

LUCIANO MAURICIO ESTEVES

MORFOLOGIA E GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE PTERIDÓFITAS  
DOS CERRADOS DO ESTADO DE SÃO PAULO

Este exemplar corresponde à redação  
final da tese defendida pelo candidato  
Luciano M. Esteves e aprovada pela  
comissão julgadora.

Vilalpe

04 de janeiro de 1989

Tese apresentada ao Instituto  
de Biologia da Universidade  
Estadual de Campinas, para  
obtenção do título de DOUTOR  
EM CIÊNCIAS.

ORIENTADOR:

PROF. DR. GIL MARTINS FELIPPE

CAMPINAS - SP

1989

Es85m

10229/BC

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

A Odilon e Orquídea,

por tudo.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha sincera gratidão às várias pessoas que me deram sua ajuda e seu apoio durante o período em que trabalhei nesta tese. Seria impossível mencionar a todos. Entretanto, estou especialmente grato a:

- Dr. Gil Martins Felipe, pela orientação geral, sem a qual não teria sido possível realizar esta tese, e pela troca permanente de idéias, amizade e incentivo, marcando de modo positivo e permanente minha formação científica.

- Dra. Therezinha Sant'Anna Melhem, pela sua orientação nos estudos palinológicos e pelos valiosos conselhos e recursos oferecidos no decorrer do trabalho.

- Dra. Maria Cláudia Marx Young e Dra. Rita de Cássia Leone Figueiredo Ribeiro, pelo valioso auxílio oferecido no estudo de inibidores fenólicos.

- Dr. Ivany Ferraz Marques Válio, pelo aconselhamento e atenção dispensados durante o ano de 1987.

- Rita Helena Buso Jacon, pelo auxílio no trabalho de microscopia eletrônica, com eficiência e dedicação extremadas.

- Angela Maria Silva Corrêa Pando, técnica de laboratório da Seção de Dicotiledôneas (IBT), pela realização das acetólises utilizadas nesta tese.

- Instituto de Botânica de São Paulo, especialmente aos colegas da Seção de Dicotiledôneas, da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pelas sugestões no decorrer do trabalho e pelo auxílio na montagem da tese.

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela Bolsa de Doutorado, pelo auxílio financeiro destinado à realização da microscopia eletrônica de varredura.

## ÍNDICE GERAL

	Página
INTRODUÇÃO .....	1
MATERIAIS E MÉTODOS .....	9
1. MORFOLOGIA DOS ESPOROS .....	15
1.1. Coleta .....	15
1.2. Limpeza e esterilização .....	15
1.3. Preparação dos esporos para microscopia óptica....	16
1.3.1. Acetólise .....	16
1.3.2. Técnica do carbonato de sódio.....	17
1.4. Medidas.....	18
1.5. Fotomicrografias .....	19
1.6. Microscopia eletrônica de varredura .....	19
2. GERMINAÇÃO.....	20
2.1. Curvas de germinação .....	22
2.2. Germinação de esporos de <u>Polypodium latipes</u> .....	22
2.2.1. Luz branca.....	22
2.2.1.a. Período de pré-indução.....	22
2.2.1.b. Período de indução.....	22
2.2.1.c. Intensidade luminosa .....	23
2.2.2. Luz vermelha e vermelho-extremo.....	23
2.2.2.a. Indução por luz vermelha .....	23
2.2.2.b. Choques de luz vermelha .....	24

2.2.2.c. Vermelho-extremo constante.....	24
2.2.2.d. Reversão do efeito de luz vermelha por vermelho-extremo.....	24
2.2.3. Temperaturas constantes e alternadas .....	25
2.2.4. Reguladores de crescimento.....	25
2.2.4.a. Ácido 2-cloro-etilfosfônico (CEPA).....	25
2.2.4.b. Ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ).....	26
3. EXTRAÇÕES E DOSAGENS EM ESPOROS DE <u>Polypodium latipes</u> .	26
3.1. Extrações .....	
3.1.1. Extração de açúcares solúveis totais e proteí- nas solúveis .....	26
3.1.2. Extração de lipídios livres .....	27
3.2. Dosagens .....	
3.2.1. Dosagem de açúcares solúveis totais.....	28
3.2.2. Dosagem de proteínas solúveis .....	28
3.2.3. Dosagem de lipídios.....	29
4. INIBIDORES FENÓLICOS EM <u>Polypodium latipes</u> .....	29
4.1. Bioensaios .....	29
4.1.1. Bioensaio com folíolos secos.....	29
4.1.2. Bioensaio com extrato aquoso.....	30
4.1.3. Bioensaio com extrato etanólico.....	31

4.2. Extração e dosagem de fenóis totais nos folíolos.	31
4.2.1. Extração.....	31
4.2.2. Dosagem.....	32
4.2.3. Reagente Folin- Denis.....	32
4.2.4. Solução saturada de $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .....	32
4.3. Identificação e dosagem de cumarina nos folíolos.	33
4.3.1. Extração.....	33
4.3.2. Cromatografia em camada delgada .....	33
4.3.3. Cromatografia preparativa.....	33
4.3.4. Efeito da substância isolada na cromatografia preparativa, na germinação de esporos de <u>Polypodium latipes</u> .....	34
4.3.5. Identificação pelo espectro de absorção no ultra-violeta.....	34
4.3.6. Dosagem.....	35
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	35
RESULTADOS .....	37
1. MORFOLOGIA DO ESPOROS .....	37
1.1. <u>Adiantum serratodentatum</u> .....	37
1.2. <u>Anemia flexuosa</u> .....	45
1.3. <u>Anemia raddiana</u> .....	45
1.4. <u>Doryopteris concolor</u> .....	46
1.5. <u>Polypodium hirsutissimum</u> .....	47

1.6. <u>Polypodium latipes</u> .....	47
1.7. <u>Polypodium pleopeltifolium</u> .....	47
1.8. <u>Polypodium polypodioides</u> .....	48
1.9. <u>Polypodium squamulosum</u> .....	48
1.10. Chave para identificação dos esporos de espécies de pteridófitas coletadas em cerrado.....	49
2. GERMINAÇÃO	
2.1. Método para contagem de germinação.....	50
2.2. Germinação dos esporos das nove espécies coletadas nos cerrados.....	52
3. <u>Polypodium latipes</u> .....	55
3.1. Germinação.....	56
3.1.1. Luz branca.....	56
3.1.1.a. Determinação do período de pré-indução.....	56
3.1.1.b. Determinação do período de indução.....	58
3.1.1.c. Intensidade luminosa.....	60
3.1.2. Luz vermelha e vermelho-extremo.....	61
3.1.2.a. Indução da germinação por luz vermelha.....	61
3.1.2.b. Efeito de choques de luz vermelha.....	61
3.1.2.c. Germinação sob vermelho-extremo constante...	63
3.1.2.d. Reversão do efeito de luz vermelha por ver- melho-extremo.....	64

3.1.3. Efeito de temperaturas constantes e alternadas	65
3.1.4. Reguladores de crescimento.....	67
3.1.4.a. Ácido 2-cloro-etilfosfônico (CEPA).....	67
3.1.4.b. Ácido giberélico ( $GA_3$ ).....	71
3.2. Susbtâncias de reserva dos esporos.....	72
3.2.1. Açúcares solúveis totais.....	72
3.2.2. Proteínas solúveis.....	72
3.2.3. Lipídios livres.....	72
3.3. Inibidores fenólicos nos folíolos.....	73
3.3.1. Bioensaios .....	73
3.3.1.a. Bioensaio com folíolos secos.....	73
3.3.1.b. Bioensaio com extrato aquoso.....	74
3.3.1.c. Bioensaio com extrato etanólico.....	75
3.3.2. Dosagem de fenóis totais.....	76
3.3.3. Detecção, separação, isolamento e purificação de cumarina.....	76
3.3.3.a. Cromatografia em camada delgada.....	76
3.3.3.b. Identificação pelo espectro de absorção no ultra-violeta.....	77
3.3.3.c. Dosagem.....	77
3.3.3.d. Germinação de esporos de <u>Polypodium</u> <u>lati-</u> <u>pes</u> : efeito de cumarina.....	77

DISCUSSÃO.....	81
1. MORFOLOGIA E GERMINAÇÃO DOS ESPOROS .....	81
2. <u>Polypodium latipes</u> .....	87
2.1. Germinação e substâncias de reserva dos esporos....	87
2.2. Substâncias fenólicas nos folíolos.....	97
RESUMO.....	101
LITERATURA CITADA.....	104

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1:	Medidas dos diâmetros dos esporos triletes.....	43
Tabela 2:	Medidas dos diâmetros dos esporos monoletes.....	44
Tabela 3:	Comparação dos métodos A e B para contagem de germinação de esporos.....	51
Tabela 4:	Velocidade de germinação (coeficiente de inclinação <u>b</u> ) para as nove espécies de pteridófitas dos cerrados.....	54
Tabela 5:	Determinação do período de pré-indução (dias) em esporos de <u>Polypodium latipes</u> .....	56
Tabela 6:	Determinação do período de pré-indução (horas) em esporos de <u>Polypodium latipes</u> .....	57
Tabela 7:	Determinação do período de indução em esporos de <u>Polypodium latipes</u> .....	60
Tabela 8:	Germinação de esporos de <u>Polypodium latipes</u> sob várias intensidades luminosas.....	61
Tabela 9:	Período de luz vermelha necessário para indução da máxima germinação de esporos de <u>Polypodium latipes</u> .....	62
Tabela 10:	Germinação de esporos de <u>Polypodium latipes</u> sob vermelho-extremo constante.....	63
Tabela 11:	Reversão do efeito de luz vermelha por vermelho-extremo na germinação de esporos de <u>Polypodium latipes</u> .....	64
Tabela 12:	Efeito de 40 minutos de vermelho-extremo após diferentes períodos de luz vermelha na germinação de esporos de <u>Polypodium latipes</u> .....	65

Tabela 13: Velocidade de germinação (b) de esporos de <u>Polypodium latipes</u> sob temperaturas constantes e pares de temperaturas alternadas. As alternadas foram em ciclos diários de 8h/16h, 12h/12h e 16h/8h (inicial sempre a 25°C).....	68
Tabela 14: Efeito de ácido 2-cloro-etilfosfônico (CEPA)..... na germinação de esporos de <u>Polypodium latipes</u> . luz branca.....	70
Tabela 15: Germinação de esporos de <u>Polypodium latipes</u> pré-tratados com CEPA sob luz e/ou escuro, lavados e expostos à luz branca contínua.....	71
Tabela 16: Efeito de ácido giberélico na germinação de esporos de <u>Polypodium latipes</u> sob luz constante.....	71
Tabela 17: Conteúdo de açúcares solúveis totais, proteínas solúveis e lipídios livres em esporos de <u>Polypodium latipes</u> .	72
Tabela 18: Efeito de folíolo de <u>Polypodium latipes</u> na germinação de alface (bioensaio).....	73
Tabela 19: Inibição da germinação de sementes de alface pela aplicação de extrato aquoso de folíolos de <u>Polypodium latipes</u> .....	74
Tabela 20: Inibição da germinação de sementes de alface pela aplicação de extrato etanólico de folíolos de <u>Polypodium latipes</u> .....	75
Tabela 21: Fenóis totais equivalentes de ácido tânico em folíolos de <u>Polypodium latipes</u> .....	76
Tabela 22: Efeito de cumarina na germinação de esporos de <u>Polypodium latipes</u> , sob luz branca.....	79
Tabela 23: Efeito da cumarina extraída dos folíolos na germinação de esporos de <u>Polypodium latipes</u> .....	80

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras 1 a 7:	Esporos de <u>Adiantum serratodentatum</u> .....	38
Figuras 8 a 11:	Esporos de <u>Doryopteris concolor</u> .....	39
Figuras 12 a 16:	Esporos de <u>Anemia flexuosa</u> .....	39
Figuras 17 a 21:	Esporos de <u>Anemia raddiana</u> .....	40
Figuras 22 a 24:	Esporos de <u>Polypodium latipes</u> .....	40
Figuras 25 a 28:	Esporos de <u>Polypodium pleopeltifolium</u> .....	41
Figuras 29 a 33:	Esporos de <u>Polypodium hirsutissimum</u> .....	41
Figuras 34 a 38:	Esporos de <u>Polypodium squamulosum</u> .....	42
Figuras 39 a 41:	Esporos de <u>Polypodium polypodioides</u> .....	42
Figuras 42 a 50:	Germinação de esporos de pteridófitas dos cerrados.....	53
Figura 51:	Germinação de esporos de <u>Polypodium latipes</u> em relação ao período de embebição no escuro (pré-indução).....	59
Figura 52:	Germinação de esporos de <u>Polypodium latipes</u> sob temperatura e luz constantes.....	66
Figuras 53 a 58:	Germinação de esporos de <u>Polypodium latipes</u> sob temperaturas alternadas e luz constante.....	69
Figura 59:	Identificação de cumarina isolada de folíolos de <u>Polypodium latipes</u> pelo espectro de absorção no ultra-violeta.....	78

## INTRODUÇÃO

As fases, do ciclo de vida das pteridófitas, mais vulneráveis às condições ambientais são a germinação dos esporos, o desenvolvimento do gametófito, a fertilização e o crescimento do esporófito jovem (TRYON, 1972). Todos estes estádios envolvem uma ou poucas células. Estas normalmente têm um breve período de duração, durante o qual podem estar sujeitas a condições ambientais desfavoráveis. O esporófito adulto é bem mais durável, com uma vida de meses ou anos.

Quiescência e dormência, segundo RAGHAVAN (1980) não são nitidamente definidas no estudo de esporos de pteridófitas, principalmente porque os mecanismos de dormência não têm sido sistematicamente estudados. Pelo que se sabe, em esporos de pteridófitas, ao contrário do que ocorre em semente de angiospermas, somente um pequeno número de estímulos parece ser capaz de quebrar a dormência. Entre estes, o principal fator é a luz.

Em sua maioria absoluta, os esporos homósporos de pteridófitas são fotoblásticos positivos. Pela revisão de MILLER (1968) somente sete espécies germinam na ausência de luz (mas germinam também sob luz), em um total de 88. Entre as espécies brasileiras estudadas são maioria também aquelas com esporos fotoblásticos positivos, em temperaturas ao redor de 25°C. Por exemplo, Cyathea delgadii e Trichipteris corcovadensis, duas espécies arbóreas características de matas úmidas, são exclusivamente fotoblásticas positivas (MARCONDES-FERREIRA, 1983; ESTEVES, 1984; RANDI, 1987; RANDI & FELIPPE, 1988a).

Para que seja estabelecida a fotossensibilidade é necessário que o esporo inicialmente passe por um período conheci

do como pré-indução. Nesta fase ocorre síntese de proteínas responsáveis pelo estabelecimento e manutenção da sensibilidade à luz (TOWILL & IKUMA, 1975). A pré-indução pode ocorrer no escuro e inicia-se com a exposição do esporo à água, condições aeróbicas e temperaturas adequadas (TOWILL & IKUMA, 1975; CHEN & IKUMA, 1979). Segundo MILLER (1968) o tempo de hidratação varia de espécie para espécie, com um mínimo de três horas e o máximo de 36 horas. Entretanto, em Cyathea delgadii o período de pré-indução seria de 48 horas de acordo com MARCONDES-FERREIRA & FELIPPE (1974) e RANDI (1987).

A indução da germinação em esporos fotoblásticos positivos é dependente de vários aspectos relacionados à quantidade e qualidade da luz recebida.

Esporos de Trichipteris corcovadensis apresentam uma germinação maior nas menores intensidades luminosas testadas e fotoperíodos de 8, 12, 16 e 24 horas causam a mesma resposta de germinação (ESTEVES et al., 1985). Em Cyathea delgadii observou-se uma resposta semelhante, porém uma única exposição de luz fluorescente branca (MARCONDES-FERREIRA & FELIPPE, 1984) ou de vermelho (RANDI, 1987) já foi capaz de promover a germinação.

Os comprimentos de onda do espectro visível que promovem maior taxa de germinação geralmente encontram-se na faixa de 600 a 680nm, na região do vermelho (MILLER, 1968; SUGAI, 1971; TOWILL & IKUMA, 1973; HOWLAND & EDWARDS, 1979; MARCONDES-FERREIRA & FELIPPE, 1984). Em muitas espécies este efeito do vermelho não é revertido por vermelho-extremo (TOWILL & IKUMA, 1973; REINOLDS & RAGHAVAN, 1982). Em algumas espécies a indução da germinação é regulada pela fotorreversibilidade vermelho / vermelho-extremo, sugerindo que o fitocromo esteja envolvido no processo, atuando como receptor fotossensível. Entre estas espécies estão

Asplenium nidus (RAGHAVAN, 1971), Cheilantes farinosa RAGHAVAN, 1973), Cyathea delgadii (MARCONDES-FERREIRA & FELIPPE, 1984; RANDI, 1987; RANDI & FELIPPE, 1988b), Lygodium japonicum (SUGAI & FURUYA, 1977), Pteris vittata (SUGAI & FURUYA, 1967) e Thelipteris kunthii (HUCKABY & RAGHAVAN, 1981).

Em Cyathea delgadii o efeito de 1 minuto de luz vermelha é revertido pelo mesmo período de exposição subsequente ao vermelho-extremo. Exposições de 1 minuto à luz vermelha promovem a germinação de esporos embebidos durante 24 horas no escuro, mas não há diferença entre as porcentagens de germinação em esporos que receberam 1 ou 40 minutos de luz vermelha após 48 horas de embebidos. Entretanto, exposições diárias de 1 minuto (total de 6 exposições) causam o mesmo efeito que uma exposição de 24 horas, indicando que os esporos não apresentam reciprocidade (RANDI, 1987; RANDI & FELIPPE, 1988b).

MARCONDES-FERREIRA & FELIPPE (1984), RANDI (1987) e RANDI & FELIPPE, 1988c demonstram que choques de azul podem induzir alguma germinação em esporos de Cyathea delgadii. Esta indução é revertida por vermelho-extremo. A luz azul pode, também, reverter a inibição da germinação causada por vermelho-extremo.

As temperaturas mais altas que permitem germinação de esporos geralmente estão ao redor de 30 - 35°C (MILLER, 1968), embora algumas espécies de ambiente xérico germinem a 40 - 45°C (RAGHAVAN, 1980). Esporos de Cyathea delgadii germinam em temperaturas entre 15 e 30°C; temperaturas acima desta faixa não induzem germinação mesmo quando alternadas com 25°C em ciclos diários de 12 horas. Os dados indicam que temperaturas alternadas são mais efetivas para a germinação do que a temperatura de 25°C (MARCONDES-FERREIRA & FELIPPE, 1984). Esporos de Trichipteris covadensis germinam em uma faixa de temperaturas ainda mais es-

treita, entre 20 e 30°C, e em temperaturas alternadas de 20 - 25°C e 25 - 30°C. A temperatura mínima para a germinação dos esporos está ao redor de 10°C (ESTEVES et al., 1985). Entretanto, esporos de Pteridium aquilinum podem germinar sob temperatura de 1°C (MILLER, 1968).

Os efeitos de temperaturas em esporos podem apresentar interações com outros fatores, como luz, tornando difícil a compreensão do efeito de temperatura. Em alguns casos, temperaturas altas podem induzir germinação no escuro em esporos que necessitam de luz para germinar (SUSSMAN, 1965). Esporos de Cyathea delgadii e Trichipteris corcovadensis foram postos para germinar numa faixa de temperaturas de 5 a 45°C, mas nenhuma das temperaturas testadas promoveu a germinação na ausência da luz (MARCONDES-FERREIRA & FELIPPE, 1984; ESTEVES et al., 1985).

A temperatura ótima para germinação de esporos de Dryopteris filix-max é de 20°C. A germinação é inibida se os esporos receberem uma dose saturante de luz vermelha a 20°C seguida de 24 horas a 36°C sob escuro e depois retornarem para 20°C. Porém, se houver um intervalo entre os tratamentos de luz vermelha e temperatura alta a inibição não ocorre. Isto acontece porque a ação do fitocromo vermelho-extremo ocorre antes da inibição pela temperatura alta, obtendo-se em efeito de escape (MOHR, 1956; RAGHAVAN, 1980).

A quantificação do material de reserva dos esporos de pteridófitas e a sua mobilização durante o processo de germinação são aspectos muito pouco estudados. A dosagem de lipídios em esporos de Trichipteris corcovadensis mostrou que estes constituem mais de 50% do peso (ESTEVES, 1984). Esta grande quantidade de lipídios não é incomum nos esporos de pteridófitas. Em Anemia phyllitidis também representam mais da metade do peso dos esporos

(GEMMMRICH, 1977, 1982) e em Cyathea delgadii alcançam 60% de acordo com MARCONDES-FERREIRA (1983) ou 43% (RANDI & FELIPPE, 1988d).

PAGE (1979) comenta que a germinação dos esporos o corre em uma larga faixa de pH, portanto este não é um fator crítico. O pH baixo começa a ser um fator importante no ciclo de vida das pteridófitas somente após o estabelecimento do esporófito. CONWAY (1949) observou que para Pteridium aquilinum há uma faixa ótima para germinação dos esporos entre pH 5,5 e 7,5. Inibição total da germinação ocorre somente em condições extremamente ácidas, de pH 3,1 ou menos. Experimentos, com variação do pH do meio de cultura em que foram postos a germinar esporos de Trichipteris corcovadensis mostraram que estes germinam em uma faixa relativamente ampla. Após 14 dias observou-se que a maior taxa de germinação ocorria com pH 4,0, 4,5 e 5,0, porém no 7º dia a maior taxa de germinação ocorria no meio inicialmente ajustado para pH 5,0 (ESTEVES, 1984).

O aspecto da superfície dos esporos, associado a sua forma e tamanho, são características importantes em estudo taxonômicos, porém têm sido pouco utilizadas. Esporos de pteridófitas apresentam a parede dividida em dois extratos, denominados in tina e exina. Na exina, podem ser observadas duas camadas: uma in terna, denominada nexina e outra externa, a sexina. Esta última corresponde à parte esculpturada da exina. Muitas vezes o termo esclerina é utilizado como sinônimo de exina, porém em esporos de algumas pteridófitas a esclerina compreende uma outra estrutura sobre a exina, a perina ou perisporo (ERDTMAN, 1971). Esporos de pteridófitas não apresentam uma abertura verdadeira. O que se observa são lesões na face proximal resultantes da união dos esporos na tétrade, durante o processo de meiose. Esporos com uma só

lesão são denominados monoletes. Triletes são esporos que têm três lesões radiais unidas no pólo proximal (ERDTMAN, 1952, 1971).

Uma das poucas espécies brasileiras de pteridófitas analisada quanto à morfologia dos esporos é Trichipteris covadensis (ESTEVES et al., 1985). Nesse trabalho foram observadas variações no tamanho e na escultura dos esporos coletados de cinco espécimens diferentes, analisados sob microscopia óptica e eletrônica de varredura. A germinação dos esporos foi muito baixa em um dos exemplares e nula para os outros quatro. A análise da perina (confrontada com os dados de germinação) indicou que os esporos provavelmente não estavam completamente maduros morfologicamente.

O tipo característico de formação vegetal conhecida como cerrado ocupa uma área considerável do Estado de São Paulo. O cerrado é um elemento importante no desenvolvimento do país, no campo da agricultura, da pecuária e da indústria; assim, é necessário um conhecimento mais amplo desta formação, especialmente no que se refere à manutenção da flora aí existente. Isto remete em primeiro lugar, a um levantamento das espécies existentes, seguido de um estudo sobre a maneira como estas espécies se multiplicam.

Desde a década de 40 vários trabalhos foram publicados sobre a vegetação dessa formação (FERRI, 1963), porém a maioria teve como objetivo o estudo das angiospermas. São raros os trabalhos de taxonomia e morfologia, complementados com uma abordagem fisiológica, que enfocam o grupo das pteridófitas; na verdade, isto ocorre não somente para as áreas de cerrado, mas para toda a flora brasileira.

Embora seja estimado que existam 220 espécies de pteridófitas homósporas distribuídas em 54 gêneros na Amazônia brasileira (TRYON & CONANT, 1975) e 600 espécies na região Sude-

te do país (TRYON, 1986), são poucos os trabalhos de fisiologia. Há os trabalhos de MARCONDES-FERREIRA (1983), MARCONDES-FERREIRA & FELIPPE (1984), ESTEVES (1984), ESTEVES et al. (1985), RANDI (1987) e RANDI & FELIPPE (1988a,b,c,d) onde são verificados vários aspectos da fisiologia da germinação de esporos. RANAL (1983) estudou o efeito da temperatura e da intensidade luminosa no desenvolvimento de algumas pteridófitas da mata.

Nos cerrados, a espécie de pteridófitas mais frequente é Polypodium latipes. BAKER (1870) e SOTA (1960) descrevem Polypodium latipes Langsd. & Fisch. como uma planta terrestre, com rizoma rastejante e escamado. As frondes apresentam até 75cm de comprimento, são pinado-pinatífidas, papiráceas, com lâmina glabra na face abaxial e adaxial. Os soros são circulares. O pecíolo é glabro e longo, atingindo entre 1/2 e 1/3 do tamanho da fronde. Segundo SOTA (1960) a espécie ocorre no Brasil Austral, Bolívia, Argentina e Paraguai.

De acordo com RANAL (1983) Polypodium latipes é uma espécie resistente à seca, pois no município de Anhembi (SP) permanece verde a maior parte do ano. Foram observados em Anhembi espécimens nas manchas de cerrado e na mata, especialmente na região mais arenosa. Os espécimens da mata eram sempre estéreis. Somente foram encontradas frondes férteis nos espécimens ocorrentes nas manchas de cerrado. Aparentemente, na área estudada, essas plantas do cerrado são o centro de dispersão dos esporos da espécie.

