimento os propágulos foram retirados do papel de filtro com auxílio de pincel fino e então colocados em bequeres contendo 0.5 ml de ácido crômico 5% e deixados a temperatura ambiente por 27 horas. Após esse período o material foi macerado com auxílio de bastão fino de vidro por aproximadamente 5 minutos; foram passados através de pipeta Pasteur repetidas vezes, sob sucção e pressão e posteriormente através de seringa de 1 ml, para separação das células.

A contagem de células foi feita com auxílio de câmara de Newbauer e microscópio ótico. Foram coletadas 3 alíquotas de cada amostra.

II.2.17. Aplicação de 6-BA e cinetina

Os propágulos foram tratados com diferentes concentrações de 6-Benziladenina ($4 \times 10^{-5}M$, $2 \times 10^{-5}M$ e $10^{-5}M$) e cinetina ($4 \times 10^{-5}M$, $2 \times 10^{-5}M$ e $10^{-5}M$) aplicadas sobre o papel de filtro e mantidos nas condições de crescimento do item II.2.1.

II.2.18. Aplicação do GA₃

Com o objetivo de estudar o efeito de giberelina no crescimento inicial de talos, procedeu-se ao tratamento com GA₃ nas concentrações de 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} M, que foi aplicado para umedecer o papel de filtro em substituição à água destilada do controle.

II.2.19. Efeito da luz branca e escuro contínuos na formação de propágulos dentro das cestas.

Porções apicais de talos de Marchantia chenopoda contendo cestas foram colocadas nas mesmas condições descritas no item II.2.9.. Foi verificada a formação dos propágulos dentro das cestas durante 14 dias. Os dados foram expressos em % de cestas com propágulos em seu interior.

II.2.20. Efeito do etrel e AIA na formação de propágulos dentro das cestas

Secções de talos contendo cestas das quais os propágulos foram retirados com auxílio de pincel fino, foram colocadas em placas de Petri de 5 cm de diâmetro. Foram aplicados etrel e AIA nas concentrações de 10^{-4} M e 5×10^{-4} M respectivamente, com auxílio de microseringa, dentro das cestas de modo a completar o volume interno das mesmas.

Também testou-se a aplicação das soluções no papel de filtro, ao invés da aplicação dentro das cestas. Os resultados foram observados

por vários períodos até 14 dias e os dados expressos em % de cestas com de propágulos.

II.2.21. Dosagem de etileno liberado por cestas

Utilizando-se o mesmo método descrito no item II.2.16., observou-se a liberação de etileno em porções apicais de talos sem cestas e porções apicais de talos com cestas mas sem propágulos. Foram colocadas 8 cestas por vidro e a análise feita após 7 e 11 dias.

II.3. Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente através de análise de variância e o cálculo da Diferença Mínima Significativa (DMS) foi feito a nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. As diferenças significativas são representadas nos gráficos através de barras verticais. Quando se fez a comparação de apenas 2 valores médios utilizou-se o Teste "t" de Student.

III. RESULTADOS

A. Propágulos

1. Efeito de luz

Pelos resultados representados na figura 2 observa-se que o crescimento inicial dos talos a partir de propágulos ocorre em presença de luz branca e vermelha. Em luz vermelha contínua, o crescimento em área é mais lento quando comparado à luz branca contínua, sendo essa diferença mantida até o 14^o dia. Após esse período, observa-se que os propágulos crescidos em luz branca apresentam o mesmo padrão de crescimento daqueles crescidos em luz vermelha, não sendo mais observada diferença significativa entre os dois tratamentos. Em presença de escuro ou VE contínuos não se observou crescimento. A figura 3 mostra que em presença de luz azul contínua também não ocorre crescimento de propágulos.

Com o objetivo de se determinar a necessidade de um período mínimo de luz necessário para a indução do crescimento de talos a partir de propágulos, no escuro, foram feitas exposições à luz branca por diferentes períodos. Exposições de 48 horas não induziram o crescimento no escuro (figura 4). O mesmo resultado foi obtido quando o tempo de exposição foi aumentado para 72, 96 e 120 horas (figura 5). Além dis

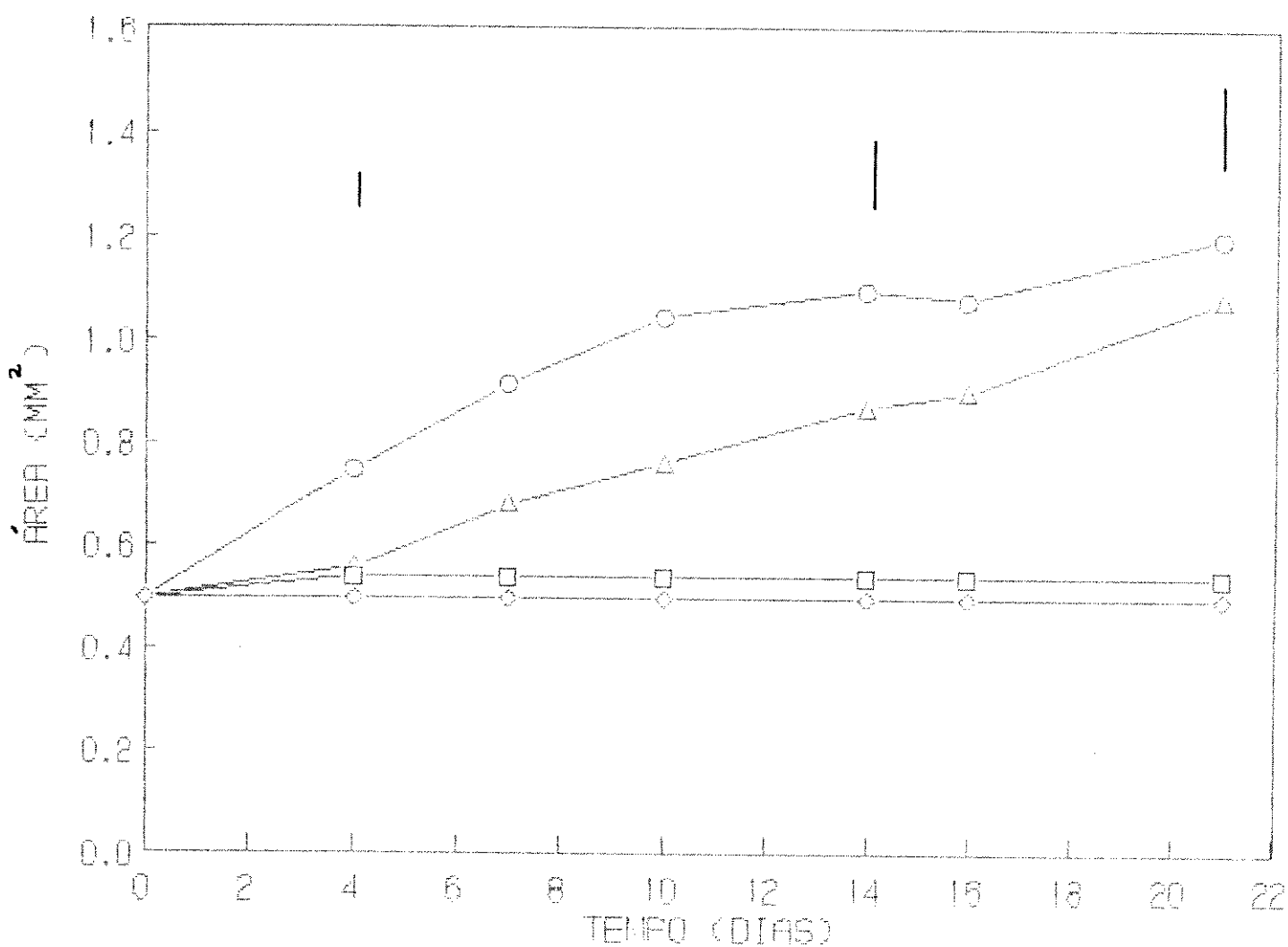


FIGURA 2: Efeito da exposição à luz branca (O), vermelho (Δ), vermelho-extremo (□) e escuro (◇) contínuos no crescimento em área de propágulos de M. chenopoda.
| - DMS 5%

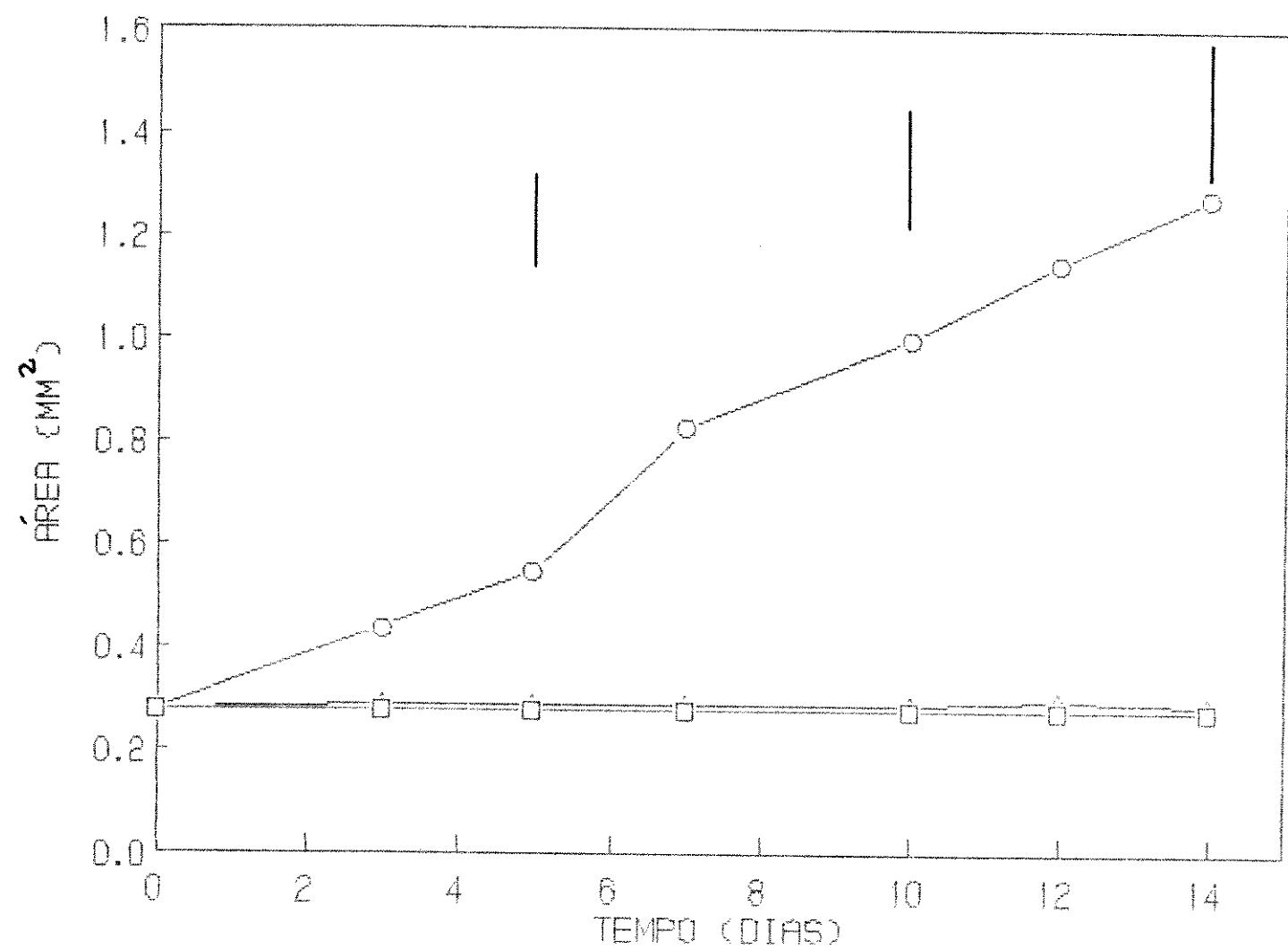


FIGURA 3: Efeito da luz branca (O), luz azul (Δ) e escuro contínuo (□) no crescimento em área de proglutinos de *M. chenopoda*
|- DMS 5%

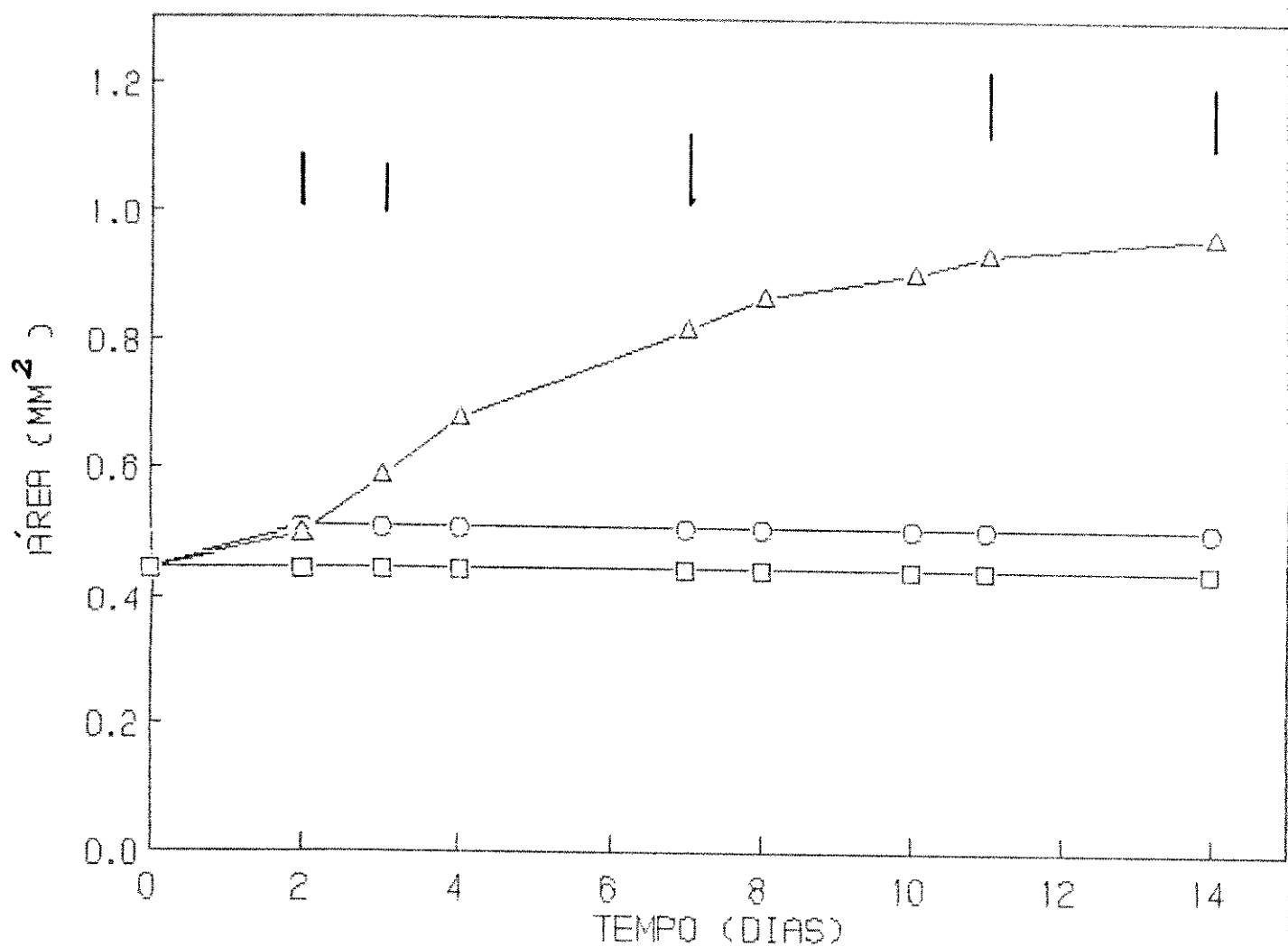


FIGURA 4: Efeito de exposição à luz branca no crescimento propágulos submetidos a 48 horas de luz branca (○) em comparação com propágulos crescidos em luz branca contínua (Δ) e em escuro contínuo (□).
 | - DMS 5%

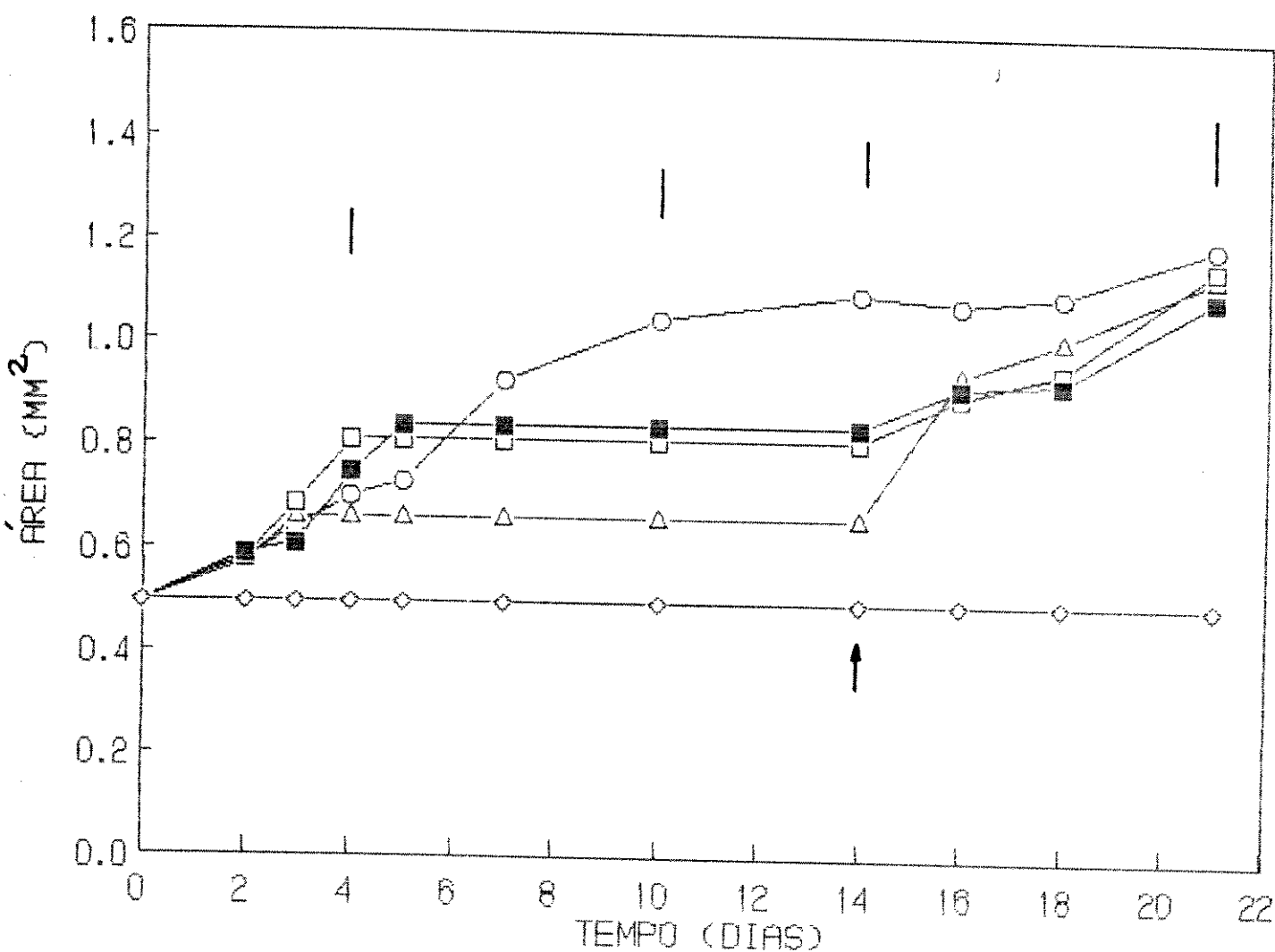


FIGURA 5: Efeito do tempo de exposição à luz branca no crescimento de propágulos. A seta indica o momento de transferência dos propágulos do escuro para luz. | - DMS 5%

O - luz branca contínua
 Δ - 72 horas de luz
 ■ - 120 horas de luz

◇ - escuro
 □ - 96 horas de luz

so, a transferência destes propágulos do escuro para a luz branca causa retomada do crescimento e o efeito do escuro é totalmente revertido após 7 dias da transferência.

