

Este trabalho contém a redigida
final da tese defendida pelo Sr. Luciano
Maurício Esteves, e aprovada pelo

LUCIANO MAURICIO ESTEVES

comissão julgadora

Campinas, 20 de fevereiro de 1984

1984

Resolução CCPG/036/83 de 29/XI/83

MORFOLOGIA E GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE
Trichipteris corcovadensis.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientador: Dr. G.M. Felipe

Campinas

1984

Es85m

5373/BC

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. G.M.Felippe pela sua orientação e incentivo dados durante todo este trabalho, influenciando positivamente a minha iniciação científica.

À Dra. Therezinha Sant'Anna Melhem pela sua orientação no estudo palinológico dos esporos e por todos os auxílios prestados no decorrer do trabalho.

À Rita Helena Buso Jacon pelo seu auxílio de valor inestimável durante o trabalho de microscopia eletrônica.

À Dra. Vera Maxemiuc Naccache pela orientação dada na extração de lipídios.

À Dra. Neusa Diniz da Cruz, pelo aconselhamento e atenção dados durante o decorrer do trabalho.

A todas as pessoas da Universidade Estadual de Campinas e do Instituto de Botânica de São Paulo que de algum modo contribuíram neste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

	Página
INTRODUÇÃO	1
Comentários gerais.....	1
Germinação de esporos: luz e temperatura.....	4
Morfologia de esporos.....	10
Objetivos.....	11
MATERIAL E MÉTODOS	13
Material.....	13
Métodos.....	14
Viabilidade dos esporos.....	14
Consumo de oxigênio.....	14
Germinação.....	15
1) Temperatura.....	17
2) Reguladores de crescimento.....	17
3) Intensidade luminosa.....	18
4) Fotoperíodo.....	18
5) Vermelho, vermelho-extremo, azul e verde	18
6) pH do meio de cultura.....	19
Dosagem de lipídios.....	19
Dosagem de proteínas solúveis.....	20
Morfologia dos esporos.....	21
1) Microscopia óptica.....	21
a. acetólise.....	22
b. Técnica do carbonato de sódio.....	23

	Página
c. Método de Wodehouse.....	23
d. Medidas.....	24
e. Fotomicrografias.....	26
2) Microscopia eletrônica de varredura.....	28
Apresentação de dados e análise estatística.....	28
RESULTADOS.....	30
Viabilidade dos esporos.....	30
Consumo de oxigênio.....	30
Germinação.....	30
Curva de germinação.....	32
Efeito de temperatura.....	32
1) Temperaturas constantes.....	32
2) Temperaturas alternadas.....	36
Efeito de reguladores de crescimento.....	36
1) Ácido indolil-3-acético (AIA).....	36
2) Ácido giberélico (GA ₃).....	39
3) 6-benziladenina (6-BA).....	39
4) Ácido 2-cloro-etilfosfônico (CEPA).....	39
Efeito de luz branca.....	39
1) Intensidade luminosa.....	43
2) Fotoperíodo.....	43
Efeito de vermelho, vermelho-extremo, azul e verde.....	43
Períodos diferentes de armazenamento.....	43
1) Exemplar 11066-A.....	47
2) Exemplar 11066-B.....	47
pH do meio de cultura.....	47
Dosagem de lipídios.....	49

	Página
Dosagem de proteínas solúveis.....	49
Morfologia dos esporos.....	53
Forma.....	53
Trilete.....	60
Superfície.....	60
DISCUSSÃO.....	67
RESUMO.....	79
BIBLIOGRAFIA.....	82

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Porcentagem de viabilidade, determinada pelo carmin-acético em esporos (com a parede quebrada de cinco exemplares de <i>T. corcovadensis</i>	31
Tabela 2. Germinação de esporos recém coletados de cinco exemplares diferentes de <i>T. corcovadensis</i> em luz branca e escuro constantes a 25°C.....	33
Tabela 3. Efeito de temperaturas constantes na germinação de esporos do exemplar de 11066-B de <i>T. corcovadensis</i> , mantidos sob luz fluorescente branca constante.....	35
Tabela 4. Efeito de pares de temperaturas alternadas na germinação de esporos do exemplar 11066-B de <i>T. corcovadensis</i> , mantidos sob luz fluorescente branca constante.....	37
Tabela 5. Efeito de ácido indolil-3-acético (AIA) na germinação de esporos do exemplar 11066-B de <i>T. corcovadensis</i> , mantidos sob luz fluorescente branca constante.....	38
Tabela 6. Efeito de ácido giberélico (GA ₃) na germinação de esporos do exemplar 11066-B de <i>T. corcovadensis</i> , mantidos sob luz fluorescente branca constante.....	40

Tabela 7.	Efeito de 6-benziladenina (6-BA) na germinação de esporos do exemplar 11066-B de <i>T. corcovadensis</i> , mantidos sob luz fluorescente branca constante.....	41
Tabela 8.	Efeito de ácido 2-cloro-etilfosfônico (CEPA) na germinação de esporos do exemplar 11066-B de <i>T. corcovadensis</i> , mantidos sob luz fluorescente branca constante.....	42
Tabela 9.	Efeito da intensidade luminosa na germinação de esporos do exemplar 11066-B de <i>T. corcovadensis</i> ,.....	44
Tabela 10.	Efeito de fotoperíodo na germinação de esporos do exemplar de 11066-B de <i>T. corcovadensis</i>	45
Tabela 11.	Efeito de vermelho, vermelho-extremo, azul e verde constantes na germinação de esporos do exemplar 11066-B de <i>T. corcovadensis</i>	46
Tabela 12.	Germinação de esporos do exemplar 11066-B de <i>T. corcovadensis</i> , armazenados a 4°C por períodos diferentes de tempo.....	48
Tabela 13.	Efeito de variação de pH na germinação de esporos do exemplar 11066-B de <i>T. corcovadensis</i>	50
Tabela 14.	Dosagem de lipídio em esporos de <i>T. corcovadensis</i>	51

Tabela 15.	Dosagem de lipídio em esporos embebidos de <i>T. corcovadensis</i>	52
Tabela 16.	Dosagem de proteína solúvel em esporos armazenados a 4°C e não embebidos de <i>T. corcovadensis</i> ...	54
Tabela 17.	Variação de formas (%) encontradas em esporos de cinco exemplares de <i>T. corcovadensis</i>	59
Tabela 18.	Diâmetro equatorial de esporos de cinco exemplares de <i>T. corcovadensis</i>	62
Tabela 19.	Medidas do comprimento e da margem do Trilete em esporos de cinco exemplares de <i>T. corcovadensis</i>	63
Tabela 20.	Aspecto predominante da superfície em esporos de cinco exemplares de <i>T. corcovadensis</i>	64
Tabela 21.	Porcentagem de esporos com perina em cinco exemplares de <i>T. corcovadensis</i>	66

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figuras 1-3. Variações na forma de esporos de <i>T. corcovadensis</i> , microscopia eletrônica de varredura.....	25
Figura 4. Representação esquemática do esporo de <i>T. corcovadensis</i> em vista polar, mostrando como foram tomadas as medidas.....	27
Figura 5. Curva de germinação dos esporos de <i>T. corcovadensis</i> , exemplar 11066-B, sob luz branca constante.....	34
Figuras 6-8. Superfície do esporo de <i>T. corcovadensis</i> , exemplar 11066-A, ao microscópio óptico e de varredura.....	55
Figuras 9-12. Superfície do esporo de <i>T. corcovadensis</i> , exemplar 11066-B, ao microscópio óptico e de varredura.....	56
Figuras 13-14. Superfície do esporo de <i>T. corcovadensis</i> , exemplar 11066-C, microscopia de varredura.....	57
Figura 15. Superfície do esporo de <i>T. corcovadensis</i> , exemplar 11066-D, microscopia de varredura.....	58

Figura 16.	Superfície do esporo de <i>T. corcovadensis</i> , exemplar 11066-E, microscopia de varredura	58
Figura 17.	Esporos do exemplar 11066-C, tratados pelo método de Wodehouse, mostrando conteúdo ce- lular.....	61
Figura 18.	Aspecto da perina ao microscópio óptico, após tratamento com carbonato de sódio, em esporo do exemplar 11066-B.....	61

INTRODUÇÃO

Comentários gerais

Atualmente são conhecidas por volta de 12000 espécies de pteridófitas, distribuídas em aproximadamente, 400 gêneros (CRABBE et al., 1975). Estas espécies ocorrem nos mais variados habitats, apresentando uma grande variedade de formas e tamanhos, tanto do esporofito como do gametofito (PAGE, 1979). Apesar de grande diversidade de espécies, é relativamente recente o conhecimento do ciclo de vida completo das pteridófitas.

A maior parte dos estudos feitos com pteridófitas são sobre o esporofito adulto. Isto acontece porque o esporofito é a fase mais evidente e duradoura do ciclo de vida, embora existam exceções. Em *Actinostachys* sp o esporofito é diminuto e o gametofito é grande e dominante no ciclo (BIERHORST, 1970). O primeiro trabalho mostrando o ciclo de vida completo das pteridófitas, desde a germinação dos esporos até a formação do esporofito, foi publicado somente em 1827, por Kaulfuss, embora desde o século XVI os esporos já houvessem sido reconhecidos como estruturas reprodutivas (NAYAR e KAUR, 1971; RANAL, 1983).

Os esporos de pteridófitas são estruturas unicelulares, resultantes da divisão meiótica das células-mãe dos esporângios, presentes na face abaxial das frondes. Se um esporo maduro encontra condições adequadas de luz, temperatura e umidade, ocorrerá ger

minação e por meio de várias divisões mitóticas é formado um gametofito haplóide. Os eventos entre a germinação do esporo e a diferenciação do jovem gametofito variam de espécie para espécie, mas geralmente quando a germinação se completa, o gametofito compreende três células que diferem em função, estrutura e crescimento potencial, originadas de duas divisões celulares. A primeira divisão dá origem à célula basal do protonema e à célula rizoidal primária. A célula basal divide-se novamente, produzindo a primeira célula protonemal. Posteriormente a célula protonemal sofre várias divisões para formar os filamentos do protonema, e a célula rizoidal primária alonga-se e divide-se para formar os rizóides secundários (GANT e ARNOTT, 1965; MILLER e GREANY, 1974; DYER e CRAN, 1976).

O gametófito desenvolvido é fixo ao substrato pelos rizóides e pode ser autotrófico ou heterotrófico (RANAL, 1983). Nesta fase são formados os anterídios e os arquegônios (ou ambos), que posteriormente irão produzir respectivamente os anterozóides e as oóferas; estes são os gametas "masculinos" e "femininos". Nos casos em que os anterozóides são móveis, como em *Lygodium* e *Marsilea*, estes movimentam-se em direção à oófera por movimentos flagelares que consistem de uma sequência de ondas helicoidais propagadas da base até o final do flagelo (BILDERBACK et al., 1974). A geração esporofítica tem início quando ocorre a união do anterozóide com a oófera, formando um zigoto diplóide (BELL, 1979).

Em relação aos aspectos reprodutivos e genéticos, as pteridófitas podem ser divididas em dois grupos, as homosporadas e as heterosporadas. As pteridófitas heterosporadas formam um pequeno grupo de oito gêneros, distribuídos em cinco famílias: Selaginellaceae, Isoetaceae, Marsileaceae, Salviniaceae e Azollaceae (KLEKOWSKI e BAKER, 1966; KLEKOWSKI, 1979). Nas pteridófitas homosporadas os esporângios produzem somente um tipo de esporo que dará

origem a gametofitos hermafroditas, com anterídios e arquegônios presentes no mesmo gametofito. Nas pteridófitas heterosporadas esporângios diferentes produzem dois tipos de esporos. Os megasporângios produzem megásporos, que vão desenvolver-se em gametofitos femininos com arquegônios, enquanto que os microesporângios produzem micrósporos, que darão origem a gametofitos masculinos com anterídios. O ciclo de vida das pteridófitas heterosporadas é, geneticamente, muito semelhante ao ciclo de vida das plantas com sementes (KLEKOWSKI, 1972, 1979).

Várias alterações podem ocorrer no ciclo de vida das pteridofitas. Aposporia ocorre quando o gametofito é produzido vegetativamente pelo esporofito, sem a produção de esporos; nestes casos o gametofito geralmente é funcional, porém é morfologicamente diferente dos produzidos no ciclo normal (MILLER, 1968 ; BELL, 1979; WALKER, 1979; SHEFFIELD e BELL, 1981). A apogamia é o processo pelo qual um esporofito é produzido vegetativamente a partir de um gametofito, sem que ocorra fertilização e formação de um zigoto. Apogamia ocorre somente eventualmente, porém em algumas espécies que produzem esporos diplóides durante uma esporogênese modificada a apogamia é um meio de manter o mesmo número de cromossomos na geração esporofítica e gametofítica, através de vários ciclos de vida. Nestes casos, o processo recebe o nome de apomixia ou agamosporia (WHITTIER, 1964, 1965, 1966, 1970; EVANS, 1964; MANTON, 1950; WHITTIER e PRATT, 1971; BELL, 1979; WALKER, 1979). Uma outra variação bastante comum no ciclo de vida é a reprodução vegetativa, predominante em híbridos estéreis. A reprodução vegetativa nos esporofitos adultos dá-se por ramificações dos rizomas, estolões ou bulbilhos (WALKER, 1979). Os gametofitos também podem reproduzir-se vegetativamente, através de gemas que se destacam e dão origem a novos indivíduos (MILLER, 1968; FARRAR, 1974).

Germinação de esporos : luz e temperatura

A luz controla vários aspectos do ciclo de vida das pteridófitas, entre eles a germinação dos esporos. O termo fotomorfogênese aplica-se a todos os aspectos do crescimento e desenvolvimento que estão sujeitos à regulação por estímulos luminosos (HOWLAND e EDWARDS, 1979).

A germinação dos esporos de pteridófitas pode ser dividida em três fases sequenciais conhecidas como pré-indução, indução e pós-indução (TOWILL e IKUMA, 1975a).

Durante a fase de pré-indução o esporo estabelece a sua sensibilidade à luz. Esta fase pode ocorrer no escuro e inicia-se com a exposição do esporo à água, condições aeróbicas e temperatura adequadas (TOWILL e IKUMA, 1975a; CHEN e IKUMA, 1979). Segundo MILLER(1968), o tempo de hidratação varia de espécie para espécie, com um mínimo de 3 horas e um máximo de 36 horas. Em *Cyathea delgadii* o período total de pré-indução é de 48 horas (FERREIRA NETO, 1983).

A presença de oxigênio durante a fase de pré-indução mostrou-se fundamental para que esporos de *Onoclea sensibilis* estabelecessem a sua fotossensibilidade. É possível que sob condições anaeróbicas o esporo produza etanol, que seria responsável pela inibição da germinação (TOWILL e IKUMA, 1975a; HOWLAND e EDWARDS, 1979). SMITH e ROBINSON (1969) demonstraram que etanol inibe a divisão celular em *Polypodium vulgare*.

Provavelmente o oxigênio molecular também atua diretamente no processo de estabelecimento da fotossensibilidade, pois esporos sob condições anaeróbicas recuperam-se rapidamente quando expostos a oxigênio. Este processo pode ser revertido repetidamente (TOWILL e IKUMA, 1975a; HOWLAND e EDWARDS, 1979).

Experimentos realizados com esporos de *Onoclea sensibilis*

por TOWILL e IKUMA (1975a) demonstram que durante a pré-indução ocorre síntese de proteínas, responsável pelo estabelecimento e manutenção da sensibilidade à luz. A germinação dos esporos embebidos, sob condições aeróbicas decai à taxa de 1% por minuto de tratamento com cicloheximida,, um inibidor da síntese protéica. Quando a cicloheximida é removida pela lavagem dos esporos, a germinação é recuperada, sugerindo que a síntese de proteínas fundamentais para o estabelecimento da fotossensibilidade foi novamente iniciada.

A fase de indução é o período onde o esporo necessita de luz para desencadear o processo de germinação. A maioria das espécies de pteridófitas têm esporos sensíveis à luz durante a germinação (MILLER, 1968); esses esporos são denominados de fotoblásticos, um termo criado para sementes por EVENARI (1965). Esporos fotoblásticos positivos são os esporos em que a luz branca inibe a germinação.

Em esporos de *Onoclea sensibilis* foi demonstrado que a indução é um processo que não requer oxigênio e é independente da temperatura. A luz é o único fator necessário, considerando-se então que a indução é um evento fotoquímico puro (TOWILL e IKUMA, 1975a; HOWLAND e EDWARDS, 1979).

Os comprimentos de onda do espectro visível que promovem maior taxa de germinação geralmente encontra-se na faixa de 600 a 680nm, na região do vermelho (MILLER, 1968; SUGAI, 1971; TOWILL e IKUMA, 1973; HOWLAND e EDWARDS, 1979; FERREIRA NETO, 1983).

A indução da germinação pela luz vermelha indica que possivelmente o fitocromo esteja envolvido no processo, atuando como um receptor fotossensível. A fotorreversibilidade vermelho/vermelho-extremo regula a germinação em várias espécies: *Pteris vittata* (SUGAI e FURUYA, 1967), *Asplenium nidus* (RAGHAVAN, 1971), *Cheilantes*

farinosa (RAGHAVAN, 1973), *Lygodium japonicum* (SUGAI e FURUYA, 1977) *Thelypteris kunthii* (HUCKABY e RAGHAVAN, 1981) e *Cyathea delgadii* (FERREIRA NETO, 1983).