Objetivos - a Reserva Biológica de Moji-Guaçu é uma das áreas de cerrado mais frequentemente estudadas no Estado de São Paulo. Segundo EITEN (1961) e MANTOVANI (1983) cinco espécies de pteridófitas ocorrem na área de cerrado da Reserva: Anemia flexuosa, Ane-

mia raddiana, Adiantum fovearum, Doryopteris concolor e Polypodium latipes. Entretanto, nada foi publicado a respeito da germinação dos esporos dessas espécies, como pode ser visto na revisão de trabalhos sobre a germinação de espécies do cerrado de FELIPPE & SILVA (1984). Daí o interesse em realizar um levantamento das espécies de pteridófitas que ocorrem nos cerrados do Estado de São Paulo para um estudo da germinação do esporos acompanhado da análise morfológica dos mesmos, como uma contribuição ao estudo taxonômico. Polypodium latipes foi estudada mais profundamente, por ser a espécie mais frequente nos cerrados do Estado de São Paulo e pela facilidade de obtenção de material.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram estudadas nove espécies de pteridófitas. Todas essas espécies são encontradas na Reserva Biológica de Moji-Guaçu. A reserva localiza-se no município de Moji-Guaçu, Estado de São Paulo, 8 km NW da cidade de Conchal e a 2 km N da Vila Martinho Prado, no interior de uma pequena mancha disjunta, em área marginal do cerrado (MANTOVANI, 1983).

A área que corresponde à Reserva é de aproximadamente 343,42ha e é delimitada por estradas e culturas anuais. Segundo VUONO et al. (1982), a Reserva é composta por duas áreas distintas, denominadas gleba A e B. A gleba A é recoberta principalmente por cerrado e a gleba B por mata ciliar. Neste trabalho foram feitas coletas de material apenas na gleba A. Foram encontradas e coletadas na gleba A nove espécies de pteridófitas. Material dessas nove espécies também foi coletado em outras áreas de cerrado do Estado de São Paulo (municípios de Corumbataí, Itirapina, Moji-Guaçu, São Carlos).

Os materiais coletados encontram-se depositados no Herbário do Estado "Maria Eneyda P.K. Fidalgo" do Instituto de Botânica (SP) e no Herbário do Departamento de Botânica Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UEC). O material foi identificado por Dr. P. Windish, Sra. A.R. Pereira-Noronha e L.M. Esteves.

A seguir, são listadas as espécies coletadas, com informações sobre procedência, coletor, número e data de coleta, sigla do herbário e respectivo número de inclusão para cada espécie. Os exemplares assinalados com asterisco foram utilizados no estudo de morfologia polínica.

Adiantum serratodentatum Willd.; São Paulo: Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, L.M. ESTEVES 66\*, 8-V-1985 (UEC36496); Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, A.L. KLEIN 50, 31-V-1985 (37099).

Anemia flexuosa (Sav.) Sw.; São Paulo: Itirapina, km 5 da antiga estrada para a cidade, L.M. ESTEVES 6, 22-III-1984 (SP195633); Itirapina, km 5 da antiga estrada para a cidade, L.M. ESTEVES 29, 13-X-1984 (SP202839); Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, L.M. ESTEVES 37, 12-II-1985 (SP202847); Itirapina, km 5 da antiga estrada para a cidade, A.L. KLEIN 1, 13-III-1985 (SP202854); Itirapina, cerrado do Pedregulho, F. ARASAKI 70, 22-I-1985 (SP202868); Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, L.M. ESTEVES 46\*, 09-VI-1985 (SP202855).

Anemia raddiana Link.; São Paulo: Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, L.M. ESTEVES 28, 15-X-1984 (SP202838); Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, L.M. ESTEVES 36\*, 12-II-1985 (SP202846); Itirapina, km 5 da antiga estrada para a cidade, L.M. ESTEVES 40, 13-II-1985 (SP202850); Itirapina, km 5 da antiga estrada para a cidade, A.L. KLEIN 3, 13-III-1985 (SP202857).

Doryopteris concolor (Langsd. & Fisch.) Kuhn; São Paulo: Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, L.M. ESTEVES 38, 12-II-1985 (UEC36940); Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, A.L. KLEIN 12\*, 17-06-1985 (UEC36815).

Polypodium hirsutissimum Raddi; São Paulo: Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, L.M. ESTEVES 9\*, 23-III-1984 (SP195636).

Polypodium latipes Langsd. & Fisch.; São Paulo: São Carlos, distrito de Santa Eudóxia, entrada da Fazenda Figueira Branca, L.M. ESTEVES 1, 9-II-1984 (SP195628); São Carlos, distrito de Santa Eudóxia, entrada da Fazenda Figueira Branca, L.M. ESTEVES 2, 9-II-1984 (SP195629); Itirapina, km 1 da antiga estrada para a cidade, L.M. ESTEVES 3, 9-II-1984 (SP195630); Itirapina, km 1 da antiga estrada para a cidade, L.M. ESTEVES 4, 10-II-1984 (SP195631); Itirapina, km 5 da antiga estrada para a cidade, L.M. ESTEVES 5, 22-III-1984 (SP195632); Itirapina, cerrado do Valério, L.M. ESTEVES 7, 22-III-1984, (SP 195634); Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, L.M. ESTEVES 8, 23-III-1984 (SP195635); São Carlos, distrito de Santa Eudóxia, entrada da Fazenda Figueira Branca, L.M. ESTEVES 10, 23-IV-1984 (SP195637); Itirapina, cerrado do Aníbal, L.M. ESTEVES 10, 20-IV-1984 (SP195637); Itirapina, cerrado do Aníbal, L.M. ESTEVES 12, 20-IV-1984 (UEC35710); Itirapina, Rodovia Washington Luís divisa com Corumbataí, L.M. ESTEVES 18, 12-X-1984 (SP202829); Itirapina, Rodovia Washington Luís divisa com Corumbataí, L.M. ESTEVES 23, 12-X-1984 (SP 202833); Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, L.M. ESTEVES 26, 15-X-1984 (SP202836); Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, L.M. ESTEVES 30\*, 6-XII-1984 (SP202840); Itirapina, cerrado do Aníbal, L.M. ESTEVES 31, 7-XII-1984 (SP202841); São Carlos, distrito de Santa Eudóxia, L.M. ESTEVES 34, 9-XII-1984 (SP202844); Itirapina, km 3 da antiga estrada para a cidade, L.M. ESTEVES 41, 13-II-1985 (SP 202851); Itirapina, divisa com Corumbataí, Rodovia Washington

Luís, L.M. ESTEVES 42, 13-II-1985 (SP202852); Itirapina, divisa com Corumbataí, Rodovia Washington Luís, L.M. ESTEVES 43, 13-II-1985 (SP202843); Itirapina, km 3 da antiga estrada para a cidade, L.M. ESTEVES 47, 9-IV-1985 (UEC36822); Itirapina, cerrado do Pedregulho, L.M. ESTEVES 49, 10-IV-1985 (UEC36820); Itirapina, cerrado do Pedregulho, L.M. ESTEVES 50, 10-IV-1985 (UEC36825); Corumbataí, cerrado da FAPESP, L.M. ESTEVES 53, 11-IV-1985 (UEC36818); Itirapina, divisa com Corumbataí, Rodovia Washington Luís, L.M. ESTEVES 55, 11-IV-1985 (UEC36823); Itirapina, km 5 da antiga estrada para a cidade, L.M. ESTEVES 56, 6-V-1985 (UEC36947); Itirapina, km 5 da antiga estrada para a cidade, L.M. ESTEVES 57, 6-V-1985 (UEC36948); Itirapina, cerrado do Pedregulho, L.M. ESTEVES 58, 7-V-1985 (UEC36939); Itirapina, cerrado do Pedregulho, L.M. ESTEVES 59, 7-V-1985 (UEC36935); Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, L.M. ESTEVES 60, 8-V-1985 (UEC36937); Itirapina, km 5 da antiga estrada para a cidade, A.L. KLEIN 2, 13-II-1985 (SP202856); Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, A.L. KLEIN 12, 17-IV-1985 (UEC36815); Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, A.L. KLEIN 17, 18-IV-1985 (UEC36814); Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, A.L. KLEIN 29, 19-IV-1985 (UEC36816); Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, A.L. KLEIN 31, 19-IV-1985 (UEC36813); Itirapina, cerrado da Graúna, A.L. KLEIN 32, 29-V-1985 (SP202869); Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, A.L. KLEIN 40, 30-V-1985 (SP202872); Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, A.L. KLEIN 53, 11-VII-1985 (UEC36830); Itirapina, cerrado da Graúna, F. ARASAKI 65 (SP202863); Itirapina, cerrado do Ubá, F. ARASAKI 66, 19-I-1985 (SP202864); Itirapina, cerrado do Valério, F. ARASAKI 67, 21-I-1985 (SP202865).

Polypodium pleopeltifolium Raddi; São Paulo: Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, L.M. ESTEVES 25, 15-X-1984 (UEC36950); Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, L.M. ESTEVES 35, 12-II-1985 (SP202845); Itirapina, cerrado do Pedregulho, L.M. ESTEVES 48, 10-IV-1985 (UEC36821); Itirapina, cerrado do Pedregulho, A.L. KLEIN 6, 14-III-1985 (SP202860); Reserva Florestal de Moji-Guaçu Fazenda Campininha, A.L. KLEIN 8\*, 15-III-1985 (SP202862); Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, A.L. KLEIN 14, 17-IV-1985 (UEC36913); Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, A.L. KLEIN 28, 18-IV-1985 (UEC36941); Itirapina, cerrado do Pedregulho, F. ARASAKI 69, 21-I-1985 (SP202867).

Polypodium polypodioides (L.) Watt.; São Paulo: Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, L.M. ESTEVES 24, 15-X-1984 (SP202834); Itirapina, cerrado do Pedregulho, L.M. ESTEVES 52, 10-IV-1985 (UEC36819); Itirapina, cerrado do Pedregulho, A.L. KLEIN 4, 14-III-1985 (SP202858); Itirapina, cerrado do Pedregulho, A.L. KLEIN 7, 14-III-1985 (SP202861); Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, A.L. KLEIN 15, 17-IV-1985 (UEC36920); Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, A.L. KLEIN 16, 18-IV-1985 (UEC36915); Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, A.L. KLEIN 19\*, 18-VI-1985 (UEC36915).

Polypodium squamulosum Kaulf; São Paulo: Itirapina, divisa com Corumbataí, Rodovia Washington Luís, L.M. ESTEVES 19, 12-X-1984 (SP 202831); Itirapina, divisa com Corumbataí, Rodovia Washington Luís, L.M. ESTEVES 20, 12-X-1984 (SP202832); Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, L.M. ESTEVES 39, 12-II-1985 (SP202849); Itirapina, cerrado do Pedregulho,

L.M. ESTEVES 51, 10-IV-1985 (UEC36824); Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, A.L. KLEIN 16\*, 17-IV - 1985 (UEC36916); Reserva Florestal de Moji-Guaçu, Fazenda Campininha, A.L. KLEIN 20, (UEC36919); Itirapina, cerrado do Valério, F. ARASAKI 68, 22-I-1985 (SP202866).

## 1. MORFOLOGIA DOS ESPOROS

### 1.1. Coleta

Os esporos foram removidos do esporofito coletando-se as folhas, que foram postas para secar em câmara a 25°C sob luz incandescente, sobre folhas de papel. Com este procedimento os esporângios abriam-se e após 24 horas os esporos foram armazenados em tubos de vidro hermeticamente fechados, envoltos em papel alumínio e mantidos em geladeira a 4°C (ESTEVES, 1984).

### 1.2. Limpeza e esterilização

Os esporos foram separados de resíduos (paredes do esporângio, tecido da folha do esporofito, etc.) e esterilizados pelo método de DYER modificado, descrito a seguir. O material foi colocado em uma solução de hipoclorito de cálcio 0,5% por dois minutos e a seguir centrifugado por 10 minutos a 1000 r.p.m. (121g). O sobrenadante foi descartado, tomando-se o cuidado de retirar os esporângios que flutuavam com o auxílio de uma pipeta Pasteur. A seguir os esporos foram lavados duas vezes, suspendendo-os em água destilada, centrifugando e descartando o sobrenadante; foram novamente ressuspensos e filtrados a vácuo em papel de filtro, deixando-se passar ar até que os esporos secassem completamente (ESTEVES, 1984).

### 1.3. Preparação dos esporos para microscopia óptica

O método padrão para o estudo da morfologia dos esporos foi a acetólise, introduzida por ERDTMAN (1943) no estudo do grão de pólen e mais tarde modificado pelo mesmo autor (ERDTMAN, 1960, 1969). Este método elimina o material protoplasmático do esporo, deixando-o reduzido à exina, transparente, além de remover as substâncias estranhas da superfície, tornando os detalhes da escultura mais distintos.

#### 1.3.1. Acetólise

A técnica da acetólise consiste na hidrólise ácida do material a ser observado.

Os esporos são colocados em tubos de vidro Pyrex com 5ml de ácido acético glacial, onde permanecem por um período mínimo de 24 horas. O material assim fixado é centrifugado, para que sedimente e permita a eliminação do sobrenadante.

Esse material é tratado a seguir com a mistura de acetólise, formada de anidrido acético e ácido sulfúrico na proporção de 9:1. A mistura de acetólise é preparada na hora do uso, sendo adicionados 5ml da mesma em cada tubo contendo o material, mantidos então em banho-maria por dois minutos, a 100°C. A seguir os tubos são centrifugados (com a mistura ainda quente) e o sobrenadante é eliminado. O resíduo é lavado com 10ml de água destilada com 3 gotas de álcool etílico; o sobrenadante é eliminado por centrifugação e decantação. Em seguida o material é tratado com 5ml de glicerina pura e água destilada (1:1), durante um período

de aproximadamente 30 minutos. Após este período centrifuga-se novamente (2000 r.p.m., 482g, durante 5 minutos), elimina-se o sobrenadante e mantêm-se os tubos com a abertura para baixo sobre papel de filtro.

Posteriormente, as lâminas são montadas com gelatina glicerinada, preparada segundo o método de Kisser, em 1935 (ERDTMAN, 1971). Com um estilete esterilizado um pequeno pedaço de gelatina glicerinada é posta em contacto com os esporos acetolisados, no fundo do tubo. A gelatina com os esporos aderidos é colocada sobre uma lâmina de microscópio e esta é aquecida numa placa aquecedora até a fusão da gelatina. Coloca-se a lamínula, tomando-se o cuidado de esperar a gelatina esfriar para evitar de formações nos esporos (MELHEM & MATOS, 1972).

As lâminas permanentes são lutadas com parafina fundida (MULLER, 1950 in ERDTMAN, 1952). A parafina é colocada em uma das extremidades da lamínula que cobre a preparação; com o aquecimento a parafina penetra por capilaridade entre a lâmina e a lamínula, contornando a preparação de gelatina glicerinada que contém os esporos. A limpeza final da lâmina é feita com xilol.

Esporos acetolisados não utilizados imediatamente na preparação de lâminas que podem ser estocados adicionando-se 2ml de glicerina pura no tubo de ensaio.

### 1.3.2. Técnica do carbonato de sódio

Utilizou-se a técnica do carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 3% para observação da perina ao microscópio óptico. Esta técnica foi desenvolvida para tratar grãos de pólen pouco resistentes à acetólise (MORBELLI, 1974).

Preparou-se inicialmente uma solução de 3g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  em 100ml de água destilada. No tubo de ensaio que continha os esporos foram colocados 5ml desta solução; o tubo foi aquecido lentamente até a fervura durante um minuto, tomando-se cuidado para que a fervura não fosse muito violenta. Acrescentaram-se 4ml de água destilada, e foi feita a centrifugação durante 5 minutos (1500 r.p.m., 271g), descartando-se o sobrenadante. Repetiu-se esta lavagem e o resíduo foi tratado pelo processo da acetólise, já descrito.

#### 1.4. Medidas

As medidas foram feitas em um microscópio binocular Zeiss G.F.L., com o auxílio de uma ocular micrométrica Leitz 12,5X de tambor giratório.

Para cada material foram preparadas 5 lâminas, no mínimo. As medidas de tamanho foram feitas ao acaso, em 25 esporos acetolisados, distribuídos em pelo menos três lâminas, visando uma uniformidade da amostra (SALGADO-LABOURIAU et al., 1965). Quando a medida não pode ser tomada com segurança mediam-se apenas 10 esporos e posteriormente calculou-se a média aritmética.

Os esporos foram medidos no máximo sete dias após o preparo da lâmina. Este cuidado foi tomado para evitar o inchaço do esporo, como foi observado em grãos de pólen por MELHEM & MATOS (1972).

As medidas dos esporos foram obtidas do modo pré-estabelecido por ERDTMAN (1943). A classificação dos esporos por tamanho foi baseada em ERDTMAN (1971).

### 1.5. Fotomicrografias

Para obtenção das fotomicrografias foi utilizado fotomicroscópio Olympus Vanox com câmara de exposição automática incorporada. Foi utilizado filme Kodak Panatomic-X, ASA 32, empregando-se filtro verde ou azul para salientar detalhes dos esporos.

### 1.6. Microscopia eletrônica de varredura

Foram utilizados esporos acetolisados e não acetolisados, e portanto, duas metodologias diferentes no preparo do material para a microscopia eletrônica de varredura.

Esporos não acetolisados foram separados dos resíduos dos esporângios, com o auxílio de um papel poroso. Um suporte metálico de 1,5cm de diâmetro foi recoberto com uma fina camada de Neolub - dry film conductive (Huron Industries, INC.), cola especial, à base de grafite diluído em isopropanol; os esporos foram colocados sobre a cola com o auxílio de um pincel. É necessário que a cola esteja quase seca para que os esporos não afundem ou sejam recobertos por ela.

Esporos acetolisados e estocados em glicerina foram lavados duas vezes com água aquecida (mas não fervente), álcool etílico 50% e finalmente álcool etílico 70%. Esta suspensão (esporos em álcool 70%) foi gotejada nos suportes metálicos, onde os esporos permaneciam fragilmente aderidos após a evaporação do veículo alcoólico. Antes da metalização os suportes foram mantidos em atmosfera seca (em um dessecador, por exemplo) durante pelo menos 24 horas.

Os suportes preparados pelos dois métodos foram metalizados com ouro, numa espessura não controlada, mas estimada entre 100 e 150 Å.

Para obtenção das fotomicrografias foi utilizado um microscópio de varredura marca JEOL, modelo JSM P 15, e filme Kodak verichrome pan, asa 125.

## 2. GERMINAÇÃO

A coleta e a esterilização dos esporos foi feita de acordo com o método já descrito para o estudo morfológico.

Os esporos foram germinados em meio de cultura de MOHR (1956) modificado por DYER (1979); neste trabalho foi feita também uma alteração na solução de ferro acrescida ao meio de cultura:

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	510 mg/l
$\text{KNO}_3$	120 mg/l
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1440 mg/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	250 mg/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{EDTA}$	1 ml/l

A solução de ferro foi acrescida ao meio de cultura somente no momento do ensaio. Esta solução foi preparada com 33,2g de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 3,65g de  $\text{NaOH}$  e 25g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  para um litro de água destilada.

O material utilizado no preparo das culturas foi autoclavado por 20 minutos a 120°C e manipulado em câmara asséptica

ca. Após a autoclavagem, para cada 1ml de meio de cultura foram acrescentadas 100 unidades de Nystatin (BDH Chemicals LTD).

Os esporos, cerca de 15mg, foram semeados com o auxílio de uma pequena espátula, em erlenmeyers de 125ml contendo 25ml de meio de cultura. Os esporos transferidos para a superfície do meio de cultura se mantêm flutuando.

Os experimentos foram realizados em câmaras de crescimento "Forma Scientific", modelo 24, com temperatura constante de 25°C nos experimentos em que não se estudava os efeitos de temperatura.

Luz branca fluorescente foi obtida com duas lâmpadas fluorescentes de 15W e intensidade total de  $224 \mu\text{W.cm}^{-2}$ . Luz vermelha foi obtida com três lâmpadas fluorescentes vermelhas, de 20W, com pico máximo a 660nm. Vermelho-extremo foi obtido com uma lâmpada incandescente de 40 W e filtro formado por três folhas de papel celofane azul e duas folhas de papel celofane vermelho, com pico máximo a 730nm. Os tratamentos de escuro foram feitos envolvendo-se os erlenmeyers em dois sacos plásticos pretos (RANDI, 1980).

Foram preparados três erlenmeyers e de cada erlenmeyer duas lâminas; em cada lâmina foram contados 100 esporos. As contagens foram feitas utilizando-se microscópio binocular Zeiss, aumento de 100 vezes e contador manual Hope. Os esporos foram removidos da solução nutritiva utilizando-se o lado superior de uma pipeta Pasteur, colocada em contato com a superfície da solução, onde flutuavam. O conteúdo retido na pipeta Pasteur foi soprada sobre uma lâmina de vidro e recoberto por lamínula. Foram considerados germinados os esporos que apresentaram protusão da célula rizoidal.

## 2.1. Curvas de germinação

Foram determinadas as curvas de germinação dos esporos das nove espécies de pteridófitas coletadas em cerrados do Estado de São Paulo. Os experimentos foram realizados sob luz branca fluorescente e escuro constantes. As contagens de germinação foram feitas diariamente.

## 2.2. Germinação de esporos de Polypodium latipes

### 2.2.1. Luz branca

#### 2.2.1.a. Período de pré-indução

Os esporos foram embebidos sob condições de escuro por períodos de 0, 1, 2, 3 e 4 dias e a seguir transferidos para luz fluorescente branca contínua. Posteriormente foram verificados os efeitos de períodos de 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 horas de embebição sob escuro. Foram feitas contagens 3, 4 e 5 dias após o início do tratamento luminoso, para verificação de possíveis diferenças na germinação final e também na velocidade de germinação.

#### 2.2.1.b. Período de indução

Os esporos foram embebidos durante dois dias no escuro e a seguir tratados com 0, 1, 5, 7, 9, 12, 15 e 24 horas

de luz, retornando para o escuro. Após 4 dias (contando a partir do início do tratamento de luz) foi feita a contagem da germinação. O controle utilizado foi tratado apenas com 4 dias de luz contínua.

#### 2.2.1.c. Intensidade luminosa

Foi verificada a germinação dos esporos sob luz branca contínua seguintes intensidades luminosas: 224, 182, 148, 124, 110, 104, 99, 92 e  $224 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Essas intensidades luminosas foram determinadas com o auxílio de um radiômetro U.D.T., modelo 40X, e obtidas envolvendo-se os erlenmeyers com uma a oito camadas de gaze. A intensidade  $224 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$  foi o controle de luz (erlenmeyer sem gaze); além deste, havia um controle de escuro. As leituras foram feitas 4, 5 e 6 dias após o período de pré-indução (dois dias no escuro).

#### 2.2.2. Luz vermelha e vermelho-extremo

Em todos os experimentos a seguir foram feitos controles de luz branca e escuro. Os esporos receberam inicialmente um tratamento de dois dias de embebição sob escuro e após o tratamento de luz retornaram ao escuro. A contagem foi feita 4 dias após o início do tratamento de luz.

##### 2.2.2.a. Indução por luz vermelha

Os esporos foram tratados com 0, 15, 30 e 45 minutos de luz vermelha ou 3, 5, 8, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21,

22, 23 e 24 horas de luz vermelha. A seguir os esporos retornaram ao escuro.

#### 2.2.2.b. Choques de luz vermelha

Os esporos foram submetidos a choques de 1 e 5 minutos de vermelho intercalados com períodos de 30 minutos de escuro, durante 5 horas. No total foram dados 11 choques de luz (o primeiro choque foi no tempo 0). O tempo de 5 horas foi escolhido porque é suficiente para induzir 50% da germinação máxima sob vermelho constante.

#### 2.2.2.c. Vermelho-extremo constante

Os esporos foram expostos a vermelho-extremo durante 10 dias. A leitura da germinação foi feita entre o 4º e o 10º dia, a partir do início do tratamento. Foram preparadas 21 culturas, para que pudessem ser descartadas a cada dia de contagem de germinação.

#### 2.2.2.d. Reversão do efeito de luz vermelha por vermelho-extremo

Os esporos foram tratados com 5 e 18 horas de vermelho e a seguir tratados com 5, 10, 20, 30, 40 e 50 minutos de vermelho-extremo. Em outros experimentos os esporos receberam inicialmente tratamentos de luz vermelha durante 5, 7, 9, 11 e 13 horas e a seguir vermelho-extremo por 40 minutos.

### 2.2.3. Temperaturas constantes e alternadas

Foi verificada a germinação dos esporos sob temperaturas constantes de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45°C e pares de temperaturas alternadas 25-5, 25-10, 25-15, 25-20, 25-30, 25-35, 25-40 e 25-45°C. Cada par de temperaturas foi utilizado sob três regimes de alternância diferente: 8, 12 e 16 horas a 25°C e respectivamente 16, 12 e 8 horas na outra temperatura do par (horas diárias). As alternâncias 12 horas/12 horas eram feitas automaticamente pelas câmaras de crescimento; as outras duas condições de alternância eram feitas manualmente, transferindo os erlenmeyers de uma câmara para outra. Os experimentos sempre foram iniciados com a temperatura de 25°C. Todas estas condições foram verificadas sob luz fluorescente branca e escuro constantes.

As contagens foram feitas até a estabilização das curvas de germinação. Nos tratamentos de escuro as lâminas foram preparadas sob luz verde de segurança.