O mesmo padrão de resposta foi observado quando propágulos foram expostos à luz vermelha por diferentes períodos e depois mantidos em escuro contínuo. O crescimento ocorre quando os propágulos estão na presença de luz e cessa quando são transferidos para o escuro. Da mesma forma, após 7 dias da transferência do escuro para a luz não há mais diferença significativa entre todos os tratamentos (figura 6).

Analisando-se os efeitos de luz branca e luz vermelha separadamente sobre o crescimento, com diferentes durações de exposição observou-se que, até 14 dias após o início do experimento, o crescimento em área é maior quando propágulos recebem luz branca do que quando recebem luz vermelha, independentemente da duração do tratamento. Sete dias após a transferência desses propágulos para a luz, essa diferença não é mais significativa (figura 7).

Pela tabela I observa-se que exposições de 2 horas a luz vermelha não são suficientes para induzir o crescimento no escuro, mesmo com 5 exposições. Após a transferência dos propágulos para o escuro, num período de 14 dias não foi observado crescimento.

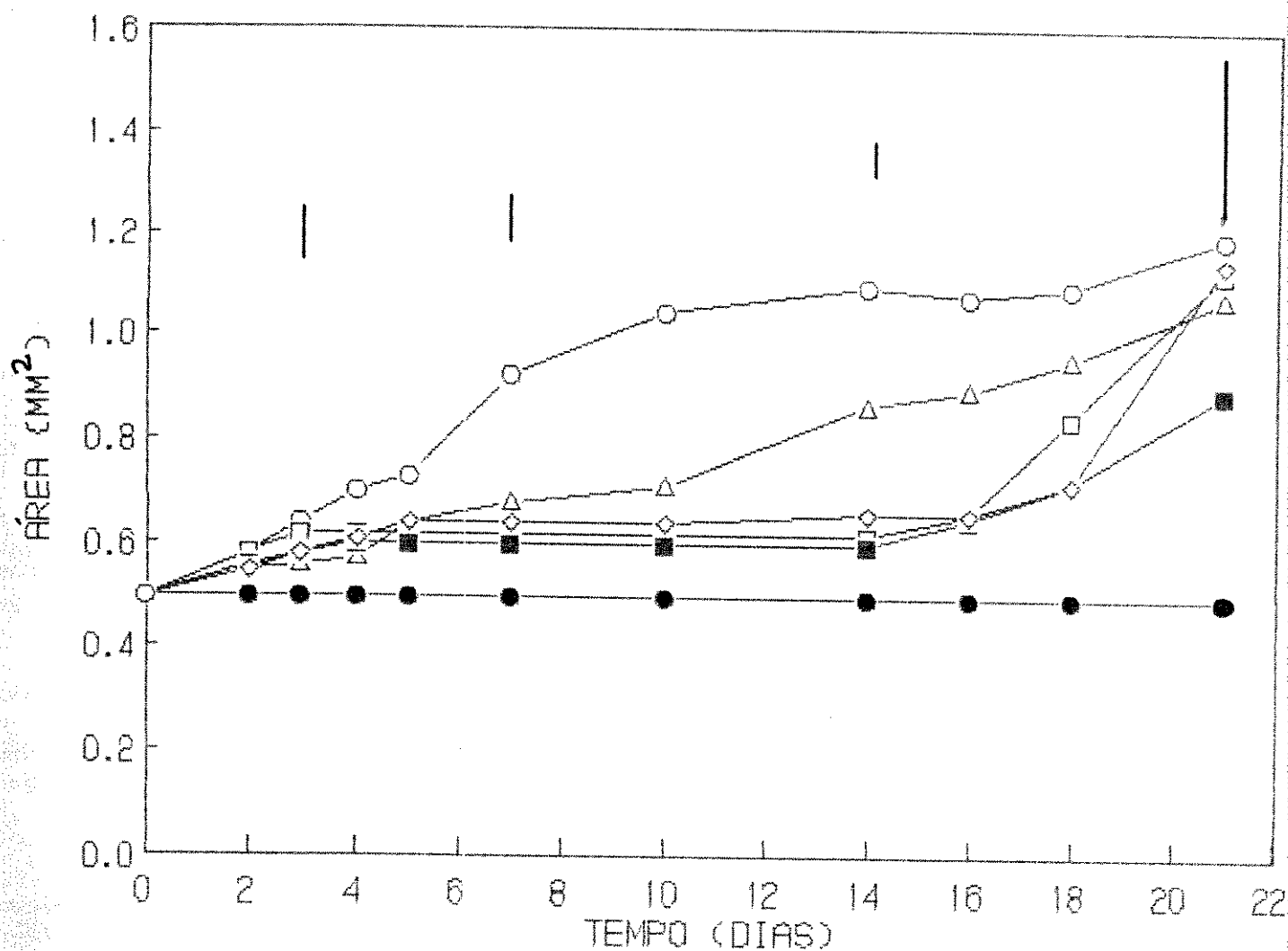


FIGURA 6: Efeito do tempo de exposição à luz vermelha no crescimento de propágulos. A seta indica o momento de transferência do escuro para a luz.
 | - DMS 5%

○ - luz branca contínua
 Δ - luz vermelha contínua
 ■ - 72 horas de luz
 ◇ - 120 horas de luz

● - escuro
 □ - 96 horas de luz

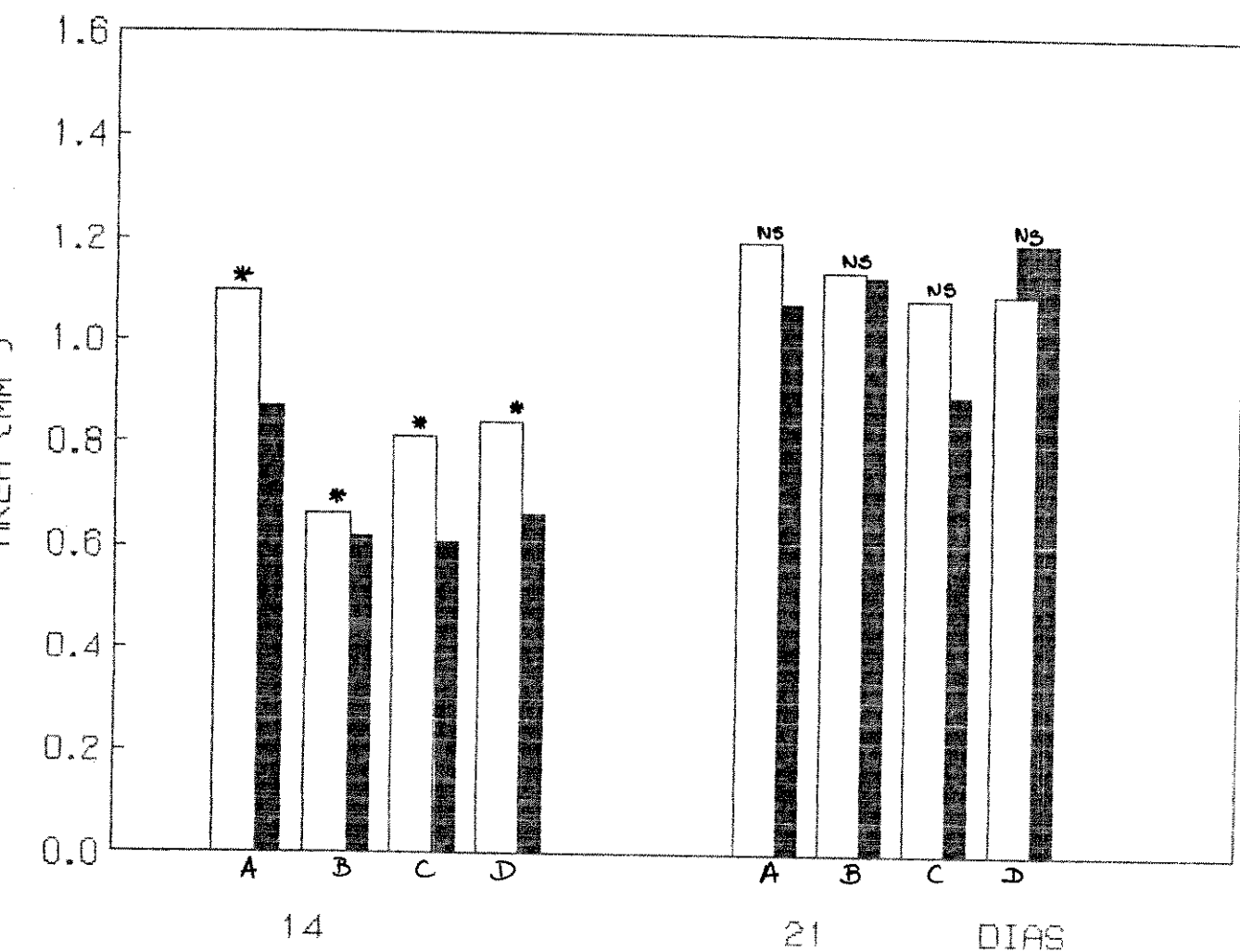


FIGURA 7: Efeito de luz branca (□) ou vermelho (■), com diferentes durações de exposição, no crescimento de propágulos, após 14 e 21 dias.

A. luz contínua

B. 72 horas de luz

C. 96 horas de luz

D. 120 horas de luz

* - diferença significativa a nível de 5% de probabilidade entre luz branca e vermelho; n.s. - não há diferença significativa.

TABELA I: Efeito de exposições curtas de vermelho (2 horas) no crescimento em área (mm^2) de propágulos.

T₃- 2 hs de LV + 22 hs de escuro por dia durante 3 dias

T₅- 2 hs de LV + 22 hs de escuro por dia durante 5 dias

Após esse período, transferiu-se os tratamentos para escuro contínuo.

ÉPOCA DA OBSERVAÇÃO

TRATAMENTOS

	T ₃	T ₅
INICIAL	0.36	0.36
APÓS TRATAMENTO	0.37	0.37
APÓS 14 DIAS	0.37	0.37

2. Efeito da temperatura

O efeito de diferentes temperaturas no crescimento de talos, a partir de propágulos está representado na figura 8. Observa-se que temperaturas de 20°C e 25°C são, dentre as testadas, as mais favoráveis ao crescimento de propágulos de *M. chelonoides*. Embora haja uma diferença inicial na velocidade de crescimento entre 20°C e 25°C, uma vez que até 4 dias a área alcançada pelos propágulos no tratamento de 25°C é superior a 20°C, sendo que após esse período não há mais diferença significativa. Temperaturas de 15°C e 30°C retardaram o desenvolvimento dos propágulos. A temperatura de 35°C também foi testada, no entanto causa a perda de clorofila, ficando o material com coloração marrom, levando a morte após 4 dias do início dos experimentos, e por isso os dados não são apresentados na figura.

3. Efeito do período de armazenamento

Durante a fase de reprodução sexuada de *M. chelonoides* ocorre uma diminuição na formação de propágulos dentro das cestas. Tal fato poderia prejudicar a obtenção de propágulos para a realização dos experimentos. Diante disso, foram feitos experimentos com o objetivo de se determinar se o período de armazenamento teria efeito no crescimento inicial dos propágulos. Observou-se que em propágulos armazenados por períodos de 15 e 60 dias, o crescimento foi idêntico ao observado

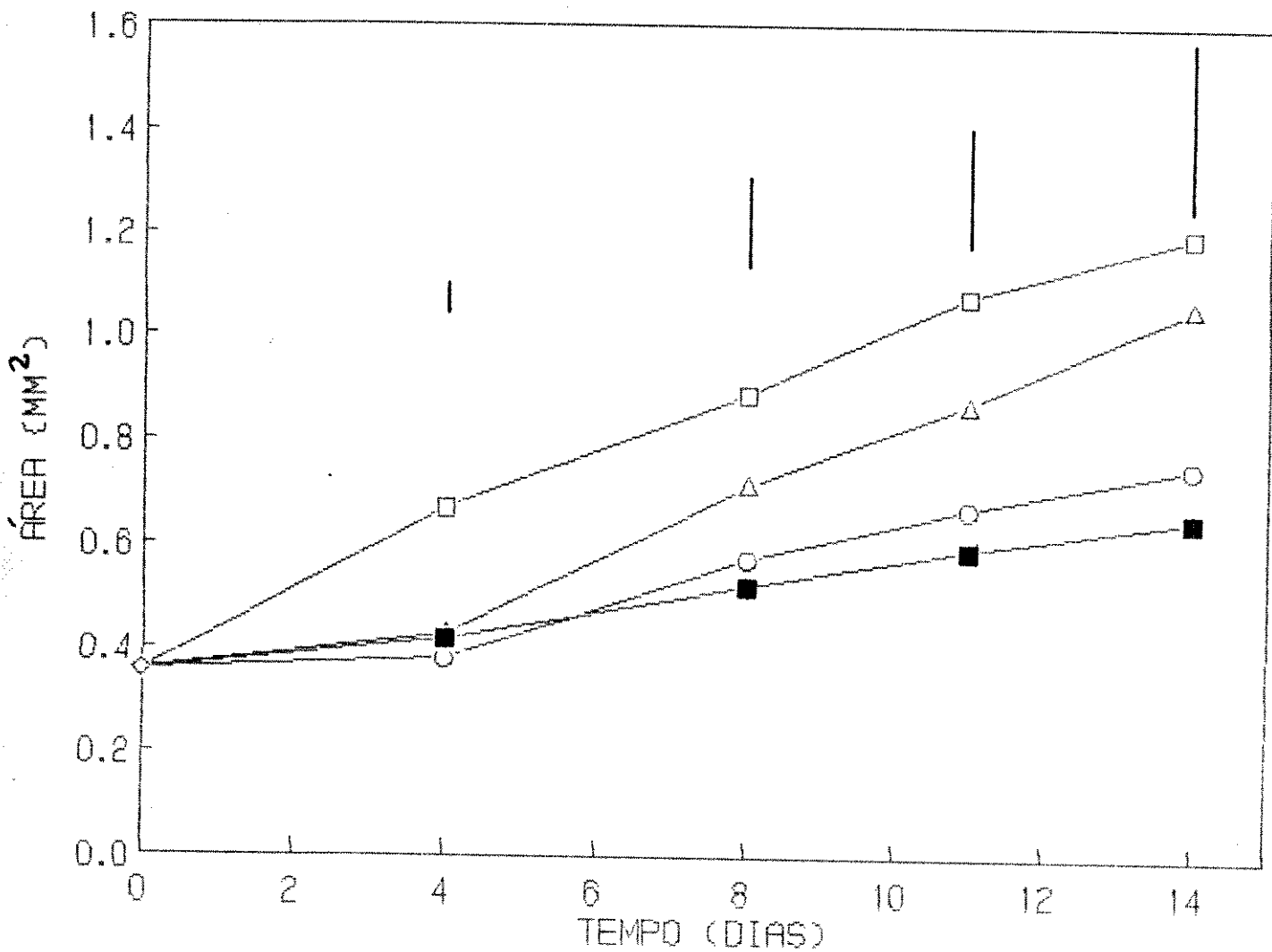


FIGURA 8: Efeito de diferentes temperaturas no crescimento de propágulos em luz contínua.

— DMS 5%

○ - 15°C
□ - 25°C

△ - 20°C
■ - 30°C

em propágulos recém-colhidos (controle). O crescimento inicial de propágulos armazenados por 130 dias foi ligeira, embora significativamente inferior ao controle, até o 4º dia. Após esse período, não foi verificada qualquer diferença entre os propágulos armazenados e os recém coletados (figura 9).

4. Efeito da pré-lavagem

Com o objetivo de se estudar o possível envolvimento de substâncias inibidoras no crescimento inicial de talos no escuro, testou-se o efeito da pré-lavagem dos propágulos por 6 horas. Observa-se pelos resultados obtidos que não ocorre crescimento no escuro, mesmo com a lavagem inicial. Em luz branca, o crescimento de propágulos pré-lavados é semelhante ao observado em propágulos recém-colhidos (figura 10).

5. Influência das condições ambientais durante a formação dos propágulos nas cestas no seu crescimento posterior

O crescimento, em área, de propágulos formados em diferentes condições ambientais também foi analisado. Os resultados apresentados na figura 11 mostram que propágulos formados em cestas que permaneceram

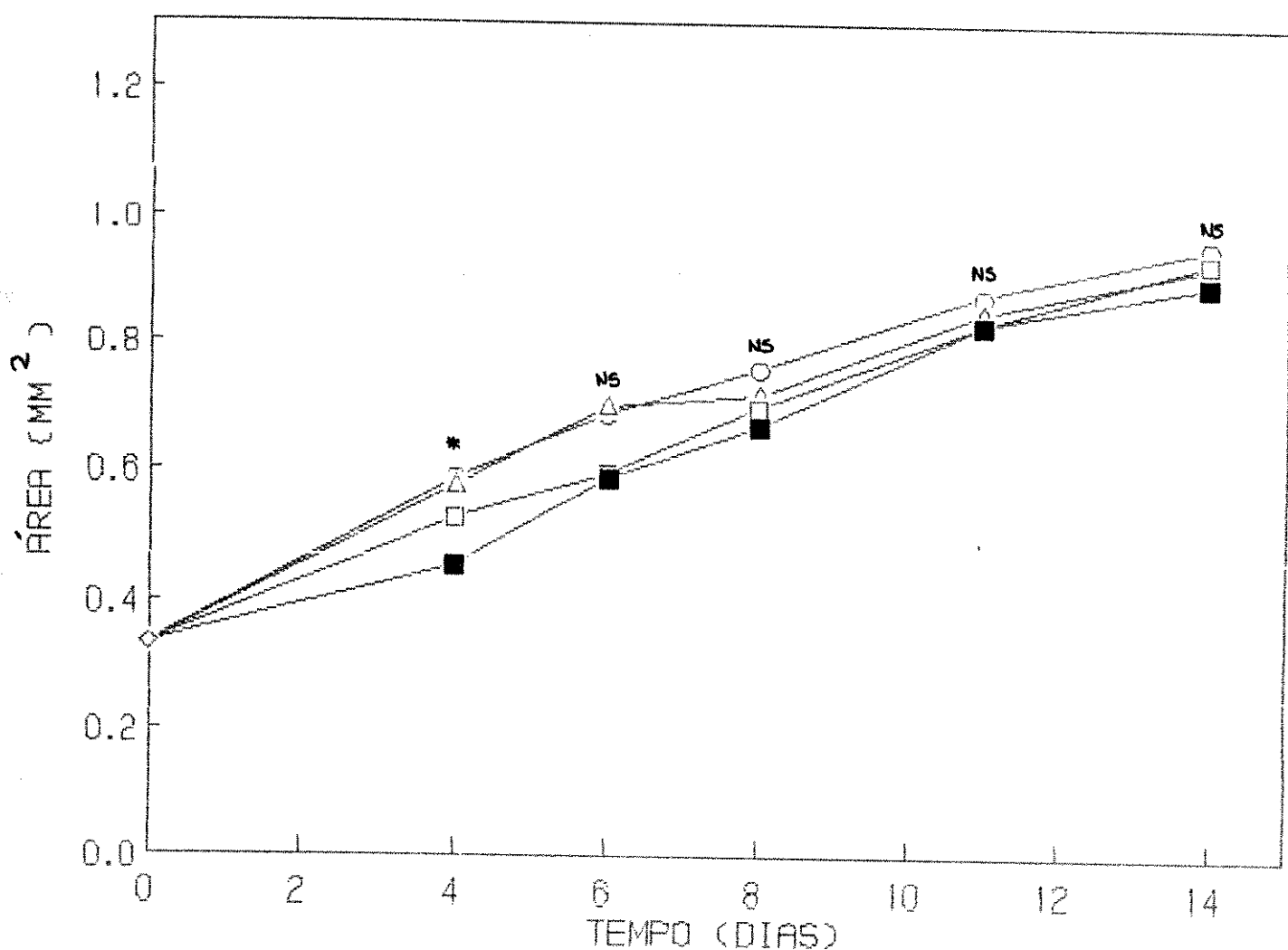


FIGURA 9: Efeito do período de armazenamento no crescimento de propágulos de *M. chenopoda*.