Para que se caracteriza a presença de fitocromo (reação de baixa energia) vermelho/vermelho-extremo é necessário que se demonstre a fotorreversibilidade do efeito estudado, por vermelho e vermelho-extremo (HILLMAN, 1967). Muitas espécies de pteridófitas apresentam um pico de germinação sob luz vermelha (MILLER, 1968), porém este efeito não é revertido por vermelho-extremo, como acontece em *Onoclea sensibilis* (TOWILL e IKUMA, 1973) e *Mohria caffrorum* (REYNOLDS e RAGHAVAN, 1982). É possível que outros pigmentos além do fitocromo regulem a germinação de esporos. Esporos de *Onoclea sensibilis* não dependem de fotossíntese para germinar, porém necessitam desta quando tratados com etileno, um inibidor da germinação nesta espécie (TOWILL e IKUMA, 1973; FISHER e MILLER, 1975). É provável também que um pigmento receptor de luz azul esteja envolvido na germinação de esporos de algumas espécies. A conversão do fitocromo vermelho (Fv) para fitocromo vermelho-extremo (Fve) pode ser aumentada com a exposição do esporo à luz azul (MILLER, 1968). Luz azul inibe a germinação de esporos em *Pteris vittata* (SUGAI e FURUYA, 1967), *Cheilantes farinosa* (RAGHAVAN, 1973), *Lygodium japonicum* (SUGAI e FURUYA, 1977), *Thelypteris kunthii* (HUCKABY e RAGHAVAN, 1981) e *Cyathea delgadii* (FERREIRA NETO, 1983). O espectro de absorção do carotenóide violaxantina e o espectro de ação da luz azul, atuando como inibidora, são muito semelhantes. Segundo SUGAI (1971), a violaxantina poderia ser o pigmento fotorreceptor de azul; a irradiação deste carotenóide com a luz azul poderia convertê-lo em substâncias inibitórias da germinação, por exemplo ácido abscísico.

Em esporos de algumas espécies a germinação pode ocorrer na total ausência de luz: *Ceratopteris thalictroides*, *Osmunda regalis*

e *Pteridium aquilinum* (MILLER, 1968). Esporos de *Bothrychium dissectum* germinam somente no escuro (WHITTIER, 1973).

A fase de pós-indução é o período compreendido entre a fotoindução e o término da germinação do esporo, com a protrusão do rizóide ou da célula protonemal. Esta fase é totalmente dependente do sucesso da pré-indução e indução (HOWLAND e EDWARDS, 1979).

A pós-indução não requer luz, porém necessita de oxigênio e temperaturas adequadas (TOWILL e IKUMA, 1975a; CHEN E IKUMA, 1979). As exigências aeróbicas da pós-indução são bastante diferentes da pré-indução. Esporos de *Onoclea sensibilis* têm 50% da germinação inibida quando colocados sob condições anaeróbicas, 5 horas após a fotoindução. Condições anaeróbicas aplicadas aos esporos 10 horas após a fotoindução não inibem a germinação (TOWILL e IKUMA, 1975a).

A pós-indução pode ser recuperada, após a sua inibição por anaerobiose. A recuperação sob atmosfera de oxigênio é lenta; os esporos atingem a metade da germinação máxima somente após 26 horas de tratamento (TOWILL e IKUMA, 1975a).

Durante a fase de pós-indução ocorre grande atividade de síntese de proteínas (TOWILL e IKUMA, 1975b) e síntese de ácidos nucleicos (EDWARDS e MILLER, 1972).

A temperatura ótima para a germinação de esporos varia de espécie para espécie. Segundo a revisão bibliográfica realizada por MILLER (1968), os extremos em que ainda ocorre germinação variam de 1°C em esporos de *Pteridium* até 35°C em um grande número de espécies, como por exemplo *Onoclea sensibilis*. Nesta espécie a fase de pré-indução é inibida em temperaturas de 40°C; temperaturas entre 30 e 35°C estimulam a germinação e 25°C inibem ligeiramente a germinação. Durante a fase de pós-indução a temperatura atua de modo semelhante, porém não ocorre inibição se os esporos

receberem temperaturas de 40°C seis horas após a fotoindução (CHEN e IKUMA, 1979).

Muitas sementes germinam sob temperaturas constantes, porém algumas apresentam um ótimo de germinação sob temperaturas alternadas (FELIPPE, 1978). O processo ainda não está explicado, embora pareça ter algum significado ecológico.

Esporos de *Cyathea delgadii* germinam sob luz branca, em temperaturas de 15, 20, 25 e 30°C e pares de temperaturas de 5-25, 10-25, 15-25, 20-25, e 30-25°C, alternando-se a cada 12 horas. As maiores taxas de germinação ocorrem a 25°C constantes e pares de temperaturas 20-25 e 30-25°C. Nenhum tratamento de temperatura promoveu germinação na ausência de luz (FERREIRA NETO, 1983).

O efeito de temperatura talvez seja devido a alteração nos níveis endógenos de reguladores de crescimento. FELIPPE et al. (1970) mostraram que o nível de giberelinas é aumentado quando sementes de *Rumex obtusifolius* são expostas a altas temperaturas, tratamento este que aumenta a germinação.

Temperaturas por volta de 30°C podem induzir a germinação de esporos fotoblásticos positivos na ausência de luz. Esporos de *Onoclea sensibilis* apresentam uma germinação igual a 95% daquela induzida por luz vermelha, a 30°C (MILLER, 1968; TOWILL, 1978).

Giberelina pode, em alguns casos, substituir a luz necessária para que o esporo germine. A adição de giberelina ao meio de cultura promove a germinação de esporos de *Anemia phyllitidis* no escuro (HOWLAND e EDWARDS, 1979), porém induz somente 2% de germinação no escuro em esporos de *Matteuccia struthiopteris* (JARVIS e WILKINS, 1973). As duas espécies são fotoblásticas positivas.

A importância de giberelinas durante o processo de germinação fica clara com os experimentos realizados com AMO-1618, ini-

bidor da síntese de giberelinas, em esporos de *Anemia phyllitidis*. Esporos tratados com este inibidor não germinam a este efeito pode ser revertido com a adição de giberelinas ao meio de cultura. Provavelmente a síntese de giberelina é uma resposta ao estímulo luminoso, pois meios de cultura com esporos que permaneceram em luz apresentaram atividade giberelínica, não observada nos tratamentos de escuro (HOWLAND e EDWARDS, 1979). GEMMRICH(1982) estudou os efeitos da luz vermelha e do ácido giberélico no metabolismo de lipídios durante a germinação de *Anemia phyllitidis*. Tanto o ácido giberélico como a luz vermelha aumentaram a atividade de lipase e isocitrato liase. A degradação dos lipídios e a atividade de lipase eram, entretanto, mais ativas sob luz vermelha. Na germinação a luz vermelha e o ácido giberélico tinham efeito aditivo.

Cinetina e ácido indolil-3-acético induzem 4 e 7%, respectivamente, de germinação no escuro em esporos de *Matteuccia struthiopteris* (JARVIS e WILKINS, 1973).

São poucos os trabalhos realizados com inibidores da germinação. Ácido abscísico ocorre naturalmente em esporos de *Anemia phyllitidis* e a indução da germinação não é alterada por aplicações exógenas de até 50 mg.ml^{-1} (CHENG e SCHRAUDOLF, 1974). Cumarina inibe a germinação de esporos de *Gymnogramme calomelanos* (SOSSOUNTOZOV, 1961 in HOWLAND e EDWARDS, 1979).

Como já foi mencionado, etileno inibe a germinação em esporos de *Onoclea sensibilis*; este processo é fotorreversível e dependente da intensidade luminosa (EDWARDS e MILLER, 1972; FISHER e MILLER, 1975), sugerindo uma dependência da fotossíntese. O inibidor da fotossíntese di-cloro-metil-uréia (DCMU) impede que a reversibilidade da inibição por etileno ocorra quando os esporos são expostos a altas intensidades luminosas (FISHER e MILLER, 1975), mas não afeta a germinação de esporos não tratados por

etileno (TOWILL e IKUMA, 1973).

Morfologia de esporos

Grãos de pólen e esporos de pteridófitas apresentam uma parede dividida em dois extratos, denominados intina e exina. Na exina podem ser observadas duas camadas: uma interna, 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, 1952).

Esporos de pteridófitas não apresentam uma abertura verdadeira. O que se observa são cicatrizes na face proximal resultantes da união dos esporos na tétrade, durante o processo de meiose. Esporos com uma só cicatriz são denominados monoletes. Triletes são esporos que têm três cicatrizes radiais, unidas no pólo proximal (ERDTMAN, 1952).

O aspecto da superfície do esporo e das cicatrizes, associado à forma e ao tamanho dos esporos, são características importantes em estudos taxonômicos de pteridófitas, porém têm sido pouco utilizadas. Uma das exceções é o estudo palinológico em esporos de Cyatheaceae, realizado por GASTONY (1974, 1979) e GASTONY e TRYON (1976).

Estudos em Cyatheaceae utilizando microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura indicam que nesta família os esporos dos oito gêneros (TRYON, 1970) podem ser divididos em dois grupos: os que apresentam ou não perina (GASTONY, 1974).

BOWER (1923 in GASTONY, 1974) considera a perina como uma característica presente nas mais primitivas pteridófitas, incluindo

do entre elas a família Cyatheaceae.

ERDTMAN (1947) observa que, embora muitos esporos apresentem perina, esta muitas vezes é de difícil observação em esporos imaturos. Posteriormente, o mesmo autor sugere que a perina é produto da atividade do periplasmódio e parece ter propriedades físico-químicas próximas à da exina (ERDTMAN, 1952).

Formação de perina foi descrita em micrôsporos de *Marsilea*, um gênero heterosporado, demonstrando-se que esta realmente é originada do periplasmódio, sem nenhuma contribuição do esporo (PETTITTI, 1979).

O gênero *Trichipteris* é um dos gêneros caracterizados pela presença de perina em Cyatheaceae (GASTONY, 1979). RIBA (1967) descreve algumas espécies do gênero *Trichipteris* (sob o nome de *Alsophila*) e caracteriza os esporos como trilete, radiais e triangulares em vista polar, com o diâmetro variando de 27 a 35 μm . Porém, GASTONY (1979) observa que esporos de outras espécies do gênero apresentam um diâmetro consideravelmente maior, embora não apresente medidas no seu trabalho.

Segundo GASTONY (1979), esporos de *Trichipteris corcovadensis* relativamente maduros apresentam uma perina típica. A exina pode ser observada ao microscópio eletrônico de varredura em esporos menos maduros ou tratados com álcalis, mostrando-se finamente perfurada, particularmente em vista equatorial e distal. Proximalmente, finas perfurações também ocorrem próximas de perfurações maiores ao redor do trilete.

Objetivos

Poucos trabalhos sobre fisiologia de pteridófitas têm si

do realizado no Brasil, apesar da grande diversidade de espécies existentes. Várias espécies de pteridófitas têm sido sistematicamente coletadas em grandes quantidades das matas, para ornamentação e fabricação de xaxim. Além disso, as matas como um todo estão sendo devastadas, alterando todo o equilíbrio entre as espécies.

Assim, decidiu-se verificar os efeitos de luz, temperatura e substâncias de crescimento na germinação de esporos de *Trichipteris corcovadensis*.

Posteriormente, os resultados obtidos levaram-nos a uma nova linha de trabalho, em que foi feita a análise palinológica dos esporos. O objetivo nesta fase foi verificar se diferenças morfológicas entre esporos coletados de vários exemplares da mesma espécie poderiam indicar porque somente ocorria germinação em esporos de um único exemplar.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

A espécie estudada neste trabalho é a *Trichipteris concovadensis* (Raddi) Copel., uma pteridófita de porte arbóreo. Essa espécie ocorre naturalmente na Reserva Biológica do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga. A reserva está situada no município de São Paulo, a cerca de 10,2 Km Sul e 0,8 Km Leste do centro de São Paulo (Praça da Sé), à latitude de 23°38' S e à longitude de 46°38' W, numa altitude de 780 m (MELHEM et al, 1981).

Material fértil foi coletado para identificação e incluído no herbário do Departamento de Morfologia e Sistemática da UNICAMP (UEC 21065; coletores G. M. Felipe, W. M. Ferreira e L. M. Esteves, nº 11066-A). O material foi identificado por Dr. Paulo Windish do Departamento de Botânica de São José do Rio Preto. Foram coletados cinco exemplares, que foram denominados 11066-A, 11066-B, 11066-C, 11066-D e 11066-E.

Esporos do exemplar 11066-A foram coletados em três ocasiões, com intervalos de um ano: 10/03/80, 23/03/81 e 29/03/82. Os esporos dos exemplares 11066-B e C foram coletados em 29/03/82 e 23/03/83. Os esporos dos exemplares D e E foram coletados em 29/03/82.

Métodos

Viabilidade dos esporos

A viabilidade dos esporos (11066-A, B, C, D, e E) foi verificada com carmim-acético, preparado de acordo com MANTON (1950). Foi verificado que o carmim-acético não penetrava em esporos intactos, havendo necessidade de previamente partir-se a parede dos esporos. Os esporos foram colocados em uma lâmina de microscópio com uma gota de carmim-acético. A lamínula foi então, colocada e pressionada com o dedo polegar para quebrar a parede dos esporos. A leitura foi feita 36 horas após as lâminas terem sido montadas. Foram contados os esporos com a parede partida, corados ou não. Os dados são apresentados como porcentagem de esporos em relação ao número de esporos com paredes partidas (os esporos com paredes intactas eram ignoradas). Foram examinadas 15 repetições para cada material.

Consumo de oxigênio

Foi medido o consumo de oxigênio pelos esporos do material 11066-A, através do aparelho de Warburg (UMBREIT et al., 1964). Foram usados esporos armazenados por doze meses a 4°C. Em cada frasco, foram colocados 50 mg de esporos, 2,0 ml de água destilada e, na cisterna, 0,5 ml de hidróxido de potássio (KOH) a 20% para a absorção do gás carbônico liberado. Os esporos permaneceram embebendo na água destilada por 24 horas. As leituras para determinar o consumo de oxigênio foram feitas após essas 24 horas por 120 minutos, em intervalos de 15 minutos (frascos a

25°C, e em luz branca). O KOH só foi colocado na cisterna na hora em que as leituras iriam ser iniciadas. Os frascos, durante a embebição, eram vedados com parafilme e colocados em câmara de crescimento, com luz fluorescente branca contínua (intensidade de $320 \mu\text{W. cm}^{-2}$) a 25°C. Foram utilizados cinco frascos como repetições. O consumo de oxigênio foi expresso em $\mu\text{l O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Germinação

Os esporos foram armazenados em tubos de vidro hermeticamente fechados, envoltos em papel alumínio e mantidos em geladeira a 4°C (SUGAI e FURUYA, 1967; SUGAI, 1971). Em um experimento (períodos diferentes de armazenamento) foram utilizados esporos do exemplar 11066-A armazenados a 4°C e 25°C.

Como meio de cultura foi utilizada a solução de Knop com as modificações introduzidas por DYER (1979):

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	510 mg/l
KNO_3	120 mg/l
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1440 mg/l
KH_2PO_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 é acrescentada somente no momento do ensaio. Esta solução é preparada com 33,2 g de Na_2EDTA , 3,65 g de NaOH e 25 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para um litro de água destilada.

Em erlenmeyers de 125 ml foram colocados 25 ml de solução de Knop. Os esporos foram semeados no meio com o auxílio de uma espátula, a qual foi mergulhada no frasco onde estavam armazenados os esporos (misturados com esporângios) e os esporos

aderiam à espátula. As paredes internas do erlenmeyer foram tocadas com a espátula, ocasionando a queda dos esporos sobre o meio de cultura. Os esporos não foram esterilizados, porém, o meio de cultura, os erlenmeyers e o algodão que tampa os erlenmeyers foram autoclavados a 120°C, por vinte minutos; as espátulas foram esterilizadas em chama.

Após a autoclavagem, ao meio de cultura foram acrescentados 50 unidades de Nystatin (BDH Chemicals Ltd) para cada 1 ml de meio de cultura (DYER, 1979). Os experimentos foram sempre montados em câmara asséptica.

Os experimentos foram realizados em câmaras de crescimento "Forma Scientific", modelo 24, com temperatura constante de 25°C, a não ser quando o efeito de temperatura era testado.

Nos experimentos com luz fluorescente branca constante foram utilizadas duas lâmpadas fluorescentes de 15W e intensidade total de 320 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$. Os tratamentos de escuro foram feitos envolvendo-se os erlenmeyers em papel alumínio ou então recobrin-do-os com três sacos plásticos pretos.

O tratamento com luz fluorescente branca constante, a 25°C, foi o controle para todos os experimentos.

As leituras dos experimentos foram feitas em geral após 14 dias, a partir do início do experimento. Uma das exceções foi o experimento em que foi determinada a curva de germinação; neste caso as leituras foram feitas 2, 3, 6, 7, 11, 12, 14, 15, 18, 20, 24 e 25 dias após o início do experimento. O padrão utilizado para se considerar um esporo germinado foi a protrusão do rizóide.

Para cada tratamento foram montados três erlenmeyers. Para cada erlenmeyer foram feitas três lâminas, retirando-se uma gota da superfície do meio de cultura (os esporos flutam no meio) e recobrin-do-a com uma lamínula. De cada lâmina foram examinados cinco campos ao microscópio, contando-se o número total de esporos

presentes no campo e contando-se a seguir os esporos germinados. Tem-se então para cada tratamento 45 repetições. Foram contados os esporos de 45 campos, mesmo quando não ocorria a germinação.

1) Temperatura

Foram testadas temperaturas constantes de 5,10,15,20,25, 30,35,49 e 45°C, com os erlenmeyers mantidos em luz fluorescente branca constante e escuro.

O efeito de alternância de temperatura foi verificada sob luz fluorescente branca contínua, e escuro com os seguintes pares de temperaturas: 25-5, 25-10, 25-15, 25-20, 25-25, 25-30, 25-35, 25-40 e 25-45°C. Cada temperatura do par alternava-se a cada 12 horas em um total de 14 dias.

2) Reguladores de crescimento

Foram também verificados os efeitos do ácido indolil-3-ácético (AIA), ácido giberélico (GA₃), 6-benziladenina(6-BA) e ácido 2-cloro-etilfosfônico (CEPA) na germinação de esporos sob luz fluorescente branca contínua, a 25°C. Os quatro reguladores de crescimento foram testados nas concentrações de 0,5,25, 50 e 100 µg.ml⁻¹. Nos tratamentos com reguladores de crescimento, estes foram acrescentados ao meio de cultura após a autoclavagem. Nos tratamentos com CEPA as soluções foram preparadas imediatamente antes do experimento; neste caso os erlenmeyers foram substituídos por frascos, com a tampa rosqueada, que não permitiam a perda de etileno para o meio ambiente.