### 2.2.4. Reguladores de crescimento

#### 2.2.4.a. Ácido 2 -cloro-etilfosfônico (CEPA)

O efeito de CEPA na germinação dos esporos foi verificado utilizando-se meio de cultura contendo CEPA nas concentrações de 0 (controle),  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $5 \cdot 10^{-3}$  e  $10^{-2}$ M, sob luz e escuro. As soluções foram preparadas imediatamente antes dos experimentos, com meio de cultura já autoclavado. Neste caso os erlenmeyers foram substituídos por frascos com a tampa rosqueada, para evitar a perda de etileno para o meio ambiente. As leituras foram feitas 4, 5 e 6 dias após o período de pré-indução.

No 7º dia alguns lotes de esporos tratados com CEPA  $10^{-3}$ ,  $5.10^{-3}$  e  $10^{-2}$  M, além do controle de escuro, foram removidos do meio de cultura através de filtração a vácuo em papel de filtro e a seguir lavados e novamente filtrados. Os papéis da filtração contendo os esporos foram depositados em placas de Petri, mantida úmida por 4 dias. No 4º dia foi feita a contagem da germinação sob lupa.

#### 2.2.4.b. Ácido giberélico ( $GA_3$ )

Foram preparados meios de cultura com  $GA_3$ , nas concentrações de 0 (controle),  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-2}$  M. O ácido giberélico era acrescentado ao meio de cultura somente depois da autoclavagem. A germinação foi estudada sob luz e escuro. As leituras foram feitas 4, 5 e 6 dias após o período de pré-indução.

### 3. EXTRAÇÕES E DOSAGENS EM ESPOROS DE Polypodium latipes

#### 3.1. Extrações

##### 3.1.1. Extração de açúcares solúveis totais e proteínas solúveis

Para a extração de açúcares solúveis totais e proteínas solúveis foi utilizado o método de BIELESKI & TURNER (1966). 100mg de esporos não embebidos foram homogeneizados em almofariz com 6ml de solvente MCW (metanol:clorofórmio:água, 12:5:3). Esse extrato bruto foi centrifugado a 2000 r.p.m. (482g) por 15 minu-

tos; a fração solúvel (fração A) contém carboidratos, lipídios e pigmentos, e a fração insolúvel (fração B) contém proteínas e ácidos nucleicos.

Para cada 4 volumes da fração A foi acrescido 1 volume clorofórmio e 1,5 volumes de água. A mistura foi colocada em um funil de separação, em que a fase inferior continha clorofórmio com pigmentos e lipídios e a fase superior açúcares solúveis dissolvidos em água e metanol. A fase superior foi coletada e o volume final acertado para 5ml. Este extrato era dosado diretamente sem evaporar o metanol.

A fração B, acrescida de 1ml de NaOH 0,1N, foi centrifugada a 2000 r.p.m. (482g) por 10 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante tratado com 1ml de TCA (ácido tricloroacético) a 10%, para precipitar as proteínas. Após a centrifugação a 2000 r.p.m. (482g) por 15 minutos o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 0,5ml de NaOH 0,1N. Neste extrato foi feita a dosagem de proteínas solúveis.

O processo de extração foi repetido três vezes e para cada extração foram feitas três dosagens de proteínas e três dosagens de açúcares solúveis.

### 3.1.2. Extração de lipídios livres

Lipídios livres foram extraídos segundo o método de GEMMICH (1977). Amostras de 100mg de esporos não embebidos foram homogeneizadas em homogeneizador de vidro, com 15ml de hexano. O extrato resultante teve o volume acertado para 15ml (com o mesmo solvente). Os tubos foram vedados com filme transparente de PVC e centrifugados por 15 minutos, a 2000 r.p.m. (482g). O sobrenadante foi colocado em balões de vidro de 25ml, previamente lava

dos para eliminação de qualquer resíduo, numerados e pesados em balança analítica. O solvente foi evaporado a vácuo em evaporador rotatório, a 60°C. Após a evaporação, os balões foram colocados em dessecador até que pesagens realizadas a intervalos regulares indicassem a estabilização do peso.

### 3.2. Dosagens

#### 3.2.1. Dosagem de açúcares solúveis totais

Açúcares solúveis totais foram dosados pelo método de UMBREIT et al. (1964), utilizando-se o reagente de antrona (Mc CREADY et al. (1950)). Foram dissolvidos 220mg de antrona em 100ml de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 95%. Retiraram-se alíquotas de 0,1ml do extrato e acrescentaram-se 0,9ml de água e 2ml de reagente. A mistura foi agitada e aquecida a 100°C por 3 minutos. A absorvância foi lida em espectrofotômetro a 620nm. Os resultados obtidos foram expressos em  $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ . Foi utilizada uma curva padrão preparada com diluições de glicose a partir de 100  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ .

#### 3.2.2. Dosagem de proteínas solúveis

As dosagens foram feitas pelo método de BRADFORD (1976). Como reagente foi utilizado o Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma). Foram dissolvidos 100mg em 50ml de etanol 95%. A esta solução acrescentaram-se 100ml de ácido ortofosfórico 85%. Completou-se para volume final de 1 litro, com água destilada.

Para cada alíquota de 0,1ml de extrato foram acrescentados 5ml de reagente. A mistura foi agitada e após 5 minutos a absorvância foi lida a 595nm. Os resultados foram expressos em

$\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$  , usando-se uma curva padrão preparada com diluições de solução padrão de albumina bovina na concentração  $200 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ .

### 3.2.3. Dosagem de lipídios

Os lipídios foram dosados gravimetricamente, subtraindo-se do peso dos balões contendo os lipídios o peso dos balões vazios.

## 4. INIBIDORES FENÓLICOS EM Polypodium latipes

### 4.1. Bioensaios

Para se ter uma idéia inicial da presença ou não de compostos fenólicos em folíolos de Polypodium latipes foram feitos alguns experimentos bastante simples com folíolos secos, extratos brutos aquosos e etanólicos, verificando-se o efeito na germinação de sementes de alface.

#### 4.1.1. Bioensaio com folíolos secos

Para todos os tratamentos descritos a seguir foram utilizadas três placas de Petri (9cm), recobertas com papel de filtro umedecido com 5ml de água destilada. Em cada placa foram colocadas 50 sementes de alface. As placas permaneceram 24 horas sob luz branca, a  $25^{\circ}\text{C}$ . Após este período foi feita a contagem da germinação.

Os tratamentos foram os seguintes:

Tratamento A - um folíolo inteiro foi deixado 24 horas sobre o papel de filtro e a seguir removido. As sementes de alface foram colocadas sobre o local previamente ocupado pelo folíolo.

Tratamento B - um folíolo permaneceu 24 horas sobre o papel de filtro. Sem removê-lo, as sementes de alface foram colocadas ao redor.

Tratamento C - um folíolo foi moído e o pó colocado sobre o papel de filtro por 24 horas, depositando-se a seguir as sementes de alface.

Tratamento D - um folíolo foi picado e os pedaços depositados no centro do papel de filtro. As sementes de alface foram distribuídas ao redor.

Tratamento E - controle com água destilada e sementes de alface.

#### 4.1.2. Bioensaio com extrato aquoso

O extrato foi preparado com 10g de folíolos pulverizados em moinho de bola (aproximadamente 200 folíolos) postos em 80ml de água destilada, onde permaneceram por 24 horas a 25°C e 48 horas a 4°C. A seguir foi feita a filtração a vácuo.

Foram preparadas placas com 5ml de extrato bruto e diluído  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  vezes. Nos controles as placas receberam somente água destilada. Após a deposição das sementes de alface as placas permaneceram 24 horas sob luz branca, a 25°C. Para

cada tratamento foram preparadas 4 repetições.

#### 4.1.3. Bioensaio com extrato etanólico

Os folíolos foram pulverizados em moinho de bola. Acrescentaram-se 10g de pó em 50ml de etanol 80%, permanecendo a 25°C por 24 horas. Este material foi filtrado em papel de filtro, a vácuo; o resíduo foi novamente tratado com etanol 80% por 24 horas, a 25°C, e posteriormente filtrado. Os dois extratos resultantes foram reunidos e evaporados em evaporador rotativo, sob vácuo, a 50°C, para retirar o etanol. A fração aquosa resultante foi centrifugada (1500 r.p.m., 271g, por 15 minutos) para retirada de resíduos e a seguir aplicada no bioteste.

O bioteste consistiu em verificar a inibição da germinação de sementes de alface pela aplicação de 5ml de extrato puro e diluído  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $5 \cdot 10^{-3}$  e  $10^{-4}$  vezes. Para cada tratamento foram preparadas 5 repetições. Após a deposição das sementes de alface as placas permaneceram 24 horas sob luz branca, a 25°C. Nos controles as placas receberam somente água destilada.

#### 4.2. Extração e dosagem de fenóis totais nos folíolos

##### 4.2.1. Extração

Para a extração de fenóis totais foi utilizado, com modificações, o método de HARBORNE (1974). Os folíolos foram secos e moídos, para obtenção de um pó bastante fino. 500mg do material foram extraídos cinco vezes com 5ml de MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) em ebulição, tomando-se o cuidado de interromper o processo logo no início de cada fervura. Os cinco extratos foram filtrados e reuni

dos em um só. Quando houve necessidade de estocagem, esta foi feita a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Foram preparadas três repetições da extração.

#### 4.2.2. Dosagem

A concentração de fenol total foi determinada pelo método de FOLIN-DENIS, modificado por SWAIN & HILLIS (1959). O extrato bruto foi diluído cinco vezes com água destilada. Em uma alíquota de 0,5ml do extrato foram acrescentados 7ml de água destilada e 0,5ml de reagente Folin-Denis. Após três minutos de agitação, foi adicionado 1ml de solução saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . O volume foi acertado para 10ml, com água destilada. Após 30 minutos a absorvância foi lida a 730nm. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Foi utilizada uma curva padrão preparada com ácido tânico, variando de 10 a 190 $\mu\text{g}$  em intervalos de 20 $\mu\text{g}$ . Os resultados são dados como equivalentes de ácido tânico.

#### 4.2.3. Reagente Folin-Denis

Para 750ml de água destilada foram adicionados 100g de  $\text{Mo}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 20g de ácido fosfomolibdico e 50ml de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Refluxou-se por duas horas; após resfriamento, o volume foi acertado para 1 litro (A.O.A.C., 1955).

#### 4.2.4. Solução saturada de $\text{Na}_2\text{CO}_3$

Para cada 100ml de água destilada foram adicionados 35g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anidro, dissolvidos a  $70 - 80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente

te, a solução foi resfriada por uma noite e semeada com um cristal de  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ). Após a cristalização a solução foi filtrada em lã de vidro.

#### 4.3. Identificação e dosagem de cumarina nos folíolos

##### 4.3.1. Extração

Os extratos utilizados na identificação e dosagem de cumarina foram preparados do mesmo modo que os utilizados para dosagem de fenóis totais. Foram feitos cinco extratos.

##### 4.3.2. Cromatografia em camada delgada

Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório, a  $50^\circ\text{C}$ , até atingir o menor volume possível. Este volume variou entre 5ml e 9,5ml. Esses extratos foram fracionados por cromatografia em camada delgada, em placas de sílica-gel GF<sub>254</sub> de 15 X 20cm. Utilizaram-se os seguintes sistemas de solventes (v/v): benzeno:etanol (5:1); n-hexano:acetato de etila (1:3); benzeno:n-butanol:ácido acético (70:25:50). A revelação das cromatoplasmas foi feita por fluorescência em luz U.V. (longa e curta) e por aspersão com uma solução de hidróxido de potássio 5% em etanol, seguida de observação sob luz U.V. (SOMAROO et al., 1973). Utilizaram-se como padrões cumarina e metil-umbeliferona.

##### 4.3.3. Cromatografia preparativa

Os extratos concentrados foram submetidos à análise preparativa em placas de sílica-gel GF<sub>254</sub>, desenvolvidas em

benzeno:etanol (5:1). Dependendo da concentração de cada extrato, foram aplicados 0,5ml ou 1,0ml deste na placa.

A revelação foi feita sob luz U.V. As faixas correspondentes aos Rfs de cumarina foram raspadas e eluídas em etanol absoluto (5ml) durante 3 dias, a 4°C.

Como controle, foram preparadas placas com aplicações de quantidades conhecidas de cumarina, verificando-se assim a capacidade de recuperação do método.

#### 4.3.4. Efeito da substância isolada na cromatografia preparativa, na germinação de esporos de Polypodium latipes

O eluato obtido na cromatografia preparativa foi evaporado sob vácuo, a 40°C, e o resíduo ressuspendido em 15ml de água destilada. Os esporos foram germinados em placas de Petri de 15cm recobertas com dois papéis de filtro e umedecidas com 5ml da substância diluída. O controle foi preparado com água destilada. Os dois tratamentos permaneceram sob luz branca contínua, a 25°C. Para cada tratamento foram preparadas 6 repetições. A leitura foi feita no 5º dia, sob lupa, verificando-se se 100 esporos estavam ou não germinados.

#### 4.3.5. Identificação pelo espectro de absorção no ultra-violeta

Os espectros de absorção no ultra-violeta foram feitos num espectrofotômetro Perkin Elmer lambda 3B, na faixa compreendida entre 200 e 350nm. Foram feitos espectros com os eluatos obtidos das cromatoplasmas preparativas (diluídos 1:4, em etanol), com o extrato bruto (diluído 1:1600, em etanol), e com pa-

drão de cumarina  $80\mu\text{g.ml}^{-1}$ , em etanol.

#### 4.3.6. Dosagem

O eluato obtido a partir das placas preparativas foi filtrado a vácuo. A absorvância foi lida a 275nm (GOODWIN e POLLOCK, 1959). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g.mg}^{-1}$ . Foi utilizada uma curva padrão preparada com cumarina, em várias diluições.

### 5. Análise estatística

Para as medidas dos esporos calculou-se a média aritmética ( $\bar{x}$ ), o desvio padrão da média ( $s_{\bar{x}}$ ), desvio padrão da amostra(s), coeficiente de variação (V) e intervalo de confiança a 95%. Os resultados dessa análise estatística são apresentados em tabelas.

A análise dos dados de germinação, com exceção da análise de regressão para as curvas de germinação de Polypodium latipes foi realizada com os dados em valor angular para obtenção de uma curva normal. Assim também são apresentadas as médias finais.

Foram calculados os intervalos de confiança representados por uma barra vertical para as comparações entre diferentes dias das curvas de germinação das nove espécies estudadas, bem como para as curvas de germinação de Polypodium latipes sob várias condições de temperatura.

Nos experimentos em que havia necessidade de comparação entre três ou mais tratamentos os dados foram submetidos à

análise de variância; nos casos em que havia diferença significativa entre os tratamentos foi calculada a DMS 5% pelo método de Tukey modificado por SNEDECOR (1962). Nas tabelas, letras diferentes mostram que os tratamentos são diferentes.

Foi feita a análise de regressão, obtendo-se assim a velocidade de germinação através do fator de inclinação da reta (b).

Os testes e análises estatísticas utilizaram as tabelas de FISCHER & YATES (1971).

## RESULTADOS

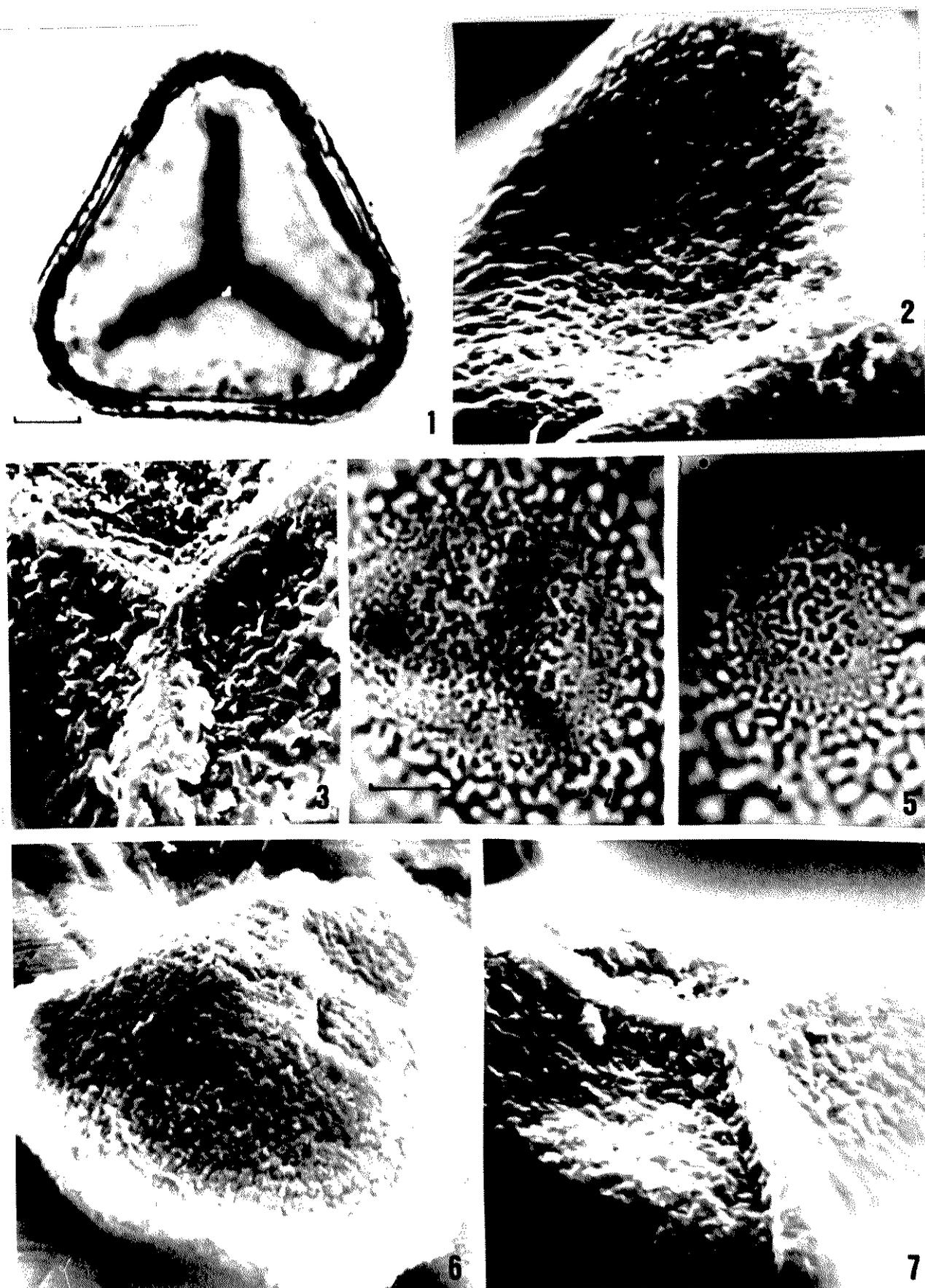
### 1. MORFOLOGIA DOS ESPOROS

São descritos a seguir os esporos das nove espécies de pteridófitas coletadas na área de cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçu, primeiro os esporos triletes, (Figuras 1-21; Tabela 1), seguidos dos esporos monoletes (Figuras 22-41; Tabela 2).  $\underline{P}$  é o diâmetro polar.  $\underline{E}$  é o diâmetro equatorial  $\underline{E}_1$  e  $\underline{E}_2$  são os diâmetros equatoriais maior e menor (para esporos monoletes, elipsóides em vista polar). Os termos convexo-côncavo ou convexo-plano referem-se à forma do pólo distal e proximal, respectivamente, de esporos monoletes observados em vista equatorial.

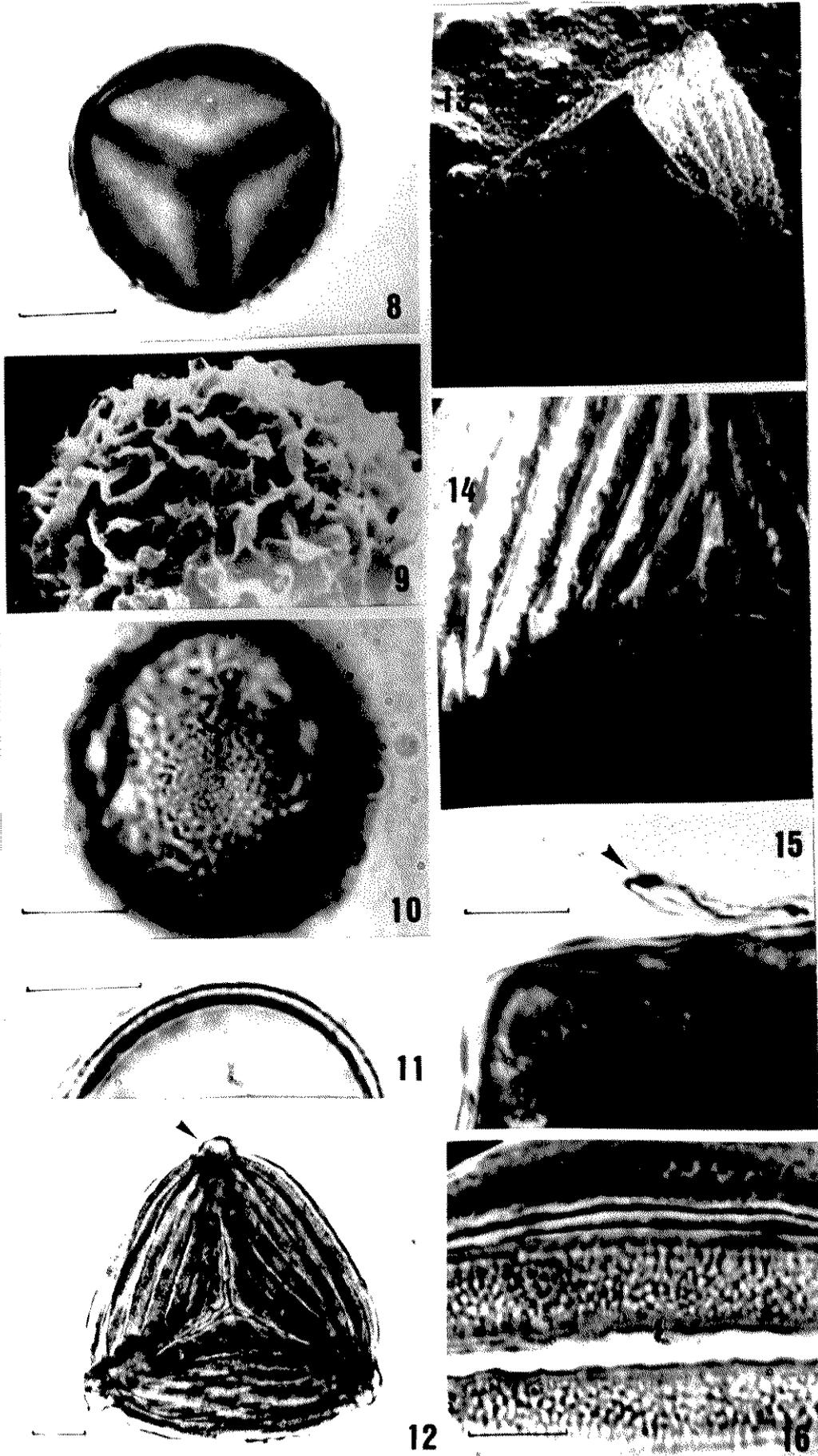
#### 1.1. Adiantum serratodentatum (Figuras 1-7)

Esporos médios, triletes, marrons-escuros quando frescos.  $P$ :  $35,1 \pm 1,5\mu\text{m}$ .  $E$ :  $48,3 \pm 1,2\mu\text{m}$ . Vista polar: âmbito triangular, com os lados retos e ângulos arredondados (Figura 1); ligeiramente côncavo ao redor da lesão (Figura 2). A lesão apresenta margem bastante saliente. Comprimento total da lesão:  $29,5 \pm 2,5\mu\text{m}$ . Braço da lesão:  $19,6 \pm 1,9\mu\text{m}$ . Vista equatorial: pólo distal convexo; pólo proximal bastante saliente, subcônico com arestas salientes. Esporos recobertos com perina pouco densa (Figura 3), porém frequentemente resistente à acetólise. Superfície ornamentada com grânulos e rúgulas distribuídas por toda a superfície (Figuras, 2,4, 5,6 e 7).