* - diferença significativa a nível de 5%; n.s. não há diferença entre os tratamentos.

O - recém-colhidos

□ - armazenamento por 15 dias

Δ - armazenamento por 60 dias

■ - armazenamento por 130 dias

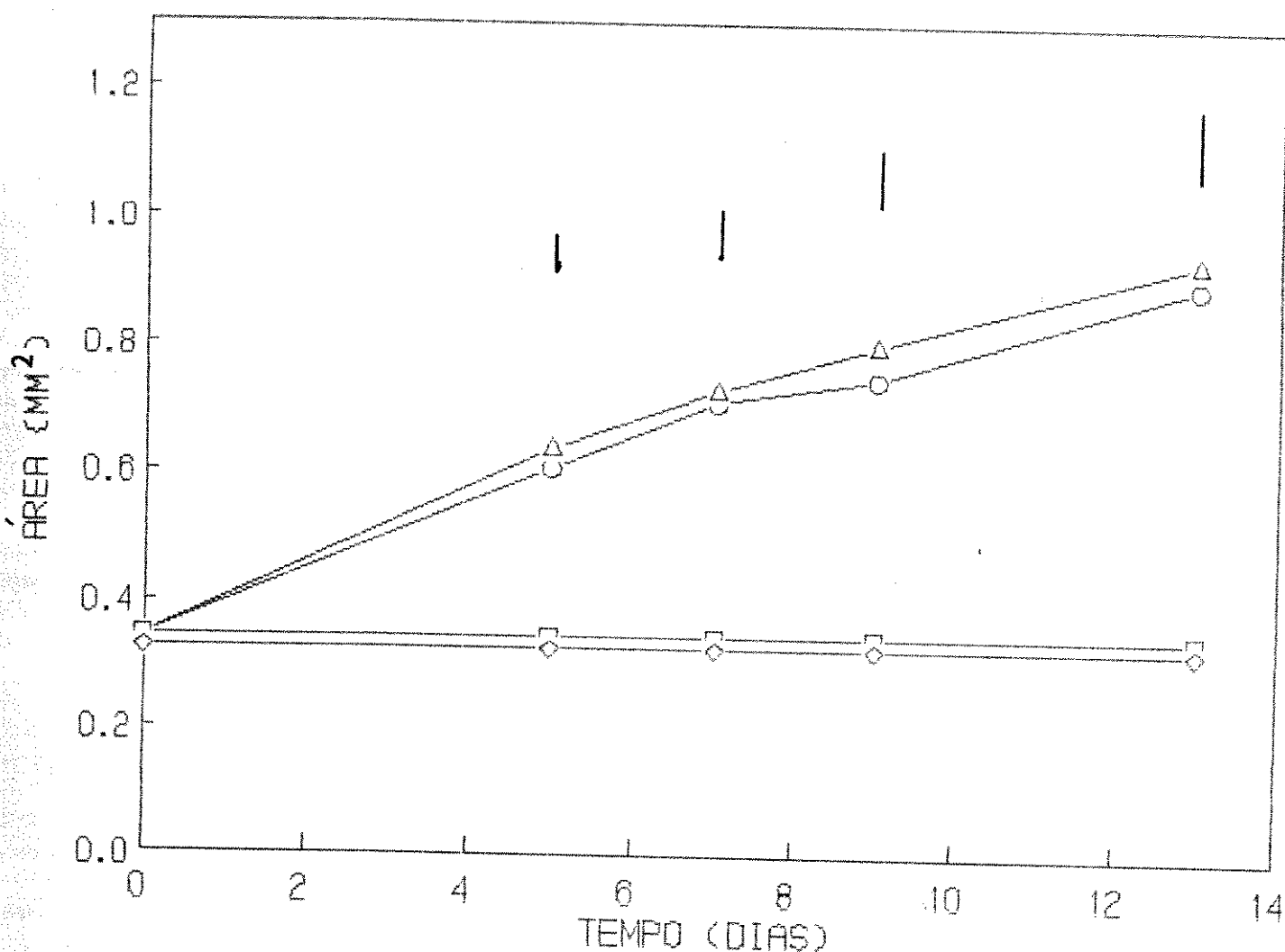


FIGURA 10: Efeito da pré-lavagem no crescimento inicial de propágulos de M. chenopoda em presença de luz branca e escuro contínuos.
 | - DMS 5%

- Em luz
- - propágulos submetidos a pré-lavagem
 - △ - propágulos recém-colhidos
- Em escuro
- - propágulos submetidos a pré-lavagem
 - ◇ - propágulos recém-colhidos

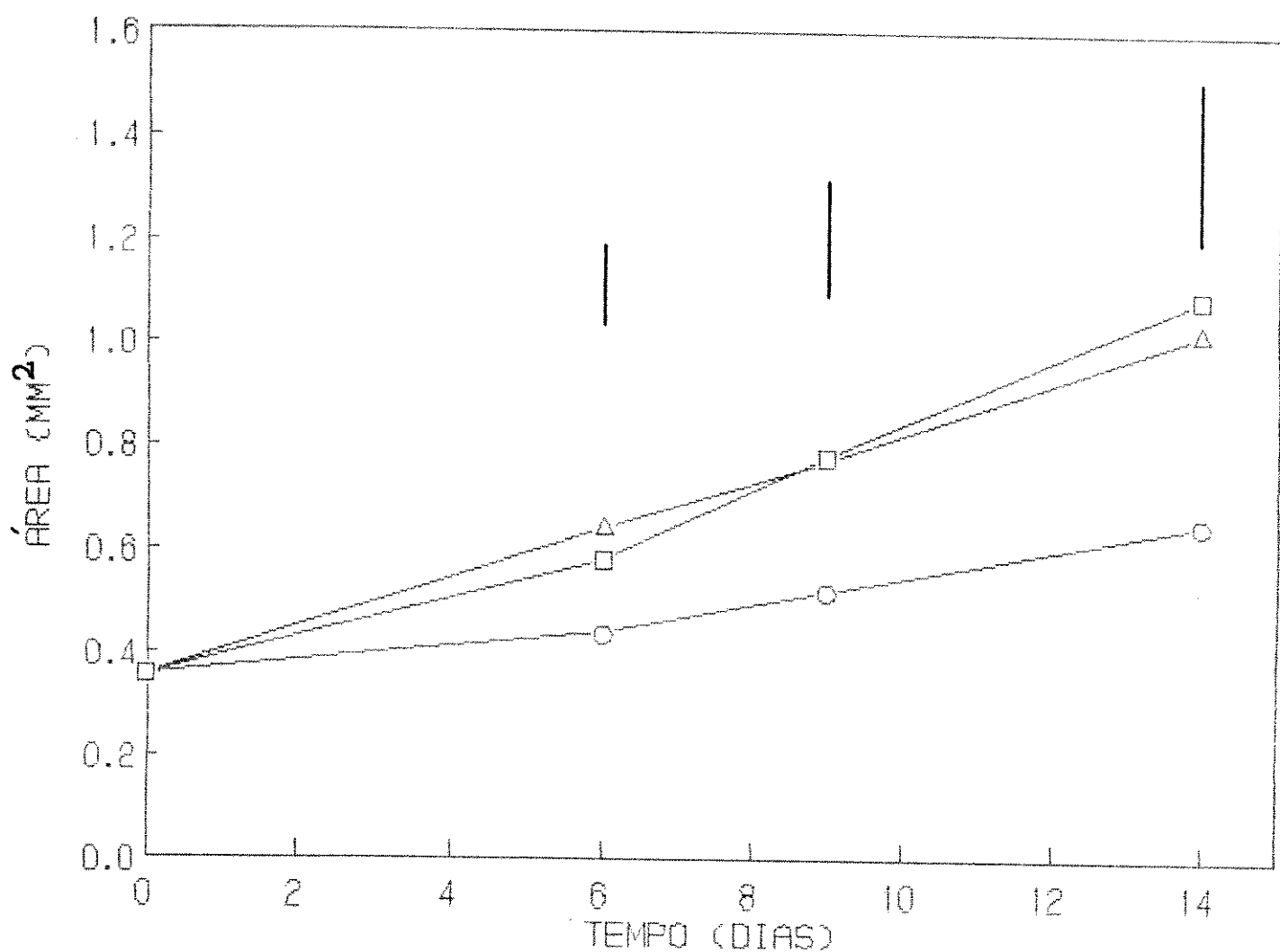


FIGURA 11: Crescimento em área de propágulos formados em escuro contínuo, luz branca e condições naturais (casa de vegetação)

| - DMS 5%

- O - luz contínua
- - escuro contínuo
- Δ - condições naturais

em condições naturais (casa de vegetação) ou escuro contínuo tiveram um padrão de crescimento semelhante e alcançaram no período de experimento, área bastante superior àquela alcançada pelos propágulos formados em luz branca contínua.

6. Efeito de solução mineral

Foi verificado o efeito de nutrição mineral sobre o crescimento de propágulos e os resultados estão apresentados na figura 12. Observa-se que em presença da solução, o crescimento dos propágulos em luz branca contínua é duas vezes maior que o observado quando estes estão em água destilada. Em escuro contínuo não ocorre crescimento mesmo em presença da solução mineral.

7. Efeito de substâncias de crescimento

7.1. AIA

A figura 13 mostra o efeito da auxina no crescimento de propágulos. Observa-se que em presença de AIA nas concentrações de $10^{-4}M$, $10^{-5}M$, $10^{-6}M$ o crescimento é o mesmo observado quando comparado

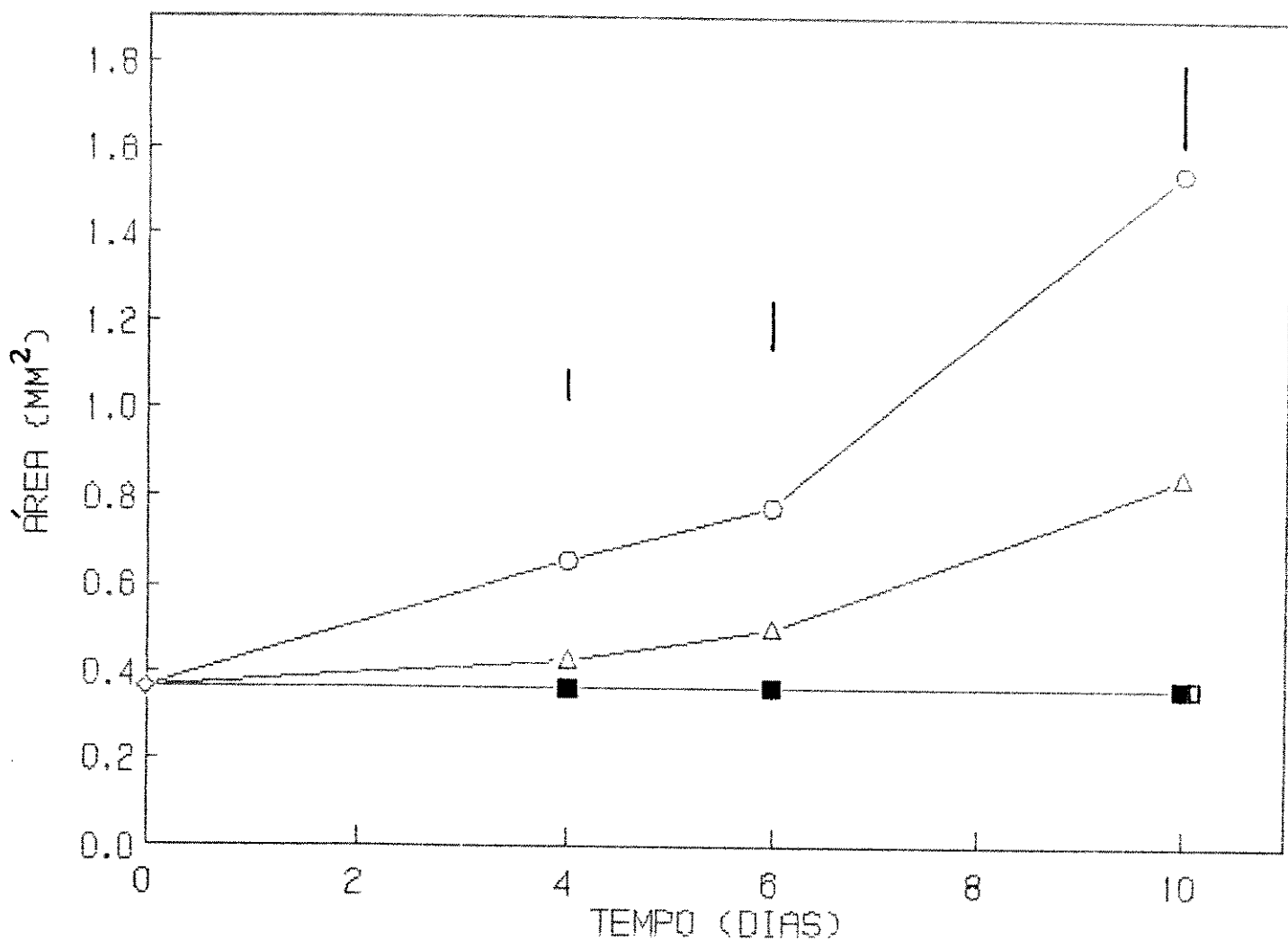


FIGURA 12: Crescimento de propágulos de *M. chenopoda* em água e solução nutritiva em luz e escuro contínuos
- DMS 5%

Em luz

○ - solução nutritiva
△ - água

Em escuro

□ - solução nutritiva
■ - água

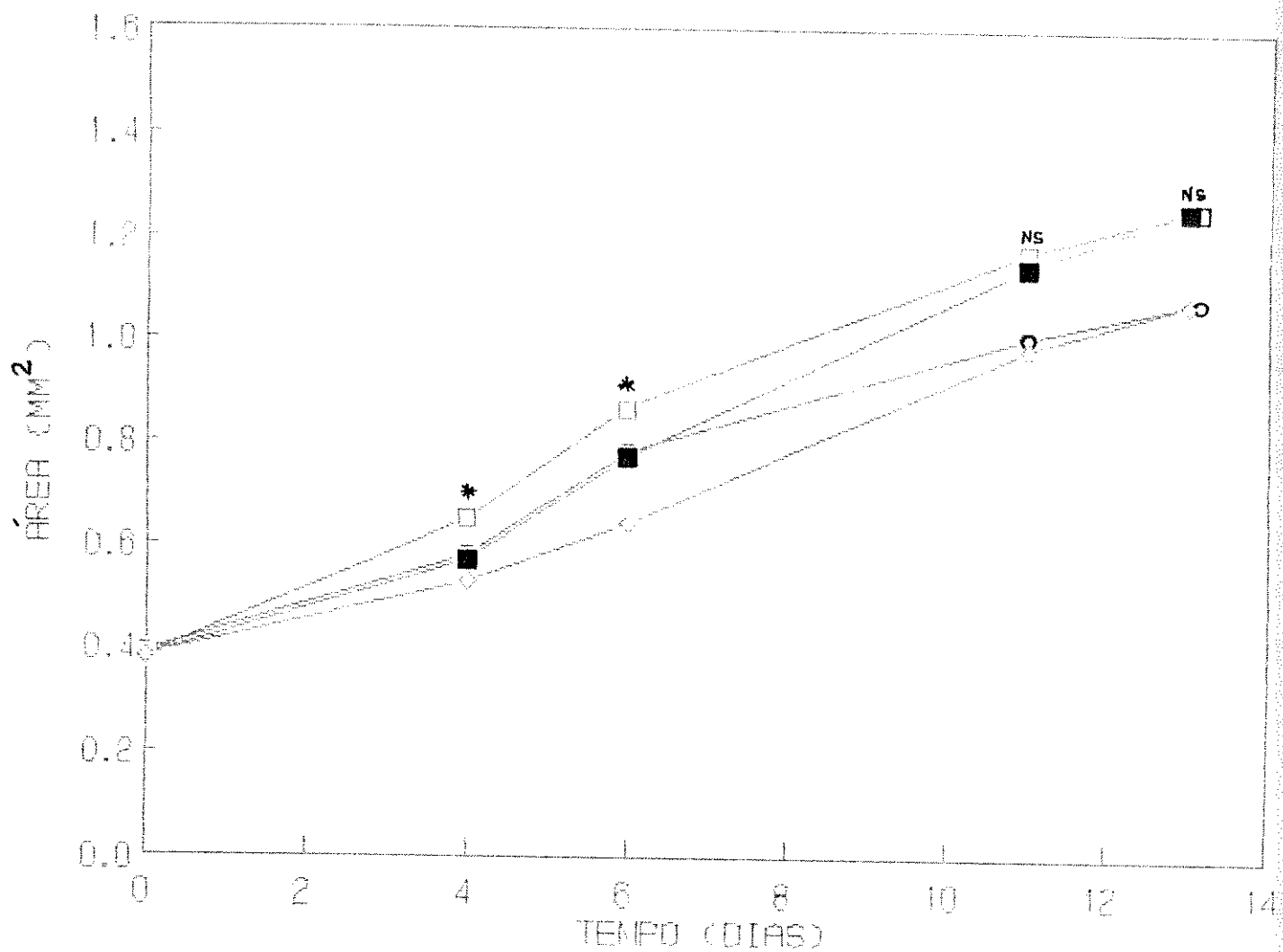


FIGURA 13: Efeito da aplicação do AIA no crescimento de propágulos em luz. Em escuro não há crescimento. * - diferença mínima significativa a nível de 5%; n.s. - não há diferença significativa

○ - água
 □ - AIA 10⁻⁴M
 ■ - AIA 10⁻⁵M
 ◇ - AIA 10⁻⁶M

ao de propágulos mantidos em água destilada, em luz. A concentração de $10^{-3}M$ também foi testada e mostrou-se tóxica. No escuro também não ocorre crescimento, mesmo na presença das soluções e por essa razão os dados não são apresentados na figura. Quando a solução foi reaplicada no 6º ou no 7º dias, observou-se uma inibição no crescimento na concentração de $10^{-4}M$, sendo esta mantida até o final do experimento (Figura 14). Tal efeito é revertido se os propágulos forem transferidos para água.

7.2. Etileno

7.2.1. Aplicação de etrel e etileno gasoso

A figura 15 mostra o efeito da aplicação de etrel no crescimento de propágulos de M. chencopoda. Observa-se que o crescimento na presença das soluções nas concentrações de $10^{-4}M$, $10^{-5}M$, $10^{-6}M$ diferiu estatisticamente em relação ao controle.

Aplicação de soluções mais concentradas, no entanto, causa inibição do crescimento em área, inibição esta mantida até o final do experimento (figura 16). Este efeito inibidor é revertido se os propágulos forem transferidos para água.