3) Intensidade luminosa

Foi também estudado o efeito de diferentes intensidades luminosas. As intensidades luminosas foram as seguintes: 220, 900, 1400, 1900 e 2500 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$. Essas intensidades foram conseguidas envolvendo os erlenmeyers com gase até obter as intensidades desejadas. As intensidades luminosas foram determinadas com o auxílio de um radiômetro U.D.T. modelo 40X. O experimento foi realizado a 25°C.

4) Fotoperíodo

O efeito do período diário de luz foi verificado (luz fluorescente branca) na germinação. Seis fotoperíodos diferentes (24, 16, 12, 8 e 1 horas de luz, além de escuro contínuo foram utilizados. A temperatura foi de 25°C.

5) Vermelho, vermelho-extremo, azul e verde

Os comprimentos de onda vermelho, vermelho-extremo, azul e verde foram obtidos de acordo com RANDI (1980):

- a) vermelho: lâmpada fluorescente vermelha, marca Sylvania, de 20 W, com máximo a 660 nm.
- b) vermelho-extremo: lâmpada incandescente de 6 W e filtro formado por três folhas de papel celofane azul e duas de vermelho; pico a 730 nm.
- c) azul: lâmpada fluorescente azul, da Phillips, de 15W, e filtro formado por uma folha de papel celofane azul; pico a 450 nm.

d) verde: lâmpada fluorescente verde, marca G.E. de 20W, e filtro formado por uma folha de papel celofane verde; pico a 525 nm.

A intensidade luminosa foi de $1,2 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{nm}^{-1}$.

Foi verificado o efeito de luz monocromática aplicada continuamente, portanto os erlenmeyers permaneceram nas câmaras sob luz monocromática por 14 dias.

Todos os experimentos com luz monocromática foram feitos a 25°C constante.

6) pH do meio de cultura

Foi verificada a germinação dos esporos do exemplar 11066-B em vários pH, em meios de cultura não tamponados. Foram preparados meios com pH 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, e 6,0. Os vários pH foram obtidos acrescentando-se gotas de HCl ou NaOH 0,05 M à solução de Knop. No 7º e no 14º dia do experimento, além da leitura da germinação dos esporos foi verificado o pH do meio. Foram preparados também meios nos quais não foram semeados esporos, com os mesmos pH; também aqui foi verificada a variação dos pHs no 7º e 14º dia.

Dosagem de lipídios

Foi feita a estimativa do conteúdo de lipídio total em esporos secos, sem embebição, dos exemplares 11066-A, 11066-B e 11066-C. Foram utilizados esporos do exemplar 11066-A coletados em três datas diferentes; os esporos das coletas de 10/03/80 e 23/03/81 foram armazenados a 4°C e a 25°C . Do exemplar 11066-C foram utilizados esporos coletados em 29/03/82 e 23/03/83. Não

foi possível obter uma quantidade suficiente de esporos dos exemplares 11066-D e 11066-E para realizar as dosagens.

A dosagem do conteúdo de lipídio total foi feita de acordo com o método de GEMMICH (1977): 50 mg de esporos são homogeneizados no almofariz, com areia, usando éter dietílico como solvente (20 ml). O material foi agitado durante 24 horas e acrescentado de sulfato de sódio (Na_2SO_4) para retirar traços de água. A seguir foi feita a filtração em papel de filtro, tomando-se o cuidado de remover todos os traços de lipídio do papel, com éter dietílico. A evaporação do solvente foi feita a vácuo, a 40°C , em balão de peso conhecido. O balão com o lipídio é mantido em dessecador até apresentar peso constante, determinando-se gravimetricamente o conteúdo de lipídio.

A dosagem do conteúdo total de lipídio foi feita também após 4, 7, 11 e 14 dias após o início da embebição de esporos do exemplar 11066-B. 50 mg de esporos por erlenmeyer foram semeados em solução Knop e mantidos sob luz fluorescente branca constante, a 25°C . No dia da dosagem esse meio de cultura era filtrado a vácuo, em papel de filtro. A superfície do papel foi raspada cuidadosamente e a seguir esse material foi tratado do mesmo modo já descrito anteriormente para esporos não embebidos.

Para cada material foram feitas três repetições, número que se mostrou suficiente em experimentos prévios devido à pequena variabilidade dos resultados obtidos entre as amostras.

Dosagem de proteínas solúveis

A dosagem de proteínas solúveis foi feita pelo método do "Dye-Binding" (BRADFORD, 1976), modificado, em esporos dos exemplares 11066-A, B, C, D e E. Para o exemplar 11066-A foram reali

zadas dosagens em esporos coletados em 1981, 1982 e 1983.

Foram utilizados 200 mg de esporos para cada dosagem. As amostras foram colocadas em almofariz e maceradas com areia em 4 ml de hidróxido de sódio (NaOH) 1%. Este material foi colocado em tubos de ensaio, permanecendo 1 hora a 4°C. A seguir foi feita a centrifugação durante 15 minutos a 2.000 rpm. Colocou-se o sobrenadante em novo tubo de ensaio e o precipitado foi descartado.

Deste extrato retirou-se 0,1 ml, ao qual foram acrescentados 0,9 ml de cloreto de sódio (NaCl) 1%. Desta diluição do extrato foi retirado 0,1 ml e acrescentados 5 ml de reagente Brilliant Blue G-250. Após um tempo de aproximadamente 5 minutos a absorvância foi lida em espectrofotômetro a 595 nm. Os resultados obtidos foram expressos em $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$, usando-se uma solução padrão de albumina na concentração de $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Usaram-se três repetições para cada tratamento.

Morfologia dos esporos

1) Microscopia Óptica

O método utilizado 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.

a. Acetólise

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

Os esporos (soltos ou nos esporângios) são colocados em tubos de vidro Pyrex com 5 ml de ácido acético, glacial onde permanecem por um período do 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, sendo então mantido em banho-maria por um período de dois minutos, na temperatura de 100°C. A seguir os tubos são centrifugados (com a mistura ainda quente) e o sobrenadante é eliminado. O resíduo é lavado com 10 ml de água destilada com 3 gotas de álcool etílico; o sobrenadante é eliminado por centrifugação e decantação. Em seguida o material é tratado com 5 ml de glicerina pura e água destilada (1:1), durante um período de aproximadamente 30 minutos. Após este período centrifuga-se novamente (2000 rpm durante 5 minutos), elimina-se o sobrenadante e mantém-se os tubos de boca para baixo sobre papel de filtro.

Posteriormente, as lâminas são montadas com gelatina glicerinada, preparada segundo o método proposto por KISSER, em 1935 (ERDTMAN, 1952).

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 deformações nos esporos (MELHEM e MATOS, 1972).

Para a preparação de lâminas permanentes, estas são lutadas com parafina fundida (MULLER, 1950; in ERDTMAN, 1952). Com o auxílio de um bastão a parafina é levada até 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 o esporo. A limpeza final da lâmina é feita com xilol.

b. Técnica do carbonato de sódio

Utilizou-se a técnica do carbonato de sódio (Na_2CO_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 Na_2CO_3 em 100 ml de água destilada. Em um tubo de ensaio, capacidade de 10 ml, que continha os esporos foram colocados 5 ml desta solução; o tubo era aquecido lentamente até ferver durante um minuto, tomando-se cuidado para que a fervura não fosse muito violenta. Acrescentou-se água, cerca de 4 ml, e foi feita a centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos, descartando-se o sobrenadante. Repetiu-se esta lavagem novamente e o resíduo foi a seguir tratado pelo processo de acetólise, já descrito.

c. Método de Wodehouse

O método de Wodehouse (WODEHOUSE, 1935) foi utilizado para verificar se a acetólise não estava deformando os esporos.

Por este método é possível também determinar se os esporos apresentam ou não conteúdo, pois este não é removido como na acetólise.

Os esporos foram colocados no centro de uma lâmina, com uma gota de álcool etílico. Com um algodão removeram-se os resíduos e o óleo que se foram depositando em torno da preparação, como um anel. A seguir levou-se a lâmina à chama de uma lamparina, até secar o álcool. Acrescentou-se uma gota de fucsina em solução aquosa bem diluída e levou-se novamente à chama para secar. Uma pequena porção de gelatina glicerinada, preparada segundo KISSER (1935 *in* ERDTMAN, 1952), foi posta sobre uma lamínula e levada à chama para fundir. A lamínula foi invertida e colocada sobre a preparação que se encontrava sobre a lâmina.

Para a preparação de lâminas permanentes, estas foram lutadas com parafina pelo método de MULLER (1950 *in* ERDTMAN, 1952).

d. Medidas

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

Para cada material foram preparadas cinco 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).

Logo no início do trabalho foi constatada, em amostras de alguns exemplares, uma variação marcante na forma dos esporos, como é mostrado nas figuras 1-3 (fotografias pelo microscópio de varredura). Foram definidas duas formas extremas: a forma I (figura 1), que é triangular em vista polar, com os lados do triân-

Figuras 1-3

Variações na forma de esporos de *T. corcovadensis*:
microscopia eletrônica de varredura.

Figura 1 - vista proximal do esporo: forma I
aumento: 6480X

Figura 2 - vista distal do esporo: forma II
aumento: 6480X

Figura 3 - vista proximal de um esporo mostrando uma das
formas intermediárias entre I e II.
aumento: 6480X



figura 1

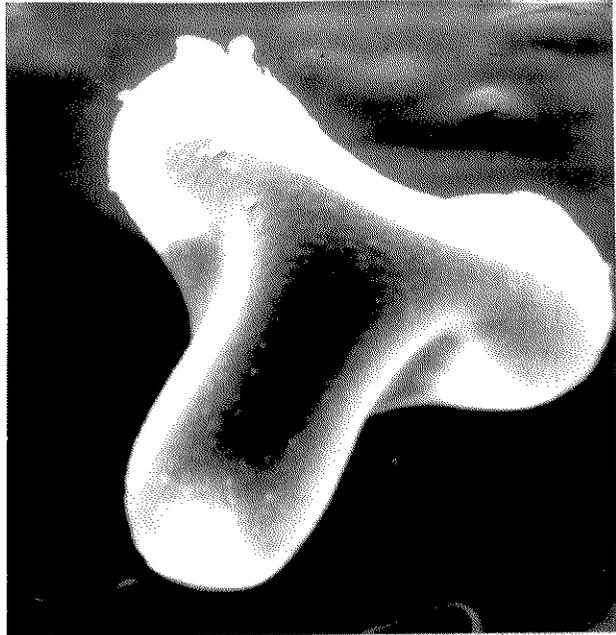


figura 2

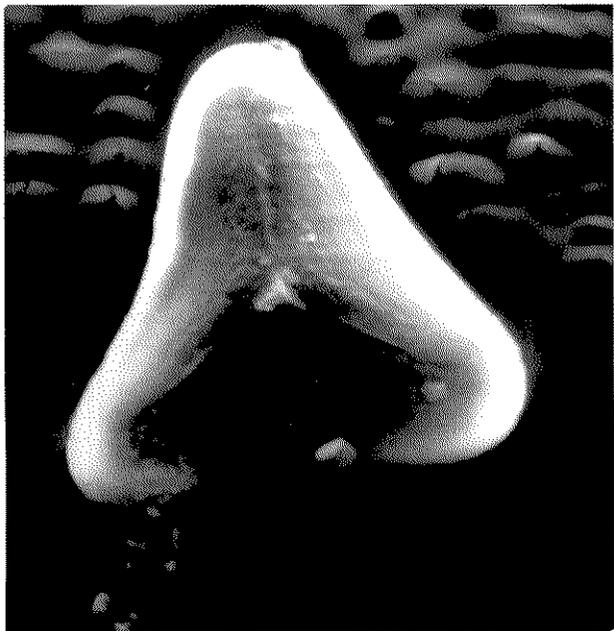


figura 3

gulo retos, e a forma II (figura 2), também triangular em vista polar, porém com os lados do triângulo côncavos, dando um aspecto lobado ao esporo. Entre a forma I e a forma II havia formas intermediárias, um exemplo sendo a apresentada na figura 3, em que os lados do triângulo eram levemente curvados para o centro. Quando em uma amostra de esporos foi encontrada essa variação de formas foram tomadas medidas das formas extremas I e II.

Os esporos foram medidos no máximo até sete dias após o preparo da lâmina. Este cuidado foi tomado para evitar inchamento do esporo, como foi observado em grãos de pólen por MELHEN e MATOS (1972). Foram tomadas medidas do diâmetro equatorial do esporo, do comprimento do trilete e largura da margem do trilete. A representação esquemática das medidas tomadas no esporo (em vista polar) estão na figura 4.

As porcentagens das formas I, II e das formas intermediárias encontradas em cada coleta de esporos foram verificadas ao microscópio óptico em 45 campos, distribuídos em pelo menos três lâminas. Contou-se o número total de esporos presentes no campo e a seguir os esporos de cada forma. O mesmo método foi utilizado para se verificar presença ou não de perina nos esporos de cada amostra.

Os esporos tratados pelo método de Wodehouse foram somente observados, sem fazer qualquer quantificação.

e. Fotomicrografias

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

Figura 4

Representação esquemática do esporo de *T. corcovadensis*, em vista polar, mostrando como foram tomadas as medidas.

E = diâmetro equatorial

C = comprimento do trilete

M = largura da margem do trilete

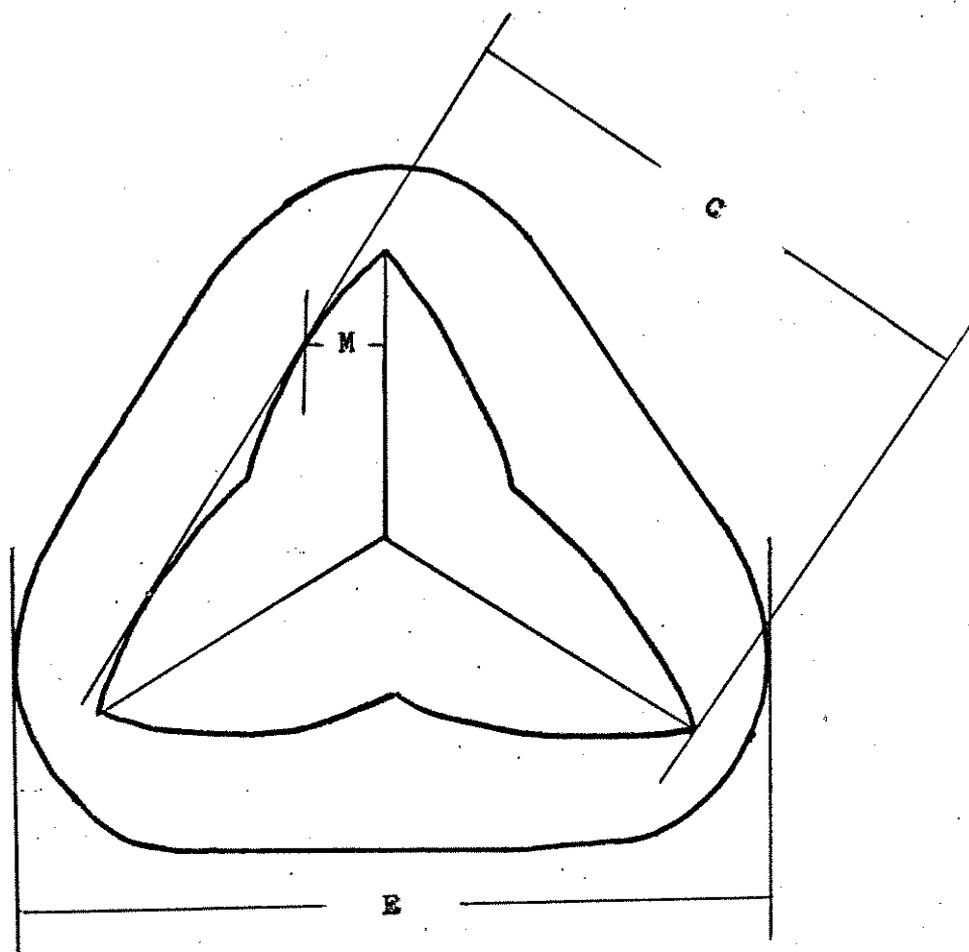


figura 4

2) Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para uma melhor visualização dos detalhes de escultura dos esporos. A preparação foi iniciada, em câmara asséptica, com a separação dos esporos dos resíduos do esporângio. Isto foi feito com o auxílio de uma espátula, podendo-se então coletar os esporos em uma lâmina de vidro utilizando um pincel. A seguir, um pequeno disco metálico (toro) de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro foi recoberto com uma fina camada de esmalte incolor; os esporos foram então colocados sobre o esmalte, com o auxílio de um pincel. É necessário que o esmalte esteja quase seco para que os esporos não afundem ou sejam recobertos por ele (CRUZ, 1982).

A etapa seguinte foi a metalização a ouro dos toros com a preparação, em um vaporizador construído no Departamento de Física do Hidrogênio, do Instituto de Física da UNICAMP. Para a obtenção das fotomicrografias foi utilizado um microscópio de varredura da marca GO, modelo JSM P15, e filme Kodak PX-135 ASA 100.

Apresentação dos dados e análise estatística

Para os experimentos de germinação, a relação entre o número total de esporos observados em um campo ao microscópio e o número de esporos germinados nesse campo foi transformada em porcentagem. A porcentagem de germinação de cada amostra (campo do microscópio) foi transformada em valor angular (arco seno da raiz quadrada da porcentagem). Os dados finais são apresentados em tabelas, em valor singular. A análise estatística dos experimentos de germinação foi realizada com os dados em valor angular.

Para comparação de dois ou mais tratamentos (germinação

ou medidas dos esporos) foi feita a análise de variância e nos casos em que houve diferença significativa entre eles, foi calculada a DMS 5% (Tukey). Nas tabelas letras minúsculas diferentes mostram que os tratamentos são diferentes.