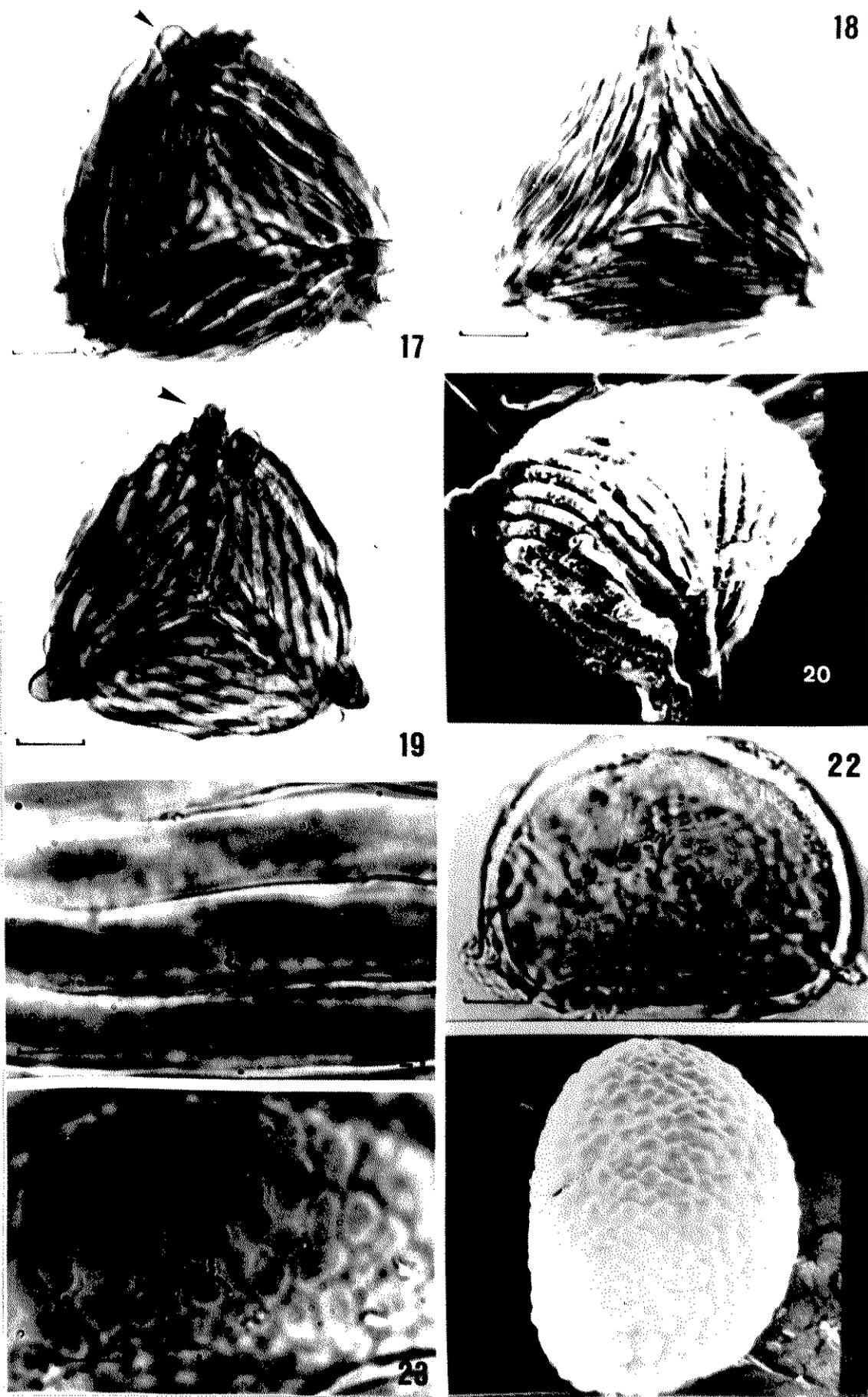
Exina: é possível distinguir duas camadas. Sexina com espessura regular ( $1,4\mu\text{m}$ ) e nexina com espessura irregular ( $0,8\mu\text{m}$  em mé-



FIGURAS 1 A 7: ESPOROS DE Adiantum serratodentatum. FIGURA 1: VISTA POLAR. FIGURA 2: DETALHE DA SUPERFÍCIE, PRÓXIMO À LESÃO (M.E.V., 4100X). FIGURA 3: DETALHE DA LESÃO (M.E.V., 4100X). FIGURAS 4 E 5: DETALHE DA ESCULTURA (VISTA POLAR DISTAL E VISTA EQUATORIAL RESPECTIVAMENTE). FIGURA 6: VISTA POLAR DISTAL (M.E.V., 1600X). FIGURA 7: DETALHE DA SUPERFÍCIE E DA LESÃO (M.E.V., 4000X). M.E.V.: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. \*TODAS AS ESCALAS CORRESPONDEM A 10 $\mu$ m.

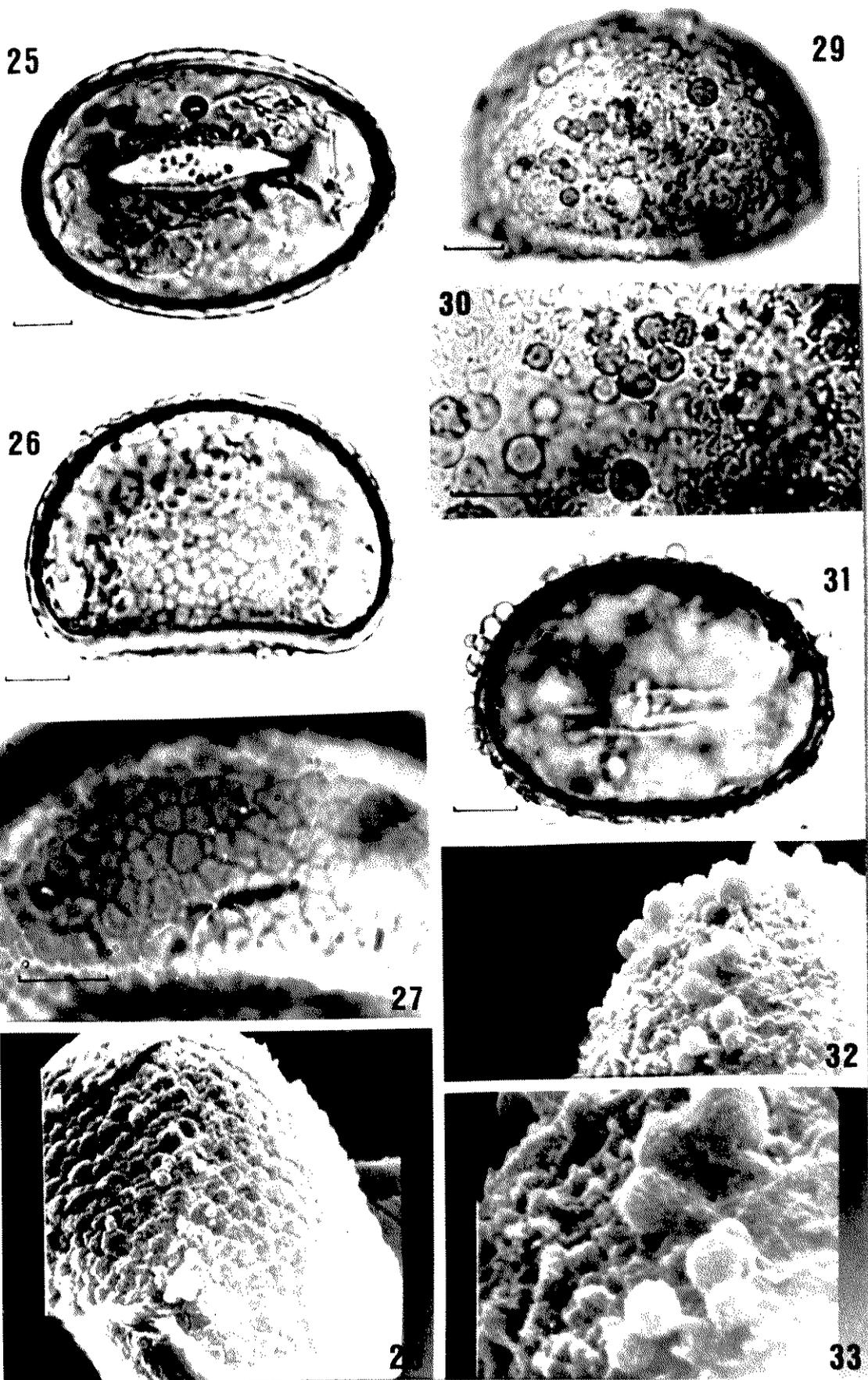


FIGURAS 8 A 11: ESPOROS DE *Doryopteris concolor*. FIGURA 8: VISTA POLAR. FIGURA 9: ASPECTO DA PERINA (M.E.V., 1700X). FIGURA 10: ESCULTURA. FIGURA 11: CORTE ÓPTICO MOSTRANDO A PERINA E AS TRÊS CAMADAS DA EXINA. FIGURAS 12 A 16: ESPOROS DE *Anemia flexuosa*. FIGURA 12: VISTA POLAR PROXIMAL. FIGURA 13: ESPORO COM VISTA PARCIAL DA LESÃO E RESÍDUOS DE PERINA (M.E.V., 1100X). FIGURA 14: DETALHE DO PÓLO DISTAL. FIGURA 15: PERINA. FIGURA 16: SUPERFÍCIE MICRORRETICULADA DAS ESTRIAS. M.E.V.: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. \*TODAS AS ESCALAS CORRESPONDEM A 10 μm.



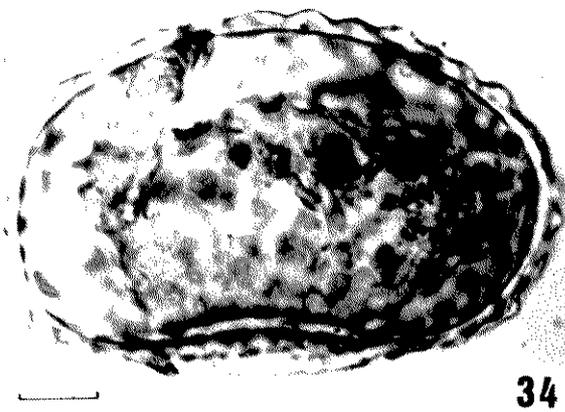
FIGURAS 17 A 21: ESPOROS DE Anemia raddiana . FIGURA 17: VISTA POLAR PROXIMAL. FIGURA 18: VISTA POLAR DISTAL. FIGURA 19: ASPECTO DA PERINA AO MICROSCÓPIO ÓPTICO. FIGURA 20: ESPORO INCLINADO MOSTRANDO RESÍDUOS DA PERINA (M.E.V., 1000X). FIGURA 21: SUPERFÍCIE LISA DAS ESTRIAS.

FIGURAS 22 A 24: ESPOROS DE Polypodium latipes . FIGURA 22: ESPOROS RECOBERTOS POR PERINA. FIGURA 23: DETALHE DA SUPERFÍCIE. FIGURA 24: ASPECTO DA SUPERFÍCIE (M.E.V., 1600X). M.E.V.: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA \*TODAS AS ESCALAS CORRESPONDEM A 10 $\mu$ m.

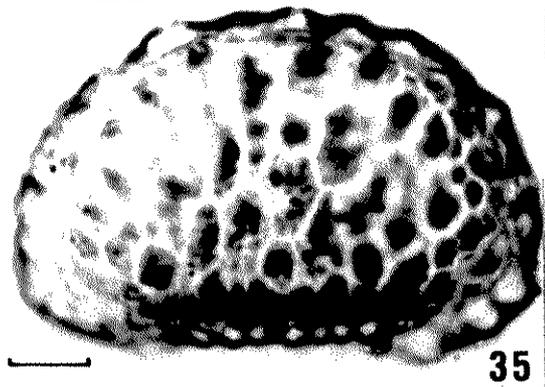


FIGURAS 25 A 28: ESPOROS DE *Polypodium pleopeltifolium*. FIGURA 25: ESPORO RECOBERTO POR PERINA. FIGURAS 26 E 27: ESCULTURA. FIGURA 28: ASPECTO GERAL DA SUPERFÍCIE (M.E.V., 1600X).

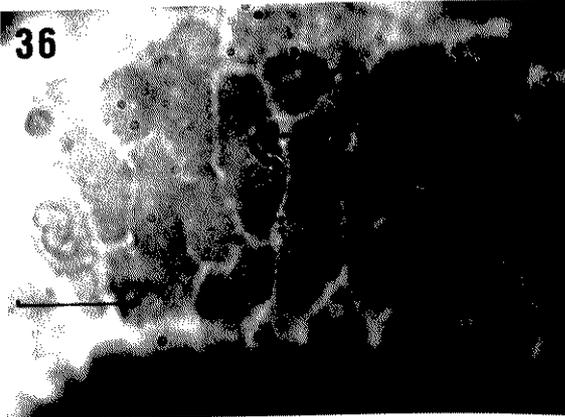
FIGURAS 29 A 33: ESPOROS DE *Polypodium hirsutissimum*. FIGURA 29: ESPORO RECOBERTO COM PERINA (?). FIGURA 30: DETALHE DA SUPERFÍCIE.. FIGURA 31: CORTE ÓPTICO DO ESPORO. FIGURAS 32 E 33: DETALHE DA SUPERFÍCIE MOSTRANDO DEPRESSÕES E PILOS (M.E.V., 3700 E 7500X RESPECTIVAMENTE). M.E.V.: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. \*TODAS AS ESCALAS CORRESPONDEM A 10 $\mu$ m.



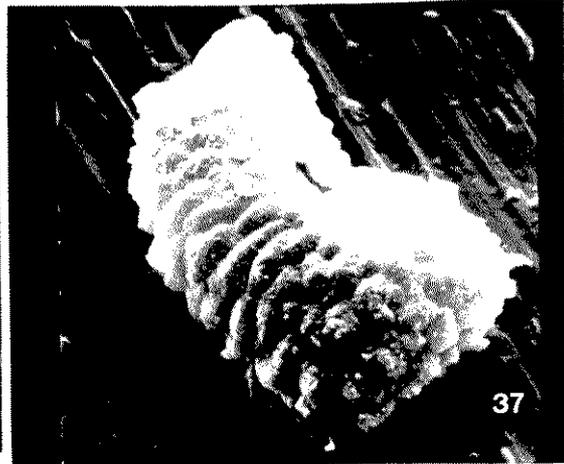
34



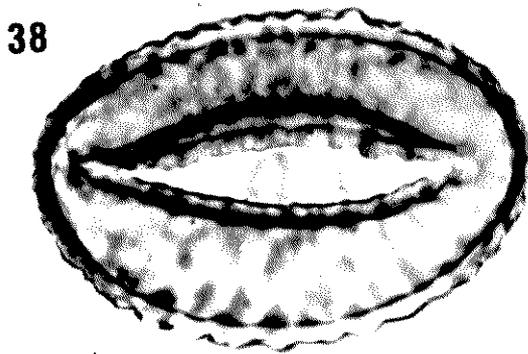
35



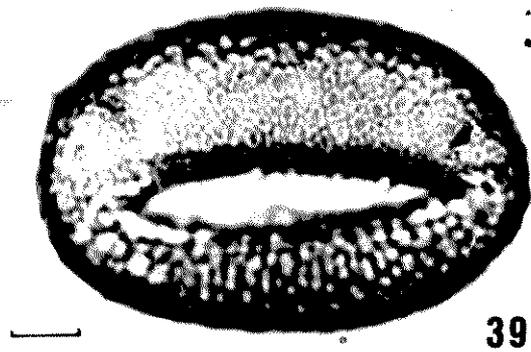
36



37



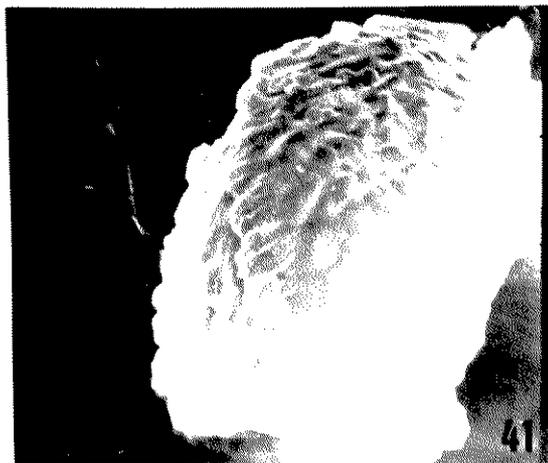
38



39



40



41

FIGURAS 34 A 38: ESPOROS DE Polypodium squamulosum . FIGURA 34: ESPO-  
RO RECOBERTO COM RESÍDUOS DE PERINA. FIGURAS 35 E 36: ESCULTURA EM VISTA  
LATERAL. FIGURA 37: ASPECTO GERAL DA ESCULTURA (M.E.V., 2200X). FIGURA  
38: VISTA POLAR PROXIMAL.

FIGURAS 39 A 41: ESPOROS DE Polypodium polyodioides , FIGURAS 39 E  
40: ESCULTURA COM PEQUENAS DEPRESSÕES RODEADAS POR MARGENS GROSSAS. FIGU  
RA 41: ASPECTO GERAL DA ESCULTURA (M.E.V., 1600X). M.E.V.: MICROSCOPIA  
ELETRÔNICA DE VARREDURA. \*TODAS AS ESCALAS CORRESPONDEM A 10 $\mu$ m.

Tabela 1. Medidas dos diâmetros dos esporos triletes.

Diâmetro polar (P)				
	Faixa de variação ( $\mu\text{m}$ )	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ ( $\mu\text{m}$ )	s ( $\mu\text{m}$ )	V (%)
<u>Adiantum serratodentatum</u>	29,2-41,3	35,1 $\pm$ 1,5	3,1	8,9
<u>Anemia flexuosa</u>	34,7-43,4	37,9 $\pm$ 1,9	2,8	7,3
<u>Anemia raddiana</u>	32,4-42,8	36,0 $\pm$ 1,7	3,6	8,4
<u>Doryopteris concolor</u>	23,6-28,0	25,5 $\pm$ 1,1	1,4	4,6
Diâmetro equatorial (E)				
	Faixa de variação ( $\mu\text{m}$ )	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ ( $\mu\text{m}$ )	s ( $\mu\text{m}$ )	V (%)
<u>Adiantum serratodentatum</u>	45,3-53,6	48,3 $\pm$ 1,2	2,1	4,4
<u>Anemia flexuosa</u>	50,1-60,1	54,0 $\pm$ 4,5	11,1	20,5
<u>Anemia raddiana</u>	50,9-64,9	55,9 $\pm$ 1,3	3,1	5,7
<u>Doryopteris concolor</u>	27,3-31,1	29,2 $\pm$ 0,9	1,3	4,4

Tabela 2. Medidas dos diâmetros dos esporos monoletes.

Espécies	Faixa de variação ( $\mu\text{m}$ )	$\bar{x} \pm s$ $\bar{x}$ ( $\mu\text{m}$ )	s ( $\mu\text{m}$ )	V (%)
Diâmetro polar				
<u>Polypodium hirsutissimum</u>	35,4-43,9	39,6 $\pm$ 1,7	7,3	18,4
<u>Polypodium latipes</u>	26,9-35,0	30,6 $\pm$ 1,1	2,6	8,6
<u>Polypodium pleopeltifolium</u>	32,3-48,7	39,2 $\pm$ 1,7	4,1	10,6
<u>Polypodium polypodioides</u>	40,6-51,6	44,3 $\pm$ 2,1	6,3	16,2
<u>Polypodium squamulosum</u>	36,1-50,3	45,3 $\pm$ 1,5	3,6	8,0
Diâmetro equatorial maior				
<u>Polypodium hirsutissimum</u>	52,3-67,3	61,2 $\pm$ 1,3	3,3	5,4
<u>Polypodium latipes</u>	49,1-62,0	55,0 $\pm$ 1,5	3,7	6,6
<u>Polypodium pleopeltifolium</u>	55,9-73,4	64,3 $\pm$ 2,0	4,8	7,6
<u>Polypodium polypodioides</u>	69,2-79,1	76,8 $\pm$ 3,5	5,4	8,5
<u>Polypodium squamulosum</u>	63,7-75,0	68,2 $\pm$ 1,8	3,8	5,6
Diâmetro equatorial menor				
<u>Polypodium hirsutissimum</u>	36,4-49,0	44,5 $\pm$ 1,6	3,5	8,0
<u>Polypodium latipes</u>	32,8-40,0	36,3 $\pm$ 0,9	2,4	6,6
<u>Polypodium pleopeltifolium</u>	36,0-48,6	42,7 $\pm$ 1,5	3,7	8,6
<u>Polypodium polypodioides</u>	45,2-56,2	51,5 $\pm$ 2,9	3,8	8,8
<u>Polypodium squamulosum</u>	36,1-48,1	39,9 $\pm$ 2,9	6,1	15,3

dia). Em alguns pontos do corte óptico é possível observar uma zona intermediária mais clara.

### 1.2. Anemia flexuosa (Figuras 12-16)

Esporos grandes, triletes, amarelos quando frescos. P:  $37,9 \pm 1,9 \mu\text{m}$ . E:  $54,0 \pm 4,5 \mu\text{m}$ . Vista polar: âmbito triangular, com os lados levemente convexos (Figura 12). Após a acetólise os esporos apresentam prolongamentos de aproximadamente  $3 \mu\text{m}$  de comprimento nos vértices (Figura 12). A lesão apresenta margem saliente (Figura 13). Comprimento total da lesão:  $27,0 \pm 2,2 \mu\text{m}$ . Braço da lesão:  $17,3 \pm 1,5 \mu\text{m}$ . Vista equatorial: esporos hemisféricos no pólo distal e subcônicos no pólo proximal. A superfície dos esporos é estriada, com as estrias formando triângulos concêntricos no pólo distal (Figura 14). Esporos recobertos com perina transparente ao microscópio óptico (Figura 15).

Exina: devido às estrias é praticamente impossível fazer cortes ópticos para análise das camadas da exina. A análise da superfície por L.O. mostra que as estrias são microrreticuladas (Figura 16).

### 1.3. Anemia raddiana (Figuras 17-21)

Esporos grandes, triletes, amarelos quando frescos. P:  $36,0 \pm 1,7 \mu\text{m}$ . E:  $55,9 \pm 1,3 \mu\text{m}$ . Vista polar: âmbito triangular, com os lados levemente convexos. Após a acetólise os esporos apresentam prolongamento de aproximadamente  $4 \mu\text{m}$  nos vértices (Figura 17). A lesão também apresenta margem saliente. Comprimento total da lesão:  $25,9 \pm 0,9 \mu\text{m}$ . Braço da lesão:  $16,3 \pm 0,8 \mu\text{m}$ .

Vista equatorial: esporos hemisféricos no pólo distal e subcônicos no pólo proximal. Superfície estriada, com estrias formando triângulos concêntricos no pólo distal (Figura 18). Esporos recobertos com perina estriada e transparente ao microscópio óptico (Figura 19). Na Figura 20 é mostrada a perina sob microscopia eletrônica de varredura.

Exina: as estrias impossibilitam que se façam cortes ópticos para análise da exina. A superfície das estrias é lisa ou apresenta raras microperfurações (Figura 21).

#### 1.4. Doryopteris concolor (Figuras 8-11)

Esporos médios, triletes, amarelos quando frescos. P:  $25,5 \pm 1,1\mu\text{m}$ . E:  $29,2 \pm 0,9\mu\text{m}$ . Vista polar: âmbito triangular, tendendo a subcircular, com os lados acentuadamente convexos e ângulos bastante arredondados (Figura 8). Comprimento total da lesão:  $20,1 \pm 1,1\mu\text{m}$ . Braço da lesão:  $13,2 \pm 0,7\mu\text{m}$ . Vista equatorial: tanto o pólo proximal como o distal são acentuadamente convexos. Esporos recobertos completamente com perina bastante característica, com cristas que se unem dando um aspecto fenestrado ao esporo (Figura 9). A perina é resistente à acetólise e sempre sobram resíduos que dificultam a observação da superfície; a escultura parece ser escabrada (Figura 10).

Exina: é possível distinguir três camadas (Figura 11): a externa, com  $0,5\mu\text{m}$ ; a intermediária, mais clara, com  $1,1\mu\text{m}$ ; e a interna, com  $0,8\mu\text{m}$ .

1.5. Polypodium hirsutissimum (Figuras 29-33)

Esporo grande, monolete, convexo-plano, amarelo quando fresco. P:  $39,6 \pm 1,7\mu\text{m}$ .  $E_1$ :  $61,2 \pm 1,3\mu\text{m}$ .  $E_2$ :  $44,5 \pm 1,6\mu\text{m}$ . Comprimento da lesão:  $42,9 \pm 2,0\mu\text{m}$ . Perina (?) envolve alguns esporos (Figura 29). Superfície ornamentada com murículos, eventualmente formando retículos; e pilos intercalados de modo irregular (Figuras 30, 31, 32 e 33).

Exina: em alguns cortes ópticos é possível observar que os pilos apresentam uma base inserida na sexina. Sexina com  $1,3\mu\text{m}$  e nexina com  $0,6\mu\text{m}$ .

1.6. Polypodium latipes (Figuras 22-24)

Esporo grande, monolete, convexo-plano, amarelo-vivo quando fresco. P:  $30,6 \pm 1,1\mu\text{m}$ .  $E_1$ :  $55,0 \pm 1,5\mu\text{m}$ .  $E_2$ :  $36,3 \pm 0,9\mu\text{m}$ . Comprimento da lesão:  $32,4 \pm 0,8\mu\text{m}$ . Perina recobre um grande número de esporos (Figura 22). Escultura verrugosa, com verrugas homogêneas e dispostas de modo bastante regular (Figuras 23 e 24).

Exina: a sexina, medida entre as verrugas, mede aproximadamente  $1,2\mu\text{m}$  e a nexina  $0,6\mu\text{m}$ .

1.7. Polypodium pleopeltifolium (Figuras 25-28)

Esporo grande, monolete, convexo-plano, amarelo quando fresco: P:  $39,2 \pm 1,7\mu\text{m}$ .  $E_1$ :  $64,3 \pm 2,0\mu\text{m}$ .  $E_2$ :  $42,7 \pm 1,5\mu\text{m}$ . Comprimento da lesão:  $37,7 \pm 1,8\mu\text{m}$ . Perina envolve completamente alguns esporos (Figura 25). Superfície verrugosa, com verrugas

de tamanhos e altura irregulares, menores do que as observadas em Polypodium latipes (Figuras 26, 27 e 28), sempre tendendo a circulares em toda a superfície dos esporos.

Exina: sexina e nexina com espessuras regulares (respectivamente 1,2 e 0,5 $\mu$ m).