A aplicação de etileno gasoso em propágulos crescendo em luz branca também foi verificada e os resultados apresentados na figura

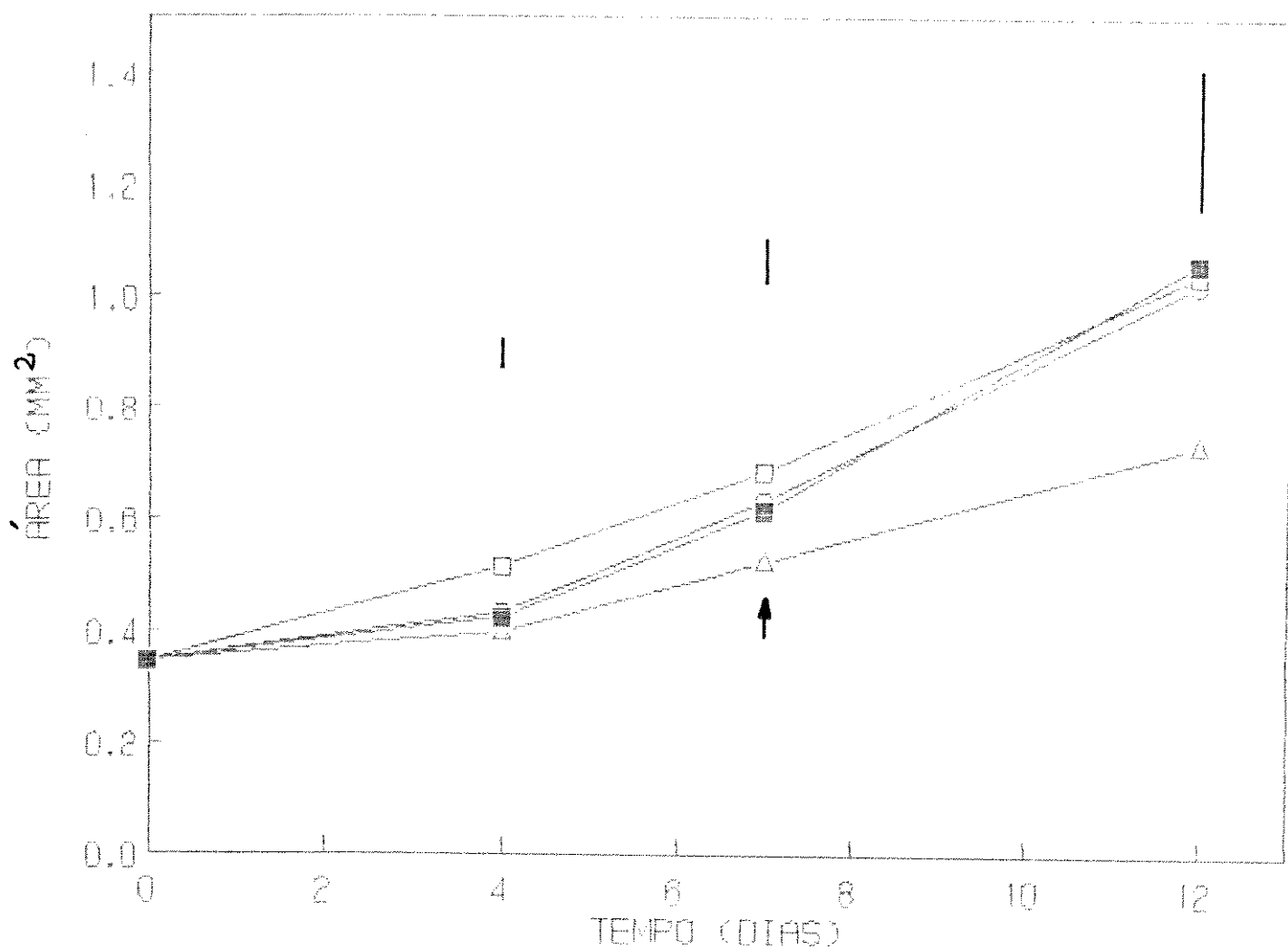


FIGURA 14: Efeito da aplicação do AIA no crescimento de propágulos em luz. A seta indica o momento da reaplicação do AIA.

— DMS 5%

O - água

□ - AIA $10^{-5}M$

△ - AIA $10^{-4}M$

■ - AIA $10^{-6}M$

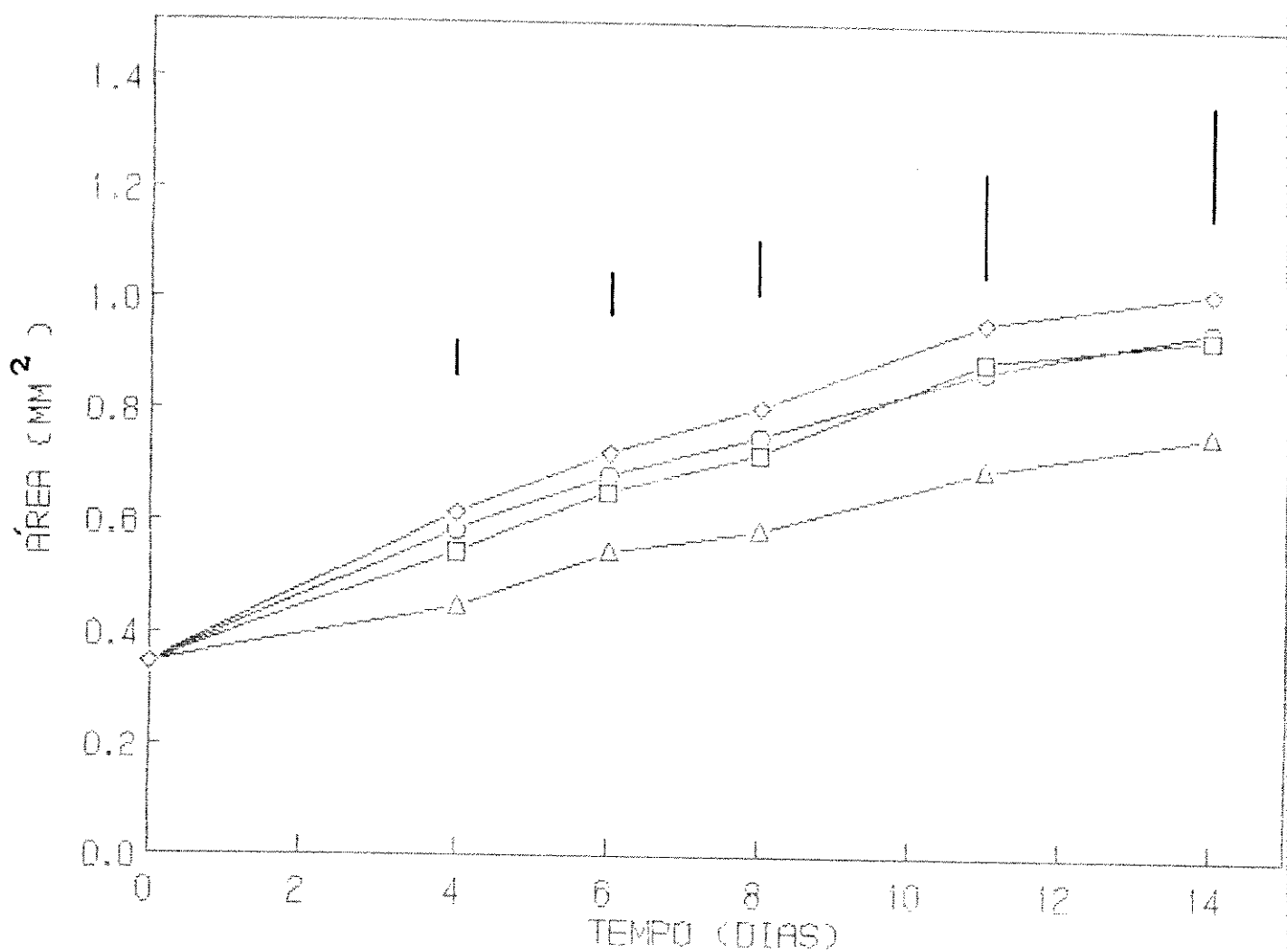


FIGURA 15: Efeito da aplicação de etrel no crescimento de propágulos em luz. Em escuro não ocorre crescimento.

— DMS 5%

O - água
□ - $10^{-5}M$

△ - $10^{-4}M$
◇ - $10^{-6}M$

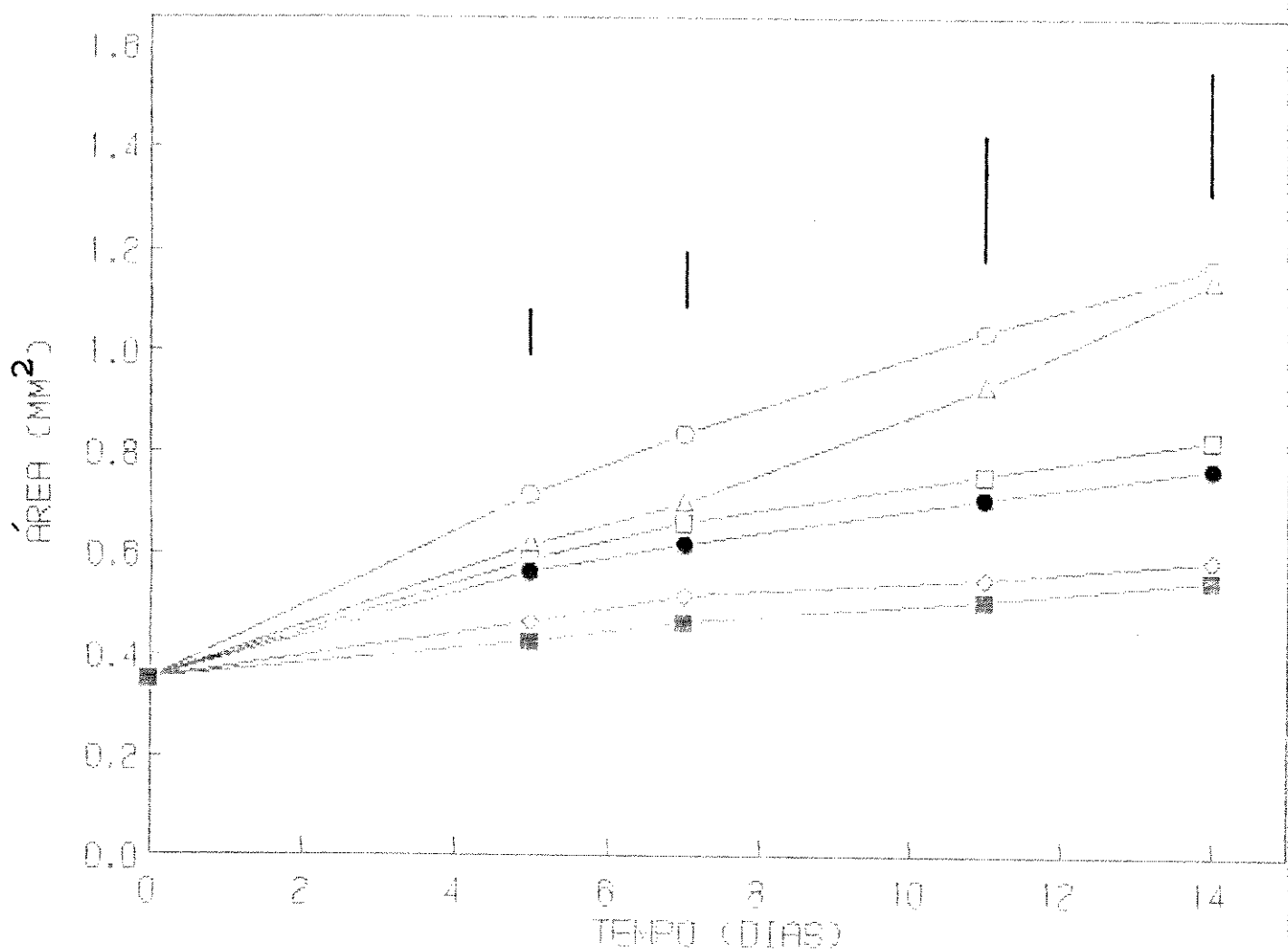


FIGURA 16: Efeito da aplicação de etrel no crescimento de propágulos em luz. Em escuro não ocorre crescimento.

— DMS 5%

O - água
 □ - 5x10⁻⁴M
 ■ - 10⁻³M

Δ - 10⁻⁴M
 ● - 7x10⁻⁴M
 ◊ - 3x10⁻³M

17. Observa-se que a aplicação de etileno na concentração de 10 ppm não causa inibição de crescimento quando comparado a propágulos crescendo em ambiente fechado ou ambiente aberto .

7.2.2. Determinação de etileno liberado

A estimativa de etileno liberado foi feita em propágulos crescendo em luz branca e escuro contínuos (figura 18). Durante o desenvolvimento, ocorre liberação do gás a níveis detectáveis a partir do 5º dia somente em luz branca, sendo que a partir deste dia e até o final do experimento, houve um aumento significativo de liberação de etileno. O aumento do número de propágulos por amostra não resultou em aumento na liberação do etileno na luz (figura 18). Não foram mostrados os resultados da liberação no escuro porque esta não ocorre em níveis detectáveis.

O efeito da aplicação de AIA na liberação de etileno em propágulos crescendo na luz após 5 dias também foi verificado. Em presença de AIA ocorre liberação de 1,02 ppm de etileno, enquanto que, no mesmo período em presença de água destilada, 0,34 ppm foi liberado.

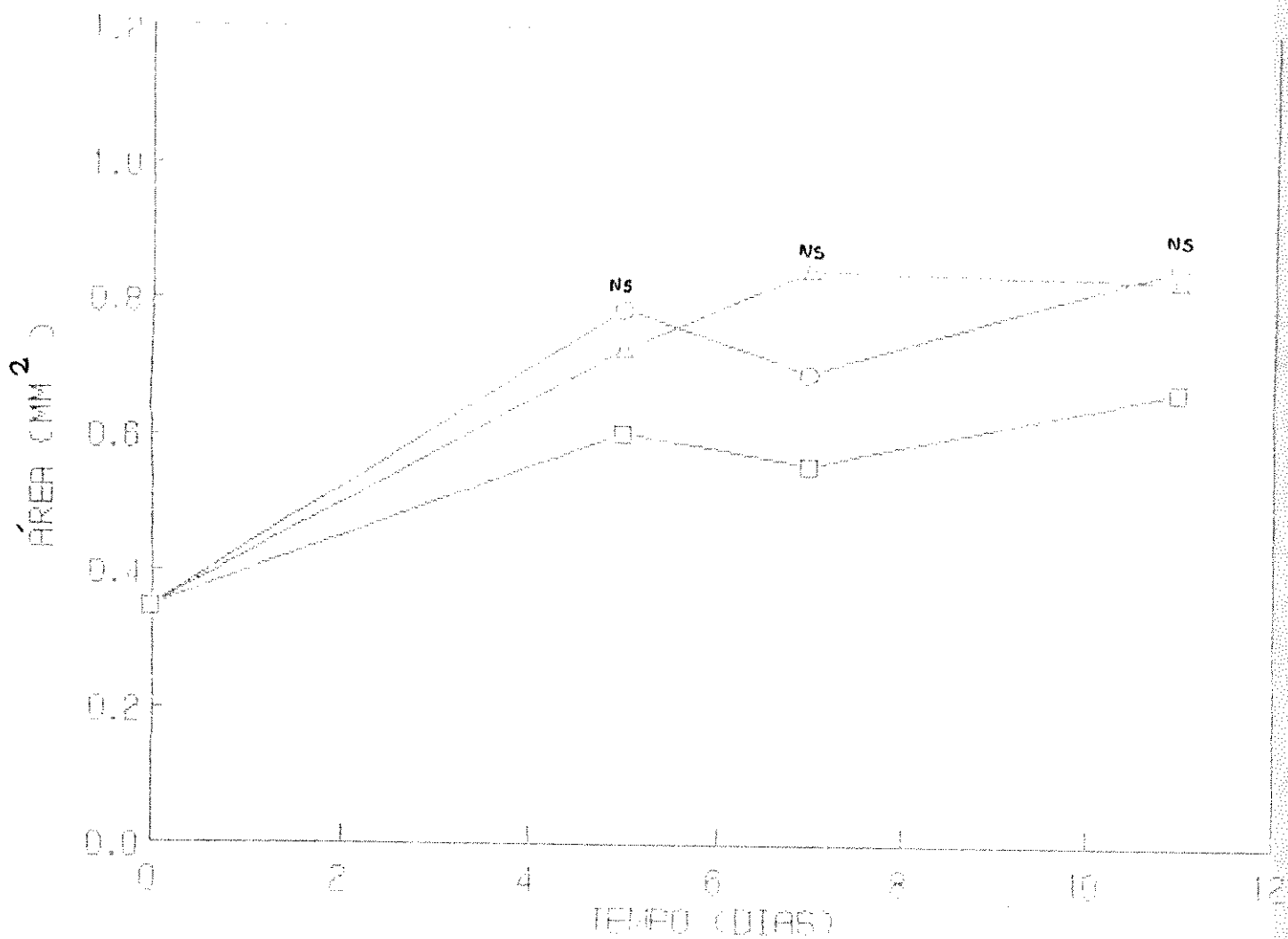


FIGURA 17: Efeito da aplicação de etileno gasoso no crescimento de propágulos em luz. n.s.- não há diferença significativa

- - ambiente aberto
- △ - ambiente fechado
- - ambiente fechado com aplicação

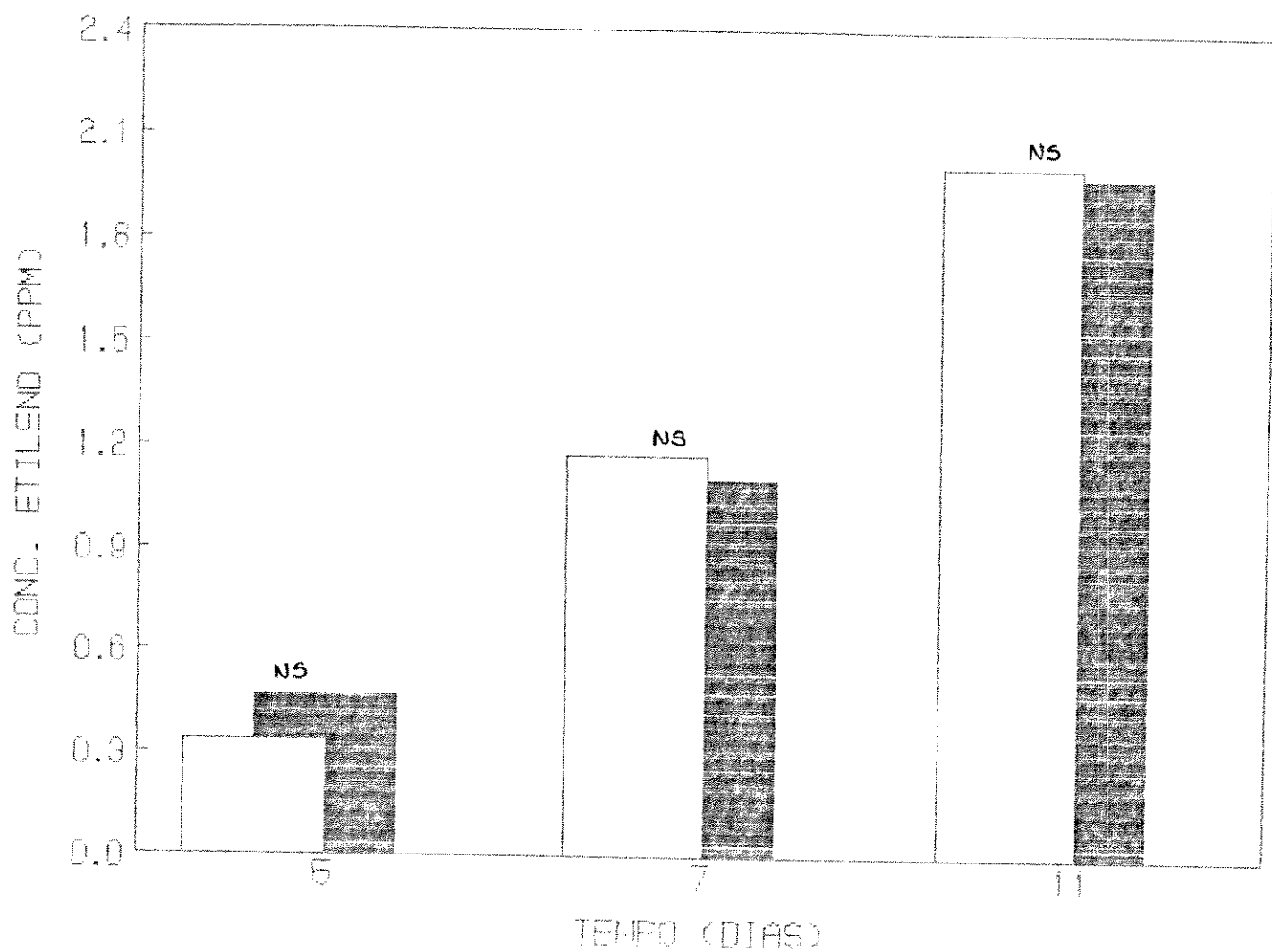


FIGURA 18: Etileno liberado em propágulos crescendo em luz branca contínua. n.s. - não há diferença significativa entre os tratamentos.