Foram calculados os intervalos de confiança para as variações do pH dos meios de cultura após 7 e 14 dias. Para as medidas da margem do trilete foram somente calculadas médias, porque estas medidas são pouco precisas. Os testes e análises estatísticas foram apresentadas por SNEDECOR (1962) e as tabelas utilizadas as de FISHER e YATES (1971).

RESULTADOS

Viabilidade dos esporos

A porcentagem de viabilidade (coloração por carmin-acético) é apresentada na tabela 1, onde pode ser observado que a porcentagem de esporos vivos está entre 76 e 88% nos cinco exemplares utilizados.

É bom lembrar que foi determinada apenas a viabilidade dos esporos que tiveram a parede partida em razão do esmagamento pela lamínula, já que o carmin-acético não penetrava nos esporos intactos.

Consumo de oxigênio

Foi determinado o consumo de oxigênio por esporos do exemplar 11066-A. O consumo de oxigênio pelos esporos, após 24 horas de embebição sob luz branca constante foi de $0,225 \mu\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}$ de esporo. Este dado confirma o resultado apresentado na tabela 1, mostrando que o esporo do exemplar 11066-A está viável.

Germinação

Todos os experimentos de germinação foram feitos com esporos

TABELA 1

Porcentagem de viabilidade, determinada pelo carmim-acético, em esporos (com a parede quebrada) de cinco exemplares de *T. corcovadensis*.

Esporos armazenados a 4°C.

exemplar	viabilidade (%)
11066-A	79
11066-B	88
11066-C	86
11066-D	77
11066-E	76

dos exemplares 11066-A e 11066-B. Em nenhum dos experimentos ocorreu germinação do exemplar 11066-A. Também foi testada a germinação de outros três exemplares em luz branca e escuro constantes e a 25°C; pode ser observado na tabela 2 que só germinaram esporos provenientes do exemplar 11066-B. Portanto, em todos os experimentos a seguir foram usados esporos do exemplar 11066-B.

Curva de germinação

A germinação foi verificada 2, 3, 6, 7, 11, 12, 14, 15, 18, 20, 24 e 25 dias após o início do experimento, para os esporos do exemplar 11066-B. Os resultados podem ser observados na figura 5. A germinação inicia-se no 7º dia e o número de esporos germinados estabiliza-se no 14º dia. Nos experimentos seguintes (com exceção do experimento sobre efeito de pH a germinação foi sempre verificada após 14 dias. Nunca ocorreu germinação no escuro. Nos experimentos seguintes os esporos do exemplar 11066-B foram sempre colocados para germinar sob luz fluorescente branca constante (a não ser nos experimentos com vermelho-extremo, vermelho, verde e azul).

Efeito de temperatura

1) Temperaturas constantes

Os esporos foram mantidos em luz fluorescente branca constante nas seguintes temperaturas constantes: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45°C. Os resultados estão na tabela 3. Como pode ser visto, só ocorreu germinação de esporos do exemplar 11066-B a

TABELA 2

Germinação de esporos recém-coletados de cinco exemplares diferentes de *T. corcovadensis* em luz branca e escuro constantes a 25°C.

exemplar	germinação (valor angular)	
	luz constante	escuro constante
11066-A	0	0
11066-B	18,6	0
11066-C	0	0
11066-D	0	0
11066-E	0	0

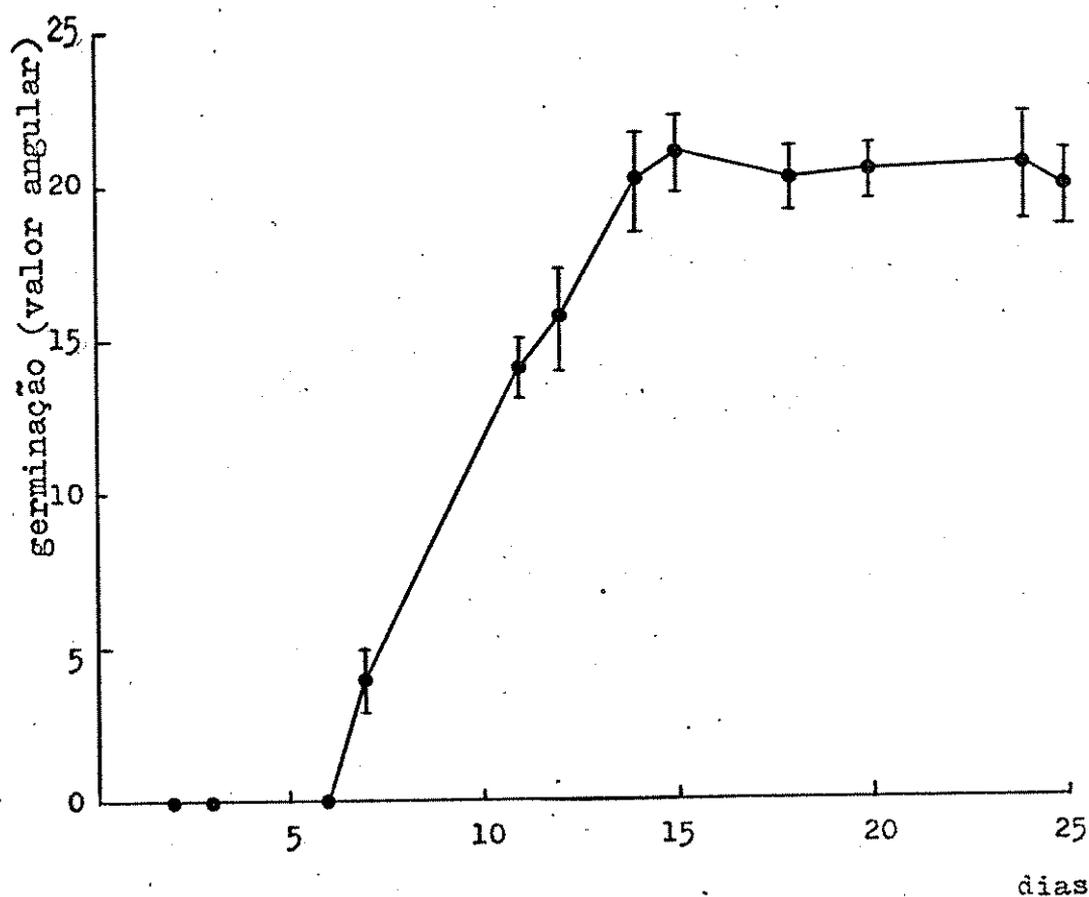


Figura 5 - Curva de germinação dos esporos de *T. corcovadensis*, exemplar 11066-B, sob luz branca constante. As barras verticais representam os intervalos de confiança.

TABELA 3

Efeito de temperaturas constantes na germinação de esporos do exemplar 11066-B, de *T. corcovadensis*, mantidos sob luz fluorescente branca constante.

Temperaturas (°C)	germinação (valor angular)
5	0
10	0
15	0
20	3,0 ^a
25	16,6 ^b
30	10,4 ^c
35	0
40	0
45	0
DMS _{5%} (Tukey)	1,8

20, 25 e 30°C, sendo que a germinação máxima ocorreu a 25°C. A germinação dos esporos a 20°C é baixíssima, muito próxima de zero.

2) Temperaturas alternadas

Os esporos foram mantidos em luz fluorescente branca, constante, nos seguintes pares de temperaturas: 25-5, 25-10, 25-15, 25-20, 25-25, 25-30, 25-35, 25-40 e 25-45°C. Os resultados estão na tabela 4. Ocorreu germinação de esporos do exemplar 11066-B nos pares 25-20°C, 25-25°C e 25-30°C. A germinação máxima ocorreu a 25-25°C (ou 25°C constante). Os pares 25-20°C e 25-30°C apresentaram uma germinação igual entre si, porém menor que o controle 25-25°C.

Efeito de reguladores de crescimento

1) Ácido indolil-3-acético (AIA)

Os esporos foram mantidos em luz constante, a 25°C, nas seguintes concentrações de AIA: 0, 5, 25, 50 e 100 µg/ml. Os resultados estão na tabela 5. A melhor germinação dos esporos do exemplar 11066-B ocorreu na ausência de AIA. Houve um decréscimo da germinação na presença de 5 µg/ml de AIA e uma diminuição muito maior com 25 µg/ml. Não ocorreu germinação em concentrações de 50 e 100 µg/ml.

TABELA 4

Efeito de pares de temperaturas alternadas na germinação de esporos do exemplar 11066-B de *T. corcovadensis*, mantidos sob luz fluorescente branca constante.

Tratamentos (°C)	germinação (valor angular)
25-5	0
25-10	0
25-15	0
25-20	12,7 ^a
25-25	16,6 ^b
25-30	13,0 ^a
25-35	0
25-40	0
25-45	0
DMS _{5%} (Tukey)	2,4

TABELA 5

Efeito de ácido indolil-3-acético (AIA) na germinação de esporos do exemplar 11066-B de *T. corcovadensis*, mantidos sob luz fluorescente branca constante.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	germinação (valor angular)
0	18,8 ^a
5	14,1 ^b
25	3,6 ^c
50	0
100	0
DMS _{5%} (Tukey)	2,2

2) Ácido giberélico (GA_3)

Os esporos foram mantidos em luz constante, a $25^{\circ}C$, nas seguintes concentrações de GA_3 : 0, 5, 25, 50 e 100 $\mu g/ml$. Como pode ser visto na tabela 6, a concentração de 5 $\mu g/ml$ de GA_3 não alterou a germinação dos esporos do exemplar 11066-B em relação ao controle. Concentração de 25 $\mu g/ml$ de GA_3 diminuiu a germinação em relação ao controle, porém quando esta concentração é dobrada (50 $\mu g/ml$) a quantidade de germinação permaneceu igual. A concentração de 100 $\mu g/ml$ de GA_3 provocou uma queda substancial na germinação dos esporos.

3) 6-benziladenina (6-BA)

Os esporos foram mantidos em constante, a $25^{\circ}C$, nas seguintes concentrações de 6-BA: 0, 5, 25, 50 e 100 $\mu g/ml$. Os resultados estão na tabela 7. Só ocorreu germinação de esporos do exemplar 11066-B na ausência de 6-BA e com a concentração de 5 $\mu g/ml$, sendo esta estatisticamente menor do que o controle.

4) Ácido 2-cloroetilfosfônico (CEPA)

Os esporos foram mantidos em luz constante, a $25^{\circ}C$, nas seguintes concentrações de CEPA: 0, 5, 25, 50 e 100 $\mu g/ml$. Como pode ser verificado na tabela 8, não ocorreu germinação de esporos do exemplar 11066-B na presença de CEPA em nenhuma concentração.

Efeito de luz branca

TABELA 6

Efeito de ácido giberélico (GA_3) na germinação de esporos do exemplar 11066-B de *T. corcovadensis*, mantidos sob luz fluorescente branca constante.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	germinação (valor angular)
0	18,5 ^a
5	17,2 ^a
25	10,2 ^b
50	11,7 ^b
100	3,3 ^c
DMS ₅ % (Tukey)	1,8

TABELA 7

Efeitos de 6-benziladenina (6-BA) na germinação de esporos do exemplar 11066-B de *T. corcovadensis*, mantidos sob luz fluorescente branca constante.

concentração ($\mu\text{g/ml}$)	germinação (valor angular)
0	16,9 ^a
5	9,7 ^b
25	0
50	0
100	0

Teste $t_{5\%}$ significativo para 0 e 5 $\mu\text{g/ml}$.

TABELA 8

Efeito de ácido 2-cloroetilfosfônico (CEPA) na germinação de esporos do exemplar 11066-B de *T. corcovadensis*, mantidos sob luz fluorescente branca constante.

concentração (µg/ml)	germinação (valor angular)
0	17,9
5	0
25	0
50	0
100	0

1) Intensidade luminosa

A germinação dos esporos foi verificada sob seis intensidade luminosas: 2500, 1900, 1400, 900, 320 e 220 $\mu\text{W.cm}^{-2}$. A germinação dos esporos do exemplar 11066-B foi maior nas intensidades de 320 e 220 $\mu\text{W.cm}^{-2}$ do que nas outras testadas. Nas outras intensidades luminosas os valores da germinação foram iguais entre si, como pode ser visto na tabela 9. A intensidade de 320 $\mu\text{W.cm}^{-2}$ é a normalmente usada como controle.

2) Fotoperíodo

Foi verificado o efeito de seis fotoperíodos diferentes na germinação dos esporos: 24, 16, 12, 8, 1 e 0 horas diárias de luz. Os resultados são apresentados na tabela 10. A germinação dos esporos do exemplar 11066-B nos fotoperíodos de 16, 12 e 8 horas foi igual à germinação em luz contínua (24 horas de luz); não houve germinação no escuro e com fotoperíodo de 1 hora.

Efeito de vermelho, vermelho-extremo, azul e verde

Os esporos do exemplar 11066-B foram submetidos a tratamentos com vermelho, vermelho-extremo, azul e verde constantes. Os resultados estão na tabela 11. Todos os comprimentos de onda induziram a mesma taxa de germinação, que foi sempre menor do que a obtida no tratamento com luz fluorescente branca constante.

Períodos diferentes de armazenamento

TABELA 9

Efeito da intensidade luminosa na germinação de esporos do exemplar 11066-B de *T. corcovadensis*.

intensidade luminosa ($\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$)	germinação (valor angular)
220	18,0 ^a
320	18,9 ^a
900	13,8 ^b
1400	13,4 ^b
1900	12,9 ^b
2500	13,6 ^b
DMS _{5%} (Tukey)	3,0

TABELA 10

Efeito do fotoperíodo na germinação de esporos do exemplar 11066-B de *T. corcovadensis*.

fotoperíodo (horas)	germinação (valor angular)
0	0 ^b
1	0 ^b
8	17,6 ^a
12	18,5 ^a
16	17,7 ^a
24	18,9 ^a

F_{5%} não significativos para os fotoperíodos de 8, 12, 16 e 24 horas.

TABELA 11

Efeito de vermelho, vermelho-extremo, azul e verde constantes na germinação de esporos do exemplar 11066-B de *T. corcovadensis*.

Tratamento	germinação (valor angular)
vermelho	4,3 ^a
vermelho-extremo	3,8 ^a
azul	3,7 ^a
verde	3,6 ^a
luz fluorescente branca constante (controle	9,2 ^b
escuro	0 ^c
DMS _{5%} (Tukey)	1,7

1) Exemplar 11066-A

Com os esporos do exemplar 11066-A foi montado um experimento para se verificar se ocorria germinação com o aumento do tempo de armazenamento, isto é, se inicialmente os esporos estavam dormentes e se com o tempo de armazenamento em duas temperaturas diferentes a dormência era quebrada. Os tempos utilizados foram 15, 40, 60, 70, 90, 150, 270, 360, 600, 780 e 960 dias. Não ocorreu germinação a 25°C e sob luz fluorescente branca constante em nenhum período de armazenamento, a 4°C e 25°C.

2) Exemplar 11066-B

Na tabela 12 foram reunidos os controles de alguns experimentos realizados com os esporos 11066-B coletados em 29/03/82, sempre sob luz fluorescente branca e temperatura de 25°C constante. A leitura foi feita 14 dias após o início do experimento. Pode-se observar que até 135 dias após a coleta a germinação mantém-se igual à inicial e que após 238 dias a germinação é aproximadamente 50% da inicial.

pH do meio de cultura

Os esporos foram semeados em meios de cultura com pHs 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 e 6,0, e mantidos sob luz fluorescente branca de 25°C constante. Os resultados estão na tabela 13. No 7º dia a germinação máxima ocorreu no controle (pH inicial 4,9) e no meio com pH 5,0 inicial. No 14º dia a germinação máxima ocorreu nos pHs 4,0, 4,5 e 5,5 iniciais e a mínima no pH 3,5 inicial.

As variações dos pHs dos meios no 7º e 14º dia, bem como

TABELA 12

Germinação de esporos do exemplar 11066-B de *T. corcovadensis*, armazenados a 4°C por períodos diferentes de tempo.

Tempo após a coleta (dias)	Germinação (Valor angular)
15	19,1 ^a
67	17,0 ^a
92	17,1 ^a
96	18,9 ^a
102	18,4 ^a
108	19,2 ^a
134	16,9 ^a
135	18,7 ^a
238	11,5 ^b
239	9,0 ^b
254	9,2 ^b

DMS_{5%} (Tukey) = 2,9

as variações em relação aos meios sem esporos podem ser observadas também na tabela 13. Somente o meio com pH 5,5 manteve-se sem variações, quando semeado com os esporos. O meio sem esporos com pH 5,0 e o controle sem esporos (pH 4,9) mantiveram-se constantes até o 14º dia.

Dosagem de lipídios

A dosagem de lipídios em esporos não embebidos (resultados na tabela 14) mostrou que os esporos do exemplar 11066-A, coletada 10/03/80 (armazenados a 25°C) têm uma quantidade de lipídio total significativamente maior do que a encontrada em esporos coletados em 23/03/81. Com esporos deste mesmo exemplar verificou-se que a temperatura de armazenamento não influi na quantidade de lipídio total dos esporos. Esporos das coletas de 10/03/80 e 23/03/81 armazenados a 4°C e 25°C não apresentaram diferença significativa. A quantidade de lipídio total dos esporos foi a mesma em todos os exemplares coletados, quando armazenados a 4°C.

A dosagem de lipídio total em esporos do exemplo 11066-B, embebidos após 4, 7, 11 e 14 dias (tabela 15) não mostrou diferença significativa. Mesmo após o sétimo dia, onde já se observa germinação, a quantidade total de lipídio mantém-se igual à encontrada em esporos embebidos.

Dosagem de proteínas solúveis

Apenas os esporos do exemplar 11066-A coletados em 1980 apresentaram um nível de proteína solúvel menor que a dos exem-

TABELA 13

Efeito da variação de pH na germinação de esporos do exemplar 11066-B de *T. corcovadensis*.