#### 1.8. Polypodium polypodioides (Figuras 39-41)

Esporo grande, monolete, convexo-plano, amarelo quando fresco. P: 44,3  $\pm$  2,1 $\mu$ m. E<sub>1</sub>: 76,8  $\pm$  3,5 $\mu$ m. E<sub>2</sub>: 51,5  $\pm$  2,9  $\mu$ m. Comprimento da lesão: 51,2  $\pm$  2,2 $\mu$ m. Não foi observada perina. A análise da superfície em aumentos menores dá a sensação de pequenas depressões rodeadas por margens grossas (Figuras 39 e 40). A microscopia eletrônica de varredura mostra às vezes verrugas e algumas apresentam pequenas depressões no topo (Figura 41).

Exina: é possível distinguir duas camadas com bastante dificuldade, devido à coloração quase igual de ambas. Sexina com 1,3  $\mu$ m e nexina com 0,8 $\mu$ m.

#### 1.9 Polypodium squamulosum (Figuras 34-38)

Esporo grande, monolete, convexo-plano, raramente convexo-côncavo, amarelo vivo quando fresco. P: 45,3  $\pm$  1,5  $\mu$ m. E<sub>1</sub>: 68,2  $\pm$  1,8 $\mu$ m. E<sub>2</sub>: 39,9  $\pm$  2,9 $\mu$ m. Comprimento da lesão: 43,2  $\pm$  3,4 $\mu$ m. Em alguns esporos observa-se perina (Figura 34). A ornamentação é verrugosa, semelhante a Polypodium pleopeltifolium, porém o arranjo escultural é maior (Figura 35). Em vista lateral as verrugas são bastante alongadas, tendendo à forma de rúgulas (Figuras 36 e 37).

O grão acetolisado por 2 minutos apresenta uma deformação padrão na lâmina montada, quando se compara com o grão sem lamínula: o diâmetro equatorial maior e menor, e a abertura, tornam-se maiores, especialmente quando estão exatamente em vista polar proximal (Figura 38).

Exina: sexina com espessura variável (1,1 $\mu$ m em média); nexina com 1,7 $\mu$ m.

1.10. Chave para identificação dos esporos de espécies de pteridófitas coletadas em cerrado

1. Esporos triletes

2. Perina densa não contínua formando por cristas unidas, dando um aspecto fenestrado ao esporo.....  
 .....Doryopteris concolor
2. Perina pouco densa, fortemente aderida à superfície. Superfície ornamentada com grânulos e rúgulas ou estrias.....  
 .....3
3. Esporos ornamentados com grânulos e rúgulas.....  
 .....Adiantum serratodentatum
3. Esporos ornamentados com estrias.....4
4. Estrias microrreticuladas..... Anemia flexuosa
4. Estrias lisas ou com raras microperfurações.....  
 .....Anemia raddiana

## 1. Esporos monoletes

## 5. Superfície pilada

6. Pilos dispostos irregularmente .....  
 ..... Polypodium hirsutissimum

## 5. Superfície verrugosa

7. Verrugas alongadas em vista equatorial, tendendo à forma  
 de rúgulas..... Polypodium squamulosum

7. Verrugas tendendo à forma circular em toda a superfície  
 ..... Polypodium latipes

Polypodium pleopeltifolium

Polypodium polypodioides

## 2. GERMINAÇÃO

## 2.1. Método para contagem de germinação

Foram testados dois métodos de contagem de germinação, utilizando esporos de Polypodium latipes sob luz fluorescente branca, no 3º, 4º e 5º dia após o início do experimento.

Método A - foram preparados 3 erlenmeyers e de cada erlenmeyer foram preparadas 3 lâminas. Em cada lâmina observaram-se 5 campos ao acaso, contando-se os esporos presentes no total e a seguir os esporos germinados. Com estes dados é possível determinar a porcentagem de esporos germinados por campo. Para cada variável, portanto, havia 45 campos observados (N=45).

Método B - foram preparados 3 erlenmeyers e de cada erlenmeyer prepararam-se 2 lâminas. Em cada lâmina foram conta

dos 100 esporos, verificando-se se estavam ou não germinados. Assim, para cada variável foram observadas 6 lâminas (N=6).

Os resultados estão na Tabela 3. Considerando-se o intervalo de confiança, os dados obtidos pelos métodos A e B são iguais estatisticamente. Embora o método A apresente intervalos de confiança menores, o coeficiente de variação do método B é menor. Isto acontece porque no método B a variação de cada amostra (100 esporos em uma lâmina) é menor do que em cada amostra do método A (geralmente um número muito menor que 100 esporos). O fator que eleva o intervalo de confiança no método B é o número pequeno de amostras (N=6), em relação ao método A (N=45); porém os dados são perfeitamente aceitáveis em ambos os métodos.

O método adotado para todos os experimentos de germinação foi o B.

Tabela 3. Comparação dos métodos A e B para contagem de germinação de esporos.

Foram usados esporos de Polypodium latipes sob luz fluorescente branca constante. Contagens feitas 3, 4 e 5 dias após o início do experimento. As médias estão acompanhadas dos intervalos de confiança.

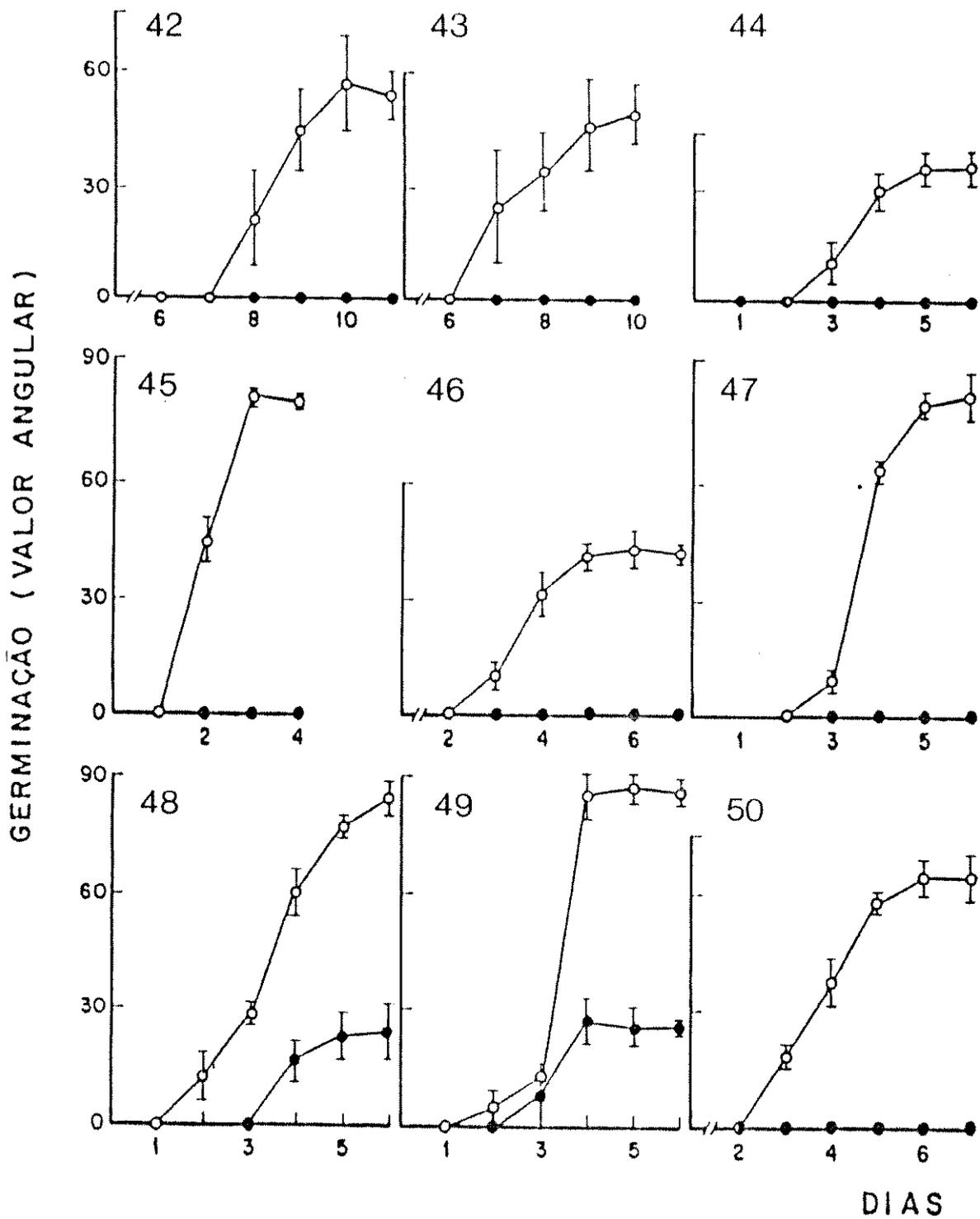
DIAS	Germinação (valor angular)	
	Método A	Método B
3	8,40 <sub>+0,71</sub>	7,66 <sub>+1,31</sub>
4	61,84 <sub>+3,69</sub>	63,79 <sub>+9,46</sub>
5	78,08 <sub>+3,71</sub>	80,32 <sub>+5,69</sub>
V. total (%)	20,13	12,37

## 2.2. Germinação dos esporos das nove espécies coletadas nos cerrados

As curvas de germinação dos esporos, sob luz e escuro constantes, mostraram que as nove espécies de pteridófitas germinam na presença de luz (Figuras 42 a 50). Não ocorre germinação no escuro em Anemia flexuosa (Figura 42), Anemia raddiana (Figura 43), Adiantum serratodentatum (Figura 44), Doryopteris concolor (Figura 45), Polypodium hirsutissimum (Figura 46), Polypodium latipes (Figura 47) e Polypodium squamulosum (Figura 50). Polypodium pleopeltifolium (Figura 48) e Polypodium polypodioides (Figura 47) apresentam alguma germinação no escuro, sempre inferior à ocorrida em luz.

Na Tabela 4 são mostrados os valores das diferentes velocidades de germinação. Doryopteris concolor é a que apresenta a mais rápida germinação, com germinação máxima no terceiro dia, valor angular de aproximadamente 80 (ver Figura 45). Anemia flexuosa é a espécie com menor velocidade: somente no oitavo dia a germinação tem início (Figura 42). Considerando-se a grande variação observada na amostragem de Anemia flexuosa e A. raddiana (observe os intervalos de confiança, Figuras 42 e 43) é possível afirmar que as duas espécies apresentam um padrão de germinação bastante semelhante; a variação da amostragem foi verificada em todas as repetições dos experimentos. As velocidades de germinação das duas espécies (Tabela 4) também são bastante semelhantes.

Entre as espécies de Polypodium (Tabela 4) as maiores velocidades de germinação foram as das espécies mais comumente encontradas no cerrado: Polypodium polypodioides, P. latipes e P. pleopeltifolium (Figuras 47, 48 e 49).



Figuras 42 - 50. Germinação de esporos de pteridófitas dos cerrados. 42. *Anemia flexuosa*. 43. *Anemia raddiana*. 44. *Adiantum serratodentatum*. 45. *Doryopteris concolor*. 46. *Polypodium hirsutissimum*. 47. *Polypodium latipes*. 48. *Polypodium pleopeltifolium*. 49. *Polypodium polypodioides*. 50. *Polypodium squamatum*. Círculos vazios: luz branca; círculos cheios: escuro.

Esporos de Polypodium pleopeltifolium e P. polypodioides, na ausência de luz, apresentam não só uma germinação final menor em relação aos tratamentos de luz (Figuras 48 e 49) mas também uma velocidade de germinação menor (Tabela 4). Isto é causado, em grande parte, pelo início retardado da germinação.

Tabela 4. Velocidade de germinação (coeficiente de inclinação  $b$ ) para as nove espécies de pteridófitas dos cerrados.

Espécies	Velocidade de germinação	
	luz	escuro
1. <u>Adiantum serratodentatum</u>	9,41	-
2. <u>Anemia flexuosa</u>	4,28	-
3. <u>Anemia raddiana</u>	5,88	-
4. <u>Doryopteris concolor</u>	48,34	-
5. <u>Polypodium hirsutissimum</u>	11,96	-
6. <u>Polypodium latipes</u>	27,47	-
7. <u>Polypodium pleopeltifolium</u>	26,26	2,28
8. <u>Polypodium polypodioides</u>	30,08	6,38
9. <u>Polypodium squamulosum</u>	18,37	-

### 3. Polypodium latipes

Polypodium latipes é uma pteridófita predominantemente terrestre (L.M. Esteves nº1), com rizoma epígeo, longo e flexível (L.M. Esteves nº49), revestido de escamas, e hemicriptófito (os brotos ou gemas apicais situam-se na superfície do solo). As plantas aparecem agrupadas em ilhas; são encontrados também alguns exemplares crescendo sobre árvores, todos eles com aspecto semelhante aos exemplares terrestres (L.M. Esteves nº2). Os pecíolos são isolados, distanciados entre si e nas folhas férteis apresentam um comprimento variando entre 11cm (L.M. Esteves nº16) e 44cm (L.M. Esteves nº60); A lâmina foliar pode ser deltóideia (L.M. Esteves nº57) ou lanceolada (L.M. Esteves nº53), com uma grande variação de tamanho, textura e cor. O tamanho da lâmina foliar varia de 30cm (L.M. Esteves nº16) a 58cm (L.M. Esteves nº60) nas folhas férteis; estas podem ser finas e tenras (L.M. Esteves nº53), neste caso geralmente verde-pálidas, ou então duras e coriáceas, com uma coloração verde-escura (L.M. Esteves nº60). Os folíolos da base podem atingir até 14cm de comprimento (L.M. Esteves nº60).

Em outubro ocorre o rebrotamento de novas folhas na maioria das plantas, embora esporadicamente ocorra em outras épocas do ano (L.M. Esteves nº57). No período compreendido entre novembro e maio ocorre predominantemente a esporulação (L.M. Esteves nº5, nº32), porém são também encontrados alguns exemplares férteis em outros períodos do ano, até agosto (L.M. Esteves nº76). A formação dos soros ocorre do ápice para a base da lâmina foliar e da ráquis para a ponta dos folíolos. O pico de dispersão dos esporos ocorre em fevereiro/março. A partir de maio observa-se um grande número de folhas secas ou mortas, com um máximo em julho/agosto.

Embora Polypodium latipes seja uma das espécies mais frequentes em cerrados, foram também encontrados exemplares crescendo na mata ciliar (A.L. Klein nº40) e em área alagada na beira do rio (A.L. Klein nº31), dentro da Reserva Florestal de Moji-Guaçu.

### 3.1. Germinação

#### 3.1.1. Luz branca

##### 3.1.1.a. Determinação do período de pré-indução

O período de embebição no escuro necessário para a germinação dos esporos de Polypodium latipes foi determinado inicialmente utilizando-se períodos de 0, 1, 2, 3 e 4 dias. A contagem da germinação foi feita 3, 4 e 5 dias após o início do tratamento de luz (posterior ao período de escuro). Na Tabela 5 pode-se observar que um dia de embebição no escuro produz a mesma ger

Tabela 5. Determinação do período de pré-indução (dias) em esporos de Polypodium latipes.

As leituras foram feitas 3, 4 e 5 dias após o início do tratamento com luz branca contínua. As letras comparam valores na vertical.

Embebição no escuro (dias)	Germinação (valor angular)		
	Dias em luz após embebição no escuro		
	3	4	5
0	13,02 <sup>a</sup>	59,02 <sup>a</sup>	72,36 <sup>a</sup>
1	45,02 <sup>bc</sup>	71,28 <sup>b</sup>	84,42 <sup>bc</sup>
2	55,48 <sup>c</sup>	80,12 <sup>bc</sup>	80,64 <sup>b</sup>
3	53,76 <sup>c</sup>	76,04 <sup>b</sup>	78,52 <sup>b</sup>
4	34,54 <sup>b</sup>	69,60 <sup>b</sup>	80,11 <sup>b</sup>
DMS 5% (Tukey)	14,53	8,31	5,72

minação que 2, 3 ou 4 dias; isto é válido para o 3º, 4º e 5º dias após o início do tratamento com luz constante. Estes resultados indicam, portanto, que além da germinação final ser igual com períodos de embebição de 1 a 4 dias no escuro, a velocidade de germinação também não é alterada.

Posteriormente foram utilizados períodos de 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 horas de embebição no escuro. Os resultados estão na Tabela 6. O menor tempo de embebição sob escuro necessário para produzir a máxima germinação mais rapidamente é de 18 horas (compare os valores das colunas correspondentes a 3 e 4 dias após embebição no escuro). No quinto dia sob luz todos os tratamentos apresentaram germinação máxima, mesmo aqueles que permaneceram menos de 18 horas embebendo no escuro.

Tabela 6. Determinação do período de pré-indução (horas) em esporos de Polypodium latipes.

As leituras foram feitas 3, 4 e 5 dias após o início do tratamento com luz branca contínua. As letras comparam valores na vertical.

Embebição no escuro (horas)	GERMINAÇÃO (valor angular)		
	Dias em luz após embebição no escuro		
	3	4	5
0	14,89 <sup>a</sup>	36,86 <sup>a</sup>	58,43
3	13,16 <sup>a</sup>	38,64 <sup>ab</sup>	57,85
6	19,35 <sup>ab</sup>	38,83 <sup>ab</sup>	57,63
9	20,50 <sup>ab</sup>	46,33 <sup>b</sup>	58,94
12	22,46 <sup>b</sup>	52,97 <sup>b</sup>	59,46
15	28,37 <sup>b</sup>	53,33 <sup>b</sup>	59,66
18	31,25 <sup>c</sup>	57,03 <sup>cb</sup>	64,97
21	32,21 <sup>c</sup>	56,79 <sup>cb</sup>	64,81
24	35,25 <sup>c</sup>	62,28 <sup>c</sup>	64,98
DMS 5% (Tukey)	7,86	8,34	

Na Figura 51 são mostradas as retas ajustadas pela análise de regressão, resultantes da germinação dos esporos (valor angular) em relação ao período de embebição no escuro, após 3, 4 e 5 dias sob luz branca constante; respectivamente, os coeficientes de correlação ( $r$ ) foram 0,98, 0,97 e 0,89, e as inclinações das retas ( $b$ ) foram 0,95, 1,11 e 0,35. A inclinação maior da reta no 4º dia de luz mostra que este é o dia em que mais se evidenciam as diferenças de germinação pelos diferentes tratamentos de embebição no escuro. Para o 5º dia a inclinação da reta ( $b$ ) é pequena em relação às outras retas, e possivelmente desprezível levando-se em conta a correlação ( $r$ ) menor (0,89); estes dados reafirmam que no 5º dia todos os tratamentos atingem germinação máxima, o que já havia sido demonstrado pela DMS 5% (Tukey).

#### 3.1.1.b. Determinação do período de indução

Os esporos foram embebidos durante dois dias no escuro e a seguir expostos a 0, 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15 e 24 horas de luz fluorescente branca. Após o tratamento de luz os esporos retornaram ao escuro. Como pode ser visto na Tabela 7, 15 horas de luz branca são suficientes para induzir a germinação na mesma proporção que o controle (96 horas de luz contínua, correspondentes aos quatro dias que os esporos dos diversos tratamentos permaneceram no escuro até a contagem do experimento). Cinco horas de luz branca são suficientes para induzir 50% da germinação máxima.

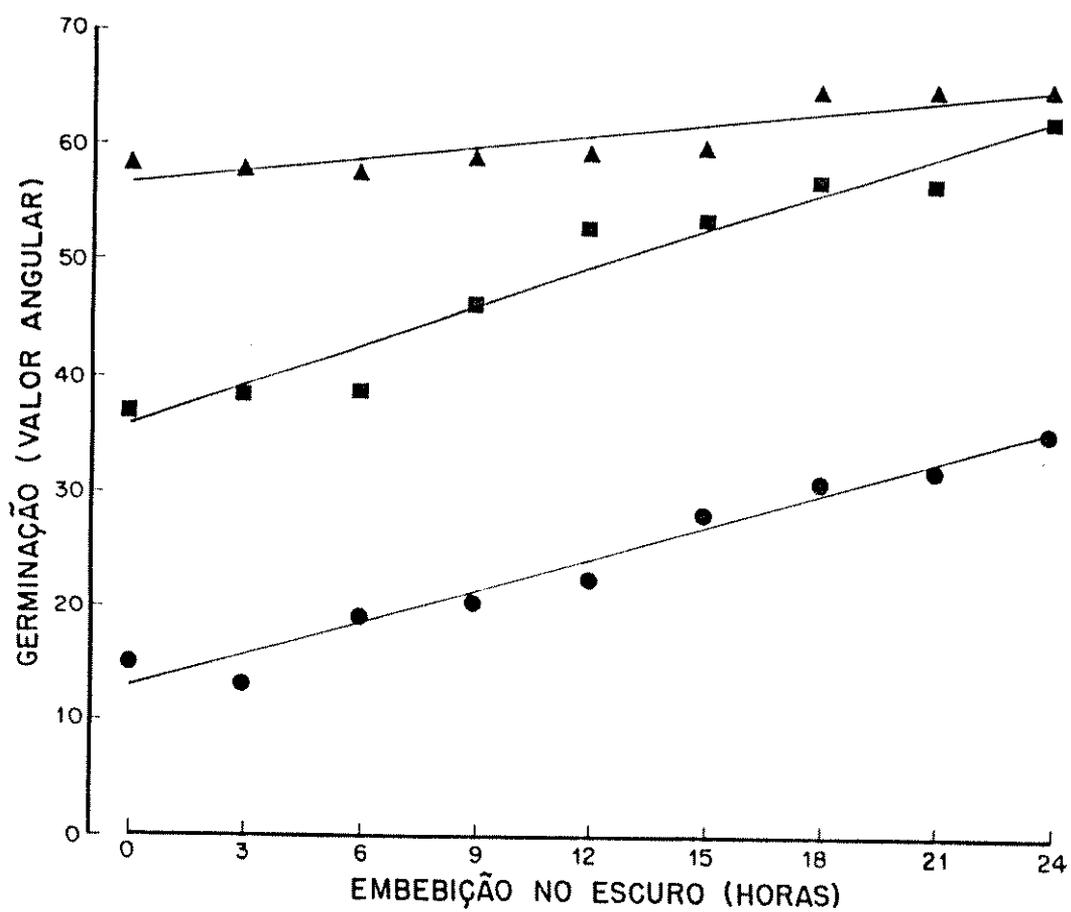


Figura 51 - Germinação de esporos de Polypodium latipes em relação ao período de embebição no escuro (pré-indução).

Período sob luz branca, após a pré-embebição no escuro durante: 3 dias: círculos; 4 dias: quadrados; 5 dias: triângulos.

Tabela 7. Determinação do período de indução em esporos de Polypodium latipes.

Pré-indução de 2 dias. A verificação de germinação foi realizada 4 dias após o início do tratamento de luz.

Horas de luz	Germinação (valor angular)
0	0 <sup>a</sup>
1	0 <sup>a</sup>
3	14,14 <sup>b</sup>
5	39,61 <sup>c</sup>
7	49,08 <sup>cd</sup>
9	47,88 <sup>cd</sup>
12	59,62 <sup>d</sup>
15	71,30 <sup>de</sup>
24	74,01 <sup>e</sup>
96 (controle)	72,08 <sup>e</sup>
DMS 5% (Tukey)	12,35

### 3.1.1.c. Intensidade luminosa

A germinação dos esporos foi verificada em nove intensidades luminosas diferentes. A intensidade de  $224\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  foi utilizada como controle em todos os experimentos. Pelos resultados observados na Tabela 8, pode-se verificar que sob intensidades luminosas entre 87 e  $224\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  a germinação dos esporos é igual, no 4º, 5º e 6º dias. Não ocorrem alterações significativas na quantidade de germinação entre o 4º e 6º dias em esporos de Polypodium latipes.

Tabela 8. Germinação de esporos de Polypodium latipes sob várias intensidades luminosas.

Intensidade luminosa ( $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	GERMINAÇÃO (valor angular)		
	4º dia	5º dia	6º dia
87	57,80	60,31	59,19
92	56,95	59,30	60,54
99	53,64	61,41	61,60
104	58,27	60,13	63,96
110	58,18	58,12	57,75
124	55,28	56,89	57,93
148	56,96	59,28	60,03
182	56,55	57,78	57,85
224 (controle)	56,15	61,84	60,15
F 5%	n.s.	n.s.	n.s.

### 3.1.2. Luz vermelha e vermelho-extremo

#### 3.1.2.a. Indução da germinação por luz vermelha

Os dados obtidos (Tabela 9) mostram que 18 horas de exposição à luz vermelha são suficientes para a indução da máxima germinação em esporos de Polypodium latipes. Uma exposição de 5 horas de luz vermelha induz aproximadamente 50% da germinação máxima.

Tabela 9. Período de luz vermelha necessário para indução da máxima germinação em esporos de Polypodium latipes.

Germinação verificada após 4 dias do início do experimento. Dados apresentados em valor angular. As letras comparam valores na vertical.