- - amostras contendo 10 propágulos
- - amostras contendo 60 propágulos

7.2.3. AgNO_3

Com a finalidade de verificar o envolvimento do etileno no crescimento inicial dos talos, testou-se o efeito do AgNO_3 nas concentrações de $0.6 \times 10^{-5}\text{M}$, $1.5 \times 10^{-5}\text{M}$ e $6 \times 10^{-5}\text{M}$. Na concentração de $6 \times 10^{-5}\text{M}$ a solução de AgNO_3 mostrou-se tóxica, enquanto que $0.6 \times 10^{-5}\text{M}$ não foi efetiva. A concentração de $1.5 \times 10^{-5}\text{M}$ inibiu o crescimento inicial dos talos, a partir do 4º dia do início dos experimentos (figura 19). Foi verificado posteriormente que tal feito inibitório é revertido quando propágulos são retirados da presença da solução de AgNO_3 , sendo o crescimento restabelecido.

7.2.4. Perclorato de Mercúrio

Além do AgNO_3 , utilizou-se perclorato de mercúrio com o objetivo de captar o etileno liberado pelos propágulos crescendo em luz branca contínua. Os resultados revelam que na presença da solução de perclorato ocorre inibição do crescimento inicial dos talos a partir do 7º dia, sendo esta mantida até o final do experimento (figura 20).

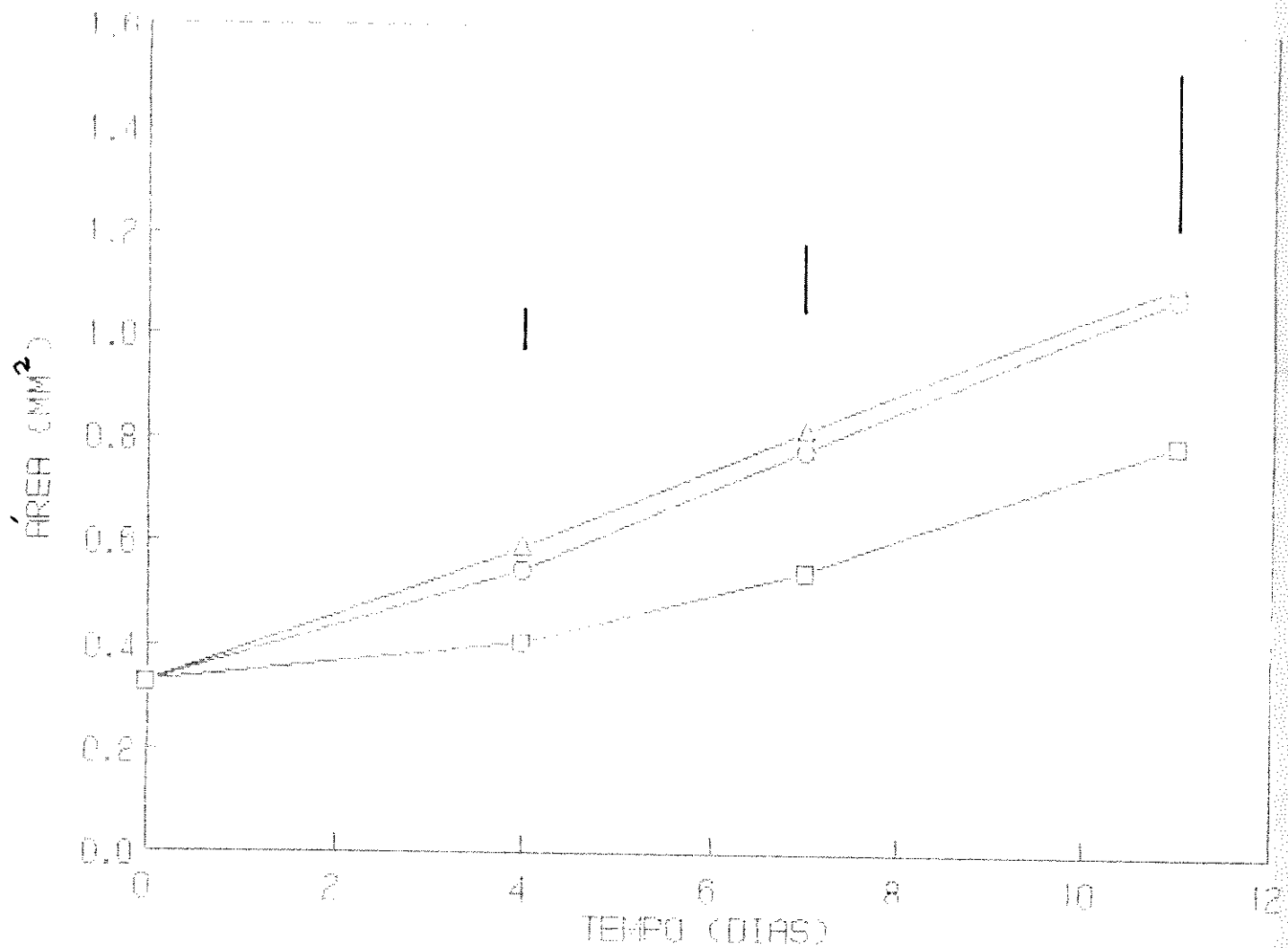


FIGURA 19: Efeito da aplicação de AgNO₃ em propágulos de M. chenopoda.
 | - DMS 5%

- O - água
- Δ - AgNO₃ 0.6x10⁻⁵M
- - AgNO₃ 1.5x10⁻⁵M

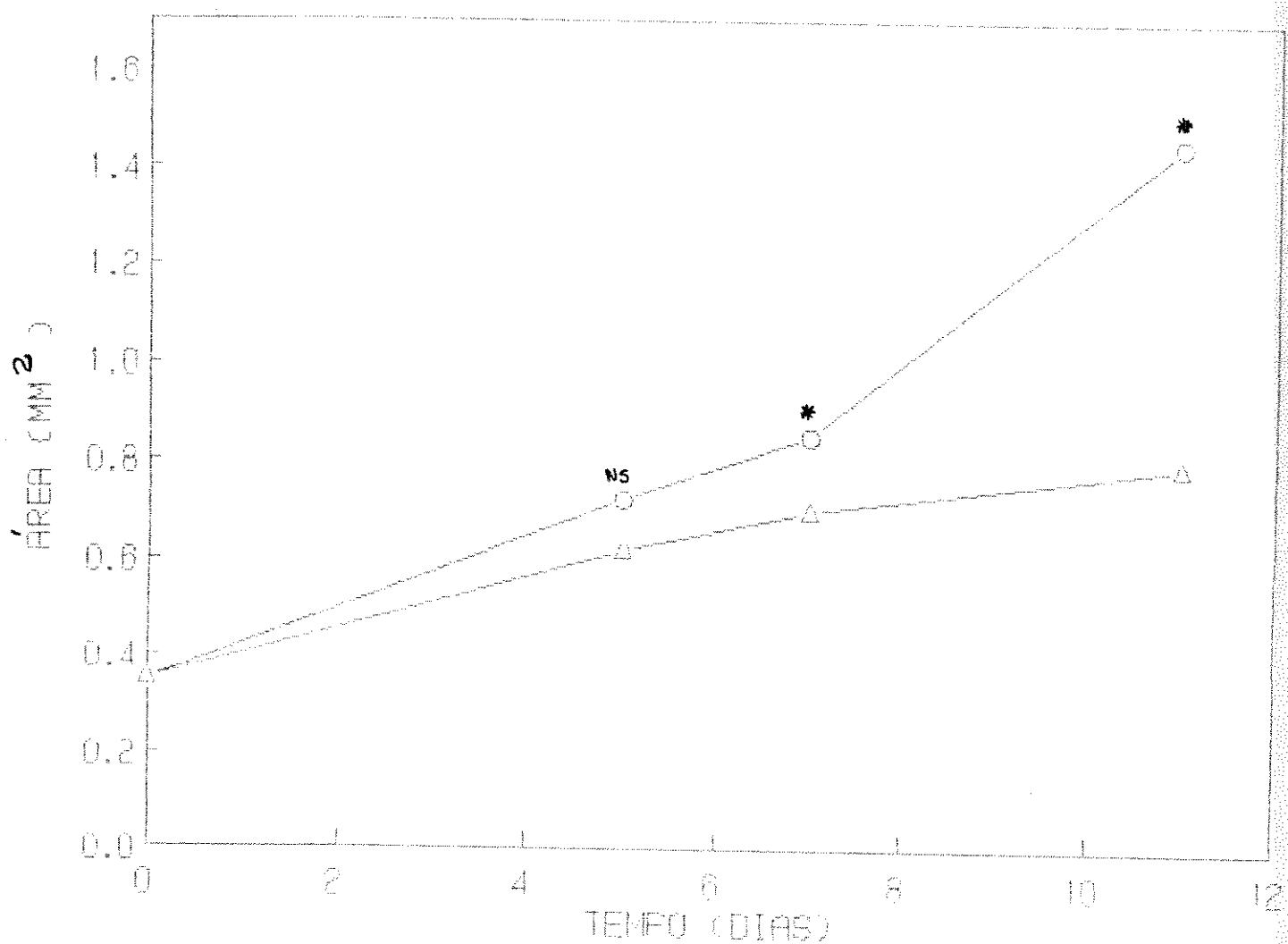


FIGURA 20: Efeito da aplicação de Perclorato de Mercúrio no crescimento inicial de talos de M. chenopoda.
 * - diferença mínima significativa a nível de 5%;
 n.s. não há diferença significativa

○ - água
 Δ - Perclorato de Mercúrio

7.3. Contagem de células

Com o objetivo de se determinar se o crescimento, medido anteriormente pelo aumento em área, ocorre devido ao aumento no número de células, foram feitas contagens em propágulos crescendo em luz branca contínua em presença de água, AIA e etrel.

Os resultados da figura 21 mostram que o aumento do número de células durante o desenvolvimento inicial dos talos em presença de AIA ($10^{-4}M$) é semelhante àquele observado durante o desenvolvimento dos mesmos em presença de água destilada. Entretanto a aplicação de AIA na concentração de $10^{-4}M$ causa inibição do crescimento em área. A figura 21A mostra a relação existente entre essas duas grandezas. O mesmo padrão de resposta foi observado quando se verificou o efeito de etrel na concentração de $5 \times 10^{-4}M$ (figura 22 e 22A).

7.4. Giberelina

Com o intuito de se determinar se outras substâncias de crescimento além do AIA e etileno podem afetar o crescimento inicial dos talos, testou-se o efeito de diferentes concentrações de GA₃ (figura 23). Observa-se que GA₃ é efetivo na promoção do crescimento na luz, na concentração de $10^{-5}M$. GA₃ nas concentrações de $10^{-3}M$ e $10^{-4}M$ não têm efeito no crescimento dos propágulos. No escuro não ocorre cres

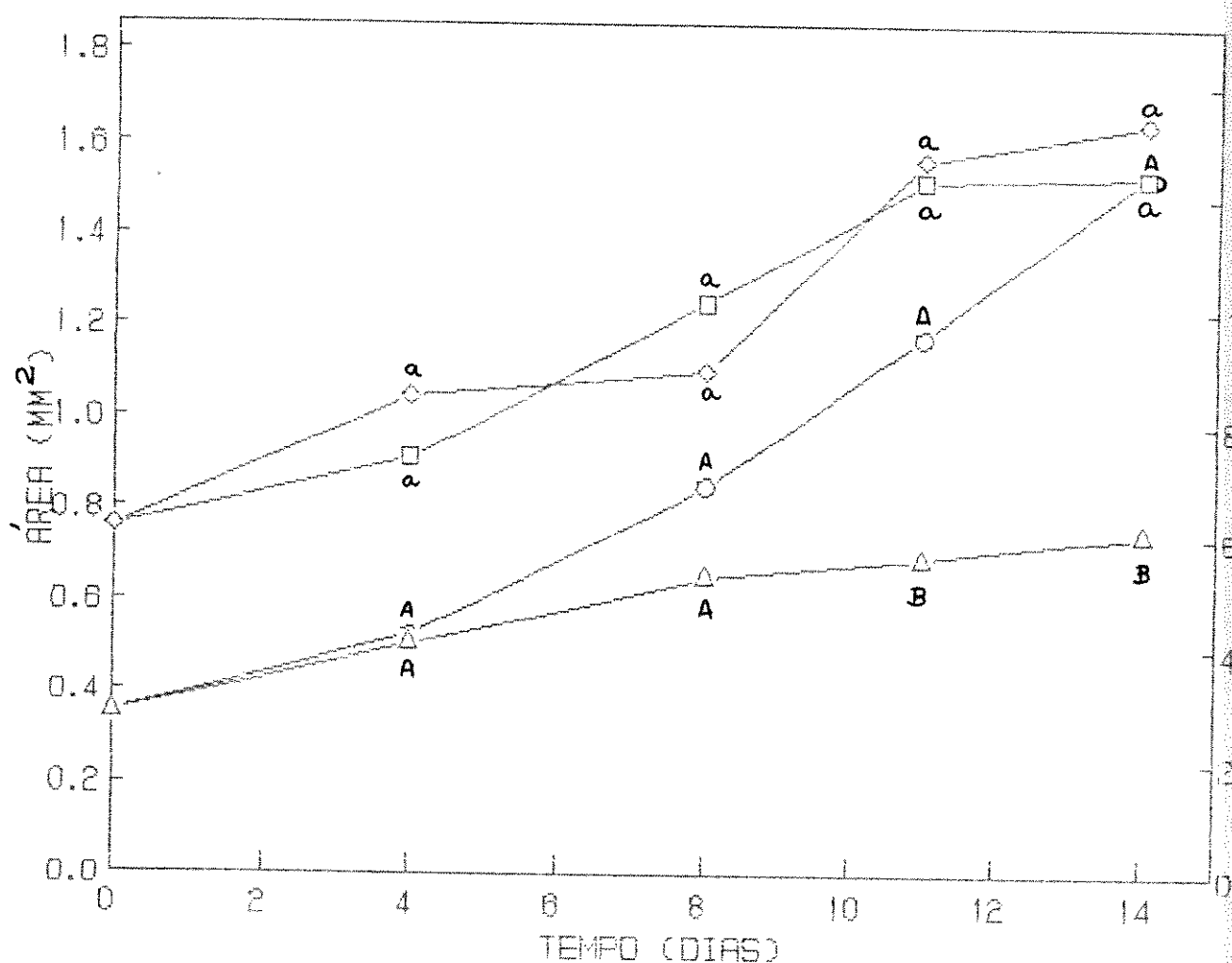


FIGURA 21: Crescimento de propágulos em área e em número de células em presença de água e AIA.

Em água	Em AIA
○ - aumento em área	△ - aumento em área
◇ - aumento em n.º células	□ - aumento em n.º células

Letras maiúsculas comparam crescimento em área e letras minúsculas n.º cel/propágulo. Letras diferentes representam diferença significativa a nível de 5%.

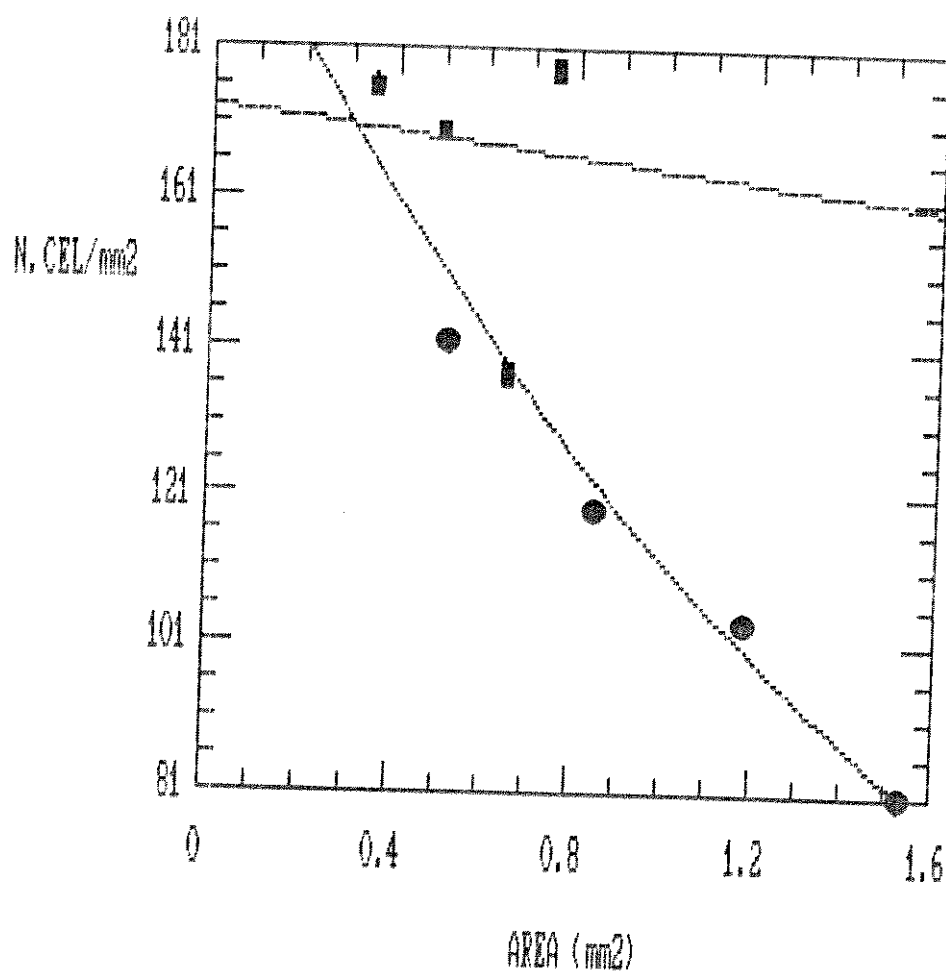


FIGURA 21A: Relação entre crescimento em área e o aumento do número de células/mm² em presença de água e AIA.

● - água

■ - AIA

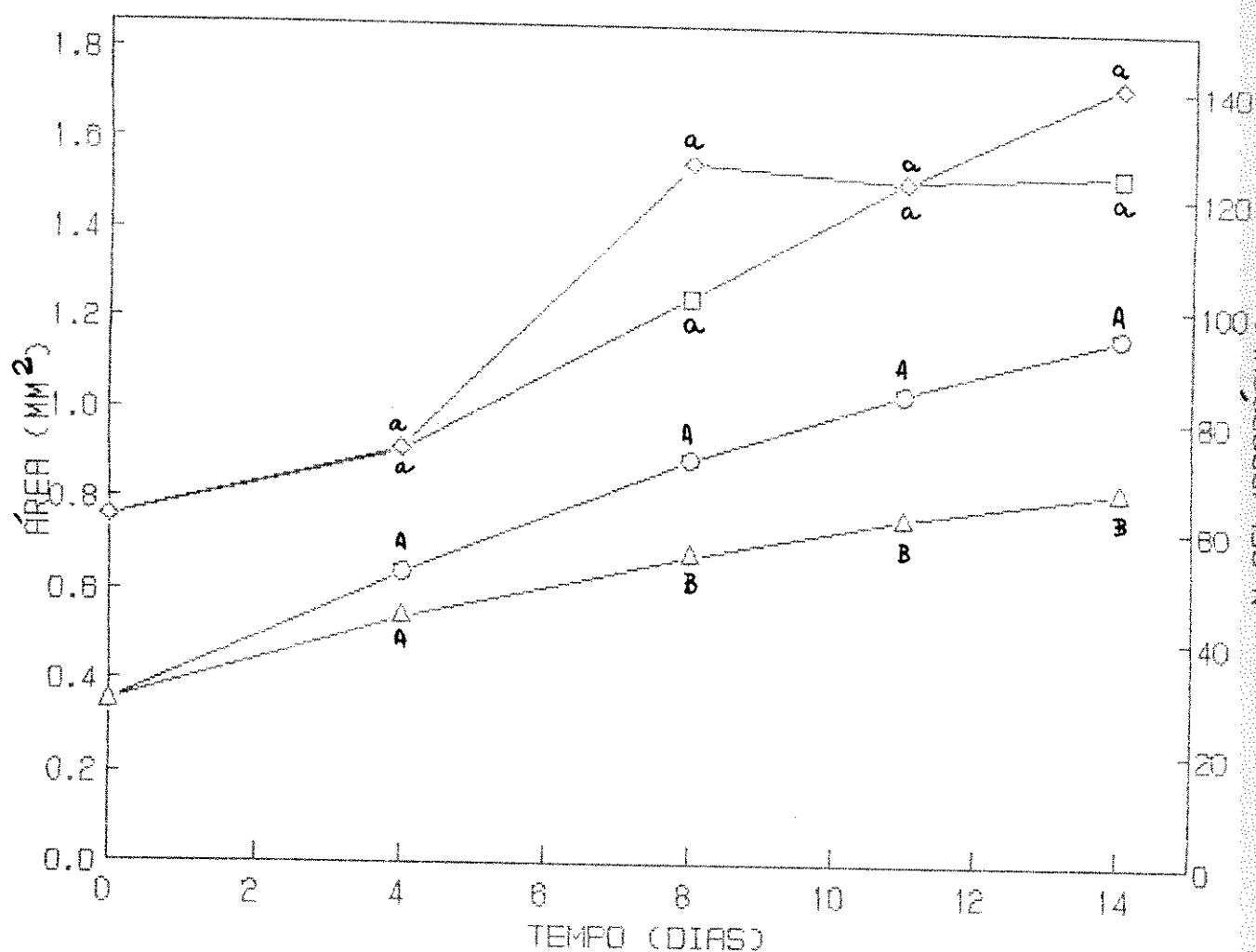


FIGURA 22: Crescimento de propágulos em área e em número de células em presença de água e etrel.