7 DIAS			
pH inicial do meio	Germinação (\bar{X})	pH do meio com esporos	pH do meio sem esporos
3,5	5,39 ^{bc}	3,69 \pm 0,07	3,74 \pm 0,08
4,0	7,81 ^b	4,42 \pm 0,13	4,51 \pm 0,03
4,5	5,72 ^{bc}	4,99 \pm 0,06	4,99 \pm 0,01
5,0	12,43 ^a	5,17 \pm 0,20	5,10 \pm 0,10
5,5	6,50 ^b	5,38 \pm 0,14	5,30 \pm 0,31
6,0	5,03 ^c	5,21 \pm 0,0,	5,20 \pm 0,00
controle (4,9)	12,27 ^a	5,10 \pm 0,02	4,97 \pm 0,37

DMS_{5%} (Tukey) = 2,61

14 DIAS			
pH inicial do meio	Germinação (\bar{X})	pH do meio com esporos	pH do meio sem esporos
3,5	24,24 ^c	3,54 \pm 0,09	3,74 \pm 0,01
4,0	42,24 ^a	5,18 \pm 0,65	5,17 \pm 0,03
4,5	42,28 ^a	5,39 \pm 0,26	5,05 \pm 0,05
5,0	37,10 ^b	5,46 \pm 0,33	4,99 \pm 0,04
5,5	41,12 ^{ab}	5,60 \pm 0,40	5,39 \pm 0,09
6,0	33,48 ^b	5,45 \pm 0,09	5,20 \pm 0,09
controle (4,9)	36,98 ^b	5,26 \pm 0,13	4,99 \pm 0,14

DMS_{5%} (Tukey) = 4,88

Bcl/5393

TABELA 14

Dosagem de lipídio total em esporos de *T. corcovadensis*.

EXEMPLAR	mg de lipídio.100mg ⁻¹ de esporos	
	ARMAZENAMENTO	
	4°C	25°C
11066-A coleta 10/03/80	58,9 ^{ab}	64,4 ^a
11066-A coleta 23/03/81	47,5 ^b	47,8 ^b
11066-A coleta 29/03/82	48,8 ^b	-
11066-B coleta 29/03/82	44,2 ^b	-
11066-C coleta 29/03/82	50,1 ^b	-
11066-C coleta 23/03/83	45,0 ^b	-

DMS_{5%} (Tukey) = 13,9

TABELA 15

Dosagem de lipídio total em esporos embebidos de *T. corcovadensis*

Tempo de Embebição (dias)	mg de lipídio 100 mg ⁻¹ de esporos	Germinação (Valor angular)
0	45,0	0 ^a
4	41,5	0 ^a
7	42,3	12,7 ^b
11	47,0	14,5 ^b
14	42,8	18,3 ^c

F não significativo DMS_{5%}(Tukey) = 3,0

plares 11066-B e C (tabela 16).

Morfologia dos esporos

Foram estudados esporos dos exemplares 11066-A (figura 6-8), 11066-B (figuras 9-12), 11066-C (figuras 13-14), 11066-D (figura 15) e 11066-E (figura 16). Os esporos de cada exemplar se não descritos quanto à forma, trilete e aspecto da superfície.

Forma

Nas amostras preparadas os esporos predominantemente tomam a posição em que pode ser observada a vista polar. Em várias amostras foram constatadas variações na forma dos esporos, mas podem ser definidos dois tipos extremos: as formas I e II.

Os esporos com a forma I apresentam um aspecto triangular em vista polar, com os lados do triângulo retos (figura 1). Os esporos com a forma II também são triangulares em vista polar, porém os lados do triângulo são côncavos, dando um aspecto lobado ao esporo (figura 2). Foram observados também esporos com formas intermediárias entre as formas I e II, com os lados do triângulo levemente curvados para o centro (figura 3).

Os esporos do exemplar 11066-B foram os únicos que não apresentaram variação de formas; todos os esporos observados tinham a forma I (tabela 17). Os esporos coletados do exemplar 11066-A em 10/03/80 e 23/03/81 apresentaram uma variação mínima de formas, com grande predominância da forma I e pequeno número de esporos com formas intermediárias (tabela 17). Amostras de todos os outros exemplares apresentaram esporos com formas I, II ou intermediárias.

TABELA 16

Dosagem de proteína solúvel em esporos armazenados a 4°C, não embebidos, de *T. corcovadensis*.

Exemplar	µg de proteína solúvel. mg ⁻¹ de esporos
11066-A	
coleta 10/03/80	8,2 ^b
coleta 23/03/81	10,1 ^{ab}
coleta 29/03/82	9,3 ^{ab}
11066-B	
coleta 29/03/82	11,4 ^a
11066-C	
coleta 29/03/82	11,1 ^a
11066-D	
coleta 29/03/82	9,8 ^{ab}
11066-E	
coleta 29/03/82	10,2 ^{ab}

DMS_{5%} (Tukey) = 2,4

Figuras 6-8

Superfície do esporo de *T. corcovadensis*, exemplar 11066-A, ao microscópio óptico e de varredura.

Figuras 6 e 7 - análise de L.O. Exina granulosa

aumento: 1330X

Figura 8- Perfurações e grânulos em torno do trilete, ao microscópio de varredura.

aumento: 16200X

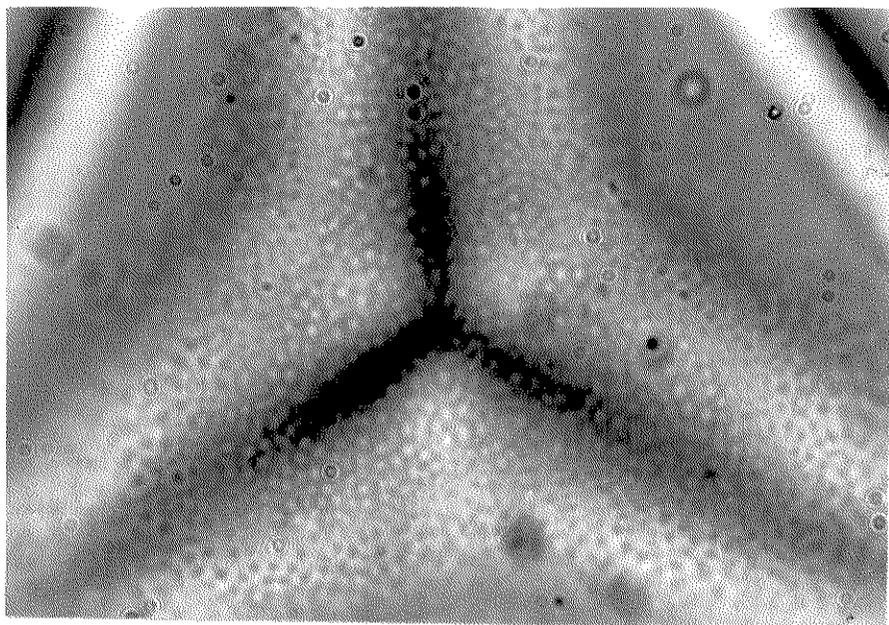


figura 6

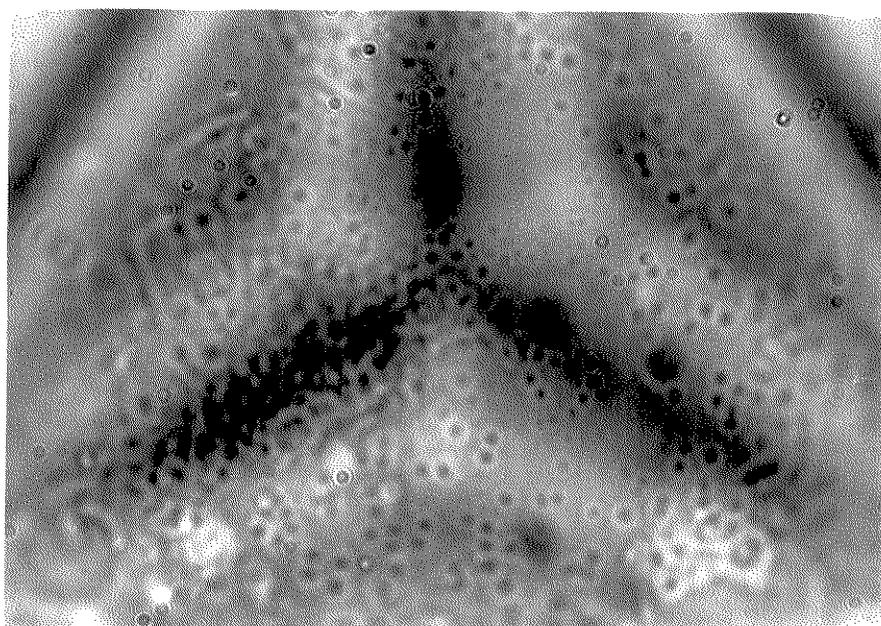


figura 7

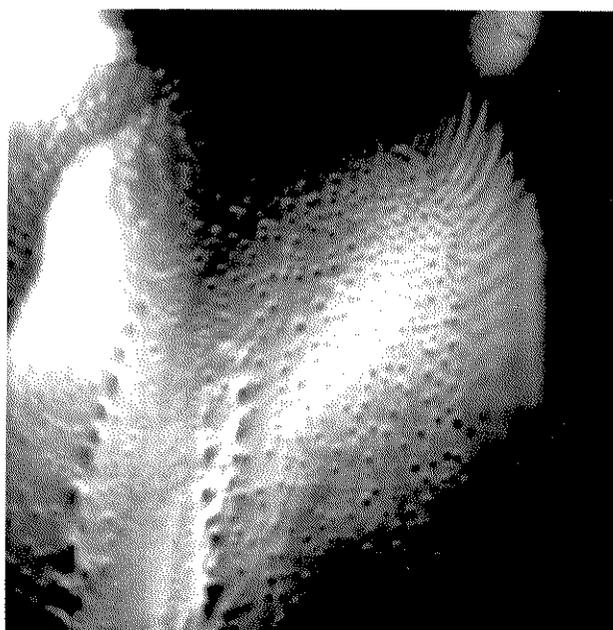


figura 8

Figuras 9-12

Superfície do esporo de *T. corcovadensis*, exemplar 11066-B, ao microscópio óptico e de varredura.

Figuras 9 e 10- análise de L.O.: aspecto granuloso (?)

aumento: 1330X

Figura 11- superfície com perina, ao microscópio de varredura.

aumento: 36000X

Figura 12- esporo sem perina, mostrando em detalhe a região do trilete, ao microscópio de varredura.

aumento: 36000X

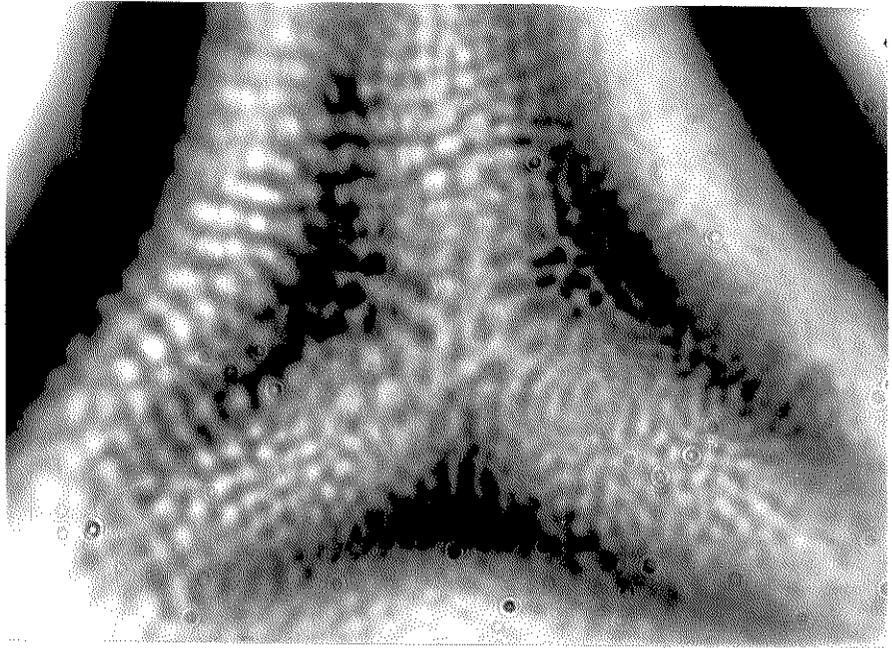


figura 9

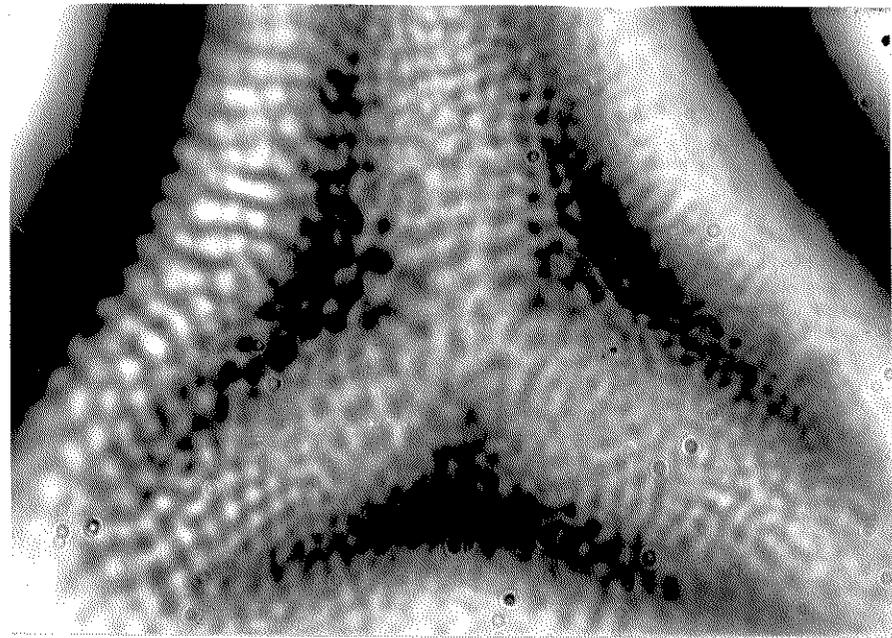


figura 10

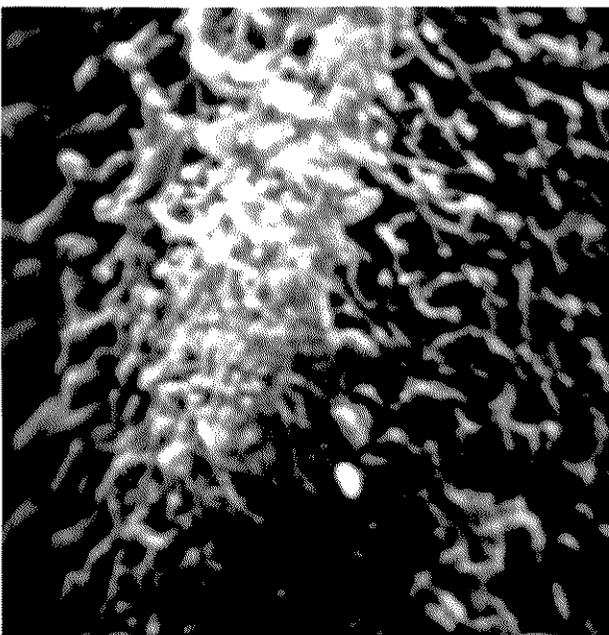


figura 11

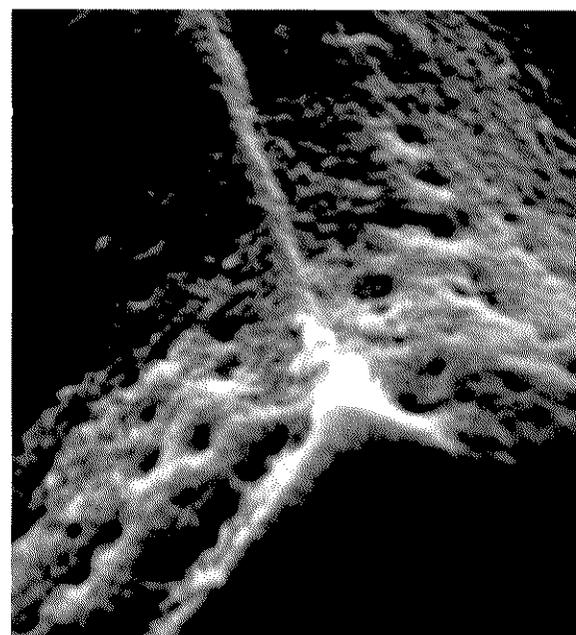


figura 12

Figuras 13-14

Superfície do esporo de *T. corcovadensis*, exemplar
11066-C, microscopia de varredura.

Figura 13- detalhe das perfurações da parede

aumento: 32400X

Figura 14- detalhe das perfurações junto ao trilete

aumento: 16200X

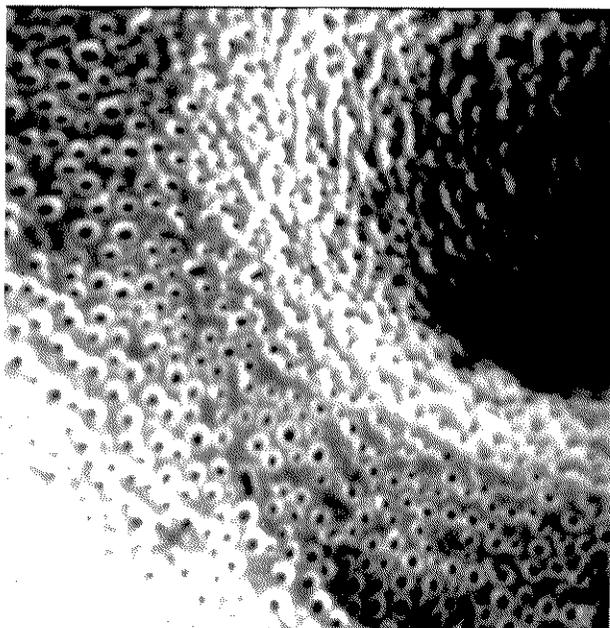


figura 13

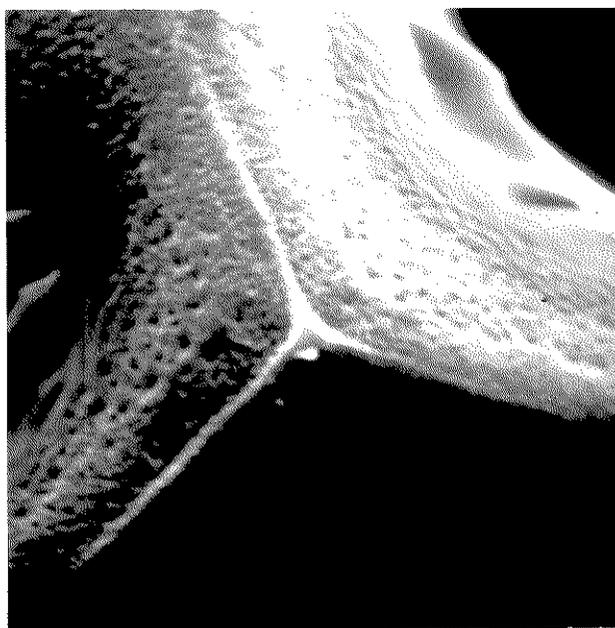


figura 14

Figura 15

Superfície do esporo de *T. corcovadensis*, exemplar 11066-D, microscopia de varredura.