Experimento 1		Experimento 2	
tempo de luz vermelha	germinação ( $\bar{x}$ )	tempo de luz vermelha	germinação ( $\bar{x}$ )
		15h	55,76 <sup>a</sup>
15 min	0 <sup>a</sup>	16h	54,27 <sup>a</sup>
30 min	0 <sup>a</sup>	17h	59,63 <sup>a</sup>
45 min	0 <sup>a</sup>	18h	61,74 <sup>b</sup>
60 min	0 <sup>a</sup>	19h	64,13 <sup>b</sup>
3h	12,36 <sup>b</sup>	20h	63,07 <sup>b</sup>
5h	47,49 <sup>c</sup>	21h	65,56 <sup>b</sup>
8h	58,14 <sup>d</sup>	22h	62,24 <sup>b</sup>
12h	59,35 <sup>d</sup>	23h	63,58 <sup>b</sup>
15h	66,52 <sup>d</sup>		
24h	75,85 <sup>e</sup>	24h	63,98 <sup>b</sup>
controle (luz branca contínua)	75,70 <sup>e</sup>	controle (luz branca contínua)	65,01 <sup>b</sup>
controle (escuro contínuo)	0 <sup>a</sup>	controle (escuro contínuo)	0 <sup>c</sup>
DMS 5% (Tukey)	9,11	DMS 5% (Tukey)	3,84

## 3.1.2.b. Efeito de choques de luz vermelha

Choques de 1 e 5 minutos de luz vermelha, com intervalos de 30 minutos de escuro durante 5 horas não induziram a germinação de nenhum esporo.

## 3.1.2.c. Germinação sob vermelho-extremo constante

Esporos mantidos sob vermelho-extremo constante apresentaram germinação a partir do 5º dia de exposição (Tabela 10). A germinação foi baixa e a amostragem muito variável; pode-se ter uma idéia da amplitude da variação pelo alto valor da DMS 5%, em relação aos pequenos valores de germinação. Mesmo assim, estes dados não são desprezíveis porque nunca foi observada germinação na ausência de luz.

Tabela 10. Germinação de esporos de Polypodium latipes sob vermelho-extremo constante. Germinação verificada entre 4 e 10 dias do início do experimento. Dados apresentados em valor angular. A análise estatística não incluiu o valor para luz branca.

Tempo de exposição a vermelho-extremo (dias)	Germinação (valor angular)
controle (luz branca por 6 dias)	66,42
4	0 <sup>a</sup>
5	3,31 <sup>b</sup>
6	5,74 <sup>b</sup>
7	4,68 <sup>b</sup>
8	0 <sup>a</sup>
9	5,24 <sup>b</sup>
10	4,68 <sup>b</sup>
DMS 5% (Tukey)	3,24

### 3.1.2.d. Reversão do efeito de luz vermelha por vermelho-extremo

Esporos tratados com 5 horas de vermelho podem ter a germinação reduzida por aplicações de vermelho-extremo por 30, 40 e 50 minutos (Tabela 11). Vermelho extremo por períodos de 5 a 50 minutos, após 18 horas de luz vermelha, não inibe a germinação (comparar com os valores para luz branca constante e 18 horas de vermelho, Tabela 9).

Tabela 11. Reversão do efeito de luz vermelha por vermelho-extremo na germinação de esporos de Polypodium latipes.

Germinação verificada após 4 dias do início do tratamento de luz. Dados apresentados em valor angular. As letras comparam valores na vertical.

Exposição a vermelho-extremo (minutos)	Germinação (valor angular)	
	Tempo de pré-tratamento com luz vermelha	
	5 horas	18 horas
5	60,33 <sup>a</sup>	62,73
10	58,69 <sup>a</sup>	57,42
20	57,00 <sup>a</sup>	58,37
30	49,02 <sup>b</sup>	61,34
40	51,94 <sup>b</sup>	58,05
50	50,77 <sup>b</sup>	63,43
DMS 5% (Tukey)	6,98	F m.s.

Os dados da Tabela 12 mostram que após 11 horas de exposição à luz vermelha os esporos atingem um período onde a indução da germinação promovida pela luz vermelha não pode mais ser revertida pelo vermelho-extremo.

Tabela 12. Efeito de 40 minutos de vermelho-extremo após diferentes períodos de luz vermelha na germinação de esporos de Polypodium latipes. Germinação verificada 4 dias após o início do tratamento luminoso. Dados apresentados em valor angular.

Germinação (valor angular)	
Tratamento inicial com luz vermelha (horas)	Vermelho-extremo por 40 minutos
5	13,96 <sup>a</sup>
7	42,14 <sup>b</sup>
9	50,88 <sup>c</sup>
11	57,03 <sup>d</sup>
13	59,11 <sup>d</sup>
15	58,05 <sup>d</sup>
DMS 5% (Tukey)	5,88

### 3.1.3. Efeito de temperaturas constantes e alternadas

A germinação sob temperatura e luz constante é mostrada na Figura 52. Não ocorre germinação nas temperaturas cons

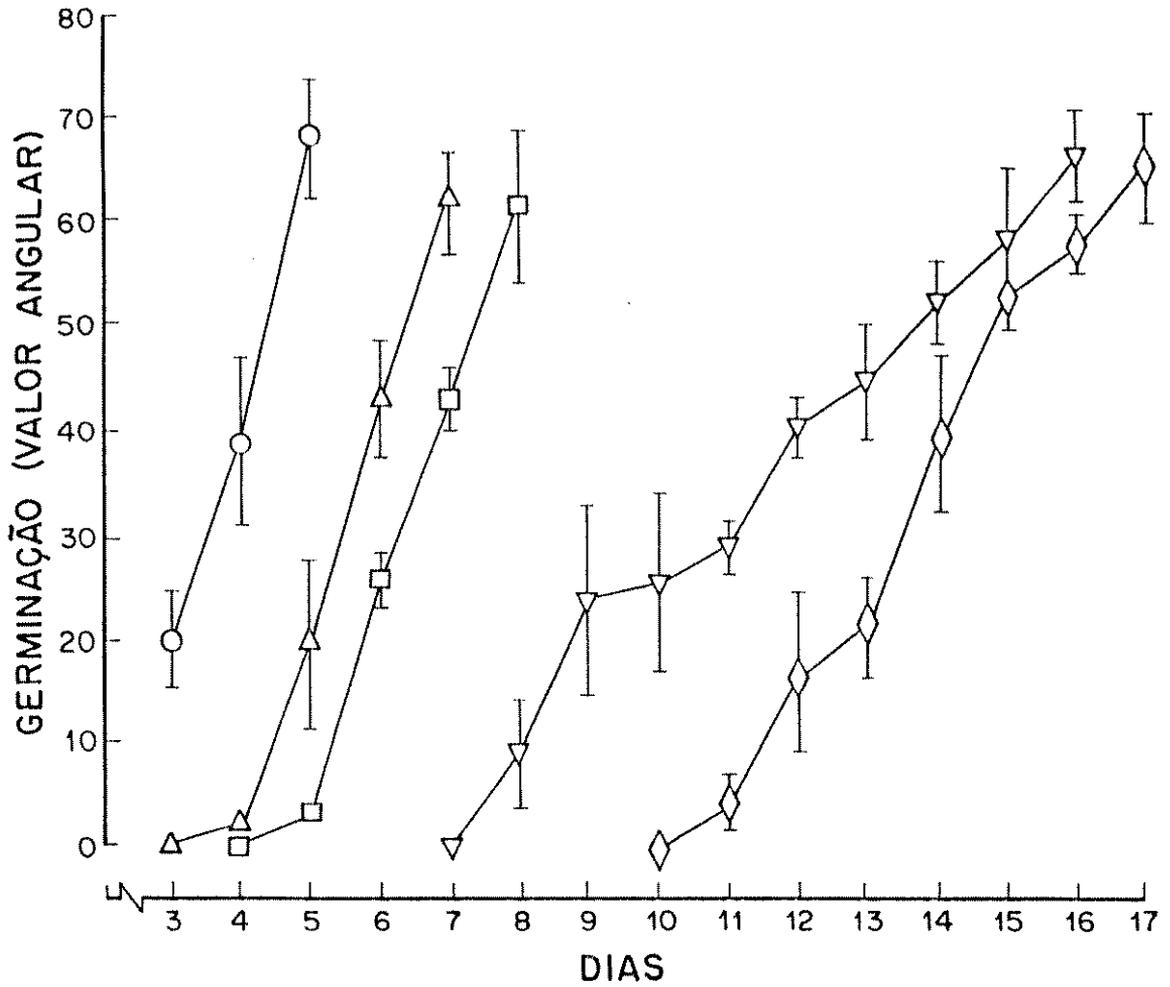


Figura 52 . Germinação de esporos de Polypodium latipes sob temperaturas e luz constantes.

10°C: losangos; 15°C: triângulos invertidos; 20°C: triângulos; 25°C: círculos; 30°C: quadrados.

tantes de 5, 35, 40 e 45°C em luz e em nenhuma temperatura sob escuro constante. Na Tabela 13, onde são dados os coeficientes de inclinação das retas resultantes da porcentagem de germinação dos esporos por dia, verifica-se que a maior velocidade de germinação ocorre a 25°C seguida, em ordem decrescente, por 20, 30, 15 e 10°C. Apesar das diferentes velocidades de germinação, a germinação final é igual sob temperaturas na faixa de 10 a 30°C (veja os dados de germinação para o último dia mostrados na Figura 52).

Nas Figuras 53 a 58 estão os resultados dos experimentos com pares de temperaturas alternadas sob luz branca. Na ausência de luz nenhum dos tratamentos com temperaturas alternadas promoveu a germinação. A temperatura de 25°C reverte o efeito inibitório da temperatura de 5°C (Figura 53) quando aplicada por 8, 12 ou 16 horas diárias; 8 ou 16 horas diárias a 25°C revertem inibição a 35°C (Figura 58). A temperatura de 25°C não reverte a inibição causada pelas temperaturas de 40 e 45°C (germinação nula). A velocidade de germinação (Tabela 13) sugere que a alternância de temperaturas por períodos desiguais (diferentes de 12 / 12 horas diárias) provoca um aumento na velocidade de germinação. Períodos de alternância 12 / 12 horas parecem diminuir não só a velocidade de germinação, mas também, em alguns casos, o número final de esporos germinados (Figuras 54 e 55; 58, germinação nula).

A velocidade de germinação foi maior a 25°C constante e com o par 25-20°C (16/8 e 8/16 horas diárias).

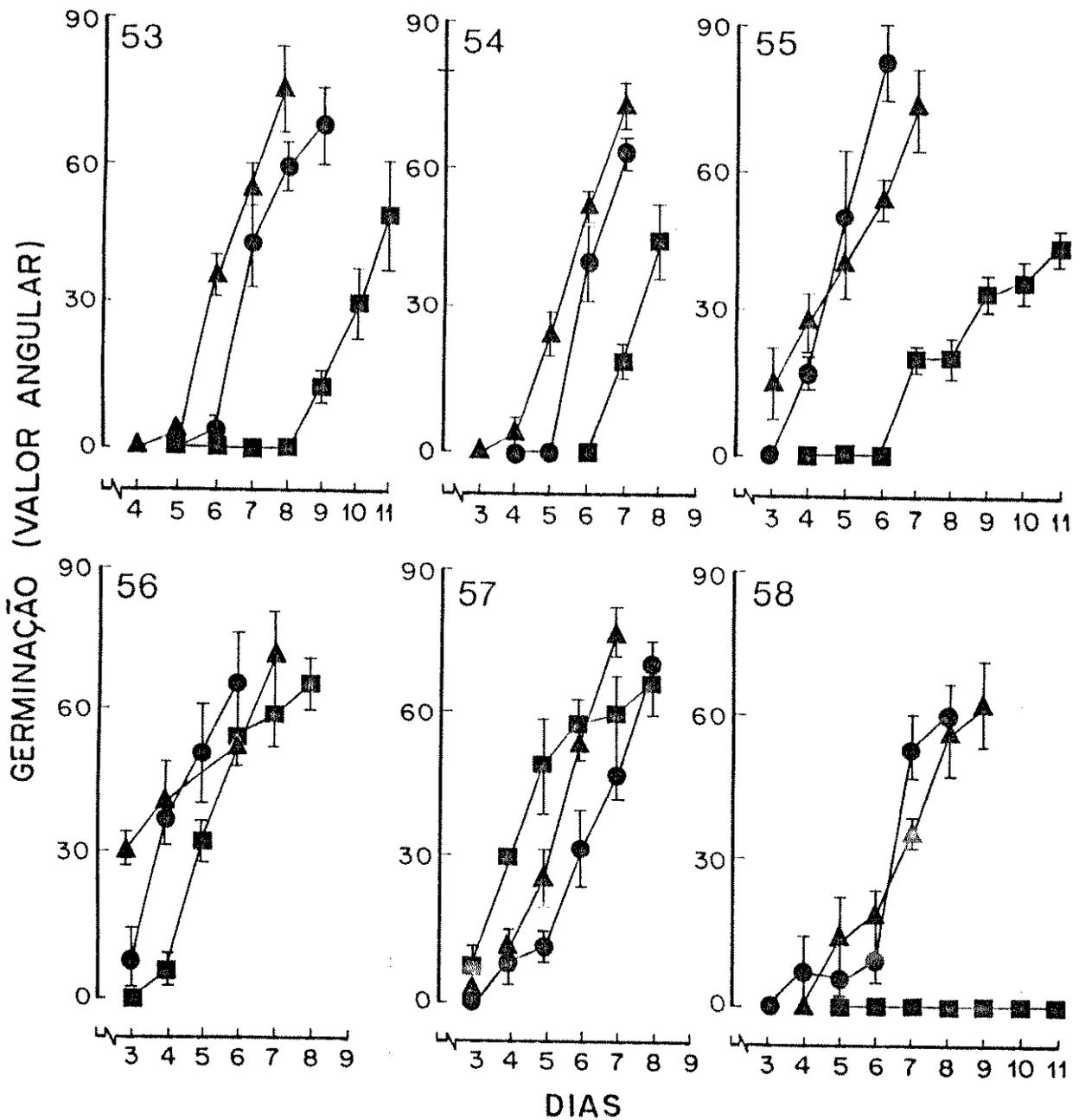
#### 3.1.4. Reguladores de crescimento

##### 3.1.4.a. Ácido -2-cloro-etilfosfônico (CEPA)

Em todas as concentrações de CEPA testadas não ocorreu germinação dos esporos na ausência de luz. Sob luz bran-

Tabela 13. Velocidade de germinação (b) de esporos Polypo - dium latipes sob temperaturas constantes e pares de temperaturas alternadas. As alternadas foram em ciclos diários de 8h/16h, 12h/12h e 16h/8h (inicial sempre a 25°C).

temperatura (°C)	constante	Velocidade (b) (coeficiente de inclinação)		
		alternância (horas diárias)		
		8/16 (25°C/-)	12/12 (25°C/-)	12/8 (25°C/-)
5	0	-	-	-
10	2,98	-	-	-
15	4,59	-	-	-
20	10,50	-	-	-
25	17,52	-	-	-
30	8,64	-	-	-
35	0	-	-	-
40	0	-	-	-
45	0	-	-	-
25-5	-	10,42	4,33	8,63
25-10	-	11,62	6,48	9,34
25-15	-	12,12	4,66	11,86
25-20	-	11,81	7,78	14,00
25-30	-	11,76	8,91	9,44
25-35	-	8,13	0	8,57



Figuras 53 - 58. Germinação de esporos de Polypodium latipes sob temperaturas alternadas e luz constante. Figura 53: 25-5°C. Figura 54: 25-10°C. Figura 55: 25-15°C. Figura 56: 25-20°C. Figura 57: 25-30°C. Figura 58: 25-35°C. 16 horas a 25°C: círculos; 12 horas a 25°C: quadrados; 8 horas a 25°C: triângulos.

ca constante, a germinação obtida nas concentrações de  $10^{-5}$  e  $10^{-4}$  M foi igual à obtida no controle sem CEPA. Na concentração de  $10^{-3}$  M ocorreu inibição da germinação (no 4º, 5º e 6º dia); nas concentrações de  $5 \cdot 10^{-3}$  e  $10^{-2}$  M a inibição da germinação foi total (Tabela 14).

Tabela 14. Efeito de ácido 2-cloro-etilfosfônico (CEPA) na germinação de esporos de Polypodium latipes sob luz branca.

As letras comparam valores na vertical.

CEPA (M)	Germinação (valor angular)		
	4º dia	5º dia	6º dia
$10^{-5}$	60,69 <sup>a</sup>	63,04 <sup>a</sup>	65,67 <sup>a</sup>
$10^{-4}$	63,42 <sup>a</sup>	66,07 <sup>a</sup>	69,33 <sup>a</sup>
$10^{-3}$	48,13 <sup>b</sup>	51,55 <sup>b</sup>	55,48 <sup>b</sup>
$5 \cdot 10^{-3}$	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
$10^{-2}$	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
0 (controle)	64,20 <sup>a</sup>	68,14 <sup>a</sup>	67,19 <sup>a</sup>
DMS 5% (Tukey)	7,28	9,49	6,29

Na Tabela 15 estão os resultados da germinação após a remoção do CEPA e permanência de 4 dias sob luz branca. Em todos os tratamentos ocorreu germinação.

Tabela 15. Germinação de esporos de Polypodium latipes pré-tratados com CEPA sob luz e/ou escuro, lavados e expostos à luz branca contínua.

A contagem de germinação foi feita no 4º dia após a lavagem. As letras comparam todos valores.

	Germinação (valor angular)	
	escuro	luz
0	25,17 <sup>a</sup>	-
10 <sup>-3</sup>	20,08 <sup>a</sup>	52,14 <sup>b</sup>
5.10 <sup>-3</sup>	21,19 <sup>a</sup>	23,73 <sup>a</sup>
10 <sup>-2</sup>	23,03 <sup>a</sup>	19,77 <sup>a</sup>
DMS 5% (Tukey)	11,42	

#### 3.1.4.b. Ácido giberélico (GA<sub>3</sub>)

Os resultados dos experimentos com GA<sub>3</sub> sob luz branca estão na Tabela 16. Nenhuma das concentrações testadas promoveu a germinação no escuro. Sob luz branca, GA<sub>3</sub> não produziu nenhum efeito aditivo na germinação, estatisticamente igual ao controle em todas as concentrações testadas.

Tabela 16. Efeito de ácido giberélico na germinação de esporos de Polypodium latipes sob luz constante.

GA <sub>3</sub> (M)	Germinação (valor angular)		
	4º dia	5º dia	6º dia
0 (controle)	57,82	61,69	59,98
10 <sup>-5</sup>	54,86	56,97	58,19
10 <sup>-4</sup>	55,15	64,07	62,88
10 <sup>-3</sup>	54,47	63,14	65,12
10 <sup>-2</sup>	58,02	60,65	58,94
F 5%	n.s.	n.s.	n.s.

### 3.2. Substâncias de reserva dos esporos

#### 3.2.1. Açúcares solúveis totais

A dosagem de açúcares solúveis totais em esporos de Polypodium latipes (Tabela 17) indicou uma proporção de 62,9 $\mu$ g para cada mg de esporos não embebidos (frescos). Aproximadamente 6,3% do peso fresco do esporo são carboidratos.

#### 3.2.2. Proteínas solúveis

Pela Tabela 17, pode ser visto que foi detectada a proporção de 60,9 $\mu$ g de proteínas solúveis para cada mg de esporos não embebidos. Aproximadamente 6,1% do peso fresco do esporo são proteínas.

#### 3.2.3. Lipídios livres

A dosagem de lipídios livres (Tabela 17) mostrou uma proporção de 520 $\mu$ g para cada mg de esporos não embebidos. Portanto, cerca de 50% do peso dos esporos são lipídios.

Tabela 17. Conteúdo de açúcares solúveis totais, proteínas solúveis e lipídios livres em esporos de Polypodium latipes.

São apresentados os intervalos de confiança e o coeficiente de variação.

	$\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$	intervalo de confiança	coeficiente de variação (%)
açúcares	62,9	$\pm$ 6,8	10,3
proteínas	60,9	$\pm$ 14,0	21,9
lipídios	520,0	$\pm$ 5,1	8,9

### 3.3. Inibidores fenólicos nos folíolos

#### 3.3.1. Bioensaios

##### 3.3.1.a. Bioensaio com folíolos secos

Foi verificado se folíolos de Polypodium latipes inibiam a germinação de sementes de alface. Os resultados estão na Tabela 18.

É bastante evidente a inibição da germinação das sementes de alface nos tratamentos A, B, C e D. Pode-se notar uma inibição maior da germinação das sementes nos tratamentos em que a liberação do exsudato é facilitada (por exemplo, no tratamento C, onde os folíolos foram moídos). A inibição foi menor no tratamento A, em que o folíolo foi mantido inteiro na placa por apenas 24 horas.

Tabela 18. Efeito de folíolo de Polypodium latipes na germinação de alface (bioensaio).

A germinação do alface foi verificada em 24 horas.

Tratamentos	Germinação de alface (valor angular)
A (folíolo só no 1º dia)	40,2 <sup>b</sup>
B (folíolo em dois dias)	21,6 <sup>c</sup>
C (pó em dois dias)	10,4 <sup>c</sup>
D (fragmentos em dois dias)	18,6 <sup>c</sup>
E (controle)	90,0 <sup>a</sup>
DMS 5% (Tukey)	12,4

## 3.3.1.b. Bioensaio com extrato aquoso

Na Tabela 19 estão os resultados referentes à aplicação de extrato bruto aquoso (10g de folíolo/80ml de água) e diluído a  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , na germinação de sementes de alface. Pode-se observar que o extrato bruto inibe totalmente a germinação das sementes. O extrato bruto diluído 10 vezes ainda mantém uma grande capacidade de inibir a germinação das sementes de alface: 13,5 em valor angular corresponde a apenas 5,5% de sementes germinadas.

Tabela 19. Inibição da germinação de sementes de alface pela aplicação de extrato aquoso de Polypodium latipes.

A germinação do alface foi verificada em 24 horas.

Diluição	Germinação (valor angular)
Extrato não diluído	0 <sup>a</sup>
$10^{-1}$	13,5 <sup>b</sup>
$10^{-2}$	90,0 <sup>c</sup>
$10^{-3}$	81,1 <sup>c</sup>
controle	90,0 <sup>c</sup>
DMS 5% (Tukey)	10,2

## 3.3.1.c. Bioensaio com extrato etanólico

Foi verificado o efeito da aplicação de extrato de folíolos de Polypodium latipes, extraído em etanol 80%, na germinação de sementes de alface. Foram aplicados o extrato bruto e diluições de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $5.10^{-3}$  e  $10^{-4}$ . Os resultados estão na Tabela 20. O extrato diluído 100 vezes ainda provoca uma inibição na germinação das sementes de alface, em relação ao controle; o extrato bruto e diluído 10 vezes inibem totalmente a germinação.

Tabela 20. Inibição da germinação de sementes de alface pela aplicação de extrato etanólico de folíolos de Polypodium latipes.

A germinação das sementes de alface foi verificada em 24 horas.

Diluição	Germinação (valor angular)
Extrato não diluído	0 <sup>a</sup>
$10^{-1}$	0 <sup>a</sup>
$10^{-2}$	77,0 <sup>b</sup>
$10^{-3}$	86,1 <sup>cb</sup>
$5.10^{-3}$	86,1 <sup>cb</sup>
$10^{-4}$	90,0 <sup>c</sup>
controle	90,0 <sup>c</sup>
DMS 5% (Tukey)	12,4

### 3.3.2. Dosagem de fenóis totais

A dosagem de fenóis totais em folíolos de Poly-podium latipes (Tabela 21) indicou uma proporção de 61,4 $\mu$ g equivalentes de ácido tânico para cada mg de folíolos. Cerca de 6,1% do peso seco dos folíolos são fenóis.

Tabela 21. Fenóis totais equivalentes de ácido tânico em folíolos de Polypodium latipes.

São apresentados o intervalo de confiança e o coeficiente de variação.

	$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$	intervalo de confiança	coeficiente de variação (%)
fenóis totais	61,4	$\pm$ 2,9	6,1

### 3.3.3. Detecção, separação, isolamento e purificação de cumarina

#### 3.3.3.a. Cromatografia em camada delgada

Os extratos foram cromatografados em placas de sílica-gel PF 240 e solvente etanol:benzeno (5:1), juntamente com os padrões cumarina e metil-umbeliferona.

Os extratos apresentaram uma mancha com Rf que correspondia à do padrão cumarina, quando observado sob luz ultra-violeta.

### 3.3.3.b. Identificação pelo espectro de absorção no ultravioleta

A identificação foi feita através da absorbância no ultra-violeta, comparando-se com uma amostra autêntica de cumarina. A coincidência de bandas com máximo de absorção a 273nm e 310nm entre o padrão cumarina, o eluato resultante da placa preparativa e o extrato bruto comprovam a presença nos folíolos (Figura 59).

### 3.3.3.c. Dosagem

A dosagem de cumarina no eluato obtido a partir das placas preparativas feita por leitura no espectrofotômetro mostrou uma proporção de 15,4µg por mg de folíolos.

### 3.3.3.d. Germinação de esporos de Polypodium latipes: efeito de cumarina

Cumarina padrão nas concentrações de  $10^{-4}$  M e  $5.10^{-4}$  M inibiu a germinação dos esporos sob luz fluorescente branca constante. Na concentração de  $10^{-3}$  a inibição foi total (Tabela 22).