Em água
 ○ - aumento em área
 □ - aumento em n.º. células

Em etrel
 △ - aumento em área
 ◇ - aumento em n.º. células

Letras maiúsculas comparam crescimento em área e letras minúsculas n. cel/propágulo. Letras diferentes representam diferença significativa a nível de 5%.

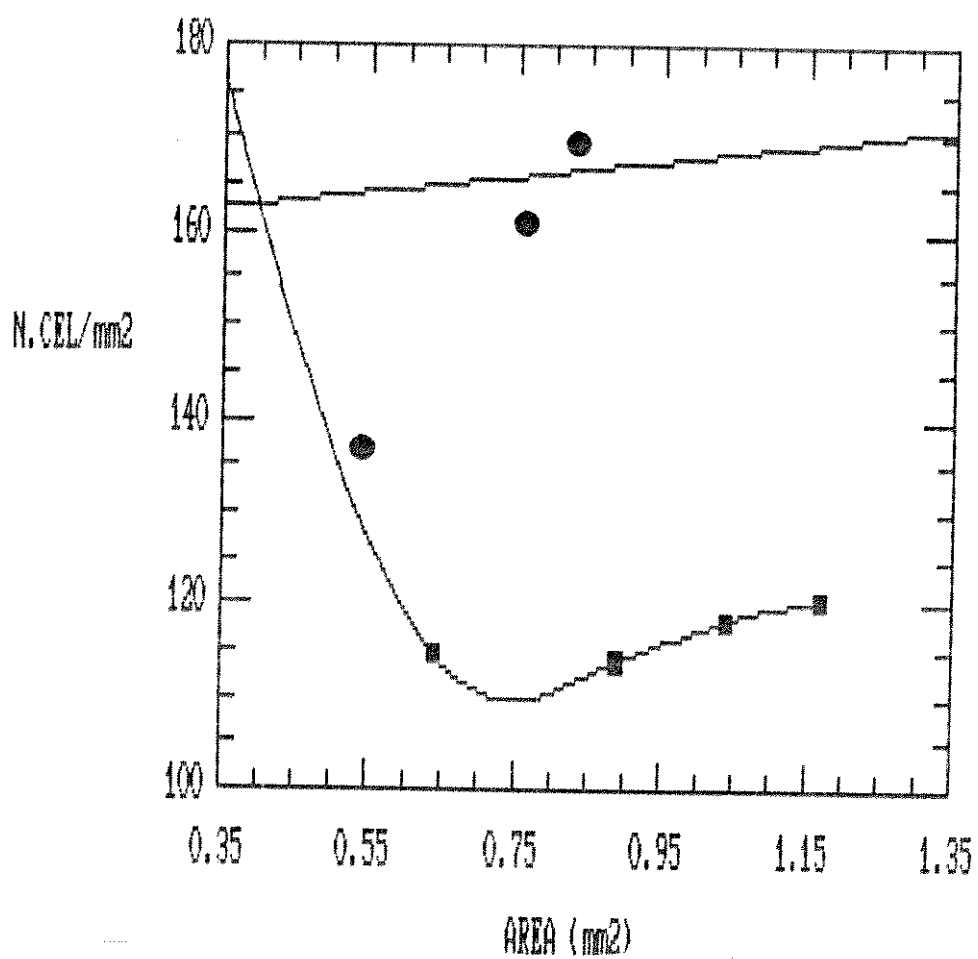


FIGURA 22A: Relação entre o crescimento em área e o aumento do número de células/mm² em presença de água e etrel.

■ - água

● - Etrel

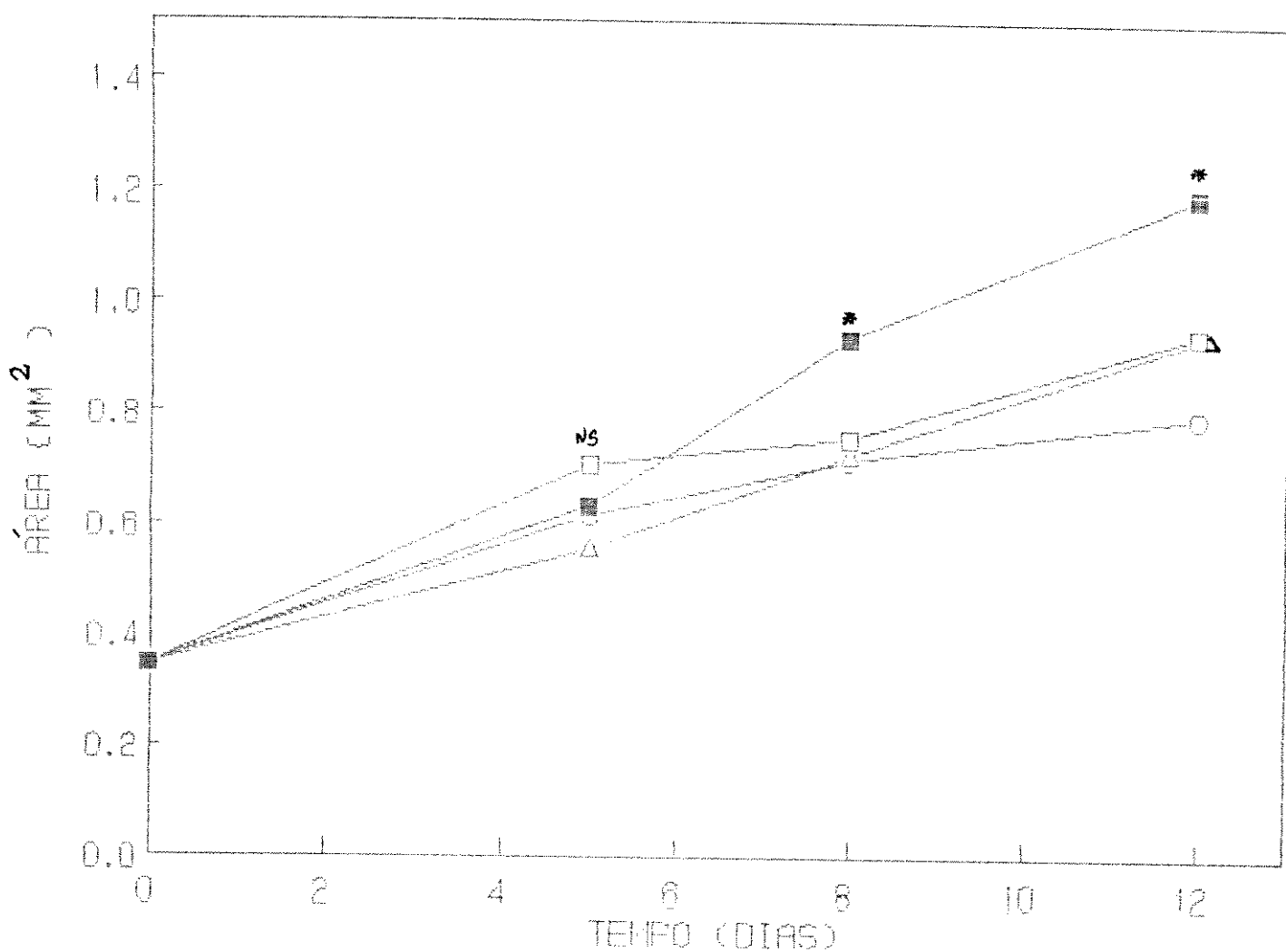


FIGURA 23: Efeito do GA_3 no crescimento de propágulos de *M. chenopoda* em luz contínua.
 * - diferença mínima significativa a nível de 5%;
 n.s. não há diferença significativa

O - água Δ - $10^{-3}M$
 □ - $10^{-4}M$ ■ - $10^{-5}M$

cimento, mesmo com a aplicação de GA₃.

7.5. Citocininas

As figuras 24 e 25 mostram o efeito de 6-Benziladenina (6-BA) e cinetina, respectivamente, no crescimento de *M. chenopodia*. Observa-se que a aplicação de 6-BA na concentração de $2 \times 10^{-5} M$ estimulou o crescimento de propágulos na luz enquanto que nas outras concentrações utilizadas o crescimento foi semelhante ao observado pelo controle (figura 24). A aplicação de cinetina não mostrou efeito significativo no crescimento em nenhuma das concentrações utilizadas (figura 25).

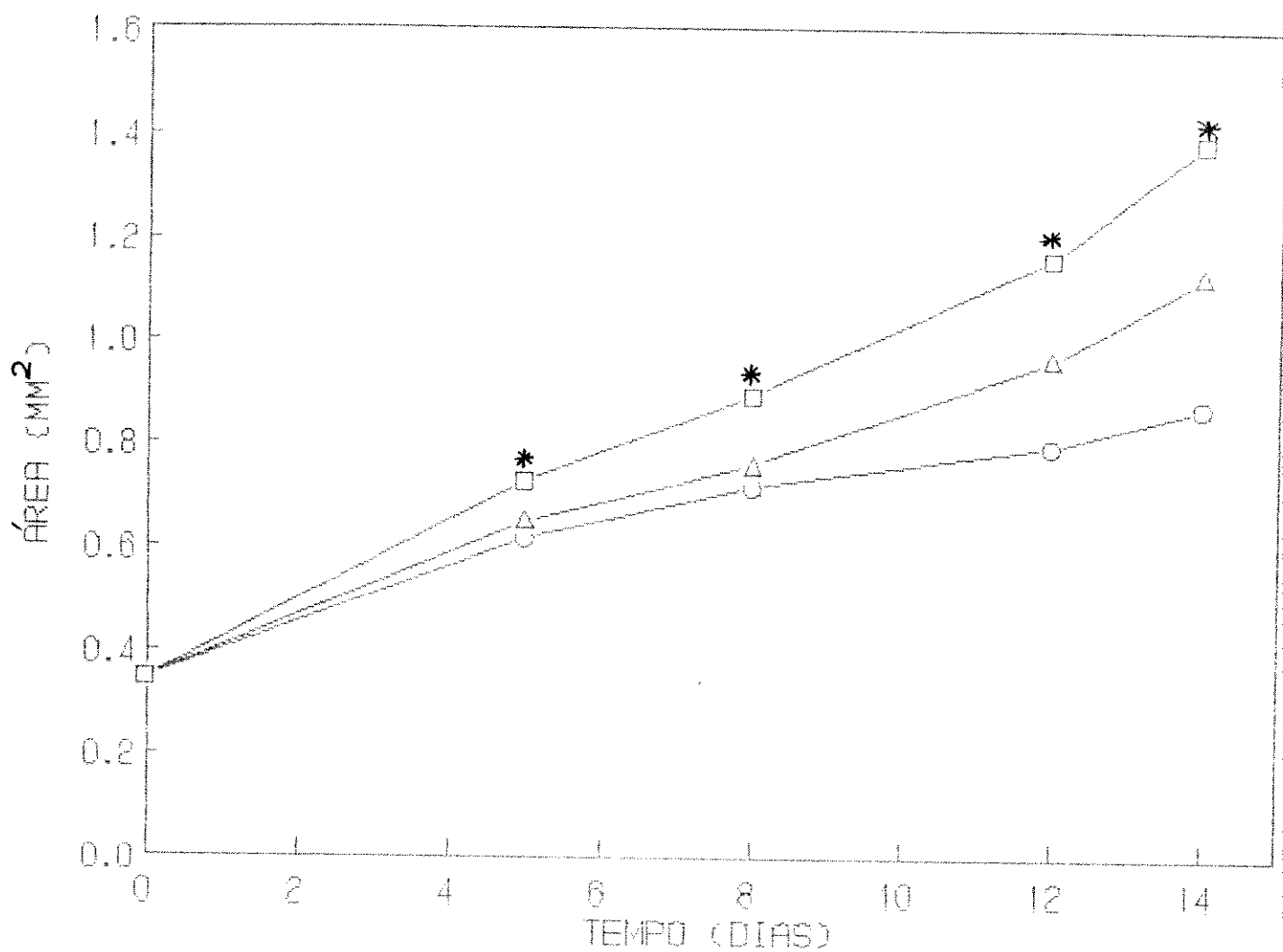


FIGURA 24: Efeito do 6-BA no crescimento de propágulos em luz branca contínua.

* - diferença significativa a nível de 5%

- O - água
- Δ - $10^{-5}M$
- $\square$ - $2 \times 10^{-5}M$

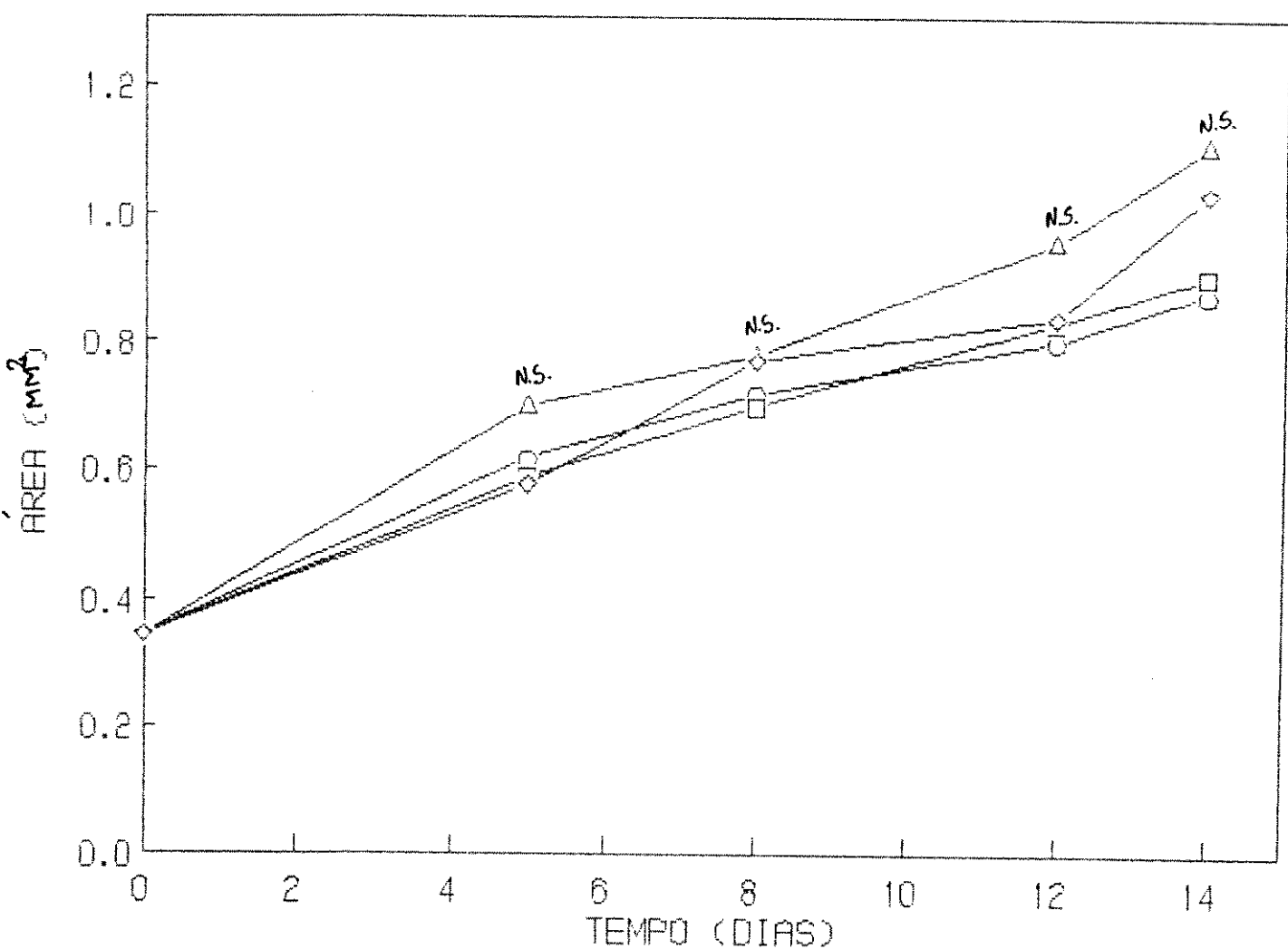


FIGURA 25: Efeito da cinetina no crescimento inicial de talos jovens em luz branca. n.s. não há diferença significativa

O - água
 $\square$ - $2 \times 10^{-5}M$
 Δ - $10^{-5}M$
 $\blacksquare$ - $4 \times 10^{-5}M$

B. Talos

1. Efeito de luz

A tabela II mostra o efeito de luz e escuro na formação de propágulos no interior das cestas. Com 6 dias, em escuro, não foram observadas cestas cheias de propágulos. Em condições de luz, no mesmo período, havia 72% de cestas cheias. Após 13 dias, em luz, 90% das cestas já estavam cheias enquanto no escuro, apenas cerca de 10% de cestas estão cheias.

2. AIA e etrel

Pela tabela III, observa-se que, além da luz, a aplicação de hormônios também afeta a velocidade de formação dos propágulos no interior dos receptáculos. Em presença de etrel observa-se um número menor de cestas cheias quando comparados ao controle (água destilada) apenas até o 7º dia do início dos experimentos. A partir do 11º dia, essa diferença não é mais estatisticamente significativa entre o tratamento com etrel e o controle (água). Com relação à aplicação de AIA e seu efeito na formação de propágulos em cestas, há diferença significativa, com relação ao controle, a partir dos primeiros dias, sendo

TABELA II: Efeito de luz branca e escuro na formação de propágulos no interior das cestas. Dados apresentados em porcentagem de cestas com propágulos em seu interior na luz branca ou escuro contínuos. * - diferença significativa a nível de 5%.

DURAÇÃO DO TRATAMENTO (DIAS)

TRATAMENTO	6	9	13
LUZ	72*	81*	91*
ESCURO	0.0	3.0	9.0

TABELA III: Efeito de água, AIA e etrel na formação de propágulos no interior das cestas. Dados apresentados em porcentagem de cestas com propágulos em seu interior.

* - Diferença significativa em relação a água a nível de 5%.

DURAÇÃO DO TRATAMENTO (DIAS)

TRATAMENTO	4	7	11	14
AGUA	41	59	81	87
AIA $10^{-4}M$	8*	17*	33*	33*
ETREL $5 \times 10^{-4}M$	3*	19*	69	94

esta mantida até o final dos experimentos.