Superfície com pequenas perfurações. Ausência de perfurações maiores junto ao trilete.

aumento: 32400X

Figura 16

Superfície do esporo de *T. corcovadensis*, exemplar 11066-E, microscopia de varredura.

Perfurações maiores ao redor do trilete.

aumento: 16200X

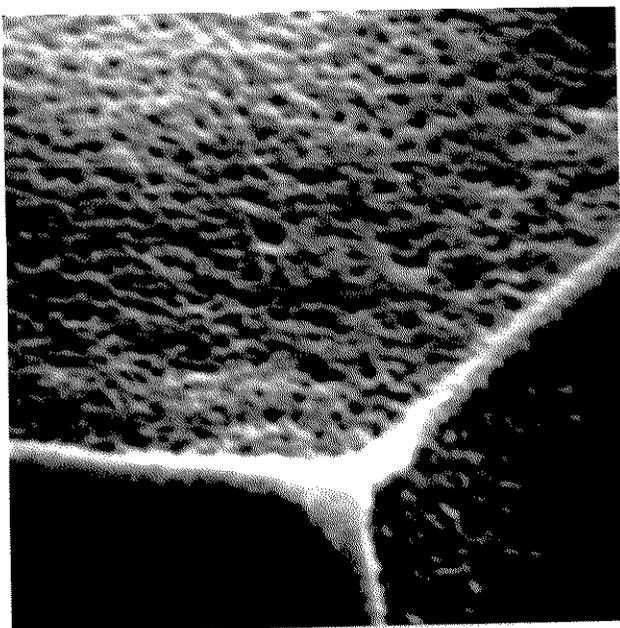


figura 15

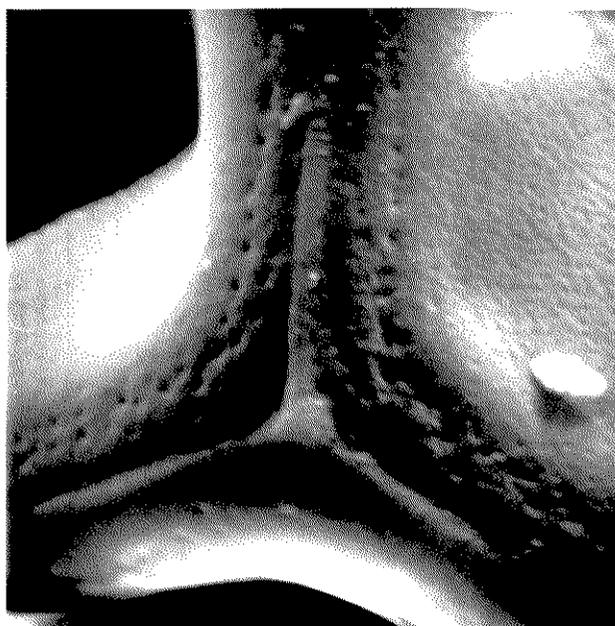


figura 16

TABELA 17

Variação de formas (%) encontradas em esporos de cinco exemplares de *T. corcovadensis*.

Exemplar	FORMAS ENCONTRADAS (%)		
	Forma I	forma II	intermediários
11066-A			
coleta 10/03/80	98,1	0	1,8
coleta 23/03/81	96,4	0	3,5
coleta 29/03/82	28,6	27,1	44,2
11066-B			
coleta 29/03/82	100,0	0	0
11066-C			
coleta 29/03/82	30,4	22,7	46,4
11066-D			
coleta 29/03/82	28,5	14,2	57,1
11066-E			
coleta 29/03/82	31,5	22,3	46,0

Quase todos os esporos tratados pelo método de Wodehouse, em todos os exemplares, revelaram possuir conteúdo celular (figura 17), e que confirma os dados da tabela 1. Isto é válido para formas I, II e intermediárias, eliminando-se a possibilidade de que as variações de formas fossem decorrentes da ausência de conteúdo celular.

O maior diâmetro equatorial foi encontrado nas amostras de esporos do exemplo 11066-B. Porém, os esporos do exemplar 11066-A coletados em 23/03/81 apresentam um diâmetro equatorial estatisticamente igual ao dos esporos do exemplar 11066-B (tabela 18).

Trilete

O comprimento do trilete em esporos de todos os exemplares é aproximadamente 1,6 vezes menor que o diâmetro equatorial (tabela 19), indicando que existe uma proporcionalidade entre as duas medidas. As medidas da margem do trilete são difíceis de se obter e variam bastante dentro de uma mesma amostra.

Superfície

Muitas vezes é difícil interpretar e definir o padrão de escultura da superfície dos esporos, principalmente quando se comparam os resultados obtidos em microscopia óptica e de varredura. O aspecto da superfície dos esporos varia bastante, não só entre os diversos exemplares como também dentro de uma mesma amostra de um exemplar. Porém, é possível definir um padrão predominante para os esporos de cada exemplar. A superfície dos esporos varia de psilada finamente perfurada (figura 15) a granulosa (?), (figuras 9-10) como pode ser observado na tabela 20; as perfurações ao redor do trilete podem ser grandes e nítidas (figura 16) ou

Figura 17

Esporos do exemplar 11066-C, tratados pelo método de Wodehouse, mostrando conteúdo celular.

aumento: 1000X

Figura 18

Aspecto da perina ao microscópio óptico, após tratamento com carbonato de sódio, em esporos do exemplar 11066-B.

aumento: 400X

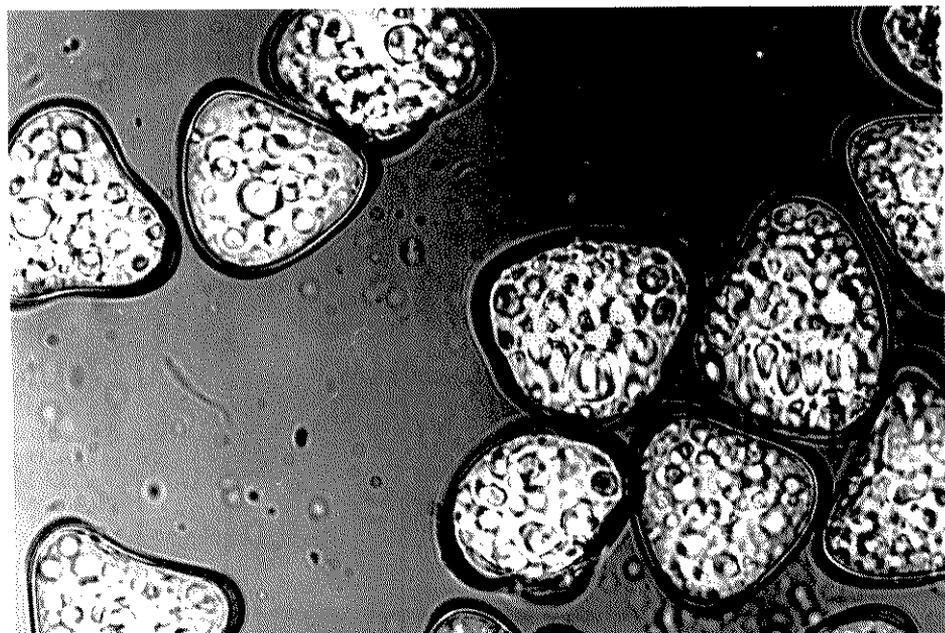


figura 17

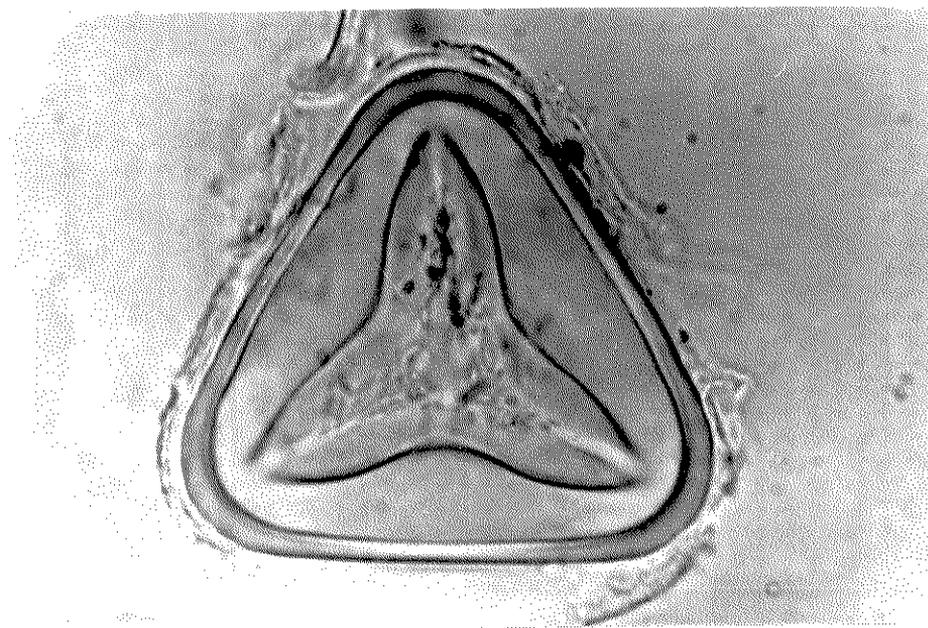


figura 18

TABELA 18

Diâmetro equatorial de esporos de cinco exemplares de *T. corcovaden*
sis.

Foram realizadas três coletas do exemplar 11066-A.

Exemplar	DIÂMETRO EQUATORIAL (μm)	
	forma I	forma II
11066-A		
coleta 10/03/80	57,79 ^d	56,98 ^d
coleta 23/03/81	71,49 ^a	57,79 ^d
coleta 29/03/82	64,25 ^{bc}	58,34 ^d
11066-B		
coleta 29/03/82	73,09 ^a	-
11066-C		
coleta 29/03/82	65,52 ^b	57,44 ^d
11066-D		
coleta 29/03/82	68,52 ^{ab}	61,13 ^{cd}
11066-E		
coleta 29/03/82	68,51 ^{ab}	62,32 ^c
	DMS _{5%} (Tukey) = 3,17	
	CV = 5,44%	

TABELA 19

Medidas do comprimento e da margem do trilete em esporos de cinco exemplares de *T. corcovadensis*.

Foram realizadas três coletas diferentes do exemplar 11066-A.

Exemplar	COMPRIMENTO DO TRILETE(um)		MARGEM DO TRILETE(µm)	
	Forma I	forma II	forma I	forma II
11066-A				
coleta 10/03/80	35,9 ^c	34,8 ^c	4,54	1,35
coleta 23/03/81	46,3 ^a	45,0 ^a	5,85	1,37
coleta 29/03/82	41,6 ^b	37,6 ^c	4,74	1,33
11066-B				
coleta 29/03/82	46,0 ^a	-	5,80	-
11066-C				
coleta 29/03/82	40,5 ^{ab}	37,4 ^c	5,76	1,34
11066-D				
coleta 29/03/82	43,9 ^{ab}	37,3 ^c	5,94	1,06
11066-E				
coleta 29/03/82	44,0 ^a	37,7 ^c	6,14	1,37

DMS_{5%} (Tukey) = 3,6

CV = 9,8%

TABELA 20

Aspecto predominante da superfície em esporos de cinco exemplares de *T. corcovadensis*.

Exemplar	Escultura predominante	Perfurações ao redor do trilete
11066-A	granulosa (?), perfurada, intercalada com pequenos grânulos.	nítidas
11066-B	granulosa (?)	nítidas
11066-C	psilada, nitidamente perfurada	diminuem ao se aproximar da <u>ci</u> catriz do trilete.
11066-D	psilada, finamente perfurada	ausentes
11066-E	psilada, com perfu- rações finas e espa- çadas	nítidas

totalmente ausentes. (figura 15). Em esporos do exemplar 11066-A foram observados também pequenos grânulos na superfície, intercalados com perfurações (figura 8).

A perina está presente em esporos de todos os exemplares (tabela 21), embora em porcentagens diferentes. O aspecto da perina ao microscópio óptico, após tratamento com carbonato de sódio, é mostrado na figura 18. Ao microscópio eletrônico de varredura os esporos do exemplar 11066-B apresentam uma perina bastante característica com filamentos grossos (figura 11). Nos esporos dos outros exemplares a perina é mais tênue, com filamentos finos.

TABELA 21

Porcentagem de esporos com perina em cinco exemplares de *T. corcovadensis*.

Antes da acetólise os esporos passaram por pré tratamento com carbonato de sódio (3%).

EXEMPLAR	PERINA (%)
11066-A	
coleta 10/03/80	79 ^c
coleta 23/03/81	86 ^b
coleta 29/03/82	81 ^c
11066-B	
coleta 29/03/82	94 ^a
11066-C	
coleta 29/03/82	74 ^d
11066-D	
coleta 29/03/82	78 ^{cd}
11066-E	
coleta 29/03/82	67 ^e

DMS_{5%} (Tukey) = 4,1

DISCUSSÃO

Como os esporos do exemplar 11066-A de *Trichipteris corcovadensis* nunca apresentaram germinação, foi levantada a possibilidade de dormência, que seria quebrada com o aumento do tempo de armazenamento, a 4 ou 25°C. HARTT (1925) reporta que *Alsophila australis* precisa de um período de armazenamento de um ano para que ocorra germinação. Essa hipótese, porém foi agora afastada pois após 32 meses de estocagem não ocorreu germinação dos esporos. Além disso, esporos do exemplar 11066-B apresentaram germinação imediatamente após a coleta, demonstrando que não há necessidade de estocagem para que haja germinação. EDWARDS E MILLER (1972) mostraram também que esporos de *Onoclea sensibilis* produzidos por diferentes esporofitos apresentam porcentagens diferentes de germinação, pelo menos em relação à fotoindução. Esses dados foram confirmados por MILLER e GREANY (1974) e FISHER e MILLER (1975).

Os esporos de *Trichipteris corcovadensis* são fotoblásticos positivos, como na maioria das espécies de pteridófitas já estudadas. Em uma revisão bibliográfica, MILLER (1968) apresentou uma listagem de 75 espécies, dentre as quais somente 4 germinaram na ausência de luz.

A temperatura ótima para a germinação de esporos varia para cada espécie, porém, de um modo geral, os esporos de pteridófitas germinam melhor entre 15 e 30°C; as mais altas temperatu

ras que permitem germinação, estão entre 30 e 35°C MILLER, (1968). Em esporos de *T. corcovadensis* a melhor temperatura constante para germinação é 25°C, seguida das temperaturas de 30°C e 20°C. Fora desta faixa de temperaturas (20 a 30°C) não ocorre germinação. Em relação às temperaturas alternadas, os pares de temperaturas 25-20°C e 25-30°C são os únicos em que ocorre germinação dos esporos de *T. corcovadensis*, porém essa germinação é mais baixa do que a 25°C. Esta série de experimentos mostra que o efeito inibitório das temperaturas abaixo de 20°C e acima de 30°C é mantido mesmo quando diariamente há uma alternância com a temperatura de 25°C. Portanto, 12 horas diárias a 25°C não são suficientes para eliminar o efeito inibitório de temperaturas abaixo de 20°C e acima de 30°C.

Em *Cyathea delgadii*, uma espécie que ocorre na mesma região de *T. corcovadensis*, ocorre germinação dos esporos em uma faixa maior de temperatura, indo esta faixa de 15 a 30°C. Neste caso ocorre germinação com as temperaturas alternadas de 5-25 e 10-25°C, o que mostra que a temperatura de 25°C reverte o efeito inibitório das temperaturas de 5°C e 10°C; entretanto, a temperatura de 25°C não reverte o efeito inibitório de 35, 40 e 45°C FERREIRA NETO (1983).

Os efeitos de auxina na divisão e alongamento celular variam de acordo com a espécie (SOSSOUNTZOV, 1961 in HOWLAND e EDWARDS, 1979). Nos esporos de *T. corcovadensis* a germinação decresce com o aumento de concentração para 25 µg.ml⁻¹ de ácido indolil-3-acético. Em concentração acima de 25 µg.ml⁻¹ de AIA não ocorre germinação.

Em *Anemia phyllitidis* a fotoindução para germinação dos esporos é impedida por AMO-1618, um inibidor da síntese de giberelinas. O efeito inibitório do AMO-1618 é revertido quando áci-

do giberélico é adicionado ao meio de cultura. A síntese de giberelinas pelos esporos de *Anemia phyllitidis* é uma resposta ao tratamento de luz (WEINBERG e VOELLER, 1969). Em esporos de *T. corcovadensis* o aumento da concentração de ácido giberélico (GA_3) provocou uma queda na germinação dos esporos. Esta diminuição da germinação não é diretamente proporcional ao aumento da concentração de GA_3 ; uma concentração de 5 $\mu\text{g/ml}$ de GA_3 resulta numa germinação igual à ausência de GA_3 ; 25 $\mu\text{g/ml}$ e 50 $\mu\text{g/ml}$ de GA_3 produzem uma germinação igual entre si.