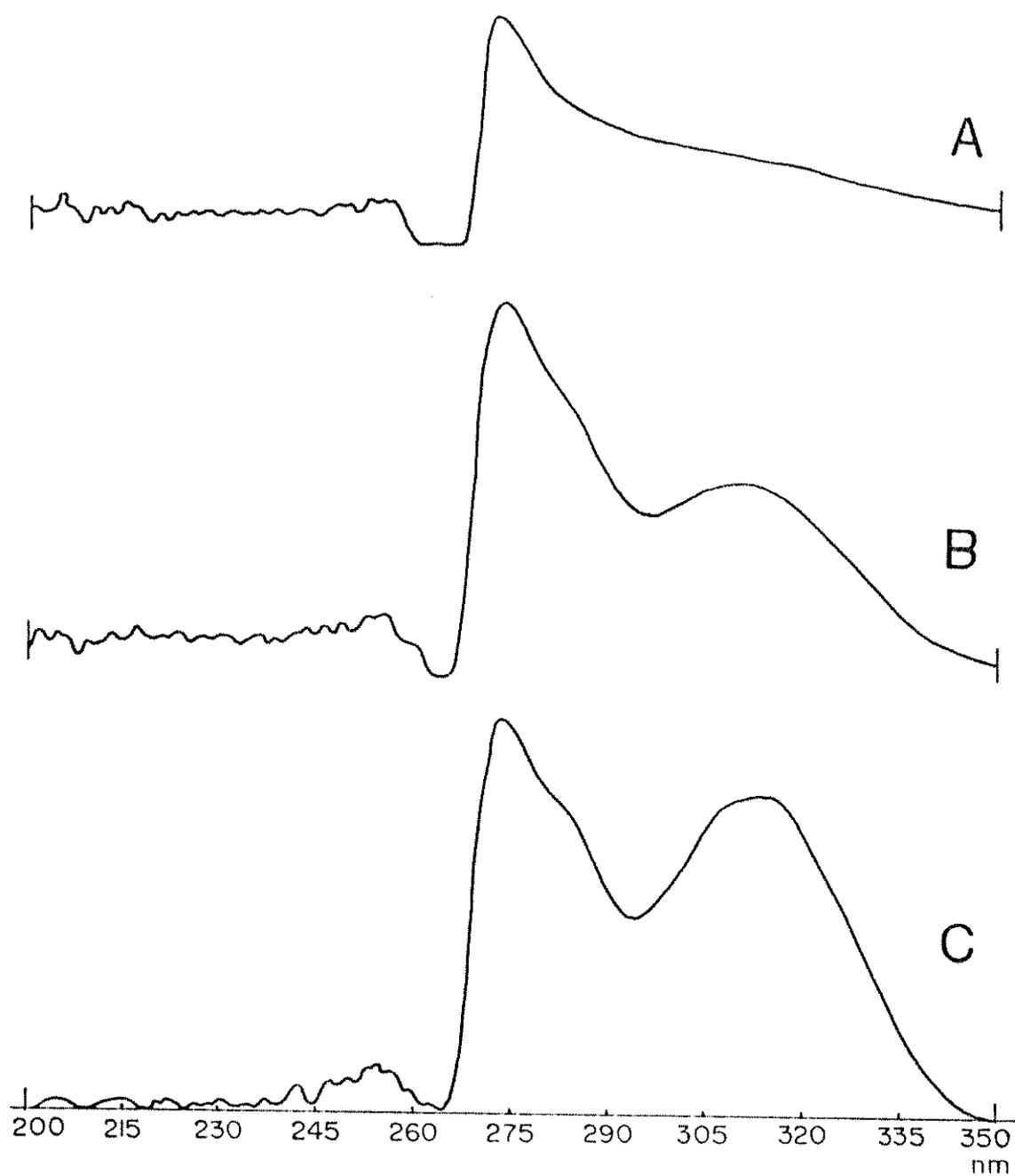


Figura 59. Identificação de cumarina isolada de folíolos de Polypodium latipes pelo espectro de absorção no ultra-violeta.

A: extrato bruto diluído 600 vezes; B: eluato da cromatografia preparativa, diluído 4 vezes; C: padrão de cumarina.

Tabela. 22. Efeito de cumarina na germinação de esporos de Polypodium latipes, sob luz branca.

As letras comparam valores na vertical.

Cumarina (M)	Germinação (valor angular)		
	4º dia	5º dia	6º dia
0 (controle)	56,04 <sup>a</sup>	62,22 <sup>a</sup>	61,27 <sup>a</sup>
10 <sup>-4</sup>	27,14 <sup>b</sup>	30,50 <sup>b</sup>	28,97 <sup>b</sup>
5.10 <sup>-4</sup>	25,56 <sup>b</sup>	24,12 <sup>b</sup>	23,26 <sup>b</sup>
10 <sup>-3</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
DMS 5% (Tukey)	6,11	9,03	7,48

O eluato resultante da cromatografia preparativa foi evaporado e a substância resultante, agora já identificada como cumarina, foi diluída em 15ml de água. Esporos de P. latipes foram colocados em placas de Petri recobertas com papel de filtro umedecidas com cumarina extraída dos folíolos, diluída. Pela Tabela 23, pode-se ver que a germinação no quinto dia foi bastante reduzida em relação ao controle de água.

A diluição utilizada corresponde a aproximadamente  $2.10^{-4}$  M.

Tabela 23. Efeito de cumarina extraída dos folíolos na germinação de esporos de Polypodium latipes. Resultados do quinto dia.

	Germinação (valor angular) com intervalo de confiança
controle	65,48 $\pm$ 5,18
cumarina do folíolo	28,72 $\pm$ 3,72

## DISCUSSÃO

## 1. MORFOLOGIA E GERMINAÇÃO DOS ESPOROS

As nove espécies de Pteridófitas que ocorrem na Reserva Biológica de Moji-Guaçu e em outras manchas de cerrado do Estado de São Paulo pertencem à ordem Filicales, distribuídas em três famílias: Pteridaceae (Adiantum, Doryopteris), Schizaeaceae (Anemia) e Polypodiaceae (Polypodium). Alguns destes gêneros (ou espécies) tiveram seus esporos descritos por outros autores, especialmente ERDTMAN (1971) e LUGARDON (1963, 1974 e 1976). Erdtman reúne informações de vários outros autores, portanto as diferenças de metodologia não permitem comparações quantitativas. Os trabalhos de Lugardon apresentam o mesmo problema, porém são muito ricos em informações sobre a exina dos esporos, obtidos sob microscopia óptica e eletrônica de transmissão.

Os esporos coletados podem ser divididos em dois grupos, quanto ao tipo de lesão apresentada: triletes e monoletes. Para cada um dos dois grupos serão discutidos os resultados obtidos e comparados com os dados existentes na literatura a nível genérico e específico.

## A. Esporos triletes

Foram definidas neste grupo quatro espécies: Adiantum serratodentatum, Doryopteris concolor, Anemia flexuosa e

Anemia raddiana. A única espécie com esporos descritos na literatura é Doryopteris concolor por ERDTMAN (1971). O mesmo autor apresenta descrições bastante breves para os três gêneros.

ERDTMAN (1971) descreve os esporos do gênero Adiantum como triletes, ocasionalmente monoletes, com uma fina perina recobrindo todo o esporo. Não existem descrições da escultura, provavelmente porque em quase todas as espécies a perina é descrita como fortemente aderida ao esporo. Em Adiantum serratodentatum a perina também é resistente à acetólise, porém foi possível observar em vários esporos a escultura com grânulos e rúgulas distribuídos por toda a superfície. LUGARDON (1974) descreve a superfície da exina dos esporos de Adiantum capillus-veneris como lisa. Todas as espécies de Adiantum descritas na literatura disponível apresentam exina composta por duas camadas, também observadas em Adiantum serratodentatum; porém nesta espécie é possível observar uma terceira camada mais clara entre as duas outras, somente em alguns pontos do corte óptico. A observação foi feita cuidadosamente assegurando-se não ser esta um efeito da refração.

Esporos de Doryopteris concolor são descritos por ERDTMAN (1971) e em alguns pontos suas observações são divergentes das obtidas aqui. A perina, observada somente sob microscopia óptica por Erdtman, foi descrita como apresentando um padrão reticulado; neste trabalho foi observado, sob microscopia óptica e de varredura que as cristas características da perina unem-se dando um aspecto fenestrado aos esporos. Erdtman

também fornece medidas de somente duas camadas da exina ("sexina" duas vezes mais fina que "nexina"), porém foram observadas aqui três camadas na exina, bastante evidentes em todos os cortes ópticos. LUGARDON (1974, 1976) generalisa que todas as Filicales apresentam exina composta por duas camadas: uma externa, não estruturada, que constitui a ornamentação e uma interna, estruturada, com aspecto folhado devido ao processo de formação por deposição de material na fase de tétrade. Geralmente essas camadas são justapostas sem interpenetrações, porém em alguns casos elas são mais ou menos intrincadas, o que leva a distinguir uma terceira camada: a camada média ou intermediária. Em seus trabalhos anteriores com esporos de filicíneas isosporadas (LUGARDON, 1963, 1974) não há nenhuma descrição do gênero Doryopteris.

Os esporos de Anemia flexuosa podem ser facilmente distintos dos esporos de Anemia raddiana pela análise da superfície das estrias: A. flexuosa apresenta microrretículos visíveis em aumentos de 600X, enquanto que esporos de A. raddiana têm estrias lisas ou com raras microperfurações. Em todos os outros aspectos os esporos das duas espécies são muito semelhantes. Não foi possível examinar a estrutura da exina porque as estrias impedem que se faça o corte óptico. A única espécie de Anemia que tem a exina dos esporos estudada é Anemia phyllitidis (LUGARDON, 1974). O trabalho foi feito sob microscopia eletrônica de transmissão e indica a presença de duas camadas: uma interna, perfeitamente homogênea e compacta em todos os pon

tos, e outra externa, com cavidades que formam um complicado sistema de canais em sua parte mais profunda. A camada externa representa a quase totalidade da parede e constitui a ornamentação do esporo.

#### B. Esporos monoletes

Neste grupo foram definidas cinco espécies, todas pertencentes ao gênero Polypodium: Polypodium hirsutissimum, Polypodium latipes, Polypodium pleopeltifolium, Polypodium polypodioides e Polypodium squamulosum.

ERDTMAN (1971) descreve os esporos do gênero como monoletes (trilete em P. subpinnatum), sem perina e ornamentados com verrugas e/ou tubérculos.

Com exceção de Polypodium polypodioides, todas as outras quatro espécies apresentaram perina na maior parte dos esporos, inclusive dificultando a observação da escultura, pois é bastante resistente à acetólise. É pouco provável que os esporos fossem imaturos pois a coleta foi feita quando os esporângios estavam a ponto de liberar espontaneamente o seu conteúdo.

Os esporos apresentam verrugas e/ou pilos sobre a superfície e o modo como estes se organizam permite a identificação de algumas espécies. A escultura dos esporos de Polypodium hirsutissimum é bastante característica, com a presença de grande número de pilos intercalados com murículos, às vezes formando retículos. Os esporos de P. squamulosum são bastante se-

melhantes a P. pleopeltifolium , porém distinguem-se destes pelo arranjo escultural maior e pelas verrugas alongadas em vista equatorial.

As características observadas não foram suficientes para a distinção de Polypodium latipes, P. pleopeltifolium e P. polypodioides . O padrão de distribuição das verrugas sobre a superfície e o tamanho destas não são suficientemente definidos para a caracterização das três espécies. Não foi observada perina somente em P. polypodioides porém esta não é uma característica segura; frequentemente perina está presente ou ausente em várias espécies, dependendo do estágio de maturação dos esporos. ERDTMAN (1971), por exemplo, descreve todo o gênero Polypodium como sem perina. As medidas tomadas podem auxiliar a distinção entre as três espécies; o coeficiente de variação da maioria é bastante baixo e portanto, as medidas são bastante seguras. Porém, as medidas não são suficientes sozinhas para a separação das espécies. A estrutura da exina é muito semelhante para todas as espécies de Polypodium.

Em relação à germinação, as nove espécies de pteridófitas apresentam esporos fotoblásticos positivos.

Segundo a revisão bibliográfica de DYER (1979) aproximadamente 100 espécies de pteridófitas haviam sido estudadas experimentalmente quanto aos efeitos de luz, porém dados da mesma revisão indicam apenas 7 espécies com esporos capazes de germinar na ausência de luz. Embora a germinação de esporos no escuro seja um evento raro no geral, proporcionalmente parece

ser bastante frequente dentro do gênero Polypodium. Foi observada a germinação de esporos, na ausência de luz, em Polypodium crassifolium (SCHRAUDOLF, 1967), P. feei (WEINBERG & VOELLER, 1969), P. hirsutissimum (RANAL, 1983) e P. vulgare (ORTH, 1937; in DYER, 1979). Com este trabalho pode-se acrescentar outras duas espécies que apresentam esporos que germinam no escuro: Polypodium pleopeltifolium e P. polypodioides. Nestas duas espécies a porcentagem final de germinação foi bem menor em relação ao tratamento de luz. Além disso, houve um atraso do início da germinação em relação ao tratamento de luz.

A curva de germinação de Polypodium hirsutissimum (ver Figura 46) mostra que a espécie é exclusivamente fotoblástica positiva a 25°C constante. RANAL (1983) relata para esta espécie germinação de 6,3% dos esporos no escuro. É possível que a divergência nos dados seja devida às condições dos experimentos. RANAL trabalhava com duas câmaras cujas temperaturas oscilavam entre 18,2 e 30°C. Na verdade, dados conflitantes obtidos por diferentes pesquisadores sobre o requerimento de luz de esporos de pteridófitas é um fato bastante comum (RAGHAVAN, 1980).

O início do processo de germinação está relacionado com o período de embebição necessário para rehidratar o protoplasto do esporo, em particular a cromatina e o material de reserva. Por sua vez, a embebição depende não só da espessura e composição da parede do esporo mas também da hidratação do con-

teúdo, com um volume dependente do tamanho do esporo (RAGHAVAN, 1980). Neste trabalho não foi possível correlacionar a velocidade de germinação das nove espécies estudadas ou com o tamanho do esporo ou com o fato de ser monolete ou trilete, ou ainda, com a espessura das paredes.

## 2. Polypodium latipes

### 2.1. Germinação e substâncias de reserva

A fotossensibilidade dos esporos de pteridófitas é estabelecida após um período de embebição que depende de condições aeróbicas. Esse período é chamado de período de pré-indução (TOWILL & IKUMA, 1975). Em esporos dormentes que requerem luz para germinar a fotossensibilidade aumenta com o tempo de embebição, até atingir um platô (período mínimo de pré-indução). A determinação do período de embebição no escuro para esporos de Polypodium latipes mostrou que 15h são suficientes para o estabelecimento da fotossensibilidade máxima.

O período de embebição requerido pelos esporos de Polypodium latipes é significativamente menor do que os demonstrados para várias espécies de pteridófitas, nas quais a pré-indução prolonga-se por vários dias (MOHR, 1956; SUGAI & FURUYA, 1967; JARVIS & WILKINS, 1973; TOWILL & IKUMA, 1973; TOMIZAWA et al., 1982; AGNEW et al., 1984).

TOMIZAWA et al. (1982) demonstraram que esporos secos de Lycopodium japonicum não contêm fitocromo em um nível detectável e que o padrão de desenvolvimento da fotossensibilidade no escuro está relacionado com o aumento do conteúdo de fitocromo. Partindo-se do princípio que fitocromo está envolvido no processo de germinação dos esporos de Polypodium latipes (possibilidade discutida adiante), o curto período de embebição necessário para o estabelecimento da fotossensibilidade possibilita duas hipóteses: ou o esporo seco apresenta uma grande quantidade de fitocromo inativo, ou então os esporos respondem à luz requerendo um baixo nível de fitocromo para desencadear o processo fotoquímico que levará à germinação.

Os esporos de Polypodium latipes são induzidos para a germinação máxima com 15 horas de luz branca ou 18 horas de luz vermelha. Cinco horas de luz branca ou vermelha são suficientes para causar 50% da germinação máxima. A indução da germinação de esporos de Polypodium latipes pela luz vermelha pode ser revertida por vermelho-extremo, indicando um possível envolvimento do sistema de fitocromo. Porém, são necessários períodos relativamente longos de luz vermelha (ou branca) para que ocorra a indução da germinação. Choques de luz vermelha não atuam, mesmo quando repetidos a cada 30 minutos durante 5 horas.

Este comportamento não se amolda à teoria clássica do fitocromo, porém é bastante comum em várias espécies de pteridófitas e mesmo dentro de diferentes amostras de uma espécie.

cie. Por exemplo, a germinação de alguns esporos de uma amostra de Lygodium japonicum pode ser induzida por um choque de luz vermelha, enquanto que esporos de outras amostras necessitam de uma longa exposição (SUGAI et al., 1977).

Em sementes fotoblásticas positivas a germinação parece ser determinada pela porcentagem de Fve sobre o nível de fitocromo total, sendo que esta porcentagem varia de espécie para espécie. (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1982). FURUYA (1985) também sugere que a fotoconversão da forma FV para FVE seria sincrônica e gradual em uma amostra de esporos, porém alguns esporos germinariam com baixas porcentagens de FVe e outros somente com altas porcentagens.

BUTLER et al. (1963) demonstraram que a forma FVe do fitocromo é instável e que a destruição desta forma é responsável pela destruição irreversível do fitocromo. Concluíram também que as formas FV e FVe apresentam picos de absorção máxima a 660nm e 730nm respectivamente, porém ambos teriam amplas bandas de absorção. O equilíbrio dinâmico entre as duas formas poderia ser atingido pela irradiação prolongada com um só comprimento de onda. Uma fonte de luz monocromática levaria a um estado fotoestacionário, no qual as proporções de FV e FVe são mantidas constantes. Luz vermelha contínua induziria um estado fotoestacionário no qual a maior parte do fitocromo permaneceria na forma FVe. Os níveis de FVe permaneceriam baixos pela reversão parcial à forma FV e também pela destruição.

Um modelo semelhante poderia explicar o efeito dos tratamentos de luz na germinação de Polypodium latipes. Supondo-se que a conversão do fitocromo da forma FV para FVe é sincrônica e gradual, após três horas de irradiação com luz vermelha um pequeno "pool" de FVe seria formado e seria suficiente para desencadear o processo de germinação em alguns esporos. Após 5 horas o aumento desse "pool" seria capaz de induzir 50% dos esporos viáveis e após 18 horas seria atingido o equilíbrio fotoestacionário. Choques de 5 minutos de luz vermelha, mesmo sendo repetidos a cada 30 minutos durante 5 horas, não seriam suficientes para constituir um "pool" de FVe capaz de desencadear o processo de germinação.

A germinação de alguns esporos sob vermelho-extremo contínuo é outra indicação do possível envolvimento do sistema de fitocromo. O fitocromo irradiado com vermelho-extremo tende a permanecer na forma FV (não ativa). Uma pequena parte pode retornar à forma FVe (ativa) e após um período de tempo manter-se em pequena porcentagem, em equilíbrio dinâmico com a forma FV (SMITH, 1973). Esta pequena quantidade poderia teoricamente induzir a germinação de alguns esporos.

É importante lembrar que todos os modelos de atuação de fitocromo são hipotéticos, e que junto às respostas medidas pela luz existem várias interações metabólicas e limitações experimentais. Por exemplo, as fontes de vermelho e vermelho-extremo utilizadas (ver Material e Métodos) apresentam banda lar-

ga, assim, a germinação sob vermelho-extremo poderia ser causada por vermelho contaminante.

A quantidade de luz necessária para a indução da germinação (isto é, o número de quanta) pode ser alterada pela exposição dos esporos por diferentes períodos de tempo ou então pela alteração da quantidade de radiação oferecida (TOWILL & IKUMA, 1973). A germinação dos esporos de Polypodium latipes foi semelhante em intensidades luminosas de 87 a  $224\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Isto mostra que  $87\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  é uma dose saturante e que o processo pode ser desencadeado em um limiar bastante baixo. Este dado indica que o fator intensidade luminosa possivelmente não foi limitante dos experimentos com diferentes períodos de exposição à luz branca ou vermelha.

Os requisitos de temperatura necessários para que ocorra germinação máxima no menor tempo (temperatura ótima) variam de espécie para espécie. Geralmente ocorre germinação dentro de uma faixa de temperaturas e nos limites desta faixa a germinação é bastante retardada ou mesmo nula. Esporos de Polypodium latipes germinam em temperaturas constantes entre 10 e  $30^{\circ}\text{C}$ , com um ótimo a  $25^{\circ}\text{C}$ , sob luz. A espécie é fotoblástica positiva a  $25^{\circ}\text{C}$ . Embora pouco estudados, esporos de várias espécies germinam entre 10 e  $20^{\circ}\text{C}$  desde que haja luz e bastante umidade (PAGE, 1979). Temperaturas ótimas ao redor de  $25^{\circ}\text{C}$  são bastante comuns para a germinação de esporos de pteridófitas (MILLER, 1968), porém raramente são estudados os locais de ação nos quais

são efetivas (CHEN & IKUMA, 1979). Em sementes vários estudos demonstram o papel da temperatura em reações metabólicas envolvidas na germinação, especialmente na fotorreversibilidade do pigmento fitocromo (KOLLER, 1972; BEWLEY & BLACK, 1982). TOWILL (1978) mostra que esporos fotoblásticos positivos podem germinar na ausência de luz em algumas condições de temperatura, porém esporos de Polypodium latipes somente germinam sob luz, em todas as condições testadas.

Tratamentos com temperaturas alternadas fornecem muito mais informações do que temperaturas constantes: é possível verificar não só o efeito do nível absoluto de temperatura sobre a germinação, mas também o papel da amplitude dentro de cada ciclo diário (variação entre as duas temperaturas do par) e do tempo que cada temperatura atua diariamente (BEWLEY & BLACK, 1982). Neste trabalho, o tempo de adaptação na troca entre as temperaturas do par foi considerado não significativo. FELIPPE (1978), em trabalho feito em condições semelhantes a este, mostra que o tempo requerido para a câmara de germinação adaptar-se à segunda temperatura do par é de 45 minutos no máximo (par 25-5°C).

Os dados de temperatura alternada sob luz para Polypodium latipes mostram que nos tratamentos com amplitude igual a 5°C (pares 25-20 e 25-30°C) ocorreram as menores variações de velocidade e de germinação final, entre os três regimes de alternância. Isto parece ocorrer porque houve

somente uma pequena variação em torno da temperatura ótima constante, 25°C. A alternância com 25°C quebra a inibição da germinação por 5°C (nos três regimes de alternância) e por 30°C (alternâncias 16/8 horas e 8/16 horas diárias). MARCONDES-FERREIRA & FELIPPE (1984) mostram promoção da germinação final em esporos de Cyathea delgadii com pares de temperaturas 5-25 e 10-25°C, germinação normalmente inibida pelas temperaturas constantes de 5 e 10°C. O mecanismo de quebra de dormência por temperaturas alternadas ainda é pouco claro. Para sementes, segundo BEWLEY & BLACK (1982), é possível que as mudanças de temperaturas atuem na ação e preservação do fitocromo; por exemplo, alta temperatura poderia aumentar a atividade de fitocromo vermelho-extremo.

Temperaturas alternadas não supriram a necessidade de luz em esporos de Polypodium latipes, porém é possível que estejam envolvidas no estabelecimento e manutenção da fotosensibilidade. Os dados sugerem que em ciclos com amplitude maior que 5°C uma variação de temperatura a cada 16 horas (tanto nos ciclos 16/8 e 8/16 horas diárias) promove a germinação em relação às alternâncias de 12/12 horas, independente da temperatura absoluta em cada parte do ciclo. KOLLER et al. (1962) reconhecem a existência de flutuações periódicas em plantas, com duração aproximada de 24 horas, e que essas variações estariam ligadas com estímulos externos como fotoperíodo e termoperíodo. Esses estímulos externos têm a função de sincronizar os vários

processos metabólicos que ocorrem simultaneamente (KOLLER, 1972), porém esta ritmicidade ainda não foi demonstrada definitivamente para sementes ou esporos.

Nos pares 25-5, 10-25 e 15-25°C o regime de alternância com 8 horas a 25°C aumentou a velocidade de germinação em relação aos tratamentos com 16 horas a 25°C (a germinação iniciava-se um ou dois dias antes). Como as alternâncias sempre começavam a 25°C, é possível que a mudança brusca de temperatura após 8 horas do primeiro ciclo diário tenha um papel importante nestes pares. Experimentos anteriores mostraram que o término das 8 horas coincide com o meio do período de pré-indução, onde ocorrem vários eventos importantes para o estabelecimento da fotossensibilidade, tais como síntese de proteínas e enzimas (HOWLAND & EDWARDS, 1979).

Etileno inibe a germinação de esporos de variedades de Onoclea sensibilis que germinam no escuro. Uma pequena parte desta inibição pode ser revertida pela luz branca. Experimentos em que foi utilizado dicloro-metil-uréia (DCMU) nessas variedades indicam que a luz age no processo de fotossíntese para reverter a inibição da germinação pelo etileno (EDWARDS & MILLER, 1972; FISCHER & MILLER, 1978; FISCHER & SHROPSHIRE, 1979). Em Polypodium latipes a hipótese mais imediata é que a inibição causada por etileno não tem relação com a fotossíntese. Se houvesse efeito em fotossíntese, a luz reverteria o efeito do CEPA pelo menos nas concentrações menores ( $10^{-5}$  M e

$10^{-4}$  M). Nos tratamentos de escuro, só ocorreu germinação após a remoção do CEPA e transferência para a luz. A relação luz e etileno ainda está para ser esclarecida e melhor compreendida. Com os dados obtidos somente é possível afirmar que CEPA inibe a germinação de P. latipes e essa inibição pode ser revertida parcialmente pela sua remoção do meio.

As giberelinas podem substituir a luz vermelha na germinação de sementes e esporos. Assim, a giberelina adicionada ao meio de cultura induz germinação, no escuro, de esporos fotoblásticos positivos de Anemia phyllitidis (NAF, 1966). Em Polypodium latipes  $GA_3$  não atua na germinação dos esporos: em nenhuma concentração a germinação foi induzida no escuro ou promovida sob luz; isto ocorre também em outras espécies (MILLER, 1968).