3. Dosagem de etileno endógeno

A figura 26 mostra a liberação de etileno por secções de talos em luz e escuro após 7 e 11 dias. Os resultados mostram que ocorre, como padrão geral, um aumento da liberação do gás na luz branca, enquanto que uma queda dos níveis de etileno é observada no escuro. No entanto, análise detalhada mostra que em talos sem cestas, em condições de luz branca ocorre aumento da liberação do gás, enquanto que no escuro este aumento não é significativo. Quando se analisa talos com cestas na luz observa-se um aumento na liberação do gás após 11 dias, período em que cerca de 90% das cestas estão repletas de propágulos em seu interior, enquanto que no escuro, uma queda destes níveis é observada, sendo que apenas cerca de 9% das cestas mantidas no escuro têm propágulos formados.

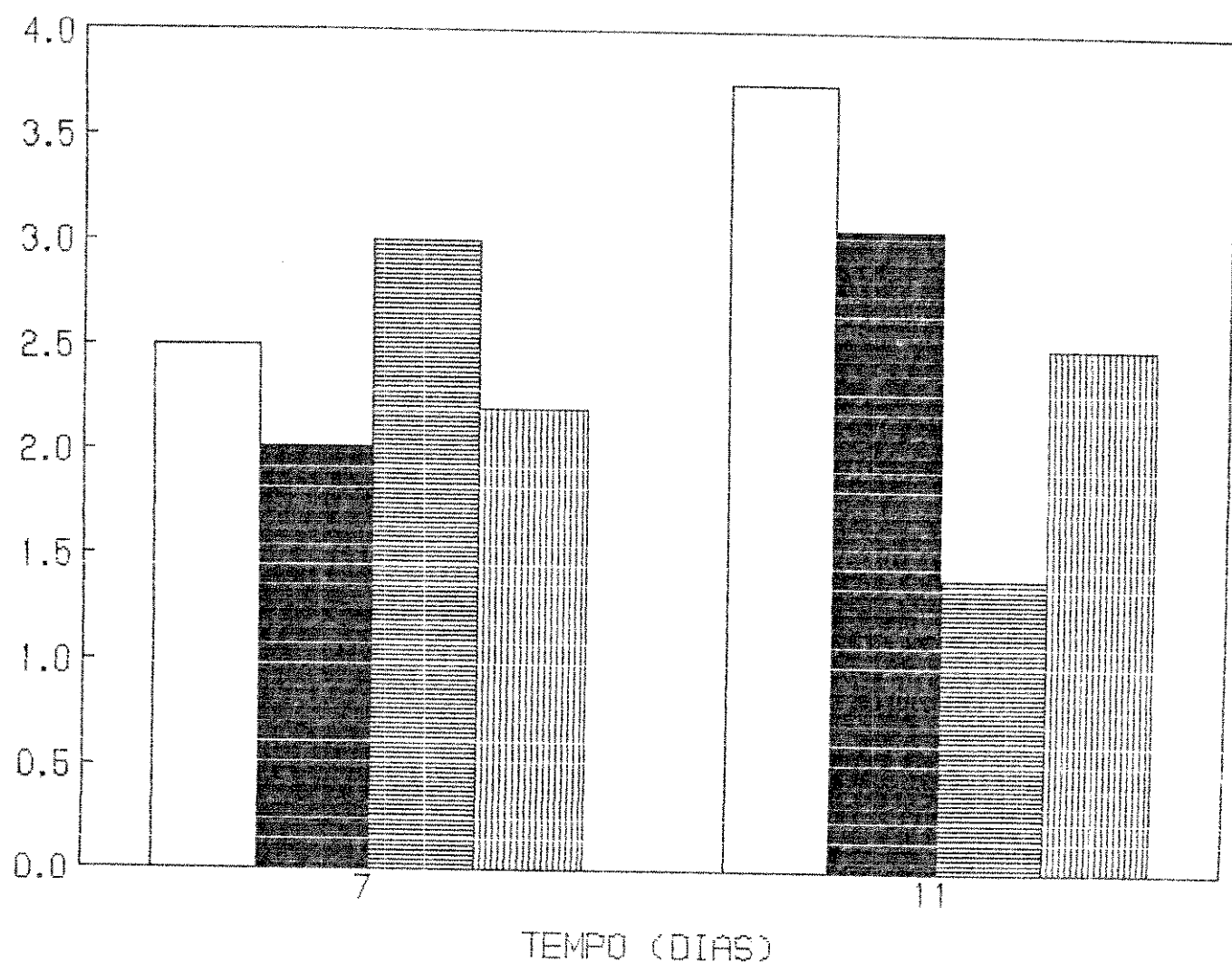


FIGURA 26: Medida da liberação de etileno por talos na luz e escuro contínuos

Em luz

□ - talos com cestas
 ■ - talos sem cestas

Em escuro

■ - talos com cestas
 ▨ - talos sem cestas

IV. DISCUSSÃO

A germinação de propágulos, bem como o seu posterior desenvolvimento em talos, pode estar condicionada aos mesmos fatores que controlam esses processos em plantas superiores, como luz, temperatura e substâncias de crescimento.

A luz induz a germinação de esporos de muitas espécies de pteridófitas. Este processo, segundo Towill & Ikuma (1975) pode ser dividido em tres fases: a. uma fase de pré-indução no escuro onde os esporos absorvem água e se sensibilizam á radiação; b. uma fase de indução máxima e c. fase pós-indutora, na qual ocorre a protrusão dos rizóides e do protonema.

Em M. chenopoda, durante as primeiras 24 horas de exposição à luz branca não houve crescimento numa taxa mensurável em área dos propágulos, sendo que este só se inicia ao redor de 48 horas, após o início de formação de rizóides. O mesmo comportamento foi verificado por Válio & Schwabe (1969), em Lupularia cruciata.

A germinação de propágulos e o crescimento inicial de talos de M. chenopoda ocorreu quando os propágulos foram expostos à luz vermelha (V) ou branca contínua e não aconteceu quando foram mantidos no escuro e vermelho-extremo (VE).

Em L. cruciata, por exemplo, a germinação de propágulos também mostrou ser dependente da luz, exibindo, resposta típica de baixa energia com efeito fotorreversível de exposições curtas a V e VE quando o critério para a germinação foi a formação de rizóides (Válio &

Schwabe, 1969). Sugai & Furuya (1967), verificaram em Pteris vittata que a formação de rizóides também era uma resposta de baixa energia onde o efeito promotor de germinação de V é completamente inibido por VE; 50% da fotorreversibilidade inicial é perdida após 6 horas de escuro, resposta típica do sistema fitocromo. A inibição causada pelo VE é revertida pelo V. Em M. chenopoda esta resposta a exposições curtas de V e VE não foi encontrada. Exposições de até 120 horas não foram efetivas na indução do crescimento no escuro, não exibindo, portanto, em relação ao parâmetro medido, uma típica da uma reação de baixa energia do sistema fitocromo.

Sempre que os propágulos foram transferidos para o escuro após diferentes períodos de luz, houve uma parada de crescimento, resultando em uma área menor do que a dos propágulos que foram mantidos em luz contínua e proporcional ao tempo de exposição à luz. Essa parada de crescimento com a transferência para o escuro foi também verificada em protalos de Adiantum capillus-veneris (Kadota & Furuya, 1977). Em M. chenopoda o crescimento inibido pela manutenção no escuro foi reassumido pela exposição novamente à luz, sendo efetivas tanto a luz branca como a luz vermelha. No final do experimento não havia diferenças significativas entre os tratamentos. Este fato sugere que, neste caso, o fitocromo possa estar envolvido através de uma reação de alta energia. A existência de fitocromo em hepáticas foi evidenciada por Taylor & Bonner (1967).

Há várias hipóteses sobre a ação do fitocromo no fotocontrole através da reação de alta energia. Uma delas assume, basicamente, que a resposta, na reação de alta energia, depende da presença, durante um

período longo, da forma fisiologicamente ativa, embora instável (FVE) do fitocromo (Mancinelli, 1983). Estudos sobre síntese de antocianina com irradiação prolongada, mostraram que tratamentos iguais em termos de quantidade total de energia incidente, mas diferentes na duração do período de iluminação, num ciclo de 24 horas, levaram a uma maior quantidade de antocianina quando a luz era fornecida por um período mais longo (Mancinelli & Rabino, 1975). Os autores explicam os resultados obtidos através de diferentes estados do fitocromo. Assim, quando a iluminação é dada por um período mais prolongado vai haver a presença de FVE, mesmo que o nível total de fitocromo seja reduzido devido à sua destruição, que ocorre nesta situação uma vez que não há a reversão no escuro. Nos tratamentos mais curtos de luz, há um período de escuro, e ocorre, além da destruição do FVE, a reversão não fotoquímica FVE-FV no escuro, o que acarretará uma redução no nível de FVE em um intervalo curto de tempo (Smith, 1975).

Os resultados obtidos com *M. chenopoda* corroboram esta hipótese se for assumida uma rápida reversão no escuro e/ou a destruição do fitocromo, ou seja, desaparecimento rápido da forma ativa do fitocromo, uma vez que os valores de crescimento obtidos mostraram que após a transferência para o escuro não se verifica mais crescimento.

Outra alternativa possível é o envolvimento da luz como fator energético, através da reação da fotossíntese. Esta hipótese não foi desenvolvida neste trabalho.

Em *M. chenopoda* a luz azul inibe totalmente o crescimento de propágulos. Em espécies da mesma família, *M. polymorpha*, esse comprimento de onda parece também retardar a germinação de propágulos, segundo

Sussman (1965A).

O efeito do azul em outras espécies de plantas inferiores parece não ser somente inibidor. Em protonemas de Adiantum a luz azul induz fototropismo e um fotorreceptor para luz azul deve estar envolvido nessa resposta fototrópica (Hayami et al, 1987).

Shanab et al (1988) mostraram que talos de Bachelotia antillarum são sensíveis a diferentes comprimentos de onda, sendo que a indução de germinação (e o crescimento posterior) é estimulada especialmente pelo azul, enquanto que vermelho não é efetivo.

A temperatura, além da luz, pode afetar os processos de germinação e desenvolvimento das espécies vegetais. Em plantas superiores, a temperatura pode aumentar ou inibir a taxa de germinação de sementes por alterar a velocidade das reações bioquímicas (Côme & Tissaoui, 1973).

Além do fator metabólico, a temperatura pode ainda ser um fator limitante quando se analisa a capacidade de resistência, especialmente de plantas inferiores, à dessecação, sendo que nem todos os tecidos respondem da mesma forma. Os gametófitos, por exemplo, parecem ser mais resistentes à dessecação e exposição a baixas temperaturas.

Válvio & Schwabe (1969), trabalhando com Lunularia cruciata, verificaram que a produção de rizóides dessa espécie ocorre em luz, numa faixa de temperatura de 20°C a 25°C. Em M. chenopoda essa faixa de temperatura também se mostrou favorável ao crescimento. Embora seja uma espécie comum em áreas tropicais, e portanto quentes, com temperaturas frequentemente superiores às observadas, propágulos de M. chenopoda mostraram-se sensíveis a temperaturas superiores a 30°C, onde o

crescimento foi inibido.

A resposta à luz, pode ser alterada, em plantas superiores, por diversos fatores, entre eles o período e as condições de armazenamento das sementes (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1979).

Algumas sementes estocadas em museus e herbários são conhecidas por terem sobrevivido por vários anos. A maioria das sementes mantém sua viabilidade quando armazenadas no escuro, com baixo teor de umidade e baixas temperaturas (Bewley & Black, 1986). Sementes de plantas superiores que somente germinam na presença de luz, são capazes de germinar no escuro após o período de armazenamento, que é variável dependendo da espécie estudada (Mayer & Poljakoff Mayber, 1979). Em M. chenopoda, entretanto, o período de armazenamento de até 130 dias em escuro e à temperatura ambiente não alterou o comportamento de sensibilidade à luz observado anteriormente e nem a capacidade de germinação. Esse comportamento mostrou-se importante pois foi possível armazená-los e assim dar prosseguimento aos experimentos, mesmo quando os talos entravam em sua fase gametofítica (produção de gametas para reprodução sexuada).

Em plantas inferiores, estudos têm sido feitos no sentido de se determinar o envolvimento de substâncias na germinação de propágulos. Válio & Schwabe (1970) revelaram que o período de 8 horas diárias é ideal para o crescimento de talos de Lunularia cruciata, e que a presença do ácido lunulárico era o responsável pela dormência, sobretudo em dias longos. Imoto et al (1985) trabalhando com M. polymorpha propuseram que o ácido lunulaárico tem efeito inibidor nas funções fotossintéticas, havendo a possibilidade de que este possa ser o responsá-

vel pela regulação do crescimento. Como os propágulos de *M. chenopoda* não germinam em escuro, levantou-se a hipótese que poderiam estar agindo substâncias inibidoras.

Em muitas espécies de plantas superiores o efeito promotor da lavagem das sementes para remoção de substâncias inibidoras, tem sido amplamente estudado. Em *Vitis vinifera*, por exemplo, a lavagem das sementes pode promover a germinação (Maeda & Pereira, 1987). Entretanto a pré-lavagem dos propágulos não afeta a taxa de germinação e crescimento dos talos jovens no escuro, descartando-se, assim, a possibilidade da presença de substâncias inibidoras estarem agindo na inibição do crescimento de propágulos mantidos no escuro.

Segundo Treboux (in Sussman, 1965B) a germinação no escuro pode ocorrer em *M. polymorpha* se forem colocados num meio nutritivo especial. As observações de Buch & Chalaud (in Sussam, 1965B) em hepáticas também enfatizam o efeito do meio na forma do protonema desses organismos. Em esporos de *Dryopteris filix-mas* e de outras samambaias a germinação ocorre no escuro após exposição à luz por algumas horas. Quando são transferidos para um meio de agar contendo nutrientes minerais, um tratamento curto de luz vermelha (um minuto) é suficiente para induzir a germinação. No escuro a germinação não ocorre. Em *M. chenopoda* a germinação no escuro também não ocorre mesmo na presença de solução nutritiva, parecendo ser a luz um importante fator desencadeador dos processos morfogênicos.

As condições ambientais durante a formação dos propágulos dentro das cestas parece também afetar o crescimento destes. Propágulos formados sob luz branca contínua e colocados para crescer também em luz

branca contínua, atingem uma área inferior àquela alcançada por propágulos formados em condições naturais de casa de vegetação ou escuro.

A luz, nesse caso, poderia estar agindo como fator de estresse para propágulos em formação no interior das cestas, que seriam capazes de germinar mas teriam seu crescimento posterior inibido.

Além da luz, hormônios podem estar envolvidos como promotores ou inibidores de crescimento e germinação em plantas superiores e inferiores.

O efeito promotor de luz de alta intensidade, por exemplo, na germinação de esporos de Eunaria hygrometrica, pode ser revertido por baixas concentrações de AIA (Sussman, 1965).

De La Rue & Narayanaswami (1957) mostraram que em L. cruciata os propágulos não germinam enquanto estão dentro dos receptáculos devido à auxina que se difunde basipetamente do meristema apical do talo-mãe. Hormônios de crescimento em blocos de agar e substâncias difundidas das extremidades excisadas de talos em blocos de agar, são efetivas na inibição do crescimento de propágulos. Este efeito inibidor da auxina, no entanto, pode ser revertido pelo uso de anti-auxinas (ácido $\uparrow$ -fenil-butírico). O transporte seria polar, ou seja, do ápice do talo-mãe para os receptáculos.

Em E. hygrometrica, Rose et al (1983) mostraram que o efluxo de AIA do protonema era devido a 2 componentes: difusão e fluxo ativo, sendo que este último era dependente da temperatura e da concentração interna do hormônio. Experimentos recentes com protonema de musgos mostraram um transporte também polar de AIA nesses tecidos que pode ser explicados pela hipótese quimiosmótica de transporte polar de AIA.

A aplicação de anti-auxinas, segundo Sussman (1965) induz a germinação das gemas mesmo que estejam dentro dos receptáculos. A aplicação de AIA a $100 \mu\text{g/l}$ inibe completamente a germinação e crescimento de gemas de *Calceogerrria trichomanes*; concentrações de $1 \mu\text{g/l}$ e $5 \mu\text{g/l}$ são estimulatórias.

Os resultados obtidos em *M. chenopoda* parecem corroborar essa hipótese de inibição de crescimento por ação do AIA.

Além do AIA, o etileno também parece estar envolvido no controle do desenvolvimento de propágulos. Segundo Rohwer & Schierle (1982), a luz pode agir reduzindo a produção (formação) de etileno em segmentos de plantas e promover em plantas intactas, dependendo da espécie utilizada. Nesse caso um aumento da concentração de ACC (ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico) que é um precursor de etileno, pode ser uma expressão do aumento de formação de ACC ou da inibição da conversão a etileno, ou ambos. A luz modifica também a atividade da ACC-oxidase, em plântulas estioladas via fitocromo.

O etileno pode agir ainda inibindo a síntese de componentes de parede. Mudanças no tempo ou locação (ou ambos) de síntese de hidroxiprolina (componente de paredes celulares) durante a ontogênese poderia descrever algumas diferenças filogeneticamente significativas na morfologia de folhas e talos de hepáticas. O etileno poderia, assim, ser um dos componentes do sistema morforregulatório que agiria como inibidor de desenvolvimento. A ação do etileno, nesse caso, parece ser semelhante ao observado em plantas superiores (Basile & Basile, 1983).

O efeito de certos fatores fisiológicos e de desenvolvimento na produção de etileno tem sido examinado em muitos sistemas. Segundo Smith & Hall (1984) parece que o etileno por si pode auto-regular sua biossíntese. Um aumento na produção de etileno em tecidos vegetais tem sido detectado após exposição a etileno exógeno. Também a auto-inibição da produção de etileno tem sido demonstrada em frutos e tecidos vegetativos. A liberação de etileno também é estimulada pelo conteúdo de ACC em musgos (Rohwer & Bopp, 1985).

Análises com auxílio de cromatógrafo a gás revelaram que propágulos de M. chenopoda liberam etileno somente em presença de luz branca, sugerindo que o etileno seja necessário para a germinação e crescimento dessa espécie, uma vez que a aplicação de AgNO_3 e Perclorato de Mercúrio inibe o crescimento inicial dos talos em luz. A inibição do crescimento causada pela aplicação de etrel, em propágulos de M. chenopoda, poderia ser devida a um efeito de concentrações supra-ótimas.

Em vários sistemas vegetais a formação de etileno pode ser também promovida pela presença de AIA. Yu & Yang (1979) sugerem que no caminho biossintético do etileno o AIA estimule a sua produção pela indução de síntese ou ativação de ACC-sintetase, que catalisa a conversão de SAM (S-adenosil-metionina) a ACC. Em musgos o conteúdo de ACC e a formação de etileno também são promovidos pelo AIA (Rohwer & Bopp, 1985). Sugeriu-se como hipótese de trabalho que o AIA presente nos ápices dos talos (De La Rue & Narayanaswami, 1957) seria o responsável pela liberação de etileno nestes, e que em presença de AIA, níveis mais altos do gás seriam detectados.

Análises cromatográficas de talos jovens crescendo em presença de luz em AIA e água mostraram diferença significativa quanto ao nível de etileno detectado, sugerindo que a hipótese de que haja uma interação hormonal entre etileno e AIA seja verdadeira. Em outras espécies de pteridófitas como *Equisetum* e *Pteridium* também se encontraram resultados semelhantes com relação à germinação de esporos, sugerindo que a produção de etileno siga o mesmo padrão observado em plantas superiores.