Trabalhos utilizando citocininas na germinação de esporos são raros na literatura. Cinetina produz em esporos de *Matteuccia struthiopteria* um aumento de 4% de germinação no escuro, embora não seja efetiva em esporos sob luz branca (JARVIS e WILKINS, 1973). Os esporos de *T. corcovadensis* são bastante sensíveis a 6-benziladenina (6-BA), que teve um efeito inibidor da germinação.

A aplicação de ácido 2-cloroetilfosfônico (CEPA) na faixa de 5 a 100 $\mu\text{g/ml}$ inibiu totalmente a germinação de esporos de *T. corcovadensis*. FISHER e MILLER (1975) apresentam dados que sugerem um processo dependente da fotossíntese na fotorreversibilidade da inibição da germinação pelo etileno, em esporos de *Onoclea sensibilis*. O fitocromo provavelmente não está envolvido, pois exposições periódicas de luz vermelha ou vermelho-extremo não agem sobre a inibição causada pelo etileno. A reversão da inibição da germinação pelo etileno só ocorre em intensidades de luz muito maiores do que as necessárias para a germinação total dos esporos não tratados pelo etileno. As curvas de fotossíntese e de fotorreversibilidade da inibição pelo etileno são igualmente dependentes da intensidade de luz. Além disso, o inibidor da fotossíntese, diclorometiluréia (DCMU), bloqueia a germinação de

esporos tratados por etileno, que permanecem em luz (FISHER-MILLER, 1975). mas não afeta esporos não tratados por etileno, os quais não requerem fotossíntese para germinar (TOWILL e IKUMA - 1973).

Os esporos de *T. corcovadensis* apresentam uma germinação melhor sob intensidade de 320 a 220 $\mu\text{w.cm}^{-2}$, isto é, nas mais baixas intensidades testadas. Isto também ocorreu com esporos de *Cyathea delgadii* (FERREIRA NETO, 1983). A dosagem de luz (ou quantidade de quanta) pode ser alterada por exposição dos esporos a intensidades diferentes da radiação ou alterando o período de exposição dos esporos à luz (HOWLAND e EDWARDS, 1979). Quando se aumentam as doses não saturantes de um comprimento de onda efetivo, ocorre um aumento proporcional na resposta selecionada, como por exemplo, germinação adicional.

Em *T. corcovadensis* fotoperíodos de 8, 12, 16 e 24 horas causam a mesma resposta de germinação, porém uma hora de luz diária não é suficiente para que ocorra germinação. Em *Cyathea delgadii* a germinação também foi a mesma para os fotoperíodos de 8, 12, 16 e 24 horas, mas uma exposição única de 3 horas de luz fluorescente branca (após embebição por 48 horas no escuro) já foi capaz de promover a germinação (FERREIRA NETO 1983).

Os esporos de *T. corcovadensis* sob vermelho, vermelho-extremo, verde e azul constantes apresentam a mesma germinação, embora menor que em luz fluorescente branca. a germinação sob luz vermelha sugere o envolvimento do fitocromo. Entretanto, nesta espécie a germinação também é promovida pelo vermelho-extremo. Estaria o fitocromo, assim mesmo, envolvido na germinação? Uma possibilidade para explicar a germinação sob vermelho-extremo é que somente uma baixa concentração da forma ativa do fitocromo (Fve) é necessária; esta concentração pode ser produzida a par

tir da forma inativa (Fv) não somente por luz vermelha, como também por vermelho-extremo. Em experimentos com angiospermas (indução floral e germinação de sementes) 2% da forma ativa do fitocromo já são efetivos e esta baixa concentração pode ser obtida por exposição a vermelho-extremo (NAKAYAMA et al., 1960).

A luz azul tem um efeito inibidor da germinação de esporos em várias espécies, como por exemplo *Pteris vittata* (SUGAI e FURUYA, 1967), *Cheilantes farinosa* (RAGHAVAN, 1973), *Lygodium japonicum* (SUGAI e FURUYA, 1977) e *Thelypteris kunthii* (HUCKABY e RAGHAVAN, 1981). Porém, em *T. corcovadensis* a luz azul promoveu a germinação. É possível que um outro pigmento além do fitocromo esteja envolvido no processo de germinação (SUGAI, 1971), mas a indução da germinação pela luz azul pode ser resultado de absorção da luz azul pelo próprio fitocromo.

Os esporos de *T. corcovadensis* germinaram sob luz verde na mesma quantidade de outros tratamentos de luz monocromática. A regulação do alongamento por protonema por um pigmento que absorve na faixa verde-amarelo (P 580), em adição ao fitocromo, foi proposta por MILLER e MILLER (1967) entretanto, a demonstração bioquímica desse pigmento ainda não foi feita.

Os experimentos com variações do pH do meio de cultura em que são postos a germinar esporos de *Trichipteris corcovadensis* mostram que estes germinam numa faixa relativamente ampla, em condições controladas. Após 14 dias observou-se que a maior taxa de germinação ocorre em meios de cultura preparados com pH 4,0, 4,5 e 5,5 porém no sétimo dia a maior taxa de germinação ocorreu no meio inicialmente ajustado para pH 5,0 e no controle (pH 4,9). Isto significa que um meio com pH 5,0, aproximadamente, inicialmente acelera o processo de germinação.

Em laboratório, para germinação dos esporos de *T. corco-*

vadensis, utilizando solução de Knop como meio de cultura, os melhores pH ajustados inicialmente são 4,0 e 4,5. PAGE (1979) comenta que a germinação de esporos de pteridófitas ocorre em uma larga faixa de variação de pH, portanto este não é um fator crítico. A acidez começa a ser um fator importante no ciclo de vida das pteridófitas somente após o estabelecimento do esporofito. CONWAY (1949) observou que para *Pteridium aquilinum* há uma faixa ótima para germinação dos esporos, em pH 5,5 a 7,5, embora inibição da germinação ocorra somente em condições extremamente ácidas, de pH 3,1 ou menos. .

A dosagem de lipídios em esporos de *Trichipteris corcovadensis* mostrou uma grande quantidade dos mesmos, constituindo mais de 50% do peso seco. CRAN (1970 in CRAN, 1979) demonstrou que em esporos de *Dryopteris pseudo-mas* lipídio representa 20% do peso seco. Em *Anemia phyllitidis* os lipídios representam mais de 50% do peso seco dos esporos (GEMMICH, 1977, 1982).

GEMMICH (1977) observou que em esporos de *Anemia phyllitidis* a quantidade inicial de lipídios diminuiu para mais da metade no 14º dia de germinação, chegando ao limite mínimo. Nos esporos de *Trichipteris corcovadensis* a quantidade de lipídio dos esporos permaneceu igual à inicial até o 14º dia. É possível que não se tenha observado variação na quantidade de lipídios porque no 14º dia a germinação é baixa (18,37) em valor angular, aproximadamente 10%, embora seja a máxima obtida.

Neste trabalho, o padrão utilizado para considerar um esporo como germinado é a protrusão do rizóide, o que ocorre somente no 12º dia na maior parte dos esporos. No sétimo dia, somente 12,74 (valor angular) de esporos de *T. corcovadensis* germinaram; isto corresponde a aproximadamente 4,5%. Este desenvolvimento é bem mais lento do que o observado em *Anemia phyllitidis*. Nessa espécie o rizóide rompe a parede após três dias de indução

do esporo embebido. Uma divisão celular ocorre a cada dia resultando em um filamento de 10 células após 10 dias e um protalo biplanar com 40 células após 20 dias.

É interessante observar que embora os esporos coletados do exemplar 11066-A e, 10/03/80 foram os que apresentaram maior quantidade de lipídio em relação ao peso seco, estes estão entre os menores esporos coletados de todos os exemplares e em todas as coletas.

Os esporos de *Trichipteris corcovadensis* coletados dos cinco exemplares não apresentam grandes variações no conteúdo de proteínas solúveis, pelo menos quando não embebidos. A menor quantidade foi encontrada em esporos do exemplar 11066-A coletados em 1980 ($8,2 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ de esporos) quando comparados com esporos dos exemplares 11066-B e C ($11,4 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ de esporos). Portanto, cerca de 1% do peso seco dos esporos é constituído de proteína solúvel. Este dado é bastante diferente do obtido por GEMMICH (1977) em esporos de *Anemia phyllitidis*. Nesta espécie, proteína solúvel é responsável por 10% do peso seco dos esporos. Existem evidências que proteínas são material de reserva em esporos de *Selaginella* e *Blechnum* (GULLVAG, 1971). Em espécies destes gêneros as proteínas formam grânulos envolvidos por uma membrana, e estes são digeridos junto com as gotas de lipídios durante a germinação. Em esporos de *Anemia phyllitidis* RAGHAVAN (1976) demonstra a presença de grande número de grânulos de proteínas em esporos embebidos até 48 horas no escuro. Após 4 horas de luz os grânulos de proteína diminuem de tamanho e após 20 horas desaparecem totalmente.

Foram realizados experimentos de germinação com esporos de *T. corcovadensis* sob diversas condições de luz, temperatura, meios de cultura, fotoperíodos e substâncias de crescimento, excluindo-se assim a hipótese de que algum fator externo estava

impedindo a germinação dos esporos dos exemplares 11066-A, C, D e E. De qualquer modo, esporos do exemplar 11066-B germinaram em várias destas condições, embora em baixa porcentagem. Concluindo, nunca se obteve germinação de esporos de quatro exemplares de *Trichipteris corcovadensis*, em várias coletas realizadas. Germinação somente ocorreu, embora pequena, em esporos das duas coletas do exemplar 11066-B. Nem o conteúdo de lipídios, nem o de proteína solúvel, explica a diferença de germinação entre os exemplares. Em decorrência disso, surgiu a hipótese de que os exemplares seriam híbridos de ocorrência natural.

A hibridização natural pode ter muitas formas e diferentes implicações genéticas e taxonômicas. Em plantas com sementes, híbridos entre duas espécies podem algumas vezes produzir uma geração fértil, isto é, capaz de produzir sementes e progênie. Isto é raro em pteridófitas, porém existem exceções (REICHSTEIN, 1981). Em *Pteris quadriaurita* e *P. multiaurita* ocorre hibridização, porém a meiose na progênie é perfeitamente regular. Neste caso podem ser observados dois tipos extremos de híbridos, com uma ampla faixa intermediária, porém todos são férteis (WALKER, 1958).

Porém encontradas evidências de hibridização introgressiva entre *Thelypteris serra* e *T. grandis*. Os espécimes típicos podem ser facilmente reconhecidos, mas em algumas áreas ocorrem intermediários. Os espécimes típicos praticamente são esporos abortivos, porém nos intermediários até 50% dos esporos são abortivos (SMITH, 1971).

Entre *Pityrogramma viscosa* e *P. triangulares* também ocorre hibridização, com uma ampla faixa de híbridos intermediários entre as duas espécies. A fertilidade dos esporos variou de 14 a 97% (ALT e GRANT, 1960).

Muitos outros exemplos de hibridização podem ser encontrados nos trabalhos de ALSTON (1940), MANTON (1950), BRITTON (1953),

WALKER (1979), REICHSTEIN (1981) e outros menos abrangentes. Na maior parte dos casos, a hibridização resulta em uma progênie estéril.

Segundo REICHSTEIN (1981), são dois os procedimentos necessários para o estudo de um híbrido: se possível, deve-se fazer um estudo citológico e sempre deve-se examinar o conteúdo dos esporângios (e, conseqüentemente, os esporos).

Neste trabalho foi feita inicialmente uma tentativa de se acompanhar o desenvolvimento da meiose durante a esporogênese, sob a orientação da Dra. Neusa D. da Cruz, do Instituto Agrônomo de Campinas. A técnica empregada foi o método de "squash", utilizando carmim-acético (MANTON, 1950). Esta linha de pesquisa foi, entretanto, abandonada para possivelmente retomá-la no futuro; a principal dificuldade foi a falta de disponibilidade de material nas fases que nos interessavam. O próprio material apresentava dificuldades, não se conseguindo visualizar claramente os cromossomos nem mesmo no esporo maduro, para verificação do número.

A alternativa de se estudar a variabilidade morfológica dos esporos era a mais viável. Partindo do princípio que os esporos dos cinco exemplares de *T. corcovadensis* não germinam ou têm baixa fertilidade devido a problemas de hibridização, e conseqüentemente no pareamento de cromossomos, estes esporos provavelmente apresentariam também alterações na sua morfologia que poderiam ser detectadas com o estudo morfológico dos mesmos.

Anormalidades morfológicas dos esporos são citadas por REEVE (1935) como indicadores de hibridização em espécies de *Selaginella*. MANTON (1950) cita a presença de esporos abortados em vários híbridos de pteridófitas. WAGNER e DARLING (1957) observaram esporos anormais e abortados em híbridos de *Asplenium*, naturais e obtidos em laboratório.

Em híbridos de *Asplenium heterochroum* e *A. resiliens* características intermediárias dos esporos e variações no aspecto da perina foram observadas por MOZENTI (1966). Em uma análise palinológica de híbridos interespecíficos do genero *Blechnum*, MORBELLI (1974) relata novamente a produção de esporos abortivos pelos híbridos. Estes esporos foram classificados como normais, anormais e não-desenvolvidos; os esporos anormais mostraram variações na forma, no tamanho e na ornamentação.

Ao se examinar os dados de morfologia em esporos de *T. corcovadensis* fica evidente que os parâmetros examinados não são comuns a todos os esporos de todos os exemplares.

As formas variadas dos esporos não podem ser associadas diretamente à não germinação dos esporos: esporos do exemplar B (que germinam) não têm variação na forma, porém os esporos de duas coletas do exemplar A (que não germinam) apresentam uma variação mínima na forma.

O tamanho dos esporos aparentemente não têm relação com sua viabilidade. Esporos do exemplar 11066-B têm o maior diâmetro equatorial entre as amostras observadas, porém esta medida não é estatisticamente diferente da obtida com os esporos coletados do exemplar 11066-A em 23/03/81, que não germinam.

Quanto à superfície dos esporos, ocorrem variações que tornam difícil agrupá-la como característica. Pode-se destacar a presença de uma perina bem mais evidente em esporos do exemplar B. Ao microscópio eletrônico de varredura a perina deste exemplar é caracterizada por filamentos bastante grossos, porém perina está presente em esporos de todos os exemplares.

Uma outra possibilidade para a não germinação dos esporos seria a imaturidade dos mesmos, porém é pouco provável que em todas as coletas realizadas nos exemplares 11066-A, C, D, e E não tenha sido coletado um único esporo maduro. Além disso, perina é

uma característica de esporos maduros, segundo ERDTMAN (1947) , HARRIS (1955 in GASTONY, 1974) e GASTONY (1974). Nas coletas realizadas, perina está presente em esporos de todos exemplares. Mesmo no exemplar E, o que apresentou menos esporos com perina, aproximadamente 60% dos esporos estariam maduros.

Na maior parte dos esporos de todas as coletas foi observado conteúdo celular, pelos métodos do carmim-acético e Wodehouse. Foi determinado que os esporos do exemplar 11066-A consumiam oxigênio, após 24 horas de embebição.

Em resumo, pode-se dizer que:

1) embora grande número de esporos de todos os exemplares fossem potencialmente viáveis, somente esporos do exemplar 11066-B germinaram.

2) apesar de existirem diferenças morfológicas entre os esporos dos cinco exemplares, nenhuma característica estudada separa totalmente o exemplar 11066-B (que germina) dos outros exemplares.

Estes dados levam-nos a supor que os exemplares estudados realmente são híbridos, talvez inclusive o exemplar 11066-B. É possível que este exemplar tenha características mais próximas da espécie *Trichipteris corcovadensis* e seja um híbrido que tenha mantido uma baixa fertilidade, como alguns casos citados na literatura. Em híbridos diplóides de pteridófitas às vezes ocorre que algumas células-mãe não se separam, e permanecendo juntas, formam um núcleo reconstituído. Este núcleo sofre uma divisão mitótica, dando origem a dois esporos diplóides, capazes de germinar e originar gametofitos diplóides. Formação de esporos diplóides foi observada em híbridos de *Asplenium adiantum* e *A. nigrum*, e *Asplenium cuneifolium* e *A. onopteris* (SHIVAS, 1969; REICHSTEIN, 1981).

As características morfológicas observadas em esporos do exemplar 11066-B são muito semelhantes às observadas por GASTONY (1979) na sua análise palinológica de *Trichipteris corcovadensis*. A germinação mais elevada obtida com esporos do exemplar B de *Trichipteris corcovadensis* foi 18,9 (valor angular), sob luz fluorescente branca de 220 ou 320 $\mu\text{W}.\text{cm}^{-2}$, em fotoperíodos de 8 e 24 horas e temperatura constante de 25°C.

A hipótese de que os exemplares estudados são híbridos somente poderá ser confirmada se posteriormente forem retomados os estudos citológicos. Porém, estes não parecem ser possíveis utilizando os exemplares estudados aqui, pois o exemplar 11066-B foi acidentalmente derrubado na mata onde ocorria.

RESUMO

Poucos trabalhos têm sido realizados no Brasil sobre germinação de esporos de pteridófitas, apesar da grande variedade de espécies existentes. Neste trabalho foi estudada a germinação de esporos de *Trichipteris corcovadensis* (Raddi) Cople, sob várias condições de luz, temperatura, pH e substâncias de crescimento; foram verificados também o conteúdo total de lipídios e proteínas solúveis dos esporos. Foi feito também um estudo palinológico de esporos coletados de vários exemplares, visando encontrar alterações que pudessem ser associadas aos resultados de germinação.

Foram coletados esporos de cinco exemplares (11066-A, B, C, D, e E) de *T. corcovadensis*, de ocorrência natural na mata do Instituto de Botânica de São Paulo. O consumo de oxigênio dos esporos do exemplar A foi determinado pelo aparelho de Warburg. A viabilidade dos esporos dos cinco exemplares foi verificada pelo método do carmin-acético.