Não era esperado que  $GA_3$  induzisse germinação sob luz nos experimentos com Polypodium latipes, pois a dose de luz fornecida já era saturante (luz contínua com intensidade de  $224\mu W.cm^{-2}$ ). WEINBERG & VOELLER (1969) demonstram que concentrações de  $GA$  sub-ótimas podem ter um efeito aditivo na germinação de esporos de Anemia phyllitidis, sob intensidades de luz sub-saturantes.

Esporos de Polypodium latipes apresentam 52% do seu peso seco correspondente a lipídios livres. Essa grande quantidade de lipídios é comum em esporos de pteridófitas. Esporos de Anemia phyllitidis contêm 56% de lipídios (GEM

MRICH, 1977). Nessa espécie os lipídios começam a ser metabolizados após a embebição dos esporos. Aproximadamente 12 dias depois começa a síntese de novos lipídios e a mobilização dos lipídios de reserva. Grandes quantidades de lipídios são também encontradas em esporos de Trichipteris corcovadensis (50%), Adiantum capillus-veneris (47%), Cyathea delgadii (42%), Pteris vittata (42%), Dryopteris filix-max (40%), Onoclea sensibilis (27%) e Matteucia struthiopteris (27%) (GEMMRICH, 1980; MINAMI-KAWA et al., 1984; DEMAGGIO & STETLER, 1985; ESTEVES et al., 1985; RANDI, 1987; RANDI & FELIPPE, 1988d).

Proteínas solúveis representam 6,1% do peso seco dos esporos de Polypodium latipes. Frequentemente proteínas solúveis atuam como material de reserva. DEMAGGIO & STETLER (1985) demonstram que após o início da germinação de esporos de Dryopteris filix-max, Onoclea sensibilis e Matteucia struthiopteris houve uma redução de 80% das proteínas de reserva, inicialmente correspondentes a 5%, 14% e 15% do peso seco dos esporos, respectivamente.

Os açúcares solúveis totais constituem 6,2% do peso seco dos esporos de Polypodium latipes. MINAMIKAWA et al. (1984) propõe que os açúcares solúveis atuam como fonte de carbono durante a embebição dos esporos Adiantum capillus-veneris. A metabolização desses açúcares é uma fonte de energia importante enquanto as vias de degradação de lipídios ainda não estão ativadas. RANDI (1987) também sugere que açúcares so-

lúveis poderiam atuar como fonte de carbono e de energia durante os primeiros dias da germinação de Cyathea delgadii.

É interessante mencionar aqui que Polypodium latipes, uma espécie dos cerrados, apresenta muito mais, na verdade, cinco vezes mais proteína solúvel e carboidratos solúveis nos esporos que duas espécies da Mata Atlântica (úmida) - Trichipteris corcovadensis e Cyathea delgadii (ESTEVES, 1984; RANDI, 1987; FELIPPE et al., 1988). Essas diferenças não ocorrem em relação aos lipídios livres. Se há uma importância ecológica nesses resultados, somente o estudo em um maior número de espécies poderá confirmar.

## 2.2. Substâncias fenólicas nos folíolos

Os estudos realizados com folíolos de Polypodium latipes mostraram uma grande quantidade de compostos de natureza fenólica, especialmente cumarina. Cumarina é conhecida como inibidor da germinação de sementes desde o início do século (MAYER & EVENARI, 1952). A demonstração clássica do efeito inibitório da cumarina é a indução da dormência em sementes de alface sensíveis à luz (BERRIE et al., 1968). O único trabalho citado em literatura sobre o efeito de aplicações de cumarina em esporos é o de SOSSOUNTZOV (1961; HOWLAND &

EDWARDS, 1979). Neste trabalho mostra-se que esporos de Gymnogramme calomelanos têm a germinação inibida por cumarina e a reversibilidade deste efeito pode ser mediada por etileno.

Esporos de Polypodium latipes têm a germinação inibida pela aplicação de cumarina. Foi demonstrada também a inibição parcial da germinação pela cumarina extraída e purificada do próprio esporófito. Os cálculos realizados com dados da dosagem espectrofotométrica e do espectro de absorção mostram que aproximadamente  $2 \times 10^{-4}$  M de cumarina produzida pelos folíolos do esporófito são suficientes para provocar a inibição parcial da germinação dos esporos. Esse resultado é bastante próximo do obtido com cumarina exógena, não proveniente do esporófito.

Presume-se que a vantagem das espécies de pteridófitas que produzem inibidores da germinação é prevenir a sobrecarga do habitat pela redução ou completa eliminação do estabelecimento de jovens esporófitos nas proximidades dos já existentes. Polypodium latipes é uma espécie frequentemente encontrada em grandes agrupamentos, ou ilhas. Algumas dessas ilhas foram visitadas periodicamente por um longo período de tempo, observando-se que a frequência de outras espécies entre exemplares de Polypodium latipes é muito pequena.

SCHWABE (1951) e CONWAY (1957) observaram que nenhum protalo se desenvolvia próximo de esporófitos maduros de Pteridium aquilinum (uma espécie rica em substâncias

fenólicas) plantados em caixas. Os protalos apareciam quando os esporófitos eram retirados. Em caixas em que haviam exemplares de Pteridium vigorosos e saudáveis raramente se observavam protalos, enquanto que caixas com exemplares não saudáveis eram invadidas pelos protalos. Neste caso estabeleciam-se novos esporófitos em grande número, inclusive de outras espécies. Posteriormente, GLIESSMAN (1976) mostrou que ácidos fenólicos simples podem ser um importante inibidor de espécies de plantas associadas em um amplo espectro de habitats nos quais Pteridium é dominante.

Em Polypodium latipes observou-se que novos esporófitos aparecem com mais frequência em outubro, por rebrotamento dos rizomas. Pelos dados obtidos nos experimentos de laboratórios pode-se supor que os ácidos fenólicos acumulados no solo atuam na inibição da germinação dos esporos. Provavelmente a germinação dos esporos não tem uma função importante na manutenção de uma população já estabelecida, mas atue na dispersão da espécie. Assim, podem ser encontrados exemplares isolados crescendo sobre troncos de árvores, supostamente a partir da germinação de esporos dispersos.

Além de serem importantes inibidores alelopáticos da germinação de sementes de várias espécies, ácidos fenólicos atuam como fungicidas pós-infeccionais e inseticidas. Alguns exemplos são relatados por PAGE (1979). Infelizmente somente Pteridium aquilinum tem sido estudada nesse aspecto,

com um enfoque bioquímico. Esta espécie apresenta vários mecanismos químicos de defesa, entre os quais se inclui a produção de compostos fenólicos, que provocam afastamento ou inibição do crescimento e desenvolvimento de insetos (TAKEMOTO et al., 1968; COOPER-DRIVER, 1976). Durante os trabalhos de coleta observou-se que um número pequeno de exemplares de Polypodium latipes apresentavam sinais de predação por insetos, fato que poderia estar relacionado com a grande quantidade de compostos fenólicos presente nas folhas.

## RESUMO

Foram estudadas a morfologia e a germinação sob luz e escuro a 25°C de nove espécies de pteridófitas. Todas são encontradas no cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçu (SP). As espécies são as seguintes: Adiantum serratodentatum, Anemia flexuosa, Anemia raddiana, Doryopteris concolor, Polypodium hirsutissimum, Polypodium latipes, Polypodium pleopeltifolium, Polypodium polypodioides e Polypodium squamulosum. Polypodium latipes foi a espécie estudada mais profundamente, por ser a mais frequente nos cerrados do Estado de São Paulo, como também pela facilidade de obtenção do material.

Para o estudo morfológico os esporos foram medidos e fotografados sob microscópio óptico e eletrônico, após serem acetolisados e eventualmente tratados com carbonato de sódio. A análise permitiu a caracterização das espécies e a criação de uma chave de identificação para as mesmas.

A germinação dos esporos foi realizada em meio de cultura líquido, em câmara de crescimento com luz e temperatura controladas. As curvas de germinação mostraram que as espécies são fotoblásticas positivas a 25°C. Das espécies estudadas, apenas Polypodium pleopeltifolium e P. polypodioides apresentam alguma germinação no escuro, sempre in

ferior à ocorrência sob luz.

Em Polypodium latipes o tempo de pré-indução requerido para o estabelecimento da fotossensibilidade é de 15 horas. Esporos pré-embebidos são induzidos para a germinação máxima após 15 horas de exposição à luz branca ou 18 horas ao vermelho. Cinco horas de luz branca ou vermelha são suficientes para causar 50% da germinação máxima. Choques de luz vermelha não atuam, mesmo quando repetidos a cada 30 minutos durante 5 horas.

A indução da germinação de esporos de P. latipes pela luz vermelha pode ser revertida por vermelho-extremo. Um número pequeno de esporos pode germinar sob vermelho-extremo constante.

Esporos de P. latipes germinam em temperaturas constantes entre 10 e 30°C, com um ótimo a 25°C, sob luz. Foram testados pares de temperaturas alternando-se em ciclos diários de 8/16, 12/12 e 16/8 horas, sob luz. Nos pares com amplitude de temperatura igual a 5°C (25-20 e 25-30°C) ocorreram as menores variações de velocidades e de germinação final, entre os três regimes de alternância. Os dados sugerem que em ciclos com amplitude maior que 5°C uma variação de temperatura a cada 16 horas promove a germinação em relação às alternâncias de 12/12 horas, independente da temperatura absoluta em cada fase do ciclo. É possível ainda que uma mudança brusca de temperatura após 8 horas do primeiro ciclo diário

rio tenha um papel importante na velocidade de germinação. Nenhum tratamento de temperatura induziu a germinação de esporos no escuro.

CEPA inibiu a germinação de P. latipes. Essa inibição pode ser revertida pela remoção do CEPA e exposição à luz.  $GA_3$  nas concentrações utilizadas não afetou a germinação desta espécie.

As dosagens de substâncias de reserva dos esporos de P. latipes indicaram que lipídios livres, proteínas solúveis e açúcares solúveis totais correspondem, respectivamente, a 52%, 6,1% e 6,2% do peso dos esporos.

O estudo dos inibidores fenólicos em folíolos de P. latipes através de bioensaios, cromatografia em camada delgada e identificação pelo espectro de absorção no ultra-violeta, demonstrou a presença de uma grande quantidade de cumarina. Cumarina inibiu a germinação dos esporos de P. latipes.

## LITERATURA CITADA

- AGNEW, N.; McCABE, A. & SMITH, D.L. 1984. Photocontrol of spore germination in Polypodium vulgare L. New Phytol. 96: 167-178.
- A.O.A.C. 1955. Official and tentative methods of analysis. Ass. Off. Agric. Chem. 8<sup>th</sup> Ed., Washington, p. 144.
- BAKER, J.G. 1870. Cyatheaceae et Polypodiaceae. In Martius, C.F.P. de & Eichler, A.G., ed. Flora Brasiliensis. Monachii. Lipsiae Apud Frid. Fleischer in Comm. vol. I. parte II: 306-624.
- BERRIE, A.M.M.; PARKER, W.; KNIGHTS, B.A. & HENDRIE, M.R. 1968. Studies on lettuce seed germination. 1. Coumarin induced dormancy. Phytochemistry 7:567-573.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. 1982. Physiology and Biochemistry of Seeds (Vol. II). Springer-Verlag, Berlin, 375p.
- BIELESKI, R.L. & TURNER, N.A. 1966. Separation and estimation of aminoacids in crude plant extracts by thin-layer eletrophoresis and chromatography. Anal. Biochem. 17: 278-293.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

- BUTLER, W.L., LANE, H.C. & SIEGELMAN, H.W. 1963. Nonphotochemical transformation of phytochrome in vivo. Plant Physiol. **38**: 514-519.
- CHEN, C.Y. & IKUMA, H. 1979. Photocontrol of the germination of Onoclea spores. V. Analysis of germination processes by means of temperature. Plant. Physiol. **63**: 704-708.
- CONWAY, E. 1949. The autoecology of bracken (Pteridium aquilinum (L.) Kuhn): the germination of the spore and the development of the prothallus and the young sporophyte. Proc. R. Soc. Edinburgh **63**:325-342.
- CONWAY, E. 1957. Spore production in bracken. J. Ecol. **45**: 273-284.
- COOPER-DRIVER, G. 1976. Chemotaxonomy and phytochemical ecology of bracken. Bot. J. Linn. Soc. **73**: 35-46.
- DEMAGGIO, A.E. & STETLER, P.A. 1985. Mobilization of storage reserves during fern spore germination. Proc. R. Soc. Edinb. **86B**: 195-202.
- DYER, A.F. 1979. The culture of fern gametophytes for experimental investigation. In The experimental biology of ferns. London, Academic Press, p. 253-305.
- EDWARDS, M.E. & MILLER, J.H. 1972. Growth regulation by ethylene in fern gametophytes. III. Inhibition of spore germination. Am. J. Bot. **59**: 458-465.

- EITEN, G. 1961. Habitat flora of Fazenda Campininha, São Paulo, Brazil. In Simpósio sobre o cerrado. Editora da Universidade de São Paulo, p. 156-202.
- ERDTMAN, G. 1943. An introduction to pollen analysis. Waltham, Chronica Botanica Company, 239p.
- ERDTMAN, G. 1952. Pollen morphology and plant taxonomy. Angiosperms, Stockholm, Almqvist & Wiksell, 539p.
- ERDTMAN, G. 1960. The acetolysis method. A revised description. Svensk. Bot. Tidskr. 54: 561-564.
- ERDTMAN, G. 1969. Handbook of palynology (Morphology-Taxonomy - Ecology). An introduction to the study of pollen grains and spores. Copenhagen, Munksgaard, 486p.
- ERDTMAN, G. 1971. Pollen and spore morphology /plant taxonomy. Stockholm. Almqvist & Wiksell, 302p.
- ESTEVES, L.M. 1984. Morfologia e germinação de esporos de Trichipteris corcovadensis. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 92p.
- ESTEVES, L.M., FELIPPE, G.M. & MELHEM, T.S. 1985. Germination and morphology of spores of Trichipteris corcovadensis. Am. Fern J. 75: 92-102.
- FELIPPE, G.M. 1978. Effects of temperature on germination of Rumex obtusifolius. Revta. do Museu Paulista 25: 173-181.

- FELIPPE, G.M. & SILVA, J.C.S. 1984. Estudos de germinação em espécies do cerrado. Revta brasil. Bot. 7: 157-163.
- FELIPPE, G.M., ESTEVES, L.M. & RANDI, A.M. 1988. Lipídios, proteínas e carboidratos em esporos de Cyathea delgadii, Polypodium latipes e Trichipteris corcovadensis. Resumos 7º Congr. SBSP: 37-38.
- FERRI, M.G. 1963. Histórico dos trabalhos botânicos sobre o cerrado. In Simpósio Sobre o Cerrado. Editora da Universidade de São Paulo, S. Paulo, pp. 15-50.
- FISHER, R.A. & YATES, F. 1971. Tabelas estatísticas para a pesquisa em Biologia, Medicina e Agricultura, São Paulo. Ed. Polígono e EDUSP, 150p.
- 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.
- FISHER, R.W. & SHROPSHIRE, W., Jr. 1979. Reversal by light of ethylene-induced inhibition of spore germination in the sensitive fern Onoclea sensibilis. An action spectrum. Plant. Physiol. 63: 984-988.
- FURUYA, M. 1985. Photocontrol of spore germination and elementary processes of development in fern gametophytes. Proc. R. Soc. Edinb. 86B: 13-9.
- GEMMICH, A.R. 1977. Mobilization of reserve lipids in germinating spores of the fern Anemia phyllitidis L. Plant Sci. Lett. 9:301-307.

- GEMMRICH, A.R. 1980. Developmental changes in microbody enzyme activities in germinating spores of the fern Pteris vittata Z. Pflanzenphysiol., 97:153-160.
- GEMMRICH, A.R. 1982. Effect of red light and gibberellic acid on lipid metabolism in germinating spores of the fern Anemia phyllitidis. Physiol. Plant. 54: 58-62.
- GLIESSMAN, S.P. 1976. Allelopathy in a broad spectrum of environments as illustrated by bracken. Bot. J. Linn. Soc. 73: 95-105.
- GOODWIN, R.H. & POLLOCK, B.M. 1954. Studies on roots. I. Properties and distribution of fluorescent constituents in Avena roots. Amer. Jour. Bot. 41(6):516-520.
- HARBORNE, J.B. 1974. Phenolic compounds. In Phytochemical methods. London, Chapman & Hall, p. 33-52.
- HOWLAND, G.P. & EDWARDS, M.E. 1979. Photomorphogenesis in fern gametophytes. In The Experimental Biology of Ferns. Academic Press, London, p. 393-434.
- HUCKABY, C.S. & RAGHAVAN, V. 1981. Photocontrol of spore germination in the fern Thelypteris kunthii. Physiol. Plant. 51: 19-22.
- JARVIS, S.J. & WILKINS, M.B. 1973. Photoresponses of Matteuccia struthiopteris (L.) Todaro. J. Exp. Bot. 24: 1149-1157.

- KOLLER, D. 1972. Environmental control of seed germination. In Seed Biology Vol. III. Academic Press, London, p.2-101.
- KOLLER, D., MAYER, A.M., POLJAKOFF-MAYBER, A. & KLEIN, S. 1962. Seed germination. Ann. Rev. Plant. Physiol. 13: 437-464.
- LUGARDON, B. 1963. Les spores des pteridacées de France. Pollen et spores 5: 325-336.
- LUGARDON, B. 1974. La structure fine de l'exospore et de la périspore des filicinées isosporées. II. Filicales. Commentaires. Pollen et spores 16: 161-226.
- LUGARDON, B. 1976. Sur la structure fine de l'exospore dans les divers groupes de Ptéridophytes actuelles (microspores et isospores). In The evolutionary significance of the exine. London Academic Press, p. 231-244.
- MCCREADY, R.M. GUGGOLZ, J., VERNON SILVIERA & OWENS, H.S. 1950. Determination of starch and amylose in vegetables. Anal. Chem., 22: 1156-1158.
- MANTOVANI, W. 1983. Composição e similaridade florística, fenologia e espectro biológico do cerrado da reserva biológica de Moji-Guaçu, Estado de São Paulo. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 147p.
- MARCONDES-FERREIRA, W. 1983. Efeito de luz e temperatura na germinação de esporos de Cyathea delgadii Sternb. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 63p.

- MARCONDES-FERREIRA, W. & FELIPPE, G.M. 1984. Effects of light and temperature on the germination of spores of Cyathea delgadii. Revta. Bras. Bot. 7: 53-56.
- MAYER, A.M. & EVENARI, M. 1952. The relation between the extraction of coumarin and its derivatives, and their activity as germination inhibitors. J. Exp. Bot. 3: 246-252.
- MAYER, A.M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. 1982. Factors affecting germination. In The germination of seeds. Oxford, Pergamon, p. 22-49.
- MELHEM, T.S. & MATOS, M.E.R. 1972. Variabilidade de forma nos grãos de pólen de Eriope crassipes Benth. - Labiatae. Hoehnea 2: 1-10.
- MILLER, J.H. 1968. Fern gametophytes as experimental material. Bot. Rev. 34: 361-440.
- MINAMIKAWA, T., KOSHIBA, T. & WADA, M. 1984. Compositional changes in germinating spores of Adiantum capillus-veneris L. Bot. Mag. 97: 313-22.
- MOHR, H. 1956. Die Abhängigkeit des Protonemawachstums und der Protonemapolarität bei Farnen vom Licht. Planta 47: 127-158.
- MORBELLI, M.A. 1974. Analisis palinológico en híbridos interespecíficos del género Blechnum L., subgénero Blechnum. Bol. Soc. Argentina Bot. 15: 446-466.

- RANDI, A.M. & FELIPPE, G.M. 1988a. Efeito do armazenamento de esporos, da aplicação de DCMU e da pré-embebição em PEG na germinação de Cyathea delgadii. Ciência & Cultura 40: 484-489.
- RANDI, A.M. & FELIPPE, G.M. 1988b. Effect of red light and far red on the germination of spores of Cyathea delgadii. Revta brasil. Bot. 11: no prelo.
- RANDI, A.M. & FELIPPE, G.M. 1988c. Germinação de esporos de Cyathea delgadii sob luz azul e aplicações longas de vermelho. Revta brasil Biol. 48: no prelo.
- RANDI, A.M. & FELIPPE, G.M. 1988d. Lipid content during germination of spores of the fern Cyathea delgadii. Revta brasil Bot. 11: no prelo.
- REINOLDS, T.L. & RAGHAVAN, V. 1982. Photo induction of spore germination in a fern, Mohria caffrorum. Ann. Bot. 49: 141-147.
- SALGADO-LABOURIAU, M.L., VANZOLINI, P.E. & MELHEM, T.S. 1965. Variation of polar axes and equatorial diameters in pollen grains of two species of Cassia. Grana Palynologica 6: 166-176.
- SCHRAUDOLF, H. 1967. Steuerung der Antheridienbildung in Polypodium crassifolium L. Planta 76: 37-46.

- NAF, U. 1966. On dark-germination and antheridium formation in Anemia phyllitidis. Physiologia Pl. 19: 1079-1088.
- PAGE, C.N. 1979 . The diversity of ferns. An ecological perspective. In The Experimental Biology of Ferns. Academic Press, London, p. 551-589.
- RAGHAVAN, V. 1971. Phytochrome control of germination of the spores of Asplenium nidus .Plant. Physiol. 48: 100-102.
- RAGHAVAN, V. 1973. Blue light interference in the phytochrome controlled germination of the spores of Cheilanthes farinosa. Plant. Physiol. 51: 306-311.
- RAGHAVAN, V. 1980. Cytology, physiology, and biochemistry of fern spores. Int. Rev. Cytology 62: 69-118.
- RANAL, M.A. 1983. Efeito da temperatura e da intensidade luminosa no desenvolvimento de gametófitos de pteridófitas. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Rio Claro, Tese de Mestrado, 234p.
- RANDI, A.M. 1980 - Germinação de Stevia rebaudiana Bert. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 88p.
- RANDI, A.M. 1987. Aspectos fotomorfogênicos, bioquímicos e citotóxicos durante a germinação de esporos de Cyathea delgadoi Sternb. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 192p.

- SUSSMAN, A.S. 1965. Physiology of dormancy and germination in the propagules of Cryptogamic plants. In Encyclopedia of Plant Physiology 15, Part II, Springer-Verlag, Berlin, p. 933-1025.
- SWAIN, T. & HILLIS, W.E. 1959. The phenolic constituents of Prunus domestica. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. J. Sci. Food Agric. 10: 63-68.
- TAKEMOTO, T., ARIHARA, S., HIKONO, H. 1968. Isolation of insect moulting substances for Pteridium aquilinum var. latiusculum. Chem. Pharm. Bull. 16: 762.
- TOMIZAWA, K., MANABE, K. & SUGAI, M. 1982. Changes in phytochrome content during inhibition in spores of the fern Lygodium japonicum. Plant Cell Physiol. 23: 1305-1308.
- TOWILL, L.R. 1978. Temperature and photocontrol of Onoclea spore germination. Plant Physiol. 62: 116-119.
- TOWILL, L.R. & IKUMA, H. 1973. Photocontrol of the germination of Onoclea spores. I. Action spectrum. Plant Physiol. 51: 973-978.
- TOWILL, L.R. & IKUMA, H. 1975. Photocontrol of the germination of Onoclea spores. II. Analysis of germination processes by means of anerobiosis. Plant Physiol. 55: 150-154.
- TRYON, R.M. 1972. Endemic areas and geographic speciation in tropical American ferns. Biotropica 4: 121-131.

- SCHAWABE, W.W. 1951. Physiological studies on plant nutrition. XVI. Mineral nutrition of bracken. Ann. Bot. 15: 417-446.
- SNEDECOR, G.N. 1962. Statistical Methods. Iowa, Iowa State Univ., 534p.
- SOMAROO, B.H., THAKUR, M.L. & GRANT, W.F. 1973. A useful spray reagent to differentiate common phenolic compounds on thin-layer plates and paper chromatograms. J. Chromatography 87: 290-293.
- SOTA, E.R. de La. 1960. Polypodiaceae y Grammitidaceae argentinas. Opera Lilloana 5: 1-229.
- SUGAI, M. 1971. Photomorphogenesis in Pteris vittata. IV. Action spectra for inhibition of phytochrome-dependent spore germination. Plant Cell Physiol. 12: 103-109.
- SUGAI, M. & FURUYA, M. 1967. Photomorphogenesis in Pteris vittata. Phytochrome-mediated spore germination and blue light interaction. Plant Cell Physiol. 8: 737-748.
- SUGAI, M. & FURUYA, M. 1977. Diverse responses of spores in light-dependent germination of Lygodium japonicum. Pl. Sci. Lett 8: 333-338.
- SUGAI, M., TAKENO, K. & FURUYA, M. 1977. Diverse responses of spores in the light-dependent germination of Lygodium japonicum. Plant Sci. Lett. 8: 333-338.

- TRYON, R.M. 1986. The biogeography of species, with special reference to ferns. Bot. Rev. 52: 117-156.
- TRYON, R.M. & CONANT, D.S. 1975. The ferns of Brazilian Amazonia. Acta Amazonica 5: 23-34.
- UMBREIT, W.W., BURRIS, R.H. & STAUFFER, J.F. 1964. Manometric Techniques. Burges Publishing Company, Minneapolis, 305p.
- VUONO, Y.S., DE BARBOSA, L.M. & BATISTA, E.A. 1982. A reserva Biológica de Moji-Guaçu. Silvic. S. Paulo, 16:548-580.
- WEINBERG, E.S. & VOELLER, B.R. 1969. External factors inducing germination of fern spores. Am. Fern J. 59: 153-167.