Segundo Fredericq et al (1978) estudos preliminares mostraram que o talo verde de *M. polymorpha* produz mais etileno em luz que em escuro. Transferindo-se talos de escuro para luz notou-se um rápido aumento da produção de etileno, enquanto que uma queda lenta e gradual é encontrada quando se transfere da luz para o escuro. Os autores mostraram que, nesse caso, a luz promove produção de etileno e que esta é dependente da fotossíntese. Mais tarde Veroustraete et al (1982) mostraram que esta produção de etileno estimulada pela luz era dependente da presença ou ausência de CO_2 , sendo que se torna praticamente independente deste quando VE terminal é dado. Em *M. chenopodia* a luz promove a formação dos propágulos no interior das cestas. Embora esta também ocorra em cestas mantidas em escuro contínuo, a velocidade de formação é drasticamente afetada pois após 10 dias apenas 9% das cestas estão repletas de propágulos. Em *Eunaria hygrometrica* a luz também parece ser importante na formação das gemas uma vez que ela não ocorre no escuro (Simon & Naef, 1982). Com relação à formação de propágulos no interior de receptáculos, análises com auxílio de cromatógrafo a gás revelaram que talos de *M. chenopodia* liberam etileno em luz

e escuro. Talos com cestas mas sem propágulos em seu interior também liberam etileno. Uma hipótese levantada seria que o etileno liberado pelo talo seria o responsável pela formação dos propágulos no interior das cestas. Análises mostraram que há diferença significativa nos níveis de etileno liberado por cestas em luz e em escuro, sugerindo que, além da luz, o etileno também possa estar envolvido no controle da formação dos propágulos dentro das cestas, pois nesse período uma queda do nível de etileno liberado pelas cestas em escuro é observado, enquanto que em luz ocorre aumento de formação de propágulos e do nível de etileno liberado. A aplicação de etrel, no entanto, atrasa a formação de propágulos dentro das cestas, possivelmente devido a um efeito de concentrações supra-ótimas.

Em cestas de *M. chenopodia* a aplicação de AIA causa inibição da formação dos propágulos em seu interior, durante os 14 dias de experimento.

Na tentativa de se estudar o mecanismo pelo qual hormônios como AIA e etrel estão envolvidos no controle do crescimento inicial dos talos jovens, análises envolvendo contagem de células em presença de ambos foi realizada em propágulos dessa espécie.

Segundo Edwards & Miller (1972) esporos de *Oocleas sensibilis* em germinação possuem uma população de células que se dividem sincronicamente. Esporos atingem rapidamente o máximo de germinação em baixas intensidades luminosas, enquanto que altas intensidades luminosas são necessárias para sua germinação quando são tratados com etileno. Os autores sugerem que o etileno poderia estar agindo a nível de divisão celular (atividade cromática ou replicação cromossômica). Fisher &

Miller (1978) realizaram experimentos nesse sentido em esporos de samambaias. Quando esporos são expostos no início a $10 \mu\text{l/l}$ de etileno nenhuma germinação ocorre depois de 24 e 48 horas. O núcleo permanece no centro do esporo e nenhuma divisão celular ocorre. O efeito inibitório é completamente revertido tão logo os esporos sejam removidos da presença do gás. Em Elaginochila arctica (Basile & Basile, 1983) a inibição de divisão celular também é associada ao hormônio etileno.

Em M. chenopoda entretanto a aplicação de etileno não inibe o processo de divisão, embora haja uma redução na taxa de crescimento em área. A aplicação de AIA também não altera o número de células por propágulo, mostrando que a inibição ocorrida é apenas devida a inibição de alongamento celular.

Em plantas de ervilha, por exemplo, tanto a aplicação de etileno como de AIA afetam o crescimento de maneira similar pois AIA estimula síntese de etileno (Apelbaum & Burg, 1972). Resultados obtidos em M. chenopoda sugerem fortemente que durante o período inicial do crescimento de propágulos dessa espécie, etileno e AIA estejam envolvidos nos processos de alongamento celular, sendo que o AIA promoveria a síntese de etileno.

Durante seu desenvolvimento os tecidos passam por algumas fases distintas de crescimento, cada uma sendo caracterizada pela formação de tipos celulares específicos. A produção de gametófitos, por exemplo, pode ser influenciada pela aplicação de reguladores de crescimento como AIA e etileno. Entretanto, estudos recentes mostram que além destes, citocininas e giberelinas também podem agir alterando o padrão de crescimento em espécies inferiores (Trevor et al, 1981).

Em Physcomitrella patens o uso de mutantes indicou que citocininas são necessárias para o desenvolvimento do gametófito nessa espécie. Também em algumas briófitas citocininas são importantes reguladores de crescimento (Yamane et al, 1983).

Em E. hygrometrica a formação de gemas é um passo fundamental na morfogênese do protonema dessa espécie. Este crescimento parece ser também regulado por citocininas, como a cinetina, mudando a forma de crescimento da região apical das ramificações (Bopp, 1984). Markmann & Bopp (1987), mostraram que também a formação de gemas pode ser induzida pela cinetina.

Em M. chenopoda a aplicação de cinetina não tem efeito estimulador do crescimento dos talos jovens. A aplicação de 6-BA, no entanto, é promotora do crescimento em luz.

Outro grupo de substâncias de crescimento que pode estar envolvida no controle do desenvolvimento inicial de espécies inferiores são as giberelinas. Seus efeitos são bastante estudados em plantas superiores, principalmente quanto a indução de alongamento de caule.

Em M. chenopoda a aplicação de GAg estimula o crescimento dos talos jovens somente em presença de luz.

Poucos são os trabalhos sobre o efeito desta substância de crescimento em plantas inferiores. Em 1970, Schwabe & Válio, trabalhando com L. cruciata encontraram uma resposta inibidora de crescimento de propágulos com a aplicação de GAg nessa espécie.

Hisakazu et al (1985) identificaram a presença de vários tipos de giberelinas em esporófitos de Cyathea australis. Em esporos de Anemia phyllitidis o crescimento dos filamentos (talos) é uma resposta a luz

vermelha e não ocorre em escuro ou vermelho-extremo. O crescimento ocorre nestas condições se estiver em presença de ácido giberélico.

Todos os resultados obtidos com M. chenopoda sugerem fortemente que a luz é um fator importante no crescimento de talos jovens, uma vez que mesmo com a aplicação de substâncias estimuladoras de crescimento este não ocorre no escuro.

A luz, desta forma, estaria agindo no controle dos níveis de hormônios endógenos, modificando a germinação e o crescimento posterior.

Este material também se mostrou interessante para o estudo do envolvimento da luz nos processos morfogenéticos, pois esta espécie responde muito rapidamente aos testes e, devido a seu tamanho, permitem a realização de grande número de repetições em pequeno espaço. O material é, na maior parte do ano, abundante e de fácil manutenção em casa de vegetação.

Este é, sem dúvida, um campo que deveria ser mais detalhadamente estudado, uma vez que em literatura encontram-se poucos trabalhos relacionados a este assunto.

V. CONCLUSÕES

1. O crescimento de propágulos só ocorreu em presença de luz branca ou vermelha contínuas e cessa quando transferidos para o escuro. Em VE e azul também não ocorreu crescimento.
2. A temperatura influi no crescimento dos propágulos sendo a mais favorável 25°C. Temperaturas acima de 30°C e abaixo de 20°C são desfavoráveis ao crescimento na presença da luz.
3. A aplicação de AIA ou etileno inibem o crescimento dos talos em luz, entretanto mesmo na presença destas soluções não ocorre alteração do número de células quando comparado ao controle com água.
4. Talos jovens liberam mais etileno em luz.
5. A aplicação de GA₃ e 6-BA estimulam o crescimento dos talos jovens na luz branca.
6. A luz branca promove a formação dos propágulos no interior das cestas. No escuro esta formação ocorre embora numa velocidade menor.
7. A aplicação de AIA causa inibição da formação dos propágulos dentro das cestas na luz branca.

VI. RESUMO

Marchantia chenopoda é uma hepática comum em locais quentes e úmidos. A reprodução vegetativa nessa espécie ocorre através de estruturas denominadas propágulos, que se desenvolvem dentro de receptáculos situados na superfície dorsal do talo.

A germinação de propágulos pode estar condicionada aos mesmos fatores controladores de desenvolvimento de plantas superiores, onde o fenômeno é mais estudado. Este trabalho teve como objetivo o estudo do envolvimento da luz e de substâncias de crescimento no controle do desenvolvimento inicial dos talos, bem como na formação destes dentro dos receptáculos.

A germinação de propágulos e o crescimento inicial dos talos ocorreu quando os propágulos foram expostos à luz vermelha ou branca e não aconteceu no escuro, mesmo com a aplicação de sacarose. Em vermelho-extremo e azul também não ocorre crescimento, sugerindo o envolvimento do fitocromo como fotorreceptor. Também com aplicação de solução nutritiva não ocorre crescimento dos propágulos em escuro.

Também não foram encontradas respostas a exposições curtas de V e VE na germinação e desenvolvimento do propágulos. Exposições de até 120 horas não foram efetivas na indução do crescimento no escuro, não tendo sido encontrada, portanto, resposta de reação de baixa energia do sistema fitocromo.

A temperatura também afeta a velocidade de crescimento dos talos jovens em luz, sendo que, dentre as testadas, as mais favoráveis ao

crescimento são 20°C e 25°C.

Observou-se também que o período de armazenamento bem com a pré-lavagem inicial dos propágulos não afeta a germinação e o crescimento posterior destes em luz.

A aplicação tanto de etileno como de AIA em propágulos causa inibição do crescimento em área, entretanto esta inibição não é observada quando o número de células por propágulo é avaliado.

O efeito de outras substâncias de crescimento como giberelinas e citocininas também foram testadas e verificou-se que ocorre promoção do crescimento em luz em presença de GA₃ e 6-BA. Em escuro não ocorre crescimento mesmo com a aplicação destas soluções.

Também foram verificados os efeitos da luz e substâncias de crescimento na formação dos propágulos dentro dos receptáculos. Em luz a velocidade de formação dos propágulos é maior, embora em escuro também ocorra. AIA e etrel inibem a formação dos propágulos, sendo que após 11 dias a inibição causada pelo etrel é revertida.

Análise da liberação de etileno, através de cromatografia a gás, mostrou que o nível deste aumenta durante o crescimento inicial dos talos a partir de propágulos, bem como durante a sua formação nos receptáculos, sugerindo que este hormônio esteja envolvido do controle dos dois processos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeles, F.B. 1973. Ethylene Traps. In. Ethylene in Plant Biology. Academic Press. 21p.
- Apelbaum, A. & Burg, S.P. 1972. Effect of ethylene on cell division and deoxyborunucleic acid synthesis in Pisum sativum. Plant Physiol. 50: 117-124.
- Bandurski, R.S. 1984. Metabolism of Indole-3-Acetic Acid. In: The biosynthesis and metabolism of plant hormones. Cambridge University Press. London. 183p.
- Basile, D.V. & Basile, M.R. 1983. Dessupresion of leaf primordia of Plagiobhila arctica (Hepaticae) by ethylene antagonists. Science. 220:1051-1053.
- Bewley, J.D. & Black, M. (1986). Seed Physiology: Development and Germination. Plenum Press-New York and London. 175p.
- Bopp, M. 1984. The hormonal regulation of protonema development in-Mosses. II. The first steps of cytokinin action. Z. Pflanzenphysiol. 43: 435-444.

- Brown, R.B. & Rickless, P. 1949. A new method for the study of cell extension with some preliminary observations of the effect of temperature and nutrients. *Proc. R. B.* 136: 110-125.
- Cooke, T.J.; Racusen, R.H. & Hickook, L.G. 1987. The Photocontrol of spore germination in the Fern Ceratopteris richardii. *Plant Cell Physiol.* 28(5): 753-759.
- Côme, D. & Tissaouri, T. 1973. Interrelated effects of inhibition, temperature and oxygen on seed germination. In: *Seed Ecology*. W. Heydecker, eds. Butterworths. London. pp. 157-168.
- De Greef, J.A. & Fredericq, H. 1983. Photomorphogenesis and Hormones. In: *Photomorphogenesis*. W. Shropshire Jr. & H. Mohr, eds. Springer-Verlag, Berlin. pp. 401-427.
- De La Rue, C.D. & Narayanaswami, S. 1957. Auxin Inhibition in the liverwort Lunularia. *New Phytol.* 56: 61-70.
- Edwards, M. E. & Miller, J. H. 1972. Growth regulation by ethylene in fern gametophytes. III Inhibition of spore germination. *Am. J. Bot.* 59(5): 458-465.
- Fisher, R. W. & Miller, J. H. 1978. Growth regulation by ethylene in fern gametophytes. V. Ethylene and the early events of spore germination. *Am. J. Bot.* 65: 334-339.

Fredericq, H., Veroustraete, F., De Greef, J.A. & Rethy, R. 1978. Light enhancement ethylene production in *M. polymorpha*. L. Arch. Int. Physiol. Biochim. 85:977-978

Fredericq, H., & De Greef, J.A. 1966. Influence, Réversible par La-lumière rouge-clair, de courts éclaircissements rouge-foncé a la fin de la photopériode sur la croissance et la teneur en chlorophylles de *M. polymorpha*. Photoch. Photobiol. 5: 431-440.

Furuya, M. 1983. Photomorphogenesis en ferns. In. Photomorphogenesis. W. Shropshire Jr and H. Mohr, eds. Springer-Verlag. Berlin, pp 569-600

Hayami, J., Kadota, A., & Wada, M. 1987. Blue light-induced phototropic response and the intracellular photoreceptive site in *Adiantum* protonemata. Plant Cell Physiol. 27(8): 1571-1577.

Haupt, W. 1965. Perception of environmental stimuli orienting growth and movement in lower plants. Rev. Plant. Physiol. 16: 267-290

Haupt, W. 1985. Effects of nutrients and light pretreatment on phytochrome-mediated fern-spore germination. Planta. 164: 63-68.

- Heydecker, W; Chetram, R.S. & Heydecker, J.C. 1971. Water relations of Beetroot seed germination. II. Effects of the ovary cap and of the endogenous inhibitors. *Ann. Bot.* 35: 31-42.
- Hisakazu, Y. et al. 1985. Identification of ten Gibberelins from sporophytes of the tree fern, Cyathea australis. *Plant Physiol.* 78: 899-903.
- Imoto, S.A. & Yoshimoto, O. 1985. Intracellular localization of Lunularic Acid and Prelunularic Acid in suspension cultured cells of Marchantia polymorpha. *Plant. Physiol.* 79: 751-755.
- Kadota, A. & Furuya, M. 1977. Apical growth of protonemata in Adiantum capillus-veneris. I. Red-far-red reversible effect on growth cessation in the dark. *Dev. Growth Differ.* 19: 357-365
- Kadota, A. & Furuya, M. 1977. Apical growth of protonemata in Adiantum capillus-veneris. IV. Phytochrome-mediated induction in non-growing cells. *Plant Cell Physiol.* 22:629-638.
- Lagoa, A.M.M.A. & Pereira, M.F.A. 1989. Envolvimento do tegumento no controle da germinação de sementes de Ricinus communis L. *Revta Biologia* (no prelo).
- Maeda, J.A. & Pereira, M.F.D.A. 1987. Germination of Vitis vinifera seeds: role of the seed coat. *Revta Bras. Bot.* 10: 1-5.

- Mancinelli, A. L. 1983. The photoregulation of anthocyanin synthesis. In: Photomorphogenesis (W. Shropshire Jr. & H. Mohr, eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 640-661.
- Mancinelli, A. L. & Rapino, I. 1975. photocontrol of anthocyanin synthesis. IV. Dose Dependence and reciprocity relationships. Plant Physiol. 56: 351-355.
- Markmann-Mulisch, V. & Bopp, M. 1987. The hormonal regulation of protonemata development in Mosses. IV. The role of Ca^{+2} as cytokinin effector. J. Plant Physiol. 129: 155-168.
- Marmé, D. 1977. Phytochrome: membranes as possible sites of primary action. Annu. Rev. Plant. Physiol. 28: 173-198.
- Mayer, A.M. & Poljakoff-Mayber, A. 1979. Dormancy, Germination Inhibition and Stimulation. In: The germination of seeds. P.F. Wareing and A.Y. Galston. Pergamon Press, pp. 46-75.
- Mayer, A.M. & Poljakoff-Mayber, A. 1979. Metabolism of Germinating Seeds. In: The germination of seeds. P.F. Wareing and A.Y. Galston. Pergamon Press. 76p.
- Metivier, J.R. & Paulilo, M.T.S. The utilization of cotyledonary reserves in Phaseolus vulgaris L. cv carioca. II. J. Exp. Bot. 31(124): 1271-1282.

- Parihar, N. S. 1966. An Introduction to Embryophyta. Vol. I. Bryophyta
Central Book Depot. Publ. Allahabad 375 p.
- Rohwer, F. & Shierle, J. 1982. Effect of light on ethylene production:
red light enhancement of ACC concentration in etiolated pea
shoots. Z. Pflanzenphysiol. 107 (4): 295-300
- Rohwer, F. & Bopp, M. 1985. Ethylene synthesis in Moss protonema. J.
Plant. Physiol. 117: 331-338.
- Rose, S.; Eberhardt, I. & Bopp, M. 1983. Temperature dependent auxin
efflux from moss protonema. Z. Pflanzenphysiol. 109: 243-249.
- Shanab, S. & Jacques, R. Magne, F. 1988. Croissance et ramification
du thalle de Rachetotia antillarum cultivé en éclairagements
monochromatiques. Plant. Physiol. Biochem. 26(3): 303-311.
- Simom, P.E. & Naef, J.B. 1982. Light dependency of the cytokinin-
induced bud initiation in protonemata of the moss Eunaria
hygrometrica. Physiol. Plant. 53(1): 13-18.
- Schwabe, W.W. & Válio, I.F.M. 1970. Growth and dormancy in Lunularia
cruciata (L.) Dum. VI. Growth regulation by daylight, by red-far-
red, and blue light, and by applied regulators and chelating
agents. J. Exp. Bot. 21: 122-137.

Smith, H. 1975. *Phytochrome and Photomorphogenesis*. Mc. Graw-Hill.

Sugai, M. & Furuya, M. 1967. Photomorphogenesis in Pteris vittata. I. Phytochrome-mediated spore germination and blue light interaction. *Plant Cell Physiol.* 8: 737-748.

Sussman, A.S. 1965 A. Physiology of dormancy and germination in the propagules of cryptogamic plants. *Encycl. Plant. Physiol.* Vol XV/2 pp 933-1012.

Sussman, A.S. 1965 B. Longevity and resistance of the propagules of bryophytes and pteridofites. *Encycl. Plant. Physiol.* Vol XV/2 pp. 1086-1092.

Taylor, A.O. & Bonner, B.A. 1967. Isolation of phytochrome from the alga Mesotaenium and liverwort Sphaerocarpos. *Plant Physiol.* 42: 762-766.

Towill, L.R. & Ikuma, H. 1973. Photocontrol of germination of Oenoclea spores. I. Action spectrum. *Plant Physiol.* 51: 973-978.

Towill, L.R. & Ikuma, H. 1975. Photocontrol of germination of Oenoclea spores. II. Analyses of germination processes by meas of anaerobiosis. *Plant Physiol.* 55: 150-154.

- Trevor, L.W. & Morgan, R. & Cove, D. 1981. Cytokinins from the moss Physcomitrella patens. Plant Physiol. 68: 735-739.
- Valio, I.F.M. 1969. Promotion and inhibition of growth in Lunularia cruciata (L.) Dum. Tese de Doutorado.
- Valio, I.F.M. & Schwabe, W.W. 1969. Growth and dormancy in Lunularia cruciata (L.) Dum. IV. Light and temperature control of rhizoid formation in gemmae. J. Exp. Bot. vol.20: 615-628.
- Valio, I.F.M. & Schwabe, W.W. 1970. Growth and dormancy in Lunularia cruciata (L.) Dum. VII The isolation and bioassay of lunularic acid. J. Exp. Bot. vol.21: 138-150.
- Vianna, E.C. 1981. Nota sobre a ocorrência de brotações de anterióforos de Marchantia chenopoda. Iheringia. 28: 43-46.
- Veroustraete, F.; Fredericq, W.; Van Wiemeersch, L. & De Greef, J. 1982. Specific photoregulation by phytochrome of epinasty and light-induced ethylene production in M. polymorpha. 35(2): 261-264.
- Ward, T.M., Wright, M., Roberts, J.A., Self, R. & Osborne, D.J. 1978. Analytical procedures of the assay and identification of ethylene. In Isolation of plant growth substances. Society for Experimental Biology. Hillman, J.R. eds.

H.; Watanabe, M.; Satoh, Y.; Takahashi, N. & Iwatsuki, K.
. Identification of cytokinins in two species of
idophytes sporophytes. Plant Cell Physiol. 24(6): 1027-1031.

Yang, S.F. 1979. Auxin-induced ethylene production and its
bition by Aminoethoxyvinylglycine and Cobalt ion. Plant
iol. 64: 1074-1077.