Os experimentos de germinação foram feitos em câmaras de crescimento com luz e temperatura controladas. Utilizou-se como meio de cultura solução de Knop autoclavada e acrescida de fungicida. Verificou-se o efeito de várias temperaturas constantes e pares de temperaturas alternadas na germinação dos esporos. Ácido indolil-3-acético, ácido giberélico, 6-benziladenina e ácido 2-etilfosfônico foram testados em concentrações de 0 até $100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Foram verificados os efeitos de várias intensidades luminosas e fotoperíodos sobre a germinação. Esporos foram postos a germinar

sob luz vermelha, vermelho-extremo, azul e verde. O meio de cultura foi preparado com pH variando de 3,5 a 6,0.

Os lipídios foram dosados nos esporos não embebidos e embebidos até 14 dias e as proteínas solúveis foram dosadas em esporos secos.

Somente esporos do exemplar B germinaram. Os esporos são fotoblásticos positivos, não germinando no escuro em nenhuma condição.

A melhor temperatura constante para a germinação é 25°C, não superada por nenhum par de temperaturas.

As quatro substâncias de crescimento testadas, AIA, GA₃, 6-BA, e etileno (CEPA) inibiram a germinação dos esporos, em diferentes proporções..

Os esporos germinam melhor nas menores intensidades de luz testadas e germinam igualmente em fotoperíodos de 8 a 24 horas. A germinação também é igual sob vermelho, vermelho-extremo, azul e verde.

Os esporos germinam melhor em meios de cultura com pH aproximadamente 5,0, embora germinação ocorra em todos os pHs testados.

Mais de 50% do peso dos esporos é resultante de lipídios. Não foram observadas diferenças no conteúdo de lipídio em esporos estocados a 4°C ou 25°C; também não foram observadas diferenças entre esporos embebidos por 4, 7, 11 e 14 dias.

O conteúdo de proteínas solúveis é ligeiramente menor em esporos de uma coleta do exemplar A, permanecendo por volta de 10 µg.ml⁻¹ de esporos.

Para o estudo palinológico sob microscópio óptico os esporos de todos os exemplares foram acetolisados e medidos. A perina foi observada utilizando-se o método do carbonato de sódio e o conteúdo celular pelo método de Wodehouse. Os esporos foram tam

bém analisados em microscopia eletrônica de varredura.

Foram observadas variações de tamanho, forma e aspecto da superfície dos esporos. Perina e conteúdo celular são encontrados em esporos de todos os exemplares.

Em síntese, pode-se destacar os seguintes resultados:

- 1) somente esporos do exemplar B germinam, porém em pequena quantidade.
- 2) os esporos dos outros exemplares parecem viáveis, pois coram-se por carmin-acético, têm conteúdo celular e foi observado consumo de oxigênio em esporos do exemplar A.
- 3) nenhuma característica morfológica separa o exemplar B totalmente dos outros exemplares.
- 4) esporos dos exemplares que não germinam provavelmente não são imaturos, pois apresentam perina.

Estes dados levam-nos a supor que talvez os exemplares sejam híbridos de ocorrência natural. Talvez até mesmo o exemplar que germina (B) seja um híbrido que mantém uma baixa fertilidade. Para confirmação desta hipótese seria necessário um estudo citológico posterior que provavelmente não será possível, pois o exemplar B foi acidentalmente derrubado.

BIBLIOGRAFIA

- ALSTON, A.H.G., 1940. Notes on the supposed hybrids in the genus *Asplenium* found in Britain. Proc. Linn. Soc. London 152: 132-144.
- ALT, K.S. e GRANT, V., 1960. Cytotaxonomic observations on the gold-back fern. *Brittonia* 12: 153-170.
- BELL, P.R., 1979. The contribution of the ferns to an understanding of the life cycles of vascular plants. In A.F. Dyer (ed) The Experimental Biology of Ferns. Academic Press, London, pp. 57-85.
- BIERHORST, D.W., 1970. A vascular plant with a dominant gametophyte: *Actinostachys* sp. Am. J. Bot. 57: 744-749.
- BILDERBACK, D.E., BILDERBACK, D.E., JALM, T.L. e FONSECA, J.R., - 1974. The locomotor behavior of *Lygodium* and *Marsilea* sperm. Am. J. Bot. 61 : 888-890.
- BRADFORD, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248-254.
- BRITTON, C.M., 1953. Chromosome studies in ferns. Am. J. Bot. 40: 575-583.

- CHEN, C.Y. e IKUMA, H., 1979. Photocontrol of the germination of *Onoclea* spores. V. Analysis of germination processes by means of temperature. *Plant Physiol.* 63: 704-708.
- CHENG, C.Y. e SCHRAUDOLF, H., 1974. Nachweis vom Abscisinsäure in Sporen und jungen Prothallien von *Anemia phyllitidis* L. Sw. *Z. Pflphysiol.* 71: 366-369.
- 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.
- CRABBE, J. A., JERMY, A.C. e MICKEL, J.T., 1975. A new general sequence for the pteridophyte herbarium. *Fer Gaz.* 11:141-162.
- CRAN, D.G., 1979. The ultrastructure of fern gametophyte cells. In A.F. Dyer (ed) *The Experimental Biology of Ferns*. Academic Press, London, pp. 171-212.
- CRUZ, M.A.V., 1982. Contribuição ao estudo palinológico das Sapindaceae. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas.
- DYER, A.F., 1979. The culture of fern gametophytes for experimental investigation. In A.F.Dyer (ed) *The Experimental Biology of Ferns*. Academic Press, London, pp. 253-305.
- DYER, A.F. e CRAN, D.G., 1976. The formation and ultrastructure of rhizoids on protonemata of *Dryopteris borreri* Newm. *Ann. Bot. (Lond.)* 40: 757-766.

- EDWARDS, M.E. e MILLER, J.H., 1972. Growth regulation by ethylene in fern gametophytes. II. Inhibition of cell division. *Am. J. Bot.* 59: 450-457.
- ERDTMAN, G., 1943. An introduction to pollen analysis. Waltham: Chronica Botanica Company. 239 p.
- ERDTMAN, G., 1947. Suggestions for the classification of fossil and recent pollen grains and spores. *Svensk. Bot. Tidskr.* 41: 104-114.
- ERDTMAN, G., 1952. Pollen morphology and plant taxonomy. Angiosperms, Stockholm: Almqvist & Wiksell. 539 p.
- 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. 486 p.
- EVANS, A.M., 1964. Aneiotic alternation of generations: a new life cycle in ferns. *Science.* 143: 261-263.
- EVENARI, M., 1965. Light and seed dormancy. In W. Ruhland (ed), *Encyclopedia of Plant Physiology*. Vol. 1512, Springer-Verlag Berlin, pp. 804-847.
- FARRAR, D.R., 1974. Gemmiferous fern gametophytes Vittariaceae. *Am. J. Bot.* 61: 146-155.

- FELIPPE, G.M., 1978. Effects of temperature on germination of *Rumex obtusifolius*. Revta. do Museu Paulista 25: 173-181.
- FELIPPE, G.M., GHERARDI, E., PENTEADO, L.B.K., ANNES, V.C.S. e SENE, A., 1970. Detecção de giberelinas durante a germinação de *Rumex obtusifolius*. L. Arq. Inst. Biol. (São Paulo) 37: 177-187.
- FERREIRA NETO, W.M., 1983. Efeito de luz e temperatura na germinação de esporos de *Cyathea delgadii* Sternb. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas.
- FISHER, R.M. e MILLER, J.H., 1975. Growth regulation by ethylene in fern gametophytes. IV. Involvement of photosynthesis in overcoming ethylene inhibition of spore germination. Am. J. Bot. 62: 1104-1111.
- FISHER, R.A. e YATES, F., 1971. Tabelas estatísticas para pesquisa em Biologia, Medicina e Agricultura, São Paulo: Ed. Polígono e Ed. da Universidade de São Paulo. 150 p.
- GANTT, E. e ARNOTT, H.J., 1965. Spore germination and development of the young gametophyte of the ostrich Fern (*Matteuccia struthiopteris*). Am. J. Bot. 52: 82-94.
- GASTONY, G.J., 1974. Spore morphology in the Cyatheaceae. I. The perine and sporangial capacity: general considerations: Am. J. Bot. 61: 672-680.
- GASTONY, G.J., 1979. Spore morphology in the Cyatheaceae. III. The genus *Trichipteris*. Am. J. Bot. 66: 1238-1260.

- GASTONY, G.J. e TRYON, R.M., 1976. Spore morphology in the Cyathea-
ceae. II. The genera *Lophosoria*, *Metaxya*, *Sphaeropteris*, *Alsophila*,
e *Nephelea*. Am. J. Bot. 63: 738-758.
- GEMMRICH, A.R., 1977. Mobilization of reserve lipids in germinating
spores of fern *Anemia phyllitidis* L. Plant Sci. Lett. 9: 301-
307.
- 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.
- GULLVAG, B., 1971. The fine structure of some pteridophyte spores
before and during germination. In G. Erdtman e P. Sorsa (eds)
Pollen Spore Morphology/Plant Taxonomy. Stockholm: Almqvist &
Wiksell. 361 p.
- HARTT, C.E., 1925. Conditions for germination of spores of *Onoclea*
sensibilis. Bot. Gaz. 79: 427-440.
- HILLMAN, W.S., 1967. The physiology of phytochrome. A. Rev. Pl.
Physiol. 18: 301-324.
- HOWLAND, G.P. e EDWARDS, M.E., 1979. Photomorphogenesis in fern
gametophytes. In A.F.Dyer (ed) The Experimental Biology of
Ferns. Academic Press, London, pp. 393-434.
- HUCKABY, C.S. e RAGHAVAN, V., 1981. Photocontrol of spore germina-
tion in the fern *Thelypteris kunthii*. Physiol. Plant. 51: 19-22.

- JARVIS, S.J. e WILKINS, M.B., 1973. Photoresponses of *Matteuccia struthiopteris* (L.) Todaro. I. Germination. *J. Exp. Bot.* 24: 1149-1157.
- KLEKOWSKI, Jr, E.J., 1972. Evidence against genetic self-incompatibility in the homosporous ferns. *Evolution* 26: 66-73.
- KLEKOWSKI, Jr, E. J., 1979. The genetics and reproductive biology of ferns. In A. F. Dyer (ed) *The Experimental Biology of Ferns*. Academic Press, London, pp. 133-170.
- KLEKOWSKI, Jr. E. J. e BAKER, H.G., 1966. Evolutionary significance of polyploidy in the Pteridophyta. *Science* 153: 305-307.
- MANTON, I., 1950. *Problems of Cytology and Evolution in the Pteridophyta*. Cambridge University Press, Cambridge. 316 p.
- MELHEM, T.S. e MATOS, M.E.R., 1972. Variabilidade de forma nos grãos de pólen de *Eriope crassipes* Benth. - Labiatae. *Hoehnea* 2: 1-10.
- MELHEM, T.S., GIULIETTI, A.M., FORERO, E., BARROSO, G.M., SILVESTRE, M. S.F., JUNG, S.L., MAKINO, H., MELO, M.M.R.F., CHIEA, S.C., WANDERLEY, M.G.L., KIRIZAWA, M. e MUNIZ, C., 1981. Planejamento para a elaboração da "Flora Fanerogâmica da Reserva do Parque Estadual da Fontes do Ipiranga (São Paulo, Brasil)". *Hoehnea* 9: 63-74.
- MILLER, J.H., 1968. Fern gametophytes as experimental material. *Bot. Rev.* 34: 361-440.

- MILLER, J.H. e GREANY, R.H., 1974. Determination of rhizoid orientation by light and darkness in germinating spores of *Onoclea sensibilis*. Am. J. Bot. 61: 296-302.
- MILLER, J.H. e MILLER, P.M., 1967. Action spectra for light-induced elongation in fern protonemata. Physiol. Plant. 20: 128-138.
- MORBELLI, M.A., 1974. Analisis palinologico en hibridos interespecificos del genero *Blechnum* L., subgenero *Blechnum*. Bol. Soc. Argentina Bot. 15: 446-466.
- MORZENTI, V. M., 1966. Morphological and cytological data on Southeastern United States species of the *Asplenium heterochroum-resiliens* Complex. Am. Fern J. 56: 167-177.
- NAKAYAMA, S., BORTHWICK, H.A. e HENDRICKS, S.B., 1960. Failure of photoreversible control of flowering in *Pharbitis nil*. Bot. Gaz. 121: 237-243.
- NAYAR, B.K. e KAUR, S., 1971. Gametophytes of homosporous ferns. Bot. Rev. 37: 295-396.
- PAGE, C.N., 1979. The diversity of ferns. An ecological perspective. In A. F. Dyer (ed) The Experimental Biology of Ferns. Academic Press, London, pp. 9-56.
- PETTITTI, J.M. 1979. Ultrastructure and cytochemistry of spore wall morphogenesis. In A. Dyer, (ed) The Experimental Biology of Ferns. Academic Press, London, pp. 213-252.

- 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., 1976. Gibberellic acid-induced germination of spores of *Anemia phyllitidis*: Nucleic acid and protein synthesis during germination. *Am. J. Bot.* 63: 960-972.
- RANAL, M. A., 1983. Efeito da temperatura e da intensidade luminosa no desenvolvimento de gametofitos de pteridófitas. Tese de mestrado. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Rio Claro.
- RANDI, A.M., 1980. Germinação de *Stevia rebaudiana* Bert. Tese de mestrado. Universidade Estadual de Campinas.
- REEVE, R.M., 1935. Spores of genus *Selaginella* in Nort-Central and Northeastern United States. *Rhodora* 37: 342-345.
- REICHSTEIN, T., 1981. Hybrids in european Aspleniaceae (Pteridophyta). *Bot. Helvetica* 91: 89-139.
- REYNOLDS, T.L. e RAGHAVAN, V., 1982. Photoinduction of spore germination in a fern, *Mohria caffrorum*. *Ann. Bot.* 49: 227-233.
- RIBA, R., 1967. Revision monográfica del complejo *Alsophila Swartziana* Martius (Cyatheaceae). *An. Inst. Biol. Univ. Nac. Auton. Mex.* 38: 61-100.

- SALGADO-LABOURIAU, M.L., VANZOLINI, P.E. 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.
- SHEFFIELD, E. e BELL, P.R., 1981. Experimental studies of spore germination in ferns. *Ann. Bot.* 47: 187-195.
- SHIVAS, M.G., 1969. A cytotaxonomical study of the *Asplenium adiantum-nigrum* complex. *Brit. Fern Gaz.* 10: 68-80.
- SMITH, A.R., 1971. Systematics of the neotropical species of *Thelypteris* Section *Cyclosorus*. *Univ. Calif. Pubs. Bot.* 59: 1-136.
- SMITH, D.L. e ROBINSON, P.M., 1969. The effects of fungi on morphogenesis of gametophytes of *Polypodium vulgare* L. *New Phytol* 68: 113-122.
- SNEDECOR, G.N., 1962. *Statistical Methods*. The Iowa State University Press, Ames., 534 p.
- 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. e FURUYA, M., 1967. Photomorphogenesis in *Pteris vittata*. I. Phytochrome-mediated spore germination and blue light interaction. *Plant Cell Physiol.* 8: 737-748.
- SUGAI, M. e FURUYA, M., 1977. Diverse responses of spores in light-dependent germination of *Lygodium japonicum*. *Plant Sci. Lett.* 8: 333-338.

TOWILL, L.R., 1978. Temperature and photocontrol of *Onoclea* spore germination. *Plant Physiol.* 62: 116-119.

TOWILL, L.R. e IKUMA, H., 1973. Photocontrol of the germination of *Onoclea* spores. I. Action spectrum. *Plant Physiol.* 51: 973-978.

TOWILL, L.R. e IKUMA, H., 1975a. Photocontrol of the germination of *Onoclea* spores. II. Analysis of germination processes by means of anaerobiosis. *Plant Physiol.* 55: 150-154.

TOWILL, L.R. e IKUMA, H., 1975b. Photocontrol of the germination of *Onoclea* spores. III. Analysis of germination processes by means of cycloheximide. *Plant Physiol.* 55: 803-808.

TRYON, R.M., 1970. The classification of the Cyatheaaceae. *Contr. Gray Herb. Harv. Univ.* 200: 3-53.

UMBREIT, W.W., BURRIS, R.H. e STAUFFER, J.F., 1964. *Manometric Techniques*. Burges Publishing Company, Minneapolis, 305 p.

WAGNER, W.H. e DARLING, T., 1957. Synthetic and wild *Asplenium gravesii*. *Brittonia* 9: 57-63.

WALKER, T.G., 1958. Hybridization in some species of *Pteris* L.. *Evolution* 12: 82-92.

WALKER, T.G., 1979. The cytogenetics of ferns. In A.F.Dyer (ed) *The Experimental Biology of Ferns*. Academic Press, London, pp. 87-132.

WEINBERG, E.S. e VOELLER, B.R., 1969. External factors inducing germination of ferns spores. *Amer. Fern. J.* 59:153-167.

WHITTIER, D.P., 1964. The influence of cultural conditions on the induction of apogamy in *Pteridium* gametophytes. *Am. J. Bot.* 51: 730-736.

WHITTIER, D.P., 1965. Obligate apogamy in *Cheilanthes tomentosa* and *C. alabamensis*. *Bot. Gaz.* 126: 275-281.

WHITTIER, D.P., 1966. The influence of growth substances on the induction of apogamy in *Pteridium* gametophytes. *Am. J. Bot.* 53: 882-886.

WHITTIER, D.P., 1970. The initiation of sporophytes by obligate apogamy in *Cheilanthes castanea*. *Am. J. Bot.* 57: 1249-1254.

WHITTIER, D.P., 1973. The effect of light and others factors on spore germination *Botrychium dissectum*. *Can. J. Bot.* 51: 1791-1794.

WHITTIER, D.P. e PRATT, L.H., 1971. The effect of light quality on the induction of apogamy in prothalli os *Pteridium aquilinum*. *Plant (Berl.)* 99: 174-178.

WODEHOUSE, R.P., 1935. Pollen grains. Their structure, identification and significance in science and medicine. McGraw-Hill Book Company, New York (19 ed.). 574 p.